

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**PC12 HÜCRELERİNDE 1-METİL 4-FENİLPRİDİNYUM (MPP⁺)
İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE
ZONİSAMİD'İN Ca⁺² SİNYALI, OKSİDATİF STRES, HÜCRE
CANLILIĞI, KASPAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ.**

Dr. Semih GÜRLER

**UZMANLIK TEZİ
NÖROLOJİ ANABİLİMDALI**

**I. DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

2011 - ISPARTA

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ'ye ve Doç. Dr. H. Rifat KOYUNCUOĞLU'na başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN, Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ'ye;

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ'a;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma; Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme;

İhtisas dönemimde ve tez aşamasındaki çalışmalarım boyunca desteği, fedakârlığı, sevgisi ile bana hep ümit veren eşim Dr. Yeliz GÜRLER'e;

Teşekkür ederim...

Dr. Semih GÜRLER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
GRAFİKLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Parkinson Hastalığı	3
2.1.1. Parkinson Hastalığının Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3. Sınıflandırma.....	4
2.1.3.1. Parkinsonizm sınıflması (18).....	4
2.1.4. Etyoloji.....	6
2.1.4.1. Parkinson Hastalığı ve MPTP	7
2.1.5. Parkinson Patogenezi.....	8
2.1.5.1. Oksidatif Stres	8
2.1.5.2. Mitokondrial Disfonksiyon	11
2.1.5.3. Ekzitotoksisite	13
2.1.5.4. Nörotrofik Faktörler.....	14
2.1.5.5. Glial İmmün Modülatörler	15
2.1.5.6. İntrasellüler Kalsiyum Homeostazisi ve Bozuklukları	16
2.1.5.7. Apoptozis	17
2.1.5.7.1. İçsel Yol	18
2.1.5.7.2. Dışsal Yol	19
2.1.5.7.3. Kaspazlar ve Apoptozis.....	19
2.1.5.7.4. Parkinson Hastalığı ve Apoptoz Bağlantısı.....	20
2.2. Zonisamid	22
2.2.1. Zonisamid ve Parkinson Hastalığı.....	23
2.3. PC12 Hücreleri.....	26
2.4. Hücre Canlılığının MTT Analiziyle Saptanması	28
3. MATERYAL METOD	29

3.1. Materyaller.....	29
Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	29
Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.2. Metot	31
3.2.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Tedavi	31
3.2.2. PC12 Hücre Kültürü	31
3.3. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü	32
3.3.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri	32
3.3.2. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi.....	33
3.3.3. Lipid Peroksidasyon Analizi.....	34
3.3.4. MTT Analizi.....	34
3.3.5. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. PC12 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu Düzeyleri	36
4.2. PC12 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri.....	37
4.3. PC12 hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu [Ca ⁺²] Salınımı Düzeyleri	40
4.4. PC12 Hücre Gruplarında Kaspaz -3 Düzeyinin Tayini.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
ÖZET.....	54
SUMMARY.....	55
KAYNAKLAR.....	56

KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	: 2-amino-3-hidroksi-5-metilisoxazol-4-yl propionic acid
Alfa-KG	: Alfa-ketoglutarate dehidrogenaz
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BSO	: Buthionine sulphoximine
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
DD	: Dopa dekarboksilaz
DOPAC	: 3-4 dihidroksi fenilasetikasit asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Fe⁺²	: Demir iyonu
GSH R	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HVA	: Homovanilik asit
HCl	: Hidroklorik asit
IP₃	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
K⁺	: Potasyum iyonu
LD	: Levodopa
MAO-B	: Monoamin Oksidaz-B
MDA	: Malondialdehit
MPTP	: 1-metil 4 -fenil, 1,2,3,6 tetrahidropiridin
MPPP	: 1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine
MPP⁺	: 1-methyl-4-phenylpyridinium
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
Na⁺	: Sodyum iyonu
NAD⁺	: Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NGF	: Nöronal büyüme faktörü
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksid
NOS	: Nitrik oksid sentaz
O₂	: Moleküler oksijen
O₂^{-·}	: Süperoksit radikali
OH[·]	: Hidroksil radikali
PH	: Parkinson hastalığı
PC12	: Rat feokromasitoma hücre dizisi
PIP₂	: Fosfoinositoldifosfat
PARP	: Poli-ADP riboz polimeraz
ROOH	: Hidroperoksit
SOD	: Süperoksid dismutaz
SNe	: Substantia nigra
TBARS	: Tiyobarbitürik asit
TNF-alfa	: Tümör nekroz faktör- alfa
TH	: Tirozin Hidroksilaz
UPDRS	: Unified Parkinson's Disease Rating Scale
ZNS	: Zonisamid
6-OHDA	: 6- Hidroksi dopamin

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	33
Tablo 2. PC12 hücrelerinde lipit peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerinde MPP ve Zonisamid'in etkileri	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. MPPP'den MPTP oluşumu	7
Şekil 2. MPTP'den Monoamin Oksidaz-B (MAO-B) enzimi ile MPP+ oluşumu.....	8
Şekil 3. MPTP nörotoksisitesinin mekanizması.....	8
Şekil 4. Dopamin metabolizması, H ₂ O ₂ , GSH ve Fe ⁺² oksidatif reaksiyonları.....	9
Şekil 5. Serbest radikaller ve enzimatik detoksifikasyonu .	11
Şekil 6. Parkinson hastalığı yaşlanma modelinde Ca ⁺² iyonunun rolü.....	17
Şekil 7. Hücre içi ve hücre dışı yollarla uyarılan apoptozun genel işleyiş mekanizması.	19
Şekil 8. Kaspazların proteolitik olarak aktivasyonu.....	20
Şekil 9. Zonisamid biyokimyasal yapısı	22
Şekil 10. İnsanda ZNS'in metabolik yolu. SMAP:2-sulfamoylacetyl-phenol, G: glucuronide.....	23
Şekil 11. Zonisamidin dopamin sistemi üzerine etkisi.	25
Şekil 12. ZNS T-tipi Ca ⁺² kanalları yoluyla TH sentezini aktive etmesi	25
Şekil 13. PC12 hücrelerinin faz kontrast mikroskopik görünümü	27
Şekil 14. PC12 hücrelerine nöronal büyüme faktörü ilave edilmesiyle oluşan faz kontrast mikroskopik görünüm.....	27

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. PC12 hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeyleri	37
Grafik 2. PC12 hücre gruplarında GSH düzeyleri.....	38
Grafik 3. PC12 hücre gruplarında GSH-Px düzeyleri	38
Grafik 4. Değişik doz ve saatlerde MPP ⁺ 'nin hücre canlılığı (MTT) üzerine etkileri	39
Grafik 5. Değişik doz ve saatlerde zonisamid'in hücre canlılığı (MTT) üzerine etkileri.	40
Grafik 6. PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H ₂ O ₂) neden olduğu sitozole Ca ⁺² salınımı üzerindeki etkileri	41
Grafik 7. Kontrol grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	41
Grafik 8. MPP ⁺ grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	42
Grafik 9. ZNS grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği	42
Grafik 10. ZNS+MPP ⁺ grubunda sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği.....	43
Grafik 11. PC12 hücre gruplarının sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği.....	43
Grafik 12. PC12 hücre gruplarında Kaspaz-3 aktivitesi	44

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), çevresel ve genetik nedenlerin ortaklaşa neden olduğu, dopaminerjik nigrostriatal ve diğer nöron sistemlerinin ilerleyici harabiyetine bağlı olarak ortaya çıkan motor ve non- motor semptomlarla karakterize, sinsi başlangıçlı progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Bradikinezi, istirahat tremoru, rijidite, postural denge bozukluğu Parkinson hastalığının temel bulgularıdır(1-5).

Parkinson hastalığı tüm etnik gruplarda görülen, hafifçe erkek predominansına sahip bir hastalıktır. Prevelansı 65-90 yaşları arasında artmaktadır. Tüm populasyonun % 0.3'ünü etkilemekle beraber, bu oran 65 yaşın üzerinde %3'e yükselmektedir. Hastaların % 5-10'unda semptomlar 40 yaşın altında ortaya çıkmaktadır(6).

Parkinson hastalığı günümüzde tedavide kaydedilen ilerlemlere rağmen önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Etyopatogenezinde rol oynayan substantia nigra nöronlarının dejenerasyonu kesin olarak anlaşılamadığından bu süreci önleyecek bir tedavi geliştirilememiştir.

Parkinson hastalığından etkilenen kişilerin sıklığı, tanıdan sonraki uzun yaşam süresi, hastalığın progresif özelliği ve ilaçların kısa etki süresi göz önüne alındığında; yaşam kalitesi ile fonksiyonel durumu iyileştirmek ve hastalığın toplum üzerindeki yükü azaltılmaya çalışılmaktadır. Bu yönde birçok klinik ve deneysel çalışma yürütülmektedir (7).

Bu araştırmaların büyük bir kısmı Parkinson hastalığı patogenezinde önemli bir rolü olan nörodejenerasyon üzerine yoğunlaşmıştır. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde oksidatif stres, eksitotoksik mekanizmalar, mitokondriyal enerji metabolizması, apoptozis ve intrasellüler kalsiyum dengesindeki bozuklukların etken olabileceğine ilişkin bilgiler mevcuttur. Son yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda pek çok nörodejeneratif hastalığı etyolojisinde serbest radikal oluşumunun önemli rolü olduğuna ilişkin ipuçları elde edilmiştir (8-10). Bu hastalıklar arasında serebrovasküler olaylar, travma, epilepsi, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Multipl skleroz ve çeşitli demiyelinizan hastalıklar gibi beyin ve sinir sistemi hastalıkları yer almaktadır .Bu

hastalıklarda görülen hücre ölümünün nekroz veya apopitoz şeklinde olabildiği gösterilmiş (9,10).

Dopaminerjik hücre ölümünde apopitozisin rol oynadığı gerçeği, birçok in vitro ve in vivo çalışma ile desteklenmiştir (11,12). Deneysel parkinsonizm geliştirilen bazı hayvan modellerin de apopitozis dopamin nöronların da başlatılabilmektedir. 1-metil 4-fenil,1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP)'nin metabolitleri aracılığıyla mitokondriyal elektron transport zinciri kompleks -1 inhibe ederek insan ve hayvanda parkinsonizme yol açtığı saptanmıştır. Günümüzde bir çok çalışmada deneysel indükleyici olarak kullanılmaktadır (12).

Esasen bir antiepileptik olarak dünyada kullanılan Zonisamid (1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) molekülü benzisoxole yapısında uzun yarıömürlü (63 saat) iyi tolere edilen bir ilaçtır. Molekülünün yapılan klinik ve deneysel araştırmalarda, Parkinson hastalarının motor fonksiyonlarında iyileşme sağladığı, nöroprotektivite ve oksidatif stres üzerinde etkili olduğuna dair kanıtlar saptanmıştır (13).

Biz çalışmamızda, PC12 nöronal hücreleri üzerinde 1-metil-4-fenilpridinyum (MPP⁺) ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde, Zonisamidin oksidatif stres, hücre canlılığı, Ca⁺² sinyali, kaspaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Parkinson Hastalığının Tanımı ve Tarihçesi

Parkinsonizmin en sık görülen biçimi olan Parkinson hastalığı ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlanmıştır. Ondokuzuncu yüzyılda yaşamış bir İngiliz hekimi olan James Parkinson “Shaking Palsy” (Titrek felç) isimli makalesinde bu hastalığı tanımlayan ilk kişidir ve hastalığa “Paralysis Aجتans” adını vermiştir. Fransız hekim Jean Marie Charcot Parkinson’un orijinal tanımına kas rijiditesi, mikrografi, duysal değişiklikler gibi birçok özelliği eklemiş ve hastalığa onu tanımlayan ilk kişinin adını vermiştir (1). 1919 yılında Tretiakoff ve arkadaşları hastalıkla ilişkili olarak substantia nigra da dopaminerjik nöronların kayıp olduğu açıklanmıştır. 1960 da Ehringer ve Hornykiewicz Parkinson hastalarının sitriatumunda dopamin eksikliğini bildirmiştir. 1967 ve da cotzias ve arkadaşları levedopanın Parkinson hastalığında klinik kullanıma girmesini sağlamışlardır.(14)

Patolojik olarak en fazla substansiya nigradaki pigmentli nöronlarda kayıp ve buna eşlik eden tipik eozinofilik sitoplazmik inklüzyon cisimlerin (Lewy intranöral inklüzyon cisimleri) varlığı ile karakterizedir. Günümüzde bu hastalığın semptomlarının gelişmesinden sorumlu nigral dejenerasyonun nedeni bilinmemektedir (15).

Parkinsonizm altı kardinal bulgunun kombinasyonu şeklinde ortaya çıkan bir sendromdur. İstirahat tremoru, rijidite, bradikinezi, postural refleks kaybı, fleksiyon postürü ve donma ile karakterizedir. PH, parkinsonizmin en yagın görülen klinik örneği olup, idiyopatik Parkinsonizm olarak da adlandırılır. Sinsi başlangıçlı, yavaş ilerleyen progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (16).

2.1.2. Epidemiyoloji

Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Son yıllarda PH nin etyopatonezine ilişkin bilgilerimiz özellikle genetik formlarının ve patojenik mutasyoların belirlenmesi ile artış gösterdi.

Epidemiyolojik çalışmalar PH'nın sıklığını göstermenin yanında analitik yöntemlerin aracılığıyla belli risk faktörlerini belirleyebilmiştir (17).

Mevcut çalışmalar incelendiğinde kaba insidans rakamları tüm yaş grupları için 100000'de 4.5 ile 19 arasında değişmektedir. Ancak benzer metodolojili çalışmalar kıyaslandığında ve rakamlar referans topluma uyarlandığında insidans rakamları arasındaki aralık daralmaktadır. Bu durumda insidans 100000 kişi yıl için 11 ile 13.9 arasındadır. Parkinson hastalığı insidansının en önemli belirleyicisi yaştır. Hemen tüm çalışmalarda 50 yaş altında PH oldukça nadirdir. Parkinson hastalığı insidansı 6 ile 8. dekatlar arasında kararlı bir şekilde artış gösterir ancak ileri yaşlarda insidansın azaldığını gösteren çalışmalar da vardır. Parkinson hastalığı insidansı çoğu toplumda erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Kaliforniya'da yapılan bir çalışmada erkeklerde %9.1 daha yüksek(19/100 000 erkeklerde; 9.9/100 000 kadınlarda) bulunmuştur (17).

Tıpkı insidans çalışmasında olduğu gibi Finlandiya'da iki farklı zaman diliminde yapılan bir çalışmada PH prevalansı erkeklerde ve kırsal alanda yaşayanlarda artmış görünmektedir (17).

2.1.3. Sınıflandırma

2.1.3.1. Parkinsonizm sınıflması (18)

1- Primer (İdyopatik) Parkinsonizm

- ▶ Parkinson Hastalığı
- ▶ Jüvenil Parkinsonizm

2- Sekonder (Edinsel, semptomatik) Parkinsonizm

- ▶ İnfeksiyöz: Postensefalitik, yavaş virüs enfeksiyonu, AIDS
- ▶ İlaçlar: Dopamin reseptör blokerleri (Antipsikotikler, antiemetikler), rezerpin, tetrabenazin, alfa metil dopa, lityum, flunarizin
- ▶ Toksinler: MPTP, CO, Mn, Hg, metanol, etanol
- ▶ Vasküler: Multienfarkt demans, Binswanger Hastalığı

- ▶ Travma: Boksör ensefalopatisi
- ▶ Hipoksi
- ▶ Metabolik: Paratiroid hastalıkları, hipotiroidi, hepatoserebral dejenerasyon
- ▶ Hemiparkinsonizm-hemiatrofi
- ▶ Diğer: Beyin tümörleri, normal basınçlı hidrosefali, siringomezensefali

3- Heredodejeneratif Parkinsonizm

- ▶ Huntington Hastalığı
- ▶ Wilson Hastalığı
- ▶ Hallervorden- Spatz Hastalığı
- ▶ Familial Olivopontoserebellar atrofi
- ▶ Familial bazal gangliyon kalsifikasyonu (Fahr Hastalığı)
- ▶ Seroid-lipofuksinoz
- ▶ Gerstmann-Straussler-Scheinker Hastalığı
- ▶ Machodo-Joseph Hastalığı
- ▶ Periferik nöropatili ailesel parkinson
- ▶ Nöroakantositozis
- ▶ Lubag (Filipino X'e bağlı distoni ve parkinsonizm tablosu)
- ▶ Striatal nekrozlu mitokondrial sitopatiler

4- Parkinson Plus Sendromlar

- ▶ Progresif supranükleer paralizi (PSP)
- ▶ Kortikobazal-gangliyonik dejenerasyon (KBGD)
- ▶ Multisistem Atrofiler (MSA)
 - *Shy-Drager sendromu (SDS/MSA-A)

*Striatonigral dejenarasyon (SND/MSA-P)

*Sporadik olivopontoserebellar atrofi (OPCA/MSA-C)

- ▶Guam'ın parkinsonizm-demans-ALS kompleksi (PDACG)
- ▶Parkinsonizm-primer demans kompleksi
- ▶Progresif pallidal atrofi – pallidonigral dejenerasyon
- ▶Pallidopiramidal hastalık

2.1.4. Etiyoloji

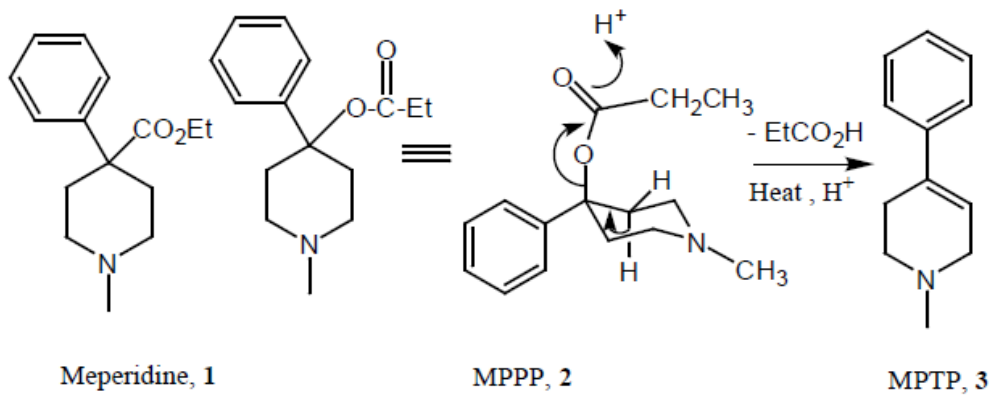
Parkinson Hastalığının patolojik açıdan ayırıcı özelliği, beynin Substansiya Nigra (SNc) pars kompakta bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronların kaybı ve henüz işlevini kaybetmemiş olan hücrelerin sitoplazmalarında içinde protein agregatlarını barındıran Lewy cisimleri varlığıdır. Dopaminerjik nöronların %60-65'nin kaybı sonucu striatal dopamin seviyesinin %80-85 oranında azalmasıyla yukarıda sözü edilen semptomlar ortaya çıkar. Bu durum, PH'da bir subklinik dönemin varlığına işaret eder (19-21).

Parkinson hastalığının etiyojisi genel olarak sporadik ve ailesel PH olarak iki gruba ayrılabilir, ancak ailesel PH tanımlamasının her zaman genetik etiyojiiye karşılık gelmediği ve aile üyelerinin uzun süre aynı çevresel etkenlere maruz kaldıkları için hastalığı geliştirmiş olabilecekleri belirtilmektedir. Dolayısıyla bazı bilimsel çevreler “idiyopatik PH (İPH)” tanımını getirmekte, bunu da “ailesel İPH” ve “sporadik İPH” olarak ikiye ayırmaktadırlar. Sporadik İPH grubundaki olası etiyojiler ise; viral enfeksiyonlar (İnfluenza A, Corona virüs, von Economo ensefaliti), tekrarlayan kafa travmaları veya bazı toksinler (rotenon, paraquat, MPTP), ilerleyen yaş, diyet gibi çok çeşitli olabilir (22). PH olgularının %85'i sporadik görünmekte, %10-15'i ailesellik göstermekte, %5'lik kısmı ise tek gene bağlı (Mendel tipi kalıtım gösteren) bozukluklardan kaynaklanmaktadır (23). Son yıllarda klinik çalışmalar, otopsi materyalleri, in vitro ve in vivo deneysel PH modellerinden toplanan veriler PH'nın patogenezinin anlaşılmasında belirli bir düzeye gelmesini sağlamıştır. Bu çalışmalar PH'da görülen nöron ölümü mekanizmasının bir etiyojik faktör tarafından tetiklendiği yönünde olup, yine de bu

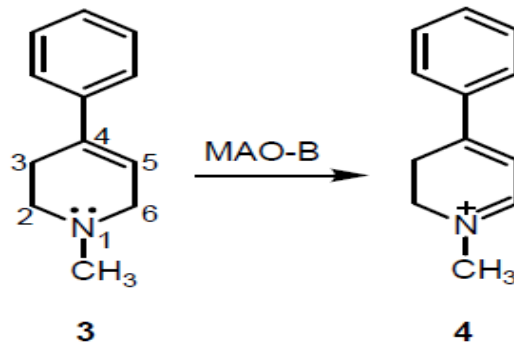
faktörün kendi başına yeterli olmadığı ve serbest radikal oluşumu, mitokondriyal bozukluklar, eksitotoksisite, nöroinflamasyon ve apoptoz gibi faktörlerin de işin içinde olduğunu göstermektedir (24).

2.1.4.1. Parkinson Hastalığı ve MPTP

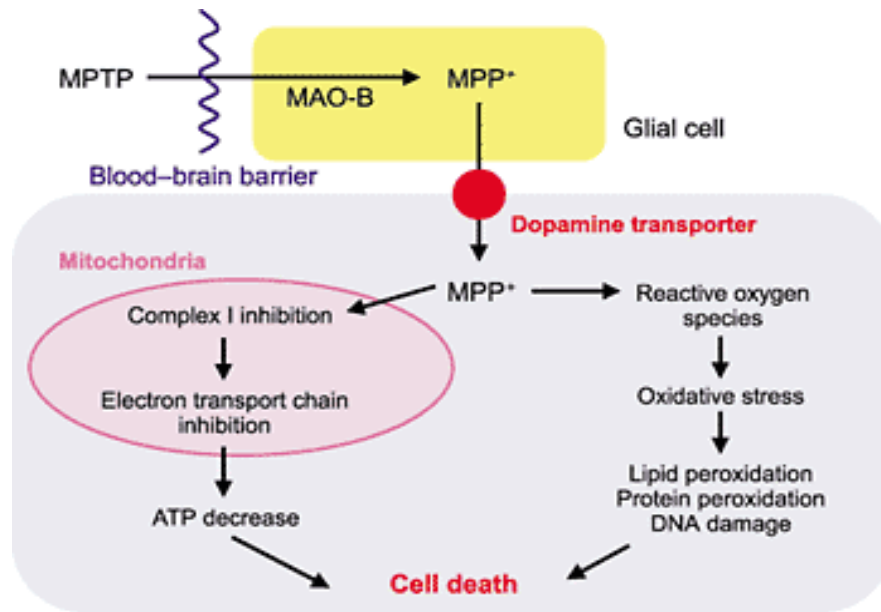
İlk olarak 1976 yılında, bir çeşit sentetik eroin olan 1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine (MPPP) üretip kullanan kolej öğrencisinin yaptığı bir hata sonucu elde ettiği MPTP'yi kullanması ve üç gün sonra parkinsonizm ortaya çıkması sonucu bu metabolitin PH yapabileceği gündeme gelmiştir. MPTP substansiya nigra için oldukça selektif davranmakta ve buradaki dopaminerjik hücrelerde mitokondriyal membrandaki oksidatif fosforilasyonda görevli solunum zincirindeki kompleks I'ı inhibe ederek nörooksidatif stres ve dejenerasyona neden olmaktadır. MPTP'nin insanlar, primatlar ve farelerde, nigrostriatal dopaminerjik hücreleri tahrip ettiği gözlenmiştir (25).



Şekil 1. MPPP'den MPTP oluşumu (26)



Şekil 2. MPTP'den Monoamin Oksidaz-B (MAO-B) enzimi ile MPP⁺ oluşumu (26)



Şekil 3. MPTP nörotoksitesinin mekanizması (27)

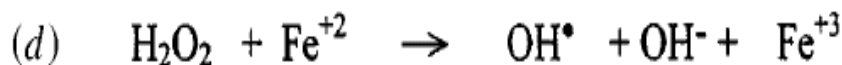
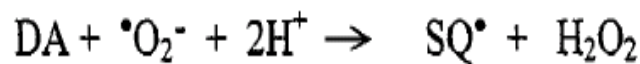
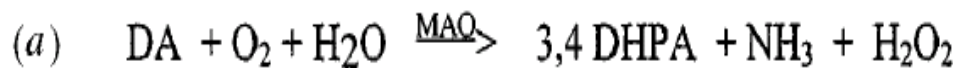
2.1.5. Parkinson Patogenezi

2.1.5.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, H₂O₂ ve reaktif oksijen radikallerini ortaya çıkaran dopamin oksidatif metabolizmasından dolayı Parkinson hastalığında çok ilgi görmüştür.(28-30) SNe'da oksidatif stres ve bunun sonucunda hücre ölümü koşulları a) aşırı peroksit oluşumu ile sonuçlanan dopamin döngüsünde artış b) Glutatyon (GSH) eksikliğinden dolayı beynin H₂O₂ temizleme kapasitesinde azalma olması c) Hidroksil (OH⁻) formatında olan reaktif demir ürünlerinde artış. Parkinson hastalarının postmortembeyin incelemelerinde, DNA, proteinler ve lipidlerde

oksidatif hasarlanma, GSH azalma, demir artışı gösterilmiştir. SNc'deki bu durumun oksidatif strese bağlı olduğunu düşündürmektedir (31).

DEMİR: Çeşitli analitik teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda Parkinson hastalarının SNc'da artmış demir düzeyleri gösterilmiştir (32,33). Lazer mikroprobe (LAMMA) çalışmalarında, demir birikimin öncelikli olarak, dopaminerjik nöronların nöromelanin granülleri içerisinde olduğu gösterilmiştir (34). Rodentlerin SNc'sı içine demir infüzyonu ile oluşturulan Parkinson modelinde, davranışsal değişiklikler, SNc nöronlarının kaybı ve striatal dopaminin ilerleyici kaybı konsantrasyon bağımlı olarak gösterilmiştir (35).



Şekil 4. Dopamin metabolizması, H₂O₂, GSH ve Fe⁺² oksidatif reaksiyonları (31)

GLUTATYON: Bir veya daha fazla doğal antioksidanlarda meydana gelen defektler PH'da nörodejenerasyona yol açar (31). Glutatyon peroksidaz veya katalaz, alfa-Tokoferol, askorbik asit düzeylerinde temel defektler tespit edilememiştir. Enzimlerin indüklenebilir şekillerinde adaptif artış ile tutarlı olarak Mn-SOD aktivitesi yükselmiştir. Parkinson hastalığında SNc'daki indirgenmiş Glutatyon düzeylerindeki azalmanın bulunması en dikkat çekici bulgulardandır (36,37). Glutatyon düzeylerinin azalması, özellikle artan demir varlığında, OH⁻ formunda artırabilir ve H₂O₂ klirensini azaltabilir. Parkinson hastalığında GSH'nun azalmasının nedeni bilinmemektedir. Glutatyon sentezi ile ilişkili major enzimlerde

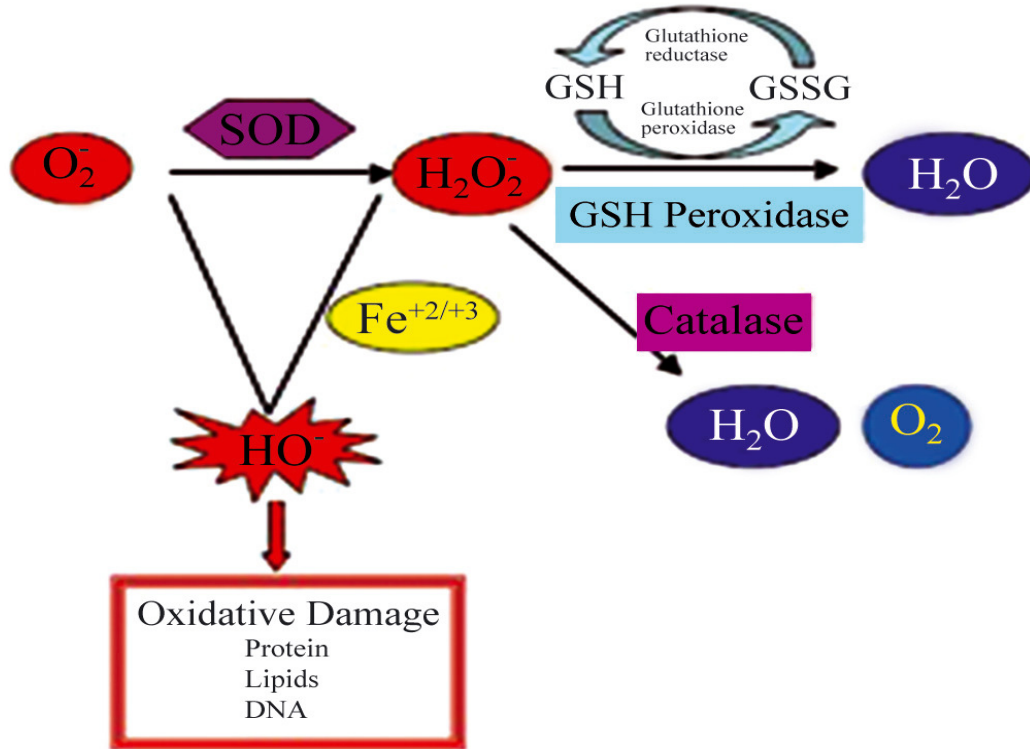
kusur saptanmamıştır. Ancak, Glutatyonun okside formunun (GSSG) metabolizmasında ve glutatyon öncüllerinin translokasyonundan sorumlu enzim gama-glutamiltanspeptidaz düzeyinde anlamlı artış saptanmıştır (37). Gama-Glutamiltanspeptidaz artışı, oksidatif stresin bir sonucu olarak potansiyel toksik GSSG nin temizlenmesinde kompensatuvar mekanizma veya hayatta kalan hücreler içerisinde GSH azalması ve glutatyon öncüllerinin birikmesiyle olan refleks bir olayı yansıyor olabilir (38).

GSH'daki defekt, prelinik PH ve lewy cisminde sahip hastaların SNC otopsisinde rastlantısal olarak tespit edilmiştir (39). PH'da ilk biyokimyasal defektin GSH düzeyindeki azalma olduğu ileri sürülmektedir. Mytilineou ve arkadaşları, selektif alfa-glutamilsistein sentaz inhibitörü olan buthionine sulfoximine (BSO) ile yaptıkları çalışmada, GSH düzeyindeki azalmayı indüklediğini ve kültüre edilmiş dopaminerjik nöronlara toksik olduğunu göstermişlerdir (40). Toffa ve ark. ratlarda BSO ile yaptıkları çalışmada, GSH düzeyinde PH dakine benzer oranda %40-60 oranında azalmayı sağladığını göstermiştir (41). Ancak, GSH düzeyindeki azalma, 6- Hidroksi dopamin (6-OHDA) ve MPP⁺ gibi diğer toksinlerle tedavi edilen rodentlerde nörodejenerasyonu artırdığı gözlenmiştir. Bu araştırmalara göre, GSH'nın azalması dopaminerjik nöronlara tek başına zarar vermeyeceği, fakat diğer toksinlerin onları savunmasız hale getirebileceği ileri sürülmektedir (42,43).

OKSİDATİF HASARLAMA: Parkinson hastalarının beyininde oksidatif hasarlanmaya dair kanıtlar saptanmıştır. Parkinson hastalığında SNC'da lipid peroksidasyon ürünleri olan Malondialdehit (MDA) ve lipid hidroperoksit düzeyindeki artış rapor edilmiştir (44,45). Hücre toksisitesinde artış ve proteinlerde değişiklik kapasitesine sahip lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan 4-hidroksinonenal boyanmasındaki artış, hayatta kalan dopaminerjik nöronlarda tespit edilmiştir. (46).

Buna ek olarak, PH'larında, DNA ve proteinlerin oksidatif hasarlanmasıyla 8-hidroksi-2-deoksiguanozin ve protein karbonil düzeyindeki artış, SNC yanı sıra beyin birçok farklı bölgesinde bulunmuştur (47). Tüm bu sonuçlar ışığında, PH'da yaygın bir oksidatif hasarlanmanın olduğu ileri sürülmektedir. Ancak, Parkinson hastalarının büyük çoğunluğunun levodopa tedavisi alması, onun oksidatif

metabolitlerinin oksidatif hasarlanmaya olan katkısı nedeniyle net değildir. Levodopanin dopaminerjik nöron kültürlerinde dejenerasyonu indüklediği gösterilmiştir. Fakat normal insan ve rodentlerde, dopaminerjik nöronlara toksik olduğu gösterilememiştir. (48,49). Bu durum savunma mekanizmalarının bozulduğu PH'da farklı olabilir. Aslında levodopa, 6-OHDA ile ön tedavi yapılan rodentlerde, lipid peroksidasyonu ve nöronal dejenerasyonu artırabilir (50). Parkinson hastalığındaki bu oksidatif hasarlanmanın primer bir olayı yoksa değişik etyolojik, ilaçlar veya postmortem olaylara bağlı olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir.



Şekil 5. Serbest radikaller ve enzimatik detoksifikasyonu (51).

2.1.5.2. Mitokondrial Disfonksiyon

Mitokondri, enerji akışının yönlendirildiği ve ATP'nin elde edildiği organel olarak tüm vücut hücrelerinde olduğu gibi nöronlarda da önemli bir yer tutmaktadır. Krebs döngüsünde oluşan elektronlar NADH^+H^+ ile FADH_2 'de toplanır ve mitokondri içzarında yer alan enzim yapısında proteinler üzerinden elektrokimyasal gradyanın oluşturulmasına katkıda bulunurlar. Bu enzim sisteminde yer alan NADH dehidrogenaz (Kompleks-I) ve süksisinat dehidrogenaz (kompleks-II) elektron

transport zincirinde başlangıç yolunu oluşturur. Elektronlar bu sisteme flavin mononükleotidler ve kompleks I ve II'nin demir-sülfür merkezlerinden giriş yaparak, ubikinona (koenzim Q) taşınırlar. Ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz (kompleks III) sitokrom b, sitokrom c 1 ve Rieske demir-kükürt proteininden ibaret önemli bir komplekstir. Koenzim Q'den kompleks III 'e transfer olan elektronlar, bakır içeren ve enzim olan sitokrom c oksidaza (kompleks IV) geçerler. Son olarak da elektronlar oksijen moleküle aktarılarak, ATP sentaz'dan (kompleks V) bir molekül ATP'nin sentezini gerçekleştirirler. Elektronlar kompleks I/II' den III. ve IV. Komplekslere geçiş yaparken protonlar da mitokondriyal iç zardan geçerek, birelektrokimyasal gradyan oluşumuna katkıda bulunurlar (52-54).

Parkinson hastalarının SNc'da mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I aktivitesinde selektif olarak %30-40 dolayında azalma olduğu saptanmıştır (55). Diğer beyin bölgeleri etkilenmemiştir ve levedopa tedavisi alan ve nigrostriatal nöronlarda geniş dejenerasyon yaptığı bilinen MSA hastalarında benzer defekt saptanamamıştır. Kompleks I defekti, Parkinson hastalarının kas ve plateletlerinde de saptanmıştır. Fakat bu sonuçların özellikle kas için tutarlılığı daha azdır (56). PH kompleks I aktivitesindeki azalmanın sebebi net değildir. Swerdlow ve ark. Parkinson hastalarının plateletlerinden elde edilen hibrid taşıyıcı içerisinde kompleks I defekti saptamıştır (57). Bu mitokondriyal genom içerisinde bir defektin varlığını göstermektedir.

Mitokondriyal kompleks I defekti, ATP sentezinin azaltılması vasıtasıyla hücre dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Fare beyinindeki sinaptozom'larda MPP⁺ veya MPTP tarafından yapılan kompleks I inhibisyonu hücre ATP azalmasına yol açabilir (58). PH'da alfa-ketoglutarate dehidrogenaz (alfa-KG) enziminde de immünhistoimyasal tekniğiyle azalma tespit edilmiştir (59).

Mitokondriyal kompleks I defekti, bu bölgede oluşan serbest radikallerin direk etkisiyle veya solunum zincirindeki kompleks II'nin kompensatuvar artışı yoluyla hücre hasara yol açmaktadır. MPTP toksisitesinin, serbest radikal temizleyicileri ve Co-enzim Q vasıtasıyla azaltılabilmesi önemlidir (60).

Kompleks I defekti apoptosiz gelişimine de katkıda bulunmaktadır. Protonpompaındaki bir bozukluğun sonucu olan, mitokondriyal membran

potansiyelindeki azalmanın mitokondrial permeabilitedeki artışa ve apoptozis başlangıç sinyali olan küçük mitokondrial proteinlerin salınımına yol açabildiğini artan kanıtlar göstermektedir (38).

2.1.5.3. Ekzitotoksisite

Eksitator nörotransmitterler kendilerine özgü reseptörlere bağlanarak, nöronların stimülasyonuna neden olurlar. Bu stimulus katyonların geçişine izin veren iyon kanallarının açılmasına veya hücre içinde kalsiyum artışına neden olacak G proteinlerinin aktivasyonuna neden olur (61).

Eksitator amino asitlerden L-glutamat ve L-aspartat sinir sistemindeki sinaptik bağlantıların gelişimsel plastisinden sorumludur. L-glutamat omurgalı canlıların santral sinir sisteminde bulunan başlıca eksitator nörotransmitterlerden biridir. Normal koşullarda glutamat beyinde, kavrama, hafıza, hareket ve duyarlılık gibi farklı işlevlerin yerine getirilmesinden sorumludur ve bu fonksiyonları kendi reseptörleri ile etkileşerek yapar. Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması nöronlarda hasara veya ölüme neden olmaktadır. Olney, retinal sinir hücrelerinde meydana gelen bu nörotoksik olaya 'ekzitotoksisite' adını vermiştir (62).

Ekzitotoksisitenin, iki olası mekanizma üzerinden PH'da nörodejenerasyonun nedeni olduğu belirlenmiştir. Kuvvetli olan ilk olasılık, glutamat oluşumundaki artıştan kaynaklanan ekzitotoksisiteyi içerir. SNC'daki dopaminerjik nöronlar, glutamat reseptörlerinden zengindir. SNC ve korteksten yaygın glutamat innervasyonu alırlar (63). Dopamin lezyonu, SNC'yı disihibe eder ve eksitator nöronların ateşlenme oranını artırır (64). Buna göre iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki tip glutamat reseptörü tanımlanmıştır. İyonotropik glutamat reseptörleri de Nmetil-D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA (AMPA ve kainat) olmak üzere iki grupta toplanmıştır. İyonotropik glutamat reseptörlerinin stimülasyonu hücre zarında depolarizasyona neden olmakta, pozitif yüklü iyonların hücre içine göçünü sağlamakta ve voltaj aracılı kalsiyum kanallarını aktive etmektedir. Hücre içine voltaj bağımlı kanallar aracılığıyla kalsiyumun göçü glutamat aracılı ekzitotoksisiteye neden olmaktadır (61,62). İkinci ve zayıf olan ekzitotoksisite teorisinde, mitokondriyal fonksiyonlarda bir defekte bağlı enerji metabolizmasındaki azalma, NMDA reseptörlerindeki ATP bağımlı Mg blokajının kaybı ile sonuçlanır ve

glutamat aracılı hücre içine Ca^{+2} girişinin fizyolojik konsantrasyonlarını sağlaması ileri sürülmektedir (65). Primatlarda MPTP tedavisi ve ratların SNc'sına MPP^{+} infüzyonuna bağlı dopamin hücre kaybına karşı NMDA antagonistlerinin rapor edilmesi PH'da eksitotoksisitenin rolünü desteklemektedir (66,67).

Eksitotoksik hasarlanmanın kısmen Nitrik oksid (NO) aracılı olduğu düşünülmektedir. (68). NO, nitrik-oksidge sentaz (NOS) tarafından katalize edilen arjininin sitriline dönüşümü ile oluşmaktadır. Glutamat aracılı sitozolik kalsiyum artışı, NOS aktivitesi ile birlikte NO üretiminde artışa neden olur. NO her ikisinde güçlü oksidleyici ajanlar olan Peroksinitrit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer. NO fenton reaksiyonu ve mitokondrial kompleks IV inhibisyonu vasıtasıyla hücre dejenerasyonuna katkıda bulunabilmektedir (69). Balanos ve ark. NO sürekli maruz kalınmasıyla mitokondrial solunum zincirinde hasarlanma olduğunu ve GSH'nın önemli bir savunma mekanizması olduğunu göstermişlerdir.(70). Bu, GSH düzeylerinin düştüğü PH'nı da kapsamaktadır. NO aracılı toksisite, MPTP tarafından indüklenen nigral hasarlamaya karışmaktadır. NO oluşumunu bloke eden NOS inhibitörü olan 7-nitroindazole (7-NI), maymunlar ve ratlarda, dopaminerjik nöronları MPTP toksisitesinden korumaktadır (71). Benzer bir çalışmada, NOS devre dışı bırakılmış farelerde, MPTP toksisitesinin azaldığını gösterilmiştir. (72). 7-NI'nın MAO-B inhibisyonu yaptığı rapor edilmiştir. Bu da MPTP nin MPP^{+} ye dönüşümünü engelleyerek etki etme olasılığını artırmaktadır. Ancak, yapılan daha ileri çalışmalar, 7-NI'nın MPP^{+} toksisitesi engellenmesinde de etkili olduğunu göstermektedir. NO neden olduğu hasar, hücre proteinler üzerinde peroksinitrit tarafından indüklenen tirozin nitrasyon artışı olan 3-nitrotyrosine (3-NT) düzeyi ölçülerek tahmin edilebilir.(73). MPTP ile tedavi edilen fare ve maymunlarda 3-NT düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. (74). Bir başka çalışmada, PH'larının lewy cisimciklerinin merkezinde 3-NT immün boyanmasında artış olduğu gösterilmiştir. (75).

2.1.5.4. Nörotrofik Faktörler

Levi-Montalcini ve Hamburger (1953) yaptıkları klasik in vitro çalışmalarda, Sinir Büyüme faktörü (NGF)'den yoksun bırakılan kültüre edilmiş sempatik nöronların hayatta kalamadıklarını göstermişler (76). Sinir hücreleri ve astrositlerin

her ikisinin de, komşu nöron hücrelerinin yaşamlarını destekleme kapasitesine sahip, ciliary nörotrofik faktör (CNTF), brain-derived nörotrofik faktör (BDNF), ve glial-derived nörotrofik faktör (GDNF) gibi çeşitli nörotrofik faktörler için protein ve mRNA sentezleyebildikleri gösterilmiştir. Normal yetişkin santral sinir sisteminde, bu trofik faktörler düşük düzeylerde salınırlar fakat hasarlanma sonrası up-regüle olabilirler. Subletal nöronal hasar reaktif astrositler ile CTF, NGF ve Fibroblast Growth Faktör (FGF) nin up-regülasyonunu indükler (77). Reaktif astrositler, PH'da dopaminerjik hücre kaybının olduğu bölgelerde gösterilmiştir. (78). Bu trofik moleküllerin dopaminerjik nöronları toksik etkilerden koruma kapasitesine sahip olduklarına dair güçlü kanıtlar vardır. BDNF, dopaminerjik hücre kültüründe canlılığını artırır ve onları MPTP toksisitesinden korumaktadır (79).

2.1.5.5. Glial İmmün Modülatörler

Mikroglia ve sitokinlerin santral sinir sistemi hasarlanması sonrası hücre sel yanıtları düzenlediği bilinmektedir. PH'da Snc'da çok sayıda reaktif (HLA –DR) pozitif mikroglia gözlenmiştir. Özellikle Snc'nın ventral ve lateral bölgesi olan maksimal nörodejenerasyon alanlarında gözlenmiştir. (78). Parkinson hastalarının Snc'da, İnterleukin-1beta, interferon-gama ve tümör nekroz faktör- alfa (TNF-alfa) düzeyleri normal kontrol hastaları ile yapılan karşılaştırmada %760-1570 dolaylarında artmaktadır (80). TNF-alfa PH'da özellikle nöromelanin içeren bölgelerde veya hasarlı alanlarda artmaktadır. TNF-alfa reseptörlerinin aktivasyonu Nfk-B nin nükleer translokasyonu ve dopaminerjik nöron kültüründe apoptozis gelişimi ile ilişkilidir (81). İlginç olarak, Nfk-B translokasyonu ve apoptozis serbest radikal üretiminden önce oluşur. Bu olaylar antioksidan N-asetil sistein tarafından engellenebilir. Parkinson hastalarında Nfk-B nükleer translokasyonunda 70 kat artış olmaktadır. TNF-alfa ve benzeri iletim yollarının nörodejenerasyonda benzer rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (38).

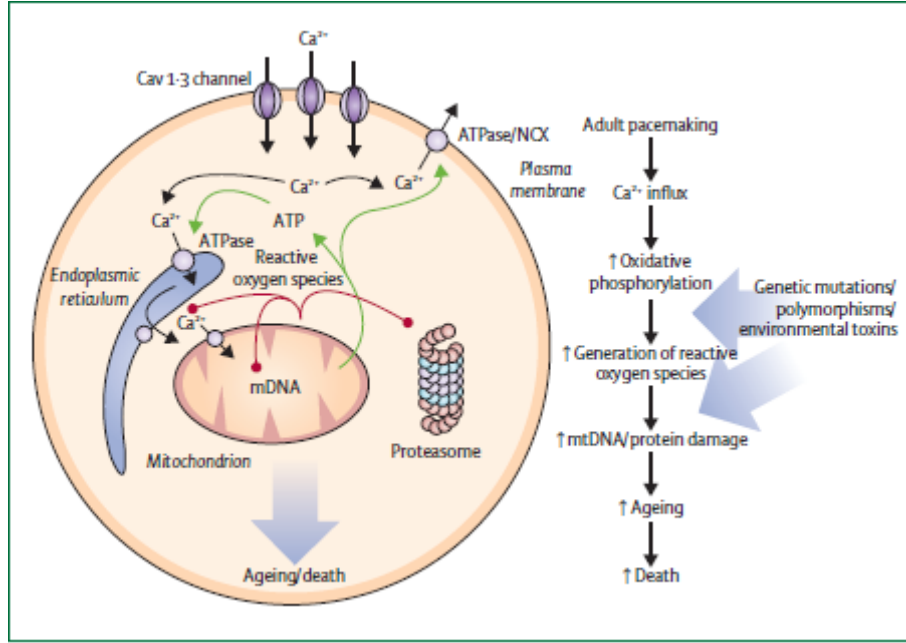
Parkinson hastalığında, immün/inflamatuvar komponeninin birincil veya ikincil bir olaya bağlı olup olmadığı açık değildir. Ayrıca gözlenen bu değişikliklerin otoimmün bir süreç veya mikroglia ve astroglialının nöronal hasara doğal cevabı olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Ancak, nörodejeneratif süreçte glial hücrelerin rolünün olduğu olasılığı giderek artmaktadır. Astrositlerin H₂O₂ ile uyarılan oksidatif

hasardan kültüre edilmiş nöronları koruduğu gösterilmiştir (82). Ayrıca, GSH primer olarak glia içinde sentezlenir ve sinir uyarılarına yanıt olarak nöronlara taşınır. PH'da SNC'da GSH azalması glial kusura bağlı olabilir. Diğer yandan, GSH azalmasının, glia varlığında kültüre edilmiş dopamin nöronlarının dejenerasyonunu indüklediği saptamıştır. Bu modelde, glialardan kaynaklanan NO ve sitokinlerin nörodejenrasyona katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Glial hücrelerin rolü ve nöroaktif moleküllerin düzenlenmesindeki büyük görüş, hasarlanan sinir hücrelerini onaracak ve koruyacak tedavi tasarımlarına katkıda bulunacaktır (38).

2.1.5.6. İntrasellüler Kalsiyum Homeostazisi ve Bozuklukları

İntrasellüler Ca^{+2} homeostazının devamlılığı nöronların yaşamaları açısından önemlidir. Kalsiyum birbirinden bağımsız ve farklı pek çok fizyolojik ve metabolik aktiviteden sorumludur. En önemli görevlerinden biri de intrasellüler mesajcı rolüdür. Ca^{+2} intrasellüler (endoplazmik retikulum ve mitokondri) ve ekstrasellüler olmak üzere iki kaynaktan açığa çıkmakta, hücreye sinyal iletebilmekte ve bu sinyalin derecesini kontrol edebilmektedir. Endoplazmik retikulümdan salınım ve mitokondriyal depolamada artış nedeniyle intrasellüler kalsiyum konsantrasyonlarında yükselme sonucunda protein fosforilasyonu, proteoliz, DNA fragmentasyonu ve membran yapılanması ile sonuçlanan çok sayıda enzim sisteminin nonspesifik indüksiyonu gerçekleşir (83).

Eksitotoksik mekanizmada ve/veya oksidatif fosforilasyon sisteminde meydana gelebilecek bozukluklar nöronun kronik toksisiteye maruz kalmasına neden olacaktır. Eksitotoksik mekanizmada NMDA reseptörlerinin açık kalması Ca^{+2} iyonlarının hücre içine göçü arttırmakta, mitokondriyal elektron transport zincirindeki defektler intrasellüler enerji açığına neden olmaktadır. Bu sorunlar Na^{+}/K^{+} ATPaz aktivitesini düşürmekte ve membran potansiyelini bozmaktadır. Na^{+}/K^{+} ATPaz'ın defektif fonksiyonu voltaj bağımlı kanalların daha uzun süre açık kalmasını sağlar ve hücre içine Ca^{+2} iyonlarının akışını artırır. Hücre içindeki Ca^{+2} iyonlarının aşırı yükselişi solunum zincirini geriye dönüşümsüz olarak bloke etmekte, önce mitokondriyal fosfolipazları, ardından sitoplazmik fosfolipazları, proteazları ve endonükleazları aktifleyerek, kendini yok etmektedir (62,83).



Şekil 6. Parkinson hastalığı yaşlanma modelinde Ca⁺² iyonunun rolü (84)

2.1.5.7. Apoptozis

Son yıllarda klinik çalışmalar, otopsi materyalleri, in vitro ve in vivo deneysel PH modellerinden toplanan veriler PH'nın patogenezinin anlaşılmasında belirli bir düzeye gelmesini sağlamıştır. Bu çalışmalar PH'da görülen nöron ölümü mekanizmasının bir etiyolojik faktör tarafından tetiklendiği yönünde olup, yine de bu faktörün kendi başına yeterli olmadığı ve serbest radikal oluşumu, mitokondriyel bozukluklar, eksitotoksisite, nöroinflamasyon ve apoptozis gibi faktörlerin de işin içinde olduğunu göstermektedir (24).

Günümüze gelinceye kadar hücre ölümü süreçleri "piknozis", "karyoliz", "karyoreksis", "büzüşme nekrozu", "programlanmış hücre ölümü", "hücren intiharı", "kendini tahrip etme" ve "apoptoz" gibi terim ve kavramlar kullanılarak adlandırılmıştır. Bu terimler içinde en çok kabul görenler "PHÖ", "hücre intiharı" ve "apoptoz" olmuştur (85).

Memeli hücrelerinde apoptoz ölüm sinyalinin kaynağına bağlı olmak üzere iki yolla gerçekleştirilir; içsel yol (intrinsic pathway) ve dışsal yol (extrinsic pathway). İçsel yol hücreden kaynaklanan çok çeşitli sinyaller tarafından (onkogen aktivasyonu, DNA hasarı gibi) tetiklenen bir yoldur. Dışsal yolda ise, apoptozu

tetikleyen sinyal moleküllerinin hücre zarında bulunan ilgili almaçlara bağlanması apoptozu başlatır (86).

2.1.5.7.1. İçsel Yol

İçsel yol ile tetiklenen apoptozda merkezi rolü mitokondri oynar. Çeşitli apoptotik uyarılar mitokondrinin dış zarının geçirgenliğini artırarak intermembran boşluğunda bulunan bazı proteinlerin sitoplazmaya kaçışına neden olur. Bunların başlıcaları sitokrom c, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG ve OMI/HTRA2'dir. Apoptozun ilerlemesindeki kritik aşama olan mitokondrinin dış zarında meydana gelen geçirgenlik artışı Bcl-2 protein ailesinde bulunan pro- ve anti-apoptotik proteinlerin karşılıklı etkileşimleri sonucu oluşmaktadır. Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w gibi anti apoptotik proteinler Bax, Bim, Bid, Bak, Noxa gibi pro-apoptotik proteinlerin aktivitelerini dengelemeye çalışmaktadırlar. Bu denge pro-apoptotik proteinlerin yönünde bozulduğu anda söz konusu proteinler mitokondrinin dış zarında bir delik oluşturarak yukarıda adı geçen intermembran boşluğunda bulunan proteinlerin sitoplazmaya geçmelerini sağlarlar. Bu proteinler arasında en önemlilerinden biri sitokrom c'dir. Sitokrom c sitoplazmada monomerik APAF-1 ile birleşerek bu proteinin konformasyonunda değişikliğe neden olur ve bu yapı da inaktif durumdaki kaspaz-9 enzimine bağlanarak "apoptozom" adı verilen bütünü oluşturur.

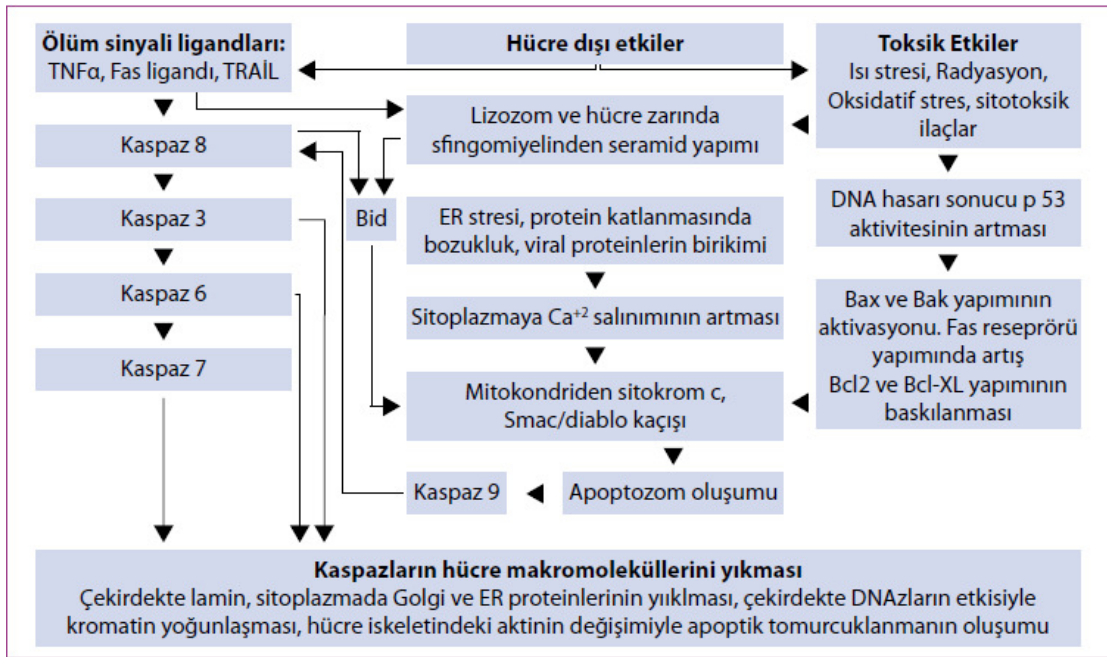
Apoptozomda kaspaz-9 proteolitik olarak aktif hale gelir ve kaspaz enzimleri hiyerarşisinde bulunan diğer kaspazları yine proteolitik olarak aktive eder (Şekil8). Bu kaspazlar içinde en önemlileri kaspaz-3 ve-7'dir, bu enzimler hücredeki bir çok yapıyı enzimatik olarak tahrip ederler ve apoptozun sonlanmasında kilit rol üstlenirler (87-89).

Apoptoz'un ilerlemesindeki bir diğer kritik aşama da normalde sitoplazmada bulunan apoptoz inhibitörlerinin (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP/livin, ILP2, NAIP, Bruce/Apollon ve survivin) inaktifleş-tirilmesidir. Bu inaktifleştirme süreci mitokondrinin intermembran boşluğundan salınan SMAC/DIABLO ve OMI/HTRA2 gibi proteinler tarafından gerçekleştirilir (86).

2.1.5.7.2. Dışsal Yol

Dışsal yolda hücre-dışından gelen sinyal molekülleri, örneğin FasL, ilgili reseptör (Fas) bağlanır ve almaç trimerizasyonu meydana gelir. Hücre zarında oluşan bu kompleksin hücre-içindeki uzantısı FADD ve inaktif kaspaz-8 gibi molekülleri bağlar ve oluşan yapı (DISC) kaspaz-8'i aktive eder. Aktif hale gelen kaspaz-8 bir pro-apoptotik protein olan Bid'i proteolitik olarak aktive eder (tBid) ve tBid de diğer pro-apoptotik proteinlerle beraber mitokondrinin dış zarında delik oluşturma olayına katılır (86).

Görüldüğü üzere apoptoz'un içsel ve dışsal yolları mitokondri noktasında kesişmektedirler ve apoptozun bundan sonraki aşamaları, kaspazların aktivasyonu gibi, her iki yolda da ortaktır.

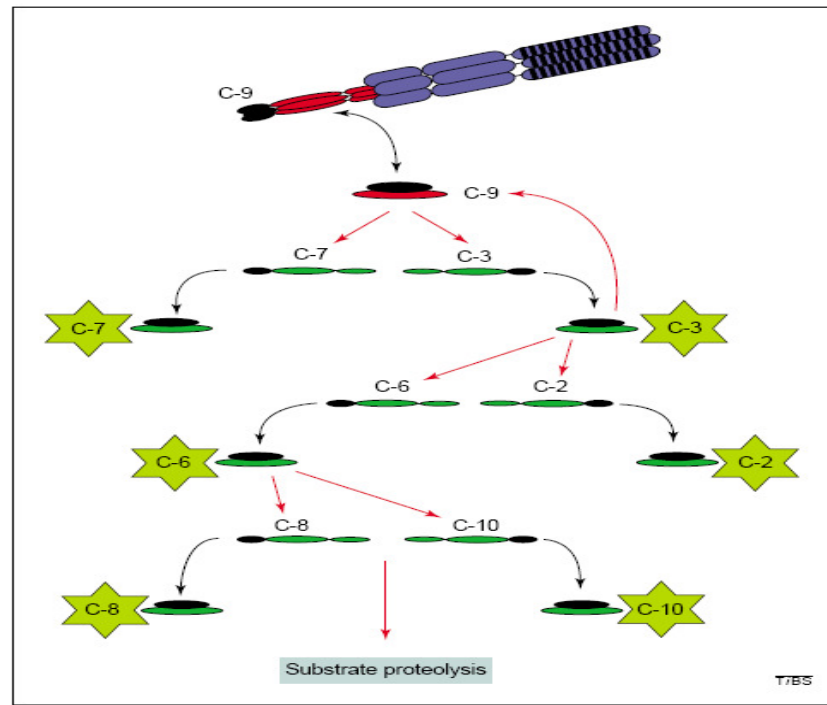


Şekil 7. Hücre içi ve hücre dışı yollarla uyarılan apoptozun genel işleyiş mekanizması (90).

2.1.5.7.3. Kaspazlar ve Apoptozis

Kaspazlar, apoptozis de rol oynayan Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Spesifik Protease=CASPASE) olarak tanımlanan bir protein ailesidir. Kaspazlar hedef hücrede apoptozu gerçekleştiren sistein proteaz

grubundan olup, ilk sentezlendiklerinde inaktif **pro-kaspaz veya zymojen** (inaktif proteolitik enzim) olarak bulunurlar. Apoptozun indüklenmesinden sonra kesilerek aktif kaspaz formuna dönüşürler. Kaspaz ailesinin bazı üyeleri (kaspaz 2,8,9,10) **başlatıcı kaspazlar** olarak bilinirken, bazıları da (3,6,7) **efektör kaspazlar** (hedef kaspazlar) olarak bilinirler. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (91).



Şekil 8. Kaspazların proteolitik olarak aktivasyonu (86)

2.1.5.7.4. Parkinson Hastalığı ve Apoptoz Bağlantısı

PH'da dopaminerjik hücrelerin kaybına neden olan etmenlerin hücrede hangi metabolik yol/yolları etkilediğini az çok aydınlatmıştır. Bunun yanısıra ailesel PH'da görülen moleküler patolojinin sporadik PH'dakiyle hemen hemen aynı olması, bu tür çalışmalar sonucunda tüm PH olgularının moleküler patolojisinin çözülmesinde yardımcı olacaktır.

PH'da görülen nöron ölümünün belirlenmesine yönelik çalışmalardan alınan ilk sonuçlar çelişkili gözükmektedir. Hirsch ve ark. ile Banati ve ark.'nın 1999 yılında yaptıkları yayınlar PH'daki nöron ölümü mekanizmasının karmaşıklığını

göstermeye yeterlidir. Bu konudaki ilk araştırmalar hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi sonucu elde edilen bulgulara dayanılarak yapılan yorumları içermektedir (92,93). İlgili çalışmalardan bazıları Parkinson hastalarının beyinlerinden elde edilen dokularda hücrelerin apoptoz yoluyla öldüklerini gösterirken, aynı teknikler kullanılarak yapılan başka çalışmalar ise SNc pars kompakta'da bulunan dopaminerjik nöronların ölüm şeklinin apoptoz olmadığını ileri sürmekte, ancak ölüm türünün ne olduğuna da bir açıklama getirmemektedir. Yine PH'lı hastaların beyin dokuları kullanılarak yapılan daha yeni bir çalışmada ise, beyin SNc bölgesinde kaspaz-1, kaspaz-3 ve TNF-R1 düzeylerinin kontrol örneklerine göre anlamlı bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir (94).

PH'daki apoptoz çalışmalarında ikinci aşamayı çeşitli toksinler kullanılarak oluşturulan hücre kültürü ve hayvan deneyleri oluşturmaktadır. Farelerde MPTP kullanılarak elde edilen PH modelinde bir pro-apoptotik protein olan Bax'ın hem mRNA ve hem de protein düzeylerinde artışlar gözlenmiş, buna karşılık bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2 düzeyinin düştüğü görülmüştür. Buna ek olarak, aynı çalışmada Bax geni elimine edilmiş farelerin MPTP ile yaratılan dopaminerjik nörotoksositeye daha dirençli oldukları gösterilmiştir (95). Bir diğer hayvan modelinde ise, substansiya nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronlarda APAF-1 geni elimine edilmiş fareler kullanılmış ve bu farelerin sistemik MPTP uygulaması sonucu oluşan nöron ölümüne, kontrol örneklerine göre, daha dirençli oldukları bulunmuştur (96).

PC12 hücrelerinde 6-OHDA kullanılarak oluşturulan Parkinson modelinde ise mitokondriden sitokrom c ve Smac/Diablo'nun salındığı, kaspaz-3'ün aktive olduğu PARP'ın (poli-ADP riboz polimeraz) kesildiği ve nükleer yoğunlaşmanın olduğu gösterilmiş, ayrıca 6-OHDA uygulanmasından önce bir nedime proteini olan Hsp27'nin yüksek oranda ifade edilmesinin de sitokrom c salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonunu ertelediği gözlenmiştir (97). Yine PC12 hücrelerinin ve 6-OHDA'nın kullanıldığı bir başka çalışmada ise, 6-OHDA uygulamasının bir pro-apoptotik protein olan Puma'nın hem mRNA, hem de protein düzeyinde arttırdığı bulunmuş, buna ek olarak bir diğer pro-apoptotik protein olan Bim'in de protein düzeyinde arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada 6-OHDA ile tetiklenen hücre ölüm

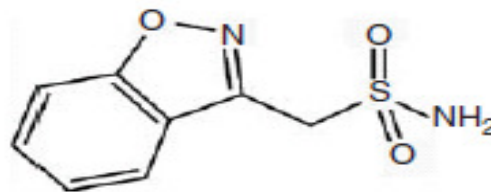
mekanizmasında Puma'nın kilit bir rol üstlendiği siRNA'lar kullanılarak da ıspatlanmıştır (98).

MPTP kullanılarak oluşturulan bir diğer hayvan modelinde mitokondriyel kompleks I yetersizliği bulunmuş, bunun da in vivo sistemde apoptotik yolu tetiklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada farelerin beyinlerinden izole edilmiş mitokondriler kullanıldığında ise kompleks I yetersizliğinin doğrudan apoptoza yol açmadığı, ancak yarattığı intramitokondriyel oksidatif stres sonucu intermembran boşluğundaki sitokrom c konsantrasyonunu yükselttiği ve Bax'a bağlı olarak gelişen apoptozun ortaya çıkma olasılığını arttırdığı bulunmuştur (99). Doğal olarak bu moleküler patolojinin hücreyi ne tür bir ölüme götürdüğünün belirlenmesi, hem moleküler patolojinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacak, hem de ileride geliştirilecek olan tedavi yaklaşımlarına yol gösterecektir.

2.2. Zonisamid

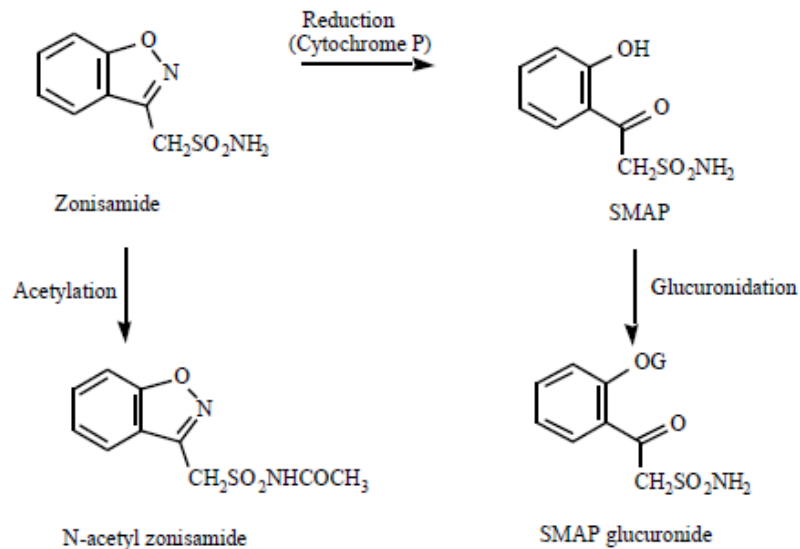
Zonisamid (1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) antikonvülzan ajanı olarak 1970'lerde Japonya da geliştirilmiştir (100). İlginç olarak birçok klinik çalışmada nörolojik ve psikiyatrik hastalıklara karşı geniş bir klinik spektruma sahip olduğu rapor edilmiştir. Epilepsi dışında, dürtü-kontrol bozuklukları, migren, nöropatik ağrı, esansiyel tremor, Parkinson hastalığı gibi hastalıklarda kullanım olanağı olabileceği ileri sürülmektedir.(101)

Zonisamid etki mekanizmaları, voltaj kapılı Na⁺ kanalları inhibisyonu, T-tipi voltaj duyarlı Ca⁺² kanalı inhibisyonu, Ca⁺² indüklediği Ca⁺² salınım sisteminin(CICR) inibisyonu, nöronal depolarizasyona bağlı glutamat salınımı inhibisyonu, GABA gibi inhibitör nörotransmitterlerin salınımının artırılması, dopamin ve serotonin salınımının artırılması, GABA_A reseptör modülasyonunu içermektedir.(102-106)



Şekil 9. Zonisamid biyokimyasal yapısı (107)

Farmakokinetik çalışmalarda, ZNS'in hızla absorbe edildiği, iyi bir biyoyararlanıma sahip olduğu, karaciğer ve böbrekten elimine edildiği ve uzun yarılanma ömrü olduğu gösterilmiştir. Maksimum plazma konsantrasyon zamanı dozdan bağımsız olarak yaklaşık 3saat civarındadır (107). Zonisamid tamamen gastrointestinal sistemden emilir ve biyoyararlanımı gıdadan etkilenmez. Kanda %40 oranında plazma albuminine bağlanır ve lipid aracılı taşıma araçları ile kan-beyin bariyerini geçer. ZNS in dağılımına yönelik yapılan sıçan beyin modelinde, serebral korteks ve orta beyinde yüksek konsantrasyonlara ulaştığı gösterilmiş. Eliminasyon yarı ömrü 49.7-62.5 saat ve kararlı doz konsantrasyonuna 10-12 gün içinde ulaşır (108). ZNS metabolizmasından başlıca sorumlu P 450 enzim CYP 3A4 tür. Ancak CYP 2C19 ve CYP 3A5 katkıda bulunabilir (109). İnsanda, ZNS'in ana metabolitleri, 2-(sulfamoylacetyl)-phenol-glucuronide (SMAP) and the N-asetil ZNS'dir (şekil 10). Total dozun büyük bir kısmı idrar ile atılır (107).



Şekil 10. İnsanda ZNS'in metabolik yolu. SMAP:2-sulfamoylacetyl-phenol, G: glucuronide(107).

2.2.1. Zonisamid ve Parkinson Hastalığı

Zonisamidin dopaminerjik sistem üzerine olan etkisine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Parkinson hastalığındaki yararlı etkilerinin altında yatan etki mekanizması açık değildir ancak hem dopaminerjik hemde non dopaminerjik mekanizmaları içeriyor görünmektedir (110). Zonisamidin tekli kullanımında hücre

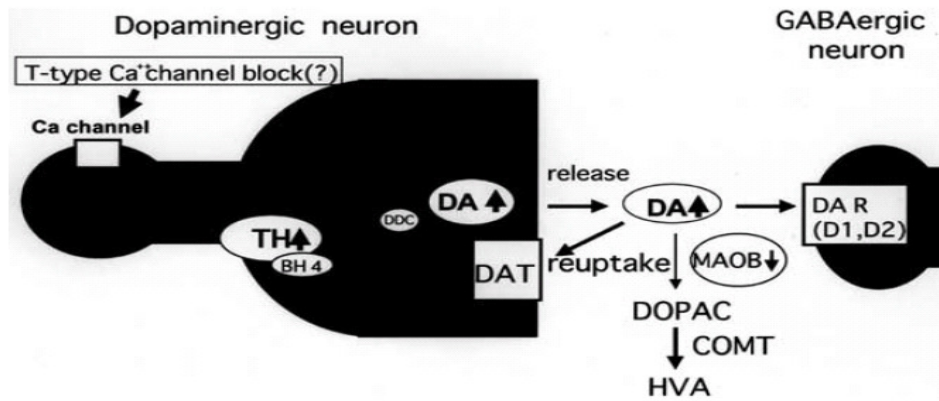
içi ve hücre dışı DOPA, dopamin, homovanilik asit (HVA) düzeyini artırdığı, 3-4 dihidroksi fenilasetikasit asit (DOPAC) düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (106). Zonisamid terapötik dozlarda sıçan striatumunda hücre içi ve hücre dışı dopamin düzeyini artırırken, supratherapötik dozlarda hücre içi dopamin düzeyini azaltmaktadır. Böylece, Zonisamid dopaminerjik sistem üzerine bifazik etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (111). Murata ve ark.(2004) uzun süreli ZNS kullanımı ile sıçan striatumunda Tirozin Hidroksilaz (TH) düzeyinin ve aktivitesinin arttığını göstermiştir (107).

Anti-parkinsonyan etkisiyle ilgili olarak, ZNS dopamin salınımı ve yıkımını artırdığı, MAO-B aktivitesi ve dopaminerjik oksidatif stresi inhibe ettiği rapor edilmiştir. (101,107,112).

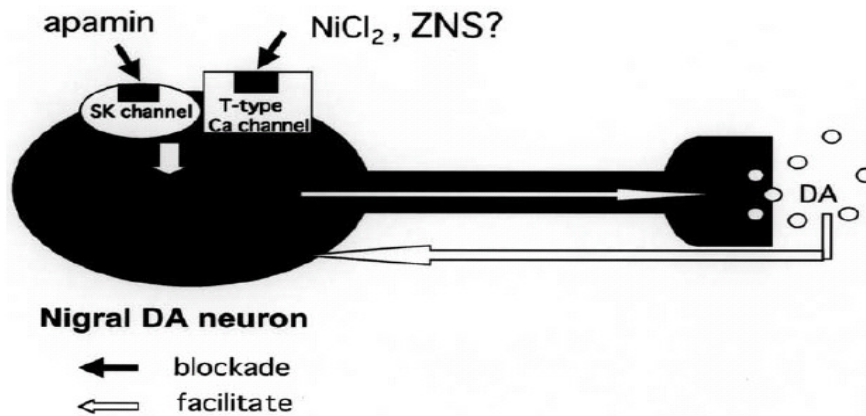
ZNS T-tipi Ca^{+2} kanallarını spesifik bir blokeridir. ZNS T-tipi Ca^{+2} kanalları yoluyla dopaminerjik nöronları direk olarak aktive etmesi olasıdır. Worfart ve Roeper, T tipi Ca^{+2} kanallarının inhibisyonunun, SNC'daki dopaminerjik nöronların deşarjını artırdığını rapor etmişlerdir (113). Ancak bu konu net olarak bilinmemekle birlikte daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır (110).

Zonisamid'in, ön ilaç olan MPTP nin aktif toksik metabolitine çevrilmesinde Monoaminoksidaz Tip-B (MAO-B) inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (106,107). Ancak bu etkinin gücü tam olarak bilinmemektedir. Murata ve ark. yaptığı bir çalışmada, MAO-B inhibitörü selegilin ile tedavi edilen Parkinson Hastalarında dahi ZNS'in etkili olduğunu göstermiştir (114). Burdan yola çıkılarak, parkinsonyan semptomları iyileştirmede Zonisamid'in temel etki mekanizmasının MAO-B inhibisyonu olmadığı ileri sürülmüştür (110).

Son zamanlarda ipek maymunu ile yapılan deneysel çalışmalarda, Zonisamid'in MPTP nin etkinliğini inhibe etmediği ileri sürülmektedir. Ancak, MPTP tedavisi alan ipek maymunlarına ZNS verilmesi, striatumda dopamin metabolizması artışında etkili olduğu saptanmıştır. (122). Bu nedenle yazarlar tarafından, ZNS'in in vivo olarak MAO-B ihibisyonu yapmadığı fakat zayıflamış nöronların aktivitesini artırdığı ileri sürülmektedir (110). Diğer bir çalışmada, ZNS tedavisinin, dopaminerjk sistemde Tirozin Hidroksilazın (TH) artırılması yoluyla farelerde MPTP'ye bağlı nörotoksisiteyi azalttığı saptanmıştır (116).



Şekil 11. Zonisamid'in dopamin sistemi üzerine etkisi (107).



Şekil 12. ZNS T-tipi Ca⁺² kanalları yoluyla TH sentezini aktive etmesi (107).

Zonisamid'in nöroprotektif etkisi, deneysel hayvan modellerinde neonatal hipoksik-iskemik hasarlanmanın azaltılması ile gösterilmiştir (117). Bu etkisinin antioksidan özellikleri ile ilişkili olduğu savunulmaktadır (111,118). Zonisamid'in olası nöroprotektif etkisi, hidroksil gibi serbest radikallerin temizlenmesiyle veya nöromembranlar için oldukça zararlı olan Nitrik oksitin engellenmesi şeklindedir (119,120). Sıçan beyinde lipid peroksidasyonu ve DNA oksidatif hasarlanması inhibe ettiği saptanmış (121). Ancak, ZNS'in nöroprotektif özelliklerinin moleküler mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir fakat destekleyici veriler henüz bir sonuca varmak için yeterli değildir (122).

Murata ve ark. tarafından Japonya'da çok merkezli, randomize çift kör plasebo kontrollü yapılan çalışmada eklem tedavisi olarak 25-100 mg/gün kullanılan ZNS'in Parkinson hastalarındaki motor semptomların tedavisinde etkili

olduğu ileri sürülmektedir. Çalışmaya L-Dopa tedavisi altında motor semptomları olan 279 Parkinson hastası alınmış. Oniki hafta boyunca ZNS (25, 50 veya 100 mg/gün) veya plasebo tedavisi altında Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) Part III ve toplam günlük 'off' süreleri değerlendirilmiş. 25 ve 50mg/gün alan grub ile plasebo grubu karşılaştırıldığında total UPDRS skorunda anlamlı iyileşme olduğu gösterilmiş. 50 ve 100 mg grubu ile plasebo karşılaştırıldığında off sürelerinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiş. Diskinezi açısından ZNS grubunda bir artış görülmemiş. Parkinson hastalarında ZNS adjuvan terapi olarak iyi tolere edilen, güvenli ve etkili bir ilaç olduğu ileri sürülmektedir (114). Kajimo ve ark., Parkinson hastalarında ZNS'in ekleme tedavisi olarak kullanımında ilaç başlangıcından sonraki 1 yıllık izlem süresinde etkili ve güvenli olduğunu ileri sürmüşlerdir (123).

Nakanishi ve ark. yaptıkları açık uçlu bir çalışmada dopamin tedavisi alan motor semptomları olan Parkinson hastalarındaki tremor üzerine ZNS'in etkili olduğunu öne sürmüşlerdir (124). Ayrıca birkaç çalışmada, ZNS'in esansiyel tremor supresyonundaki etkinliği gösterilmiştir (125,126). Bermejo ve ark. yaptığı çalışmada, 'ET-PD sendromu' olarak bilinen Parkinson ve Esansiyel tremor hastalarında ZNS'in faydalı bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (127). L-Dopa'ya bağlı diskinezide 2-amino-3-hidroksi-5-metilisoxazol-4-yl propionic acid (AMPA) reseptör blokajı ile iyileşme olduğu görülmüştür. ZNS'in bu reseptörü bloke ediyor olması ile bu ilaç hastalarda potansiyel faydalı bir rol oynayabilir (128).

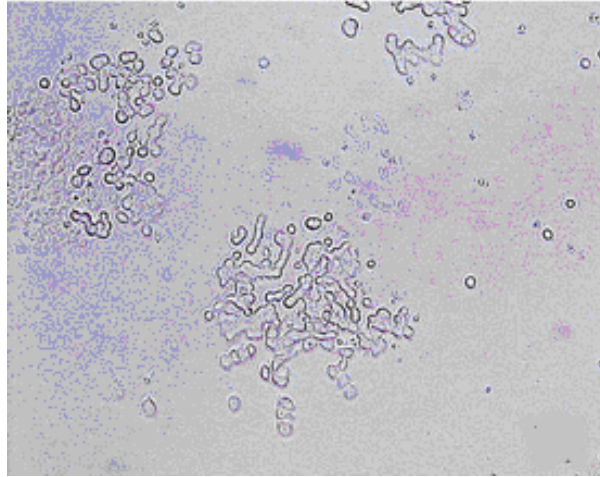
Zonsamid iyi bir güvenlik profili ile iyi tolere edilebilen bir ilaç olarak kabul edilebilir. Parkinson Hastalığı tedavisinde kullanılan doz, epilepsi tedavisinde kullanılan dozdan anlamlı olarak daha düşüktür. Murata ve ark. yapılan çalışmada ZNS iyi tolere edilmiş ve temel yan etkileri apati, somnolans, kilo kaybı, konstipasyon olarak tespit edilmiştir. ZNS ve diğer Parkinson ilaçları arasındaki etkileşimleri ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır (114).

2.3. PC12 Hücreleri

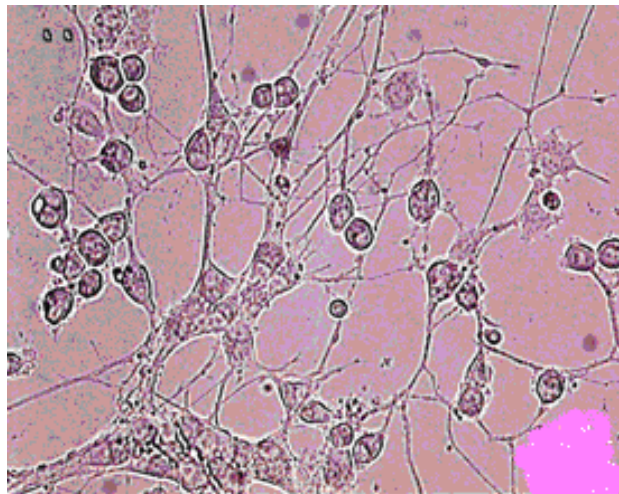
Rat feokromasitoma hücreleri olan PC12 hücreleri ilk kez 1976'da Grene ve Tischler tarafından elde edilmiştir. Adrenal bezden köken alan hücre klonudur. Hücre morfolojisi poligonal görünümündedir. PC12 hücreleri adheran özellikte, kültür

kabının yüzeyine yapışarak yaşayan ve küçük kümeler halinde çoğalan hücrelerdir (129). Şekil 8’de PC12 hücrelerinin ve şekil 9’da PC12 hücrelerine NGF ilave edilmesiyle oluşan faz kontrast mikroskopik görünümü gösterilmektedir (130).

PC12 hücrelerine kültür ortamında nöronal büyüme faktörü (NGF) ilave edilmesiyle nöronal filizlenme, elektriksel eksitabilite ve sinaptik veziküller oluşur (131). NGF’ye yanıt olarak katekolamin (dopamin, noradrenalin) sentezler ve çok hızlı nöroblast/nöron fenotipine dönüşür. Nöronun tipik özelliklerini gösterir (132,133). Bu yüzden nöronların hücresel biyolojisi ile ilgili çalışmalar için iyi tanımlanmış bir modeldir. Proliferasyon, diferansiyasyon, hücre canlılığı ve apoptozis gibi farklı hücresel olayları, nöronal tamir, nöroprotektivite ve nörotoksiteyi içeren mekanizmaları araştırmada sıkça kullanılır (131,132).



Şekil 13. PC12 hücrelerinin faz kontrast mikroskopik görünümü (130).



Şekil 14. PC12 hücrelerine nöronal büyüme faktörü ilave edilmesiyle oluşan faz kontrast mikroskopik görünüm (130).

2.4. Hücre Canlılığının MTT Analiziyle Saptanması

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] analizi ilk olarak Mosmann tarafından kullanıma girmiştir (134). MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrojenaz aktivitesine bağımlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (135,136). Reaksiyon ürünü uygun karışımda çözüldükten sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülür (137). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır (138). Hücre canlılığı ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması, radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmaması avantaj olarak kabul edilir (139,140).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ve Biyofizik Anabilim Dalları tarafından Nörolojik Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde (NÖROBAM) gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1885-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyaller

PC12 hücreleri DSMZ hücre serileri bankasından (Almanya) alındı. Biyofizik laboratuvarında Poly-D-Lysine kaplanmış hücre kültürü flasklarında, RPMI 1640 besi yeri ortamında üretildiler. Fötal sığır serumu, at serumu, Se ve diğer kimyasallar Sigma firmasından Fagus Firması (İstanbul) aracılığı ile Amerika Birleşik Devletleri ve Almanya'dan satın alındı. ZNS toz formda Sigma firmasından Fagus Firması (İstanbul) aracılığı ile alındı.

Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
9. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
10. Floresan spektrofotometre (Carry Eclipse Marka, Varian Firması, Avustralya)
11. CO₂ inkubator (Shel Lab-Biolab Lab, Fransa)
12. Laminar flow kabini (Bilser BLF2000, İstanbul)

Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Glisin, Merck (Almanya)
3. Sodium Chloride, Merck (Almanya)
4. Tween 20, Merck (Almanya)
5. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
6. EDTA, Merck (Almanya)
7. EGTA, Merck (Almanya)
8. Leupeptin, Sigma (Almanya)
9. Triton X-100, Sigma (Almanya)
10. Metanol, Merck (Almanya)
11. Hydrochloric Acid, Merck (Almanya)
12. Histopaque REF-11191 (Amerika Birleşik Devletleri)
13. Bradford Kimyasalı Bio-Rad 500-0006 (Almanya)
14. Collagenase type II- A7906, 1 gram (Almanya)
15. Colleganase-Type4 Worthington 4188/47M9961, 100 mg (Almanya)
16. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj, 35 ml, Sorvall (Ankara)
17. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj için, 2 ml, Sorvall (Ankara)
18. PC12 hücreleri, DSMZ-Germany. Kültür (37 °C) şeklinde
19. Nerve growth factor, Sigma, N0513, 1 mg (Amerika Birleşik Devletleri)
20. Poly-D-Lysine, Sigma (Almanya)
21. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma (Almanya)
22. DMSO (Dimethyl sulfoxide), Sigma (Almanya)

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Tedavi

3.2.2. PC12 Hücre Kültürü

PC12 hücreleri rat böbrek üstü bezi hücrelerinden elde edilmektedir. Bu hücrelere, kültür ortamında NGF ilave edilmesiyle, embriyolojik dönemdeki özelliklerinden dolayı sinir hücresi özelliği göstermektedirler. PC12 hücreleri hem nörolojik hem de psikiyatrik hastalıklarla ilgili çalışmalarda sinir hücresi modeli olarak kullanılmaktadırlar (131,132). Çalışmamızda kullanılan PC12 hücreleri DSMZ hücre serileri bankasından (Almanya) alındı. Deneylerde bu hücre hattının 2–9 arasındaki pasajları kullanıldı. Deneylerde kullanılan 25 ve 75 cm²'lik kültür flaskları, hücrelerin ekiminden önce tutunmayı arttırmak amacıyla Poly-D-Lysine ile kaplandı. Poly-D-Lysine steril distile su ile çözüldü ve kültür kaplarına 10 µg/ml konsantrasyonda eklenerek yayıldı. Bir saatlik bir inkübasyon süresinin ardından PC12 hücreleri kültür kaplarına 1x10⁵ hücre/cm² yoğunluğunda ekildi. Kültür ortamı olarak % 10 oranında ısıyla inaktive edilmiş at serumu, % 5 oranında ısıyla inaktive edilmiş sığır serumu, 100 IU/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. Ekim sonrası kültürler % 5 karbondioksitli nemli hava içeren 37 °C sıcaklıkta inkübatöre konuldu.

Hücreler her 2–3 günde bir taze mediumla beslendi. Hücrelerin % 80'i birleşmeye başladığı zaman, steril pipetler aracılığı ile taze medium konularak, flask zemininden hücreler tyripsin-EDTA ile ayrılarak pasajlandı. Pasajlanan PC12 hücreleri, her flaskda hücre dansitesi 2x 10⁴ olacak şekilde Poly-D-Lysine kaplı 25 ve 75 cm²'lik kültür flasklarına aynı dansitede ekildi. 48 saat sonra hücreler gruplara ayrıldı;

1. GRUP (Kontrol grubu): Sadece RPMI 1640' da 24 saat bırakıldı.
2. GRUP (ZNS grubu): Bu gruptaki hücreler 100 mikroM ZNS ile 5 saat boyunca inkübe edildi.
3. GRUP (MPP⁺): Bu gruptaki hücreler 100 mikroM MPP⁺ ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

4.GRUP (ZNS+MPP⁺ grubu): Bu gruptaki hücreler MPP⁺ ve ZNS ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

3.3. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.3.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (141) bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1- %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

2-Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (142) tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan Solüsyonlar:

1- Tris (1) HCl tampon solüsyonu (50 mM) pH:7,6

2- GSH solüsyonu

3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9

6- DTNB solüsyonu

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

3.3.2. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için PC12 hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4µM Fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (143). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na⁺-HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi (144) ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (145).

3.3.3. Lipid Peroksidasyon Analizi

PC12 hücrelerinde lipid peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (144) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm PC12 hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.3.4. MTT Analizi

Her bir eppendorf tüpüne 10^6 hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir eppendorfa 15 mikrolitre MTT kimyasali ilave edildi. MTT kimyasali ilavesinden sonra bütün eppendorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37°C de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün eppendorflar 500 g de 10 dakika boyunca santrifuj edildi. Santrifuj sonrası supernatant atıldı. Her bir eppendorfa 400'er mikrolitre DMSO ilave edildi. Pellet DMSO içerisinde resuspense edildi, sonra her bir küvete 250 mikrolitre bu örnekten konuldu. Spektrofotometrede 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı. (Abs490 nm –Abs650 nm: x) (144).

3.3.5. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. PC12 hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 9.05 paket bilgisayar programı

kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. PC12 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyonu Düzeyleri

Lipid peroksidasyon sonuçları tablo 1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde lipid peroksidasyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla MPP⁺ grubunda (p<0.05) anlamlı olarak yüksek bulundu. ZNS (p<0.05) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.05) grubunda MPP⁺ grubuna kıyasla lipid peroksidasyon düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı. Diğer bir ifadeyle PC12 hücreleri MPP⁺ ve ZNS ile inkübe edildiğinde, ZNS’in lipid peroksidasyonu üzerinde koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi.

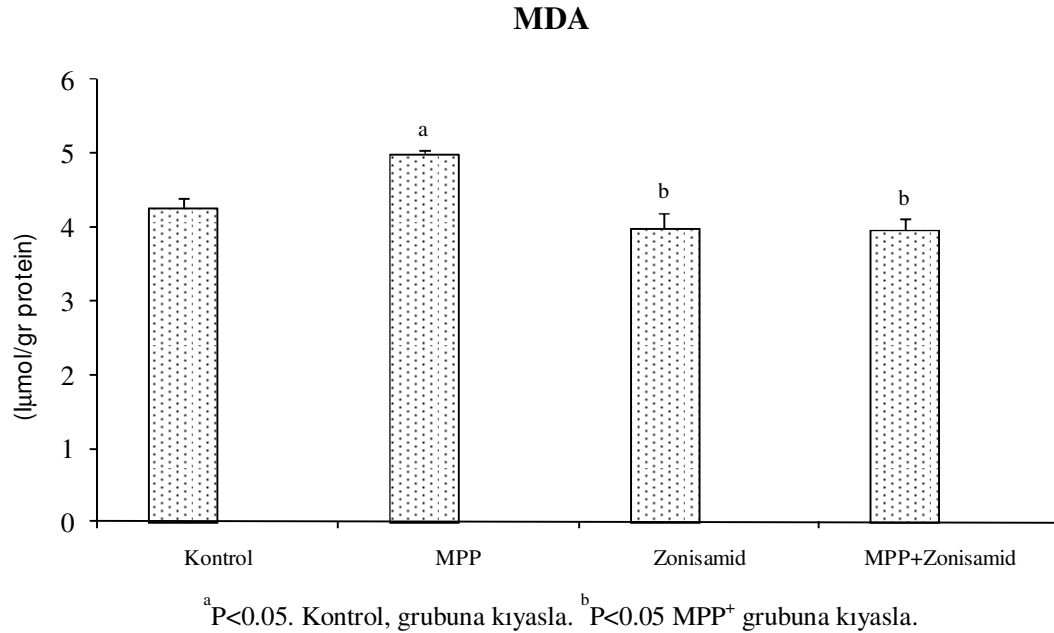
Tablo 2. PC12 hücrelerinde lipid peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerinde MPP⁺ ve Zonisamid’in etkileri. (n=6, ortalama değer±standart sapma).

Değerler	Kontrol	MPP ⁺	Zonisamid	MPP ⁺ +Zonisamid
LP (µmol/gr protein)	4.26 ± 0.13	4.99 ± 0.06 ^a	3.99 ± 0.21 ^b	3.96 ± 0.15 ^b
GSH (µmol/gr protein)	1.68 ± 0.11	1.43 ± 0.07 ^a	1.90 ± 0.12 ^c	1.68 ± 0.07 ^{b,e}
GSH-Px (IU/gr protein)	3.16 ± 0.16	2.46 ± 0.23 ^a	3.19 ± 0.27 ^d	2.98 ± 0.14 ^{c,e}

^aP<0.05. Kontrol, grubuna kıyasla.

^bP<0.05, ^cp<0.01 ve ^dp<0.001. MPP⁺ grubuna kıyasla.

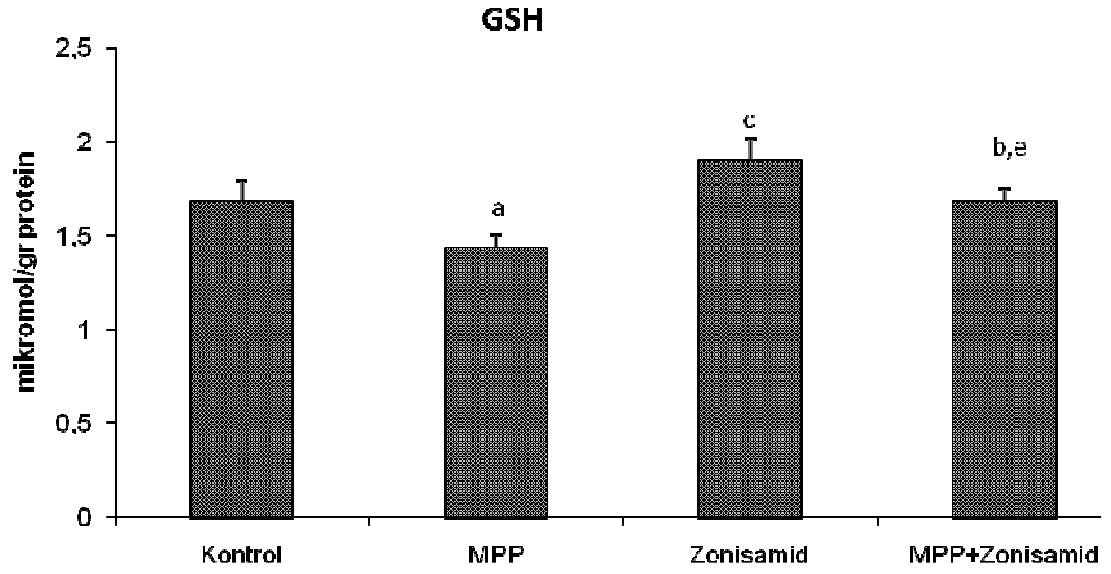
^eP<0.05. Zonisamid grubuna kıyasla.



Grafik 1. PC12 hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeyleri

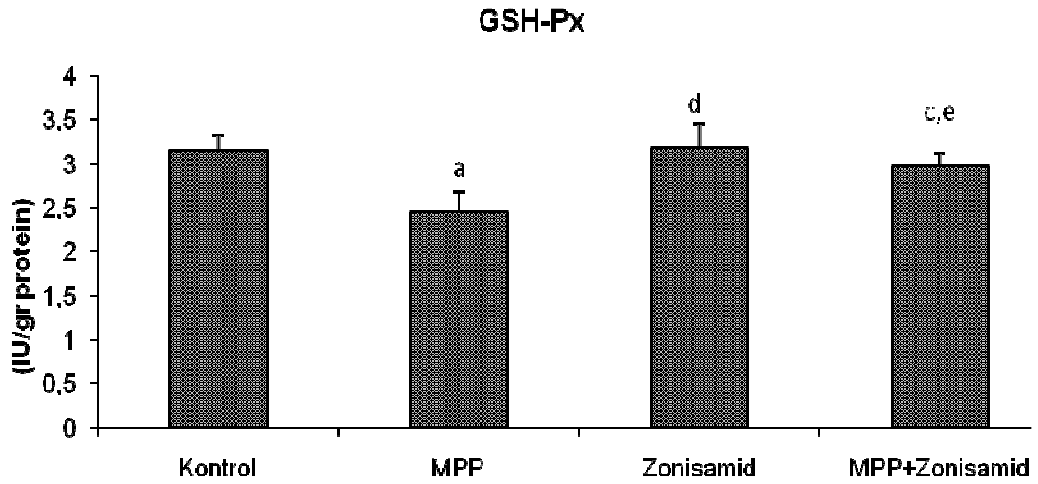
4.2. PC12 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri

GSH ve GSH-Px sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyasla MPP⁺ grubunda (p<0.05) anlamlı olarak düşük saptandı. MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS (p<0.01) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.01) grubunda GSH düzeyleri anlamlı olarak yüksek tespit edildi. ZNS grubu ile ZNS+MPP⁺ (p<0.05) grubu karşılaştırıldığında GSH düzeyleri ZNS grubunda anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Diğer bir ifadeyle PC12 hücreleri MPP⁺ ve ZNS ile birlikte ve ayrı inkübe edildiğinde ZNS'in GSH düzeyleri üzerine koruyucu etki gösterdiği gözlemlendi. Kontrol grubuna göre MPP⁺(p<0.05) grubunda GSH-Px düzeyleri anlamlı olarak düşük tespit edildi. ZNS (p<0.001) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.01) gruplarında MPP⁺ grubuna kıyasla GSH-Px düzeyleri anlamlı olarak yüksek tespit edildi. MPP⁺+ZNS (p<0.05) grubunda ZNS grubuna kıyasla GSH-Px düzeyi anlamlı olarak düşük tespit edildi. Diğer bir ifadeyle, gruplar karşılaştırıldığında ZNS'in GSH-Px üzerinde koruyucu etkisi gözlemlendi.



^aP<0.05. Kontrol, grubuna kıyasla. ^bP<0.05, ^cp<0.01 MPP⁺ grubuna kıyasla
^cP<0.05. Zonisamid grubuna kıyasla

Grafik 2. PC12 hücre gruplarında GSH düzeyleri



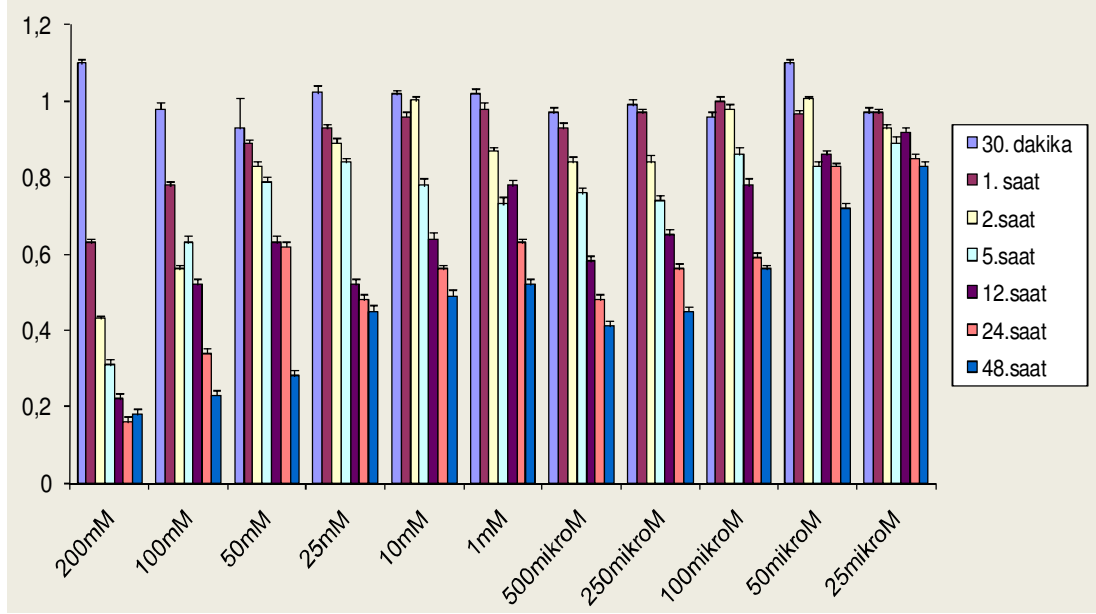
^aP<0.05. Kontrol, grubuna kıyasla
^cp<0.01 ve ^dp<0.001. MPP⁺ grubuna kıyasla.
^cP<0.05. Zonisamid grubuna kıyasla

Grafik 3. PC12 hücre gruplarında GSH-Px düzeyleri

MPP⁺'nin Hücre Canlılığı Üzerine Toksik Dozunun Tayini

PC12 hücrelerinde MPP⁺'nin hücre canlılığı üzerine etkisi grafikte görülmektedir. Hücreler artan konsantrasyonlarda (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M,

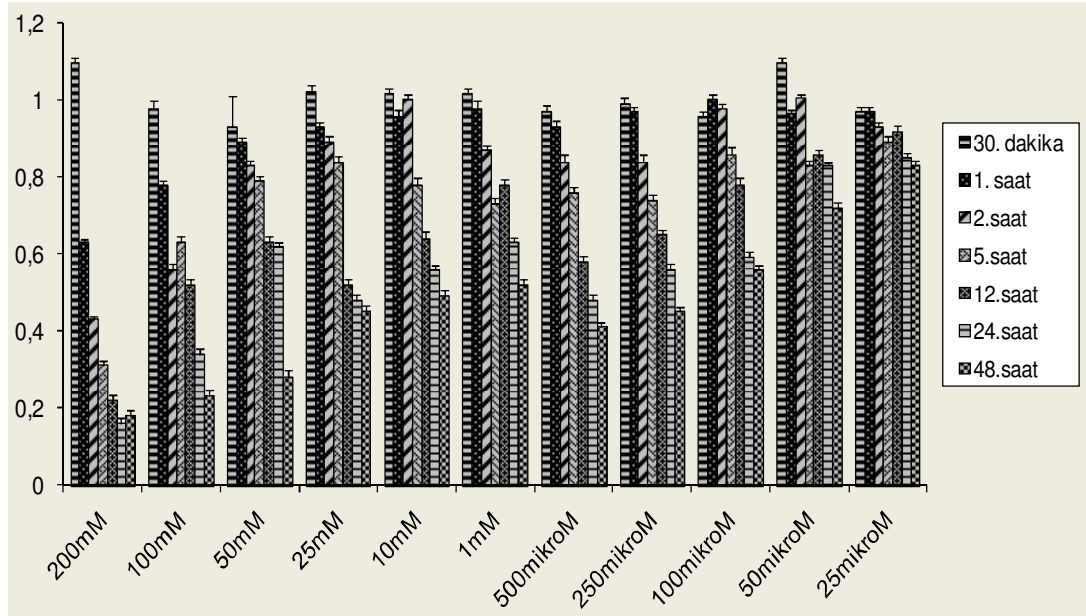
500 μM , 1mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM) MPP^+ ile 7 farklı zamanda (30 dk, 1, 2, 5, 12, 24,48 saat) inkübe edildi. MPP^+ 'nin toksik etkisi, 100 μM dozda ve inkübasyondan 24 saat sonra başladı. MPP^+ 'nin toksik dozu hücre kültür ortamında 100 μM 'da 24 saat olarak belirlendi.



Grafik 4. Değişik doz ve saatlerde MPP^+ 'nin hücre canlılığı (MTT) üzerine etkileri

Zonisamid'in Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik ve Toksik Dozunun Tayini

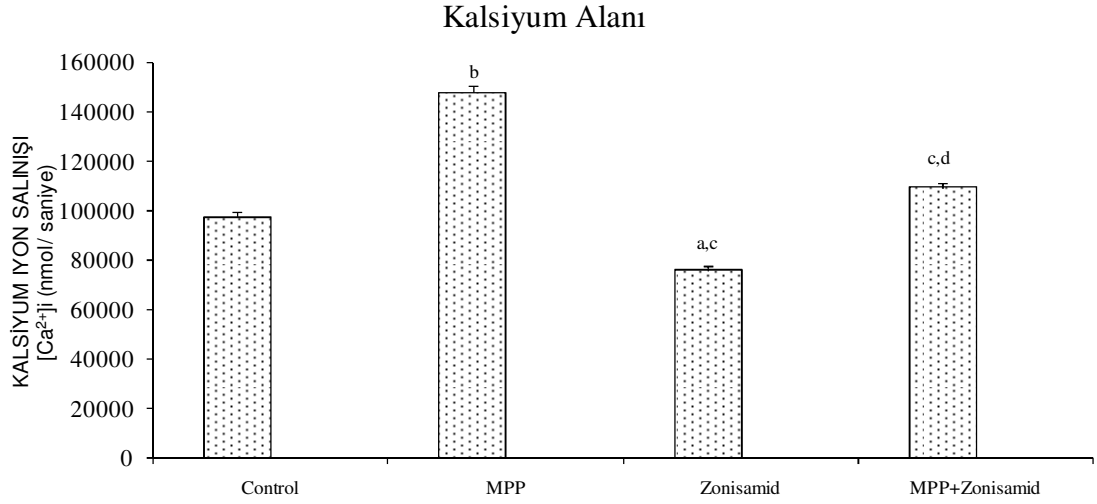
PC12 hücrelerinde ZNS'in hücre canlılığı üzerine etkisi grafikte gösterilmiştir. PC12 hücreleri, 11 farklı dozda (25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 1 mM, 10mM, 25mM, 50mM, 100mM, 200mM) ZNS ile 7 farklı zamanda (30 dk, 1, 2, 5, 12, 24,48 saat) inkübe edilerek ZNS'in terapötik ve toksik dozu bulundu. 100 μM dozda ve 10 saatte hücre canlılığında %25 misli azalma tespit edildi. ZNS'nin toksik etkisinin 100 μM dozda ve 24. saatte başladığı belirlendi. ZNS'nin en yüksek terapötik etkisi ise 100 μM doz ve 12 saat olarak tespit edildi.



Grafik 5. Değişik doz ve saatlerde Zonisamid'in hücre canlılığı (MTT) üzerine etkileri.

4.3. PC12 hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu $[Ca^{+2}]$ Salınımı Düzeyleri

PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H_2O_2) neden olduğu sitozole kalsiyum iyonu $[Ca^{+2}]$ salınımı üzerindeki etkileri grafik gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre MPP⁺ ($P < 0.001$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı düzeyde artmış olarak bulundu. Kontrol grubuna göre ZNS ($p < 0.01$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı olarak düşük düzeyde saptandı. MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS ($p < 0.001$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı olarak düşük tespit edildi. ZNS grubuna göre ZNS + MPP⁺ ($p < 0.01$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Diğer bir ifadeyle ZNS'in sitozole Ca^{+2} salınımı üzerine azaltıcı etkisi gözlemlendi.

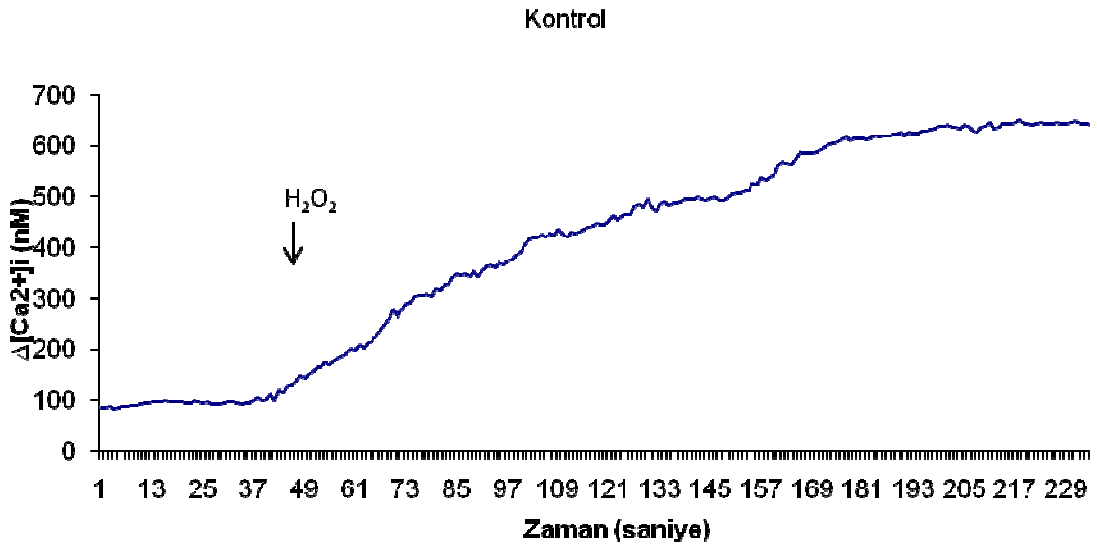


^aP<0.01 ve ^bP<0.001. Kontrol, grubuna kıyasla.

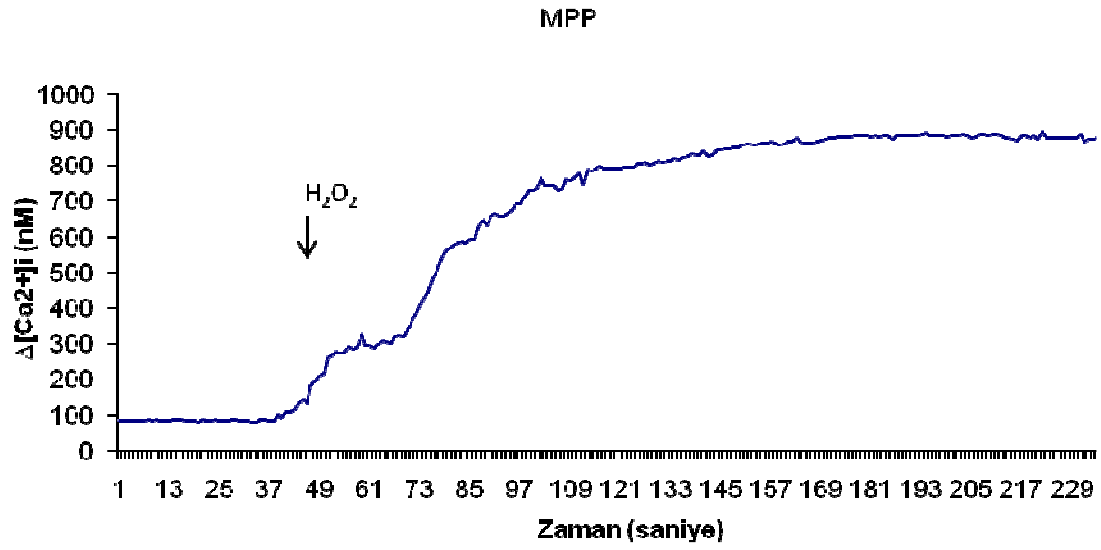
^cp<0.001. MPP⁺ grubuna kıyasla.

^dP<0.01. Zonisamid grubuna kıyasla.

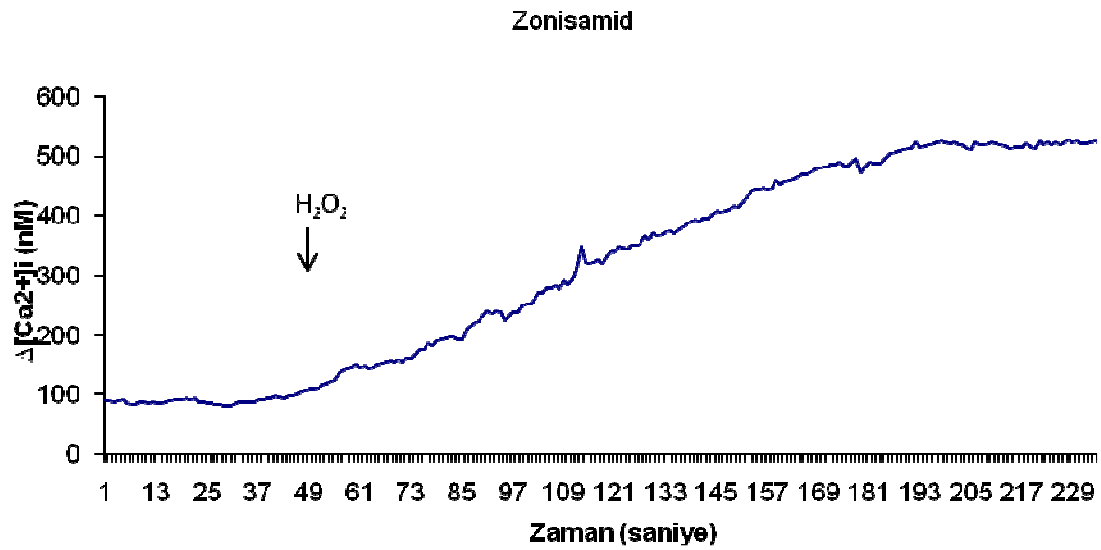
Grafik 6. PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H₂O₂) neden olduğu sitozole Ca⁺² salınımı üzerindeki etkileri.



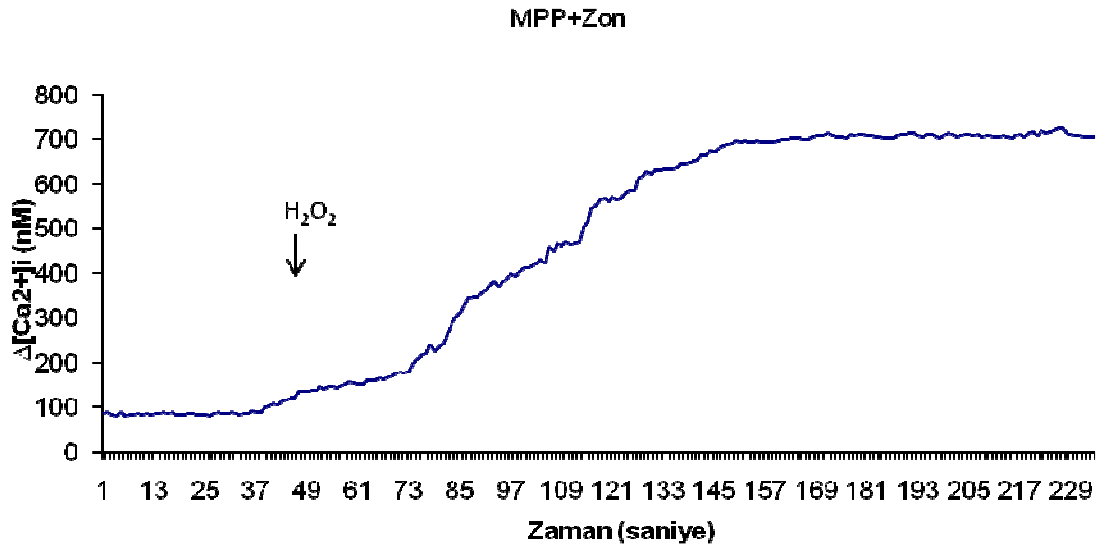
Grafik 7. Kontrol grubunda sitozole Ca⁺² salınımının zaman akım grafiği



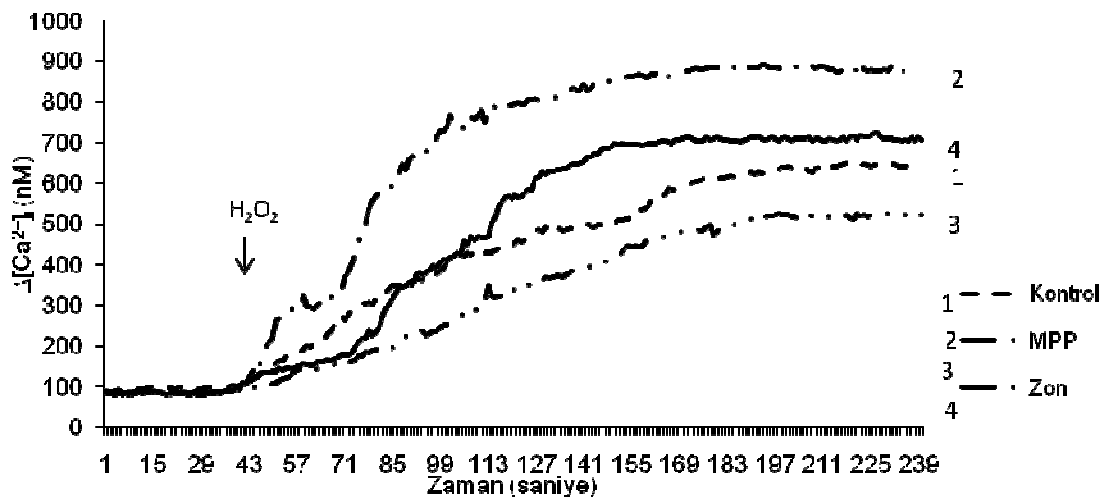
Grafik 8. MPP⁺ grubunda sitozole Ca²⁺ salınımının zaman akım grafiği



Grafik 9. ZNS grubunda sitozole Ca²⁺ salınımının zaman akım grafiği



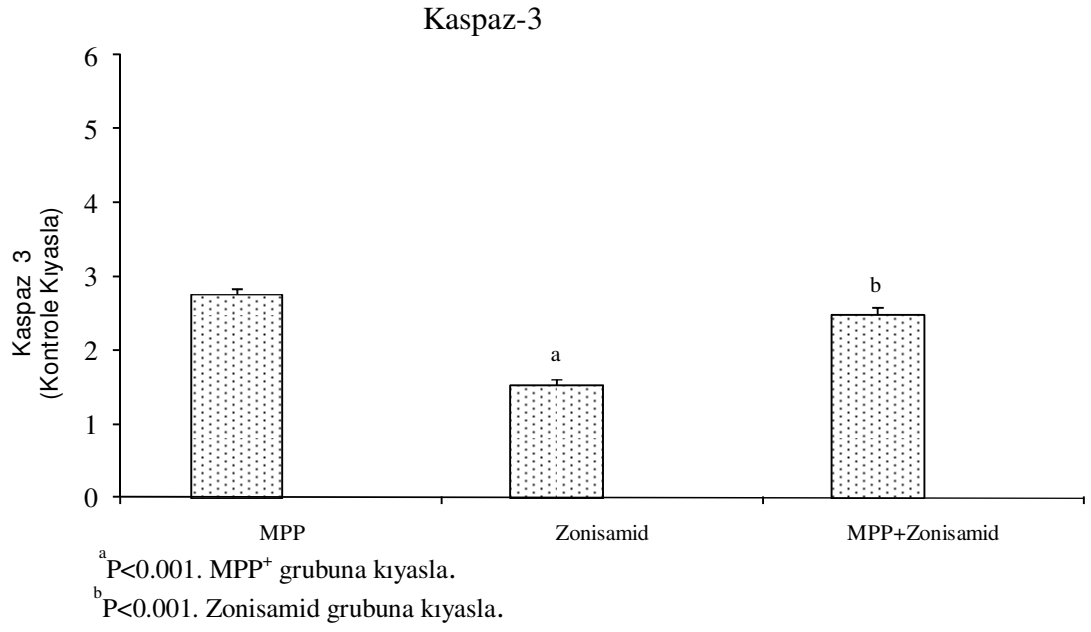
Grafik 10. ZNS+MPP⁺ grubunda sitozole Ca⁺² salınışının zaman akım grafiği



Grafik 11. PC12 hücre gruplarının sitozole Ca⁺² salınışının zaman akım grafiği

4.4. PC12 Hücre Gruplarında Kaspaz -3 Düzeyinin Tayini

PC12 hücre gruplarında Kaspaz-3 değerleri grafikte gösterilmiştir. MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS (p<0.001) grubunda kaspaz-3 düzeyi anlamlı olarak düşük tespit edildi. ZNS grubuna göre ZNS+ MPP⁺ (p<0.001) grubunda kaspaz-3 düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Diğer bir ifadeyle, ZNS'in, bir apoptoz öncülü olan kaspaz-3 aktivitesini azaltarak, PC12 hücreleri üzerinde koruyucu etkisi gözlenmiştir.



Grafik 12. PC12 hücre gruplarında Kaspaz-3 aktivitesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Parkinson hastalığı, özellikle yaşlılarda nörolojik engelliliğin önde gelen nedenlerinden biridir. Klinik özellikleri tremor, bradikinezi, rijdite ve postural instabiliteyi içermektedir (146,147).

Parkinson hastalığında mevcut semptomatik tedaviler daha çok motor belirtiler için ve genelde erken dönemlerde etkili olduğu için, hastalığın yavaş fakat kaçınılmaz progresyonu nöronal ölüme yol açan patogenetik mekanizmaların aydınlatılmasını gerekli kılar (148).

Esasen bir anti-epileptik ajan olarak bilinen ZNS, PH, duygu-durum bozuklukları ve epilepsi gibi nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarda klinik olarak geniş etki spektrumuna sahiptir (114,149,150). Son zamanlarda, özellikle Japonya'da yapılan çift-kör kontrollü çalışmalarda L-dopa'ya ek olarak verilen düşük doz ZNS (25-100mg/gün) tedavisinin PH'daki kardinal semptomlarda iyileşme sağladığı ileri sürülmüştür. (107,114). Yapılan deneysel çalışmalarda, Mori ve ark. ZNS'in hidroksil (OH⁻) ve nitrik oksit (NO) gibi serbest radikalleri temizleyici özelliğini rapor etmişlerdir (119). Noda ve ark. tarafından ZNS'in nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini azaltıcı etkisi rapor edilmiştir (121). Komatsu ve ark. ZNS'in lipid peroksit oluşumuna inhibitör etkisi ve oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-hidroksi-2V-deoksiganosin (8-OHdG) düzeyini azaltıcı etkisini rapor etmişlerdir (120,151).

Nigrostriatal dopaminerjik nöronlar yaş ilerledikçe azalır. Parkinson hastalığında bu azalma daha hızlıdır. Nöron kaybının kesin nedeni bilinmemekle birlikte artmış oksidatif stresin etken olabileceği ile ilgili bulgular vardır. Bu yönde deneysel ve klinik olmak üzere bir çok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

Son çalışmalarda, oksidatif stresin, serbest oksijen radikalleri aracılığı ile yaptığı nöron hasarı ve SNC'da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Antioksidan maddelerin hücreyi patojenik oksidayondan koruyucu rolü vardır. Oksidatif stres yüksekliği, PH patogenezinde rol oynayabilir ve nöronal hücre ölümüne sebep olabilir (152).

Biz çalışmamızda, PH patogenezinin altında yatan biyokimyasal parametreleri değerlendirmek için PC12 hücre kültürü ortamında MPP⁺ ile oluşturduğumuz Parkinson modelinde ZNS molekülünün oksidatif stres, hücre içi Ca⁺² akışı, kaspaz-3 aktivitesi üzerine olan etkilerini araştırdık.

Araştırmamızda, lipid peroksidasyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla MPP⁺ grubunda (p<0.05) anlamlı olarak yüksek bulundu. ZNS (p<0.05) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.05) grubunda MPP⁺ grubuna kıyasla lipid peroksidasyon düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı. Diğer bir ifadeyle, ZNS'in PC12 hücrelerinde kontrol grubu ve MPP+ grubuna göre lipid peroksidasyonu üzerinde koruyucu etkisi olduğunu tespit ettik.

Dopamin reseptörleri bol miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermesi nedeniyle oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Membran lipid peroksidasyonu, reseptör yoğunluğunun azalmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu reseptör fraksiyonunu indirekt etkileyen fosfolipaz A2 yolundaki bir değişimle de ilgilidir. Serbest radikaller membran yağ asitleri ile birleşerek tepkimeler serisini başlatır. Serbest radikal ve yağ asiti, oksijen ile birleşerek lipid peroksid radikalini (LOO[•]) oluşturur. Lipid peroksid radikali başka yağ asitleri ile tepkimeye girerek lipidhidroperoksidleri (LOOH) oluşturur. Üç yada daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile MDA oluşur. Bu peroksid ürünleri metal iyonları varlığında bazı enzimatik tepkimeler ile nöronal hasara yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit, iyon transportunda ve hücre içi iyonik hemostazda önemli rolleri olan membran proteinlerine çapraz bağlanmaya ve polimerizasyona neden olarak iyon transportu, enzim aktivitesi gibi membran özelliklerinde değişikliğe neden olur. Bunun sonucunda membran geçirgenliği ve kırılabilirliği artar. Ayrıca diffüze olabilen MDA, DNA'nın nitrojen bazıları ile tepkimeye girerek membran enzim aktivitesi azalır ve hücre içi Ca⁺² girişi artar. Hücre içine Ca⁺² artışı sonucu; fosfolipaz aktivasyonu ile fosfolipid kaybında artış, membran geçirgenliğinde değişiklik, akışkanlığında azalma, negatif yüzey geriliminde artma, proteaz aktivasyonu, katabolik enzimlerin aktivitesinde artış, endonükleaz aktivitesi ile DNA kırıkları meydana gelmektedir (153).

Oksidatif stresin Ca^{+2} metabolizması üzerine olan etkileri bilinmektedir. Çalışmamızda PC12 hücre gruplarında oksidatif stresin (H_2O_2) neden olduğu sitozole Ca^{+2} salınımı üzerindeki etkileri grafik gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre MPP⁺ ($P<0.001$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı düzeyde artmış olarak bulundu. Kontrol grubuna göre ZNS ($p<0.01$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı olarak düşük düzeyde saptandı. MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS ($p<0.001$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı olarak düşük tespit edildi. ZNS grubuna göre ZNS+MPP⁺ ($p<0.01$) grubunda sitozole Ca^{+2} salınımı anlamlı olarak yüksek tespit edildi. PC12 hücrelerinde MPP⁺ sitozole Ca^{+2} akışını artırırken, ZNS'in hücre içine Ca^{+2} salınımını azalttığını tespit ettik.

Oksidatif stres, Ca^{+2} mobilize edici reseptörler üzerinden hücrel Ca^{+2} da bir dengesizliğe neden olur. Deneysel Parkinson modeli oluşumunda kullanılan MPTP MAO-B tarafından MPP⁺ ye dönüştürülür. Bu madde mitokondriyal Ca^{+2} hemostazını değiştirerek elektron transportunu engeller. Kalsiyumun hücreye geri alınımını artırır ve hücrede artan lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Bu in vitro bulgular sonucunda demire bağlı oksidatif hasarın kalsiyum kanallarının demir tarafından açılması sonucu intrasellüler kalsiyum artışı ve mitokondriyal kalsiyum salınımına bağlı olduğu gözlenmiştir (154).

Parkinson hastalığında dopaminerjik nöron kaybını açıklamak çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir. Teorilerden biri, nigral nöronların selektif olarak çevresel toksik ajanların tetiklediği mitokondriyal disfonksiyon. Bu, içsel mitokondriyal toksin üretimi veya kompleks I gibi mitokondriyal enzimlerin endojen defektine yol açmasıyla açıklanmaktadır (155). Bu teori, MPTP'nin aktif metaboliti olan MPP⁺ ve Rotenon gibi mitokondriyal toksinlerin bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. İnsanlar, primatlar ve rodentler üzerinde yapılan nöropatolojik çalışmalarda mitokondriyal kompleks I aktivitesini yaklaşık olarak %30 oranında düşürerek PH'na yol açtığı ileri sürülmektedir (156,157). İkinci olarak, proteinlerin toksik birikimi ve agregasyonu ile nigral nöron kaybına yol açan proteolitik stres hipotezi ileri sürülmüştür (158).

Yabe ve ark. maymunlar ve farelere gruplar halinde MPTP, ZNS, Selejilin vererek striatal dopamin düzeylerine baktıkları bir çalışmada, MPTP ile tedavi edilen

fare ve maymunlarda striatumdaki dopamin miktarının azaldığı tespit edilmiş. MPTP inhibitörü olan Selejilinin birlikte uygulanması ile dopamin miktarı kontrol grubuna benzer olarak tespit edilmiş. Birlikte uygulanan ZNS dopamin miktarı üzerinde MPTP'nin etkisini inhibe etmediği fakat MPTP+ZNS ile tedavi edilen hayvanlarda yalnız MPTP tedavi edilen gruba göre striatal dopamin devirini artırdığı saptanmış ve bununla dopaminerjik nöronlara yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir (159).

Costa ve ark. (2010) yaptığı çalışmada, kompleks I inhibitörü olan rotenon ile yaptıkları nörotoksik modelde düşük dozda verilen ZNS'in (0.3, 1, 3 ve 10 μ M) rat striatal nöronlarını rotenon toksisitesinden koruduğu rapor etmişler ve bu nedenle bazal gangliyon nörodejeneratif hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmektedirler (160).

PC12 hücre kültüründe, MPP⁺ ile oluşturduğumuz Parkinson modelinde MPP⁺'nin oksidatif stresi artırdığı ve 100 μ M ZNS ile inkübasyon sonrası bu etkinin azaldığını tespit ettik.

Shashikant Nikam ve ark. Parkinson hastalarının serum, plazma veya eritrositlerindeki enzimatik (Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Katalaz, Seroloplazmin gibi) ve non-enzimatik vitamin E, C düzeylerini değerlendirdiği çalışmada bulgular, sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılmış. Parkinson hastalarında lipid peroksidasyonunun indikatörü olan plazma tiobarbutirik asit (TBARS) düzeyleri anlamlı olarak yüksek iken, SOD, GSH-Px, katalaz (H_2O_2) düzeyleri anlamlı olarak düşük saptanmıştır (152).

İntraselüler dopamin, MAO-A veya otooksidasyon yoluyla metabolize edilir. Dopamin metabolizması MAO-A tarafından dihidroksifenilasetik asid (DOPAC) ve H_2O_2 oluşturulur. İntraselüler otooksidasyon ile H_2O_2 ve dopamin-quinone üretilir. Dopamin-quinone protein sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek, GSH düzeylerinin azalmasına ve proteinlerin yapısının değişmesine yol açar. Bu bağlamda, dopamin-quinone'nun sinaptozomlarda glutamat ve dopamin transport fonksiyonlarını ve tirozin hidroksilaz (TH) inhibe ettiği gösterilmiş. Dopamin oksidasyonu seçici olarak dopaminerjik hücre ölümüne yol açabilir (161).

Protein oksidasyonunun göstergesi olan karbonil değişiklikleri, SNc'da normal olguların bazal gangliyonları ve prefrontal korteksleri ile karşılaştırıldığında

2 kat artmıştır. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bir aldehit olan 4-hidroksi-2,3-nonenal (HNE) ve nükleozid oksidasyon ürünü olan 8-hidrosiguanosine, Parkinson hastalarının SNc'da normal kontrol grubuna göre 16 kat artmıştır. HNE proteinlere bağlanarak yapılarını değiştirir, mitokondriyal solunumu durdurur ve apoptozis bağımlı kaspazları indükler. Parkinson hastalarının SNc'da sağlam kalan nöronlarda GSH düzeylerinin kendi sağlam yaş gruplarına göre azalmış olduğu tespit edilmiş. Ayrıca, sinaptozomlarda dopaminin MAO-A tarafından metabolize edilmesi, GSSG düzeylerinde anlamlı derecede artış ile sonuçlandığı gösterilmiştir. GSH ve GSSG düzeylerindeki bu değişiklikler muhtemelen dopamin oksidasyonu sonucu gelişen oksidatif stres artışını göstermektedir. GSH'nın bu şekilde azalması hücre kültüründe dopamin ve H₂O₂'nin artmış toksisitesine bağlanmıştır. H₂O₂, redukte glutatyon (GSH) ile detoksifiye olur, dolayısıyla dopamin turnover hızının artması veya GSH eksikliği oksidatif strese yol açar. (161).

Hücrel metabolizma sonucu hidrojen peroksidin toksik etkilerini engelleyen en güçlü enzimlerden bir olan GSH-Px özellikle orta beyin glial hücrelerde bulunur. İmmunohistokimyasal metodlarla GSH-Px içeren glial hücrelerin yoğunluğu, mezensefalonun çeşitli dopaminerjik hücre grupları arasında farklılıklar gösterir. Örneğin merkezde bulunan gri maddede yüksektir (Parkinson hastalığında korunmuştur), SNc zona kompakta da düşüktür (Parkinson hastalığında en çok etkilenen bölge). Kontrollerin beynindeki, glutatyon peroksidaz(+) hücre yoğunluğu ile Parkinson hastalığındaki dopaminerjik nöronlar arasında negatif bir ilişki varlığı gösterilmiştir. Parkinson hastalığında en çok etkilenen nöronların düşük yoğunlukta glutatyon içeren hücrelerle çevrildiği, bu nedenle oksidatif strese karşı yeterince korunamadığı ileri sürülmektedir (153).

GSH-Px'in kosubstratı olan glutatyon, sistein içeren bir tripeptiddir ve beyinde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Peroksidlerin uzaklaştırılması, GSH'nın GSH-Px tarafından GSSG'na dönüşümü ile sonuçlanır. GSH'nın instabilitesi oksidatif stresin yaygın kabul edilen bir göstergesidir (153).

Glutatyon, reaktif oksijen radikalleri ve dopamin quinone toksisitesi üzerine antioksidatif aktivite göstermektedir. Dopaminerjik nöronlar içindeki GSH düzeyinde azalma, mitokondriyal kompleks I aktivitesini bozmaktadır (112).

Parkinson hastalarının SNC'da lipid peroksidasyonunun arttığı, GSH düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.(42). Reiderer ve ark yaptığı bir diğer çalışmada, nöron kaybının derecesi ile GSH deplesyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (153).

Özet olarak, serbest radikaller, SNC nöronlarının destrüksiyonuna neden olan en önemli ajanlardır ve bu yolla Parkinson hastalığı ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyasla MPP⁺ grubunda (p<0.05) anlamlı olarak düşük saptandı. MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS (p<0.01) ve ZNS+MPP⁺(p<0.01) grubunda GSH düzeyleri anlamlı olarak yüksek tespit edildi. ZNS grubu ile ZNS+MPP⁺(p<0.05) grubu karşılaştırıldığında GSH düzeyleri ZNS grubunda anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Diğer bir ifadeyle PC12 hücreleri MPP⁺ ve ZNS ile birlikte ve ayrı inkübe edildiğinde ZNS'in GSH düzeyleri üzerine koruyucu etki gösterdiği gözlemlendi. Kontrol grubuna göre MPP⁺(p<0.05) grubunda GSH-Px düzeyleri anlamlı olarak düşük tespit edildi. ZNS (p<0.001) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.01) gruplarında MPP⁺ grubuna kıyasla GSH-Px düzeyleri anlamlı olarak yüksek tespit edildi. MPP⁺+ZNS (p<0.05) grubunda ZNS grubuna kıyasla GSH-Px düzeyi anlamlı olarak düşük tespit edildi. PC12 hücre gruplarında, ZNS'in gruplar karşılaştırıldığında, GSH ve GSH-Px düzeylerini anlamlı olarak artırdığını tespit ettik.

Asunama ve ark. ZNS'in genel reaktif oksijen radikallerini temzileyici etkisine ek olarak, DA veya L-dopa'nın indüklediği quinone toksisitesi üzerinde koruyucu rol oynadığını rapor etmişler ve L-dopa alan Parkinson hastalarında adjuvan tedavi olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedirler (112).

Asunama ve ark. ZNS ile tedavi edilen hemiparkinsonyan farelerde, GSH düzeylerinin arttığını ve striatal levodopa tarafından indüklenen quinone toksisitesini tamamen baskıladığı rapor edilmiştir. Ayrıca hemiparkinsonyan farelerin lezyon tarafındaki nigrostriyal dopaminerjik nöronlardaki azalmanın, tekrarlayan ZNS enjeksiyonları ile anlamlı olarak ortadan kalktığı gözlenmiştir. Burdan yola çıkılarak, ZNS'in progresif dopaminerjik nörodejenerasyon ve oksidatif strese karşı nöroprotektif etkisinin olduğu ileri sürülmüştür (162).

Yano ve ark. MPTP ile oluşturulan Parkinson modelinde ZNS'in dopaminerjik hücre hasarına karşı TH aktivitesini artırmak suretiyle nöroprotektif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (116).

Alzheimer, Parkinson, Huntington Koresi ve Amiyotrofik Lateral Skleroz gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda hatalı protein üretimi, oksijen radikali yapımında artış, hücre içi kalsiyum artışı gibi mekanizmalarla nöron kaybına sonuçta apopitozun yol açtığı gösterilmiştir (163).

Apopitotik süreç, kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, bugüne dek bir düzine farklı türü tanımlanan, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir (90). (**caspase= cysteine-dependent aspartate specific proteases**).

Parkinson hastalarının beyin dokuları kullanılarak yapılan daha yeni bir çalışmada ise, beynin substansiya nigra bölgesinde kaspaz-1, kaspaz-3 ve TNF-R1 düzeylerinin kontrol örneklerine göre anlamlı bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir (94).

Nadine A. Tatton yaptığı benzer bir çalışmada substantia nigra da kaspaz-3 ve bax aktivitesinin arttığını saptamıştır (164).

MPTP kullanılarak farelerde parkinsonizm yaratılan bir başka çalışmada, dopaminerjik nöronlarda bir pro-apoptotik protein olan Bax'ın mRNA ve protein düzeylerinde artış gözlenmiş, buna karşılık bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2 seviyesinin düştüğü kanıtlanmıştır (165).

PC12 hücrelerinde 6-OHDA (6-hidroksidopamin) kullanılarak oluşturulan PH modelinde ise mitokondriden sitokrom c ve Smac/Diablo'nun salındığı, kaspaz-3'ün aktive olduğu PARP'ın (poli-ADP riboz polimeraz) kesildiği ve nükleer yoğunlaşmanın oluştuğu gösterilmiş, ayrıca 6-OHDA uygulanmasından önce bir nedime proteini olan Hsp27'nin yüksek oranda ifade edilmesinin de sitokrom c salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonunu ertelediği gözlenmiştir (166).

MPTP kullanılarak oluşturulan bir diğer hayvan modelinde mitokondriyel kompleks I yetersizliği bulunmuş, bunun da in vivo sistemde apopitotik yolu

tetiklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada farelerin beyinlerinden izole edilmiş mitokondriler kullanıldığında ise kompleks I yetersizliğinin doğrudan apoptoza yol açmadığı, ancak yarattığı intramitokondriyel oksidatif stres sonucu intermembran boşluğundaki sitokrom c konsantrasyonunu yükselttiği, ve Bax'a bağlı olarak gelişen apoptozun ortaya çıkma olasılığını arttırdığı bulunmuştur (167).

Andreas Hartmann ve ark. insan beyni ve in vitro ortamda yapılan elektromikroskopik analizlerde, kaspaz-3 aktivitesinin PH'da hücre ölümünün sonucu değil, öncülü olduğunu ileri sürmüşlerdir (168).

PC12 hücrelerinde MPP⁺ ile oluşturduğumuz Parkinson modelinde kaspaz-3 aktivitesinin MPP⁺ grubuna göre ZNS grubunda anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. Yine MPP⁺+ZNS grubu ile ZNS grubu karşılaştırıldığında kaspaz-3 aktivitesinin ZNS grubunda anlamlı olarak düşük olduğunu tespit ettik. Diğer bir ifadeyle, MPP⁺ kaspaz-3 aktivitesini artırıcı etkisi gösterilmiştir. ZNS, PH'da bir apoptoz öncülü olan kaspaz-3 aktivitesini azaltmak suretiyle, nöronal hücre ölümünü engelleyebilir.

Dünyada en sık görülen hareket bozukluğu olması ve etiyolojisinin gösterdiği karmaşıklık PH'nı, nörodejenerasyon konusundaki araştırmaların odak noktalarından biri haline getirmiştir. Parkinson hastalığının oluşumunda bir çok faktör rol oynamaktadır. Beyinde oksidatif stres ve antioksidan defans mekanizmaları arasındaki dengesizlik PH patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Enerji metabolizmasındaki değişiklikler, eksotoksisite, bozulmuş Ca⁺² homeostazı diğer önemli etkenler olup, farklı uyarılarla apoptozu başlatabilirler. Bu yönde deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaya devam etmektedir.

Çalışmamızda, PH'da oksidatif stresin rolünden yola çıkarak yaptığımız incelemelerde, ZNS'in PC12 hücrelerinde lipid peroksidasyonunu azalttığını, GSH ve GSH-Px düzeylerini ise anlamlı olarak arttırdığını tespit ettik. Bu nedenle, ZNS'in antioksidan özellikle bir ajan olduğunu düşünebiliriz. Nöronal dejenerasyonda önemli rolü olan bozulmuş kalsiyum homeostazıyla ilgili, PC12 hücrelerinde sitozole Ca⁺² akışını ZNS'in anlamlı olarak azalttığını saptadık. PC12 hücrelerinde, hücre içi ve dışı uyarılarla nöronal hücrenin apoptoza gitmesinde öncül rolü olan kaspaz-3 aktivitesinin ZNS ile anlamlı olarak azaldığını tespit ettik.

Son zamanlarda, esasen bir antiepileptik olup, PH'da yararlı etkileri tespit edilen ZNS ile ilgili çalışmalar rapor edilmeye başlamıştır. Günde bir kez 25-50mg alınan ZNS ileri evre Parkinson hastalarında, motor fonksiyonlarda iyileşme sağladığı tespit edilmiştir. ZNS'in antiparkinsonyan etkileri, TH mRNA ve TH protein düzeylerini arttırıp, dopamin sentezini aktive etmek suretiyle striatumdaki dopamin içeriğini arttırmaktadır. MAO aktivitesini ılımlı düzeyde inhibe etmektedir. T-tipi Ca^{+2} kanalı inhibisyonu anlamlı düzeyde gösterilmiştir. Bir çok parkinsonyan modelde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Quino-protein oluşumunu inhibe etmesi ve GSH düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir. Murata ve ark. yakın gelecekte, genome wide association study (GWAS) kullanarak ZNS'in bireysel farklılıklarından sorumlu faktörleri çalışmayı ve Parkinson hastaları üzerinde ZNS'in nöroprotektif etkisini doğrulayacaklarını ileri sürmektedirler (169). ZNS Japonya'da 2009 ocak itibariyle anti-parkinsonyan ilaç olarak kabul edilmiştir (170).

Sonuç olarak, yaptığımız bu deneysel çalışmada, ZNS'in Parkinson üzerindeki olumlu etkilerini moleküler düzeyde destekleyen veriler elde ettik. Tüm bu veriler yeterli olmamakla birlikte ZNS Parkinson hastalığı üzerindeki etkilerine yönelik yapılan çalışmalar artmaktadır. ZNS'in bu özellikleri nedeniyle ümit verici bir ilaç olamkla birlikte bu konuda daha fazla klinik ve deneysel çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

ÖZET

PC12 Hücrelerinde 1-Metil 4-Fenilpridinyum (MPP⁺) İle Oluşturulan Deneysel Parkinson Modelinde Zonisamid'in Ca⁺² Sinyali, Oksidatif Stres, Hücre Canlılığı, Kaspaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

Parkinson hastalığı, dopamin üreten hücrelerin dejenerasyonunun neden olduğu kesin tedavisi olmayan, motor ve non-motor semptomlarla karakterize, sinisi başlangıçlı progresif nörodejeneratif bir hastalıktır.

Dünyada, esasen bir antiepileptik olarak kullanılan Zonisamid (1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) molekülü benzisoxole yapısında uzun yarı ömürlü (63 saat) iyi tolere edilen bir ilaçtır. Yapılan klinik ve deneysel araştırmalarda, Parkinson hastalarının motor fonksiyonlarında iyileşme sağladığı gösterilmiştir ve nöroprotektif ve oksidatif stres üzerinde etkili olduğu saptanmıştır.

Biz çalışmamızda, PC12 nöronal hücreleri üzerinde MPP⁺ ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde, Zonisamidin oksidatif stres, hücre canlılığı, Ca⁺² sinyali, kaspaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

PC12 hücreleri, 1. Grup (Kontrol grubu), 2. Grup (ZNS grubu), 3. Grup (MPP⁺), 4. Grup (ZNS+MPP⁺ grubu) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. ZNS ve MPP⁺'nin doz ve süreleri hücre canlılığını değerlendirmede kullanılan MTT analizine göre belirlendi. Hücreler, 100 µM ZNS ile 5 saat, 100 µM MPP⁺ ile 10 saat ve MPP⁺ ve ZNS ile 10 saat boyunca inkübe edildi.

Lipid peroksidasyon düzeyleri, MPP⁺ grubunda (p<0.05) anlamlı olarak yüksek bulunurken, ZNS (p<0.05) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.05) grubunda, anlamlı olarak düşük saptandı. GSH düzeyleri, MPP⁺ grubunda (p<0.05) anlamlı olarak düşük saptanırken, ZNS (p<0.01) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.01) grubunda anlamlı olarak yüksek tespit edildi. GSH-Px düzeyleri MPP⁺ (p<0.05) grubunda, anlamlı olarak düşük tespit edilirken, ZNS (p<0.001) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.01) gruplarında anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Sitozole Ca⁺² salınımı, MPP⁺ (P<0.001) ve ZNS+MPP⁺ (p<0.01) grubunda, anlamlı düzeyde artmış olarak bulunurken, ZNS (p<0.01) grubunda, anlamlı olarak düşük düzeyde saptandı. MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS+MPP⁺ (p<0.01) grubunda sitozole Ca⁺² salınımı anlamlı olarak düşük tespit edildi. Kaspaz-3 aktivitesi, MPP⁺ grubuna kıyasla ZNS grubunda anlamlı olarak düşük tespit edildi (p<0.001).

Sonuç olarak, bu çalışmada ZNS'in, deneysel Parkinson modelinde oksidatif stres, hücre içi Ca⁺² homeostazı, hücre canlılığı ve apoptoz üzerine koruyucu etkisi gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Parkinson Hastalığı, Zonisamid, MPP⁺, PC12 hücresi, Oksidatif stres, Ca⁺² salınımı, Kaspaz-3, Apoptozis

SUMMARY

The Effect of Zonisamide induced by the 1-Methyl 4-Phenylpyridinium (MPP⁺) Model of Experimental Parkinson's on the Ca⁺² Signaling, Oxidative Stress, Cell Viability, Caspase activity in PC12 Cells

Parkinson's is a incurable progressive neurological condition caused by a degeneration of dopamine-producing cells characterized by motor and non-motor symptoms.

In fact, zonisamide is used as an antiepileptic molecule in the world and benisoxole (1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) is a molecular structure of zonisamide which has a long half-life (63 hours) and a well tolerated drug. ZNS revealed evidence of an effect on improves motor function in with Parkinson's patient that on oxidative stress and neuroprotective in clinical and experimental research.

In clinical and experimental research, improvement in motor functions of Parkinson's patients was revealed and its effect on neuroprotective and oxidative stress has been identified.

In our study, we aimed to investigate to the effect of zonisamide on the oxidative stress, cell viability, Ca⁺² signal, kaspas activity that induced by the MPP⁺ model of Parkinson's in neuronal PC12 cells.

PC12 cells were divided into 4 groups namely, Group 1 (control group), Group 2 (ZNS group), Group 3 (MPP⁺), Group 4 (ZNS + MPP⁺ group). The dose and duration of ZNS and MPP⁺, were determined according to MTT analysis which used to assessed the cell viability. The cells were incubated to for 5 hours with 100 μM ZNS, 10 hours with 100 μM MPP⁺ and 10 hours with ZNS and MPP⁺.

Lipid peroxidation levels were found significantly higher in the MPP⁺ group, (p <0.05) these levels were significantly lower in ZNS (p <0.05) and the ZNS+MPP⁺ (p <0.05) group. While GSH levels were found significantly lower in the MPP⁺ group, (p <0.05) it was found significantly higher in the ZNS (p <0.01) and the ZNS+MPP⁺ (p <0.01) group. While GSH-Px levels were found to be significantly lower in the MPP⁺ (p <0.05) group, it was found to be significantly higher in the ZNS (p <0.001) and the ZNS+MPP⁺ (p <0.01) groups. Cytosolic Ca⁺² release was found to be significantly increased in the MPP⁺ (P <0.001) and the ZNS+MPP⁺ (p <0.01) groups than the ZNS (p <0.01) group. And also according to the MPP⁺ group cytosolic Ca⁺² release was found to be significantly decreased in ZNS+MPP⁺ (p <0.01) group. Caspase-3 activity was found to be significantly lower in the ZNS (p <0.001) group than the MPP⁺ (p <0.001) group.

In conclusion, in this study, in an experimental model of Parkinson disease ; ZNS has been observed to protective effect on the oxidative stress, intracellular Ca⁺² hemostasis, cell viability and the apoptosis.

Key Words: Parkinson's disease, Zonisamide, MPP⁺, PC12 cells, Oxidative stress, Ca⁺² release, Caspase-3, Apoptosis.

KAYNAKLAR

1. Fahn S. Przedborski S. Parkinsonism. In: Rowland LP. ed, Merrit's Textbook of Neurology. 10th Edition. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins 2000; 679-683
2. Hurting H. What is the Parkinson disease? Neuropathology, neurochemistry and pathophysiology. In: Adler CH, Ahlskog JE, eds. Parkinson's Disease and Movement Disorders. New Jersey: Humana Press 2000; 57-70
3. Fearnley J. Lees AJ. Parkinson's Disease: neuropathology in: Watts RL, Koller WC ed, Movement disorders: neurologic principles and practice. New-York: Mc-Graw Hill 1997; 263-278
4. Gilroy R. Movement disorders In: Hefta JA ed. Basic Neurology New-York: Mc-Graw Hill 2000;177-78
5. Calne D. A definition of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2005;11 (Suppl 1):39-40.
6. Zhang Z-X, Roman GC. Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. Neuroepidemiology 1993;12:195-208.
7. Jöbges EM, Spittler-Schneiders H, Renner CI, Hummelsheim H. Clinical relevance of rehabilitation programs for patients with idiopathic Parkinson syndrome. II: Symptom-specific therapeutic approaches. Parkinsonism Relat Disord. 2007 ;13(4):203-213.
8. Beal M.F. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Ann. Neurol. 1995;38: 357-366,.
9. Halliwell B.: Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: Fact or fiction? Ann. Neurol. 1992;32: 10-15.
10. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet 344: 796-798, 1994
11. Dipasquale B, Marini AM, Youle RJ. Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. Biochem Biophys Res Commun. 1991;181(3):1442-1448.
12. Mochizuki H, Nakamura N, Nishi K, Mizuno Y. Apoptosis is induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in ventral mesencephalic-striatal co-culture in rat. Neurosci Lett. 1994;170(1):191-194.
13. Murata M, Horiuchi E, Kanazawa I. Zonisamide has beneficial effects on Parkinson's disease patients. Neurosci Res. 2001;41(4):397-399
14. Przedborski S, Etiology and Pathogenesis of Parkinson disease, İn: Frances Destefano ed, Parkinson's disease and movement disorders, 5th Edition. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins, 2007; 77-93.
15. Le Witt PA Parkinson's disease: Etiologic Considerations In: Adler CH, Ahlskog JE Ed, Parkinson's disease and movement disorder. Humana Press, New Jersey 2000; 91-100
16. Leung H, Mok V. Parkinson's disease: aetiology, diagnosis, and management. Hong Kong Med J. 2005;11(6):476-489.

17. Doğu O, Basic Science: The Epidemiology And Its Contributions To The Etiology, *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2008;1(4):1-5.
18. Paulson HL, Stern MB, Clinical manifestation of Parkinson's Disease. in: Watts RL, Koller WC ed, New-York: Mc-Graw Hill 1997; 51-52.
19. Gasser T, Genetics of Parkinson's disease. *J. Neurol*, 2001;248: 833-840.
20. Ahlskog JE, diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease and parkinsonism. *Park Rel Disord*, 2001;7:63-70.
21. Lansbury Jr PT, Brice A, Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of Implicated gene products, *Current Op Gen Develop*, 2002;12:299-306.
22. Calne DB, Parkinson's disease is not one disease. *Park Rel Disord*, 2001; 7: 3-7.
23. Cordato DJ, Chan DKY., Genetics and Parkinson's disease. *Clin Neurosci*, 2004; 11(2): 119-123.
24. Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Rel Disord*, 2005; 11: 3-7.
25. Ozkan S, Parkinson Hastalığının Etiyolojisi *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2008;1(4):6-14
26. Weingarten HL. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): one designer drug and serendipity. *J Forensic Sci.* 1988;33(2):588-95.
27. Muramatsu Y, Araki T. Glial Cells as a Target for the Development of New Therapies for Treating Parkinson's Disease. *Drug News Perspect.* 2002;15(9):586-590.
28. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985;8(2):89-93.
29. Olanow CW. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology.* 1990 ; 40(10 Suppl 3): 32-39.
30. Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 1993 ;16(11):439-444.
31. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 1996;47(Suppl 3):161-170.
32. Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989;52(6):1830-1836.
33. Olanow CW, Youdim MHB. Iron and neurodegeneration: prospects for neuroprotection. In: *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease*, CW Olanow, P Jenner, MHB Youdim, ed. London: Academic.1996; 55-67.
34. Good PF, Olanow CW, Perl DP. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.* 1992;593(2):343-346.
35. Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone S Jr, Arendash GW. Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. *Exp Neurol.* 1994; 130(1):82-94.
36. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1992;142(2):128-130.

37. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 1994 Sep;36(3):348-355.
38. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:123-144.
39. Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol.* 1994;35(1):38-44.
40. Mytilineou C, Leonardi EK, Radcliffe P, Heinonen EH, Han SK, Werner P, Cohen G, Olanow CW. Deprenyl and desmethylselegiline protect mesencephalic neurons from toxicity induced by glutathione depletion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284(2):700-706.
41. Toffa S, Kunikowska GM, Zeng BY, Jenner P, Marsden CD. Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J Neural Transm.* 1997; 104(1):67-75.
42. Pileblad E, Magnusson T, Fornstedt B. Reduction of brain glutathione by L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depleting action of 6-hydroxydopamine in rat striatum. *J Neurochem.* 1989 ;52(3):978-980.
43. Wüllner U, Löschmann PA, Schulz JB, Schmid A, Dringen R, Eblen F, Turski L, Klockgether T. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport.* 1996 ;7(4):921-923.
44. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord.* 1994 ;9(1):92-97.
45. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989 ;52(2):381-389.
46. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(7):2696-2701.
47. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 1997;69(3):1196-1203.
48. Mytilineou C, Han SK, Cohen G. Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem.* 1993;61(4):1470-1478.
49. Walkinshaw G, Waters CM. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest.* 1995 ;95(6):2458-2464.
50. Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Kawada Y, Yamamoto M, Mori A. Differential effects of chronic L-dopa treatment on lipid peroxidation in the mouse brain with or without pretreatment with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Lett.* 1994;171(1-2):55-58.
51. Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008; 71(6):72-79.
52. Beal M.F.: Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Acta* 1998;1366: 211-223.

53. Schapira A.H.V: Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochem. Biophys. Acta* 1998;1366: 225-233.
54. Turski L., Turski W.A.: Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: energy metabolism and neuropathology. *Experientia* 1993;49: 1064-1072.
55. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990;54(3):823-827.
56. DiMauro S. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease: the controversy continues. *Neurology.* 1993;43(11):2170-2172
57. Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD Jr. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1996;40(4):663-671.
58. Scotcher KP, Irwin I, DeLanney LE, Langston JW, Di Monte D. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on ATP levels of mouse brain synaptosomes. *J Neurochem.* 1990;54(4):1295-1301.
59. Mizuno Y, Matuda S, Yoshino H, Mori H, Hattori N, Ikebe S. An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1994;35(2):204-210.
60. Schulz JB, Henshaw DR, Matthews RT, Beal MF. Coenzyme Q10 and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol.* 1995;132(2):279-283.
61. Ascher P.: Glutamate receptors and glutamatergic synapses. Ed: Evangelopoulos A. E., *Receptors, Membrane transport and signal transduction*, Springer- verlag, Berlin heidelberg 1989: 127-146.
62. Lipton S.A., Rosenberg P.A.: Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 1994;330: 613-622.
63. Rothstein JD, Bristol LA, Hosler B, Brown RH Jr, Kuncl RW. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(10):4155-4159.
64. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 1990;13(7):281-285.
65. Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol.* 1992 ;31(2):119-130.
66. Greenmayre TE, Eller RV, Zhang Z, .Antiparkinsonian effects of ramacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol* 1994;35:655-661
67. Turski L, Bressler K, Rottig KJ, et al.. Protection of substantia nigra from MPPC neurotoxicity by NMDA antagonists. *Nature* 1991;349:414-418.
68. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(14):6368-6371.
69. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxylradical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(4):1620-1624.

70. Bolaños JP, Heales SJ, Peuchen S, Barker JE, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(7):995-1001.
71. Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med.* 1996;2(9):1017-1021.
72. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ;93(10):4565-4571.
73. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298(2):431-437.
74. Schulz JB, Matthews RT, Muqit MM, Browne SE, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.* 1995;64(2):936-939.
75. Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(4):338-342.
76. Levi-Montalcini R, Hamburger V.. A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of the chick embryo. *J. Exp. Zool.*1953; 123:233-288
77. Asada H, Ip NY, Pan L, Razack N, Parfitt MM, Plunkett RJ. Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. *J Neurosci Res.* 1995;40(1):22-30.
78. McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol.* 1988;76(6):550-557.
79. Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature.* 1991;350(6315):230-232.
80. Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Faucheux B. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol.* 1998;44(3 Suppl1):115-120.
81. Hunot S, Bernard V, Faucheux B, Boissière F, Leguern E, Brana C, Gautris PP, Guérin J, Bloch B, Agid Y, Hirsch EC. Glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) gene expression in the human brain: a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease. *J Neural Transm.*1996;103(8-9):1043-1052.
82. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci.* 1996;16(8):2553-2562.
83. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature.* 1998;395(6703):645-648.
84. Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2007;6(10):933-938.
85. Ozansoy M, Başak AN, Parkinson Hastalığında Programlanmış Hücre Ölümü Parkinson Hast. Hareket Boz. Der., 2006;9(1): 54-61

86. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Mol Cell Biol*, 2004; 5: 897-907.
87. Green DR. Apoptotic Pathways: Ten minutes to dead. *Cell*, 2005; 121: 671-674.
88. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X, Cytochrome-c and dATP-dependent formation of APAF-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997; 91: 479-489.
89. Bossy-Wetzel E, Green DR, Caspases induce cytochrome-c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chemistry*, 1999; 274(25): 17484-17490.
90. Solakoğlu Z, Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni, *Klinik Gelişim* 2009;22(3):20-25.
91. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead, *Cell* 2005; 121: 671-674
92. Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y. Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 1999; 14: 383-384.
93. Banati R, Blunt S, Graeber MB. What does apoptosis have to do with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 1999; 14: 384-385.
94. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain, *J Neural Transm.*, 2000; 107: 335-341.
95. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Mouse model of Parkinson's disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 2837-2842.
96. Hayakawa M, Hayakawa H, Migita M, Shibata M, Tanaka R, Suzuki A, Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Yamada M, Tamayose K, Shimada T, Miura M, Mizuno Y. An AAV-derived APAF-1 Dominant Negative Inhibitor Prevents MPTP Toxicity as Antiapoptotic Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2001; 98: 10918-10923
97. Gorman AM, Szegezdi E, Quigney DJ, Samali A. Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-Induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophysical Res Comm*, 2005; 327: 801-810.
98. Biswas SC, Ryu E, Park C, Malagelada C, Greene LA. Puma and p53 play required roles in death evoked in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2005; 30: 839-845.
99. Perier C, Tieu K, Guégan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S, Vila M. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci. UA*, 2005; 102: 19126-19131.
100. Uno H, Kurokawa M, Masuda Y, Nishimura H. Studies on 3-substituted 1,2-benzisoxazole derivatives. 6. Syntheses of 3-(sulfamoylmethyl)-1,2-benzisoxazole derivatives and their anticonvulsant activities. *J Med Chem*. 1979;22(2):180-183.
101. Yamamura S, Ohoyama K, Nagase H, Okada M. Zonisamide enhances delta receptor-associated neurotransmitter release in striato-pallidal pathway. *Neuropharmacology*. 2009;57(3):322-331.

102. Rock DM, Macdonald RL, Taylor CP. Blockade of sustained repetitive action potentials in cultured spinal cord neurons by zonisamide (AD 810, CI 912), a novel anticonvulsant. *Epilepsy Res.* 1989;3(2):138-143.
103. Kito M, Maehara M, Watanabe K. Mechanisms of T-type calcium channel blockade by zonisamide. *Seizure.* 1996;5(2):115-119.
104. Yoshida S, Okada M, Zhu G, Kaneko S. Effects of zonisamide on neurotransmitter exocytosis associated with ryanodine receptors. *Epilepsy Res.* 2005;67(3):153-162.
105. Murakami T, Okada M, Kawata Y, Zhu G, Kamata A, Kaneko S. Determination of effects of antiepileptic drugs on SNAREs-mediated hippocampal monoamine release using in vivo microdialysis. *Br J Pharmacol.* 2001;134(3):507-520.
106. Okada M, Kaneko S, Hirano T, Mizuno K, Kondo T, Otani K, Fukushima Y. Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy Res.* 1995;22(3):193-205.
107. Murata M. Novel therapeutic effects of the anti-convulsant, zonisamide, on Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2004;10(6):687-693.
108. Miwa H. Zonisamide for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 2007;7(9):1077-1083.
109. Morita S, Miwa H, Kondo T. Effect of zonisamide on essential tremor: a pilot crossover study in comparison with arotinolol. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005;11(2):101-103.
110. Bermejo PE, Anciones B. A review of the use of zonisamide in Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord.* 2009;2(5):313-317.
111. Biton V. Clinical pharmacology and mechanism of action of zonisamide. *Clin Neuropharmacol.* 2007;30(4):230-240.
112. Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N, Murata M. Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. *Neurosci Res.* 2008;60(1):106-113.
113. Wolfart J, Roeper J. Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci.* 2002;22(9):3404-3413.
114. Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I; Japan Zonisamide on PD Study Group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease: a randomized, double-blind study. *Neurology.* 2007;68(1):45-50.
115. Kubo, M., Nishikawa, N., Yabe, H., Nagai, M., Moritoyo, H., Moritoyo, T. et al. (2008) Zonisamide increased metabolism of dopamine neurons in MPTP-treated C57BL/6 and common marmosets. *Mov Disord* 2008;23(Suppl 1): 311.
116. Yano R, Yokoyama H, Kuroiwa H, Kato H, Araki T. A novel anti-Parkinsonian agent, zonisamide, attenuates MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Mol Neurosci.* 2009;39(1-2):211-219.
117. Hayakawa, T., Higuchi, Y., Nigami, H., Hattori, H.,. Zonisamide reduces hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats irrespective of its anticonvulsive effect. *Eur. J. Pharmacol.* 1994;257:131-136.
118. Sobieszek G, Borowicz KK, Kimber-Trojnar Z, Małek R, Piskorska B, Czuczwar SJ. Zonisamide: a new antiepileptic drug. *Pol J Pharmacol.* 2003;55(5):683-689.
119. Mori, A., Noda, Y., Packer, L.,. The anticonvulsant zonisamide scavenges free radicals. *Epilepsy Res.* 1998; 30:153-158.

120. Komatsu, M., Okamura, Y., Hiramatsu, M., Free radical scavenging activity of zonisamide and its inhibitory effect on lipid peroxide formation in iron-induced epileptogenic foci of rats. *Neurosciences* 1995;21:23–29.
121. Noda, Y., Mori, A., Packer, L., Zonisamide inhibits nitric oxide synthase activity induced by N-methyl-D-aspartate and buthionine sulfoximine in the rat hippocampus. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1999;105;23–33.
122. Rösler TW, Arias-Carrión O, Höglinger GU. Zonisamide: aspects inneuroprotection. *Exp Neurol.* 2010;224(2):336-339.
123. Kajimoto, Y., Nakanishi, I. and Kondo Wakayama, T. One year follow-up study of the zonisamide (ZNS) efficacy on parkinsonism. *Mov Disord.* 2008;23(Suppl 1): 214.
124. Nakanishi, I., Kohmoto, J., Miwa, H. and Kondo, T. Effect of zonisamide on resting tremor resistant to antiparkinsonian medication. *No To Shinkei* 2003;55: 685-689.
125. Ondo, W.G. Zonisamide for essential tremor. *Clin Neuropharmacol* 2007;30: 345-349.
126. Ramos, J., Staffetti, J.F. and Sullivan, K.L. A double-blind placebo-controlled trial of zonisamide (zonegran) in the treatment of essential tremor. *Mov Disord* 2007;22: 279-282.
127. Bermejo, P.E., Zabala, J.A. and Saez, R. Restless legs syndrome induced by zonisamide. *Mov Disord* 2007;22: 1517-1518.
128. Konitsiotis, S., Blanchet, P.J., Verhagen, L., Lamers, E. and Chase, T.N. AMPA receptor blockade improves levodopa-induced dyskinesia in MPTP monkeys. *Neurology* 2000;54: 1589-1595
129. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73(7):2424-2428.
130. Ayasolla KR, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) attenuates the expression of LPS- and Abeta peptide-induced inflammatory mediators in astroglia. *J Neuroinflammation* 2005; 2:21.
131. Cho SA, Seo MJ, Ko JY, Shim JH, Yoo J, Kim JH, et al. Up-regulation of Idh3alpha causes reduction of neuronal differentiation in PC12 cells. *BMB Rep.* 2010; 43(5):369-374.
132. Zhou H, Li X, Gao M. Curcumin protects PC12 cells from corticosterone-induced cytotoxicity: possible involvement of the ERK1/2 pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 104(3):236-240.
133. Bai O, Wei Z, Lu W, Bowen R, Keegan D, Li XM. Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *J Neurosci Res* 2002; 69(2):278-283.
134. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63
135. Shcharbin D, Pedziwiatr E, Blasiak J, Bryszewska M. How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. *J Control Release.* 2010; 141(2):110-127.
136. Ying HS, Gottron FJ, Choi DW. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000; 7(18):1-17.
137. Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method. *Allerg. Immunol. (Leipz)* 1991; 37:119-123.

138. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 2000; 38:325-329.
139. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(11):1957-1962
140. Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med.* 2009; 9(1):1-7.
141. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205.
142. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4):952-958.
143. Bejarano I, Terrón MP. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem.* 2007; 296(1-2):77-84.
144. Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009; 232(1-3):15-23.
145. Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-3450.
146. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.
147. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 2002;175(2):303-317.
148. Elibol B, Parkinson Hastalığında Patogenez: Nöron Kaybı Mekanizmaları. *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2008;1(4):15-22
149. Ito T, Yamaguchi T, Miyazaki H, Sekine Y, Shimizu M, Ishida S, Yagi K, Kakegawa N, Seino M, Wada T. Pharmacokinetic studies of AD-810, a new antiepileptic compound. Phase I trials. *Arzneimittelforschung* 1982;32:1581-1586
150. McElroy SL, Suppes T, Keck PE Jr, Black D, Frye MA, Altshuler LL, Nolen WA, Kupka RW, Leverich GS, Walden J, Grunze H, Post RM Open-label adjunctive zonisamide in the treatment of bipolar disorders: a prospective trial. *J Clin Psychiatry* 2005; 66:617-662
151. Komatsu, M., Hiramatsu, M., Willmore, L.J., 2000. Zonisamide reduces the increase in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels formed during iron-induced epileptogenesis in the brains of rats. *Epilepsia* 2000;41:1091-1094.
152. Nikam S, Nikam P, Ahaley SK and Sontakke AV * Oxidative Stress In Parkinson's Disease *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2009 ;24 (1): 98-101
153. Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 1996;48(1):1-19
154. Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. The possible role of iron in the etiopathology of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1993;8(1):1-12.
155. Orth M, Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2002;40(6):533-541.

156. Schapira AH. Mitochondrial function and neurotoxicity. *Curr Opin Neurol.* 1994 Dec;7(6):531-534.
157. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 2002 Aug 15;22(16):7006-7015.
158. McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53(Suppl 3):73-86.
159. Yabe H, Choudhury ME, Kubo M, Nishikawa N, Nagai M, Nomoto M. Zonisamide increases dopamine turnover in the striatum of mice and common marmosets treated with MPTP. *J Pharmacol Sci.* 2009 ;110(1):64-68.
160. Costa C, Tozzi A, Luchetti E, Siliquini S, Belcastro V, Tantucci M, Picconi B, Ientile R, Calabresi P, Pisani F. Electrophysiological actions of zonisamide on striatal neurons: Selective neuroprotection against complex I mitochondrial dysfunction. *Exp Neurol.* 2010;221(1):217-224.
161. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol.* 2005;193(2):279-290.
162. Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Kimoto N, Kikkawa Y, Takeshima M, Miyoshi K, Murata M. Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte. *Ann Neurol.* 2010;67(2):239-249.
163. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature.* 2006;443(7113):796-802.
164. Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2000;166(1):29-43.
165. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2837-2842.
166. Gorman AM, Szegezdi E, Quigney DJ, Samali A. Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ;327(3):801-810.
167. Perier C, Tieu K, Guégan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S, Vila M. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(52):19126-19131.
168. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2875-2880.
169. Murata M. The discovery of an antiparkinsonian drug, zonisamide. *Rinsho Shinkeigaku.* 2010;50(2):67-73.
170. Murata M. Zonisamide: a new drug for Parkinson's disease. *Drugs Today (Barc).* 2010;46(4):251-258.