

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KRONİK ASETİL SALİSİLİK ASİT VE C VİTAMİNİ
UYGULAMASININ YAŞLI SIÇANLARDA UZAMSAL
HAFIZA, NMDA RESEPTÖRLERİNDEN NR2A, NR2B VE
NİKOTİNİK KOLİNERJİK ASETİLKOLİN
RESEPTÖRLERİNDEN $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ SUBTİPLERİNE
ETKİLERİ**

Dr. H. Yusuf KARA

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

ISPARTA-2009

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KRONİK ASETİL SALİSİLİK ASİT VE C VİTAMİNİ
UYGULAMASININ YAŞLI SIÇANLARDA UZAMSAL
HAFIZA, NMDA RESEPTÖRLERİNDEN NR2A, NR2B VE
NİKOTİNİK KOLİNERJİK ASETİLKOLİN
RESEPTÖRLERİNDEN $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ SUBTİPLERİNE
ETKİLERİ**

Dr. H. Yusuf KARA

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 1737-TU-08 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA-2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle örnek olan, donanımlı bir laboratuvarın kurulması ve geliştirilmesinin her aşamasında gösterdiği özenle bizlerin de önemli tecrübeler edinmesini sağlayan, değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, gerek uzmanlık tezimin hazırlanmasında gerekse eğitimim süresince, bilgisi, önerileri ve hoşgörüsüyle her zaman katkıda bulunan tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'a, dört yılı aşkın eğitim süresi boyunca bilgileri ve insani değerleriyle her zaman örnek ve destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Namık DELİBAŐ, Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN, Prof. Dr. İrfan ALTUNTAŐ, Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ, Doç. Dr. Mehmet AKDOĞAN'a, istatistiksel analizlerde tecrübesini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Esin KULAÇ'a, laboratuvarında beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan hayat arkadaşım Dr. Verda KARA'ya, evimizin neşe kaynağı biricik oğlum Osman Efe'ye, anneme, babama ve eşimin ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. H. Yusuf KARA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Yaşlanma ve İnflamasyon	3
2.2. Siklooksijenaz	4
2.2.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) ve Siklooksijenaz (COX)	6
2.3. Nonsteroid Antiinflatuar İlaçlar (NSAİİ)	7
2.3.1. Etki Mekanizması	8
2.3.2. Analjezik Etkileri.....	10
2.3.3. Antipiretik Etkileri.....	10
2.3.4. Antiinflatuar Etkileri.....	10
2.3.5. Asetil Salisilik Asit.....	11
2.4. Askorbik Asit (C Vitamini).....	12
2.5. Hipokampüs	13
2.5.1. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları	13
2.6. Mekansal/Uzamsal Hafıza ve Morris Su Labirenti	13
2.7. Glutamat Reseptörleri	15
2.7.1. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri.....	16
2.7.2. NMDA Reseptör Tipleri.....	20
2.7.3. NMDA Reseptörünün Yapısı	21
2.8. Asetilkolin Reseptörleri (AChR).....	21
2.8.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri (nAChR).....	22
2.8.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerin Subtipleri.....	25
2.8.3. Nöronal Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri	25
3. MATERYAL ve METOD	27
3.1. Materyal	27

3.1.1. Deney Hayvanları.....	27
3.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	27
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	28
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	29
3.2. Metod	31
3.2.1. Morris Su Labirenti	31
3.2.2. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	31
3.2.3. SDS-PAGE Yöntemi	32
3.2.4. Western Blot Yöntemi.....	32
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	33
5. BULGULAR.....	34
5.1. Morris Su Labirenti test sonuçları.....	34
5.2. Western Blot Analizi ile NR2A, NR2B, nAChR $\alpha 7$ ve nAChR $\alpha 4\beta 2$ Reseptör Düzeyleri.....	36
6. TARTIŞMA.....	40
ÖZET	46
SUMMARY	47
KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin reseptörü
ACPD	: <i>trans</i> -(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit
AH	: Alzheimer Hastalığı
Aβ	: Amiloid β protein
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat
AMPAR	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat reseptörü
APS	: Amonyum peroksodisulfat
COX-1	: Siklooksijenaz 1
COX-2	: Siklooksijenaz 2
COX-3	: Siklooksijenaz 3
CRP	: C reaktif protein
Cu⁺	: Bakır
cPLA2	: Sitolitik fosfolipaz A2
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGTA	: Etilen glikol-bis tetraasetik asit
Fe⁺²	: Demir
ICAM	: Intercellular adhesion molecule
IKKβ	: IK kinaz β
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörü
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KAR	: Kainat tercih eden reseptörler
LTP	: Long term potensiyalizasyon
nAChR	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
NF-κB	: Nükleer faktör κ B
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NR 2A	: NMDAR 2A subtipi
NR 2B	: NMDAR 2B subtipi
NSAİİ	: Non steroidil antiinflamatuar ilaçlar
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PG	: Prostaglandin
PGG₂	: Prostaglandin G ₂
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PGI₂	: Prostosiklin
PKA	: Proteinkinaz A
PKC	: Proteinkinaz C
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TEMED	: N, N, N ¹ , N ¹ - Tetrametilen-diamin
TTBS	: Tris-Tween-Buffer Saline
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
TXA₂	: Tromboxan A ₂
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Araşidonik asit metabolizması ve siklooksijenaz enzimlerinin etkisi	5
Şekil 2. NR2A'ya ait Western Blot örneği	36
Şekil 3. NR2B'ye ait Western Blot örneği	37
Şekil 4. nAChR α 7'ye ait Western Blot örneği	37
Şekil 5. nAChR α 4 western blot örneği	38
Şekil 6. nAChR β 2'e ait western blot örneği	38

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Morris Su Labirentinde Öğrenme Süreleri ve hedef kadranda geçirilen süreler.....	34
Tablo 2. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B, nAChR $\alpha 7$ ve nAChR $\alpha 4\beta 2$ reseptör yoğunluklarının ortalama ve standart sapmaları.....	36

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Morris Su Labirenti eğitim günlerinde öğrenme süreleri arasındaki farklar...	34
Grafik 2. Her bir grup için hedef kadranda geçirilen süre	35
Grafik 3. NR2A'ya ait optik dansite sonuçları	36
Grafik 4. NR2B'ye ait optik dansite sonuçları	37
Grafik 5. nAChR α 7'ye ait optik dansite sonuçları	37
Grafik 6. nAChR α 4'e ait optik dansite sonuçları	38
Grafik 7. nAChR β 2'e ait optik dansite sonuçları	38

1. GİRİŞ

İnflamasyon bir çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynar. Normal yaşlanma sürecinde hem sistematik olarak hem de santral sinir sisteminde (SSS) kronik bir inflamasyon olayı meydana gelmektedir (1).

Demans, Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığı (AH) gibi nörodejeneratif hastalıkların nedeni halen tam olarak bilinmemekle beraber AH'ye götüren hücre dejenerasyonunun mekanizmaları arasında inflamasyonun yeri ile ilgili önemli bulgular vardır. İnflamasyonun kavrama fonksiyonuna etkisi bilinmemektedir. Fakat yapılan bazı çalışmalarda lipopolisakkaritlerin indüklemesiyle oluşan akut inflamasyonun genç sıçanlarda hafızayı zayıflattığı ve inflamasyon ile indüklenmiş hafıza bozukluğunun non steroid antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) ile önlenildiği görülmüştür (2).

NSAİİ'ler, siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek inflamasyonu azaltmaktadır ve sonuç olarak pro-inflatuar prostoglandinlerin (PG) üretimini sınırlandırmaktadır. Birçok epidemiyolojik çalışmada Romatoid Artritli ve Osteoartritli hastaların uzun süreli NSAİİ kullanımı ile AH gelişimi arasında ters bir ilişki saptanmıştır. AH'deki patolojik bulgular ile ilişkili olduğu görülen inflamatuvar olayların NSAİİ kullanımı ile azaldığı, hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı veya başlangıcının geciktiği görülmüştür (3, 4).

Yaşlanma sürecinde oksidan-antioksidan denge oksidan yönde artmaktadır. AH'nin gelişimindeki etyolojik faktörlerden biri de oksidan stres olarak gösterilmektedir (5). Askorbik asit (C vitamini) antioksidan bir vitamindir. Kandan beyne geçerek beyinde nöronal ve glial hücrelerde yüksek konsantrasyonda bulunur. Askorbik asit normal beyin fonksiyonu için nöromodulatör ve çeşitli oksidatif stres durumlarında nöroprotektif rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada kronik aspirin ve C vitamini uygulaması sonrası yaşlı sıçanlarda su labirentinde hipokampüse dayalı mekansal hafızanın geliştiği gösterilmiştir. Aspirin ile sağlanan COX inhibisyonuna bağlı proinflatuar sitokin inhibisyonunun C vitamini tarafından desteklendiği öne sürülmüştür (3).

Hipokampüste yaygın olarak bulunan, glutamat reseptörlerinin bir subtipi olarak tanımlanan N-metil-D-aspartat reseptörlerinin (NMDAR), hipokampüse bağımlı

mekansal ve mekansal olmayan hafızaların oluşmasında rol oynayarak öğrenme ve hafızada etkili olduğu düşünülmektedir (6,7,8). AH'nin karakteristik semptomlarından biri olarak bilinen progresif olarak kavrama fonksiyonlarının bozulmasında birçok mekanizma suçlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda AH'de NMDAR subunitlerinden özellikle NR2B ve NR1'de azalma saptanmış ve kavrama fonksiyonundaki bozulmaların temelinde yatan mekanizmanın bu subtiplerin konsantrasyonundaki azalma olabileceği ortaya konmuştur (9).

Diğer taraftan yapılan çok sayıda deneysel çalışmada AH'nin patofizyolojisi ile nöronal tip nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) ilişkisi üzerinde durulmuştur. Vagus sinirinin uyarılmasıyla makrofajlardan TNF- α salınımının inhibe olduğu ve sonrasında oluşacak inflamatuvar yanıtın azaldığı öne sürülmüştür. Bu fizyolojik mekanizmaya 'kolinerjik antiinflamatuvar yolak' denmiştir (10).

Biz de bu bilgilerin ışığında, yaşlı sıçanlarda NSAİİ arasında yer alan asetil salisilik asitin kronik uygulanmasıyla mekansal/uzamsal hafızanın ve NMDAR subtiplerinden N-metil-D-aspartat 2A subtipi (NR2A) ve N-metil-D-aspartat 2B subtipi (NR2B) konsantrasyonlarının ve nAChR'lerinden $\alpha 7$ ve $\alpha 4\beta 2$ subtiplerinin nasıl etkilendiğini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma ve İnflamasyon

Yaşlanma, vücut homeostazının bozulduğu, çevresel stimuluslara karşı vücudun cevabının azaldığı, fizyolojik kapasitenin düştüğü, hastalıklara karşı hassasiyetin arttığı post-maturasyonel bir süreçtir. Yaşlanma ile beraber düşük derecede ve kronik seyreden inflamasyon durumu söz konusudur (11). İnflamasyon, normal fizyolojik şartlar altında, organizma için çok önemli bir koruma mekanizmasıdır. Travma veya infeksiyon ile oluşmuş doku hasarına cevaben dokunun onarımı ve normal fizyolojik homeostazın sağlanması için oluşan moleküler ve hücrel etkileşimlerle karmaşık bir dizi reaksiyonu içerir (11,12). Son yıllarda yapılan çalışmalar, kronik inflamasyonun AH, ateroskleroz, artrit, diyabet, demans, kanser, vasküler hastalıklar gibi yaşlanma ile ilişkili birçok hastalığın etyopatogenezinde merkezi bir rol oynadığı görüşünü desteklemektedir (5,11,13). Yaşlanma sürecinde hem IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 ve iNOS gen ekspresyonunda artış hem de COX aktivitesi sonucu TXA₂, PGI₂ üretiminde artış ve reaktif oksijen türlerinin arttığı saptanmıştır (5,13,14).

Chung ve arkadaşları, moleküler inflamasyon hipotezini ortaya atmışlardır. Bu hipotezin iki temel dayanak noktası vardır: (1) Yaşlanma ile immün sistemin düzenlenmesinde bozulma, (2) Yaşlanma ile redox dengesinin değişmesi. Her iki faktör de sistemik inflamatuvar aktivitede artış ve dolayısıyla çok çeşitli inflamatuvar mediatörlerde artış ile beraber seyretmektedir. Yaşlanma ile beraber süperoksit anyonu (O₂⁻), hidroksil radikali (OH[·]), hidrojen peroksit (H₂O₂), reaktif nitrik oksit (NO[·]), peroksinitrit (ONOO⁻) ve reaktif lipid aldehidler gibi reaktif türlerin sürekli ve artan üretimine karşılık anti-oksidatif savunma sisteminde zayıflamanın net sonucu olarak redox dengesinde bozulma meydana gelmektedir. Yaşlanma sürecinde reaktif radikallerin kontrolsüz ve aşırı üretimi immün sistem aktivasyonunun temel nedenidir(5,15).

NF- κ B transkripsiyon faktör, oksidatif uyarı tarafından aktive olan ve inflamatuvar sürecin ana düzenleyicisi olarak görülen, proinflamatuvar sinyal yolağı başlatıcısıdır. Gerçekten de NF- κ B bağımlı genlerin aktivasyonu ile yaygın sistemik inflamatuvar cevap oluşmaktadır. Normal şartlarda oksidatif stimulusa cevaben NF- κ B aktivasyonu kısa sürecektir ve reaksiyon duracaktır. Ancak yaşlanma sürecinde olduğu

gibi uyarım kontrol altına alınmaz ise birçok kronik hastalığa olanak sağlayan kronik proinflatuar durum ortaya çıkmaktadır (5).

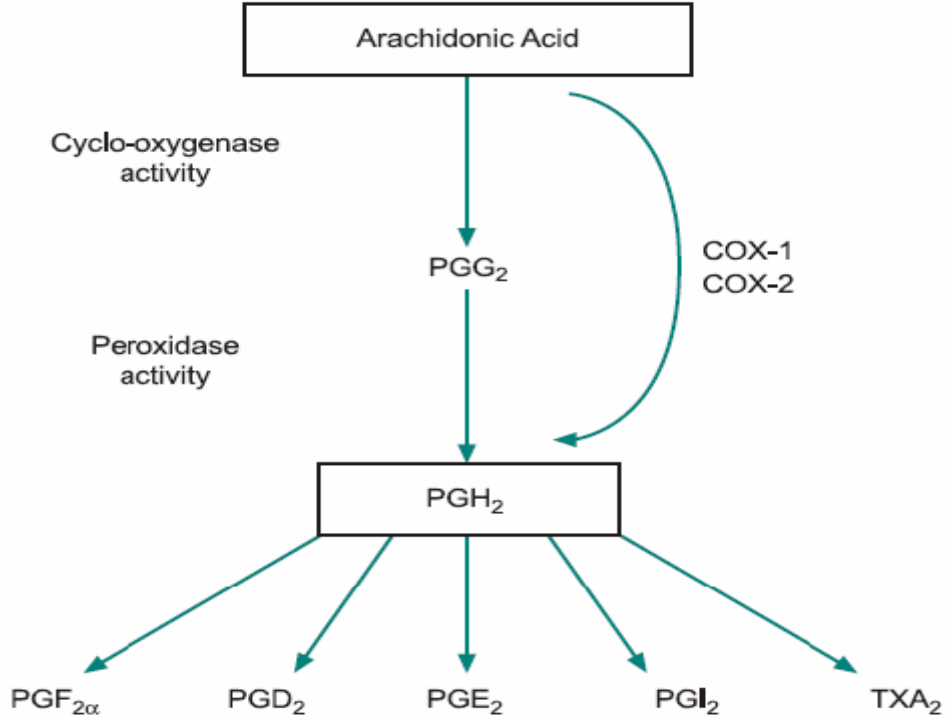
Son yıllarda oluşan kanı, yaşlanma sürecinde oluşan bu kronik inflamatuvar durumun hem Alzheimer tipi hem de vasküler kaynaklı demans gelişimi ile ilişkili olduğu yönündedir. Demans ve kavrama performansındaki bozulma ile serum proinflatuar belirteçler arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Demans vakalarıyla yapılan çeşitli çalışmalarda CRP, $\alpha 1$ kimotripsin, IL-6, çözümlü ICAM-1 ve çözümlü VCAM-1 düzeylerinde artış saptanmış ve bu vakalarda belirteçlerin düzeyleri ile AH ve vasküler demans gelişme riski arasında anlamlı bir korelasyon saptamışlardır (5,16,17). Hem Alzheimer hastası insan hem de transgenik fare modellerinde, AH patolojisinin gelişimi ile beraber reaktif astrositler ve aktive mikroglial hücreler ile birlikte çeşitli inflamatuvar belirteçler (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , akut faz reaktanları, kompleman yolağındaki ürünler) korele şekilde artmaktadır (5,18).

Çeşitli epidemiyolojik çalışmaların ışığında demans, AH gibi birçok yaş ile ilişkili nörodejeneratif hastalıkların altında yatan major faktör olduğu varsayılan kronik nöroinflamasyon olgusunun uzun süreli NSAİİ kullanımı ile inhibe olabileceği ve bu nörodejeneratif hastalıkların oluşumunun ve semptomlarının gecikebileceği veya hafifleyebileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Gerçekten de 2 yıldan fazla NSAİİ kullanan olgularda AH gelişimi riskinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Ancak negatif sonuçların elde edildiği klinik çalışmalar da mevcuttur (19). Transgenik fare modelleri ile yürütülen in vivo çalışmalar göstermiştir ki uzun süreli kullanılan NSAİİ uygulaması ile hem inflamasyon hem de amiloid β (A β) patolojisinde etkili bir supresyon sağlanmıştır (20). Son çalışmalar, NSAİİ'lerin AH gelişimi açısından koruyucu olabileceği ve en azından demansın progresyonunu yavaşlatabileceğini ileri sürmüşlerdir (19).

2.2. Siklooksijenaz

Araşidonik asit, tüm memeli hücre membranlarının lipid tabakası boyunca, fosfolipidler ile esterifiye halde bulunan 20 karbonlu doymamış yağ asitidir. Fosfolipaz enzimi, araşidonatı biyoaktif lipidlere dönüşümünü sağlayacak şekilde membranlardan koparır. Daha sonra araşidonik asit, siklooksijenaz (COX), lipooksijenaz veya sitokrom P450 monoooksijenaz yollarından biri ile metabolize edilir. Araşidonik asit, genel olarak COX olarak bilinen diğer ismiyle prostaglandin G/H sentaz enziminin etkisine

maruz kaldığında bunun sonucu olarak araşidonic asitten, siklik endoperoksidler olarak bilinen PGG_2 ve daha sonra PGH_2 oluşur. COX enzimi, hem siklooksijenaz ve hem de peroksidaz etkinliği gösterir. Birinci etkisi, araşidonic asitten PGG_2 oluşmasını, ikinci etki ise PGH_2 oluşmasını katalize eder. PGH_2 , hücre içinde meydana gelen bir dizi reaksiyonla PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 ve TXA_2 ' ye dönüşür (Şekil 1). Oluşan ürünler hücre dışına çıkar, otokrin ve parakrin etkilerde bulunurlar (21,22,23,24,25).



Şekil 1. Araşidonic asit metabolizması ve siklooksijenaz enzimlerinin etkisi.

İlk olarak izole edilen COX izoformuna siklooksijenaz 1 (COX-1) adı verildi. COX-1, yapısal olarak birçok doku ve hücrede sentezlenir. Aktivitesi için sadece substratın varolması yeterlidir. 1990'ların başında siklooksijenaz 2 (COX-2) tanımlanmıştır. COX-2'nin sentezi transkripsiyon ve translasyon düzeyinde sıkı bir şekilde regüle edilir. Daha sonra üçüncü bir tip siklooksijenaz 3 (COX-3) tanımlanmıştır. COX-3, COX-1 intron 1 kalıntısından meydana gelir ve asetaminofenin hedef aldığı bir enzimdir. COX sentezini kontrol eden genlerin uzunluğu çok farklı olmasına karşın COX-1 ve COX-2'nin her ikisi de 70 kD molekül ağırlığındadır. İnsanlarda genleri sırasıyla, 9q32 ve 1q25 kromozomal pozisyonlarda lokalizedir. Aralarında %60 aminoasit ardışım homolojisi vardır. Substrat bağlanma yerlerinin ve

katalitik bölgelerinin aminoasit konformasyonu birbirine çok benzer. Her iki enzim de hücrelerde membranlara yerleşmiştir (22,23,26,27). Membranda çeşitli faktörlerin etkisiyle fosfolipidlerden koparılan araşidonik asidi metabolize ederler. COX-1 ve COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1' in esas olarak yapısal olması yani üretildiği hücrelerde sürekli sentez edilmesi nedeniyle daima var olmasıdır. COX-2 ise bir çeşit reaktif protein sayılabilir, üretildiği hücrelerde, ortamda sentezini stimüle eden bir uyarı yoksa sentezi duraklar. Bu nedenle COX-2 indüklenebilir bir enzim olarak bilinir. Başta endotoksin (bakteriyel lipopolisakkarid), IL-1 α , IL-6 ve TNF- α olmak üzere inflamasyonu uyaran etkenler, çeşitli büyüme faktörleri (PDGF ve EGF gibi), PAF, endotelin, koryonik gonadotropin, serotonin tarafından indüklenir. COX-2 geninin düzenleyici bölgesinde bu faktörlere özgül bağlanma yerleri bulunur. Bütün bu faktörler genin, transkripsiyonu üzerinde arttırıcı etki yaparlar. PG'ler ve diğer eikozanoidlerin salıverilmesini arttıran faktörler önce transkripsiyonu arttırmak suretiyle COX'ların ekspresyonunu arttırarak eikozanoid sentezini arttırmaları. İltihap dokusunda, iltihap hücrelerindeki COX-2 ekspresyonunun artması nedeniyle bol miktarda prostanooidler (eikozanoidler, PG'ler, prostasiklinler ve tromboksanlar) oluşur ve sistemik enfeksiyon halinde ise bunların plazma düzeyi daha fazla yükselir. Özellikle indüklenebilir oksidoredüktaz COX-2 ve sitozolik fosfolipaz A2'nin ekspresyonu serebral iskemi, travma, epilepsi ve AH süresince güçlü bir şekilde aktive olur, sonuç olarak proinflamatuvar gen yollarının indüksiyonunun beyin zedelenmesine karşı jeneralize bir cevap olabileceği düşünülmektedir (26,27).

Pek çok faktör COX-2'yi indüklediği halde bu enzimin transkripsiyonunu inhibe eden tek faktör vardır. Bu da doğal hormon olan kortizol ve glukokortikoid ilaçlardır. Glukokortikoidler, COX-1'in transkripsiyonuna etki etmez (22).

2.2.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) ve Siklooksijenaz (COX)

Daha önce de belirtildiği gibi COX'un 3 izoenzimi tanımlanmıştır, fakat yapılan çalışmalarda, SSS'inde COX-2'nin önemine daha fazla dikkat çekilmiştir (28). Çünkü bu enzim indüklenebilir bir enzim olmasına rağmen, beyin dokusunda yapısal olarak eksprese edilmektedir. Beyinde COX-2 farklı populasyonlardaki nöronlarda eksprese edilir ama özellikle korteks ve hipokampus bu enzim açısından oldukça zengindir.

Bundan dolayı beyin fonksiyonlarında ve inme, epilepsi ve AH gibi nörolojik hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir (27).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, beyinde COX-2 bazal ekspresyonunun sinaptik aktivite ile düzenlendiğinin gözlemlenmiş olması dikkatleri COX'un beyindeki fonksiyonuna çekmiştir. Sinaptik aktivite nöronal bağlantı ve fenotipte uzun süreli değişiklikler meydana getirir. Bu da SSS gelişimi esnasında öğrenme ve bellek, nöronal bağlantıların onarımı ve rejenerasyonunu etkilemektedir. Nöronal plastisitenin önemli bir formu N-Metil-D-Aspartat (NMDA) tipi glutamat reseptörü üzerinden eksitatör glutamaterjik sinaptik transmisyon aracılığı ile yönlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, NMDA antagonisti MK-801 uygulanmasını takiben korteks ve hipokampüste COX-2 bazal ekspresyonunda down-regülasyon görülmüştür. Bu da COX-2'nin bazal düzeylerde ekspresyonunun NMDAR aktivasyonuna bağlı olduğunu işaret etmiştir (28,29). "Uzun süreli potansiyalizasyon-long term potentiation (LTP)" ve sinaptik plastisitede artış ile sonuçlanan hipokampal nöronların yüksek frekanslı stimülasyonu uygulanmasını takiben NMDA aracılığı ile COX-2 ekspresyonunda upregülasyon görülmüştür. Bütün bu bulgulara ek olarak COX-2'nin aktif sinapsların mevcut olduğu nöronal dendritik uzantılarda lokalize olması, COX-2'nin sinaptik plastisitede aktiviteye bağımlı bir rolü olduğunu düşündürmüştür. COX-2'nin ekspresyonu ateş, inme, yaygın depresyon ve epilepsi gibi davranışsal ve fiziksel stres durumlarında kortikal beyin bölgelerinde güçlü bir şekilde indüklenmektedir (26).

2.3. Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

Narkotik olmayan analjeziklere bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline daha uygun düşen bir isimle non-steroidal (steroid olmayan) antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) denir. Bunların kimyasal yapıları genellikle birbirine benzememekle (çoğu organik asit türevi) beraber, benzer teröpatik ve yan etkileri paylaşırlar. Prototip olan ilaç aspirindir. NSAİİ'lerin hepsi COX-2 inhibitörleridir. Bu şekilde PG'lerin sentezini azaltarak infiamasyonu hafifletirler. Ancak midedeki COX-1 enzimini de bloke ettiklerinden protektif PG'lerin sentezini de azaltırlar ve dispeptik şikayetler, ülser ve gastrointestinal kanama gibi gastrointestinal yan etkiler oluştururlar. Değişik seviyelerde antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri olan heterojen bir grup ilaçtır. Antiinflamatuvar etkinlikleri doğal veya sentetik steroidden, analjezik etkinlikleri de,

güçlü analjezikler olan fakat antiinflamatuvar etkisi bulunmayan narkotik analjeziklerinkine göre genellikle daha zayıftır. Özellikle artrit, osteoartrit ve benzeri romatizmal hastalıklar gibi genellikle inflamasyona bağlı ve uzun süre analjezik ilaç verilmesi gereken durumlarda kullanılırlar. Bağımlılık yapmamaları, antiinflamatuvar etkilerinin bulunması ve terapötik etkilerine karşı tolerans oluşmaması bu grup ilaçların terapötik değerini artırır (22,30). NSAİİ'ler, kimyasal gruplarına ve COX-1 ve COX-2 enzimlerine göreceli selektivitelere göre sınıflandırılırlar.

Non selektif COX inhibitörleri:

1. Salisilik asid deriveleri: Aspirin, sodyum salisilat, kolin magnezyum trisalisilat, salsalat, diflunisal, sulfosalazin, olsalazin
2. Para-aminofenol deriveleri: Asetaminofen
3. İndol ve inden asetik asitler: İndometazin, sulindak
4. Heteroaril asetik asitler: Tolmetin, diklofenak, ketorolak
5. Arilpropiyonik asitler: İbuprofen, naproksen, flurbiprofen, ketoprofen, fenoprofen, okzaprozin
6. Antranilik asid (fenamatlar): Mefenamik asid, meklofenamik asid
7. Enolik asitler: Oksikamlar (piroksikam, meloksikam)
8. Alkononlar: Nabumeton

Selektif COX-2 inhibitörleri:

1. Diaril furanonlar: Rofekoksib
2. Diaril pirazollar: Selekoksib
3. İndol asetik asitler: Etodolak
4. Sulfonanilidler: Nimesulid (30).

2.3.1. Etki Mekanizması

COX-2'nin inflamasyon olayına yol açan çeşitli etkenler tarafından indüklenmesi proinflamatuvar etkili PG'lerin oluşumuna yol açarken, fizyolojik stimuluslar, trombositlerde, damar endotelinde, mide mukozasında, böbrekte,

pankreasın langerhans adacıklarında, seminal vezikülde ve beyinde COX-1 aracılığıyla genelde koruyucu işlev yapan çeşitli COX ürünleri oluşumuna yol açmaktadır. PG'lerin ve ilişkili otokoidlerin biyosentezinden sorumlu COX enziminin inhibisyonu genellikle NSAİİ'lerin temel etki mekanizması olarak düşünülmektedir (22).

COX-1 ve COX-2 arasında çeşitli farklılıklar gösterildikten sonra NSAİİ'lerin her iki izoformu inhibe etme potansiyelleri arasında bir fark olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu araştırmaların klinik uygulama ile ilgili önemli bir nedeni, başlangıçta NSAİİ'lerin yararlı antiinflamatuvar etkilerinin COX-2 inhibisyonuna, zararlı yan etkilerinin COX-1 inhibisyonuna bağlı olduğuna inanılması ve COX-2'yi selektif veya özgül olarak inhibe eden bir ilacın bu iki izoformun ikisini de inhibe eden NSAİİ'lerden daha güvenli olacağına düşünülmesidir. Bu incelemelerin sonucu COX inhibitörleri iki izoform üzerindeki etki göz önüne alınarak dört gruba ayrılmıştır; COX'lara özgül olmayan, COX-1'e özgül, COX-2'ye selektif ve COX-2'ye özgül inhibitörler olarak sınıflandırılırlar.

COX-2'ye selektif inhibitörler yüksek dozlarda COX-1'i inhibe edebilmelerine karşın düşük dozlarda COX-2'ye özgülük göstermektedirler. Bu grupta meloksikam, nimesulid gibi ilaçlar bulunmaktadır. Bunlara COX-2'yi tercih edenler adı da verilir. COX-2'nin özgül inhibitörleri ise klinikte kullandıkları maksimum dozlarda bile COX-1'i inhibe etmediği kabul edilen inhibitörleridir. COX-1 ve COX-2 moleküllerinde, aspirin ve benzeri COX inhibitörü NSAİİ'lerin bağlandığı inhibitör bağlanma yerlerinin genişliği ve konfigürasyonu farklıdır (22).

NSAİİ'lerin in vitro olarak geniş bir grup reaksiyonu inhibe ettiği bilinmesine rağmen bu ilaçların antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkileri ile ilgili 1971 yılına kadar kesin bir mekanizma bulunamamıştır. Vane, Smith ve Willis isimli bilim adamları 1971 yılında aspirin ve indometazinin düşük konsantrasyonlarının PG'lerin enzimatik üretimini inhibe ettiğini gösterdiler. Aynı zamanlarda inflamasyon ve ateş patogenezinin PG'lerin katıldığına dair bazı kanıtların bulunması ile beraber, bu ilaçların klinik etkileri ile ilgili, otokoidlerin biyosentezinin inhibisyonu hipotezi daha da önem kazanmıştır(22).

2.3.2. Analjezik Etkileri

Ağrı yapıcı kimyasal ya da mekanik etkenlerin periferde PG'lerin sentezini arttırdığı ve periferik afferent sinir uçlarının ağrı uyarılarına karşı duyarlılığını arttırdıkları bilinmektedir. COX enzimi periferik dokularda bulunduğu gibi beyin ve omirilikte de bulunur. Nöronların eksitasyonu sonucu sinir uçlarına veya nöron gövdelerine Ca^{+2} girişinin artması bu yerlerde PG'lerin sentezini ve salıverilmesini artırır. PG'ler glia hücreleri tarafından da sentez edilip salıverilirler. Yapılan araştırmalar sonucunda NSAİİ'lerin analjezik etkilerini kısmen SSS'de ağrı ile ilgili sinapslarda PG etkinliğini azaltmak suretiyle yaptığı öne sürölmektedir (22).

2.3.3. Antipiretik Etkileri

Vücut sıcaklığının immünolojik olaylara bağlı olarak yükselmesi diye kısaca tanımlanan ateş, infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan iltihap olayları, kanser, graft reaksiyonu ve benzeri durumlarda salıverilen pirojen maddeler nedeniyle meydana gelir(22).

Vücut ısısının düzenlenmesi hipotalamusta preoptik bölgede bulunan termoregülatör merkez tarafından yapılır. Endojen pirojen adı verilen maddeler, sitokinler preoptik bölgedeki nöronları, astrositleri ve mikroglia hücrelerini uyararak bunların PG, özellikle de PGE_2 salıverilmesini artırırılar. Salınan PG'ler termoregülatör merkezi, hipotalamik otonom merkezleri etkileyerek ateş oluşumuna yol açarlar. NSAİİ, PG sentezini inhibe ederek ateş oluşumunu önler (22).

2.3.4. Antiinflamatuvar Etkileri

İnflamatuvar olaylar, çeşitli uyarılar (infeksiyöz ajanlar, iskemi, antijen-antikor ilişkileri, ısı veya diğer fiziksel hasarlanmalar, yaşlanma, v.s.) ile başlayabilen bir olaylar serisidir. Her tip uyarı, kendi aralarında küçük farklılıklar gösterse de karakteristik bir cevap paterni oluşturur. Makroskopik olarak, inflamatuvar cevap genellikle ödem, eritem, hiperaljezi ve ağrı gibi klinik belirtilerden oluşur.

İnflamatuvar cevap farklı mekanizmalar aracılığı ile meydana gelen üç ayrı fazdan oluşur:

1. Akut faz: Lokal vazodilatasyon ve artmış kapiller permeabilite ile karakterizedir.

2. Uzamış, subakut faz: Daha çok lökosit ve fagositik hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir.

3. Kronik proliferatif faz: Doku dejenerasyonu ve fibrozis olur.

PG'lerin, hücreler hasara uğradığında salındığı ve inflamatuvar eksudalarda mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucu olarak NSAİİ'lerin tüm hücrelerde PG'lerin sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bununla beraber NSAİİ, bu inflamasyona katılan lökotrienler veya diğer inflamatuvar mediatörler gibi eikozanoidlerin sentezini inhibe etmediği gözlenmiştir.

Bunun sonucu olarak NSAİİ'lerin temel antiinflamatuvar etkilerinin COX enzimini inhibe etmelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür (22).

2.3.5. Asetil Salisilik Asit

Asetilsalisilik asit (aspirin), salisilik asit sınıfının doğal ve sentetik prototip ilacıdır. Dreser adlı araştırmacı da piyasa ismi olan aspirini vermiştir (22). Asetilsalisilik asit, salisilik asidin asetillenmesi ile elde edilir. COX enziminin aktif bölgesi olan serin kalıntısının asetilasyonunu bloke ederek COX aktivitesine, dolayısıyla proinflamatuvar PG'lerin oluşumuna engel olarak antiinflamatuvar etkisini gösterir (20). Aspirinin analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar özellikleri vardır. COX-1 enzimini inhibe edici etkisi COX-2'den daha fazla olduğu için gastrointestinal sisteme ait problemler oldukça sık gözlenir. Aspirin, salisilat dahil diğer NSAİİ'lerden farklı olarak COX'u irreversibl olarak inaktive eder. Aspirin vücutta esterazlarca deasetillenerek salisilata çevrilir. Aspirin ve diğer NSAİİ'ler, inflamasyon sonucu lokal salgılanan histamin, bradikinin vb.'ye karşı sinir hücrelerini daha duyarlı kılan PGE₂ sentezini azaltarak ağrının algılanmasını azaltırlar. Aspirinin düşük dozda analjezik, yüksek dozda buna ek olarak antiinflamatuvar etkisi vardır. Çeşitli nedenlerle (enfeksiyon, malignite, alerjik reaksiyon) uyarılan lökositlerden salgılanan pirojenik sitokinlerin uyarıcı etkileri ile PGE₂ sentezlenir. Aspirin, PGE₂ sentezini azaltarak yükselmiş olan vücut ısısını düşürür, ayrıca periferik vazodilatasyon ve terleme ile ısı kaybını artırır. Düşük doz aspirin (75-150 mg/gün) trombositlerdeki tromboksan sentezini kalıcı olarak inhibe

ederken epitel hücrelerinin prostasiklin (PGI₂) sentezinde değişikliğe neden olmaz. Düşük doz aspirin trombosit agregasyonunu azaltır ve kanama zamanını uzatır. Miyokard enfarktüsü sonrasında akut dönemde antiagregan amaçla kullanılan dozu 160-325 mg'dır. Erişkinlerde 1-2 g/gün dozları analjezik, 2-4 g/gün dozları ise antiinflamatuvar amaçla kullanılır (22).

2.4. Askorbik Asit (C Vitamini)

Memelilerin büyük kısmında glukozdan türetilir. İnsanlarda gulonolakton oksidaz enzimi bulunmadığı için sentezlenemez. Aktif C vitamini, indirgeyici ekivalanların bir vericisi olan askorbik asitin bizzat kendisidir. Askorbik asit, indirgeyici ekivalanların vericisi olarak davrandığında, dehidroaskorbik aside oksitlenir ve bu da vitamin kaynağı olarak davranabilir. Askorbik asit, moleküler oksijen, nitrat ve sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesini sağlar. Bu olayların çoğunda askorbik asit olaya doğrudan katılmaz, bunun yerine metal kofaktörü indirgenmiş halde tutmak için gerekir. Bunlar monooksijenazlardaki Cu⁺ ve dioksijenazlardaki Fe⁺² kapsar. C vitamininin vücuttaki bazı önemli işlevleri:

1.Hidroksilasyon reaksiyonları: Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak rol oynar.

2.Tirozin yıkımında, tirozinden adrenalın sentezinde rol oynar.

3.Safra asiti oluşumunda önemlidir.

4.Sürrenal bezin ACTH ile uyarılması halinde hızla büyük miktarda C vitamini boşalır.

5.Demir emilimi vitamin C varlığında belirgin şekilde artar.

6.Antioksidan etkisi vücut için büyük önem taşır (31).

Askorbik asit (C vitamini), kandan beyine geçebilen ve nöronal ve glial hücrelerde yüksek konsantrasyonda bulunan bir vitamindir. Askorbik asit, normal beyin fonksiyonları için nöromodulatör rol oynar ve oksidatif stres karşısında nöroprotektif ajan gibi davranır. Askorbik asitin nöroprotektif aktivitesi antioksidan kapasitesine bağlıdır (32).

2.5. Hipokampüs

Hipokampüs, temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış bir gri cevher parçasıdır. Hipokampüse bu ad, koronal kesitte deniz atına benzediği için verilmiştir (33).

2.5.1. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları

Hipokampüs, limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlarıyla odak noktasını oluşturmaktadır. Hipokampüs ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve “hipokampal formasyon” adını alır. Hipokampüs, hipereksitabilite özelliğine sahiptir. Elektriksel olarak hafif uyarılması ile, uyarı bittikten sonra dahi saniyelerce süren bir epileptik nöbet gözlenir. Bu da hipokampüsün normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir. Hareket, yürüme ve diğer motor işlerde major rol oynamaktadır. Öğrenme ve hafıza, limbik sistem de dahil olmak üzere, SSS'nin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampüsü etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Lezyon sol hipokampüste olduğu zaman daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir. AH'de, beynin ilk hasar gören bölgelerinden biridir. İlk semptomlarından bazıları hafıza problemleri ve disoryantasyondur. Hipokampüste meydana gelen büyük hasarlar yeni hafıza komponentleri oluşturmayı ve oluşmuş olanı korumayı imkansızlaştırdığı ve amnezi oluşturduğu gözlenmiştir (34).

2.6. Mekansal/Uzamsal Hafıza ve Morris Su Labirenti

Mekansal hafıza, kavrama fiziyojisi ve sinir biyokimyasında, hafızanın bir parçası olarak nitelendirilmektedir. Canlının çevresel konum ve mekansal oryantasyon ile ilgili bilgisinin kaydedilmesini ifade eder. İnsanların mekansal hafızası, tanıdık bir şehirde yönünü ve çevresel ipuçlarını belirleyerek oluşturuluyor ve sıçanların labirentin kollarındaki yiyeceğin yerini öğrenmesi de mekansal hafızanın oluşturulması ile oluyor. İnsan veya hayvanların mekansal hafızalarının beyinde kavramsal haritada

yapılandırıldığı üzerinde tartışılmaktadır. Mekansal hafıza, organizmanın çevresi ile ilgili duyusal verileri özellikle görsel ve proprioseptik duyularını kullanarak bu verileri bir araya getirip işlemek ile oluşur. Genelde memeliler, mekansal/uzamsal özellikleri ve verileri oluşturabilmek için özellikle CA1 bölgesi fonksiyon gören hipokampüse ihtiyaç duyarlar. İnsan mekansal hafızasının sağ hemisfer ile güçlü bir bağlantı içinde olduğuna dair bazı ipuçları vardır. Mekansal hafıza hem NMDA hem de AMPA reseptörlerine ihtiyaç duyar. Bilginin sağlamlaştırılmasında NMDAR'leri, geri çağırılması yani hatırlanmasında AMPAR'lerine ihtiyaç duyulur. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda mekansal hafıza, hipokampal yosunsu fibrillerin projeksiyonunun hacmi ile doğru orantılı olarak yapılanmaktadır. Mekansal hafıza üzerinde yapılan çalışmalar insanlarda kompleks tipte olayların anlaşılması için çok değerli bilgiler sağlamıştır. Hayvanlardaki göç olgusu, birçok besin kaynağını bir arada tutan karmaşık çevredeki besin kaynaklarına ulaşmak gibi olaylarda mekansal hafıza çok önemlidir (35,36,37,38).

Açık alan su labirenti, dairesel ve ortalama 150-200 cm çaplı bir su tankıdır. Sıçanlar ve benzeri küçük kemirgenlerin labirentin çevresinde sabit bulunan çeşitli çevresel ipuçlarını kullanarak suyun ortalama 2 cm altında bulunan gizli platformu bulması için eğitildiği bir apanattır. Normalde hayvanlar platformun yerini kısa bir sürede (ortalama 3-5 gün) öğrenirler. Su labirentinde öğrenme olgusunun davranışsal analizi kavrama sürecinde bazı etkileşimler gerektirmektedir, mekansal bilginin depolanması ve ihtiyaç duyulduğunda hatırlanıp kullanılması, diğer yandan da hangi yöne gidileceği ile ilgili planlamayı gerektiren bir süreçtir. Hem ilaç hem de lezyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Su labirentinde yapılan davranışsal çalışmalar göstermiştir ki öğrenme, hızlı ve aynı zamanda bir seri öğrenme egzersizi ile platform lokalizasyonunun uzun süreli hafızaya yerleştirilebildiği bir uygulamadır. Oluşan hafızanın kuvveti basit bir test ile kolaylıkla değerlendirilebilmektedir. Eğitim süreci sonrasında platform labirentten alınmakta ve sıçanlar belli bir süre (1 dk) su labirentine bırakılmaktadır. Normal sıçanlar sürekli hedef lokalizasyonda (daha önce platformun bulunduğu kadran) yüzmektedirler. Su labirenti gibi basit yer-yön algılamasına dayanan testler hipokampal lezyonlara ciddi anlamda sensitiftir. Daha sonra yapılan çalışmalar göstermiştir ki geleneksel lezyon yapıcı teknikler veya selektif nörotoksinlerin kullanılmasıyla oluşan septal nukleus, subiculum ve entorhinal korteks gibi komşu yapıların lezyonlarına da sensitivite söz konusu olmaktadır ve su labirentini öğrenme

veya hatırlama performansında azalma olmaktadır. Küçük prosedürel farklarla mekansal hafıza, uzun süreli hafıza, uzun süreli mekansal hafıza gibi hipokampüse dayalı öğrenme süreçlerini test etmek için kullanılan bir sistemdir. Ayrıca mekansal olmayan genel öğrenme prosedürünü de test edebilmektedir. Demans, yaşlanma, AH, kafa travması ve inme gibi hastalıkların deneysel çalışmalarında, nörotransmitter yolları üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır (39).

2.7. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, memeli SSS'inde önde gelen eksitatör nörotransmitterdir (40). Kortikospinal motor nöronların spinal motor nöronlara yaptığı sinapslarda major nörotransmitter glutamattır. Normalde üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşmekte ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize etmektedirler. Glutamat reseptörleri memelilerin SSS'deki çoğu uyarıcı sinir iletimini düzenlemektedir. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletide rol alırken, bir yandan da sinir sisteminin gelişimi esnasındaki nöronlar arası bağlantının da oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır (40,41).

Glutamat reseptör ailesinin amino asit dizilişi asetilkolin (ACh), GABA ve glisin reseptörlerine çok az benzer. Glutamat ayrı bir ailenin üyesidir (42).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR): Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

II- Metabotropik glutamat reseptörleri: İkincil haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder (42,43,44).

Bugüne kadar memeli SSS'inde 16 adet iGluR cDNA'sı ve 8 adet metabotropik glutamat reseptör cDNA'sı tanımlanmıştır. Şimdiye kadar izole edilen 16 adet iGluR cDNA'sının; 4 tanesi Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat reseptör (AMPA) subüniti (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), 5 tanesi kainat reseptör subüniti (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2) ve 7 tanesi NMDA reseptör subünitidir (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B). Günümüzde glutamat reseptör genlerinin

ekspresyonunu manipüle edici birçok farklı teknik kullanılarak, glutamat reseptörlerinin tüm fizyolojisi ve patolojisi geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Birçok olguda iGluR subünitleri değişik laboratuvarlar tarafından ayrı ayrı ve de eş zamanlı olarak klonlandığı için benzer subünitlere her biri farklı isimler vermişlerdir (40).

I. İyonotropik Glutamat Reseptörleri:

Presinaptik sinir terminallerinden salınan glutamat molekülleri iGluR'e bağlandığında bir elektriksel olaya döndürülen kısa bir kimyasal sinyal meydana getirmektedir. Postsinaptik depolarizasyonla sonuçlanan net bir iç akıma izin veren bir integral katyon seçici kanal içeren iyonotropik glutamat reseptörleri 3 geniş gruba ayrılır:

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozol propionat tercih eden reseptörler (AMPA)

2. Kainat tercih eden reseptörler (KAR)

3. N-metil D-aspartat tercih eden reseptörler (NMDAR) (42,43,44).

II- Metabotropik glutamat reseptörleri

Metabotropik reseptörler GTP-bağlayıcı proteinlerle (G proteinleri) bağlantılıdır ve intraselüler mesajcılarının üretimini kontrol etmektedirler (45,46,47). *trans*-(1S, 3R)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit (ACPD) ile selektif olarak aktive olurlar. Glutamat, iyonotropik reseptörler üzerinden eksitasyon yaparken, metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektir (42,43,44).

2.7.1. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri 2-amino-5-phaphono valerik asit ile selektif olarak bloke olurken, AMPA ve kainat reseptörleri bu ajanla bloke olmazlar. Her iki reseptör de 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione ile bloke olurlar. Bu nedenlerde AMPAR ve KAR non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilmektedir (48).

NMDAR agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli exitatör nörotransmitterlerdir. Aspartat da

glutamat gibi NMDAR'lerine bağlanır ve aktivite gösterir. Ancak AMPAR'ler ve KAR'lere bağlandığında oluşturduğu etkiden daha az bir etki gösterir. NMDAR'leri ile AMPAR'leri ve KAR'leri arasında benzerlik az iken AMPAR'leri ve KAR'lerinin kendi aralarındaki benzerlikleri daha çoktur. Tüm NMDAR alt üniteleri nötral aminoasit içermektedir. Bir tek M2 bölgesinde polar asparajin rezidüsü bulunmaktadır (44,49).

Genelde postsinaptik bölgeler hem AMPAR'ü hem de NMDAR'ü içerirken; bazı bölgelerde sadece NMDAR'leri bulunur. Gelişimin erken evresinde sinapslar sadece NMDA tipi reseptörler içermektedir (50,52). Non-NMDA iyonotropik reseptörler motor nöronlarda ve beyinde eksitator postsinaptik potansiyel'in (EPSP) büyük erken komponentini oluşturmaktadır. Yani birçok sinapsta AMPAR'leri eksitator aşırım sırasında ana başlangıç; şarj edici gibi etki etmektedir. Bu reseptörler göreceli olarak düşük bir katyon iletkenliğine sahiptirler (< 20 pS). Na^+ ve K^+ 'a geçirgen iken Ca^{+2} 'a geçirgen değildirler. Bu sırada NMDAR'leri, intrasellüler enzimler ve ikincil mesajcıların aktivelerini modüle edebilen katı bir Ca^{+2} komponenti ile birlikte daha yavaş bir akım sağlamaktadır (44,49).

EPSP'nin geç komponentini oluşturan NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır.

1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve Na^+ ile K^+ 'un yanı sıra Ca^{+2} 'a da geçirgendirler.

2- Kanalin açılması bir ko-faktör olarak glisin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağımlıdır. Kanal sadece glisin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDAR kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır. Kinürenik asit ve aminoksalinedikarboksilik asit'in her ikisinin çoğu türevleri glisin bölgesinin kompetatif antagonistleridir.

3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDAR'lerini diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir.

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda, membran potansiyelindeki değişiklikler, intrasek voltaj sensörünün sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken NMDA ile aktive olan kanalda ekstresek bloker olan Mg^{+2} (ekstrasellüler Mg^{+2}) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur. İstirahat membran

potansiyelinde (-65 mV'da) Mg^{+2} kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (örneğin, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda), Mg^{+2} elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve Na^+ ile Ca^{+2} 'un geçişine izin verir. Bu nedenle NMDAR'lerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle NMDAR'ü sinapstaki presinaptik aktivite ve postsinaptik depolarizasyonu eş zamanlı olarak saptayan bir araç gibi davranmakta ve postsinaptik hücreye yeterli miktarda ikincil haberci iyon olan Ca^{+2} 'un girişine imkan vermektedir. Bu da sinaptik bağlantının kuvvetindeki plastik değişiklikleri başlatmaktadır (40,44,49).

Birçok hücrede hem non-NMDAR'ler hem de NMDAR'ler bulunmaktadır. Mg^{+2} , istirahat membran potansiyelinde NMDAR kanalını bloke ettiği için, NMDAR'lerinin EPSP'lerin oluşmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP'lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça Mg^{+2} NMDAR kanalından uzaklaşmakta ve NMDAR açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşmektedir.

NMDAR kanalının diğer bir farkı göreceli olarak daha yavaş açılıp yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP'lerin geç fazına katkıda bulunmasıdır. EPSP'nin geç fazı, Mg^{+2} 'un kanalı bloke etmesi nedeniyle, tek bir presinaptik sinyalden sonra zayıf bir yanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP'ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturmaktadır. Bu durumda NMDAR'ü büyük ölçüde Ca^{+2} 'un katkısı ile daha büyük akımlara yol açmaktadır. NMDAR aktivasyonu sonucu, postsinaptik hücrelerde, Ca^{+2} 'a bağımlı enzimler ve bazı ikincil haberciler devreye girmektedir. Bu biyokimyasal reaksiyonlar, sinapsta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetiklemektedir. Öğrenme ve bellek oluşumunda, sinapsta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir. NMDAR'lerin aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için çoğu kez bu duruma aktiviteye bağımlı sinaptik modifikasyonlar denmektedir (42,44).

Gen knockout teknikleri kullanılarak öğrenme ve hafızada rolü olan NMDAR'ne bağlı sinaptik plastisite keşfedilmiştir. Yapılan bu deneyler, CA1 hipokampal

NMDAR'nün hipokampusa bağımlı mekansal hafıza ve mekansal olmayan hafızanın oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (50). Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesinde rolü olan hipokampusta sinaptik plastisitenin bir türü olan “uzun süreli potansiyalizasyon-long term potentiation (LTP)” öğrenme ve hafızanın nöronal mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (44,48). LTP, sinaptik kuvvetteki aktiviteye bağımlı uzamış potansiyel olarak tanımlanabilir (49). Daha önceki çalışmalar hipokampal sinaptik plastisitenin LTP benzeri formlarının mekansal öğrenme ve hafıza ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (44). Hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP'nin indüksiyonu bir dizi olayı içermektedir. İlk olarak NMDAR kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması için postsinaptik membranın yeterince depolarize olması gerekmektedir. Kanalın açılması postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede yükselmesine olanak vermektedir. Ca^{+2} 'daki bu artış metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonuna bağlı fosfoinozidit düzeylerindeki yükselmeye birlikte proteinkinaz C (PKC) ve CAMKII'nin de dahil olduğu proteinkinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu proteinkinazlar daha sonra sinaptik kuvvette uzun süreli modifikasyonlara yol açacak proteinleri düzenlemektedirler (49).

Homosinaptik “uzun süreli depresyon-long term depression-(LTD)” ise sinaptik kuvvetin aktiviteye bağımlı uzamış zayıflaması olarak tanımlanır ve bir anlamda LTP'un fonksiyonel karşıtıdır. CA1 alanındaki LTP gibi LTD'un indüksiyonu da NMDAR'lerin aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır (49,50).

Sinaptik aktivitenin regülasyonunda protein fosforilasyonu ve defosforilasyonunun önemli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. NMDAR kanalının subünitleri farklı proteinkinazlar ve protein fosfatazlar tarafından doğrudan fosforile ve defosforile edilmektedir. NR1, NR2A ve NR2B subünitleri hem cAMP bağımlı proteinkinaz A (PKA) hem de proteinkinaz C (PKC) tarafından farklı bölgelerden fosforile edilebilmektedir. CAMKII, NR2B subünitinin karboksi terminal ucundaki spesifik bir kalıntıyı ve/veya onun NR2A subünitindeki karşılığını fosforile etmektedir. Protein tirozin kinaz da NR2A ve NR2B subünitlerini fosforile etmektedir (51).

2.7.2. NMDA Reseptör Tipleri

NMDAR'lerin şu ana kadar tanımlanan yedi tane subüniti vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B. NMDAR'leri beyin tümünde yaygın olarak bulundukları ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde buldukları yer ise hipokampüsün CA1 bölgesidir (40).

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 938 aminoasitten'ten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. NR1 reseptör subtip ekspresyonu SSS'de hemen hemen her yerde bulunmaktadır.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 subtipi bulunur:

NR2A: Beyinde postnatal ekspresyon edilir. 1464 aminoasitten meydana gelir ve 165.5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA'sı tüm beyinde yaygın olarak bulunur; fakat serebral korteks, hipokampüs ve serebellumda daha yoğun olarak bulunmaktadır.

NR2B: Tüm embriyonik beyinde ekspresyon edilir. Ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak myositlerde ekspresyon edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde ekspresyon edilir. 1482 aminoasitten oluşur ve 165,9 kDA ağırlığındadır. NR2B'nin ekspresyonu ön beyinde, serebral korteks, hipokampüs, septum, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: Postnatal olarak serebellumda ekspresyon edilir. 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır. NR2C'nin ekspresyonu ise serebellumda dominant olarak bulunurken, talamusda ve olfaktör bulbusda daha az olarak bulunmaktadır.

NR2D: Diencephalon ve beyinsapında embriyonal ve neonatal olarak ekspresyon edilir. 1323 aminoasitten oluşur ve 142,9 kDA ağırlığındadır. NR2D'nin ekspresyonu ortabeyin ve arkabeyinde yüksek iken; düşük düzeyleri talamusda, olfaktör bulbusda ve beyin sapında bulunmaktadır. NR2A ekspresyonunun tamamlayıcıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir. Ca^{+2} permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampüs (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda ekspresyon edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlamaktadır (43,44).

2.7.3. NMDA Reseptörünün Yapısı

Şu anda genellikle hem fikir olunan nokta; NMDAR'lerin NR1 subüniteleri ve beraberinde NR2 subünitelerinin en azından bir tipinden oluşan heteromerik yapılar olduğu şeklindedir. NR2 subünitelerinden gelen domainler glisin bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. Membrana doğru dizilmiş her glutamat reseptör subünitesi, farklı yaklaşımların bir bileşkesinden ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar kaçınılmaz bir kanıt ortaya koymuştur: NMDAR, AMPAR ve KAR subüniteleri 3 adet membrana uzanan domain içermektedir (M1, M3 ve M4). M2 domaini membrana sitoplazmik kenardan daldırılmış şekilde bir büküm oluşturmaktadır. Her NMDAR subünitesi geniş bir extrasellüler N-terminal domaini ve intrasellüler C- terminali içermektedir (43,44,49).

NMDAR poru Ca^{+2} 'a yüksek derecede geçirgenlik sağlar ve Mg^{+2} ile bloke olur. NMDAR, voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. NMDAR'lerin aktivitesi, Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği, pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit kalıntılarına dayanmaktadır. Katyon seçiciliği, M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanmakta, bu alan NR1 ve NR2 alt ünitelerinde bulunan bir asparajin kalıntısı tarafından oluşturulmaktadır. NR2 subünitesi, membranın extrasellüler yüzünden gelen Mg^{+2} iyonları için temel bağlanma bölgesini içermektedir. Yani Mg^{+2} blokları M2'deki kritik asparajin kalıntıları veya onlara çok yakın olan aminoasit kalıntılarının etkileşimine dayanmaktadır. Bu bağlanma bölgesi; N bölgesi, yüksek Ca^{+2} geçirgenliği için kritiktir. NR1 kalıntıları, kanalın dış vestibülünü oluşturmaktadır. Bu vestibül M3 (C-terminal ucunda) ve M4 (N-terminal ucunda) segmentlerinin M1'den önce gelen parçaları tarafından oluşturulmuştur (42,43,44,49).

2.8. Asetilkolin Reseptörleri (AChR)

Kolinerjik Sistem, sempatik ve parasempatik sistemin 1. sıra nöronlarından ve parasempatik sistemin 2. sıra nöronlarından oluşur. Bu nöronların ganglionlardaki veya nöroefektör kavşaklardaki akson uçlarından salıverilen ve sinaptik aşırımdan sorumlu olan nörotransmitteri asetilkolindir (53).

AChR'leri, farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma nikotin ve muskarin adlı iki alkaloidin reseptördeki farmakolojik aktivitesi üzerine kuruludur. Muskarinik reseptörlerin (mAChR) antagonisti atropin ile, nikotinic reseptörlerin (nAChR) antagonisti d-tübokürarin adlı ajanların tamamen farklı aktiviteleri vardır. Bu da ACh için birden fazla reseptör olduğunu desteklemektedir (53,54,55).

Nöromusküler kavşaktaki nAChR'leri, N_1/N_m reseptörler; ganglionlardaki nAChR'leri N_2/N_g reseptörler olarak bilinir. SSS'de bulunan çok sayıda farklı nöronal nAChR vardır. Bunlar kaslardakilerden çok ganglionlardaki nAChR'lerine benzerler. Günümüzde MSS'de en az 10 farklı nikotinic reseptör α subüniti ve 4 farklı β subünit geni tanımlanmış ve klonlanmıştır (56). Nikotinic ve muskarinik reseptörlerin subtipleri periferik sinir sisteminde ayrı anatomik lokalizasyonlar gösterirler ve bu da sınıflandırmayı kolaylaştırır. İskelet kaslarının reseptörleri nöromusküler kavşak veya postsinaptik motor son plak bölgesinde birarada bulunmaktadır (53).

Adrenal bezde parasempatik ve sempatik ganglionlarda postsinaptik nöronlarda ganglionik nikotinic reseptörler bulunur. Ganglionik nikotinic reseptörler embriyonik nöral krestten orijin alan dokularda bulunur. Sempatik ve parasempatik ganglionlarda benzer özellikler gösterir. Muskarinik reseptörler postganglionik parasempatik transmisyonundan sorumludur. Ancak terleme, piloereksiyon gibi sempatik sinir sisteminden kaynaklanan olaylar muskarinik reseptörlerce yönetilir (53).

2.8.1. Nikotinic Asetilkolin Reseptörleri (nAChR)

İlk olarak Electrophorus Californica adlı balığın elektrik organından (elektroplaktan) sodyum dodecyl sülfat gibi bir anyonik deterjan kullanılarak çözünmesi sağlanan nAChR'leri ayrıştırılıp saflaştırılarak ayrıntılı şekilde incelenmiş, aminoasit sekansları saptanmıştır (57).

nAChR'ler, yapıcı ligand kapılı katyon kanallarıdır. nAChR proteini beş polipeptid subünitten oluşan pentamerik bir yapıya sahiptir. Bu subünitlerin aminoasit kalıntılarının %30 ila 40'ı homologtur. Subünitler α , β , γ , δ ve ϵ 'dur. Kaslarda α subünitinin 2 kopyası vardır, diğer 3 subünit β , γ ve δ tek kopya şeklindedir. Nikotinic reseptör protein kompleksinin molekül ağırlığı 280 kD'dur. Bu subünitler bir merkezi

kavite çevresinde yerleşmişlerdir. Reseptörün çok büyük bir kısmı extrasellüler yüzdedir. Bu merkezi kavite bir iyon kanalıdır. Dinlenme durumunda iyonlara geçirgen değildir. Aktive olduğunda 6,5 Å açılmakta ve açık kanal katyonlara selektif hale gelmektedir. Kanal temelde Na⁺, Ca⁺² ve K⁺ katyonlarını geçirmekle beraber, ACh ile aktive edilip açıldığında Na⁺ kanalı gibi çalışır ve depolarizasyona yol açar. İki α subüniti ve γ ile δ subünitlerinin α subünitine bakan yüzleri agonist ve kompetitif antagonist bağlanma bölgelerini oluşturur. Dolayısıyla α subünitine ligand bağlanırken, β subüniti reseptöre ligand bağlanmasını ve reseptörün desensitizasyon hızını modüle eder. Ligand kapılı katyon kanalı yapısındaki reseptör ailesinin hepsinde α subünitinde 128. pozisyondaki sistein ile 142. pozisyondaki sistein arasında disülfid köprüsü vardır. Yine α subünitini tanıtan yapısal özellik olarak 192-193. sistein aminoasitleri arasında disülfid köprüsü vardır. Son çalışmalar göstermiştir ki α subünitindeki 185. ve 200. rezidüer agonist ve antagonist bağlanma yüzeylerinin bir kısmını oluşturduğu için önemlidir. Agonist bağlayan bölgeler tirozin ve triptofan gibi aromatik yan zincirler içerirler ki bunlar agonistlerle katyonik etkileşim sağlarlar (53,54,55).

Her bir subünit polipeptid zinciri 4 tane membranı kateden 4 hidrofobik segmentten oluşur. Bu transmembran bölgeler 210. kalıntıdan sonradır ve molekül extrasellüler yüzeyde amino terminal kısımla son bulur. Bu 4 segment, M₁, M₂, M₃ ve M₄ olarak isimlendirilmektedir. M₃ ve M₄ arasında geniş stoplazmik bir loop vardır. Bu intrasellüler loop serin/treonin kinazlar içindir. M₂ iyon kanalına göre proximaldedir. α helikal yapıdadır ve kanal lümenine doğru serin ve treonin kalıntıları içerir. Reseptörün iyon kanalının, kanalın derinliklerinde stoplazmik bölgede yer alan bir kapısı olduğu düşünülmektedir. İyon selektivitesini kanalın çevresinde yerleşim gösteren her 5 subünitin yüklü aminoasitlerinin oluşturduğu halka kontrol eder. Bu kontrol bölgesi extrasellüler kısımda α-Glu 262'den stoplazmik kısımdaki α-Glu 241'e kadardır. α-Thr 244'e denk gelen pozisyondaki amidlerin hidrojen iskeletleri ve karbonil grupları ve hidroksillenmiş aminoasitlerin oluşturduğu halka ile iyon selektivitesi ve permeabilitesi ayarlanır (54).

nAChR'leri dinlenme konumundayken ACh'e göreceli olarak düşük affinite gösterir. Agonist bağlandığında, iyon kanalı kapalı-dinlenme konumundan açık konuma geçer, Na⁺, K⁺, ve Ca⁺² akımı olur. Aktivasyon esnasında ACh'e ilgi artmıştır, allosterik etkileşimle diğer bir ACh molekülünün bağlanması artmaktadır. Yüksek

konsantrasyonlarda ACh varlığında ACh'e affinite de artmaktadır. Agonistin ortamdaki varlığının devam etmesiyle iyon kanalı kapanır ve reseptör desensitize olur. Bu durumda, nAChR'ler agonist bağlanmasına yüksek affinite gösterse de aktivasyona dirençlidir. Desensitize haldeki reseptörün birçok durumu vardır. Desensitizasyon ve geri dönüş oranı nAChR subtipine göre değişir. Örn: $\alpha 7$ nAChR çok hızlı desensitize olur. Uzayan agonist uygulaması reseptörü inaktive duruma geçirebilir ve geri dönüşü çok yavaş olur. $\alpha 4\beta 2$ nöronal nAChR'leri kronik nikotin tedavisiyle inaktivasyona eğilimlidir. Dinlenim, açık ve desensitize konumlar arası geçişler reversibldir. Agonistler, reseptörü aktive (açık) konuma getirirler, antagonistler ise tercihen nAChR'lerini dinlenim veya desensitize konfigürasyonlardan biri şeklinde kapalı konumda tutarlar (55,57,58).

nAChR'ler, daha önce değinildiği gibi bir katyon kanalının intrinsik bir bölümünü teşkil ederler veya başka bir deyişle bu kanalla direkt olarak kenetlenmişlerdir. nAChR'lerin ACh ve diğer nikotinik reseptör agonistleri tarafından aktive edilmesi kanalın kısa bir süre için açılmasına neden olur; bu sırada kanalın iletkenliği nisbeten fazlaca artar (gangliyon alt-tipinde 35-40 ve çizgili kas alt-tipinde 35-50 pikoSiemens). nAChR'nin kenetlendiği katyon kanalı tipi esas olarak Na^+ u ve daha az derecede olarak Ca^{+2} ve K^+ u geçiren kanallardır. Bu kanalların açılması hücreleri depolarize eder; gangliyon ve iskelet kası hücrelerinde eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) oluşturur. Bu potansiyel çizgili kasın nöromüsküler kavşağında son plak potansiyeli diye adlandırılır (53).

α 'ların en az 10 ve β 'ların en az 4 subtipi vardır ($\alpha 1$ 'den $\alpha 10$ 'a kadar, $\beta 1$ 'den $\beta 4$ 'e kadar). Reseptörün yerine ve tipine göre içerdiği alt birim türleri değişkenlik gösterir. nAChR'ler otonom ganglionlarda, adrenal kromaffin hücreleri, primer duysal nöronlarda ve iskelet kas liflerinde olmak üzere periferde geniş bir dağılım gösterir (55,56). Kas son plaktaki nAChR'leri $(\alpha_1)_2\beta_1\epsilon\delta$ şeklindeki subünit kombinasyonu gösterir halbuki extrajunctional nAChR'leri $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ şeklindeki subünit kombinasyonundan oluşur (Fetal ve denerve kaslarda) (55). Beynin hemen her bölgesinde hem presinaptik hem postsinaptik olarak yerleşmişlerdir. nAChR'ler daha çok prejunctionaldır (53).

2.8.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerin Subtipleri

Çizgili kasların nöromusküler kavşaklarındaki nAChR'ler ve otonomik ganglionlarla, adrenal medullanın kromaffin hücrelerindeki nAChR'ler belirli blokör ilaçlara karşı duyarlılığının farklı olmasına bakarak ayırt edilmiştir. Bunlardan 1. tip, çizgili kas tipi (N_1/N_m) reseptörler ve 2. tip, ganglion tipi (N_2/N_g) reseptörlerdir. Daha sonra SSS nöronlarında nöronal nAChR'leri tanımlanmıştır.

Çizgili kas tipi (N_m) reseptörler α -tübokürarin, pankuronyum ve benzeri çizgili kas felç edici ilaçlar tarafından selektif ve güçlü bir şekilde bloke edilirler. Ganglion (N_g) tipi reseptörler heksametyonyum, mekamilamin ve diğer gangliyon bloke edici ilaçlar tarafından selektif bir şekilde bloke edilirler; dimetilfenilpiperazinium (DMPP) maddesi bu reseptörlerin selektif bir agonistidir. Bir yılan zehiri olan α -bungarotoksin çizgili kas tipi reseptörleri selektif olarak bloke eder, fakat gangliyon tipi reseptörlere etkisizdir. Diğer bir yılan zehiri κ -bungarotoksin (diğer adıyla nöronal bungarotoksin) gangliyon tipi reseptörleri selektif olarak bloke eder. ACh ve nikotin, çizgili kas ve gangliyon tipi kolinerjik reseptörlerin non-selektif agonistleridir. Nöronal SSS tipi reseptörlerin altbirim bileşimi diğerlerinden farklı olmakla beraber, yukarıda sayılan toksin ve ilaçlara duyarlılıkları gangliyon tipi reseptörlerinki ile aynıdır. N_m reseptörler, erişkin kasında 2 tane $\alpha 1$ ve birer tane $\beta 1$, ϵ ve δ alt birimlerinden oluşur, iletkenliği 35-50 pS'dir. Embriyonik kasta ϵ alt biriminin yerini γ alt birimi almıştır. N_g 'ler genellikle sadece $\alpha 3$ ve $\beta 4$ alt birimlerinden oluşan pentamerlerdir (53).

2.8.3. Nöronal Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

1980'de [3H]-Nikotinin sıçan beyinde bağlanma bölgeleri olduğu ve bu bölgelerin eşsiz nikotinik farmakolojiye sahip olduğu rapor edilmiştir. [3H]-Nikotin, α -bungarotoksin ile bloke olmaz. Bildirilen klonlanmış ilk nöronal nAChR subtipi 1986'da $\alpha 3$ 'dür. Günümüzde memelilerde saptanan nöronal nAChR subünitleri 11 ($\alpha 2$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ – $\beta 4$) tanedir. Buna ek olarak kuş türünde $\alpha 8$ subüniti tanımlanmıştır. α ve β subünitleri ayrı fakat ilişkili gen familyasındandır (55).

nAChR'leri daha önce de belirtildiği gibi santral ve periferik sinir sisteminin her yerinde bulunurlar. Otonomik nörotransmisyon ve kas kontraksiyonunun başlatılması şeklindeki asıl rolüne ek olarak, SSS'de nAChR'leri daha çok modülatör rolü oynar

(54). Nöronal nAChR'leri, AH, PH, Şizofreni, Tourette Sendromu, Dikkat Bozukluğu gibi hastalıklarla ilişkisi nedeniyle önem kazanmaya başlamıştır. Nöronal nAChR'leri bu hastalıkların tedavisinde ilaçlar için hedef olarak algılanmaktadır (55). Nöronal nAChR'leri, α ve β subünitlerinin pentamerik kombinasyonlarından oluşur, bu da nöronal nAChR'lerine çeşitlilik sağlar. *Xenopus Oocytes* ve memeli hücre dizisinde nAChR'lerinin heterolog ekspresyonu bazı kurallarla düzenlenir bu da doğal nAChR'lerinin subünitlerini sınırlar. $\alpha 2$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ subünitlerinin $\beta 2$ ve $\beta 4$ subünitleriyle ikili kombinasyonları fonksiyonel nAChR'lerini oluşturur, ancak $\alpha 5$ ve $\beta 3$ subünitleri genellikle fonksiyonel nAChR'lerini oluşturamaz. Bunlar da en azından diğer subünitlerle bir araya gelerek heteromerler oluştururlar. $\alpha 6$ subüniti, $\beta 4$ ile fonksiyonel nAChR'ler oluşturabiliyor. Yine $\alpha 6$ subüniti $\beta 3$ ile kombinasyon oluşturuyor. $\alpha 6$ subüniti biyojenik amin içeren nöronlarda lokalizedir. $\alpha 7$, $\alpha 8$ ve $\alpha 9$ subünitleri sağlam homomerik reseptörler oluştururlar. $\alpha 10$ subüniti sadece fonksiyonel $\alpha 9$ subüniti ile birlikte reseptör oluşturacak şekilde ifade edilir. $\alpha 9$ subüniti içeren reseptörler muskarinik reseptörlerin bazı özelliklerini taşır.

Doğal sistemlerde, nAChR'lerin subünit kombinasyonu hakkında bilgi yetersizdir. Sadece birkaç major subtip tanımlanmıştır. Bunlardan biri $\alpha 4\beta 2$ 'dir. SSS'de göreceli olarak çok miktardadır, SSS'nin predominant kombinasyonudur. Diğer major subtip $\alpha 7$ 'dir. Genellikle SSS'de ve PSS'de homomerik nAChR şeklinde bulunuyor. *İn vivo* şartlarda $\alpha 7$ subüniti içeren reseptörün yüksek Ca^{+2} permeabilitesi vardır. $\alpha 3$ subüniti genellikle $\beta 2$, $\beta 4$ ve $\alpha 5$ subünitleriyle daha çok periferik ganglionlarda bulunmaktadır. SSS'deki nAChR'leri presinaptik lokasyonlarda fonksiyon gösteriyorlar ve bazı nörotransmitterlerin salınımını düzenliyorlar. Elektrofizyolojik ve mikrodializ çalışmaları sonucunda elde edilen kanıtlar göstermektedir ki glutaminerjik, dopaminerjik, serotonerjik, peptiderjik ve kolinerjik yollar presinaptik nikotinik reseptörlerin kontrolü altındadır (54,59).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Sprague Dawley cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Kontrol grubu (n=10), asetil salisilik asit (ASA) grubu (n=10), askorbik asit (C vit) grubu (n=10) ve asetil salisilik asit + askorbik asit (ASA+C vit) grubu (n=10) olmak üzere sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır. Asetil salisilik asit (%99, Acros Organics, New Jersey, USA) 60 mg/kg/gün (60,61), L-askorbik asit (J.T. BAKER, Deventer, Holland) 250 mg/kg/gün (62,63) dozlarında günlük tartılıp distile suda çözdürülerek herbir sıçana 2 ml hacimde olacak şekilde, 10 hafta süresince oral gavaj ile uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak kontrol grubuna da distile su yine oral gavaj ile 10 hafta boyunca verilmiştir. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (23 °C) koşullarında yaşatılmışlardır. Tüm gruplar yeteri kadar su ve yem (Korkutelim Yem, Standart Sıçan Yemi) ile beslenmişlerdir. Sıçanlar, ilaç uygulamasının bitiminden 24 saat sonra su labirentinde hipokampüse dayalı mekansal hafıza eğitimine tabi tutulmuşlardır. Beş günlük test prosedürü sonunda intraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) - % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında dekapite edilerek deney sonlandırılmıştır. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları alınmıştır. Soğuk fosfat tamponuyla ıslatılmış filtre kağıtları buz paketleri üzerine konarak hipokampus çıkartma düzeneği oluşturulmuştur. Dekapitasyondan hemen sonra bu düzenek üzerinde hipokampuslar çıkarılarak önceden hazırlanmış 50 mM fosfat tamponu içeren ependorf tüplere konulmuş ve analizin yapılacağı tarihe kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. 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- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- 8- Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- 9- Elektroforez cihazı: EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD)
- 10- Biyokimya analizörü: Olympus AU2700 (Japonya)
- 11- Kodak İmage Station 2000 MM (USA)
- 12- Cam-Teflon homojenizatör

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:

- 1-Akrilamid: bisakrilamid % 30 T, % 2,6 C; Sigma (Almanya)
- 2-Tris, Merck (Almanya)
- 3-Glisin, Merck (Almanya)
- 4-SDS, Merck (Almanya)
- 5-APS, Merck (Almanya)
- 6-TEMED, Merck (Almanya)
- 7-2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
- 8-Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
- 9-Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
- 10-Tween 20, Merck (Almanya)
- 11-Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
- 12-EDTA, Merck (Almanya)
- 13-EGTA, Merck (Almanya)

- 14-Leupeptin, Sigma (Almanya)
- 15-Aprotinin, Sigma (Almanya)
- 16-Benzamidin, Sigma (Almanya)
- 17-Triton X-100, Sigma (Almanya)
- 18-Immobilon-P, Sigma (Almanya)
- 19-Kromotografi filtre kağıdı, Whatman (İngiltere)
- 20-Metanol, Merck (Almanya)
- 21-Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
- 22-Anti NR2A, Millipore (Avustralya)
- 23-Anti NR2B, Millipore (Avustralya)
- 24-Anti AchR α 7, Santa Cruz (ABD)
- 25-Anti AchR α 4, Santa Cruz (ABD)
- 26- Anti AchR β 2, Santa Cruz (ABD)
- 27-Monoklonal anti-rabbit IgG, Sigma (ABD)
- 28-BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (Almanya)
- 29-Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (ABD)

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılanlar:

1- 4 x Lower Buffer: 1,5 M Tris HCl, pH: 8,8

36,3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH: 8,8'e ayarlanır. Soğutulup pH tekrar 8,8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

2- 4 x Upper Buffer: 0,5 M Tris HCl, pH: 6,8

12,1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH: 6,8'e ayarlanır. Soğutulup pH yeniden 6,8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

Lower jel: (% 7,5'lük)

Distile su	4450 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2,6 C	2500 µl
4 × lower buffer (tris HCl, pH: 8,8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

Upper jel: (% 4'lük)

Distile su	3050 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2,6 C	650 µl
4 × Upper buffer (tris-HCl, pH: 6,8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

3- Homojenizasyon buffer: pH: 7,5 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

4- Sample buffer:

Upper buffer (0,5 M Tris-HCl, Ph: 6,8)	2,0 ml
Gliserol	1,6 ml
% 10 SDS	3,2 ml
2-Merkaptoetanol	0,8 ml
% 0,1(w/v) Brom fenol blue	0,4 ml

5- Running buffer: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH: 8,3'e ayarlanıp distile su ile 1 litreye tamamlanır. 5 kat sulandırılarak kullanılır.

6- Transfer buffer: 0,606 gr Tris, 2,882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8,2-8,4 olacak şekilde tamamlanır. 40 ml metanol eklenir.

7- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 18,15 gr Tris, 26,25 gr NaCl, 3 ml Tween 20 (yoğun bir madde olduğu için pipetle yavaşça çekilir) pH: 7,5 olarak ayarlanıp 3 litreye distile suyla tamamlanır.

8- Primer antikolar: NR2A 1/500, NR2B 1/500, AchR α 7 1/200, AchR α 4 1/200, AchR β 2 1/200 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

9- Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkale fosfat konjuge) 1:10000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Morris Su Labirenti

Su labirenti 150 cm çaplı, içi beyaz boyalı, galvanik metalden yapılmış dairesel bir havuzdur. Su labirentinin bulunduğu laboratuvar, labirentin dört yanına yerleştirilmiş ve ışığı tavana yansıtılmış lambalar ile aydınlatılmıştır. Su labirentinin çevresinde sabit olarak tutulan görsel ipuçları (tablo, sandalye, masa) konulmuştur. Deney öncesi su labirenti su ile doldurulmuş, 23 °C'ye ısıtılmış ve non.toksik boya ile boyanmıştır. Labirent "1.kadran", "2.kadran", "3.kadran" ve "4.kadran" olmak üzere dört kadrana ayrılmıştır. 4. kadran hedef kadran olarak belirlenmiş ve su seviyesinin 2 cm altında kalacak şekilde gizli bir platform konulmuştur. Herbir sıçan yüzü labirentin duvarına dönmüş şekilde ve her defasında rastgele, farklı bir kadrandan havuza bırakılmıştır. Her sıçana 1 dk süre tanınmış, platformu bulamazsa elle platform üzerine konarak 30 sn mekanı algılaması için beklenmiştir. Platformu bulan sıçanlar için de platform üzerine çıktıktan sonra 30 sn dinlenme süresi tanınmıştır. Günde 5 eğitim olacak şekilde, 4 gün boyunca eğitim devam etmiştir ve her bir sıçan toplam 20 egzersiz yapmış ve platformun yerini bulmayı öğrenmişlerdir. Beşinci gün platform bulunduğu kadrandan kaldırılmış ve her bir sıçanın hedef kadranda geçirdiği süre kaydedilmiştir (64).

3.2.2. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu

Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartılıp yeterli protein konsantrasyonunu sağlamak amacıyla 3 hipokampus 1 örnek oluşturacak şekilde birleştirilmiş ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20

darbede homojenizasyon yapılmıştır. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de +4 °C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapılmıştır (65). Son olarak süpernatantları yedeklenerek çalışılincaya kadar -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.3. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışılmıştır (66). % 7,5'lik lower jel ve % 4'lük upper jel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde, doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulanmıştır.

3.2.4. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A, anti NR2B, anti nACh α_7 , anti nAChR α_4 ve anti nACh β_2 içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikörle 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar Kodak İmage Station 2000 MM cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör subüniti için kendi arasında karşılaştırıldı (67).

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 15 for Windows paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların verileri ortalama ve standart sapma dağılımları ile gösterilmiştir.

Gruplar arası karşılaştırmalarda Levene homojenite testine göre homojen olan durumlarda One Way ANOVA; homojen olmayan durumlarda Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Bu test sonuçlarına göre farkın anlamlı olduğu durumlarda anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır.

Grup içi karşılaştırmalarda (zamana göre gelişimi değerlendirmek için) Repeated Measure testi kullanıldı.

İstatistik anlamlılık değeri %95 güven aralığında $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

5. BULGULAR

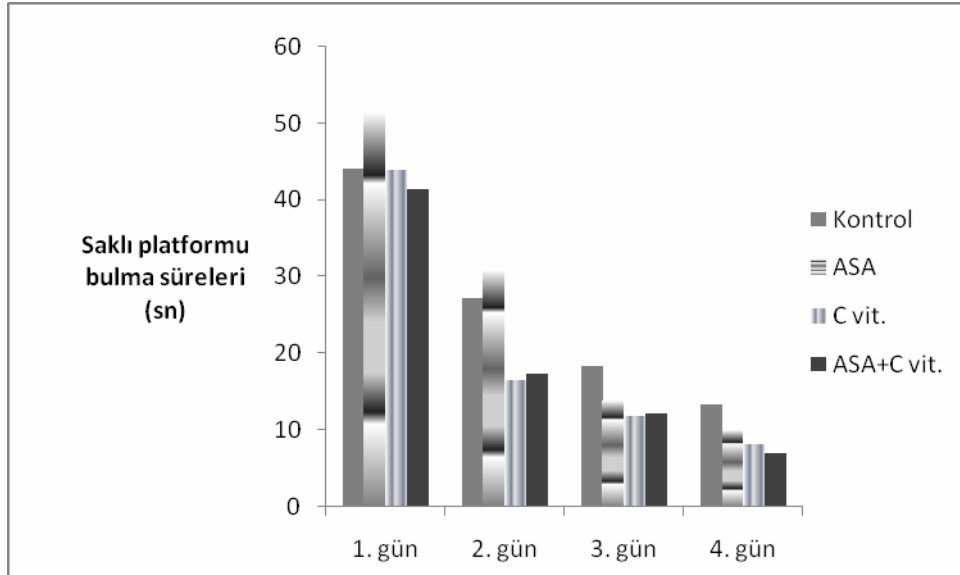
5.1. Morris Su Labirenti test sonuçları

Morris su labirentinde tüm grupların kendi içinde günler arası farkları değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak tüm gruplarda anlamlılık saptanmıştır. Bu veriler tüm grupların sistemi öğrendiğini göstermektedir.

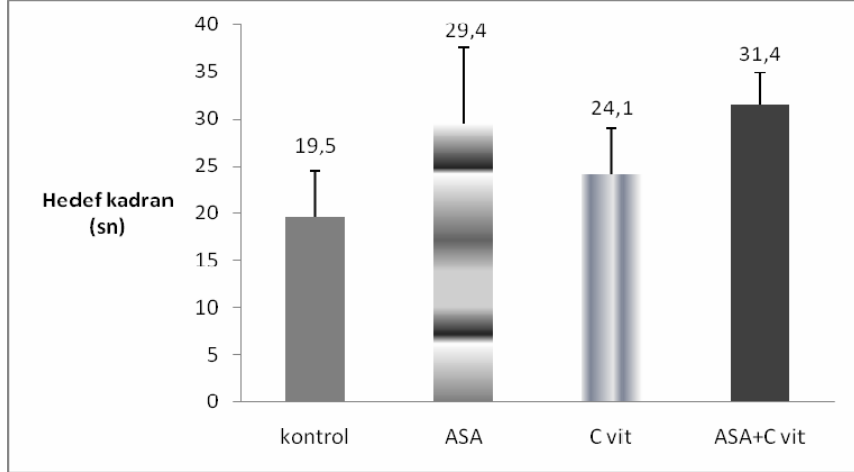
Tablo 1. Morris Su Labirentinde Öğrenme Süreleri ve hedef kadranda geçirilen süreler

Gruplar	1.gün (sn)	2.gün (sn)	3.gün (sn)	4.gün (sn)	Hedef kadranda (sn)
Kontrol (n=10)	44,14	27,28	18,42	*13,38	*19,50±4,90
ASA (n=10)	51,38	*30,78	13,74	9,98	*29,40±8,15
C vit (n=10)	43,93	*16,42	11,88	8,22	24,11±4,98
ASA+ C vit (n=10)	41,40	*17,16	12,24	*7,00	*31,40±3,48

‘**’ p<0,05 ifade etmektedir.



Grafik 1. Morris Su Labirenti eğitim günlerinde öğrenme süreleri arasındaki farklar



Grafik 2. Her bir grup için hedef kadranda geçirilen süre

Morris su labirentinde öğrenme süreleri açısından gruplar karşılaştırıldığında 2. eğitim gününde ASA grubu ile C vitamini grubu ve ASA+C vit grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). İlginç olarak 2. eğitim gününde platformu bulma süresi en uzun olan grup ASA grubu iken en kısa olan grup ASA+C vit. grubu olmuştur. C vitamini grubu da 2. eğitim gününde ASA grubundan anlamlı olarak daha iyi performans göstermiştir. 4. eğitim gününde kontrol grubuna göre ASA+C vit. grubunun saklı platformu bulma süreleri anlamlı olarak kısa bulunmuştur ($p < 0,05$). Eğitim döneminin ardından saklı platform kaldırıldıktan sonra her bir grubun hedef kadranda geçirdiği süre açısından karşılaştırıldığında ASA grubu ve ASA+C vit grubu hedef kadranda süreleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede uzun saptanmıştır ($p < 0,05$). Hipokampüse dayalı mekansal hafızayı değerlendirmede kullanılan iki veri açısından da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ASA+C vit grubu açısından anlamlı bir fark saptanmıştır.

5.2. Western Blot Analizi ile NR2A, NR2B, nAChR $\alpha 7$ ve nAChR $\alpha 4\beta 2$ Reseptör Düzeyleri

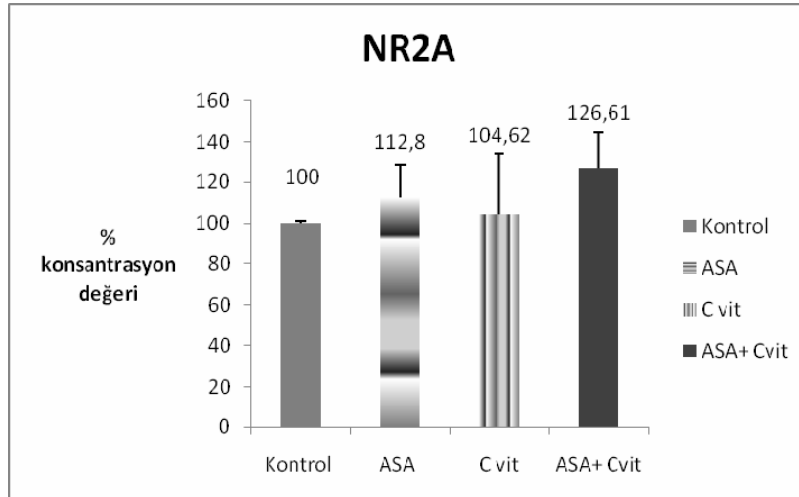
Tablo 2. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B, nAChR $\alpha 7$ ve nAChR $\alpha 4\beta 2$ reseptör yoğunluklarının ortalama ve standart sapmaları

Gruplar	NR2A (optik dansite)	NR2B (optik dansite)	nAChR $\alpha 7$ (optik dansite)	nAChR $\alpha 4$ (optik dansite)	nAChR $\beta 2$ (optik dansite)
Kontrol (n=10)	100	100	100	100	100
ASA (n=10)	112,81±16,32	119,98±23,21	133,08±22,64ж	114,04±18,60	103,46±13,56
C vit (n=10)	104,62±29,46	104,24±19,60	119,09±11,82	111,02±9,15	99,82±5,44
ASA+ Cvit(n=10)	126,61±17,76	147,86±29,57ж	143,54±20,72ж	121,71±21,68	107,69±6,80

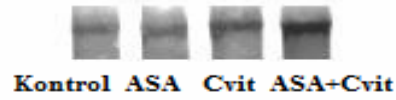
*Reseptör yoğunlukları, kontrol grubu değerlerinin ortalaması 100 kabul edilmiş ve tüm gruplar kontrole göre hesaplanmıştır. ‘ж’ p<0,05 ifade etmektedir.



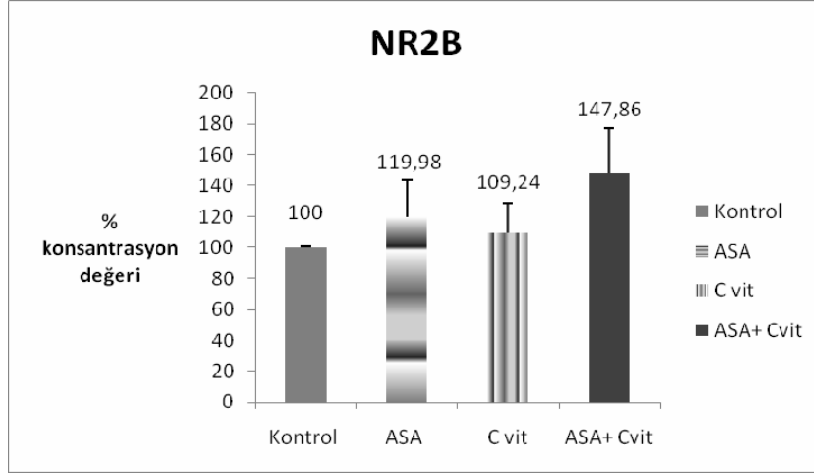
Şekil 2. NR2A'ya ait Western Blot örneği.



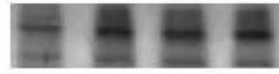
Grafik 3. NR2A'ya ait optik dansite sonuçları



Şekil 3. NR2B'ye ait Western Blot örneği

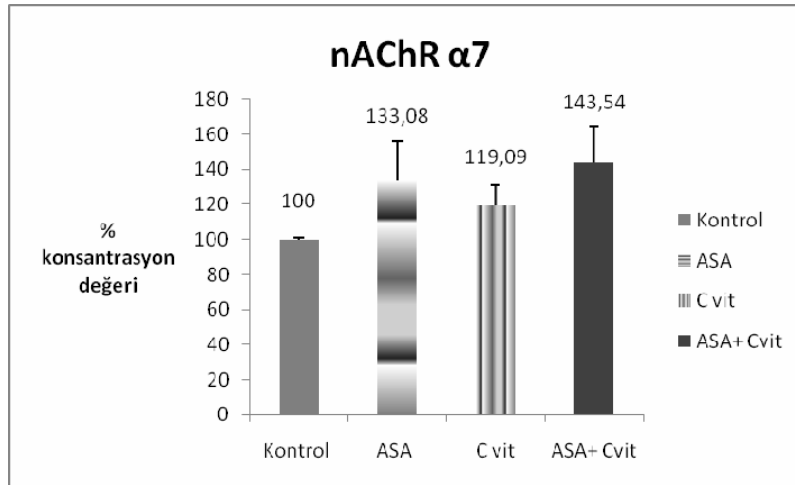


Grafik 4. NR2B'ye ait optik dansite sonuçları



Kontrol ASA C vit ASA+Cvit

Şekil 4. nAChRα7'ye ait Western Blot örneği

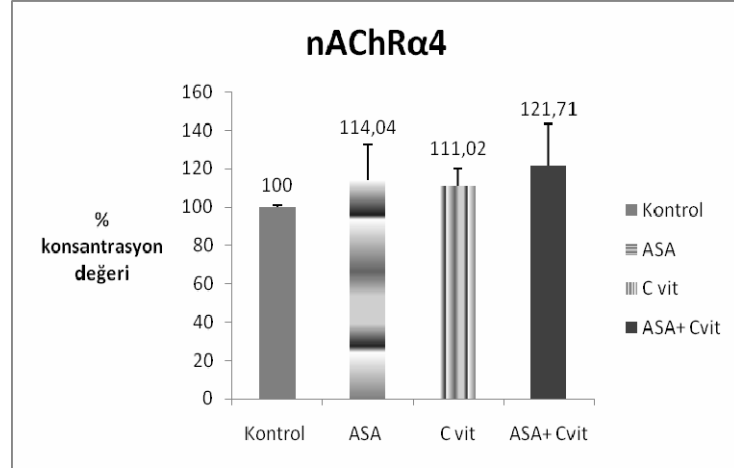


Grafik 5. nAChRα7'ye ait optik dansite sonuçları



Kontrol ASA C vit ASA+Cvit

Şekil 5. nAChR α 4 western blot örneği

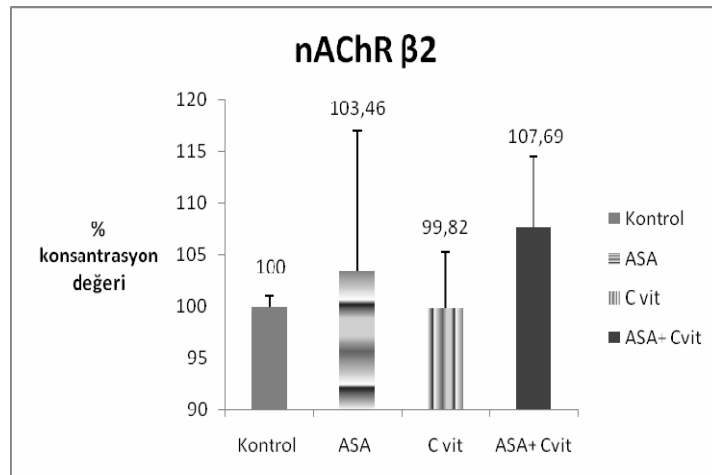


Grafik 6. nAChR α 4'e ait optik dansite sonuçları



Kontrol ASA C vit ASA+Cvit

Şekil 6. nAChR β 2'e ait western blot örneği



Grafik 7. nAChR β 2'e ait optik dansite sonuçları

Reseptör konsantrasyonları değerlendirilirken kontrol grubu optik dansite ortalaması 100 kabul edilmiş ve tüm optik dansiteler buna göre hesaplanmıştır. NR2A reseptör konsantrasyonu açısından her 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). NR2B reseptör konsantrasyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ASA+C vitamini grubunda % 47'lik bir artış ($p<0,05$) ve C vitamini grubu ile yine ASA+C vitamini grubu karşılaştırıldığında yine % 38'lik bir artış ($p<0,05$) saptanmıştır. nAChR $\alpha7$ izoformu açısından değerlendirdiğimizde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ASA+C vitamini grubunda % 43'lük artış ($p<0,05$) ve kontrol grubu ile ASA grubu karşılaştırıldığında % 33'lük bir artış saptanmıştır. nAChR $\alpha4\beta2$ reseptör konsantrasyonu açısından 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

6. TARTIŞMA

Yaşa bağı hafıza zayıflığı 65 yaş üstü kişilerin % 40' ını etkileyen bir durumdur. Kavrama fonksiyonunda orta şiddette bozulmaları olan yaşlı insanların günlük yaşamlarını sürdürebilme yeteneklerinde dramatik bir bozulma olmaz. Bununla beraber bu durum sıklıkla gelecekteki bir nörodejeneratif hastalığın (AH gibi) belirtisi olabilir (68). Yaşlanma sürecinde hem IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 ve iNOS gen ekspresyonunda artış hem de COX aktivitesi sonucu TXA₂, PGI₂ üretiminde artış ve reaktif oksijen türlerinin arttığı saptanmıştır (5,13,14). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda AH'deki patolojik bulgular ile ilişkili olduğu görülen inflamatuvar olayların NSAİİ kullanımı ile azaldığı, hastalığın ilerlemesinin yavaşladığı veya başlangıcının geciktiği görülmüştür (4,69,70).

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar antiinflamatuvar etkilerini; sitokin üretiminde modifikasyon, bazı hücre içi olayların ve hücre membranında lipid çift katmanda hasar inhibisyonu, NF- κ B aktivasyonu gibi mekanizmalar ile sağlar. Aspirin, antiinflamatuvar aktivitesini, COX enziminin aktif bölgesi olan serin rezidüsünde asetilasyon ile sağlar. Aspirin ve salisilatlar, IK kinaz β (IKK β) enzimine bağlanarak enzime ATP bağlanmasını engellemek suretiyle enzimi inhibe etmektedir (20). Moleküler inflamasyon hipotezi, yaşlanma ile artan oksidatif stresin redox-sensitif faktör; NF- κ B aktivasyonuna neden olduğunu ortaya koymaktadır. NF- κ B ise proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu düzenler (20).

Beyin, COX-1 ve COX-2 izoformlarının her ikisini de içerir. Diğer dokulardan farklı olarak beyinde normal fizyolojik durumlarda da COX-2 ekspresyonu olur. Beyinde COX-2 düzeyleri inflamatuvar sinyaller ve fizyolojik nöronal plastisite ile dinamik bir şekilde regüle edilir. COX-2, serebral korteks, hipokampus ve amigdala'daki eksitator nöronlarda mevcuttur ve bu da COX-2'nin nörotransmisyon ve postsinaptik sinyalizasyonda rol oynadığını düşündürmektedir (26,29). COX-2 ürünleri olan PG'lerin adrenerjik, noradrenerjik ve glutamaterjik transmisyon üzerinde modülatör etkileri olduğu ve PG'lerin kolinerjik reseptör aktivitesinin regülasyonunda da yer aldığı görülmüştür. Bu gözlemler ve diğer çalışmalardan elde edilen bulgular bize COX-2'nin nöronal plastisite, sinaptik aktivite ve hafızanın işlenmesi sırasında önemli rol oynadığını göstermektedir (29). COX-1 izoformu demansı olan ve olmayan hastaların

nöronlarında ve mikroglial hücrelerinde tespit edilmiştir (21). Demanslı hastalarda COX-1 ekspresyonunun frontal ve temporal kortekste arttığı ve mikroglial hücrelerde COX-1'in varlığının amiloid plak oluşumu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Alzheimer hastalarında frontal korteks, talamus ve hipokampal alanlardaki büyük nöron gruplarında COX-2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Ayrıca, nörofibriler yumakları olmayıp amiloid plakları artmış henüz demans gelişmemiş bireylerde de COX-2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu bulgular COX-2'nin AH'nın erken evrelerinde rol oynadığını düşündürmektedir (21). NSAİİ'ler, COX enzimi üzerinden daha önce de bahsedildiği gibi çeşitli düzeylerde ve çeşitli basamaklarda inhibisyon yapmaktadır (20).

Smith ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada genç ve yaşlı sıçanlara oral yolla kronik aspirin uygulamışlardır (3). Genç sıçanlarda anlamlı bir fark oluşmazken, aspirin uygulanan yaşlı sıçanlarda öğrenme hızında artış saptanmıştır. Çalışmada sıçanların performansları Morris su labirentinde değerlendirilmiş ve kavrama yeteneklerinde iyileşme anlamlı şekilde yaşlı sıçanlarda gözlenmiştir. Bu makalede de gözlenen aspirinin yaşa özgül etkileri, insanlarda yapılan bazı ön çalışmalara da yansımıştır. NSAİİ'lerin demansı olmayan orta yaşlı bireylerde kavrama fonksiyonunda iyileştirme özelliğinin olmadığı fakat geriatrik bireylerde (ortalama yaş 77.4) mental yetenekleri arttırdığı görülmüştür. Ayrıca yaşlı bireylerdeki NSAİİ kullanımının kavrama fonksiyonunda bozulmaya karşı koruyucu bir etkisi olduğu görülmüştür (3).

İnsanlar üzerinde yapılan retrospektif klinik çalışmalarda, en az iki yıldır NSAİİ veya aspirin kullanmakta olan yaşlı bireyler ile bu ilaç tedavilerini almayan bireyler karşılaştırıldığında grubun ancak yarısında AH geliştiği saptanmıştır. Ancak kullanılan NSAİİ türü ve kullanılma süresinin son derece önemli olduğu belirtilmiştir. Üç farklı merkezde yürütülen üç ayrı çalışmanın sonucunda NSAİİ'lerin nöroprotektif etkilerine işaret edilmiştir (71).

İnsan nöroblastoma hücre kültüründe aspirin ve askorbik asitin etkilerinin incelendiği invitro bir çalışmada, aspirinin, IL-1 β ile indüklenen PGE₂ sentezini doza bağımlı olarak inhibe ettiği, yüksek doz askorbik asitin de tek başına IL-1 β ile indüklenen PGE₂ biyosentezini doza bağımlı olarak inhibe edebildiği saptanmıştır. Bu çalışmada PGE₂ üretiminin aspirin ile inhibisyonuna askorbik asit sinerji sağlamıştır.

Diğer bir deyişle aspirin ve askorbik asit kombinasyonu aspirinin tek başına yaptığı inhibisyonu 15 kat daha güçlü hale getirmiş, askorbik asit, diğer COX inhibitörleri (SC-58125, indometazin) ile kombine edildiğinde aynı sinerjik etki saptanmamıştır. Çalışmanın ikinci adımında askorbik asit ve aspirin kombinasyonu invitro modelde tek tek veya bir arada COX-2 ekspresyonuna etkisi olmadığı saptanmıştır. Üçüncü adımda indüklenebilir PGE sentaz (mPGES-1) ekspresyonu üzerine askorbik asit ve aspirin + askorbik asit kombinasyonunun etkisi incelenmiştir. IL-1 β ile mPGES-1 ekspresyonunun upregülasyonunun sağlandığı ve askorbik asit ve askorbik asit + aspirin kombinasyonu ile inhibe edilemediği saptanmıştır. Askorbik asit, COX aktivitesini direk inhibe edememektedir. Askorbik asit, COX1/2, mPGES-1 gibi anahtar enzimlerin ekspresyonunu azaltmamaktadır (32). Broe ve arkadaşları düşük doz aspirin uygulaması sonrasında vasküler veya diğer demans tiplerinde değil ama AH tipi demans ile aspirin uygulaması arasında negatif korelasyon saptamışlardır (72).

Jones ve arkadaşları, yaptığı bir çalışmada sağlıklı yaşlı hastalara tek doz ve multipl doz olmak üzere iki şekilde indometazin uygulanmıştır. Sensorimotor koordinasyon ve kısa süreli hafıza değerlendirmesinde indometazinin yararlı etkileri görülmüş fakat dikkat ve psikomotor testlerde önemli bir değişiklik saptanamamıştır(73).

Diğer taraftan Jenkinson ve arkadaşları ile Mcgeer ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda NSAİİ kullanımı ile AH başlangıcının gecikmesi arasında paralel bir ilişki tespit etmemişlerdir (74,75). Sharifzadeh ve arkadaşlarının Morris su labirenti ile yaptığı bir çalışmada egzersiz dönemi sonrası selekoksibin (selektif COX-2 inhibitörü) intrahippokampal infüzyonu ile sıçanlarda mekansal hafıza oluşumunun bozulduğu gösterilmiştir (29). Teather ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada selektif ve non selektif COX inhibitörü uygulanmış ve Morris su labirentinde değerlendirilmiş; çalışmanın sonucunda mekansal hafızanın bozulduğu görülmüştür (76). Yaşlanmayla ilişkili hipokampal fonksiyonlarda azalma ve hipokampüse dayalı hafıza fonksiyonunda azalma daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (2). Bizim çalışmamızın amacı oral yoldan kronik olarak 10 hafta boyunca antiinflamatuvar dozda uygulanan asetil salisilik asit, C vitamini ve asetil salisilik asit + C vitamini kombinasyonunun yaşlı sıçanlarda öğrenme ve hafızaya etkilerini değerlendirmek idi. Morris su labirentinde mekansal hafızayı değerlendirmekte kullanılan iki parametre olan öğrenme sürelerini ve saklı

platform kaldırıldıktan sonra hedef kadranda kalma sürelerini değerlendirdik. Morris su labirentini tüm gruplar öğrenmiştir ancak ASA+C vitamini grubu anlamlı olarak daha kısa sürede öğrenmiş ve test gününde hedef kadranda daha uzun süre geçirmiştir. Her iki parametre açısından elde edilen verilerin ışığında morris su labirentinde tek başına kronik asetil salisilik asit kullanımı ile değil ama asetil salisilik asit ve askorbik asit kombinasyonu ile hipokampüse dayalı mekansal hafıza performansında gelişme sağlanmıştır. Bu çalışmada hipokampüste herhangi bir proinflatuar sitokin düzeyine bakılmamıştır. Ancak yaşlanma ile hipokampüste IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 ve iNOS gen ekspresyonunda artış ve COX aktivitesi sonucu TXA₂, PGI₂ üretiminde artış ve reaktif oksijen türlerinin arttığı saptanmıştır (2,5,13,14). Diyetle antioksidanların bulunması hipokampüste yaş ile ilişkili IL-1 β artışını ve LTP'daki bozulmayı hafifletmektedir (2). Gemma ve arkadaşları, antioksidanlardan zengin diyet ile beslenmenin serebellumda yaşla ilişkili TNF- α mRNA'sındaki artışı hafiflettiğini saptamışlardır (77). Bizim çalışmamızda da antioksidan aktivitesiyle önem kazanan C vitamini katkısı hipokampüse dayalı mekansal hafıza testinde fark yaratmıştır. Bu etki asetil salisilik asitin antiinflatuar etkisine askorbik asitin antioksidan etkisinin katkısıyla yarattığı sinerjiden kaynaklanıyor olabilir çünkü aynı etki C vitamini ile tek başına veya asetil salisilik asit ile tek başına saptanamamıştır.

Yaşlı sıçanlarda yapılan standart testlerde ve mekansal hafıza testlerinde öğrenmede bozukluklar olduğu görülmüştür. Bu bozuklukların hücresel ve moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat bu defisitlerin temelinde özellikle hipokampüste yoğun olarak bulunan NMDAR'nin büyük rol oynadığı düşünülmektedir. NMDAR'nin, öğrenme ve belleğin hücresel substratı varsayılan LTP'nun bazı formlarının indüksiyonunda esas rolü oynadığı düşünülmektedir (2). Yaşlı sıçanlarda yapılan bazı çalışmalarda NR1 ve özellikle NR2B subtipi ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bunun sonucunda öğrenme, bellek ve LTP'daki yaşa bağlı defisitlerin altında yatan mekanizmanın NR1 ve özellikle de NR2B subtipindeki azalma olduğu düşünülmüştür. Alzheimer hastalarının beyinlerinde hem nöronal nAChR'lerinin hem de NMDAR'lerinin down regülasyona uğradığı görülmüştür (78). AH'nın nöropatolojisinin ilerlemesi ile birlikte NR1 ve NR2B subtipi mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı fakat NR2A subtipi ekspresyonunun değişmediği görülmüştür (69). Alzheimer hastalarında NMDAR'leri,

özellikle de NR1 ve NR2B subtiplerinin azalmasının, hafıza bozukluğuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Reseptör fonksiyonunda aşırı artış da, yetersiz reseptör fonksiyonu da çeşitli bozukluklara yol açmaktadır. Alzheimer hastalarında azalmış NMDAR fonksiyonu hafıza bozukluğunu kötüleştirirken, bir yandan da Ca^{+2} akışını azaltarak eksitotoksisiteyi azaltmaktadır (79).

Mesches ve arkadaşları, NSAİİ'lerin diyetel uygulamasının yaşa bağlı hafıza bozukluklarına etkisini tespit etmek amacıyla sulindak (non selektif COX inhibitörü) ile bir çalışma yapmışlardır. Yaşlı sıçanlara 2 ay süre ile oral yolla sulindak verilmiştir. Öğrenme ve hafıza performansının test edildiği 2 ayrı sistem olan, ışınsal kollu su labirenti ve "contextual fear conditioning" sistemi ile sulindakın hipokampüse bağlı hafızadaki yaşa bağlı bozulmaları azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada NSAİİ uygulanmasının, hem NR1 hem de NR2B subunitlerinde yaşa bağlı defisitleri iyileştirdiği görülmüştür. Daha ötesi, hem ışınsal kollu labirent hem de "contextual fear conditioning" performansları ile NR1 ve NR2B arasında zayıf ama önemli bir korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmada yaşlanmanın NR2A subuniti üzerine anlamlı bir etkisi saptanmamıştır. Sıçanlarda, NR2B subtipinin fazla ekspresyonunun mekansal öğrenme ve hafızayı, NMDAR fonksiyonunu ve LTP'ü arttırdığı görülmüştür. Dolayısıyla yaşlı sıçanlarda NR2B subunitindeki azalmalar bozulmuş hafıza ile korele olabilir. Tüm bunlar sulindakın subkronik uygulamasının yaşa bağlı glutamaterjik hipofonksiyonu ve hafıza bozukluklarını NR1 ve NR2B düzeylerini arttırarak düzelttiğini düşündürmektedir (2).

AH'da bir çok nörotransmitter sistemi etkilense de kavrama fonksiyonunda bozulma ile ilişkilendirilen kolinerjik disfonksiyon en çok suçlanan sistemdir. Nörotransmitter üretimindeki değişiklikler örneğin ACh sentezleyen enzim olan kolinasetiltransferaz (ChAT) aktivitesinde azalma ve/veya reseptör düzeyinde fonksiyon değişiklikleri örneğin nAChR'de nikotinik bağlanma bölgelerinde farmakolojik özelliklerinde değişiklikler olabilmektedir. Alzheimer hastalarının postmortem korteks dilimlerinde western blotting yöntemiyle nAChR'lerinin $\alpha 4$ ve $\alpha 7$ izoformları çalışılmış ve kontrol grubuna göre $\alpha 4$ ve $\alpha 7$ izoformlarında sırasıyla %40 ve % 17 oranında anlamlı bir düşüklük saptanmıştır (80).

Hipokampüse dayalı mekansal hafızayı değerlendirdikten sonra hipokampüslerde NMDAR'lerinden NR2A, NR2B ve nAChR'lerinden $\alpha 7$ ve $\alpha 4\beta 2$ subtiplerini western blotting analizi ile inceledik. Kronik asetil salisilik asit ve C vitamini kombinasyonu yaşlanma ile NMDAR fonksiyonunda oluşan olumsuz değişiklikleri hafifletilebileceğini göstermektedir. NR2A subunitinde anlamlı bir fark oluşmazken, NR2B subunitinde ASA+C vitamini grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % 47' lik artış; C vitamini grubu ile karşılaştırıldığında % 38'lik artış saptanmıştır. Bu noktada yine asetil salisilik asit etkisine C vitamini katkısını görmekteyiz. nAChR subünitlerinden $\alpha 7$ izoformunda yine ASA grubu ve ASA+C vitamini grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış (sırasıyla %33, %43) bulunmuştur. Asetil salisilik asit ile C vitamini kombinasyonu mekansal hafıza testinde ve NR2B reseptör konsantrasyonunda olduğu gibi ciddi bir sinerji sağlamıştır. Bu çalışmada oral yoldan antiinflamatuvar dozda verilen asetil salisilik asit ve insanların günlük alması gereken doza karşılık gelen C vitamini dozu ile yaşlanma ile ilişkili öğrenme problemlerinin hafifletilebileceği saptanmıştır. Bu etkiyi proinflamatuvar sitokinleri azaltmak, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltmak ve öğrenme reseptör konsantrasyonunda değişiklik yaratmak gibi etkilerin tümünü bir arada sağlayarak gerçekleştiriyor olabilir. Asetil salisilik asit ve C vitamini kombinasyonunun yarattığı sinerjinin altında yatan mekanizmanın antiinflamatuvar etkiden kaynaklanıp kaynaklanmadığını göstermek için proinflamatuvar sitokin düzeylerini de değerlendirmek ve asetil salisilik asitin farklı dozlar ile aynı etkilerin sağlanıp sağlanamayacağını değerlendirmek gelecekteki çalışmalarımızın hedefi olacaktır.

ÖZET

Kronik Asetil Salisilik Asit Uygulamasının Yaşlı Sıçanlarda Uzamsal Hafıza, NMDA Reseptörlerinden NR2A, NR2B ve Nikotinik Kolinergik Asetilkolin Reseptörlerinden $\alpha 7$ ve $\alpha 4\beta 2$ Subtiplerine Etkileri

İnflamasyon birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynar. Normal yaşlanma sürecinde hem sistematik olarak hem de santral sinir sisteminde (SSS) kronik bir inflamasyon olayı meydana gelmektedir. NSAİİ'ler, siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek inflamasyonu azaltmaktadır ve sonuç olarak pro-inflamatuar prostoglandinlerin (PG) üretimini sınırlandırmaktadır. Diğer taraftan aspirin ile sağlanan COX inhibisyonuna bağlı proinflamatuar sitokin inhibisyonunun C vitamini tarafından desteklendiği öne sürülmüştür. Hipokampüsde yaygın olarak bulunan ve öğrenme ve hafızada etkili olduğu düşünülen N-metil-D-aspartat reseptörlerinin (NMDAR) ve nikotinik asetil kolin reseptörleridir (nAChR). Biz de bu bilgilerin ışığında, yaşlı sıçanlarda NSAİİ arasında yer alan aspirinin kronik uygulanmasıyla NMDAR (N-metil-D-aspartat reseptörü) subunitlerinden NR2A (N-metil-D-aspartat 2A subuniti) ve NR2B (N-metil-D-aspartat 2B subuniti) konsantrasyonu ve nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) izoformlarından $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ konsantrasyonunun nasıl etkilendiğini ve mekansal hafızaya etkilerini incelemeyi amaçladık.

Yaşlı sıçanlar (16-18 aylık) kontrol, asetil salisilik asit (ASA) verilen grup ve C vitamini verilen grup ve ASA+C vitamini verilen grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 10 hafta süre ile kontrol grubuna serum fizyolojik, diğer gruplara ASA ve C vitamini oral gavaj ile verildi. Bu sürenin sonunda hayvanlar Morris su labirentinde eğitim ve öğrenme testine tabi tutuldu ve dekapite edilerek hipokampusleri çıkarıldı. Hipokampus homojenatlarında NR2A, NR2B subunitleri ve nAChR $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ izoformları Western Blot yöntemi ile çalışıldı.

Morris su labirentinde karşılaştırılan öğrenme süreleri ve hedef kadranda geçen süre açısından ASA+C vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir ($p < 0,05$). NR2A reseptör ekspresyonu için her 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken ($p > 0,05$), NR2B reseptör ekspresyonu ASA+C grubunda %47'lik bir artış ($p < 0,05$) saptanmıştır. nAChR $\alpha 7$ izoformu ise yine ASA+C vitamini ve ASA grubunda sırasıyla %43 ve %33'lük artış ($p < 0,05$) saptanmıştır. nAChR $\alpha 4\beta 2$ izoformları açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu verilerin ışığında NSAİİ'lerin antioksidan bir vitamin olan C vitamini ile yaşlı sıçanlarda kavrama fonksiyonda iyileşme sağladığı ve bu etkiyi ise NR2B ekspresyonu ve nAChR $\alpha 7$ izoformu ekspresyonu artışı ile sağladığını söylemek mümkündür.

Anahtar sözcükler: Asetil salisilik asit, Mekansal hafıza, NMDAR, nAChR

SUMMARY

Effects Of Chronic Administration Of Acetyl Salisilic Acid On Spatial Memory and NMDAR Subtypes NR2A And NR2B and also Effects on nAChR subtypes $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$

Inflammation plays a part in patogenezis of many neurodegenerative disorders. At normal ageing process chronic inflammation status takes place systematically and at the central nervous system. NSAIDs inhibits COX enzyme and limits the proinflammatory PG production. On the otherhand COX inhibition which is obtained by the aspirin is supported by vitamin C supplementation. NMDARs and nAChRs are thought to be effective at learning and memory process. According to this data we administer chronic acetyl salisilic acid to aged rats and determine the effects of acetyl salisilic acid on spatial memory and effects on subunit concentration of NMDARs; NR2A and NR2B and nAChRs; $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ isoforms.

The aged rats (16-18 months) were divided into four groups as control group, acetyl salisilic acid (ASA) group, Vitamin C group and ASA+C group. For an ten weeks the control group was given saline and the other groups were given ASA and vitamin C by oral gavage. At the end of this period the rats were trained at the Morris water maze and tested at the end of training. Their hippocampi were extracted. Than NR2A, NR2B subunits and nAChR $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ isoforms were assessed by Western Blotting analysis. Escape latencies and time spent at the target quadrant of groups were compared and data of ASA+C group was statistically significant ($p < 0,05$). NR2A expression of the groups were not statistically significant but NR2B expression of ASA+C group were compared to control group and %47 of increase were determined and this data was statistically significant ($p < 0,05$). Expression of nAChR $\alpha 7$ isoform of ASA+C and ASA groups were increased (respectively %43 and %33) and these data were statistically significant. When compared with the control group, expression of nAChR $\alpha 4\beta 2$ isoform were not altered and was not statistically significant ($p > 0,05$).

In conclusion we find out that NSAIDs with an antioxidant vitamin C develops cognitive performans at aged rats and this effect should be related to the increase of expression of NMDARs and $\alpha 7$ isoform of nAChR.

Keywords: Acetyl salisilic acid, spatial memory, NMDAR, nAChR

KAYNAKLAR

1. Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stress and the hippocampus. *Aging research reviews* 2005; 4: 123-140
2. Mesches H, Gemma C. Sulindac improves memory and increases NMDA receptor subunits in aged Fischer 344 rats. *Neurobiology of aging* 2004; 25: 315-324
3. Smith JW, Al-Khamees O, Costall B, Naylor RJ, Smythe JW. Chronic aspirin ingestion improves spatial learning in adult and aged rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2002; 71 (1-2): 233-238
4. In 't Veld BA, Launer LJ, Hoes AW, Ott A, Hofman A, Breteler MMB, Stricker BHC. NSAIDs and Incident Alzheimer's disease. The Rotterdam study. *Neurobiology of aging* 1998;19: 607-611
5. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Review; Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* 2009; 8:18-30
6. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress of Neurobiology* 1998; 54:581-618
7. Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001.
8. Clayton DA, Browning MD. Deficits in the expression of NR2B subunit in the hippocampus of aged Fischer 344 rats. *Neurobiology of aging* 2001; 2:165-168
9. Narahashi T, Marszalec W. Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. *Life Sciences* 2003;74:281-291
10. Tuppo EE, Arias HR. Review: The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 289-305
11. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development* 2007; 128:83-91
12. Kim YJ, Kim HJ, No JK, Chung HY, Fernandes G. Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sciences* 2006; 78: 2523-2532
13. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; 8: 572-581
14. Kim HJ, Jung KJ, Yu BP, Cho CG, Choi JS, Chung HY. Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mechanisms of ageing and development* 2002; 123:1589-1595
15. Brod SA. Unregulated inflammation shortens human functional longevity. *Inflammation Research* 2000; 49:561-570
16. Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Annals of Neurology* 2002; 52: 168-174

17. Engelhart MJ, Geerlings MI, Meijer J, Kiliaan A, Ruitenberg A, Van Swieten JC et al. Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. *Archives of Neurology* 2004; 61: 668-672
18. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*. 2006; 12: 1005-1015
19. Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL. Inflammation and aging: Can endocannabinoids help? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008; 62: 212-217
20. Jung KJ, Kim JY, Zou Y, Kim YJ, Yu BP, Chung HY. Effect of short-term, low dose aspirin supplementation on the activation of pro-inflammatory NF- κ B in aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006; 127: 223-230
21. Nicolas G, Bazen V. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer 's disease. *Prostaglandins and other lipid mediators* 2002; 68-69:197-210
22. Kayaalp SO. Tıbbi farmakoloji, Hacettepe taş kitabevi, 2000.
23. Stack E, Dubois RN. Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Clinical Gastroenterology*. 2001; 15:787-800
24. Consilvio C, Vincent AM. Neuroinflammation, COX-2 and ALS a dual role. *Experimental neurology* 2004;187:1-10
25. Manev H, Uz T. 5-lipoxygenase and cyclooxygenase mRNA expression in rat hippocampus: early response to glutamate receptor activation by kainate. *Experimental gerontology* 2000; 35: 1201-1209
26. Kaufmann WE, Andreasson KI. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 1997; 54: 601-624
27. Chen C, Bazen NG. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity and neuroprotection. *Prostaglandins and other lipid mediators*. 2005; 77: 65-76
28. Sharifzadeh M, Naghdi N. Post-training intrahippocampal infusion of the COX-2 inhibitor celecoxib impaired spatial memory retention in rats. *European journal of pharmacology* 2005; 511: 159-166
29. Sharifzadeh M, Tavasoli M. A time course analysis of cyclooxygenase-2 suggests a role in spatial memory retrieval in rats. *Neuroscience Research*. 2006; 54: 171-179
30. Hardman JG, Limbird LE. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. International Edition, 9th Ed.
31. Murray RK. Harper Biyokimya, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2004.
32. Candelario-Jalil E., Akundi R.S., Bhatia H.S., Lieb K., Appel K., Munoz E., Hülll M., Fiebich B.L. Ascorbic acid enhances the inhibitory effect of aspirin on neuronal cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production. *Journal of Neuroimmunology*, 2006; 174: 39-51
33. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomi, 4. basımdan çeviri. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000.

34. Dere F. Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji, Okullar Pazarı Kitabevi, Glutamat Res, 1990.
35. Gutbrod K, Cohen R, Maier T, Meier E. Memory for spatial and temporal order in aphasics and right hemisphere damaged patients. *Cortex*. 1987; 23(3): 463-474
36. Nunn JA, Graydon FJ, Polkey CE, Morris RG. Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. *Brain: a Journal of Neurology* 1999; 122: 47-59
37. Tucker DM, Hartry-Speiser A, McDougal L, Luu P, deGrandpre D. Mood and spatial memory: emotion and right hemisphere contribution to spatial cognition. *Biological Psychology* 1999; 50(2):103-125
38. Liang KC, Hon W, Tyan YM, Liao WL. Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze. *The Chinese Journal of Physiology* 1994; 37(4): 201-212
39. Stewart CA, Morris GM. Behavioral Neuroscience, A Practical Approach Volume 1, Chapter 9, The watermaze, 1993; 107-122
40. Ozawa S, Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 1987;54: 581-618
41. Heresco U. Glutamatergic neurotransmission modulation mechanisms of antipsychotic atypicality. *Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003;23: 1113-1123
42. Goebel DJ, Poesch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Molecular Brain Research*. 1999; 69: 164-170
43. Cull-Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001.
44. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targetting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience*. 2002; 25: 571-577
45. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Research* 1999; 36(2-3): 189-204
46. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews* 1999; 29(1): 83-120
47. Smith Y, Charara A, Paquet M, Kieval JZ, Paré JF, Jesse E. Ionotropic and metabotropic GABA and glutamate receptors in primate basal ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2001; 22(1-2): 13-42
48. Petrie RXA, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. *Pharmacology and therapeutics* 2000; 7:11-25
49. Wittenberg GM, Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends in Neurosciences*. 2002; 25:571-577
50. Yakamura T, Shimoji K. Subunit and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology* 1999; 59:279-298

51. Khanduja KL, Sohi KK. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. *Life Sciences* 2006; 78: 1662-1669
52. Candelario-Jalile E, Gonza'lez-Falco'na E. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research* 2004; 1007:98-108
53. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji, 9. baskı. Bölüm 6: Santral sinir sisteminin farmakolojisinin temelleri, bölüm 7: Kolinerjik Sistem. 2000.
54. Siegel GJ. *Basic Neurochemistry* 6.ed.1999; chapter 11:213-242, chapter 15:315-334
55. Neuronal nicotinic receptors, *Tocris Reviews* No:19, October 2001
56. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Brickford PC, Tighe T, Sanberg PS. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sciences* 2002; 71
57. Principles of Medicinal Chemistry by Foye WO., Lemke TL. and Williams DA., Williams and Wilkins. 4th ed. 1995
58. The RBI Handbook of Receptor Classification and signal Transduction, K.J. Watling. RBI. 3rd ed. 1998
59. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh Receptors, *Trends in Neurosciences* 1997; 20: 92-98
60. Karnad AS, Patil PA, Majagi SI. Calcium enhances antiinflammatory activity of aspirin in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2006; 38(6)397-402
61. Zheng Z, Schwab S, Grau A, Berger C. Neuroprotection by early and delayed treatment of acute stroke with high dose aspirin. *Brain Research* 2007;1186:275-280
62. Adeneye AA, Olagunju JO. Protective Effect of Oral Ascorbic Acid (Vitamin C) Against Acetaminophen-Induced Hepatic Injury in Rats. *African Journal of Biomedical Research*, 2008; 11:183-190
63. Karabulut-Bulan O, Bolkent S, Yanardag R, Bilgin-Sokmen B. The role of vitamin C, vitamin E, and selenium on cadmium-induced renal toxicity of rats. *Drug and Chemical Toxicology* 2008; 31(4):413-426 64.
64. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11:47-60
65. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folinphenol reagents. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-275
66. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*. 1970; 227:680-689
67. Delibas N, Doguc DK, Sutcu R, Eroglu E, Gökalp O. Effect of Nicotine on hippocampal nicotinic acetyl choline alfa7 receptor and NMDA receptor subunits 2A and 2B expression in young and old rats. *International Journal of Neuroscience* 2005;115 (8):1151-1163

68. Thomas J, Olivia R. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamin treatment. *Behavioural Brain Research* 2005; 165: 160-171
69. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of disease* 2004; 15:80-92
70. Stewart WF, Kawas C. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 1997; 48:626-632
71. Lawrence D. Retrospective data strengthen Alzheimer's link with aspirin and NSAIDs. *The Lancet*. 2002. Vol 360: p1003
72. Broe G.A., Grayson D.A., Creasey H.M., Waite H.M., Casey B.J., Bennett H.M., Brooks W.A., Halliday G.M. Antiinflammatory medications protect against Alzheimer's disease at low doses. *Archives of neurology*. 2000, 57, 1586-1591
73. Crome P, Karla L. Indomethazin and cognitive function in healthy elderly volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1994; 38(1): 45-51
74. Mcgeer PL, Akiyama H. Immune system response in Alzheimer's disease. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* 1989; 816:516-527
75. Rall JM, Mach SA. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Research*: 2003; 968(2):273-276
76. Younkin SG. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology* 1998; 92(34):289-292
77. Gemma L, Mesches MH, Sepesi B, Choo K, Holmes DB, Bickford PC. Reversal of age-induced decreases in cerebellar physiology and increases in proinflammatory cytokines by diets enriched in foods with high antioxidant activity. *Journal of Neuroscience* 2002; 22(14): 6114-6120
78. Narahashi T, Marszalec W. Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. *Life Sciences* 2003; 74:281-291
79. Chen C, Magee CJ. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Journal of Neuropysiology* 2002; 87:2851-2857
80. Burhaus L, Schütz U, Krempel U, A.I. de Vos R, Steur ENHJ, Wevers A et al. Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Research-Molecular Brain Research* 2000; 76(2):385-388