



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DIŞARIDAN VERİLEN ÜRİDİN'İN SIÇANLARDA BEYİN PİRİMİDİNERJİK  
TRANSMİSYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Fulya ORHAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA - 2013**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DIŞARIDAN VERİLEN ÜRİDİN'İN SIÇANLARDA BEYİN PİRİMİDİNERJİK  
TRANSMİSYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Fulya ORHAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Doç. Dr. Mehmet CANSEV**

**BURSA – 2013**

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Genel Bilgiler.....	3
Pirimidin Bileşikleri.....	3
P2Y Reseptörleri.....	14
Üridin'in Kolinerjik Nörotransmisyon Üzerine Etkileri.....	18
Gereç ve Yöntem.....	20
Cerrahi İşlemler.....	20
Mikrodiyaliz .....	23
Deney Planı.....	25
HPLC Analizleri.....	26
Kit Analizleri.....	29
İstatistiksel Değerlendirmeler.....	30
Bulgular.....	31
Tartışma ve Sonuç.....	48
Kaynaklar.....	59
Teşekkür.....	65
Özgeçmiş.....	66

## ÖZET

Üridin, kan ve dokularda bulunan bir pirimidin nükleozididir. Aynı zamanda nükleotidlerin (mono-, di- ve tri-fosfatlı halleri), nükleotid şekerlerin (üridin difosfat-glukoz [UDP-glukoz] ve UDP-galaktoz) ve nükleik asitlerin (RNA) yapısına girerek bazı fizyolojik fonksiyonlarda yer alır. Üridin nükleotidleri tarafından aktive edilen P2Y reseptörlerinin tanımlanmasıyla, pirimidin bileşiklerinin sinirsel iletide de rol oynayabilme ihtimali ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızın öncelikli amacı sıçan beyinde üridin ve nükleotidlerinin ekstrasellüler düzeylerini araştırmak ve dışarıdan verilen üridin'in bu düzeyler üzerine olan etkisini incelemektir. Bulgularımız in vivo beyin ekstrasellüler sıvısında üridin, UDP ve üridin trifosfat (UTP)'nin varlığını ve bu bileşiklerin konsantrasyonlarının intraperitoneal (i.p.) üridin uygulamasıyla arttırılabildiğini göstermiştir. Buna ilaveten perfüzyon sıvısına eklenen yüksek konsantrasyonda potasyum ile uyarılmış koşullarda bazal ekstrasellüler üridin, UDP ve UTP düzeylerinin arttığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda takiben pirimidinerjik aktivasyonun beyinde asetilkolin saliverilmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bulgularımız i.p. üridin tedavisi sonrası striatal ekstrasellüler asetilkolin düzeylerinin arttığını ve bu artışa P2Y reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen bulgular literatürde ilk kez in vivo sıçan beyinde UDP ve UTP'nin bazal şartlarda ekstrasellüler alandaki varlığını, bu bileşiklerin ekstrasellüler konsantrasyonlarının dışarıdan verilen üridin tedavisiyle veya potasyum depolarizasyonu ile arttırılabileceğini, üridin tedavisi ile artan ekstrasellüler UDP ve UTP konsantrasyonlarına paralel olarak asetilkolin saliverilmesinin arttığını ve bu artışa P2Y reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermiştir.

Elde edilen sonuçların pirimidinerjik (nöro)transmisyonun varlığının kanıtlanması anlamında bilimsel literatüre katkıda bulunacağı ve etiyopatogenezinde kolinerjik nörotransmisyon azalması bulunan Alzheimer

hastalığı gibi bazı beyin hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımlara yol göstereceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Üridin, primidinerjik transmisyon, in vivo, sıçan, asetilkolin

## SUMMARY

### **Investigation of the effect of exogenous uridine administration on brain pyrimidinergic transmission in rats**

Uridine is a pyrimidine nucleoside which is present in blood and tissues. It also plays various physiological roles by incorporating into nucleotides (mono-, di- and tri-phosphates), nucleotide sugars (uridine diphosphate [UDP]-glucose and UDP-galactose), and nucleic acids (RNA). Identification of P2Y receptors that are activated by uridine nucleotides suggest that pyrimidines could be involved in neuronal transmission.

The principal goal of our study was to investigate extracellular levels of uridine and its nucleotides in rat brain and to research the effect of exogenous uridine administration on brain extracellular pyrimidine concentrations. Our findings showed that uridine, UDP and uridine triphosphate (UTP) exist basally in brain extracellular space and their concentrations can be increased by intraperitoneal uridine administration. In addition, inclusion of potassium at high concentrations in the perfusion medium enhanced basal extracellular uridine, UDP and UTP concentrations.

We next investigated the effects of pyrimidinergic activation on the release of acetylcholine in the brain. Our findings showed that extracellular acetylcholine concentrations were enhanced by uridine administration and the effect was mediated by P2Y receptors.

In conclusion, our findings indicate for the first time in the literature, that UDP and UTP exist extracellularly in the rat brain in vivo, their concentrations can be enhanced by potassium depolarization or exogenous uridine administration which in turn increases acetylcholine release and this effect is mediated by P2Y receptor stimulation.

We conclude that our results will make a significant contribution to scientific literature by providing the first in vivo evidence for pyrimidinergic

(neuro)transmission and pave the way for new approaches in the treatment of several brain diseases like Alzheimer's, a disease in which defective cholinergic neurotransmission is involved in etiopathogenesis.

**Key words:** Uridine, pyrimidinergetic transmission, in vivo, rat, acetylcholine

## GİRİŞ

Pirimidinler, kimyasal olarak benzen ve piridin'e benzeyen heterosiklik organik aromatik bileşiklerdir. Pirimidin nükleozidleri olan üridin, sitidin ve timidin ve bu nükleozidlerin fosfat ekli nükleotid formları normal olarak vücutta bulunurlar ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda görev alırlar. Bu fonksiyonlar arasında özellikle iyi incelenmiş olanlar glikojen metabolizmasında ve nükleik asit sentezinde aldıkları roller ile ilgili olanlardır.

Yakın zamanlı çalışmalarda özellikle üridin nükleotidleri tarafından uyarılan reseptörler (P2Y reseptörleri) klonlanmış ve çeşitli in vitro preparasyonlarda eksprese edilmiştir. Bu reseptörlerin hücre yüzeylerindeki mevcudiyeti pirimidin bileşiklerinin sadece hücrelerin içinde bulunduğu fikrini çürütmüştür. Yeni anlayışa göre pirimidin bileşikleri P2Y reseptörlerini uyararak hücreler arası sıvıda bazal şartlarda bulunuyor ve hatta bazı hücrelerden salıveriliyor olabilir.

Bu hipotezin geçerliliği in vitro deney düzeneklerinde test edilmiş ve kanıtlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalar pirimidin bileşiklerinin trombosit, lökosit, solunum epiteli ve glial hücre kültürlerinde ekstrasellüler sıvıdaki varlığını ve insan astrositoma hücrelerinin mekanik indüksiyonuyla salıverilen pirimidin nükleotidlerinin P2Y4 reseptör aktivasyonuna neden olduğu bildirmiştir.

Bu bulgular pirimidin nükleotidlerinin, in vivo koşullarda da hücreler arası sıvıda bulunuyor olabileceğine işaret etmektedir. Ancak literatürde sadece pirimidin nükleozidleri olan üridin ve sitidin'in beyin ekstrasellüler sıvısındaki varlığı in vivo beyin mikrodializi yöntemiyle saptanmış olup henüz pirimidin nükleotidlerinin varlığı gösterilememiştir. Klonlanan P2Y reseptörlerinin nükleotidlerce uyarıldığı ancak nükleozidlerin bu reseptörleri uyarabildiğine dair herhangi bir bulgu olmadığı göz önüne alındığında, pirimidin nükleotidlerinin in vivo beyin ekstrasellüler sıvısındaki muhtemel varlığının tespit edilmesi, bu bileşiklerin ekstrasellüler konsantrasyonlarının regüle edilip edilemeyeceğinin belirlenmesi, ekstrasellüler alanda ulaşılan



konsantrasyonların P2Y reseptörlerini aktive edip edemediğinin ve bunun bir fizyolojik anlamının bulunup bulunmadığının incelenmesi önemlidir.

Çalışmamız bu anlamda literatürdeki ilk kanıtları sunmaktadır.

Bulgularımızın bilimsel literatüre anlamlı katkı yapacağı ve etiyopatogenezinde suçlanan faktörlerden biri azalmış kolinerjik nörotransmisyon olan Alzheimer hastalığı gibi bazı beyin hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımlara yol göstereceği düşünülmektedir.

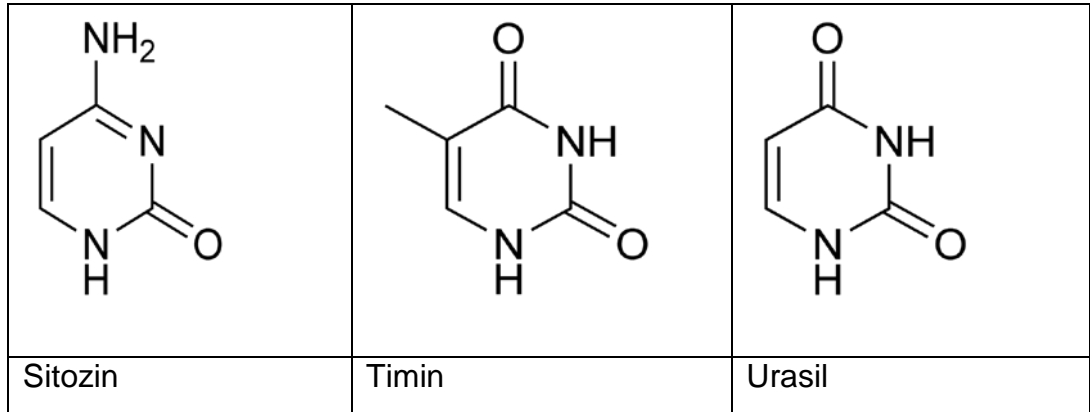
## GENEL BİLGİLER

### I. Pirimidin Bileşikleri

#### I.A. Pirimidin Bileşiklerinin Kimyasal Yapıları

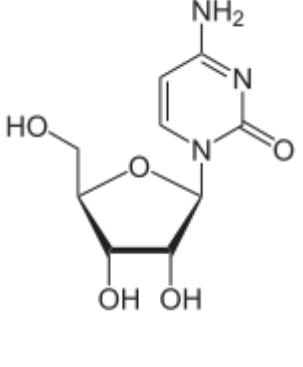
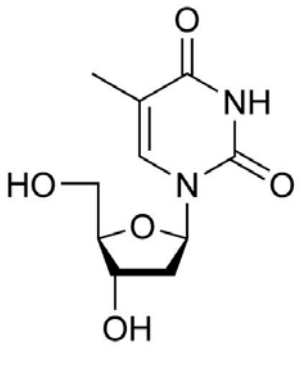
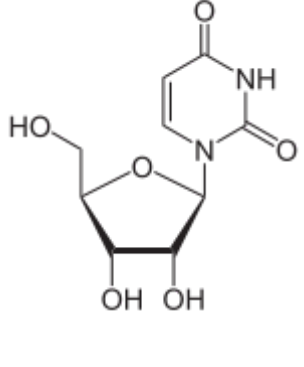
Pirimidin bileşikleri kimyasal olarak benzen ve piridin'e benzeyen heterosiklik organik aromatik bileşiklerdir ve altı üyeli kimyasal halkanın 1 ve 3 numaralı pozisyonlarında birer adet nitrojen atomu taşırlar. Pirimidinler baz, nükleozid ve nükleotid formlarında bulunurlar.

Pirimidin bazları esas olarak DNA ve RNA'nın yapısına katılırlar. Sitozin hem DNA hem de RNA'nın yapısında bulunurken, timin sadece DNA'nın urasil ise sadece RNA'nın yapısında bulunur. Pirimidin bazlarının kimyasal yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



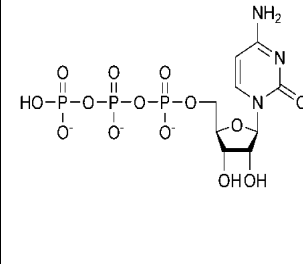
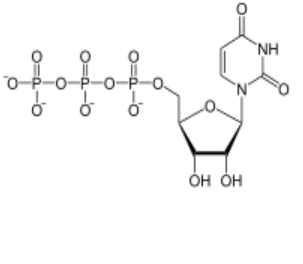
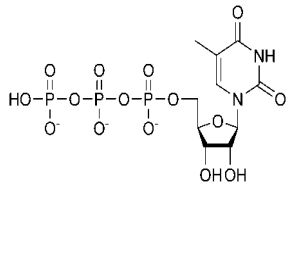
**Şekil-1:** Pirimidin bazlarının kimyasal yapıları.

Pirimidin bazlarına riboz veya 2-deoksiriboz formunda bir şeker molekülünün  $\beta$ -N-glikozit bağı ile eklenmesiyle pirimidin nükleozidleri oluşur. Bu reaksiyonda şeker molekülünün 1 numaralı karbonu pirimidin bazının 1 numaralı azotu ile birleşir. Oluşan pirimidin nükleozidi baz isminin sonuna “-idin” takısının getirilmesi ile (örneğin üridin) ifade edilir. Bazlara riboz eklendiğinde oluşan nükleozidler herhangi bir takı almazken, 2-deoksiriboz eklendiğinde ismin önüne “d-” takısı getirilir. Pirimidin nükleozidlerinin kimyasal yapıları Şekil 2'de verilmiştir.

		
Sitidin	Timidin	Üridin

**Şekil-2:** Pirimidin nükleozidlerinin kimyasal yapıları.

Pirimidin nükleotidleri ise, bir azotlu baz+bir şeker (nükleozid) ve şekerin 5'-hidroksil grubuna kovalent bağ ile bağlanmış bir veya daha çok sayıda fosfat grubunun eklenmesiyle oluşurlar. Eklenen fosfat gruplarının sayısı o nükleotidin ismini belirler; bir, iki yada üç fosfat grubu eklendiğinde nükleozid ismine sırasıyla mono-, di- ya da tri- fosfat ekleri getirilir. Pirimidin nükleozidlerine üç fosfat grubu eklendiğinde oluşan nükleotidler Şekil 3'te gösterilmiştir.

		
Sitidin-5'-trifosfat (CTP)	Üridin-5'-trifosfat (UTP)	Timidin-5'-trifosfat (TTP)

**Şekil-3:** Üç fosfat grubu içeren pirimidin nükleotidlerinin kimyasal yapıları.

### I.B. Pirimidin Bileşiklerinin Sentezi

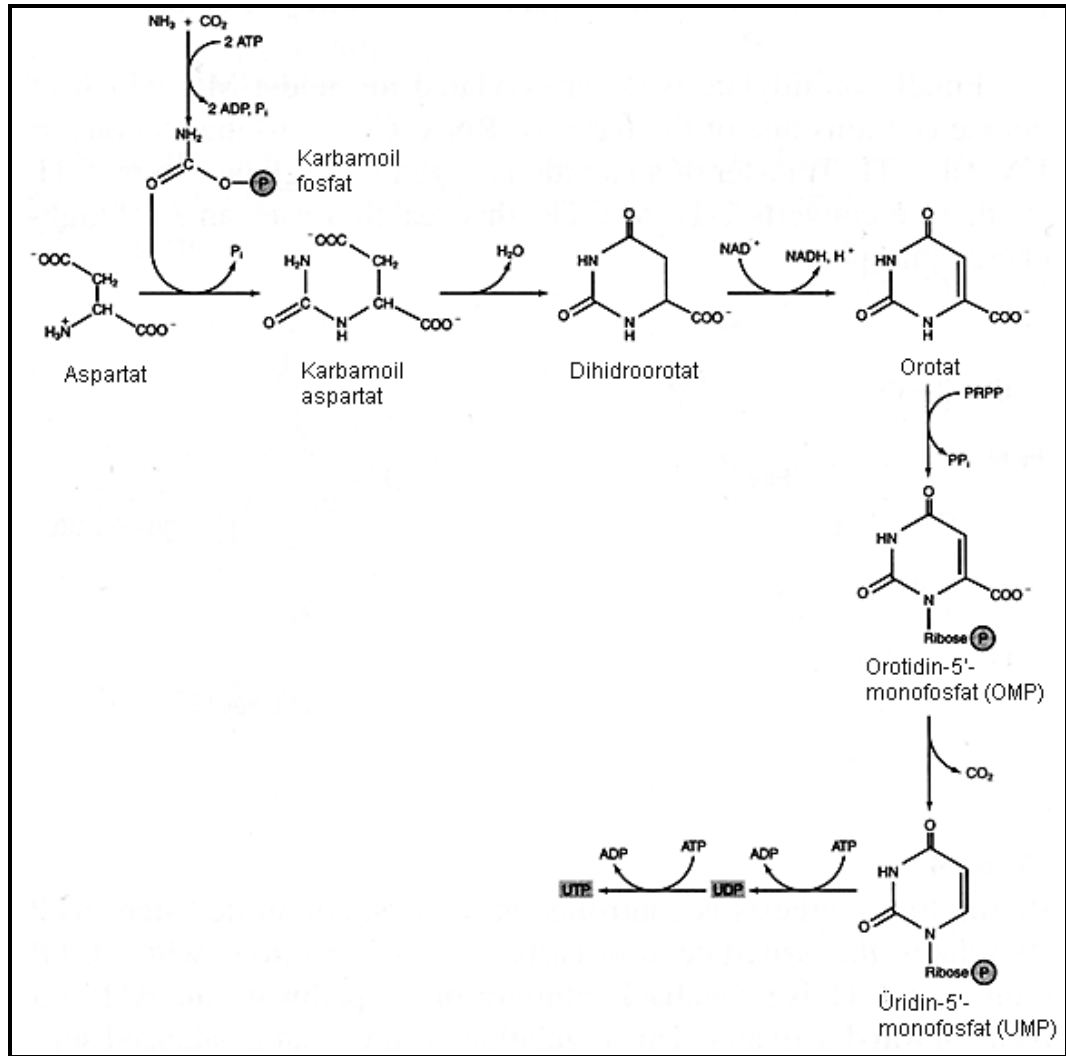
Pirimidin bileşikleri vücutta *de novo yolak* ve *kurtarma yolağı* adlı mekanizmalar aracılığıyla sentezlenirler (1).

Pirimidin nükleotid sentezinin *de novo yolağı*, büyüme ve gelişme boyunca oldukça aktiftir. Böbrek ve birçok dokuda *kurtarma yolağına* göre

daha önemli bir sentez şeklidir (2). Beyinde ise *kurtarma yolağı* pirimidinlerin başlıca sentez şeklidir.

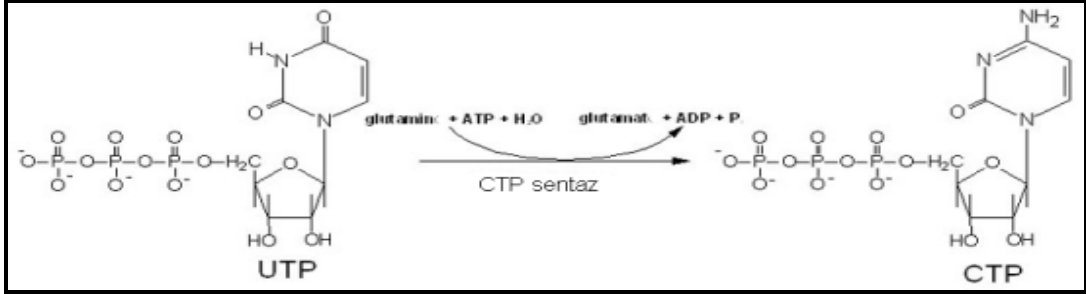
### I.B.a. *De novo* Pirimidin Biyosentezi

Pirimidin biyosentezinin *de novo yolağı*nda önce karbomoil fosfat'tan üridin-5'-monofosfat (UMP) oluşur (Şekil-4). Daha sonra nükleotid kinaz enzimince katalizlenen ardışık reaksiyonlarla ATP'den elde edilen fosfat grupları UMP'ye aktarılarak sırasıyla UDP ve UTP sentezi gerçekleşir (Şekil4).



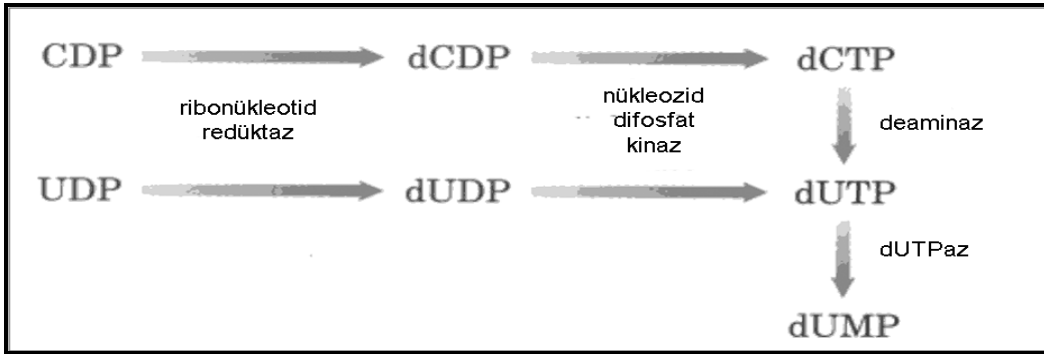
Şekil-4: Pirimidin bileşiklerinin *de novo sentez yolağı* (1).

Sitidin-5'-trifosfat (CTP) sentezi CTP sentaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla UTP'den meydana gelir. Sentez için gereken amin grubu glutamin'den elde edilir (Şekil-5).



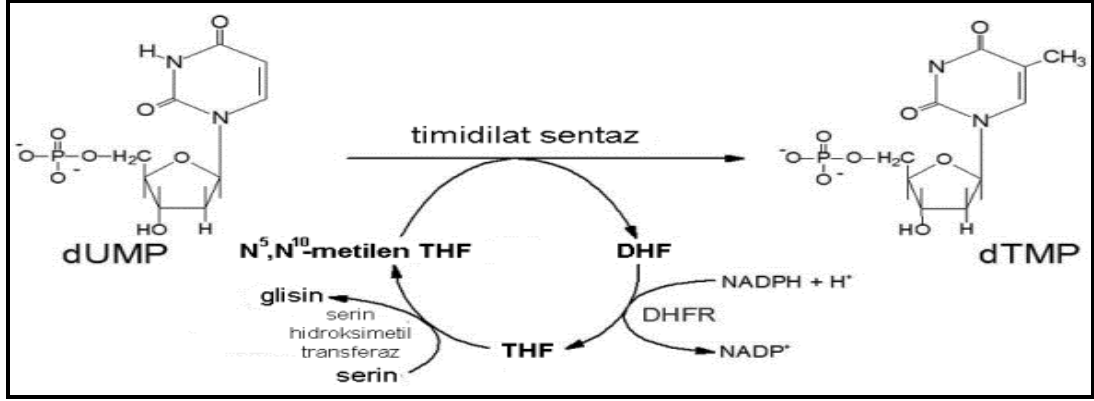
**Şekil-5:** UTP'den CTP sentezi.

Timin nükleotidleri DNA'nın yapısına katıldıklarından deoksi formunda sentezlenirler. Bu da ilk olarak UDP ya da sitidin difosfat'tan (CDP) dUMP'nin sentezlenmesini gerektirir (Şekil-6).



**Şekil-6:** dUMP sentezi.

Daha sonra dUMP timidilat sentaz enziminin katalizlediği bir reaksiyona dTMP'ye dönüştürülür. Sentez için gereken metil grubu N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilen tetrahidrofolat'tan alınır (Şekil-7).

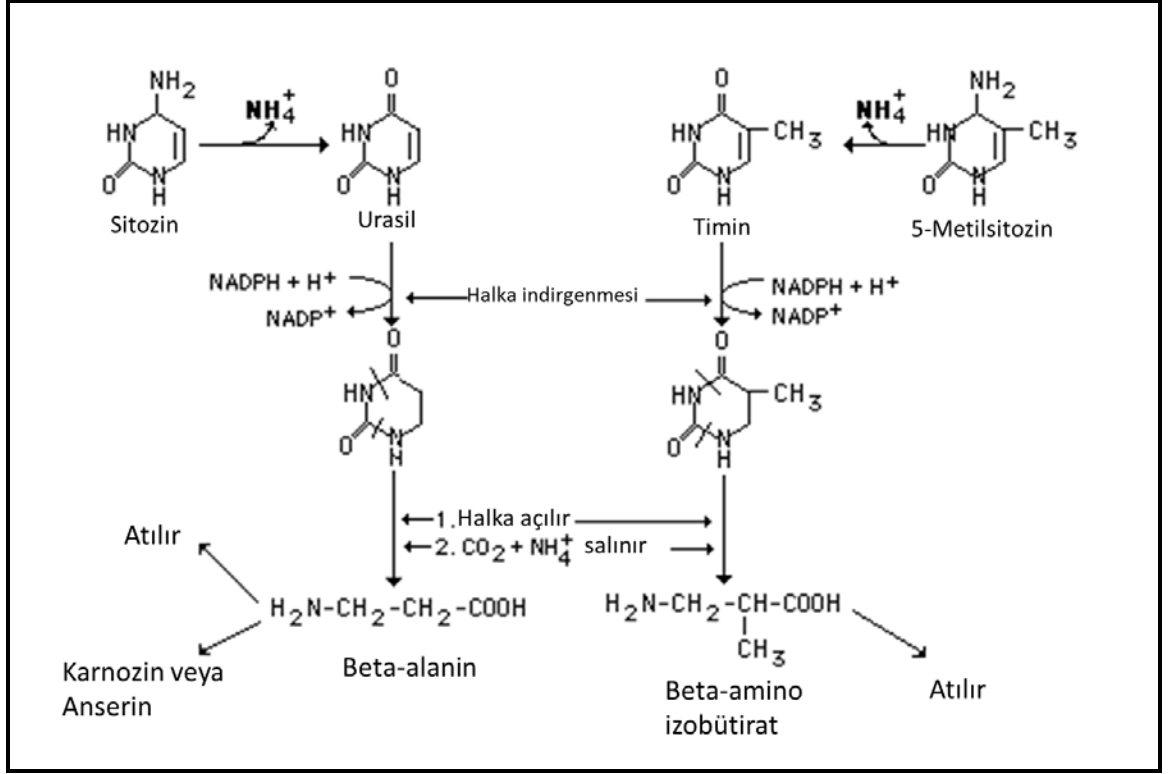


**Şekil-7:** dUMP'den dTMP sentezi.

### **I.B.b. Kurtarma Yolağı**

Pirimidin biyosentezinin *kurtarma yolağı* ise, hücre içi nükleotid havuzlarını yerine koymanın daha az enerji harcanarak yapılan yoludur (Şekil-8). *kurtarma yolağı* pirimidin nükleozidlerinin (üridin, sitidin, timidin) kandan dokulara alınması ve nükleotidlerin bu nükleozidlerden dokuda sentezlenmesini içerir. Özellikle merkezi sinir sistemi gibi *de novo sentezin* çok kısıtlı olduğu, ancak nükleotid ihtiyacının ise çok fazla olduğu (3) dokularda kandan alınan pirimidin nükleozidleri dokunun ana pirimidin kaynağını oluşturur. Üridin, insanlarda dolaşımdaki major pirimidindir ve plazma konsantrasyonları yaklaşık 3-5  $\mu\text{M}$ 'dir (4). Sıçanlarda sitidin'in kandaki seviyeleri üridinden yaklaşık 3 kat daha yüksektir (5), fakat üridin kan beyin bariyerinden daha etkin bir şekilde geçer (5).





**Şekil-9:** Pirimidin bileşiklerinin parçalanması.

#### I.D. Pirimidin Nükleotidlerin Biyokimyasal Aktiviteleri

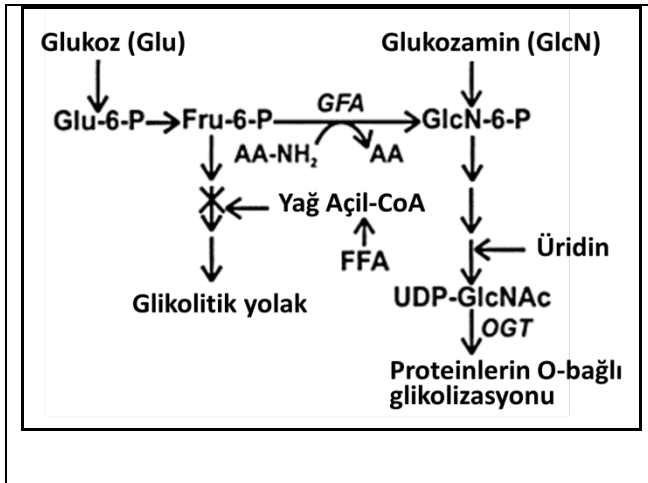
DNA ve RNA'nın yapı taşları olmalarının yanı sıra üridin nükleotidler hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması gibi fizyolojik olayları kontrol eden biyokimyasal yollarda merkezi role sahiptir.

##### I.D.a. Protein Glikozilasyon Reaksiyonları

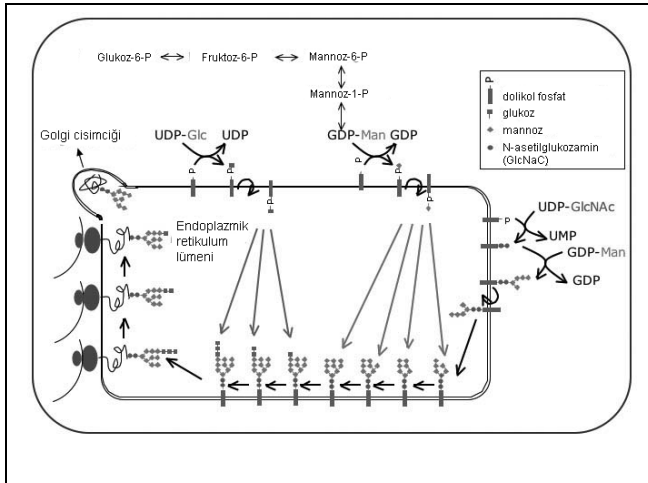
Basit veya kompleks şekerlerin proteine eklenmesidir. Glikoproteinlerde bulunan başlıca şekerler galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetilglukozamin, N-asetil galaktozamin ve N-asetil-nöroaminik asittir. Glikoprotein sentezinde kullanılan şekerler başlıca UDP'ye bağlanarak aktive edilir. Şekerler serin, treonin ve hidroksilizin kalıntılarına kovalent bağlanırlarsa O-glikoproteinler, asparjin kalıntılarına kovalent bağlanırlarsa N-glikoproteinler oluşur (6). O-Glikozilasyon, özgün glikozil transferaz enzimlerinin katalizi sayesinde nükleotide bağlı şekerin protein zincirine direkt olarak eklenmesiyle oluşurken (Şekil-10A), N-glikozilasyonun şeker kalıntısını nükleotid-şeker komplekslerinden alıp hedef proteine transfer eden dolikol fosfatlara ihtiyacı bulunmaktadır (6) (Şekil-10B). Bir diğer önemli glikozile



bileşik sınıfı ise glikozaminoglikanlardır (GAG). GAG'lar endoplazmik retikulumda sentezlenen bir protein kora urasil-şeker konjugatları tarafından taşınan karbonhidrat kalıntılarının eklenmesi ile oluşurlar ve hemen hemen tüm dokularda ekstrasellüler matriksin biyosentezinde rol alırlar (7). Glikozilasyon ve galaktozilasyon yollarındaki defektler kognitif bozukluklara ve hafıza kusurlarına neden olurlar (7).



**Şekil-10A:** Proteinlerin O-Glikozilasyonunda pirimidin nükleotidlerinin rolü.

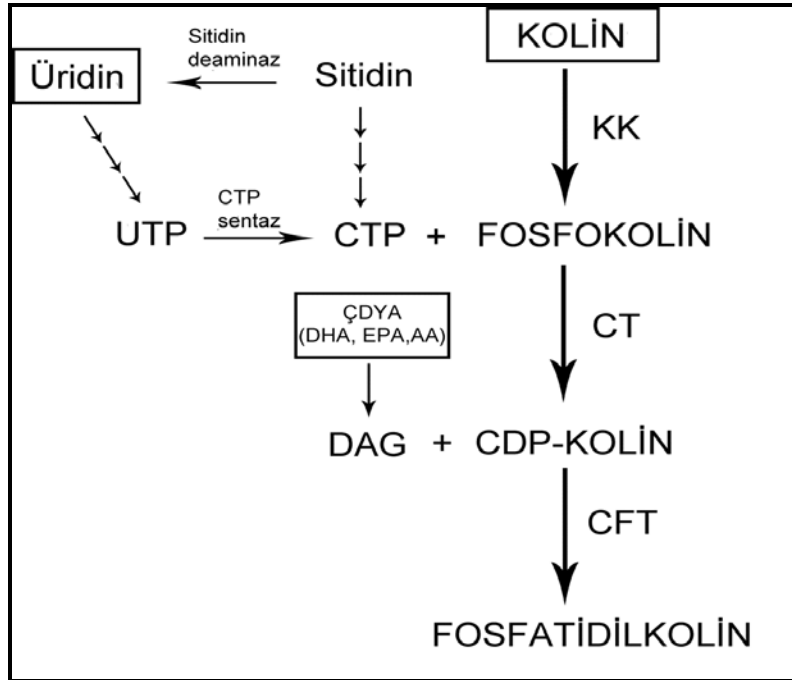


**Şekil-10B:** Proteinlerin N-Glikozilasyonunda pirimidin nükleotidlerinin rolü.

### I.D.b. Fosfolipid ve Glikosfingolipidlerin Sentezi

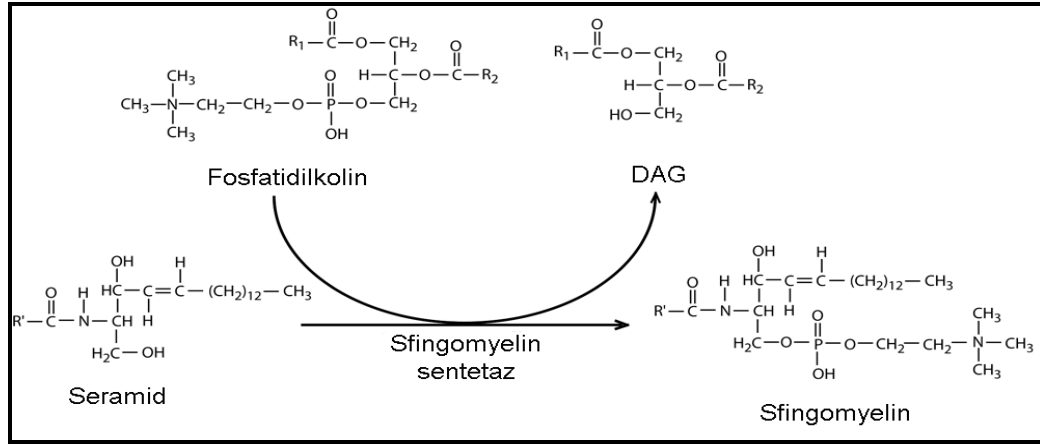
Hücre membranlarının temel bileşenleri fosfolipidlerdir ve fosfolipid miktarlarının korunması membran bütünlüğünün sağlanması ve optimal akışkanlığının belirlenmesinde hayati rol oynar.

Beyinde en bol bulunan fosfolipid olan fosfatidilkolin'in ve bir diğer temel fosfolipid olan fosfatidiletanolamin'in sentezi "Kennedy yolağı" adlı mekanizma üzerinden gerçekleşir (8) (Şekil-11). Molekülün amin kısmı (kolin veya etanolamin) diaçilgliserol'e (DAG) katılmadan önce CDP ile birleşerek aktive edilmelidir. Bu reaksiyon CDP-kolin veya CDP-etanolamin oluşumuna yol açar. Hücre içindeki CTP havuzu sitidin'in re-fosforilasyonundan ya da üridin'in metabolizmasından oluşabilir. Sitidin'e nazaran daha etkin bir şekilde kan beyin bariyerini geçebilen dolaşımdaki üridin, beyin dokusunda CTP sentezinin ana kaynağını oluşturur (5). Bunun bir sonucu olarak hücre içi UTP düzeyleri yeni sentezlenen fosfolipid miktarının temel belirleyicisidir (9).



**Şekil-11:** Kennedy yolağı üzerinden fosfolipid biyosentezi. (8) **KK:** kolin kinaz, **CT:** fosfokolin sitidil transferaz, **CFT:** kolinfosfotransferaz, **ÇDYA:** çoklu doymamış yağ asitleri, **DHA:** dokozahekzaenoik asit, **EPA:** eikozapentaenoik asit, **AA:** araşidonik asit.

Sadece proteinler değil lipidler de (örn., seramidler) endoplazmik retikulum lümeninde glikozile ve galaktozile edilebilirler (10). Seramidlerin galaktozilasyonunu myelinize hücreler ve spermatogonya gibi yüksek derecede özelleşmiş hücrelerde bulunan UDP-galaktoz:seramid galaktoziltransferaz (GalT-1) enzimi katalizler. Çeşitli şeker ve sialik asit kalıntılarının veya fosfatidilkolin'den serbestleşen kolin'in seramid'e bağlanmasıyla sırasıyla gangliozidler ve sfingomyelin (Şekil-12) sentezlenir (7). Bu kompleks moleküller plazma membranının dış tabakasının ve aksonları çevreleyen myelin kılıfın önemli bileşenleridir.

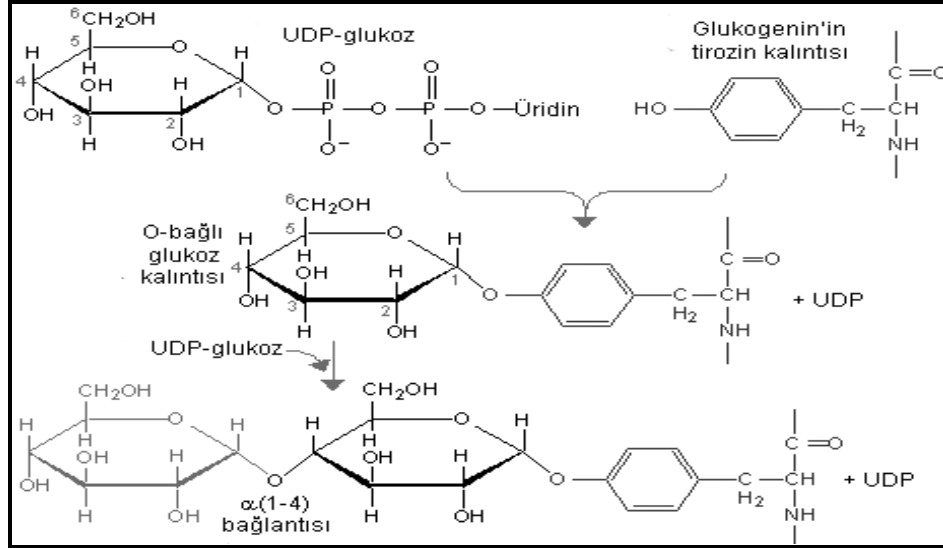


**Şekil-12:** Seramid'den sfingomyelin sentezi.

### I.D.c. Glikojen Sentezi

Glikojen vücudun ana glikoz depo formunu oluşturan bir polisakkariddir. Başlıca karaciğer ve kaslarda sentezlenir, ayrıca beyin, uterus ve diğer dokularda da sentezi mevcuttur. Glikojen molekülünün zincir uzaması her basamakta UDP-glukoz'dan gelen bir glukoz molekülünün eklenmesiyle gerçekleşir ve her reaksiyonda bir UDP molekülü salıverilir (11) (Şekil-13). Glikojen üretimini kontrol eden glikojen sentaz enziminin aktivitesi ve protein düzeyleri UTP ve glukoz bulunabilirliğine bağlı hücre içi UDP-glukoz düzeyleri tarafından düzenlenir. Hücre içi UTP konsantrasyonlarındaki bir azalma glikojen sentezini de azaltır ve bu durum kültür sıvısına üridin ilavesiyle düzeltilebilir (11). Ayrıca glukoz yoksunluğu hücre içi UDP-glukoz depolarının hızlıca boşalmasına yol açar: bu durum da glikojen sentaz

aktivitesini inhibe ederek glikojen sentaz mRNA'sını ve protein düzeylerini azaltır (12).



Şekil-13: Glikojen biyosentezi (11).

### I.E. Beyinde Pirimidin Bileşikleri

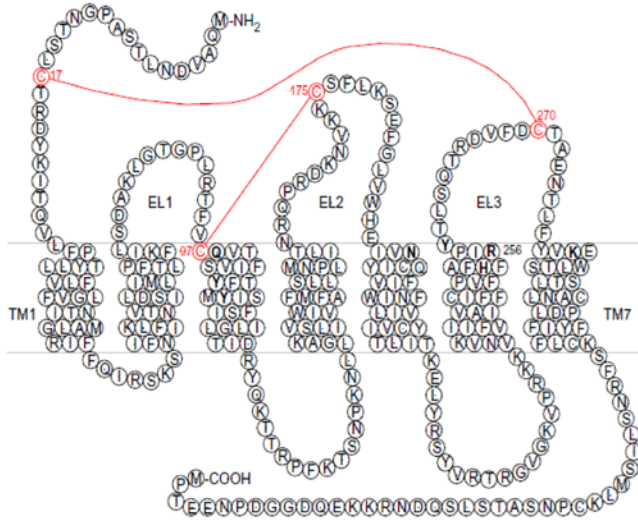
Beyinde *de novo* pirimidin sentezinin varlığı – karaciğere kıyasla daha düşük oranda olsa da – kanıtlanmıştır (13). Beyin pirimidin düzeylerinin ne kadarının *de novo* senteze bağımlı olduğu bilinmese de, dolaşımdaki sitidin ve üridin'in elektrofizyolojik aktivite, karbonhidrat ve fosfolipid içeriğinin sürekliliği için hayati olduğu bilinmektedir (3,14). Bu yüzden beyin dolaşımdaki pirimidinlere ihtiyacı bulunmaktadır ki bu da pirimidinlerin plazma konsantrasyonlarının ve taşıyıcı proteinlerinin beyin pirimidin düzeyini belirlemede önemli olduğunu düşündürmektedir. İnsanda dolaşımdaki baskın pirimidin üridin iken (15) sıçanlarda sitidin'dir (4). Deney hayvanlarında üridin ve sitidin'in plazma konsantrasyonlarını arttıran oral (9) veya parenteral (16) tedaviler bu pirimidinlerin beyin düzeylerini de arttırmaktadır.

Pirimidin nükleozidleri iki farklı taşıyıcı protein ailesi olan “Konsantre Edici Nükleozid Taşıyıcısı (Concentrative Nucleoside Transporter; CNT)” (17) ve “Dengeleyici Nükleozid Taşıyıcısı (Equilibrative Nucleoside Transporter; ENT)” (18) vasıtasıyla hücrelere alınırlar. CNT ailesi sodyum-bağımlı yüksek afiniteli taşımadan, ENT ailesi ise sodyumdan bağımsız

düşük afiniteli taşımadan sorumludurlar. Dışarıdan verilen pirimidin nükleotidleri fosfat gruplarını kaybederek kana üridin ve sitidin olarak geçerler (15). Üridin ve sitidin'in beyin hücrelerine alınması için önce kan-beyin bariyeri (KBB) üzerindeki taşıyıcılar aracılığıyla beyin ekstrasellüler sıvısına sonra da hücre zarındaki taşıyıcı proteinler tarafından hücre içine alınması gerekir. CNT ve ENT ailesinin üyeleri hem KBB hem de hücre zarları üzerinde bulunmaktadır (5). Bu sayede kanda bulunan serbest nükleozidlerin beyin hücrelerine alınması mümkün olmaktadır. Dışarıdan verilen sitidin ve üridin'in beyne geçmesi bu taşıyıcılar aracılığıyla olsa da, literatür bilgisi insanda fizyolojik koşullarda üridin'in sitidin'e göre daha kolay beyne geçiyor olabileceğine işaret etmektedir (5).

## **II. P2Y Reseptörleri**

Nükleotidlerin iki farklı (P2X ve P2Y) reseptör ailesini aktive ettikleri bilinmektedir. P2X reseptör ailesi iyonotropik reseptörlerdir ve sadece adenin nükleotidleri tarafından uyarılabilirler. P2Y ailesi ise G proteine bağlı reseptör ailesinin üyesidir ve merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere hemen hemen tüm dokularda bulunurlar. P2Y reseptörleri ligand olarak hem adenosin hem de üridin nükleotidlerini tanırlar (19). P2Y reseptörleri 7 hidrofobik transmembran bölge (TMs), 3 ekstrasellüler halka (ELs) ve 3 intrasellüler halka içerirler (Şekil-14). Reseptör proteinleri 328 (P2Y6) ila 377 (P2Y4) amino asit'ten oluşur, molekül ağırlıkları 41-53 kDA'dur.

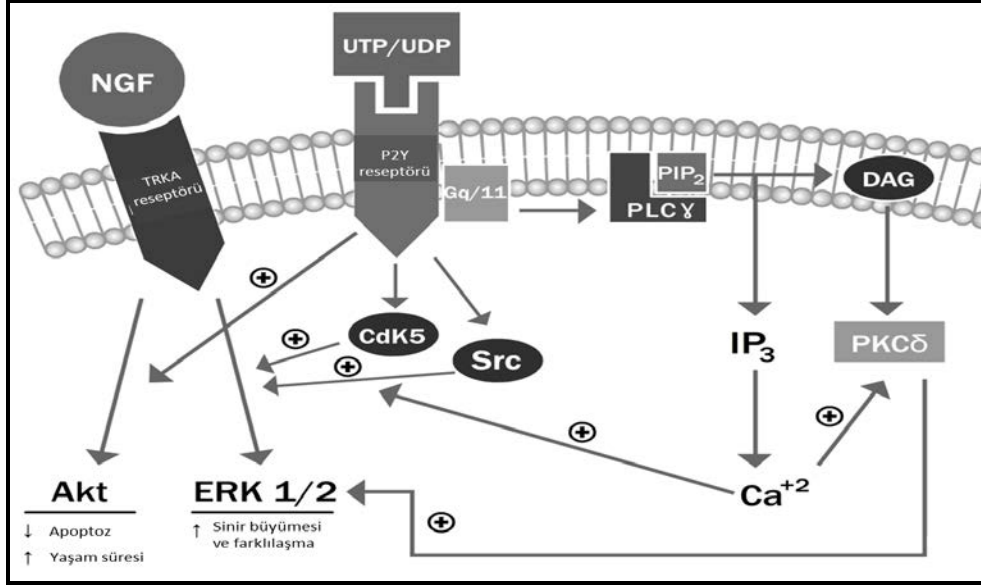


**Şekil-14:** P2Y reseptörlerine bir örnek olarak P2Y12 reseptörünün yapısı.

İnsanlarda bugüne kadar 8 adet P2Y reseptörü (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) tanımlanmıştır (20). P2Y1, P2Y11, P2Y12 ve P2Y13 reseptörleri adenin nükleotidlerine duyarlıdır, fakat üridin nükleotidlerini tanımazlar. P2Y2 ve P2Y4 reseptörleri ise hem ATP hem de UTP tarafından aktive edilebilir. Üridin nükleotidleri UTP, UDP ve UDP-glukoz hem periferik hem merkezi sinir sisteminde yaygın olarak ekprese edilen P2Y2, P2Y4, P2Y6 ve P2Y14 reseptör alt tiplerini aktive edebilirler (20). P2Y2, P2Y4, ve P2Y6 reseptörleri UDP ve UTP tarafından aktive edilirler. Uyarıldıklarında Gq proteinler üzerinden fosfolipaz C aktive olur, hücre içi DAG, inositol trisfosfat (IP3) ve takiben kalsiyum artışı meydana gelir (21,22). P2Y14 reseptörleri selektif olarak UDP-glukoz ve diğer UDP-şekerler tarafından uyarılırlar (23). Uyarıldıklarında Gi proteinler üzerinden adenilat siklaz aktivitesini inhibe ederek hücre içi siklik AMP (sAMP) düzeylerini azaltırlar (23). Üridin nükleotidleri için yeni bir reseptör olan GPR17 beyin, kalp ve böbrekte yaygın olarak bulunur ve UDP, UDP-glukoz ve UDP-galaktoz tarafından aktive edilir (24). Gi proteinler üzerinden etki eden bu reseptör ayrıca araşidonik asit metabolizmasından elde edilen pro-inflamatuar moleküller olan sisteinil-lökotrienler tarafından aktive edilebilir (24,25).

Merkezi sinir sisteminin çeşitli fonksiyonlarında P2Y reseptörlerinin katılımı olduğu bugüne kadar yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda

kanıtlanmıştır. P2Y reseptör uyarımı sinir hücrelerinin proliferasyon, farklılaşma ve büyümesinde görevlidir. P2Y reseptörlerinin nöronal büyüme ile ilişkisi PC12 hücrelerinde (26,27), insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde (28), dorsal kök ganglion hücrelerinde (26,29) ve fare siyatik sinirinde (26) gösterilmiştir. P2Y reseptör uyarımı ayrıca hücreler arası sinyal iletimi, nörotransmisyon ve uzun-sürelili potansiyalizasyonda (long-term potentiation [LTP]) rol alır. Üridin nükleotidleriyle uyarılan P2Y reseptörlerinin, nöradrenalin, glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımına (30,31) ve uzun süreli potansiyalizasyona (LTP) (32) aracılık ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Buna ilaveten P2Y reseptörlerinin uyarılmasının nöroproteksiyon ve hücre yaşam süresinin uzatılmasında (survival) rol oynadığı gösterilmiştir. UDP verilmesiyle sıçan mikrogial hücrelerinin morfolojisinde aktin reorganizasyonu ile hızlı bir değişim olduğu ve güçlü bir fagositoz başladığı gösterilmiştir (33). Ayrıca, üridin nükleotidlerinin beyin hasarına cevap olarak, reaktif astrogliozis sürecini başlatarak sağlıklı ve hasarlı doku arasında bir bariyer formu oluşturduğu bulunmuştur (34). Üridin nükleotidleri P2Y reseptörlerini aktive ederek bcl-2 ve bcl-xl gibi anti-apoptotik genleri uyarmak ve bax gibi pro-apoptotik genleri baskılamak suretiyle apoptozu baskırlar (35). Üridin nükleotidleri tarafından uyarılan P2Y2, P2Y4, P2Y6 ve P2Y14 reseptörlerinin beyinde görev aldığı fizyopatolojik olaylar ve moleküler mekanizmalar bu şekilde özetlenebilirken (36) (Şekil-15) bugün için beyin fonksiyonlarında GPR17 reseptörlerinin görevleri henüz bilinmemektedir.



**Şekil-15:** P2Y reseptör uyarımının etkileri. **NGF:** sinir büyüme faktörü, **PIP<sub>2</sub>:** fosfatidilinositol bisfosfat, **PLCγ:** fosfolipaz C gama, **PKCδ:** protein kinaz C delta.

## II.A. Pirimidinlerin Ekstrasellüler Ortamdaki Varlığı

Nükleotidlerin sadece hücre içinde değil hücre dışında da bulunabileceği görüşü yaklaşık 40 yıl önce ortaya atılmıştır. 1970'li yıllarda ATP'nin klasik nörotransmitterlerle birlikte depolanıp salıverilebileceğine dair bulgular (37) "pürinerjik transmisyon" kavramının ortaya atılmasına yol açmıştır (38). Aynı kavram daha sonra pirimidinler için de gündeme gelmiştir. Beyinde pirimidin nükleotidlerine duyarlı P2Y reseptörlerinin tanımlanması (20) ve bu nükleotidlerin kültürdeki glial hücrelerden salıverildiklerinin gösterilmesi (39) pirimidin nükleotidlerinin ekstrasellüler sinyal molekülleri olduğuna ve merkezi sinir sisteminde "pirimidinerjik transmisyon" katıldıklarına işaret eder.

Ekstrasellüler sıvıdaki pirimidin nükleotid miktarları trombosit, lökosit, solunum epiteli ve glial hücre kültürlerinde (40) ölçülmüştür. İlaveten, beyin ekstrasellüler sıvısındaki üridin ve sitidin düzeyleri de in vivo mikrodiyaliz yöntemiyle belirlenmiştir (41-43).

Bütün bu bilinenlere rağmen in vivo şartlarda beyin ekstrasellüler sıvısındaki üridin nükleotid düzeyleri hakkında literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca in vitro ya da in vivo şartlarda dışarıdan üridin



verilmesinin beyin ekstrasellüler sıvısında üridin ve üridin nükleotidlerinin düzeylerine etkileri henüz araştırılmamıştır. Çalışmamızda, literatürdeki bu eksiklikleri gidererek hem in vivo bazal koşullardaki üridin nükleotid düzeylerini belirledik, hem de dışarıdan verilen üridin'in beyin ekstrasellüler sıvısına üridin nükleotidlerinin salıverilmesine ve dolayısıyla pirimidinerjik transmisyona katkısını araştırdık.

### **III. Üridin'in Kolinerjik Nörotransmisyon Üzerine Etkileri**

Üridin nükleotidleri P2Y reseptörleri aracılığıyla beyindeki birtakım fonksiyonlara aracılık ederken aynı zamanda çeşitli nörotransmitter sistemleri ile etkileşimler gösteriyor olabilir.

Asetilkolin, merkezi ve periferik sinir sisteminde nikotinik ve muskarinik reseptörleri aracılığıyla etki gösteren bir nörotransmitterdir (44). Periferde çizgili kas kasılmasını stimüle eder. Aynı zamanda otonom sinir sisteminin parasempatik kısmının nörotransmitteridir. Merkezi sinir sisteminde plastisite ve uyarılabilirlik gibi nöromodulator fonksiyonları bulunur. Özellikle öğrenme ve kısa süreli hafızanın oluşmasında görevlidir (45). Asetilkolin, kolin asetiltransferaz enzimi katalizörlüğünde ön maddesi olan kolin'den sentezlenir ve sinaptik aralıkta asetilkolin esteraz enzimi ile derhal yıkıma uğratarak görevine son verilir. Sinaptik aralıkta bulunan asetilkolin miktarının artırılması Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan stratejilerden bir tanesi ve en önemlisidir. Çünkü Alzheimer hastalığında kolinerjik nörotransmisyon azalmış bulunmaktadır (46). Bu amaçla günümüzde en yaygın olarak kullanılan Alzheimer ilaçları donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi asetilkolin esteraz enzim inhibitörleridir. Sinir uçlarından asetilkolin salıverilmesinin artırılması da sinaptik aralıkta bulunan asetilkolin miktarını artıracak mekanizmalardan bir tanesidir (47). Bu mekanizmayı harekete geçirecek bileşikler ileride Alzheimer hastalığının tedavisi için bir seçenek olabilirler. Dışarıdan verilen kolin'in beyinde asetilkolin sentez ve salıverilmesini artırdığı Prof. Dr. Richard Wurtman'ın laboratuvarındaki çalışmalarda gösterilmiştir (47,48). Ancak kolin'in

Alzheimer hastalığında bir tedavi ajanı olarak kullanımı kabul görmemiştir. Pürin bileşiklerinin fare nöromuskuler kavşağında muhtemelen P2Y12 ve P2Y13 reseptörleri aracılığıyla asetilkolin salıverilmesini azalttığı gösterilmiştir (49). Henüz reseptör sınıflamasının tam olmadığı eski yıllarda yapılan bazı çalışmalarda da ATP'nin çeşitli in vitro preparasyonlarda asetilkolin salıverilmesini değiştirdiği bildirilmiştir (50). Bir pirimidin nükleotidi ve üridin kaynağı olan UMP'nin kronik olarak oral yolla verilmesinin yaşlı sıçanların striatum'unda asetilkolin sentez ve salıverilmesini artırdığı yakın zamanda gösterilmiştir (51). Bu çalışmada kolinerjik nörotransmisyon artışının muhtemel mekanizması olarak üridin'in "Kennedy yolağı" aracılığıyla beyin membran sentezini artırması gösterilmiş ancak akut olarak verilen çeşitli pirimidin bileşiklerinin kolinerjik transmisyona etkileri ve etkide reseptör aracılığı incelenmemiştir (51). Yakın zamanlı diğer araştırmalarda Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvısında üridin konsantrasyonlarının yaş-uyumlu normal bireylere göre daha düşük olduğunun (52) ve beyin korteksinde P2Y2 reseptör düzeylerinin azalmasının Alzheimer hastalığının nöropatolojisi ile ilişkili olduğunun (53) gösterilmesiyle, Alzheimer hastalığının tedavisinde yeni anlayışları ortaya çıkarabilme potansiyeli olan pirimidinerjik (nöro)transmisyonun in vivo şartlarda detaylı olarak karakterize edilme gereksinimini daha da arttırmıştır.

Bu sonuçlar ışığında çalışmamızın, pirimidinerjik (nöro)transmisyonun varlığının kanıtlanması anlamında bilimsel literatüre katkıda bulunacağını ve etiyopatogenezinde kolinerjik nörotransmisyon azalması bulunan Alzheimer hastalığı gibi bazı beyin hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımlara yol göstereceğini düşünüyoruz.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen yaklaşık 300-350 g ağırlığında Sprague-Dawley türü erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, deney öncesinde 4'lü gruplar halinde tutuldu ve su ve yem alımları serbest bırakıldı. Sıçanların bulunduğu ortamın ısı 20-24°C olacak şekilde sabitlendi ve oda 12 saat aydınlık-12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) döngüsüyle aydınlatıldı. Tüm deneyler Amerikan National Institutes of Health (NIH) tarafından yayımlanmış "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" adlı kılavuzun önerileri doğrultusunda yapıldı.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 2011-11/07).

### I. Cerrahi İşlemler

#### I.A. Periton Kanülü Yerleştirilmesi

İn vivo mikrodializ deneyleri için, ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi altına alınan sıçanlara önce periton kanülü yerleştirildi. Bu işlem için karın boşluğunun sol orta kısmına (karaciğere hasar vermemek için) çapı kalın bir enjektör iğnesi (18G) batırıldı, polietilen bir kanül (PE50) bu iğnenin içinden geçirilerek periton boşluğuna doğru ilerletildi ve karın duvarına dikilerek sabitlendi.

#### I.B. Mikrodializ Probu Yerleştirilmesi

İn vivo mikrodializ deneyleri için, ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi altına alınan sıçanın kafa derisi traşlandı ve sıçan stereotaksik alete yerleştirildi (Şekil-16). Cerrahi işlem yapılacak bölgede sıçanların kafasına orta hattan cilt ve cilt altı dokular geçilerek 2 cm'lik insizyon açıldı. Bu bölgede kanama kontrol altına alındı ve fasyalar uzaklaştırılarak bregma görünür hale getirildi. Takiben bregma noktası referans alınarak sol striatum'un koordinatları (Paxinos ve Watson sıçan

beyin atlasına göre ön-Arka: +1 mm; yan: +2.8 mm; vertikal: -6 mm) hesaplandı ve bu koordinatlara uyan noktada kafatası üzeri işaretlendi. Bu noktalardan küçük el matkabı yardımı ile beyne hasar vermeksizin delik açıldı. El yapımı mikrodializ probu stereotaksik alet üzerine yerleştirilerek çok yavaş bir hızla bu açılan delikten geçirilerek, diyaliz edilecek striatum'a kadar ilerletildi. Bu yerleştirme sonrası probun kafatasının üstünde kalan kısmı dişçi akriliği (Zinc polycarboxylate cement, Adhesor Carbofine, Spofa Dental a.s., Praha) ile kafatasına sabitlendi. Akriliğin kuruması beklenip diyaliz probunun stereotaksik alet ile olan bağlantısı kesildi ve sıçan stereotaksik alet üzerinden kaldırılarak tek başına bir kafese yerleştirildi ve cerrahinin etkilerinin geçmesi için bir gün dinlendirildi.



**Şekil-16:** Sıçanın stereotaksik alete yerleştirilmiş hali. Bregma noktasının bulunup striatum koordinatlarının hesaplanması, mikrodializ probunun yerleştirilmesi.

### **I.C. İntraserebroventriküler (i.s.v) Kanül Yerleştirilmesi**

Pirimidinerjik aktivasyon ile kolinerjik nörotransmisyonun arttığını tespit ettiğimiz deneylerin devamında bu etkinin mekanizmasını araştırmak için P2Y reseptör blokajı yapmak amacı ile anestezi altında striatal mikrodializ probu yerleştirilen sıçanlara ilaveten sağ lateral ventriküle

(Paxinos ve Watson sıçan beyin atlasına göre ön-Arka: -1 mm; yan: -1,5 mm; vertikal: -4 mm) el yapımı enjeksiyon kanülü yerleştirildi.

#### **I.D. Kan ve Doku Örneği Eldesi**

Ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi altına alınan sıçanlardan serum pirimidin konsantrasyonlarının analizi için bazal durumda (0. saat) ve i.p. üridin (0,1-1 mmol/kg) enjeksiyonundan 1, 2, 4 ve 8 saat sonra 22G enjektör iğnesi yardımıyla kardiyak ponksiyon yapılarak 200 µL kan örneği alındı. Kan örnekleri vakit kaybetmeden 4°C'de 10,000 G hızında santrüfuj edilerek serumları ayrıldı; bu serumlar donduruldu ve analiz edilene kadar -20°C'de saklandı. Sonrasında sıçanların kafaları sıvı azota daldırıldı ve kafatasları açıldı.

Nükleotidler dekapitasyonu takiben beyin örneği elde edilene kadar geçen süre içinde parçalandığından (54), daha önce tarif edilen ve "in vivo dondurma" (9,55) adlı bir yöntem kullanılarak nükleotidlerin bozunmasını önlemek suretiyle beyin dokuları elde edildi. Buna göre, kardiyak ponksiyonla kan örneği eldesinin hemen ardından anestezi altındaki sıçanların kafa derilerinde bir insizyon açılarak kafatası görünür hale getirildi ve sıçanların kafaları 45 saniye boyunca sıvı azota daldırıldı. Beyin dokusundan örnek almak amacıyla donmuş kafatasından 1 cm çapında bir kemik parçası bir doku homojenizatörü (Polytron PT 10–35, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) yardımıyla kaldırıldı. Bu homojenizatörün özelliği homojenizatörün şaftından 4 mm dışarı uzanan ve birbirinden 1.1 cm mesafede bulunan iki keskin bıçağa sahip olmasıdır. Yüksek hızda çalıştırıldığında homojenizatörün bıçakları kafatasından 1 cm çapında dairesel bir parça kesilmesini sağlamaktadır. Dairesel kemik parçası kaldırıldığında korteks tabakasından bir parça donmuş beyin dokusu örneği bistüri ucu yardımıyla elde edildi.

İn vivo dondurma yöntemiyle elde edilen beyin dokusu örnekleri yine aynı doku homojenizatörü (Polytron PT 10–35, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) kullanılarak PSB069 (10 µM) içeren soğuk deiyonize suda homojenize edildi.

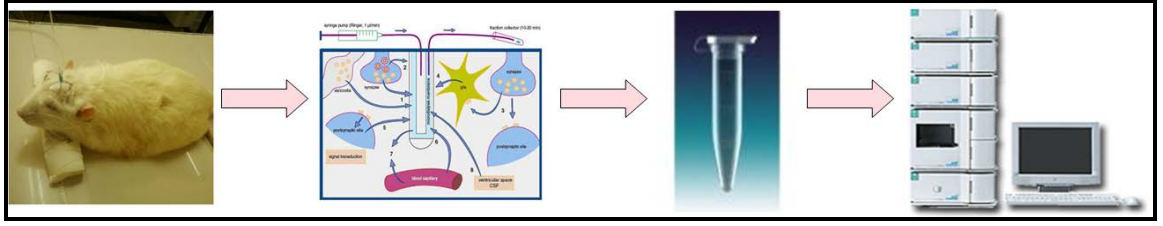
Serum örnekleri ve beyin dokusu homojenatları %80'lik metanol çözeltisi ile ekstrakte edildi, liyofilizatörde kurutuldu ve küçük hacimlerde deiyonize su ile sulandırıldı ve HPLC'ye enjekte edilerek analiz edildi. Üridin ve üridin nükleotidlerin dokudaki seviyeleri mg doku başına pikomol olarak ifade edildi.

## **II. Mikrodiyaliz**

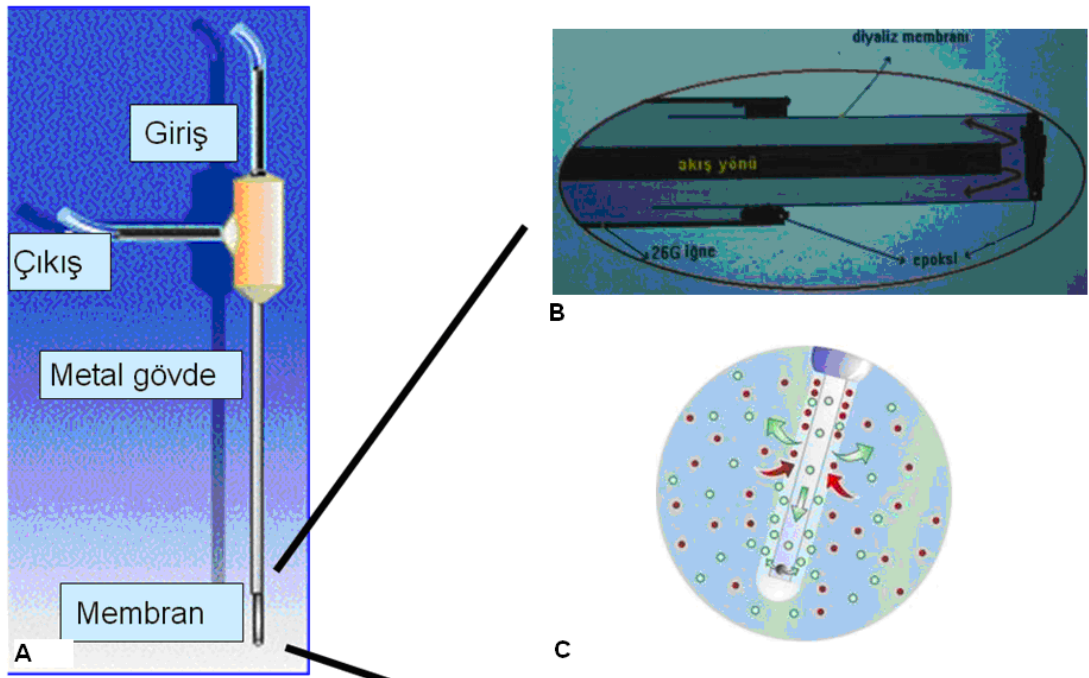
Mikrodiyaliz yöntemi kullanılarak beynin ve diğer bazı organların çeşitli bölgelerinde ekstrasellüler ortamdaki endojen madde miktarları ölçülebilir. Mikrodiyaliz prensip olarak basit difüzyon kuralına dayanan bir yöntemdir. Basit difüzyonda sıvı içindeki çözünmüş maddelerin yarı geçirgen bir zardan çok yoğun oldukları ortamdaki, az yoğun oldukları ortama geçmeleri söz konusudur. İn vivo beyin mikrodiyalizinde, beyinde bulunan ancak kullanılan diyaliz sıvısında olmayan maddeler yarı geçirgen membranı difüzyon ile geçerek toplanan örnekler (diyalizat) geçerler. Elde edilen örneklerde ölçülmek istenen endojen moleküller HPLC ve kapiller elektroforez gibi hassas ölçüm sistemleri kullanılarak değerlendirilir. Sistemik ilaç verilmesi veya diyaliz sıvısına ilaç eklenmesi sonrası, incelenen beyin bölgesindeki nörotransmitter ve metabolitleri üzerindeki etkileri gözlenebilir (56).

Çalışmalarımızda kullandığımız in vivo beyin mikrodiyalizi yöntemi ile ekstrasellüler sıvı örneği eldesi ve analizi şematik olarak Şekil 17'de gösterilmiştir.

İN vivo beyin mikrodiyalizi için bölümümüzde geliştirilen ve kendi yaptığımız problemler (Şekil-18) kullanıldı. Mikrodiyaliz problemleri PPD iğne uçları (26 G), kapiller boru (OD 165, ID 99, Polymicro), epoksi yapıştırıcı ve plastik çubuklardan imal edildi.



**Şekil-17:** İn vivo beyin mikrodializi ile ekstrasellüler sıvı örneği eldesi ve analizinin şematik gösterimi.



**Şekil-18:** (A) Diyaliz probunun şematik gösterimi. (B-C) Kapiller ve membran arasından sıvının geçişi ve diyalizatın toplanması.

İn vivo mikrodializ deneyleri anestezi etkilerini önlemek amacıyla cerrahiden 24 saat sonra gerçekleştirildi. Deney günü kafesinden alınan sıçanlar deney yapılacak laboratuvara getirilip ortama adaptasyon için herhangi bir işlem yapılmadan 1 saat beklendi. Bu saatin sonunda sıçanın sol striatum bölgesine implante edilen diyaliz probuna giriş kanülü takılıp hazırlanan Krebs solüsyonu (148 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) ile 2 µl/dk hızında diyaliz yapıldı.

Krebs solusyonuna ayrıca seçici olmayan bir nükleozid trifosfat difosfohidrolaz (NTPDaz) inhibitörü olan PSB069 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) maddesi eklendi. Bu madde NTPDaz 1, 2, ve 3'ü benzer poteste inhibe ederek nükleotidlerde bulunan fosfat gruplarının parçalanmasını önlemektedir (57).

### **III. Deney Planı**

#### **III.A. Beyin Üridin ve Üridin Nükleotid Düzeylerinin İncelenmesi**

Örnek toplama 30 dakikalık periyotlarda yapıldı ve her örnek 60 µL hacim içinde toplandı (2 µL /dk x 30 dk = 60 µL). İlk 90 dakika boyunca sıçana herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadan bazal koşullardaki örnekler toplandı. Böylece ilk 3 örnek bazal koşullarda elde edilmiş oldu. Üçüncü örneğin toplanmasının ardından periton kanülü yoluyla i.p. üridin (0.1, 0.5 ve 1 mmol/kg) enjeksiyonu yapıldı. Takiben beyin ekstrasellüler sıvısı örnekleri toplanmaya devam edildi ve deney başlangıcından itibaren 6.5 saatin sonunda örnek toplamaya son verildi.

#### **III.B. Beyin Üridin ve Üridin Nükleotid Düzeylerine Potasyum Depolarizasyonunun Etkilerinin İncelenmesi**

İn vivo mikrodializ ile ekstrasellüler alandaki pirimidin nükleotidlerinin salınımı üzerine yüksek potasyum seviyelerinin etkisini incelemek için perfüzyon sıvısına yüksek konsantrasyonda potasyum klorür (KCl) eklendi. Potasyum depolarizasyonu yapılan deneylerde ilk üç bazal örneğin toplanmasını takiben perfüzyon sıvısı değiştirildi ve 52 mM konsantrasyonda KCl içeren yeni perfüzetle 2 saat boyunca mikrodializ örneği toplandı. Krebsin osmolaritesini ayarlamak için eklenen KCl'ye ekimolar NaCl azaltıldı. Takiben perfüzyon sıvısı yine değiştirildi ve normal (3 mM) KCl içeren perfüzet ile deney sonuna kadar diyaliz örneği toplandı.

#### **III.C. Pirimidinerjik Transmisyon Artışının Kolinerjik Nörotransmisyon Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Pirimidinerjik transmisyon artışının diğer nörotransmitter sistemleri ile etkileşimini araştırmak amacıyla yapılan in vivo deneylerde perfüzyon



sıvısına 10µM eserin (fizostigmin, kolinesteraz inhibitörü) eklendi. İlk üç bazal örneğin toplanmasını takiben pirimidinerjik transmisyonu arttırdığını belirlediğimiz en yüksek üridin dozu (1 mmol/kg) i.p. yoldan enjekte edildi ve yine 2 µl/dk perfüzyon hızı altında her 30 dakikada bir mikrodializ örneği toplanarak ekstrasellüler asetilkolin konsantrasyonları analiz edildi.

### **III.D. Kolinerjik Nörotransmisyon Artışının Mekanizmalarının Araştırılması**

Pirimidinerjik aktivasyon ile kolinerjik nörotransmisyonun arttığını tespit ettiğimiz deneylerin devamında bu etkinin mekanizmasını araştırmak için P2Y reseptör blokajı yapıldı. Bu amaçla anestezi altında striatal mikrodializ probu yerleştirilen sıçanlara ilaveten intraserebroventriküler (i.s.v.) enjeksiyon kanülü yerleştirildi. Antagonist deneylerinde üçüncü bazal mikrodializ örneğinin toplanmasından (ve i.p. üridin enjeksiyonundan) 15 dakika önce seçici olmayan bir P2 reseptör antagonisti olan Suramin (1 µM) i.s.v. yoldan 10 µl Krebs içinde yavaşça enjekte edildi.

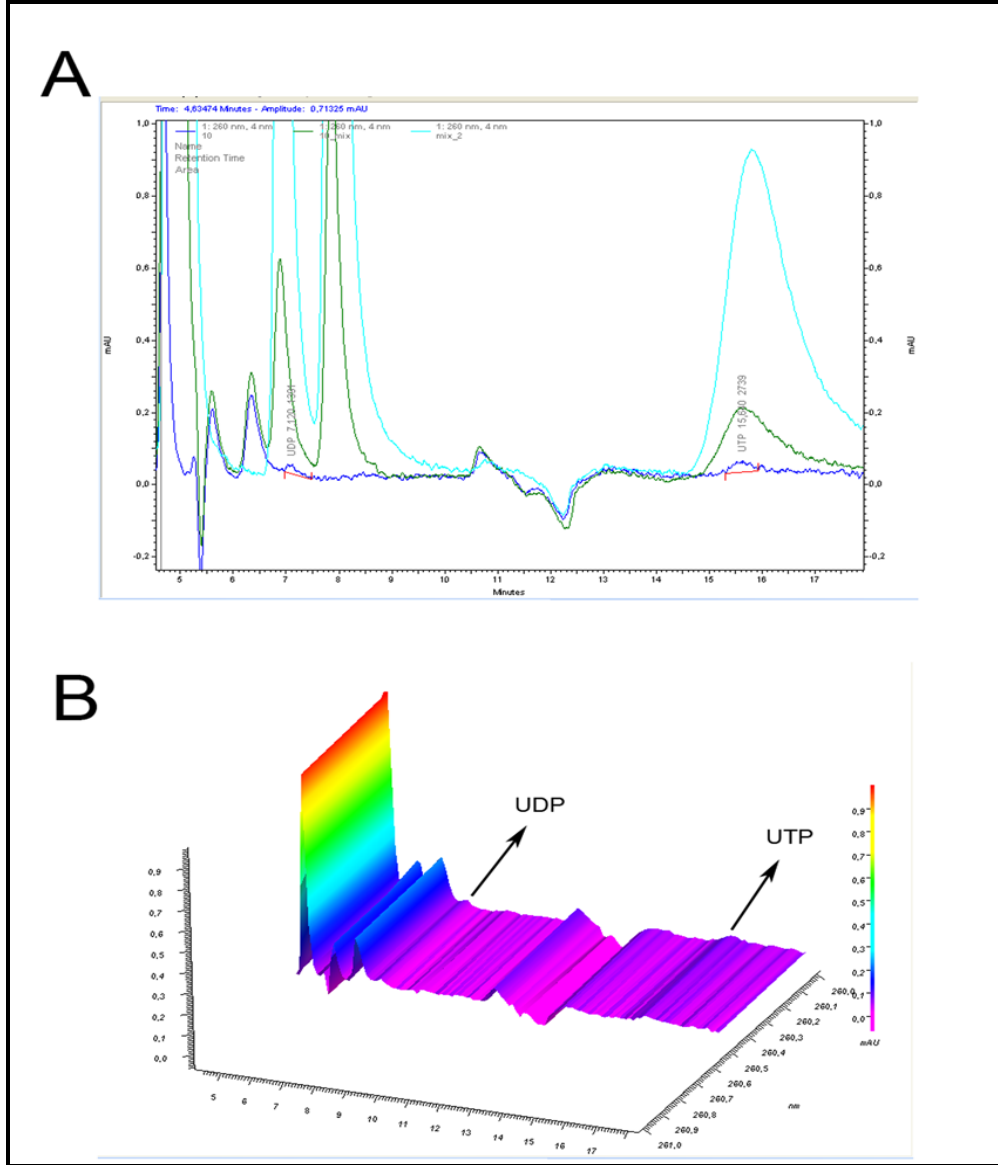
## **IV. HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Analizleri**

### **IV.A. Üridin ve Üridin Nükleotidlerin Analizi**

Serum ve beyin doku örneklerinde üridin ve üridin nükleotidleri HPLC (Hitachi, Tokyo, Japonya) kullanılarak analiz edildi. Analizlerde diode array dedektör ve koruyucu kolon (Supelco Discovery HS C18 Supelguard, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). bağlı ters faz kolon (Thermo Scientific Hypersil ODS, 5µm, 150mmx4,6mm I.D) kullanıldı. Serum ve beyinde üridin %0.1 metanol içeren 4 mM' lik K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mobil fazı ile pH: 5.8 de 1ml/dk akış hızında ayrıştırıldı. 260 nm dalga boyunda diode array dedektör ile ölçüldü ve standartların yerine göre tanımlandı.

Primidin nükleotidleri UDP ve UTP ise koruyucu kolon bağlı (Partisil SAX 7.5x 4.6 mm, Alltech, Deerfield, IL, USA) kuvvetli anyon değiştirici kolon (Macherey-Nagel Nucleosil SB 5µm, 150mmx4,6mm I.D) kullanılarak 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren mobil fazı ile pH 2.8 de, 1ml/dk akış hızında ayrıştırıldı.

Pikler 260 nm dalga boyunda diode array dedektör ile ölçüldü ve standartların yerine göre tanımlandı. Pirimidin nükleotidlerinin in vivo mikrodializ örneğinde tespitine dair temsili kromatogram ve diode array dedektör görüntüsü Şekil 19'da, laboratuvarımızda kullandığımız HPLC cihazı ise Şekil 20'de sunulmuştur.



**Şekil-19:** İn vivo mikrodializ örneğine pirimidin nükleotidlerin analizi. Pirimidin nükleotidlerinin in vivo mikrodializ örneklerinde tespitine dair temsili bir kromatogram (A) ve diode array dedektör görüntüsü (B). Yukarıdaki kromatogramda bazal örnekler mavi ile, standart eklenmiş örnekler yeşil ile ve sadece standartlar turkuaz ile boyanmıştır.

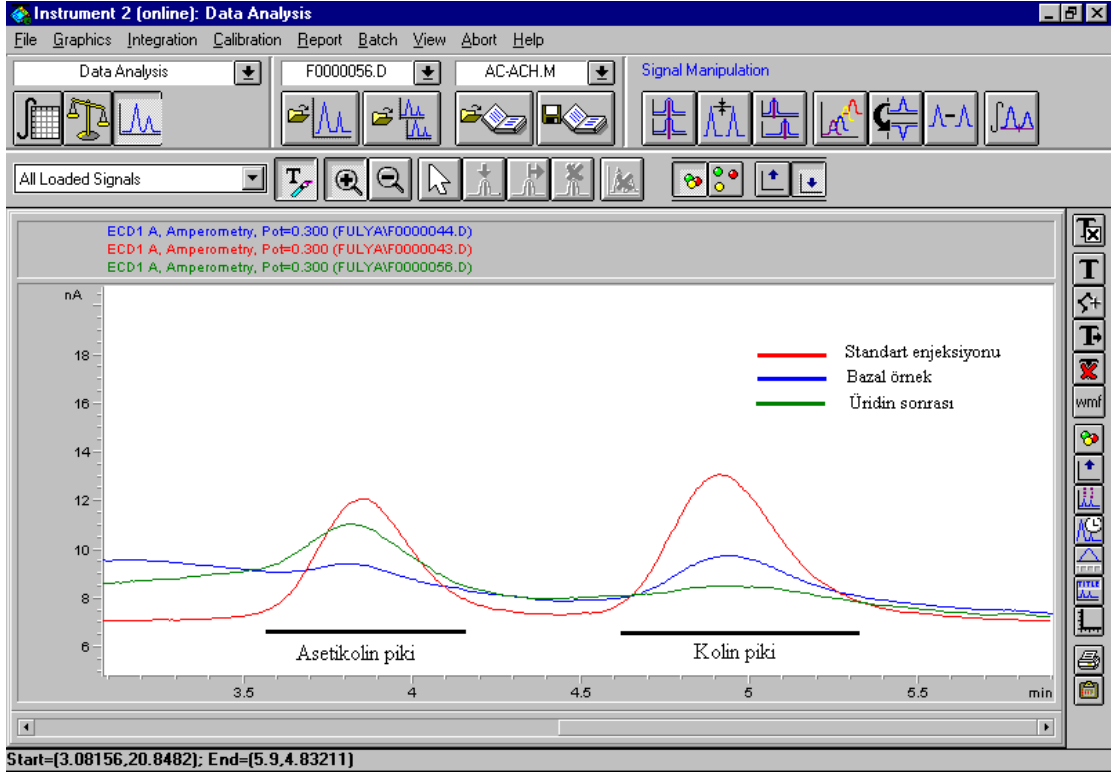
Beyin ekstrasellüler üridin konsantrasyonlarının düşük mikromolar seviyelerde olduğu rapor edilmiştir (41) ve muhtemelen ekstrasellüler üridin nükleotid konsantrasyonları daha da düşüktür. Bu yüzden çalışmada üridin ve üridin nükleotid piklerini mikrodiyalizatlara bilinen miktarlarda standart ekleyerek tanımladık. Her bir mikrodiyaliz örneğinin 20 mikrolitresi üridin ve üridin nükleotidlerin analizi için enjekte edildi. Ayrıca 20 µl örnek içine 10 pmol üridin ve üridin nükleotidlerin standartları eklenerek HPLC'ye enjekte edildi. Bu metod ile üridin ve üridin nükleotidlerin pikleri güvenilir bir şekilde belirlenmiştir.



**Şekil-20:** Laboratuvarımızdaki HPLC sistemi.

#### **IV.B. Asetilkolin ve Kolin Analizi**

Asetilkolin ve kolin HPLC (Hitachi, Tokyo, Japonya) kullanılarak analiz edildi. Analizlerde birbiri ardına bağlanmış bir enzimatik kolon ve bir katyon değiştirici kolonu içeren kolon sistemi kullanıldı. 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> içeren mobil faz (pH 8.5) kullanıldı. Pikler Elektrokimyasal (EC) dedektör ile ölçüldü. İn vivo mikrodiyaliz örneğinde asetilkolin ve kolin analizlerine ait temsili kromatogram Şekil 21'de sunulmuştur.



**Şekil-21:** Asetilkolin ve kolin temsili HPLC kromatogramı.

## V. Kit Analizleri

### V.A. Diaçilgliserol (DAG)

Beyin dokusunda DAG düzeylerinin analizi ticari bir ELISA kiti (Cusabio, Hubei Province, China) kullanılarak yapıldı. Kitin analiz prensibi beyin dokusu örneklerinde bulunan DAG moleküllerinin önceden DAG'a özgün antikorlarla kaplanan 96 kuyucuklu plate'de bulunan kuyucuklara tutunmasıdır. Daha sonra kuyucuklara eklenen biyotin-konjuge DAG antikoru doku örneklerindeki DAG'a tutunur. Bu kompleksin üzerine eklenen avidin-konjuge Horseradish Peroxidase (HRP) de substrat solüsyonu ile renk reaksiyonu verir. Oluşan rengin tonu örnekte bulunan DAG miktarı ile orantılıdır. Reaksiyon durdurulduktan sonra plate 450 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okutulmuş, optik okuma değerleri standart eğrisine konarak örneklerdeki DAG miktarı ng/ml cinsinden hesaplanmıştır.

### **V.B. İnositol-trisfosfat (IP<sub>3</sub>)**

Beyin dokusunda IP<sub>3</sub> düzeylerinin analizi de ELISA kiti (Cusabio, Hubei Province, China) kullanılarak yapıldı. Kitin analiz prensibi beyin dokusu örneklerinde bulunan IP<sub>3</sub> moleküllerinin önceden bu moleküle özgün keçi-anti-tavşan antikorlarla kaplanan 96 kuyucuklu plate'de bulunan kuyucuklara tutunmasıdır. Geri kalan işlemler DAG analizi ile aynıdır. Optik okuma değerleri standart eğrisine konarak örneklerdeki IP<sub>3</sub> miktarı pg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

### **V.C. Kolin asetiltransferaz (ChAT)**

Beyin dokusundaki ChAT düzeyleri aynı firmadan (Cusabio, Hubei Province, China) alınan ELISA kiti ile yapıldı. ChAT'nin analiz prensibi DAG ve IP<sub>3</sub> analizlerinin prensibi ile aynıdır. Oluşan renk 450 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okutulmuş ve optik okuma değerleri standart eğrisine konarak örneklerdeki ChAT miktarı ng/ml cinsinden hesaplanmıştır.

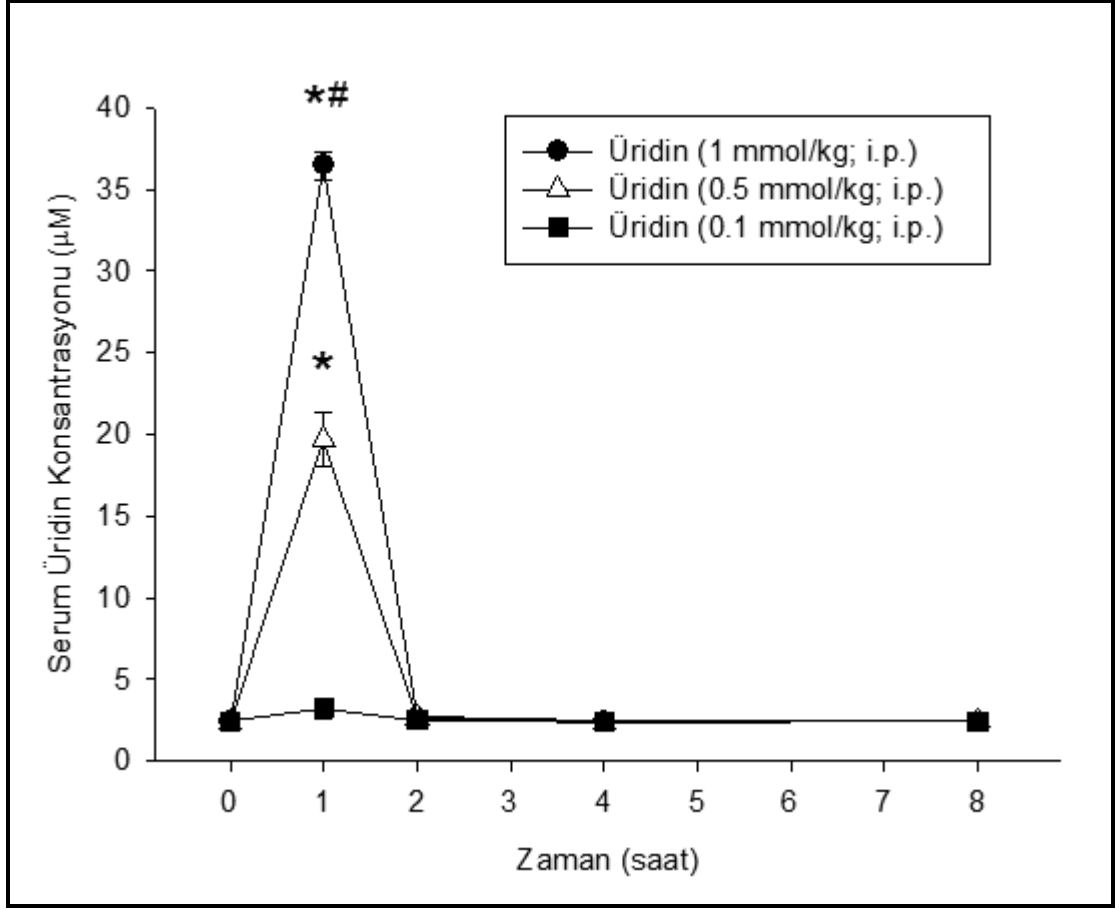
## **VI. İstatistiksel Değerlendirmeler**

İstatistiksel analizler Sigma Plot versiyon 12 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak sunuldu. Birden fazla doz ve zaman aralığının bulunduğu çalışmalarda grup içi ve gruplar arası farklılıklar İki Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile analiz edildi. Tek doz kullanılan ve tek değişkeni zaman olan deneylerde ise Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi kullanıldı. Mikrodializ deneylerinde üridin enjeksiyonu sonrası elde edilen sayısal değerler ilk üç bazal örnekten elde edilen ortalama değerle kıyaslanarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık p'nin 0.05'ten küçük olmasına atfedildi.

## BULGULAR

### I. Serum Üridin Konsantrasyonları

Ortalama bazal (0. dakika) serum üridin konsantrasyonları  $2.4 \pm 0.3$   $\mu\text{M}$  olarak analiz edildi. İntraperitoneal yolla enjekte edilen 0.5 ve 1 mmol/kg üridin, serum üridin konsantrasyonlarını 1. saatte sırasıyla 8.2 kat ( $19.7 \pm 1.7$   $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.001$ ) ve 15.2 kat ( $36.5 \pm 0.9$   $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.001$ ) arttırdı (Şekil-22). Düşük doz (0.1 mmol/kg) üridinin i.p yolla enjekte edilmesi ise serum üridin düzeylerini herhangi bir analiz anında anlamlı olarak değiştirmede (Şekil-22). Her iki dozda da (0.5 ve 1 mmol/kg) serum üridin düzeyleri 2. saatten itibaren kontrol noktasına göre anlamlı bir değişiklik göstermedi (Şekil-22).



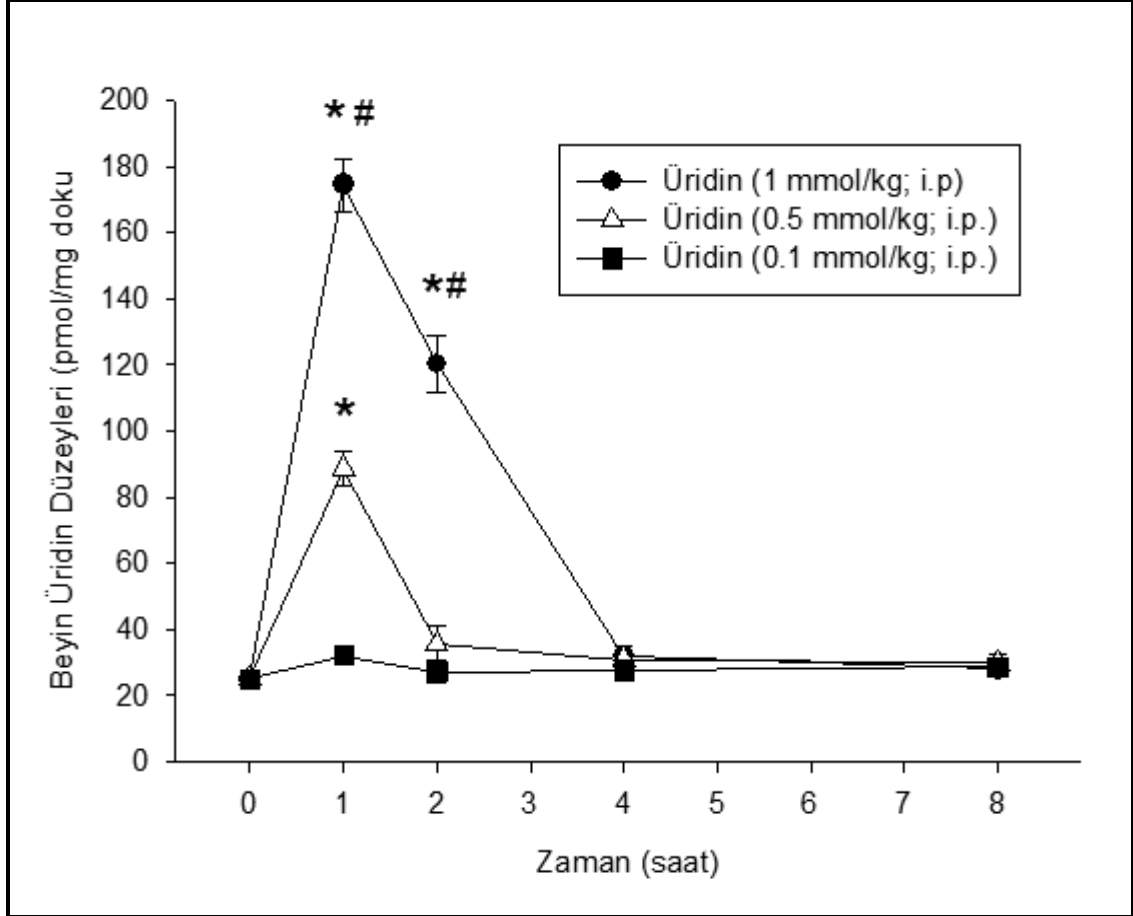
**Şekil-22:** Bazal (0. saat) ve i.p. üridin (0,1-1 mmol/kg) enjeksiyonunu takiben 1, 2, 4 ve 8 saat sonra serum üridin konsantrasyonları.

İn vivo freezing deneylerinde, ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi altına alınan sıçanlardan serum pirimidin konsantrasyonlarının analizi için bazal durumda (0. saat) ve i.p. üridin (0,1-1 mmol/kg) enjeksiyonundan 1, 2, 4 ve 8 saat sonra 22G enjektör iğnesi yardımıyla kardiyak ponksiyon yapılarak 200 µL kan örneği alındı. veriler µM olarak ifade edildi. \*p<0.001, aynı grup içinde bazal noktaya kıyasla; #p<0.001, aynı zaman noktasında 0.5 mmol/kg dozuyla elde edilen değere kıyasla. her grupta n=6. iki Yönlü ANOVA kullanılmıştır.

## II. Beyin Üridin Düzeyleri

Ortalama bazal (0. dakika) beyin üridin düzeyleri  $25.1 \pm 1.6$  pmol/mg olarak ölçüldü. İntraperitoneal yolla enjekte edilen 0.5 ve 1 mmol/kg üridin beyin üridin düzeylerini 1. saatte sırasıyla 3.5 kat ( $88.6 \pm 5$  pmol/mg doku; p<0.001) ve 7 kat ( $174.5 \pm 8$  pmol/mg doku; p<0.001) arttırdı (Şekil-23). En yüksek doz (1 mmol/kg) üridin enjeksiyonu sonrası beyin üridin düzeyleri 2. saatte de anlamlı olarak (p<0.001) artmış bulunurken, ortanca doz (0.5

mmol/kg) üridin enjeksiyonu ile 1. saatten sonra beyin üridin düzeyleri değişmedi (Şekil-23). En düşük doz (0.1 mmol/kg) üridin'in i.p. enjeksiyonu ise beyin üridin düzeylerini herhangi bir analiz anında anlamlı olarak değiştirmede (Şekil-23).



**Şekil-23:** Bazal (0. saat) ve i.p. üridin (0,1-1 mmol/kg) enjeksiyonunu takiben 1, 2, 4 ve 8 saat sonra beyin üridin düzeyleri.

Beyin dokusu parçaları 4 mm dışarı uzanan ve birbirinden 1.1 cm mesafede bulunan iki keskin bıçağa sahip doku homojenizatörü (Polytron PT 10-35, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) yardımıyla elde edildi. veriler pmol/mg doku olarak ifade edildi. \*p<0.001, aynı grup içinde bazal noktaya kıyasla; #p<0.001, aynı zaman noktasında 0.5 mmol/kg dozuyla elde edilen değere kıyasla. her grupta n=6. iki Yönlü ANOVA kullanılmıştır.

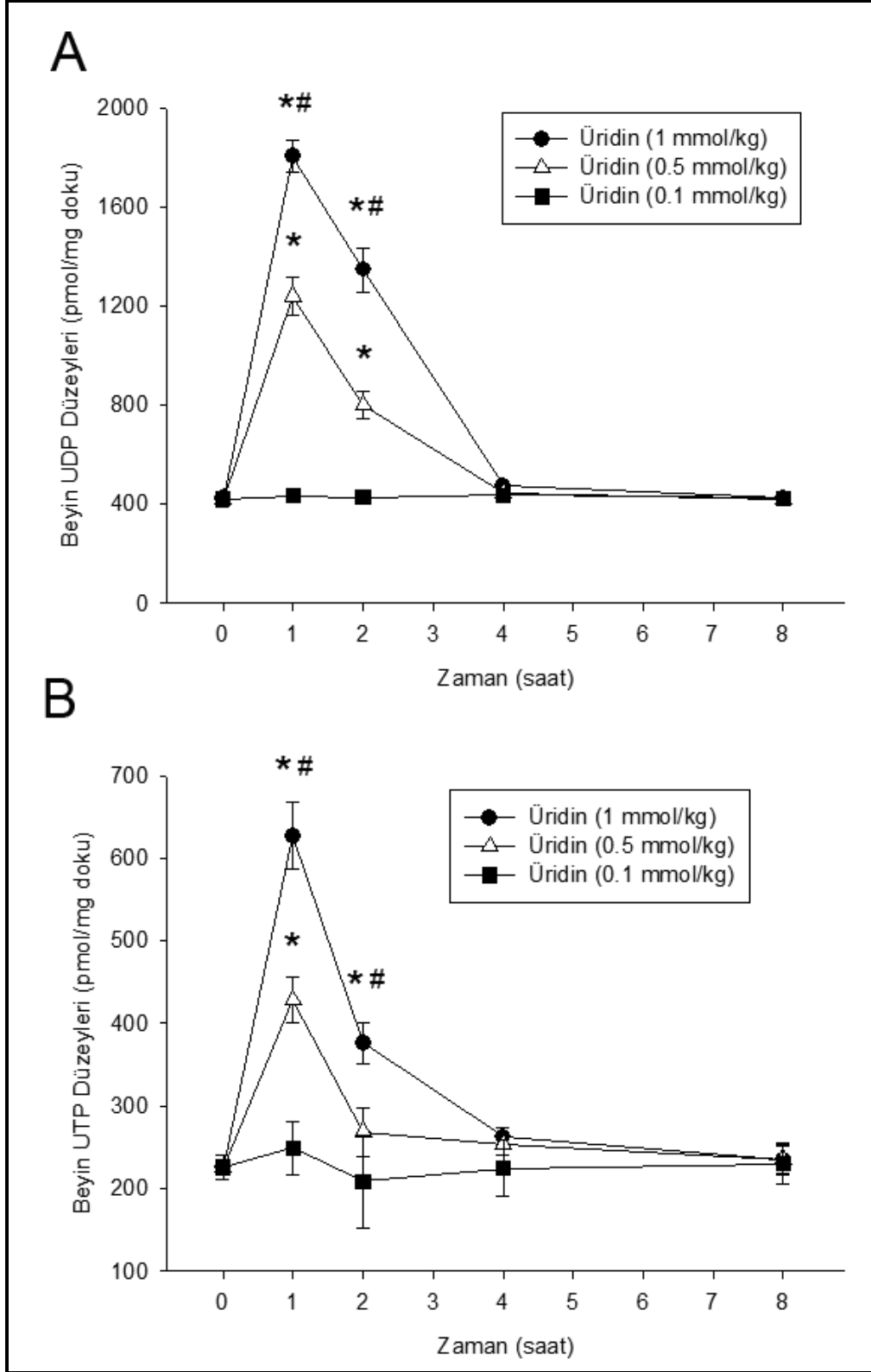
### III. Beyin UDP ve UTP Düzeyleri

Ortalama bazal beyin UDP düzeyleri  $421 \pm 29$  pmol/mg doku olarak ölçüldü. İntraperitoneal yolla enjekte edilen 0.5 ve 1 mmol/kg üridin beyin UDP düzeylerini 1. saatte sırasıyla 2.9 kat ( $1239 \pm 75$  pmol/mg doku;



$p < 0.001$ ) ve 4.3 kat ( $1803 \pm 66$  pmol/mg doku;  $p < 0.001$ ) arttırdı (Şekil-24A). En düşük doz (0.1 mmol/kg) üridin'in i.p. enjeksiyonu ise beyin UDP düzeylerini herhangi bir analiz anında anlamlı olarak değiştirmede (Şekil-24A). Beyin UDP düzeylerinde 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonu sonrası görölen artışların 2. saatten sonra bazal düzeylerine döndüğü gözlemlendi (Şekil- 24A).

Ortalama bazal beyin UTP düzeyleri  $225 \pm 14.6$  pmol/mg doku olarak ölçüldü. İntraperitoneal yolla enjekte edilen 0.5 ve 1 mmol/kg üridin beyin UTP düzeylerini 1. saatte sırasıyla 1.9 kat ( $429 \pm 28$  pmol/mg doku;  $p < 0.001$ ) ve 2.8 kat ( $627 \pm 41$  pmol/mg doku;  $p < 0.001$ ) arttırdı (Şekil-24B). En düşük doz (0.1 mmol/kg) üridin'in i.p. enjeksiyonu ise beyin UTP düzeylerini herhangi bir analiz anında anlamlı olarak değiştirmede (Şekil-24B). Bazal ölçümleriyle karşılaştırıldığında beyin UTP düzeyleri 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 2. saatte halen anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) yüksek bulundu, ancak daha sonra bazal düzeylerine geri döndü (Şekil-24B). Ortanca doz (0.5 mmol/kg) üridin enjeksiyonu ile 1. saatten sonra beyin UTP düzeyleri değişmedi (Şekil-24B).

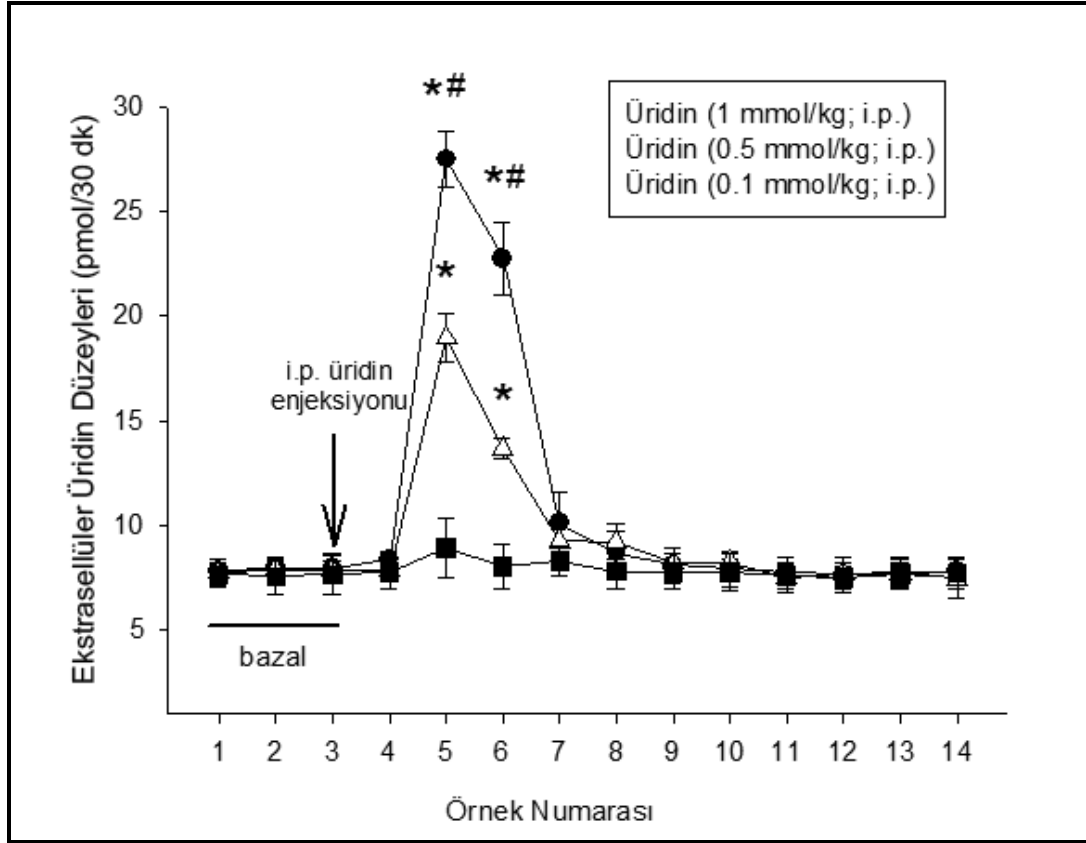


**Şekil 24:** Bazal (0. saat) ve i.p. üridin (0,1-1 mmol/kg) enjeksiyonunu takiben 1, 2, 4 ve 8 saat sonra beyin UDP (A) ve UTP (B) düzeyleri.

Beyin dokusu şekil 23' te tanımlandığı gibi elde edildi. veriler pmol/mg doku olarak ifade edildi. \* $p < 0.001$ , aynı grup içinde bazal noktaya kıyasla; # $p < 0.001$ , aynı zaman noktasında 0.5 mmol/kg dozuyla elde edilen değere kıyasla. her grupta  $n=6$ . iki Yönlü ANOVA kullanılmıştır.

#### IV. Striatal Ekstrasellüler Üridin Düzeyleri

Striatal mikrodializ örneklerindeki bazal üridin düzeyleri değer olarak birbirinden %10'dan daha az farklılık gösteren üç ardışık bazal mikrodializ örneğinin ortalaması alınarak hesaplandı. Striatal ekstrasellüler bazal üridin düzeyleri 7.79 (aralık: 7.76-7.83) pmol/30 dk olarak hesaplandı. Bu düzeyler 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1. saatte sırasıyla 2.4 kat ( $18.9 \pm 1.1$  pmol/30 dk;  $p < 0.001$ ) ve 3.5 kat ( $27.5 \pm 1.4$  pmol/30 dk;  $p < 0.001$ ) artarken 0.1 mmol/kg üridin enjeksiyonu sonrası anlamlı olarak değişmedi (Şekil-25). Striatal ekstrasellüler üridin düzeylerinde 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonu sonrası görülen artışlar 1.5. saatte de anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) devam etti ve daha sonra bazal düzeylerine geri döndü (Şekil-25).



**Şekil-25:** Bazal koşullar altında ve üridin (0,1-1 mmol/kg; i.p.) verilmesini takiben striatal ekstrasellüler üridin düzeyleri.

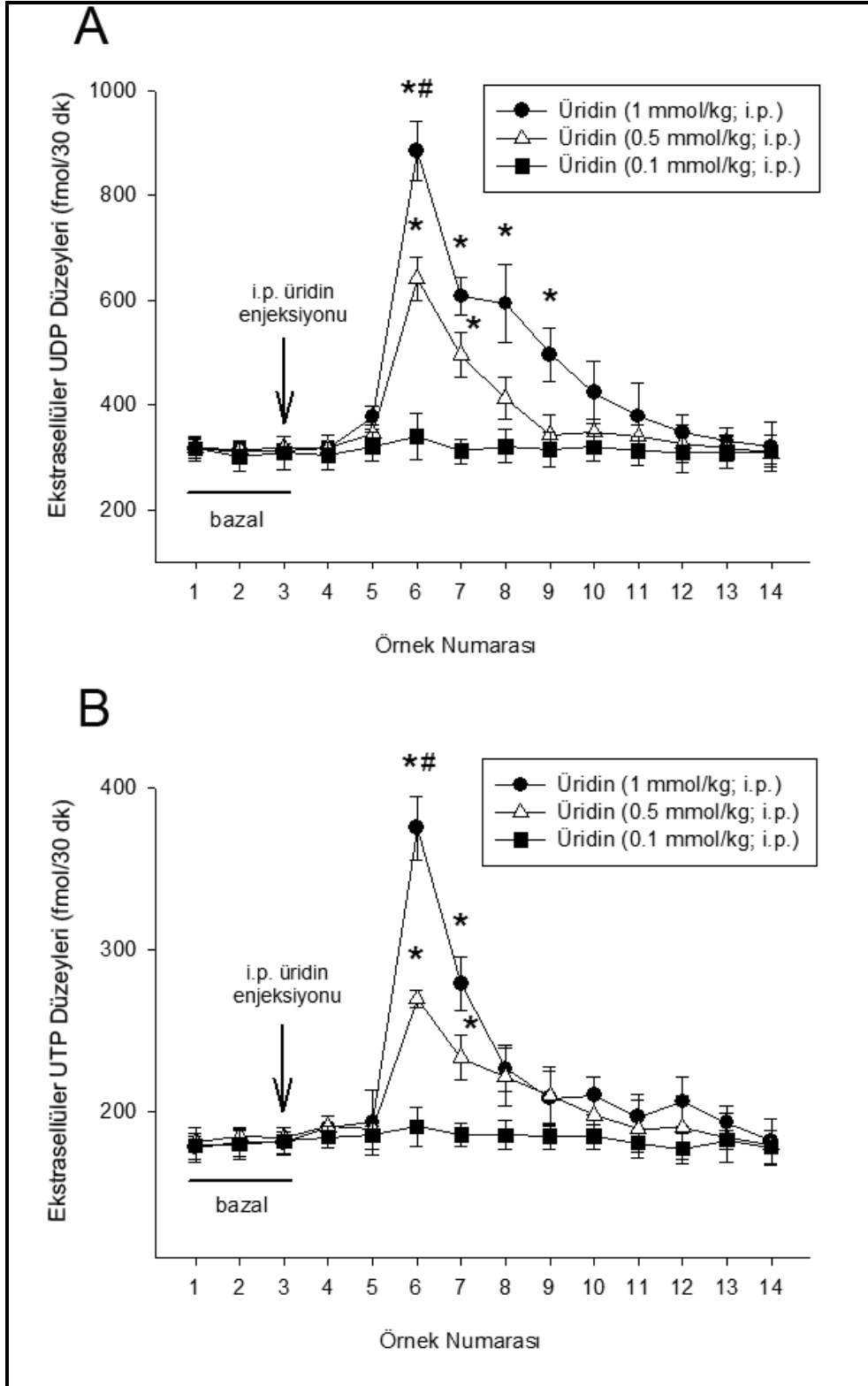
X'eksenindeki numaralar her 30 dakikada toplanan mikrodializ örneklerini göstermektedir. 1 saat stabilizasyon periyodunu takiben bazal ekstrasellüler üridin miktarını belirlemek için peş peşe 3 örnek toplandı ve 3. örnek alındıktan hemen sonra üridin (0,1-1 mmol/kg; i.p.) enjekte edildi. üridin verildikten sonra 5,5 saat boyunca örnekler toplandı. veriler pmol/30 dk. olarak ifade edildi. \* $p < 0.001$ , aynı grup içinde bazal noktaya kıyasla; # $p < 0.001$ , aynı zaman noktasında 0.5 mmol/kg dozuyla elde edilen değere kıyasla. her grupta  $n=6$ . iki Yönlü ANOVA kullanılmıştır.

## V. Striatal Ekstrasellüler UDP ve UTP Düzeyleri

Birbirinden değer olarak %10'dan farklı olmayan üç ardışık bazal mikrodializ örneğinin ortalaması alınarak hesaplanan ortalama striatal bazal ekstrasellüler UDP düzeyleri 312 (aralık: 310-315) fmol/30 dk olarak hesaplandı. Bu düzeyler 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1.5. saatte sırasıyla 2.1 kat ( $642 \pm 41$  fmol/30 dk;  $p < 0.001$ ) ve 2.8 kat ( $884 \pm 57$  fmol/30 dk;  $p < 0.001$ ) artış gösterirken 0.1 mmol/kg üridin enjeksiyonu sonrası anlamlı olarak değişmedi (Şekil-26A). Striatal ekstrasellüler UDP

düzeyleri 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonlarından sonra sırasıyla 2. ve 3. saatlerde hala anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) artmış bulundu (Şekil-26A).

Ortalama striatal bazal ekstrasellüler UTP düzeyleri ise 181 (aralık: 178-183) fmol/30 dk olarak hesaplandı. Bu düzeyler 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1.5. saatte sırasıyla 1.5 kat ( $270 \pm 6$  fmol/30 dk;  $p<0.001$ ) ve 2.1 kat ( $375 \pm 20$  fmol/30 dk;  $p<0.001$ ) artarken 0.1 mmol/kg üridin enjeksiyonu sonrası anlamlı olarak değişmedi (Şekil-26B). Striatal ekstrasellüler UTP düzeyleri 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonlarından sonra 2. saatte hala anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) yüksek bulundu (Şekil-26B).

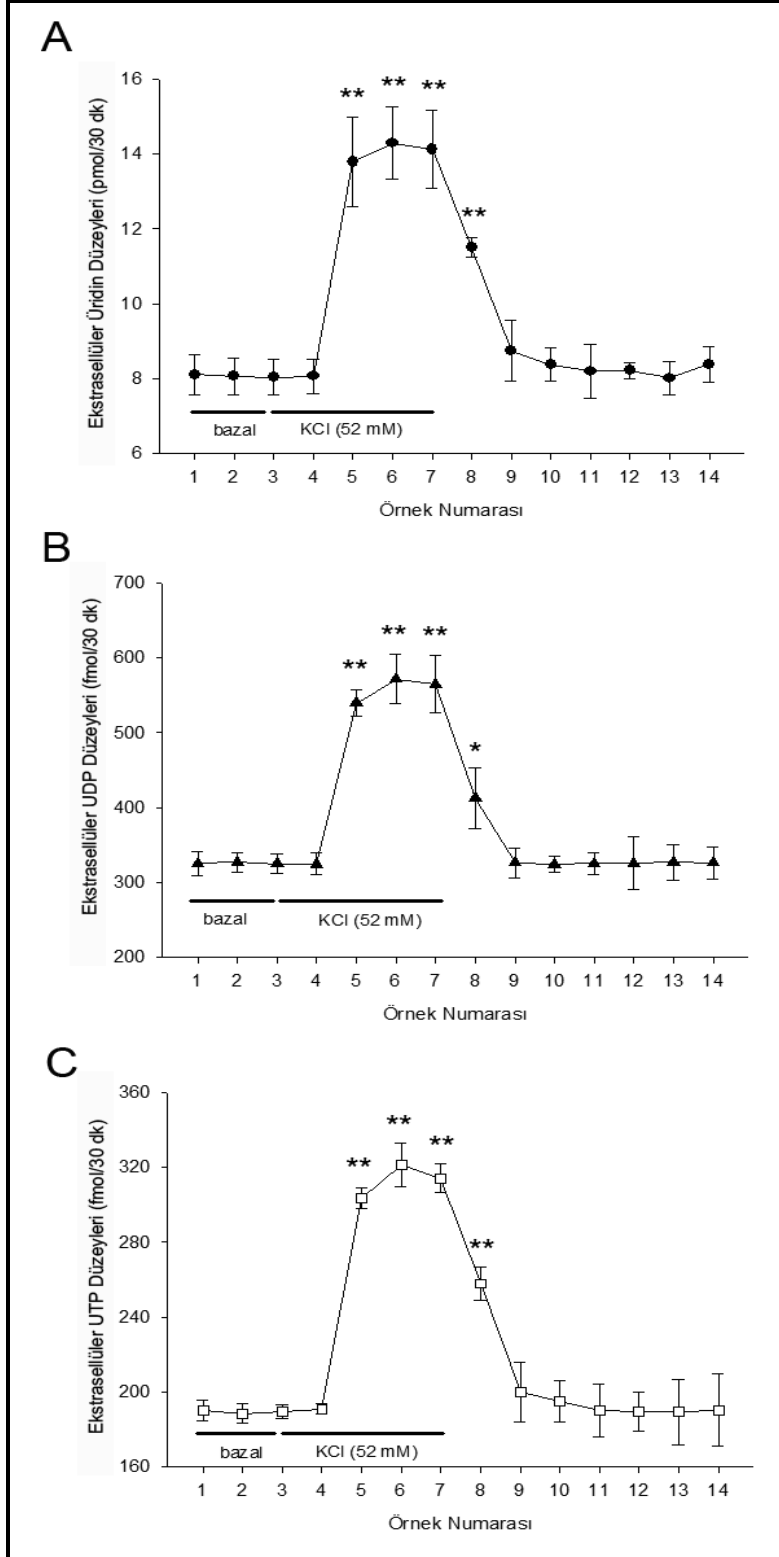


**Şekil-26:** Bazal koşullar altında ve üridin (0,1-1 mmol/kg; i.p.) verilmesini takiben striatal ekstrasellüler UDP (A) ve UTP (B) düzeyleri

Örnek toplama şekli şekil 25' te açıklandığı gibidir. veriler fmol/30 dk. olarak ifade edilmiştir. \* $p < 0.001$ , aynı grup içinde bazal noktaya kıyasla; # $p < 0.001$ , aynı zaman noktasında 0.5 mmol/kg dozuyla elde edilen değere kıyasla. her grupta  $n=6$ . iki Yönlü ANOVA kullanılmıştır.

## **VI. Potasyum Depolarizasyonunun Etkileri**

Yüksek konsantrasyonda (52 mM) KCl içeren Krebs kullanılarak yapılan uyarım sonucunda striatal ekstrasellüler üridin, UDP ve UTP düzeylerinde sırasıyla 1.8 kat (Şekil-27A), 1.8 kat (Şekil-27B) ve 1.7 kat (Şekil-27C) artış gözlemlendi. Bu artışlar potasyum depolarizasyonunu takiben 1. saatte başladı ve 2.5 saate kadar sürdü (Şekil-27). Potasyum depolarizasyonu ile artan ekstrasellüler üridin, UDP ve UTP düzeyleri 3 mM KCl içeren normal Krebs ile yeniden perfüzyonu takiben 1. saatte bazal düzeylerine geri döndü (Şekil-27).



**Şekil-27:** Potasyum stimülasyonu sonucu striatal ekstrasellüler üridin (A), UDP (B) ve UTP (C) düzeyleri.

Örnek toplanma şekli şekil 25'te açıklandığı gibidir. veriler fmol/30 dk. olarak ifade edilmiştir \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.001$  bazal düzeye kıyasla her grupta  $n=6$ . tek yönlü ANOVA kullanılmıştır.



## **VII. Üridin Uygulamasının Kolinerjik Nörotransmisyon Üzerine Etkisi**

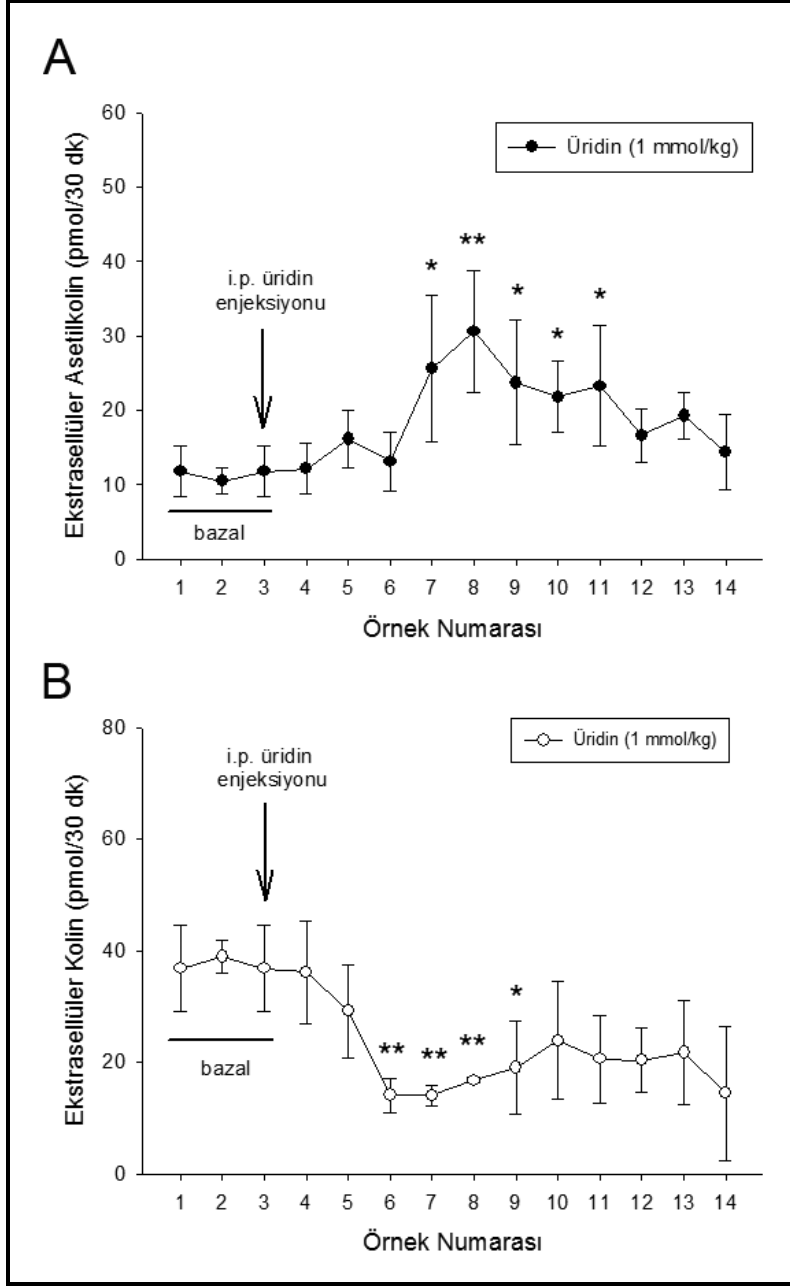
Buraya kadar olan bulgularımız bize üridin, UDP ve UTP'nin beyin ekstrasellüler sıvısında bazal şartlardaki varlığını ve bu bileşiklerin bazal seviyelerinin dışarıdan üridin enjeksiyonu veya potasyum stimülasyonu ile arttırılabileceğini göstermiştir. Bu bulgular pirimidinerjik transmisyonun beyinde in vivo varlığını ve ilave üridin takviyesiyle arttırılabileceğini kanıtlamaktadır. Ek olarak, potasyum depolarizasyonu sonrası bu bileşiklerin beyin ekstrasellüler sıvısında artması pirimidinerjik transmisyonun aslında bir nörotransmisyon olabileceğini düşündürmektedir.

Pirimidinerjik (nöro)transmisyondaki bir artışın beyindeki diğer sinirsel ileti mekanizmaları ile etkileşip etkileşmediğini araştırmak amacıyla i.p. üridin enjeksiyonu sonrası striatal ekstrasellüler sıvıdaki asetilkolin ve kolin seviyeleri analiz edildi.

### **VII.A. Striatal Asetilkolin ve Kolin Düzeyleri**

Üç ardışık bazal mikrodializ örneğinin ortalaması alınarak hesaplanan ortalama striatal bazal ekstrasellüler asetilkolin düzeyleri 11.4 (aralık: 9.8-15.1) pmol/30 dk olarak hesaplandı. Ekstrasellüler asetilkolin düzeyleri üridin (1 mmol/kg; i.p.) enjeksiyonunu takiben 2 saat sonra anlamlı olarak ( $p<0.05$ ) arttı, 2.5. saatte pik yaptı (2.7 kat artış;  $p<0.01$ ) ve 4. saatin sonunda bazal düzeylerine geri döndü (Şekil-28A). Buna karşılık striatal bazal ekstrasellüler kolin düzeyleri (37.5 pmol/30 dk), üridin (1 mmol/kg; i.p.) enjeksiyonunu takiben 1.5 saat sonra anlamlı olarak azaldı (Şekil-28B). Bu azalma üridin enjeksiyonunu takiben deneyin sonuna kadar sürse de istatistiksel olarak anlamlı düşüş 3. saatin sonunda tespit edildi (Şekil-28B).

Bu bulgular i.p. üridin enjeksiyonu sonrası kolinerjik nörotransmisyonun arttığını düşündürmektedir.



**Şekil-28:** Bazal ve üridin (1 mmol/kg;i.p.) enjeksiyonunu takiben striatal ekstrasellüler asetilkolin (A) ve kolin (B) düzeyleri.

Örnek toplanma şekli şekil 25'te açıklandığı gibidir. veriler pmol/30 dk. olarak ifade edilmiştir. \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  bazal düzeylere kıyasla. her grupta  $n=6$ . tek yönlü ANOVA kullanılmıştır.

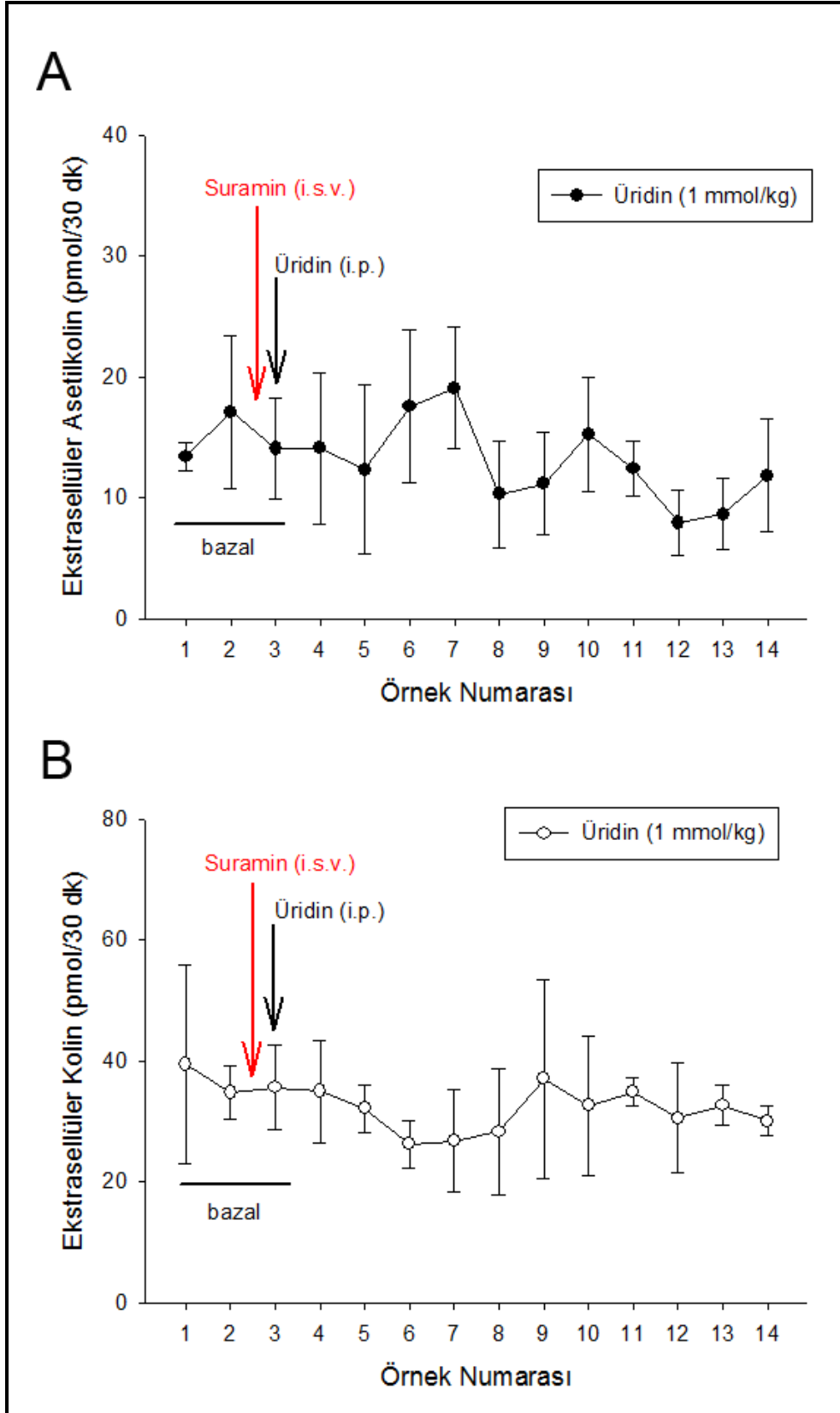
## VII.B. Kolinerjik Nörotransmisyon Artışının Mekanizmasına Yönelik Araştırmalar

Intraperitoneal üridin enjeksiyonu sonrası beyin ekstrasellüler sıvısında artan üridin nükleotidlerine paralel olarak ekstrasellüler asetilkolin düzeylerinin artması ve kolin düzeylerinin azalmasının mekanizmasını

araştırmak amacı ile P2 reseptör blokajı yapılarak in vivo mikrodiyaliz yöntemiyle asetilkolin ve kolin salıverilmeleri incelendi. Ayrıca, P2Y reseptörlerinin ikincil habercilerinin ve kolin asetiltransferaz (ChAT) enziminin beyin düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi.

#### **VII.B.a. P2 Reseptör Blokajı**

P2 reseptör blokajı deneylerinde üçüncü bazal mikrodiyaliz örneğinin toplanmasından (ve i.p. üridin enjeksiyonundan) 15 dakika önce non-selektif bir P2 reseptör antagonisti olan suramin (1 µmol) i.s.v. yoldan 10 µl Krebs içinde çözümlenerek yavaşça enjekte edildi. Suramin tedavisi üridin tedavisi sonrası gözlemlediğimiz ekstrasellüler asetilkolin artışını (Şekil-29A) ve kolin azalmasını (Şekil-29B) baskıladı.



**Şekil-29:** Suramin ön tedavisinin striatal ekstrasellüler asetilkolin (A) ve kolin (B) düzeylerine etkisi. n=6.

### VII.B.b İkincil Habercilerin Analizi

Üridin enjeksiyonunu takiben pirimidinerjik transmisyon artışı ile ilişkili kolinerjik nörotransmisyon artışında P2Y reseptörlerinin ikincil habercilerinin beyin düzeylerinde nasıl değişiklikler olduğu incelendi.

Bu amaçla, in vivo dondurma yöntemi ile elde edilen beyin dokusu homojenatlarında P2Y reseptör etkilerine aracılık eden diaçilgliserol (DAG) ve inositol trisfosfat (IP<sub>3</sub>) düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi (Tablo-1).

Sıçan beyinde bazal DAG düzeyleri 0.41 ± 0.02 nmol/ml olarak ölçüldü. Bazal DAG düzeyleri üridin enjeksiyonunu takiben 2. saatte 1.9 kat (0.79 ± 0.08 nmol/ml; p<0.001) arttı ve daha sonra bazal seviyelerine geri döndü (Tablo-1). Sıçan beyinde bazal IP<sub>3</sub> düzeyleri ise 24 ± 1.8 pg/ml olarak ölçüldü. Bazal IP<sub>3</sub> düzeyleri üridin enjeksiyonunu takiben 2. saatte 2.1 kat (50.4 ± 4.7 pg/ml; p<0.001) arttı ve daha sonra bazal seviyelerine geri döndü (Tablo-1).

**Tablo-1:** P2Y reseptör ikincil habercilerinin beyin düzeyleri.

İkinci haberci	Bazal	Üridin (1 mmol/kg; i.p.)			
		1. saat	2. saat	4. saat	8. saat
DAG (nmol/ml)	0.41 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.79 ± 0.08*	0.49 ± 0.04	0.40 ± 0.02
IP <sub>3</sub> (pg/ml)	24 ± 1.8	23 ± 1.3	50.4 ± 4.7*	28 ± 2.2	25 ± 1.9

\*p<0.001, bazal değerler ile kıyaslandığında (tek yönlü ANOVA). n=4.

### VII.B.c Kolin Asetiltransferaz (ChAT) Enzim Düzeyleri

Pirimidinerjik transmisyon artışı ile paralel olarak artan ekstrasellüler asetilkolin düzeylerinin yanısıra ekstrasellüler kolin düzeylerindeki azalma P2Y reseptör aktivasyonunun kolin'in hücre içine alınmasını sağlayarak daha fazla asetilkolin sentez ve salıverilmesini teşvik etmek üzere kolin asetiltransferaz enziminin düzeylerini artırıyor olabileceğini düşündürmektedir.

ChAT düzeyleri in vivo dondurma yöntemi ile elde edilen beyin dokusu homojenatlarında ELISA kiti kullanılarak analiz edildi. Bulgularımız

üridin (1 mmol/kg; i.p.) enjeksiyonunun bazal ChAT düzeylerini (0.12 ng/ml) incelenen herhangi bir zaman aralığında anlamlı olarak değiştirmediğini gösterdi.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Pürin veya pirimidin nükleotidlerinin beyin hücreleri arasındaki ekstrasellüler sıvıya salıveriliyor olabileceği ilk olarak 1970'li yıllarda ATP'nin klasik nörotransmitterlerle birlikte depolanıp salıverilebileceğine dair bulgular (37) ile bildirilmiş ve bu bulgulardan yola çıkılarak "pürinerjik transmisyon" kavramı ortaya atılmıştır (38). Pürin nükleotidlerinin ekstrasellüler alandaki varlığı hücre dışında pirimidin bileşiklerinin de bulunuyor olabileceği düşüncelerini doğurmuş ve "pirimidinerjik transmisyon" kavramının ortaya atılması uzun sürmemiştir (25,36). Beyinde pirimidin nükleotidleri tarafından uyarılan P2Y reseptörlerinin tanımlanması (20) ve pirimidin nükleotidlerinin kültürdeki glial hücrelerden salıverildiklerinin gösterilmesi (39) pirimidin nükleotidlerinin ekstrasellüler sinyal molekülleri olduğuna ve merkezi sinir sisteminde pirimidinerjik transmisyona katıldıklarına işaret eder. Şu ana kadar tanımlanan P2Y reseptörlerinin (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) temel uyarıları UDP, UTP ve UDP-şekerler gibi üridin nükleotidleridir (20). Buna göre üridin beyin hücrelerine alınarak pirimidin nükleotid sentezinde kullanılmakta (5), üretilen pirimidin nükleotidleri de hem bazal hem de stres koşulları altında (39,58) glial hücrelerden salıverilmektedirler.

Ekstrasellüler sıvıdaki pirimidin nükleotid miktarları in vitro kültürdeki trombosit, lökosit, hava yolu epiteli, glial hücre kültürleri (39,40) ve insan akciğer A549 hücrelerinde (59) ölçülmüştür. İnsan 1321N1 astrositoma hücrelerinde UTP'nin ekstrasellüler ortamdaki bazal varlığı kanıtlanmış ve bazal ekstrasellüler UTP konsantrasyonları  $2.6 \text{ pmol}/10^6$  hücre olarak hesaplanmıştır (39). Aynı çalışmada kültürdeki astrositoma hücrelerine yapılan mekanik stimülasyonun ekstrasellüler UTP konsantrasyonunu  $2.6$ 'dan  $36.4 \text{ pmol}/10^6$  hücre'ye çıkardığı ve ekstrasellüler ortamdaki konsantrasyonu artan UTP'nin P2Y4 reseptörlerini uyardığı bildirilmiştir (39). UDP'nin ekstrasellüler varlığı beyin hücrelerinde değil, insan akciğer A549 hücrelerinde gösterilmiş ve kültür sıvısındaki bazal UDP konsantrasyonları  $0.4 \text{ nM}$  olarak bildirilmiştir (59). Bu çalışmada kültür sıvısının hipotonik tuz

solüsyonu ile muamele edilmesinin bazal UDP konsantrasyonlarını 27 kat arttırdığı gösterilmiştir (59). Yine aynı çalışmada insan akciğer A549 hücrelerinin kültür sıvısındaki bazal UTP konsantrasyonları metodun hassasiyetinin yetmemesi nedeniyle belirlenememiş ancak kültür sıvısının hipotonik tuz solüsyonu ile muamele edilmesi sonrası ekstrasellüler UTP'nin belirlenebilir düzeylere (22 nM) ulaştığı bildirilmiştir (59).

Literatürde sadece pirimidin nükleozidleri olan üridin ve sitidin'in beyin ekstrasellüler sıvısındaki varlığı in vivo beyin mikrodializi yöntemiyle saptanmış olup, henüz pirimidin nükleotidlerinin varlığı gösterilememiştir. Klonlanan P2Y reseptörlerinin nükleotidlerce uyarıldığı, ancak nükleozidlerin bu reseptörleri uyarabildiğine dair herhangi bir bulgu olmadığı göz önüne alındığında, pirimidin nükleotidlerinin in vivo beyin ekstrasellüler sıvısındaki muhtemel varlığının tespit edilmesi, bu bileşiklerin ekstrasellüler konsantrasyonlarının regüle edilip edilemeyeceğinin belirlenmesi, ekstrasellüler alanda ulaşılan konsantrasyonların P2Y reseptörlerini aktive edip edemediğinin ve bunun bir fizyolojik anlamının bulunup bulunmadığının incelenmesi önemlidir. Çalışmamız bu anlamda literatürdeki ilk kanıtları sunmaktadır.

In vivo deneylerde ilk olarak kan ve beyindeki bazal üridin düzeyleri ve bu düzeylerin i.p. farklı dozlarda enjekte edilen üridin sonrası zamanla nasıl değiştiği incelenmiştir. Üridin endojen bir nükleozid (4-5) ve insanlarda kan dolaşımındaki ana pirimidin bileşiğidir (15). Üridin hem dolaşımda, hem dokularda, hem de beyin ekstrasellüler sıvısında aynı anda bulunur (4,5,41) ve üridin veya kaynaklarının eksojen verilmesiyle seviyeleri değişiklik gösterebilir. Erişkinlerin gıdalarında temel olarak RNA'nın yapısında bulunan üridin kandaki üridin düzeylerini yükseltmez. Bunun sebebi karaciğerin portal dolaşımda bulunan üridin'in hemen tamamını parçalamasıdır (60). Ancak anne sütünde bulunan UMP (61) gibi bir üridin kaynağı, oral yoldan deney hayvanlarına veya insanlara verildiğinde, insan kanında (15) ve sıçan (62) veya gerbillerin kanında ve beyinde (9) üridin düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir.



Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, ortalama bazal serum üridin konsantrasyonları  $2.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$  idi. Parenteral (i.p.) 0.5 ve 1 mmol/kg üridin enjeksiyonunu takiben serum üridin seviyeleri doz bağımlı olarak artmıştır (Şekil-22). Parenteral üridin uygulaması sonrası kandakine paralel artışlar beyin üridin düzeylerinde de gerçekleşmiştir; ortalama bazal beyin üridin düzeyleri ( $25.1 \pm 1.6 \text{ pmol/mg}$ ) i.p. yolla enjekte edilen 0.5 ve 1 mmol/kg üridin sonrası yine doz bağımlı olarak artmıştır (Şekil-23). En düşük doz (0.1 mmol/kg) üridin'in i.p. enjeksiyonu serum üridin konsantrasyonlarını veya beyin üridin düzeylerini bazal değerlere göre herhangi bir analiz anında anlamlı olarak değiştirmemiştir (Şekil-23). İntraperitoneal yolla verilen üridin tedavisi sonrası kan ve beyin üridin düzeylerinin yükseldiğini gösteren bulgularımız fare ve sıçanlarda yapılan önceki çalışmalarda (16) parenteral (intravenöz) yolla üridin uygulaması sonrası kanda ve beyin dokusunda bildirilen artışlarla uyumludur. Eksojen üridin verildikten sonra dolaşıma geçer, takiben beyin hücrelerine alınır ve muhtemelen konsentratif nükleozid taşıyıcıları aracılığı ile kan beyin bariyerinden geçer (5,9)

Çalışmamızda i.p. üridin enjeksiyonu sonrası artan kan ve beyin üridin düzeylerine paralel olarak beyin dokusunda UDP ve UTP düzeylerinin de üridin dozuna bağımlı olarak arttığı bulunmuştur. Ortalama bazal beyin UDP düzeyleri ( $421 \pm 29 \text{ pmol/mg doku}$ ) 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1. saatte doz bağımlı olarak artmıştır. Buna ilaveten, ortalama bazal beyin UTP düzeyleri ( $225 \pm 14.6 \text{ pmol/mg doku}$ ) 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1. saatte doz bağımlı olarak artmıştır. En düşük doz (0.1 mmol/kg) üridin'in i.p. enjeksiyonu beyin dokusundaki UDP ve UTP düzeylerini herhangi bir analiz anında anlamlı olarak değiştirmemiştir (Şekil-24). Üridin tedavisiyle beyin üridin nükleotidlerinin düzeylerinin arttığını gösteren bulgularımız daha önce yapılmış çalışmalarla uyumludur (9).

Üridinin dokularda fosforilasyonu sonucu UMP, UDP ve UTP gibi üridin nükleotidler oluşur. Üridin nükleotidler nükleik asit (RNA) yapısına katılır, glikojen biyosentezi, protein ve lipid glikozilasyonu gibi fizyolojik fonksiyonlarla ilişkilidir (4,25). UMP gibi üridin kaynaklarının sürekli tüketimi

beyin fosfolipid sentezini artırır (63-65). Bu etki muhtemelen Kennedy yolağı ile meydana gelir; çünkü tek doz oral UMP verilmesi ile kan ve beyin seviyelerinde artışla birlikte, beyin UTP seviyelerinde de artış meydana gelir (9). Artan UTP, CTP'ye dönüşür; bu reaksiyon fosfolipid sentezinin muhtemel hız sınırlayıcı basamağıdır (66).

Üridin enjeksiyonu sonrası kan-beyin bariyerinden üridin geçişinin arttığı in vivo mikrodializ deneylerimizde de test edilerek kanıtlanmıştır. Striatal mikrodializ örneklerindeki bazal üridin düzeyleri (7.79 pmol/30 dk) 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1. saatte sırasıyla doz bağımlı artmış ve bu artışlar 1.5. saatte de anlamlı olarak devam etmiştir (Şekil-25). Beyin ekstrasellüler sıvısında in vivo üridin varlığı daha önceki çalışmalarda sıçan talamus'unda gösterilmiş ve bazal üridin konsantrasyonu 0.76  $\mu$ M olarak rapor edilmiştir (41). Bizim çalışmamızda bu bulgu striatum dokusunda tekrarlanmış ve striatal ekstrasellüler üridin düzeyleri 7.79 pmol/30 dk olarak bulunmuştur. Bu değer striatum'dan 60  $\mu$ L mikrodializ örneği toplanmış olması ve mikrodializ probunun ortalama gerikazanımının %15 olması dikkate alındığında 0.87  $\mu$ M konsantrasyona karşılık gelmektedir. Dolayısıyla sonuçlarımız hem üridin'in beyin ekstrasellüler sıvısındaki varlığı hem de bazal ekstrasellüler konsantrasyonları anlamında önceki çalışmalarla (41) uyumludur.

Dışarıdan verilen üridin'in beyin ekstrasellüler sıvısındaki üridin konsantrasyonlarını arttırması, hem daha fazla üridin'in kan-beyin bariyerinden geçtiğini, hem de muhtemelen beyin hücrelerinden tekrar ekstrasellüler sıvıya salıverildiğini düşündürmektedir. Beyin hücrelerine alınan üridin'in bir kısmının UDP ve UTP sentezinde kullanıldığı Şekil 24'te sunulan bulgularımızla kanıtlanmıştır. Bu nükleotidlerin bir kısmı hücre içindeki nükleotid havuzlarına giderken, bir kısmı da beyin hücrelerinden ekstrasellüler sıvıya salıverilmektedir (Şekil-26). Bu çalışma ile UDP ve UTP'nin bazal şartlarda striatal ekstrasellüler sıvıdaki varlığı literatürde ilk kez in vivo şartlarda gösterilmiştir.

Beyin ekstrasellüler sıvısında pirimidin nükleotidlerinin bazal şartlardaki varlığını kanıtlamak için ekstrasellüler alana geçen pirimidin

nükleotidlerinin parçalanmasına yol açan enzimleri bloke etme prensibiyle yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde in vivo mikrodializ perfüzyon sıvısına PSB069 adlı seçici olmayan bir NTPDaz inhibitörü eklenmiştir. PSB069 sıçan NTPDaz'ları 1, 2 ve 3'ü benzer potens ile inhibe etmektedir (56). Geliştirilen bu yöntem sinaptik aralıkta kolinesteraz enzimlerince hızla parçalanan asetilkolin'in in vivo mikrodializ yöntemi ile tespit edilmesi için perfüzyon sıvısına fizostigmin gibi kolinesteraz inhibitörlerinin eklenmesi prensibi ile benzerlik göstermektedir (67). Üridin nükleotidler ekstrasellüler alana salıverildiğinde membrana bağlı ektonükleotidazlarca hızla parçalanırlar (68). Perfüzyon sıvısına PSB069 eklenmesiye pirimidin nükleotidleri ektonükleotidazların parçalayıcı etkisinden kurtulmuş ve güvenli bir şekilde mikrodializ örneklerinde toplanması sağlanmıştır.

Geliştirdiğimiz bu yöntemde PSB069'un mikrodializ perfüzyon sıvısına eklenecek en uygun konsantrasyonunu bulmak için PSB069'un üç farklı (1, 10 ve 100  $\mu$ M) konsantrasyonunun kullanıldığı ek deneyler yapılmıştır. En düşük PSB069 konsantrasyonu (1  $\mu$ M) ile pirimidin nükleotidleri tespit edilemezken, en yüksek (100  $\mu$ M) konsantrasyonda kullanılan PSB069 sonrası HPLC kromatogramında çok fazla arka plan gürültüsü oluşmuş ve pirimidin pikleri bu gürültülerin arasında tespit edilememiştir. Ortanca (10  $\mu$ M) PSB069 konsantrasyonu kullanıldığında ise pirimidin nükleotidleri güvenilir bir şekilde tespit edilebilmiştir. Diğer taraftan, seçici bir ekto-ATPaz inhibitörü olan ARL 67156 (69) 10  $\mu$ M konsantrasyonda perfüzyon sıvısına eklenmesi suretiyle yapılan ek deneylerde, daha önceki in vitro gözlemlerle (70) uyumlu olarak, ARL 67156'nın pirimidin nükleotidlerinin tespitinde yarar sağlamadığı belirlenmiştir.

Ortalama striatal bazal ekstrasellüler UDP ve UTP düzeyleri sırasıyla 312 fmol/30 dk ve 181 fmol/30 dk olarak saptanmıştır. Bu değerler striatum'dan 60  $\mu$ L mikrodializ örneği toplanmış olması ve mikrodializ probunun ortalama recovery'sinin %15 olması dikkate alındığında sırasıyla 34.7 nM ve 20.1 nM konsantrasyona karşılık gelmektedir. 0.5 ve 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonunu takiben 1.5. saatte hem UDP hem de UTP seviyelerinde artış gözlenmiştir. Ancak striatal ekstrasellüler UDP veya UTP

düzeyleri 0.1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonu sonrası ölçüm yapılan herhangi bir zaman noktasında anlamlı olarak değişmemiştir (Şekil-26). Bulgularımız, deney hayvanlarına i.p. yoldan verilen üridin'in kanda ve beyinde üridin düzeylerini arttırdığını, artan beyin üridin düzeylerinin de beyin dokusunda UDP ve UTP miktarını yükselttiği gibi hücre içinde artmış olarak bulunan UDP ve UTP'nin ekstrasellüler sıvıya salıverilmesini arttırdığını göstermektedir. Pirimidin nükleotid düzeylerinin dışarıdan üridin uygulamasıyla hem in vitro (27) hem de in vivo (9) deney protokollerinde sinir hücrelerinde pirimidin nükleotidlerinin düzeylerini arttırdığı ve buna ilaveten glial hücre kültürlerinde pirimidin nükleotidlerinin bazal ve uyarılmış koşullarda ekstrasellüler alana salıverildiği (39,40) bilindiği halde, çalışmamızda elde edilen bulgular literatürde ilk kez in vivo beyin ekstrasellüler sıvısında UDP ve UTP'nin bazal şartlardaki varlığını yeni bir metod kullanmak suretiyle kanıtlamış ve ekstrasellüler UDP ve UTP düzeylerinin deney hayvanına parenteral yolla uygulanan üridin sonrası doza bağımlı olarak arttığını göstermiştir.

Beyinde elektriksel olarak uyarılabilme özelliğine sahip nöronların yanısıra elektriksel uyarıya cevap vermeyen glial hücreler de mevcuttur. Ekstrasellüler alanda varlığını tespit ettiğimiz pirimidin nükleotidlerinin düzeylerinin beyin hücrelerinin yüksek potasyum ile uyarılmış koşullarda artıp artmadığını test etmek amacıyla bazal şartlar için kullandığımız ve 3 mM KCl içeren mikrodiyaliz perfüzyon sıvısı nöronal depolarizasyona neden olduğu bilinen (42,43) yüksek konsantrasyonda (52 mM) KCl içeren başka bir Krebs solüsyonu ile değiştirilmiş ve bu yöntemle sağlanan depolarizasyon 2 saat boyunca sürdürülmüştür. Potasyum depolarizasyonunu takiben 1. saatte striatal ekstrasellüler üridin, UDP ve UTP düzeyleri sırasıyla 1.8, 1.8 ve 1.7 kat artış göstermiştir (Şekil-27). Bulgularımız pirimidin bileşiklerinin nöronlardan salıveriliyor olabileceğini düşündürmektedir ve potasyum depolarizasyonu sonrası bazal ekstrasellüler üridin konsantrasyonlarının %142 oranında arttığını bildiren önceki çalışmalar (42-43) ile uyumludur. Bazal ekstrasellüler UDP ve UTP düzeylerinin potasyum depolarizasyonu ile arttığı ise ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. Bahsi edilen bulgular

pirimidinerjik transmisyonun aslında bir nörotransmisyon olabileceğinin in vivo kanıtlarıdır. Ancak pirimidin bileşiklerinin presinaptik veziküllere alınıp alınmadığı veya ayrıntılı salıverilme mekanizmaları bilinmemektedir.

Çalışmamıza ayrıca pirimidinerjik (nöro)transmisyondaki bir artışın beyindeki diğer sinirsel ileti mekanizmaları ile etkileşip etkileşmediği araştırılmıştır. Bu amaçla pirimidinerjik (nöro)transmisyonu arttırdığını gösterdiğimiz en yüksek dozda (1 mmol/kg) i.p. üridin enjeksiyonu sonrası striatal ekstrasellüler sıvıdaki asetilkolin düzeyleri analiz edilmiştir.

Ortalama striatal bazal ekstrasellüler asetilkolin düzeyi (11.4 pmol/30 dk), üridin (1 mmol/kg; i.p.) enjeksiyonunu takiben 2 saat sonra anlamlı olarak artmış ve bu artış 2.5. saatte en yüksek seviyeye (2.7 kat) ulaşmıştır (Şekil-28A). Buna karşılık striatal bazal ekstrasellüler kolin düzeyleri (37.5 pmol/30 dk), üridin (1 mmol/kg; i.p.) enjeksiyonunu takiben 1.5 saat sonra anlamlı olarak azalmıştır (Şekil-28B). Bulgularımız akut üridin uygulaması sonrası pirimidinerjik (nöro)transmisyondaki bir artışın kolinerjik nörotransmisyonu arttırdığına dair ilk bulgulardır ve iki sistem arasındaki etkileşime dair önemli bir kanıttır.

Bir pirimidin nükleotidi olan UMP'nin kronik olarak oral yolla verilmesinin yaşlı sıçanların striatum'unda asetilkolin sentez ve salıverilmesini artırdığı yakın zamanda gösterilmiştir (51). Bu çalışmada kolinerjik nörotransmisyon artışının muhtemel mekanizması olarak üridin'in Kennedy yolağı aracılığıyla beyin membran sentezini artırması gösterilmiş, ancak akut olarak verilen üridin'in kolinerjik nörotransmisyona etkileri ve etkide reseptör aracılığı incelenmemiştir. Denelerimiz göstermiştir ki kullandığımız i.p. üridin dozları beyinde hem pirimidin nükleotid sentezini hem de salıverilmesini arttırmaktadır. Salıverilen pirimidin nükleotidleri de muhtemelen P2Y reseptörlerini uyarmak suretiyle kolinerjik nörotransmisyonu artırıyor olabilir.

Denelerimizde kullandığımız 1 mmol/kg i.p. üridin dozu ile ulaşılan en yüksek ekstrasellüler UDP ( $884 \pm 57$  fmol/30 dk) ve UTP ( $375 \pm 20$  fmol/30 dk) düzeyleri ise aynı hesaplamayla sırasıyla 97.2 nM ve 42.2 nM konsantrasyona karşılık gelmektedir. İnsan 1321N1 astrositoma hücrelerinde

klonlama ve ekspresyon çalışmalarında üridin nükleotidlerce uyarılan P2Y reseptörlerinin pirimidin nükleotidlerine afinitesi incelenmiş ve P2Y4 reseptörlerinin UTP için Michaelis-Menten sabiti (Km'si)  $0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$  ve P2Y6 reseptörlerinin UDP için Km'si  $0.19 \pm 0.04 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (71). Buna ilaveten, fare nöroblastoma hücrelerindeki klonlama ve ekspresyon çalışmaları UTP'nin P2Y2 reseptörlerini uyarması sonucu  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  salıverilme etkisi için yüksek potens ( $\text{EC}_{50}=1.1 \mu\text{M}$ ) gösterdiği bildirilmiştir (72). Çalışmamızda 1 mmol/kg i.p. üridin enjeksiyonu sonrası ulaşılan en yüksek striatal ekstrasellüler UDP ve UTP düzeyleri bu bileşiklerin P2Y reseptörlerini uymaları için in vitro sistemlerde bildirilen Km değerlerinin altında olsa da, bulgularımız in vivo pirimidinerjik (nöro)transmisyon arttırıldığı taktirde kolinerjik nörotransmisyonun arttığını ve bu etkiye, altta tartışılan antagonist deneyi ile kanıtlandığı üzere, P2Y reseptör aktivasyonunun aracılık ettiğini göstermektedir.

Bu bulgular parenteral üridin enjeksiyonu sonrası kolinerjik nörotransmisyonun arttığını düşündürmektedir. Üridin tedavisi sonrası kolinerjik nörotransmisyondaki bu artış, etyopatogenezinde suçlanan faktörlerden biri azalmış kolinerjik nörotransmisyon olan Alzheimer hastalığı için yeni bir tedavi yaklaşımına ışık tutabilir. Zira pirimidinerjik sistem ile Alzheimer hastalığı patogenezi arasındaki muhtemel ilişkinin kanıtları yakın zamanlı insan çalışmalarında bildirilmiştir. Alzheimer hastalarının beyin-omurilik sıvısında üridin konsantrasyonları yaş-uyumlu normal bireylere göre daha düşük olarak bulunmuştur (52). Buna ilaveten, ölüm sonrası yapılan beyin otopsilerinde Alzheimer hastalarının kortekslerindeki P2Y2 reseptör düzeylerinin yaş-uyumlu normal bireylerdekilere göre azalmış olarak bulunmuştur (53). Bu bulgular, projemizde karakterize etmeye çalıştığımız pirimidinerjik nörotransmisyonun modüle edilmesi suretiyle Alzheimer hastalığının tedavisinde yeni bir yaklaşım ortaya çıkabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Parenteral üridin enjeksiyonu sonrası beyin ekstrasellüler sıvısında artan pirimidin bileşiklerine paralel olarak kolinerjik nörotransmisyondaki artışın mekanizmasını araştırmak amacı ile P2 reseptör blokajı yapılarak in

vivo mikrodializ yöntemiyle asetilkolin ve kolin salıverilmeleri incelenmiş ve ayrıca, P2Y reseptörlerinin ikincil habercilerinin ve kolin asetiltransferaz enziminin beyin düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir.

Üçüncü bazal mikrodializ örneğinin toplanmasından (ve i.p. üridin enjeksiyonundan) 15 dakika önce i.s.v. yoldan 10 µl Krebs içinde çözülerek yavaşça enjekte edilen non-selektif P2 reseptör antagonisti suramin (1 µmol) tedavisi ekstrasellüler asetilkolin artışını (Şekil-29A) ve kolin azalmasını (Şekil-29B) baskılamıştır. Bu bulgu artmış pirimidinerjik (nöro)transmisyonun kolinerjik nörotransmisyonu arttırıcı etkisine P2Y reseptörlerinin aracılık ettiği hipotezimizi desteklemektedir.

P2Y reseptör blokajına ilaveten P2Y reseptör sonrası olaylar da incelenmiş ve UDP ve UTP tarafından aktive edilen P2Y2, P2Y4 ve P2Y6 reseptör uyarımının hücre içi etkilerine aracılık eden DAG ve IP3 (21,22) düzeylerinin in vivo dondurma yöntemi ile elde edilen beyin dokusu örneklerinde i.p. üridin tedavisi sonrası 2. saatte sırasıyla 1.9 kat ve 2.1 kat arttığı bulunmuştur (Tablo-1). Bu bulgular da etkide P2Y reseptör aracılığını desteklemektedir.

Pirimidinerjik (nöro)transmisyon artışı ile paralel olarak artan ekstrasellüler asetilkolin düzeylerinin yanısıra ekstrasellüler kolin düzeylerindeki azalma P2Y reseptör aktivasyonunun kolin'in hücre içine alınmasını sağlayarak daha fazla asetilkolin sentez ve salıverilmesini teşvik etmek üzere kolin asetiltransferaz (ChAT) enziminin düzeylerini arttırıyor olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bulgularımız üridin (1 mmol/kg; i.p.) enjeksiyonunun bazal ChAT düzeylerini (0.12 ng/ml) incelenen herhangi bir zaman aralığında değiştirmedeğini göstermektedir. Bu bulgumuz P2Y reseptör aktivasyonunun ChAT düzeylerini değil, aktivitesini arttırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Pirimidinerjik transmisyonun hastalık ve sağlık durumlarında çeşitli beyin fonksiyonlarına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. UTP, ADP, ATP nükleotidlerinin, kemirgen beyninden elde edilmiş multipotent nöral kök hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı bulunmuştur (73). Üridin nükleotidlerin P2Y reseptörleri üzerinden nöronal büyüme ile ilişkisi PC12 hücrelerinde

(26,27) ve insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde (28), dorsal kök ganglion hücrelerinde (26,29), fare siyatik sinirinde (26) gösterilmiştir. Üridin nükleotidle uyarılan P2Y reseptörlerinin, nöradrenalin, glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımına (30,31) ve uzun süreli potensiyalizasyona (LTP) (32) aracılık ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Diyete kronik üridin eklenmesi sıçanlarda hipokampal öğrenme ve hafıza ile ilgili defisitleri iyileştirmiştir (74-75). UTP veya UDP'ye duyarlı P2Y reseptörlerinin uyarılması hasarlı beyin bölgesine mikroglial konverjans ile nöron koruyucu etki gösterir (76). Sıçan astrositlerinin UTP ile stimülasyonu sonrası astrosit migrasyonunun arttığı gösterilmiştir (34) ve reaktif astrogliazis sağlıklı ve hasarlı doku arasında bir bariyer formu oluşturur (77). Üridin nükleotidleri ile indüklenen P2Y, özellikle de P2Y2 reseptörleri, nöronlar ve glial hücrelerde apoptotik hücre ölümünü engeller (29). UTP aracılı P2Y2 reseptör aktivasyonu APP'nin alfa-sekretaz bağımlı proteolitik parçalanmasını hızlandırarak nöritik plakların major bileşeni olan Amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ )'nin oluşumunu engellemektedir (78). Bu durum Alzheimer hastalığında UTP'nin muhtemel terapötik kullanımını akla getirir. Bu öneri Alzheimer hastalığında paryetal kortekste selektif olarak P2Y2 immünoreaktivitesinin azalmasının tespitiyle (53) desteklenmiştir. Buna ilaveten Alzheimer hastalığının TgCRND8 fare modelinde de beyinde P2Y2 nükleotid reseptör kaybının hastalığın erken patolojisini arttırdığı gösterilmiştir (79).

ATP sinyal iletilişinde ve post-sinaptik gen regülasyonunda kritik rol oynayan ekstrasellüler sinyal molekülüdür. ATP-duyarlı P2Y1 reseptörlerinin uyarılmasının AChE ve ChAT gen ekspresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (80). Yine aynı araştırmacıların başka bir çalışmada P2Y2 reseptörlerinin UTP aracılı aktivasyonunun MAP kinaz sinyal yolağını aktive ettiği ve AChE ve ChAT gibi kolinerjik genlerin ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir (81). Bizim çalışmamızda da üridin tedavisi sonrası asetilkolin salıverilmesinin artmasına P2Y reseptörleri aracılık etmektedir; ancak muhtemelen çalışmamız birkaç saat içinde gerçekleşen akut incelemeleri içerdiğinden ChAT miktarında artışa rastlanamamıştır.



Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular ilk kez:

- i) UDP ve UTP'nin in vivo bazal şartlarda beyin ekstrasellüler alanındaki varlığını,
- ii) bu bileşiklerin ekstrasellüler düzeylerinin dışarıdan verilen üridin tedavisiyle veya potasyum depolarizasyonu ile arttırılabileceğini,
- iii) üridin tedavisi ile artan ekstrasellüler UDP ve UTP düzeylerine paralel olarak kolinerjik nörotransmisyonun arttığını, ve
- iv) artan kolinerjik nörotransmisyonun P2Y reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermiştir.

Bulgularımız beyinde pirimidinerjik transmisyonun varlığını, bu transmisyonun bir nörotransmisyon olabileceğini, dışarıdan pirimidin uygulamasıyla regüle edilebileceğini ve bu regülasyonun kolinerjik nörotransmisyonla etkileşim anlamında farmakolojik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bulgularımızın bilimsel literatüre anlamlı katkı yapacağı ve Alzheimer hastalığı gibi bazı beyin hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımlara yol göstereceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Barness LA. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D (eds). 7th edition. New York: McGraw-Hill; 1995. 4605.
2. Traut TW, Jones ME. Uracil metabolism UMP synthesis from orotic acid or uridine and conversion of uracil to beta-alanine: enzymes and cDNAs. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996;53:1-78.
3. Geiger A, Yamasaki S. Cytidine and uridine requirement of the brain. *J Neurochem* 1956;1:93-100.
4. Traut TW. Physiological concentrations of purine and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 1994;140:1-22.
5. Cansev M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Rev* 2006;52:389-97.
6. Hebert DN, Garman SC, Molinari M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality control tags. *Trends Cell Biol* 2005;15:364-70.
7. Aebi M, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol* 2001;11:136-41.
8. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 1956;222:193-214.
9. Cansev M, Watkins CJ, Van Der Beek E, Wurtman RJ. Oral uridine-5'-monophosphate (UMP) increases brain CDP -choline levels in gerbils. *Brain Res* 2005;1058:101-8.
10. Sprong H, Degroote S, Nilsson T, Kawakita M, Ishida N, Van Der Sluijs P. Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 2003;14:3482-93.
11. Haugaard ES, Frantz KB, Haugaard N. Effect of uridine on cellular UTP and glycogen synthesis in skeletal muscle: stimulation of UTP formation by insulin. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74:2339-42.
12. Higuera JC, Thelestam M, Katz A. Glucose starvation results in UDP-glucose deficiency and inactivation of glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys* 2004;425:242-8.
13. Bourget PA, Tremblay GC. Pyrimidine biosynthesis in rat brain. *J Neurochem* 1972;19:1617-24.
14. Benzi G, Villa RF, Dossena M, Vercesi L, Gorini A, Pastoris O. Cerebral endogenous substrate utilization during the recovery period after profound hypoglycemia. *J Neurosci Res* 1984;11:437-50.
15. Wurtman RJ, Regan M, Ulus I, Yu L. Effect oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem pharmacol* 2000;60:989-92.
16. Peters GJ, Van Groeningen CJ, Laurensse EJ, Lankelma J, Leyva A, Pinedo HM. Uridine-induced hypothermia in mice and rats in

- relation to plasma and tissue levels of uridine and its metabolites. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;20:101-8.
17. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SCL28. *Pflugers Arch* 2004;447:728-34.
  18. Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SCL29. *Pflugers Arch* 2004;447:735-43.
  19. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1471-83.
  20. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International union of LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:281-341.
  21. Albert JL, Boyle JP, Roberts JA, Challiss RAJ, Gubby SE, Boarder MR. Regulation of brain capillary endothelial cells by P2Y receptors coupled to Ca<sup>+2</sup> phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. *Br J Pharmacol* 1997;122:935-41.
  22. Arslan G, Filipeanu CM, Irenius E, et al. P2Y receptors contribute to ATP-induced increase in intracellular calcium in differentiated but not undifferentiated PC12 cells. *Neuropharmacology* 2000;39:482-96.
  23. Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, et al. G protein –coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 2000;275:10767-71.
  24. Ciana P, Fumagalli M, Trincavelli ML, Verderio C, Rosa P, Lecca D. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *Embo J* 2006;25:4615-27.
  25. Lecca D, Ceruti S. Uracil nucleotides: from metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1869-81.
  26. Arthur DB, Akkasoglu K, Insel PA. P2Y2 receptor activates nerve growth factor TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19138-43.
  27. Pooler AM, Guez DH, Benedictus R, Wurtman RJ. Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated PC12. *Neuroscience* 2005;134:207-14.
  28. Cavaliere F, Nestola V, Amadio S, D'Ambrosi N, Angelini DF, Sancesario G. The metabotropic P2Y4 receptor participates in commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 2005;18:100-9.
  29. Arthur DB, Georgi S, Akkasoglu K, Insel PA. Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci* 2006;26:3798-804.
  30. Boehm S, Huck S, Illes P. UTP- and ATP-triggered transmitter release from rat sympathetic neurons via separate receptors. *Br J Pharmacol* 1995;116:2341-3.
  31. Bofill-Cardona E, Vartian N, Nanoff C, Freissmuth M, Boehm S. Two different signalling mechanisms involved in the excitation of rat

- sympathetic neurons by uridine nucleotides. *Mol Pharmacol* 2000;57:1165-72.
32. Price GD, Robertson SJ, Edwards FA. Long-term potentiation of glutamatergic synaptic transmission induced by activation of presynaptic P2Y receptors in rat medial habenula nucleus. *Eur J Neurosci* 2003;17:844-50.
  33. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 2007;446:1091-5.
  34. Marchetti B, Abbracchio MP. To be or not to be (inflamed)—is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:517-25.
  35. Chorna NE, Santiago-Perez LI, Erb L, Seye CI, Neary JT, Sun GY. P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J Neurochem* 2004;91:119-32.
  36. Cansev M. Involvement of uridine-nucleotide-stimulated P2Y receptors in neuronal growth and function. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2007;7:223-9.
  37. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972;24:509-81.
  38. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 2006;147:172-81.
  39. Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem* 1997;272:24348-54.
  40. Lazarowski ER, Harden TK. Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br J Pharmacol* 1999;127:1272-8.
  41. Dobolyi A, Reichart A, Szikra T, et al. Analysis of purine and pyrimidine bases, nucleosides and deoxynucleosides in brain microsamples (microdialysates and micropunches) and cerebrospinal fluid. *Neurochem Int* 1998;32:247-56.
  42. Dobolyi A, Szikra T, Kekesi AK, Kovacs Z, Juhasz G. Uridine is released by depolarization and inhibits unit activity in the rat hippocampus. *Neuroreport* 1999;10:3049-53.
  43. Dobolyi A, Reichart A, Szikra T, Nyitrai G, Kekesi AK, Juhasz G. Sustained depolarisation induces changes in the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus. *Neurochem Int* 2000;37:71-9.
  44. Durrell J, Garland JT, Friedel RO. Acetylcholine action: biochemical aspects. *Science* 1969;165:862-6.
  45. Blokland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Rev* 1995;21:285-300.
  46. Greenwald BS, Davis KL. Experimental pharmacology of Alzheimer disease. *Adv Neurol* 1983;38:87-102.
  47. Ulus IH, Wurtman RJ. Choline administration: activation of tyrosine hydroxylase in dopaminergic neurons of rat brain. *Science* 1976;194:1060-1.

48. Cohen E, Wurtman RJ. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci* 1975;16:1095-102.
49. Veggetti M, Vuchnik S, Losavio A. Effect of purines on calcium-independent acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 2008;154:1324-36.
50. Sperlagh B, Vizi ES. Effect of presynaptic P2 receptor stimulation on transmitter release. *J Neurochem* 1991;56:1466-70.
51. Wang L, Albrecht MA, Wurtman RJ. Dietary supplementation with uridine-5'-monophosphate, a membrane phosphatide precursor, increases acetylcholine level and release in striatum of aged rat. *Brain Res* 2007;1133:42-8.
52. Czech C, Berndt P, Busch K, et al. Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS One* 2012 ;7:e31501.
53. Lai MKP, Tan MGK, Kirvell S, et al. Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *J Neural Transm* 2008;115:1165-1172.
54. Davidson JN, Cohen WE. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. Vol 3. New York: Academic Press Inc; 1964.
55. Wiegand F, Liao W, Busch C, et al. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Meta* 1999;19:1229-1237.
56. Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS. Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* 2009;7:701-47
57. Baqi Y, Weyler S, Iqbal J, Zimmermann H, Muller CE. Structure-activity relationships of anthraquinone derivatives derived from bromaminic acid as inhibitors of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). *Purinergic Signal* 2009;5:91-106.
58. Lazarowski ER, Boucher RC. UTP as an extracellular signalling molecule. *News Physiol Sci* 2001;16:1-5.
59. Tatur S, Kreda S, Lazarowski E, Grygorczyk R. Calcium-dependent release of adenosine and uridine nucleotides from A549 cells. *Purinergic Signal* 2008;4:139-46.
60. Gasser T, Moyer JD, Handschumacher RE. Novel single pass exchange of circulating uridine in rat liver. *Science* 1981;213:777-8.
61. Thorell L, Sjoberg LB, Hernell O. Nucleotides in human milk: sources and metabolism by the newborn infant. *Pediatr Res* 1996;40:845-52.
62. Van Groening CJ, Peters GJ, Nadal JC, Laurensse E, Pinedo HM. Clinical and pharmacologic study of orally administered uridine. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:437-41.
63. Wurtman RJ, Ulus IH, Cansev M, Watkins CJ, Wang L, Marloff G. Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Res* 2006;1088:83-92.
64. Cansev M, Wurtman RJ. Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein levels in gerbils. *Neuroscience* 2007;148:421-31.

65. Sakamoto T, Cansev M, Wurtman RJ. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res* 2007;1182:50-9.
66. Ross BM, Moszczynska A, Blustajn JK, Sherwin A, Lozano A, Kish SJ. Phospholipid biosynthetic enzymes in human brain. *Lipids* 1997;32:351-8.
67. Westerink BH. Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;747:21-32.
68. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:299-309.
69. Crack BE, Pollard CE, Beukers MW, et al. Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* 1995;114:475-81.
70. Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol* 2007;152:141-50.
71. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 1996;50:224-9.
72. Lustig KD, Shiao AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:5113-7.
73. Mishra SK, Braun N, Shukla V et al. Extracellular nucleotide signalling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 2006;133:675-84.
74. Teather LA, Wurtman RJ. Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats. *Learn Mem* 2005;12:39-43
75. Teather LA, Wurtman RJ. Chronic administration of UMP ameliorates the impairment of hippocampal-dependent memory in impoverished rats. *J Nutr* 2006;136:2834-7.
76. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8:752-8.
77. Wang M, Kong Q, Gonzalez FA, et al. P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocy migration. 2005; 95(3):630-40.
78. Camden JM, Schrader AM, Camden RE, et al. P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 2005;280:18696-702.
79. Ajit D, Woods LT, Camden JM, et al. Loss of P2Y2 nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer' s disease. *Mol Neurobiol* 2013; 10.1007/s12035-013-8577-5 Epub ahead of print.

80. Siow NL, Choi RC, Xie HQ, et al. ATP induces synaptic gene expressions in cortical neurons: transduction and transcription control via P2Y1 receptors. *Mol Pharmacol* 2010;78:1059-71.
81. Choi RC, Chu GK, Siow NL, et al. Activation of UTP-sensitive P2Y2 receptor induces the expression of cholinergic genes in cultured cortical neurons: a signalling cascade triggered by Ca<sup>2+</sup> mobilization and extracellular regulated kinase phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2013;84:50-61.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, uzmanlık tezimi hazırlamamda önemli katkıları bulunan, her durumda anlayış ve sabır gösteren değerli hocam Doç. Dr. Mehmet CANSEV'e ve başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL olmak üzere Prof. Dr. Vahide SAVCI, Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN, Prof. Dr. Sinan ÇAVUN, Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY, Doç. Dr. M. Sertaç YILMAZ'a, asistanlık hayatına birlikte başladığım en büyük desteğim Dr. Hasret YÜCEL ÖZBÖLÜK'e asistanlığım boyunca kimya ve hayata dair çok şey öğrendiğim Kimyager Sami AYDIN'a, uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Cenk COŞKUN, Dr. Nesrin FİLİZ BAŞARAN, Dr. Sema BÜYÜKUYSAL'a, tezimin her aşamasında desteğini ve arkadaşlığını esirgemeyen, tezimi benim kadar sahiplenen çalışma arkadaşlarım Biyolog Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL ve Biyolog Mesut TÜRKYILMAZ'a, hayatı büyük bir aile gibi paylaştığım değerli doktora ve yüksekisans öğrencisi arkadaşlarım Tıbbi Biyolog Çiğdem SEVİM, Ecz. Z. Gözde SÖZER, Ecz. K. Merve GÜRBÜZOĞLU, Ecz. Zülfiye GÜL'e, tüm resmi ve idari işlerimizin sorunsuz bir şekilde yürümesini sağlayan tıp fakültesi personel bürosu çalışanlarına teşekkür ederim.

Her konuda bana destek olan sevgili eşim Orhan ORHAN'a ve her zaman yanımda olan canım kardeşime, bugünlere ulaşabilmem için her türlü fedakarlığı yapan en büyük dayanaklarım anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK (108S354) tarafından desteklenmiştir.



## ÖZGEÇMİŞ

18 Eylül 1983 yılında İzmir'de doğdum. İlk öğrenimimi Ülkü ilkokulu'nda, orta öğrenimimi Gazi Ortaokulu'nda ve lise öğrenimimi Turgutlu Lisesi'nde tamamladım. Tıp eğitimimi, 2001-2008 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde aldım. 2009 Nisan dönemi Tıpta Uzmanlık Sınavı ile uzmanlık eğitimi hakkı kazandığım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim.