

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

MPTP UYGULANAN FARELERDE
YAĞ ASİDİ AMİD HİDROLAZ ENZİM (FAAH) İNHİBİTÖRÜ
URB597' NİN OKSİDATİF STRES VE DAVRANIŞ ÜZERİNE
ETKİSİ

Proje No: TYL-2013-4413

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Yrd. Doç. Dr Zafer SEZER
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/ Farmakoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı
Meltem TANBAY
Arş.Gör.Mehmet KARA
Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Farmakoloji Anabilim Dalı

EYLÜL 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve deneyiminden yararlandığım, her daim desteğini hissettiğim çok değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Zafer SEZER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını aldığım Dr. Mehmet KARA, Dr. Özlem ERÇAL, Araş. Gör. Soner BİTİKTAŞ, Dr. Vet. Hek. Zeynep SOYER SARICA, Yrd. Doç. Dr. Mürsel KARABACAK, Doç. Dr. Murat KANBUR, Doç. Dr. Gökhan ERASLAN'a ve deneylerim sırasında ki özverili yardımlarından ötürü, Veterinerlik Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Muhammet Yasin TEKELİ'ye, istatistiksel değerlendirmeler konusunda yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr Ferhan ELMALI'ya, deney hayvanları konusunda yardımlarını aldığım Vet. Tek. Hasan YÜCE ve Biyolog Celil ÜNVER'e, tezimi bitirmem konusunda beni destekleyen arkadaşlarım Esra KÖNGÜL, Duygu EROĞLU, Leyla PAŞAYEVA, Pınar DÜNDAR, Meryem TAŞCI, A. Hüseyin DOKUMACI'ya, bu süreçte her an desteğini gördüğüm çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ'a ve Uzm. Ecz. Çiğdem YÜCEL'e, beni yüksek lisans yolculuğumda da yalnız bırakmayan can dostum, kardeşim Büşra KARACA'ya ve Betül YOZGATLI ÖZTÜRK'e, literatür tararken kaynaklarını sınırsızca kullandığım Tübitak Ulakbim'e, yüksek lisans eğitimim süresince sağladığı burs ile yanımda bulunan, maddi ve manevi desteğini aldığım Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma (TÜBİTAK) ailesine, aileme, ve teşekkür etmeyi unutmış olabileceğim, bu süreçte yanımda/arkamda duran herkese sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmayı destekleyen **Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne**, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Meltem TANBAY

Kayseri, Eylül 2014

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. PARKİNSON HASTALIĞI.....	3
2.1.1. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Parkinson Hastalığının Belirtileri.....	3
2.1.3. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi.....	3
2.1.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi.....	4
2.1.5. Parkinson Hastalığının Tedavisi.....	6
2.2.BAZAL GANGLİYON DÖNGÜSÜNDE DOPAMİN VE ENDOKANNABİNOİDLER.....	7
2.3. MPTP.....	12
2.3.1.MPTP Davranış Modelleri.....	13
2.3.1.1. Açık Alan Testi.....	14
2.4.ENDOKANNABİNOİDLER.....	14
2.5.URB597.....	18
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1. KİMYASALLAR.....	21
3.2.ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	21
3.3. HAYVANLAR.....	21
3.4. DENEY PROSEDÜRÜ.....	21
3.5.YÖNTEMLER.....	22
3.5.1.Lokomotor Aktivite Ölçümü.....	22
3.5.2.Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi.....	25
3.5.2.1.Beyin Doku Homojenatlarının Hazırlanması.....	25
3.5.2.2. Beyin Protein Düzeylerinin Ölçümü.....	25
3.5.2.3. Beyin MDA Düzeylerinin Ölçümü.....	26
3.5.2.4. Beyin CAT Aktivitesinin Ölçümü.....	26
3.5.2.5. Beyin SOD Aktivitesinin Ölçümü.....	26
3.5.2.6. Beyin GSH-Px Aktivitesinin Ölçülmesi.....	27
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	27
4.BULGULAR.....	28
4.1. AÇIK ALAN TEST SONUÇLARI.....	28
4.1.1. Kontrol Grubu Açık Alan Test Sonuçları.....	28
4.1.2. MPTP Grubu Açık Alan Test Sonuçları.....	29
4.1.3. URB+MPTP Grubu Açık Alan Test Sonuçları.....	30
4.1.4. URB Grubu Açık Alan Test Sonuçları.....	32
4.1.5. Gruplar Arasında Gün Bazında Katedilen Mesafe ve Hareket Hızı.....	33
4.2. BEYİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ.....	35
4.2.1. MDA Düzeyleri.....	35
4.2.2. SOD Aktiviteleri.....	36
4.2.3. CAT Aktiviteleri.....	36
4.2.4. GSH-Px Aktiviteleri.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38

ÖZET

Parkinson hastalığının sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres ile yakından ilişkili olabileceğini işaret eden çalışmalar vardır. Bu çalışmada, selektif yağ asidi amid hidrolaz enzim (FAAH) inhibitörü URB597 (sikloheksilkarbamik asit 3'-karbamoil-bifenil-3-il ester)'nin MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridin) uygulanan farelerde oksidatif stres ve davranış üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışmada BALB c türü erkek yetişkin fareler kullanıldı. Fareler 4 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak bulunduruldu. İkinci gruba MPTP-HCl (30 mg/kg/gün, i.p.), 3. gruba URB597 (0.3 mg/kg/gün, i.p.) ve 1 saat sonrasında MPTP-HCl, dördüncü gruba URB597 uygulandı. Farelerin lokomotor aktivitesi (katedilen mesafe ve hareket hızı), açık alan testi ile ölçüldü. 5. gün fareler dekapitasyonla öldürülerek beyin dokuları çıkarıldı. Beyin homojenatlarında beyin antioksidan enzim düzeyleri [süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px)] ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Tek başına uygulanan URB597'nin, kontrol grubu ile kıyaslandığında, tüm beyin homojenatında antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri ve açık alanda davranış parametreleri üzerine bir etkisinin olmadığı görülmekle birlikte URB597, MPTP ile kombine edildiğinde, lokomotor aktivitede azalmaya ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, MPTP grubu ile kıyaslandığında enzim düzeylerinde ve MDA düzeyinde azalmaya neden oldu. Enzim düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu değişimler, URB597'nin parkinson hastalığının erken dönemlerinde oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceğini düşündürdü. URB597'nin parkinson hastalığındaki net etkisinin değerlendirilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: MPTP, URB597, BALB c, oksidatif stres, açık alan testi.

ABSTRACT

However cause of Parkinson's disease are not known completely, there are studies indicating that it is closely related to mitochondrial dysfunction and oxidative stress. In this study, effects of URB597 (selective fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme inhibitor, cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester) on oxidative stress and behavior in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) applied mouse were investigated.

In this study adult male BALB c mice were used. Mice were divided into 4 groups. The first group was hold as control group. MPTP-HCl (30 mg/kg/day, i.p.) was administered to the second group. To the third group URB597 (0.3 mg/kg/day, i.p.) and MPTP-HCl (1 hour after from administration of URB597), to the forth group URB597 were administered. The mice were tested with open field test to measure locomotor activity (distance moved, velocity). In 5th day, the mice were mice were sacrificed and brain tissues were removed with decapitation. Brain homogenates were prepared and then brain antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px)] and malondialdehyde (MDA) levels were measured.

Alone administered URB97, when compared with control group, didn't show a effect either on antioxidant enzyme activities and MDA levels in whole brain homogenates or on the parameters of behavior in open field test. When URB597 combined with MPTP, it caused a reduction in locomotor activity and it seems to cause a reduction in antioxidant enzymes and MDA levels compared with MPTP group (but this effect wasn't statistically significant). These statistically not important changes in enzyme levels were thought us that URB597 may protect aganist oxidative damage in early stages of Parkinson's disease. To assess the net effect of URB597 in Parkinson's disease, it was thought that further works are needed.

Keywords: MPTP, URB597, BALB c, oxidative stress, open field test.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), genellikle 50-60 yaşları arasında başlayan, yavaş ilerleyen, kronik bir hastalık olup (1) hareketin yavaşlaması, kas tonusunun artışı, spontan hareketlerin azalması ve tremor ile karakterizedir (2). Bugüne kadar ne medikal ne de cerrahi bir tedavinin PH'nın ilerleme hızını yavaşlattığı kesin bir şekilde gösterilememiştir. Levodopa kullanan hastaların 5 yıl içinde % 50'sinde motor dalgalanma, % 35'inde diskinezi gelişir (3).

Beyinde MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin)'nin monoamin oksidaz (MAO B) tarafından oksidasyonunun serbest radikal oluşturduğu, artan serbest radikal artışının ilerde kompleks I fonksiyonunu inhibe edebileceği bildirilmiştir (4). Kompleks I'in inhibisyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırır, bu moleküller nükleik asitler, proteinler ve lipitler ile reaksiyona girip hücrel hasara neden olabilir. MPTP'nin mitokondriyal elektron taşıma sistemini, kompleks I'i inhibe ederek bloke etmesinin keşfedilmesiyle birlikte, oksidatif fosforilasyon zincirindeki bozulmanın, parkinson patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür (5). Lipid peroksidasyonunun sonuç ürünleri olan malondialdehit (MDA) oksidatif hasarın göstergesi olarak kullanılmaktadır. Organizma kendini serbest radikal hasarına karşı korumak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirir. Bu savunma mekanizmaları antioksidan enzimler, serbest radikal yakalayıcılar ve metal şelasyon ajanlarını içerir (4).

Endokannabinoid ligandlar, onların sentez ve yıkıcı enzimleri ve reseptörleri, diğer beyin bölgeleriyle kıyaslandığında, özellikle bazal gangliyon yapılarında bol bulunur. Bu, kannabinoid sinyal sisteminin hareket kontrolündeki önemli düzenleyici görevinin bir sonucudur. Genel olarak, kannabinoid sinyali aktive eden substratlar (örneğin direkt reseptör agonistleri, endokannabinoid inaktivasyon inhibitörleri) hareketin kontrolünde güçlü etkilere sahiptir (6). Endokannabinoid sistemin, nöronlara zarar veren farklı uyarılara cevapta aktive olduklarına dair kanıtlar vardır. Örneğin anandamid düzeyi, farklı etiolojideki nöronal hasar sonrası artmaktadır (7). Rodent ve primat parkinson modellerinde ve parkinson hastalarında, dopamin tükenmesini takiben striatal endokannabinoid sistemin nörokimyasal ve nörofizyolojik değişmelere uğradığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerin birçoğu, fizyolojik dopaminerjik sistem düzeltildiğinde tersine dönmektedir (8).

Deneysel 6-hidroksidopamin parkinson modelinde, striatum'daki dopamin kaybına, FAAH (yağ asidi amid hidrolaz) aktivitesinde bir azalma ile birlikte anandamid (endojen bir kannabinoid) düzeyinde bir artış eşlik eder (7). URB597 (selektif FAAH enzim inhibitörü), FAAH enzimi için belirgin selektivite gösterir ve beyin anandamid seviyesini arttırır (9).

Yapılan bu çalışmada, MPTP uygulanan farelerde URB597'nin oksidatif stres ve davranış üzerine etkisi araştırıldı. Parkinson hastalığının tedavisinde, kannabinerjik sistem modülasyonunun yeni bir terapötik yaklaşım olup olmayacağı araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. PARKİNSON HASTALIĞI

Parkinson hastalığı (PH) beyinde nigrostriatal dopaminerjik yolağın nöronlarının sayıca azalmasına bağlı olarak bazal gangliyon'lardaki (özellikle corpus striatum'daki) nöromediyatör dopamin'in fazla azalması sonucu gelişen kronik idiopatik bir hastalıktır (10).

2.1.1. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

Parkinson hastalığının sanayileşmiş ülkelerde prevalansı genelde tam nüfusun % 0.3'üdür ve 60 yaş üzeri insanlarda yaklaşık % 1'dir. Parkinson hastalığı yaşla ilişkili bir hastalık olup 50 yaşından önce nadir görülür ve yaşla birlikte prevalansı artar (11).

2.1.2. Parkinson Hastalığının Belirtileri

Parkinsonizmin mevcut tanı kriteri, dinlenme tremoru, bradikinezi, rijidite ya da postural dengesizlik gibi semptomlardan en az iki tanesinin varlığını gerektirir (11). Parkinson hastalığının hem hipokinetik hem de hiperkinetik nitelikleri vardır. Hipokinetik özellikleri; akinezi ve bradikinezi iken, hiperkinetik nitelikler; rijidite ve tremordur (12).

2.1.3. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi

Parkinson hastalığı, çevresel faktörler (pestisit, metal, antidopaminerjik ajanlar), genetik yatkınlıklar ya da iki tip faktörün kombinasyonu gibi farklı nedenlerle oluşabilir (13). Parkinson genlerinin bulunuşu, kalıtsal yatkınlık faktörleri üzerine ilgiyi arttırmıştır (5). Tüm parkinson vakalarının yaklaşık % 90'ının sporadik olduğu görülmektedir (11). Henüz sporadik parkinsonun sebebi olarak gösterilebilecek spesifik bir toksinin varlığını gösteren yeterli veri bulunmamaktadır. Endojen bir toksin de parkinson nörodejenerasyonundan sorumlu olabilir. Endojen toksinlerin bir kaynağı, dopaminin normal metabolizması olabilir. Bu, yıkıcı reaktif oksijen türleri oluşturur. Çevresel maruziyet nedeniyle normal metabolizmanın bozulması, toksik substrat üretebilir (5).

2.1.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi

İdiyopatik parkinson hastalığı, beyindeki dopaminerjik yolların en büyüğü olan nigrostriatal yolda oluşan nöronal hasar ile doğrudan ilişkilidir. Nigrostriatal yoldaki nöronlarda oluşan dejenerasyona bağlı olarak yeterince dopamin üretilmemesi ve dopaminerjik etkinliğin azalması hastalığın başlıca nedenidir (14). Hastalıkta SNpc depigmentasyona uğrar (koyu kahverengi pigment üreten nöromelanin kaybı). SNpc'da dopaminerjik nöronlarında lewy cisimcikleri gösterilmiştir. Hastalığın patogenezi hakkında 2 temel hipotez vardır; birinci hipoteze göre, proteinlerin yanlış kıvrılması (*misfolding*) ve agregasyonu, SNpc dopaminerjik nöronlarının ölümünde etkilidir. Diğeri ise; mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin sorumlu olduğunu öne sürer (5).

Proteolitik stres hipotezi, parkinson hastalığındaki nigral nöron kaybını, yanlış kıvrılmış ve kümelenmiş proteinlerin birikmesine bağlar (15). Proteinlerin beyin dokularında anormal birikmesi, parkinson gibi yaşla ilişkili birkaç nörodejeneratif hastalığın bir özelliğidir. Protein agregatları, hücreyi deforme ederek ya da nöronlarda hücre içi trafik ile etkileşerek direkt olarak hasara neden olabilir. Protein inklüzyonları, ayrıca hücre canlılığı için önemli proteinlere el koyar. Sporadik parkinson hastalığında, disfonksiyonel protein metabolizması tetikleyicilerden biri oksidatif stres olabilir (5).

MPTP'nin mitokondriyal elektron taşıma sistemini, kompleks I'ı inhibe ederek bloke etmesinin keşfedilmesiyle birlikte, oksidatif fosforilasyon zincirinde bozulmanın, parkinson patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür (5). Takip eden çalışmalarda, parkinson hastalığında anormal kompleks I aktivitesi tanımlanmıştır (16). İn vitro çalışmalar, kompleks I zincirindeki bozulmanın, hücreleri oksidatif stres ve enerji çöküşüne maruz bırakabileceğini göstermiştir. Kompleks I'in inhibisyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) superoksit üretimini artırır. Bu, toksik hidroksil radikalini oluşturabilir ya da nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir. Bu moleküller, nükleik asitler, proteinler ve lipitler ile reaksiyona girerek hücre hasarına neden olabilir. Bu reaktif türlerin bir hedefi elektron taşıma zinciri olabilir. Mitokondri ilişkili enerji çöküşü, dopaminin veziküler depolanmasını bozabilir, serbest sitozolik dopamin konsantrasyonu artabilir ve hücre hasarına neden olan yıkıcı dopamin aracılı reaksiyonlara izin verebilir (5).

Hücre içindeki dopamin, monoamin oksidaz A tarafından ya da otooksidasyon ile parçalanır. Dopaminin hücre içi otooksidasyonu, H₂O₂ ve dopamin-quinon oluşturur.

Dopaminin metabolizması sırasında üretilen H_2O_2 , ferri demir (Fe^{+2}) varlığında, fenton reaksiyonu tarafından hidroksil radikale dönüştürülebilir. Hidroksil radikallerin demir aracılı katalizi, parkinson hastalığında oksidatif strese yol açan anahtar patojenik bir mekanizma olabilir. Postmortem araştırmalar, oksidatif stresin sadece sağlıklı nöronların bir özelliği olmadığını, hasta insanların nigral dokularının da bir özelliği olduğunu göstermektedir. SN'da protein oksidasyonunun göstergesi olan karbonil modifikasyonları, normal birey bazal gangliyon ve prefrontal korteksi ile kıyaslandığında 2 kat artmıştır (15). Lipid peroksidasyonunun son ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE), oksidatif hasarın bir göstergesi olarak kullanılabilir (4). Parkinson hastalığında SN'da 4-HNE düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında yaklaşık 6 kat artmıştır. Parkinson hastalarının SN'sında, aynı yaştaki kontroller ile kıyaslandığında, canlı nöronlara yerleşmiş glutatyon (GSH) düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca dopaminin MAO-A tarafından sinaptozomlarda metabolizmasının, GSSG (GSH'ın oksidasyon ürünü) düzeyinde yükselmeye yol açtığı gösterilmiştir. GSH ve GSSG düzeylerindeki değişiklikler, oksidatif stresteki bir artışı yansıtır ki bu durum muhtemelen dopamin oksidasyonundan kaynaklanır. GSH'ın tükenmesi, artmış dopamin ve H_2O_2 toksisitesine bağlanmıştır (15).

Organizma kendini serbest radikal hasarına karşı korumak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirir. Bu savunma mekanizmaları: antioksidan enzimler, serbest radikal yakalayıcılar ve metal şelasyon ajanlarını içerir. Antioksidan enzimler: katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksid dismutaz (SOD)'ı içerir. SOD, süperoksid'in hidrojen peroksite dönüşmesini katalizler. CAT ve GSH-Px, hidrojen peroksit (H_2O_2)'i suya çevirir (4). Orta beyinde glial hücrelerde GSH-Px yaygın olarak bulunmuştur. Bu, oksijen toksisitesine karşı H_2O_2 'i yakalayarak koruyan en potent enzimlerden biridir. GSH-Px, santral gri maddede de yüksektir. Parkinson hastalığında SNpc'da düşüktür. Ventral tegmental bölgede orta seviyededir (16). Normalde in vivo serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Artan oksidatif stres, çoklu doymamış lipidlerin hasar yapmasına neden olur (4).

Son raporlar, nöroinflamatuvar süreçlerin, parkinson hastalığının patogeneze katıldığını göstermektedir (17). Araştırmacılar tümör nekroz faktör- α , interlökin-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin, parkinson hastalarının postmortem beyinlerinde ve MPTP

uygulanan hayvanların nigrostriatal bölümlerinde arttığını göstermiştir (18). İn vivo ve in vitro deneylerden elde edilen kanıtlar, aktive olmuş mikrogliaların nöronlarda toksik etki gösterdiğini düşündürmesine rağmen, mikroglial aktivasyonun nöronal kaybı koruduğu ya da şiddetlendirdiği hala tartışılmaktadır. MPTP'ye maruz kalmış insanlardan elde edilen postmortem bulgularda, son maruziyetten 16 yıl sonra aktive olmuş mikroglia tespit edilmiştir. MPTP uygulanan primatların SN'sında yıllar sonra aktive olmuş mikroglia ve dopaminerjik hücre kaybı bulunmuştur (15).

2.1.5. Parkinson Hastalığının Tedavisi

Parkinson hastalığında semptomlar, motor ve nonmotor olarak iki grup oluşturur. Dopamin eksikliğine bağlı semptomlarda tedavi şekli dopamin replasman tedavisi şeklindedir. Motor olmayan semptomların tedavisi, non dopaminerjik etkili ilaçlarla olmaktadır (3). Başlangıç tedavisinde, özellikle levodopa veya dopamin agonistleri ilk tercih olmalıdır. Birçok merkezde bilişsel işlevleri sağlam, 70 yaşının altında olan hastalarda dopamin agonistleri ilk tercih olarak kullanılırken, kognitif bozukluk gelişen yaşlı hastalarda ilk tercih olarak levodopa kullanılmaktadır (19).

Bugüne kadar ne medikal ne de cerrahi bir tedavinin PH'nın ilerleme hızını yavaşlattığı kesin bir şekilde gösterilememiştir. PH'ında semptomatik medikal ve cerrahi tedaviler motor fonksiyonları düzeltir; fakat nörodejeneratif sürecin ilerlemesini engelleyemez. Zamanla hastaların büyük kısmında görülen donma, düşmeler, otonom disfonksiyonlar ve demans nigrostriatal dopaminerjik sistemin ötesinde patolojik sürecin gelişerek devam ettiğini gösterir ve dopaminerjik yerine koyma tedavisine yeterli yanıt alınmaz (3).

2.2.BAZAL GANGLİYON DÖNGÜSÜNDE DOPAMİN VE ENDOKANNABİNOİDLER

İstemli harekete ait komutlar, kortikal asosiyasyon alanlarından çıkar. Hareketler, korteks kadar bazal gangliyonlar ve beyin yarım kürelerinin lateral bölümlerinde planlanır. Bazal

gangliyon ve beyincik birlikte, bilgiyi talamus üzerinden premotor ve motor kortekse akıtan bir huni gibi çalışır (12). Bazal gangliyon'un, istemli vücut hareketlerinin kontrolü için gerekli olduğu kabul edilmektedir. Anatomik olarak bazal gangliyon, telensefalon, diensefalon ve ortabeyini kapsayan, birbirine bağlı subkortikal çekirdek topluluğudur. Bu yapıların anatomisi oldukça karmaşıktır. Fonksiyonel olarak bazal gangliyon, kaudat çekirdek (CD) ve putamen (PUT) (topluca striatum olarak isimlendirilir), globus pallidus (GP), substantia nigra (SN) ve subthalamic çekirdek (STN)'den oluşur (20). Çekirdek striatum, bazal gangliyon'un temel girdi çekirdeğidir, neokorteksin tüm fonksiyonel alt bölümlerinden glutamerjik kortikal girdileri alır ve talamik çekirdekten direkt olarak önemli bir girdi alır (7). Diğer striatum afferentleri, SNc'dan ve dorsal rafe çekirdeğinden serotonerjik afferentlerden dopamin içeren liflerdir. Bazı memelilerde striatum tek yapıdır; ama birçoğunda 2 bölümden oluşur, medial kaudate ve lateral putamen (2). Putamen, motor korteks bölgesinden glutamerjik aferent yolak alır ve GP ve talamus üzerinden premotor ve motor kortekse polisinaptik efferent yolak gönderir. Bu nedenle putamen'in tahribi, ekstrapiramidal motor bozuklukların oluşmasında önemli rol oynar. Kaudat çekirdeği ise duyu ve asosiyasyon korteksinden afferent alır. Bu çekirdeğin bozulması, parkinson hastalığının genellikle ilerlemiş döneminde ortaya çıkan kognitif ve motivasyonel davranış alanıyla ilgili davranış bozukluklarından sorumlu olabilir (10). Parkinson hastalığında dopamin tükenimi, dorsalateral putamen'de en belirgindir. Semptomların başlangıcında putamenal dopamin % 80'e yakın tükenmiştir ve SNpc dopaminerjik nöronlarının yaklaşık % 60'ı zaten kaybedilmiştir. Parkinson hastalığında mezolimbik dopaminerjik nöronlar daha az etkilenir. Sonuç olarak kaudat'da dopamin tükenimi düşük olur (5).

İnternal globus pallidus (GPi) ve substantia nigra pars retikülata (SNr) iki önemli çıkış istasyonudur, striatum'dan direkt projeksiyonlar alır. Talamus ve beyin kök motor bölgelerine sinyal gönderir. Çıkış nöronları striatum'da direkt ve indirekt yolak olarak ayrılır. İkisi de GABA'erdiktir (20).

Dopamin, bazal gangliyon'un fonksiyonunun belirlenmesinde kritiktir. Dopamin nöronları substantia nigra pars kompakta (SNc)'da yer alır ve striatum'a (ek olarak frontal kortikal ve limbik alanlara) projekte olur ve kortikostriatal sinyal iletimi üzerinden güçlü düzenleyici etki gösterir (20). Striatal dopamin seviyesinin azalması ve striatal GABA'erdik nöronların aktivitelerini inhibe etmekle görevli olan nigrostriatal yolaktaki

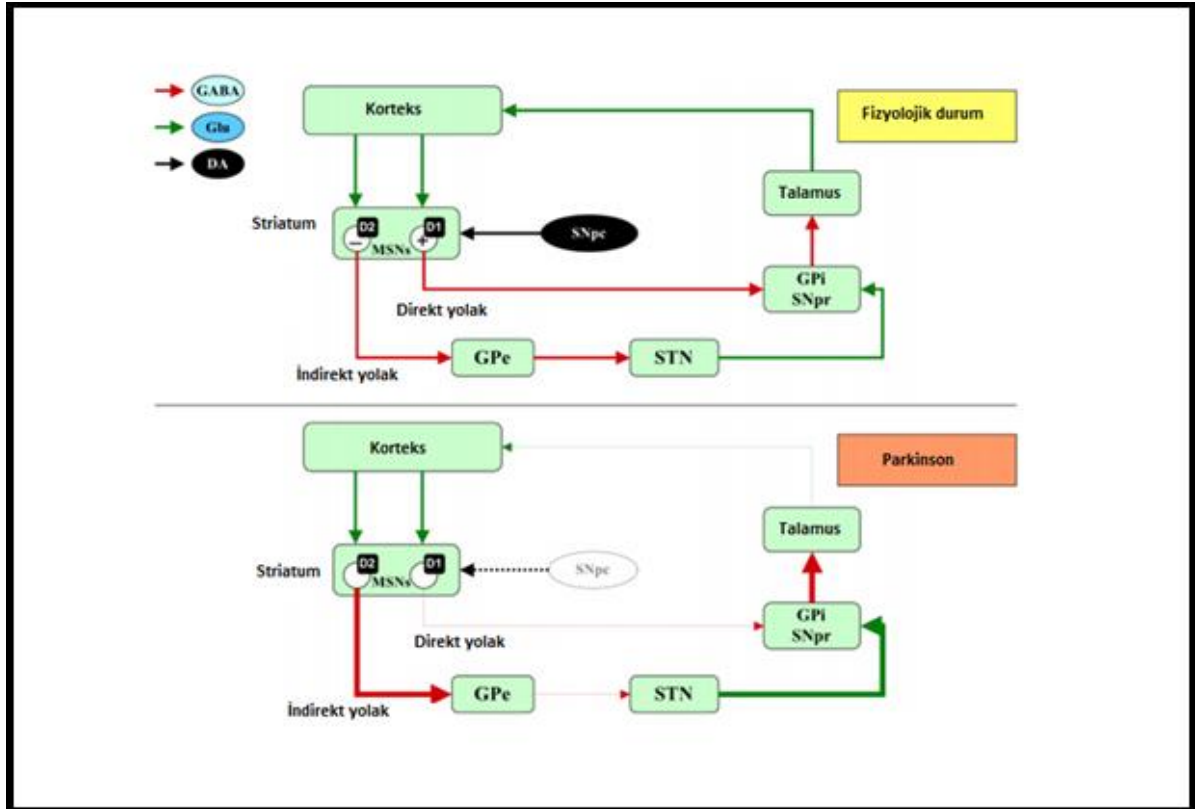
dopaminerjik nöronların dejenerasyonu, parkinsonizmin patolojik özellikleridir. GABA'erişik nöronların postsinaptik reseptörlerinin çoğu dopamin 2 (D2) reseptörleri alt grubundandır. Normal dopaminerjik nörotransmisyonun azalması, striatal GABA'erişik nöronlarda aşırı eksitasyon etkiye yol açar; böylece parkinsonizmde dopamin ve asetilkolin etkileri dengesiz olur (21). Nigrostriatal dopaminerjik yolağın korpus striatum'daki uçları, beyindeki total dopaminin yaklaşık % 75'ini içerir. Bu yolağın lokomasyonun eş güdümünde, optimizasyonunda ve postürün düzenlenmesinde rol oynadığı sanılmaktadır. Bu yolağın nöronlarının ve striatum'daki uçlarının dejenerasyonu, parkinson hastalığının oluşmasında rol oynar. Nigrostriatal yolağın aksonlarının striatum'daki uçlarından salıverilen dopamin, hem kortikostriatal sinir uçlarını inhibe ederek onların eksitator bir nöromedyator olan glutamat salıvermesini frenler hem de striatum'un intrinsik nöronları olan büyük kolinerjik nöronların somasında postsinaptik inhibisyon yapar (22). D1 dopamin reseptörleri, çoğunlukla direkt yolağın orta spin nöronları (MSN)'nda bulunur. D2 reseptörler özellikle indirekt yolağın MSN nöronlarınca sentezlenir (7, 12). SNpc'dan yükselen dopaminin direkt yolağın D1 üreten striatal nöronları aktive ettiği ve indirekt yolağın D2 üreten striatal nöronlarını inhibe ettiği düşünülmektedir (7). Parkinson hastalığındaki orta beyindeki ilerleyici dopaminerjik nöron kaybı, striatal dopamin düzeyini düşürür ve direkt ve indirekt bazal gangliyon yolak arasındaki dengenin değişmesini sağlar (23).

Parkinson hastalığında başlangıçta striatum'a dopaminerjik girdinin azalması, striatum ve diğer bazal gangliyon çekirdeklerinde nörokimyasal değişiklikler sürecini başlatır. Bu değişikliklerin bazıları dopamin kaybını kompanse etmeye çalışan endojen süreçlerdir (24). Hastalığın klinik öncesi (semptomsuz) döneminde ve başlangıcında iki dengeleme mekanizması etkinlik kazanır. Dopamin düzeyi % 30'luk bir azalma göstermesi üzerine etkinlik kazanan, presinaptik bir mekanizma olan dopamin yapım ve yıkımı (turnover)'nın artmasıdır. İkinci mekanizma striatal dopamin düzeyi daha fazla bir azalma gösterdikten sonra etkinlik kazanır. Bu mekanizma, striatum'da postsinaptik dopamin reseptör sıklığının artmasıdır (10).

Bunun sonucunda postsinaptik membranda dopamine karşı aşırı duyarlık oluşur (10). Diğer değişiklikler semptomların oluşumundan sorumludur. Semptomların oluşmasıyla kısmen ilgili olanlar (şekil 2.1) (24):

- GPe'a projekte olan striatal çıktı nöronlarına glutamerjik akışın artışı,
- GPe inhibisyonunun artması,

- Subtalamik çekirdeğin inhibisyonunun azalması,
- Subtalamik çekirdekten glutamerjik efferentlerin aşırı aktif olması, GPi ve SNr aşırı aktivitesine neden olur. Bu çekirdekler bazal gangliyon dışındaki motor çekirdeklere inhibitör projeksiyonlar göndermekle sorumludur. Böylece parkinson hastalığında bazal gangliyon etkisinin hedefleri aşırı inhibe olur.



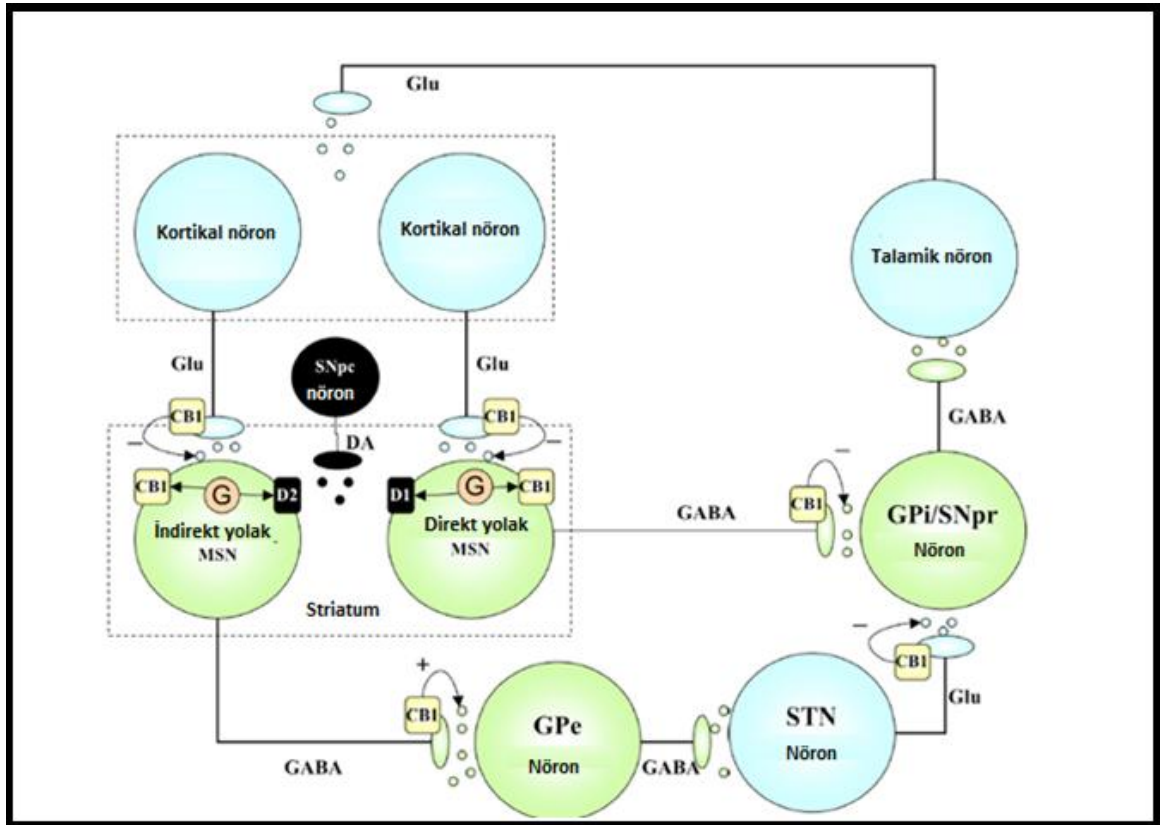
Şekil 2.1. Bazal gangliyonun fizyolojik bağlantıları ve dopamin tükeniminin döngü dinamikleri üzerine etkileri (7).

(DA: dopamin, GABA: gama-aminobütirik asit, Glu: glutamat, GPe: eksternal globüs pallidus, GPi: internal globüs pallidus, SNpc: substantia nigra pars kompakta, SNpr: substantia nigra pars retikülata, STN: subtalamik çekirdek).

Endokannabinoid ligandlar, onların sentez ve yıkıcı enzimleri ve reseptörleri, diğer beyin bölgeleriyle kıyaslandığında, özellikle bazal gangliyon yapıları (örneğin caudat-putamen, globüs pallidus, substantia nigra)'nda bol bulunur. Bu, kannabinoid sinyal sisteminin hareket kontrolündeki önemli düzenleyici görevinin bir sonucudur. Genel olarak, kannabinoid sinyali aktive eden substratlar (örneğin direkt reseptör agonistleri, endokannabinoid inaktivasyon inhibitörleri) hareketin kontrolünde güçlü etkilere sahiptir.

Bazal gangliyon boyunca birkaç GABA'rijik ve glutamerjik sinapslarda CB1 reseptörlerin tanımlanması, endokannabinoidlerin bu üç anahtar nörotransmitterin görevini doğrudan kontrol etmesine olanak sağlamaktadır. Farklı farmakolojik, elektrofizyolojik ve nörokimyasal çalışmalar, kannabinoid sinyalin bazal gangliyon devresi içinde esas görevinin, GABA'rijik ve glutamerjik sinapslarda 2.cil sinyal olduğunu desteklemektedir. Özellikle CB1 reseptörleri, striatonigral nöronlarda D1 reseptörleri ile birlikte bulunur ve globüs pallidus'a projekte olan nöronlarda D2 reseptörleri ile birlikte bulunur (6).

CB1 reseptörleri, striatal MSN nöronlarınca sentezlenir, (hem dentritlerinde hem de GPe, GPi ve SNr bölümlerini innerve eden presinaptik akson sonlarında) ve ayrıca kortikostriatal eksitator glutamerjik sonlar ve eksitator projeksiyonlarda (STN'den GPi/SNpr ve SNc'ya) bulunur. Kortikostriatal sonlardaki presinaptik CB1 reseptörlerinin aktivasyonu, glutamat salımını azaltır. Benzer şekilde bazal gangliyon çıktı çekirdeğinde CB1 reseptör aktivasyonu, hem STN afferentlerinden glutamat salımını hem de striatal afferentlerden GABA salımını inhibe eder. Bunun tersine, GPe'de presinaptik CB1 reseptör aktivasyonu, striatal afferentlerden bu çekirdeğe GABA re-uptake'ini azaltarak, lokal GABA düzeyini arttırabilir (şekil 2.2). D1 dopamin reseptörleri aracılı adenilil siklaz aktivasyonu, CB1 stimülasyonu ile tamamen bloke olabilir. D2 dopamin reseptörünün uyarılmasının, striatum'da endokannabinoidlerin salımını ile sonuçlandığı gösterilmiştir (7). Anandamid ayrıca belirli presinaptik olayları, striatum içindeki dopaminerjik sinapslarda, nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda yer alan geçici reseptör potansiyel vanilloid (TRPV1) reseptörleri üzerinden, doğrudan inhibe ediyor olabilir. Ancak, G protein/adenilil siklaz sinyal iletim mekanizmalarının (CB1 ve D1/D2 dopamin reseptörlerince kullanılır) düzeyinde etkileşerek dopamin iletimini düzenlemesi mümkündür (6).



Şekil 2.2. Bazal Gangliyon nöronal döngüsünde CB1 reseptörlerin üretimi ve fizyolojik fonksiyonu (7).

(DA: dopamin, GABA: gama-aminobütirik asit, Glu: glutamat, GPe: eksternal globüs pallidus, GPi: internal globüs pallidus, SNpc: substantia nigra pars kompakta, SNpr: substantia nigra pars retikülata, STN: subtalamik çekirdek).

Bazal gangliyon'da nöronal döngü ve özellikle striatum'da sinapslar, tekrarlanan nöronal yolak aktivasyonunu takiben, uzun süren fonksiyonel ve morfolojik modifikasyona uğrar. Sinaptik plastisite, kortikostriatal sinapslarda nöronal döngü dinamiklerinde görev alır. Kortikostriatal sinapslarda uzun dönem depresyon (LTD) ve uzun dönem potensiyalizasyon (LTP) oluşması için dopamin reseptör stimülasyonu gerekir ve parkinson deneysel modellerinde ve parkinson hastalarında hem striatum'da hem de motor korteks'de bozulmuştur. Endokannabinoidlerin, kortikal ve striatal nöronlar ile ilişkili sinapslarda LTD üretiminin bir formunun oluşturulmasında kritik rol aldığı gösterilmiştir. Striatum'da membran depolarizasyonu ve D2 dopamin reseptörünün uyarılması sonrası postsinaptik nöronlardan anandamid salınması presinaptik CB1 reseptörlerini aktive eden ikincil haberci gibi davranabilir ve böylece uyarıcı glutamerjik transmisyonun uzun süren depresyonunu indükleyebilir (7).

URB597 ve Kuinpirol (D2 reseptör agonisti) uygulamasının, katalepsiye önemli derecede azalttığı ve lokomotor aktiviteyi arttırdığı deneysel parkinson modelinde gösterilmiştir. Bu, endokannabinoid aracılı kortikostriatal sinapslarda, sinaptik plastisite formundan kurtulma ve parkinsonun motor semptomlarındaki düzelme arasındaki direkt korelasyonu işaret etmektedir (7).

2.3. MPTP

1980'li yıllarda dopaminerjik nörotoksin 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridin (MPTP) tesadüf sonucu keşfedilmiştir (25). MPTP, araştırmalar boyunca oksidatif stres, ROS, enerji çöküşü, inflamasyon gibi parkinson belirtilerinin birçoğunu gösteren, toksin bazlı hayvan modelidir. Parkinson hastalığının kesin karakteristiği lewy cisimciklerinin üretilmesidir. Bazı çalışmalar Lewy cisimciği benzeri inklüzyonların, MPTP uygulaması sonrasında göstermiştir (26). MPTP, primatlara ve rodentlere sistemik olarak uygulandığında, motor aktiviteyi ciddi bir şekilde bozar, striatal dopamin düzeyini düşürür ve ventral mezensefalon'da dopamin hücrelerinin kaybına neden olur (25). Dopaminerjik hücre kayıpları, baskın olarak substantia nigra'dadır. Fareler genellikle sistemik MPTP'ye cevapta ratlardan daha duyarlıdır, ratlar MPTP'ye dirençlidir. Fare türleri MPTP'ye cevapta farklı olabilir. C57BL/6 türü fareler, MPTP'ye BALB c türüne göre daha duyarlıdır (27). MPTP, yüksek lipofiliktir ve sistemik uygulama sonrası hızla kan-beyin bariyerini geçer. MPTP, beyinde ilk önce astrositlere girer ve monoamin oksidaz-B (MAO-B) tarafından aktif metaboliti olan MPP⁺'ye metabolize olur (26). Dopaminerjik nöronların mitokondrisinde MPP⁺ birikimi, mitokondriyal fonksiyonda bir bozukluğa neden olur. MPP⁺, solunum zincirinin kompleks I'ine bağlanır, elektron taşınmasını bloke eder (bu süreç geri dönüşlüdür) ve böylece ATP tüketimi ile enerji bozukluğuna neden olur ve serbest radikal üretiminde artışa neden olur. Özellikle poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi DNA tamiri için ATP'ye gereksinim duyan enzimler MPTP toksisitesinde kritik olarak yer alır (4, 25). Bu dejenerasyon, tedaviden birkaç saat sonra başlar ve 4 güne kadar sürer. MPTP uygulamasından 1 hafta sonra, tirozin hidroksilaz immünoreaktivite ve nissl boyalı hücre sayısında önemli bir azalma görülür. Ek olarak MPTP tedavisi sonrası dopamin reseptör yoğunluğu azalmıştır. MPP⁺, akut olarak dopamini sinaptosomal vezikülden çıkarır, dopamin ile indüklenen hidroksil radikal üretimini artırır (25).

Subakut MPTP rejimi günlük tek bir MPTP i.p. enjeksiyon (30 mg/kg)'unun ard arda 5 gün uygulanmasını kapsar ve akut rejimden daha progresif bir nörodejenerasyona neden olur. Bu % 40-50 striatal dopamin tükenimi ve % 30-40 hücre kaybına neden olur. Dopaminerjik lezyon apoptotik hücre ölümü ile olur ve MPTP uygulamasından sonra 21 gün içinde sabitlenir. Akut rejim çoğunlukla, nörodejenerasyon ile ilişkili inflamasyonu çalışmak için kullanılırken; subakut rejim öncelikle hücre ölümünün moleküler yolağını çalışmak için kullanılmaktadır (28).

2.3.1.MPTP Davranış Modelleri

Parkinson hastalarında sık görülen motor kusurların tamamını yansıtabilen davranış modeli bugüne kadar bulunamamıştır. Dopamin kaybının derecesi, toksin enjeksiyonunun dozu ve zamanı, enjeksiyonlar arasındaki zaman, davranışsal test ve genetik faktörlerin hepsi davranış çalışmasının sonucunu etkilemektedir (29).

Kemirgen parkinson modelinde oluşturulan motor bozukluğu ölçen çeşitli davranış testleri vardır. Örneğin açık alan testi ve yüzme testi gibi keşfedici (*exploratory*) testler ve öğrenilmiş ve/ya da doğuştan gelen yetenek testleri (rotarod, grid test, aşağı tırmanma testi, reaksiyon-zaman testi, pençe geri çekme testi, adımları ayarlama testleri) vardır. Ancak bu davranış testlerinin birçoğu ilk olarak hayvanın görevi öğrenmesini gerektirir, bu ölçümlerin birçoğu karmaşık görevlerdir. Karmaşık görevler doğuştan gelen motor yetenekleri ölçebilir; fakat bir görevi gerçekleştirmedeki başarısızlığın, motor bir kusurdan mı yoksa öğrenme kusurundan mı olduğu bilinmemektedir. Testler akinezi ve bradikineziyi yansıtmaktadır. Tremor ve rijiditeyi ölçen davranış modelleri olmasına rağmen, bunların karakterizasyonu, kemirgen denge için 4 uzuvuna bağımlı olduğu için zordur. Parkinson hastalığının davranış semptomları, striatal dopamin içeriğinin % 80'inden fazlası kaybolana kadar oluşmamaktadır. Kalıcı davranış bozukluklarını rotarod, hang test, genel aktivite gözlemi ile göstermek için çok büyük MPTP dozları (30 mg/kg günde 2 kez, 5 gün gibi) uygulanmalıdır ve oluşan davranış değişimleri çoğunlukla geçicidir (30). Daha spesifik davranış testleri kullanarak ya da MPTP'nin asetaldehit, probenesid gibi MPTP toksisitesini arttırıcılar ile birlikte uygulanması ile fare davranışının ölçülmesindeki zorlukların üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir. Davranış analizleri için en iyi seçenek, MPTP maymun modelidir (25).

2.3.1.1. Açık Alan Testi

MPTP uygulanan farelerin uzun dönem davranış bozukluğu göstermediği görülmüştür. Davranış bozukluğunun, yaşlı farelerde L-dopa uygulamasını takiben, genç farelerde ise striatal dopaminin artması (spontan iyileşme ile) sonucu düzeldiği görülmüştür (30). Fareler, MPTP'nin kısa dönem başlangıç toksik etkisi olarak sadece geçici davranış semptomları gösterir. Tükrük salgısının artışı (hipersalivasyon), nöbet ve hipokinezi gösterirler ve 24-48 saat içinde iyileşirler. Bazı gruplarda, uzun dönemde postural anormaller, bradikinezi ve tremor görülmüştür (25).

Açık alan testi, MPTP sonrası davranış aktivitesindeki değişiklikleri ölçmek için en sık kullanılan metottur. Hayvanların aktivitesi, açık alan boyunca gönderilen infrared ışınların ortalamasıyla gözlemlenir (31). Farelerin açık alan davranışı, 2 davranışsal parametreden etkilenir: aktivite ve duygusallık/anksiyete. Sonucun yorumlanması bu iki parametrenin karıştırılmasıyla yapılır. Bu yüzden bu test genellikle aktivite ya da anksiyetenin ölçülmesinde tek başına kullanılmamalıdır. Yeni çevreyi keşfetme ve hafif aydınlatılmış açık alandan korkma arasındaki doğal mücadeleyi gösterir. Hayvanın horizontal aktivitesi, total mesafe, vertikal aktivite (şahlanma sayısı) ve merkez mesafe sayılır. Merkez mesafenin toplam mesafe ve defekasyon hızına oranı duygusallığın bir ölçüsü olarak alınabilir. Ayrıca kendi kendine tırmanmanın gecikmesi ve sıklığı kaydedilebilir (32). Sonuçların doğrudan karşılaştırılması zordur; çünkü birçok faktör (yaş, cinsiyet, tür, MPTP uygulama rejimi, açık alan büyüklüğü) sonuca etki eder. Çalışmaların birçoğunda MPTP tedavisini takiben lokomasyonda bir azalma bulunmuştur. Bu, hipokineziyi gösterir. Hipoaktivite uygulamadan 30 dk sonra gösterilmiştir; bazı vakalarda 40 haftaya kadar sürmüştür (31).

2.4. ENDOKANNABİNOİDLER

Kannabinoidler, *Cannabis sativa L.*'nin psikoaktif bileşikleri ve analoglarıdır. Geniş in vivo ve in vitro çalışmalar, kannabinoid ilaçların, nöron koruyucu özelliklerinin olduğunu göstermektedir. Akut kannabinoid uygulamasının, değişik akut beyin hasarlarında koruyucu olabileceği gösterilmiştir. Kronik maruziyet ise bazı vakalarda nörotoksik olaylarla sonuçlanmıştır (33).

Endokannabinoidler ise G protein ilişkili reseptörlerin en az iki tipine bağlanabilen ve onları aktive edebilen bioaktif lipitlerdir (34). Endokannabinoid sistem kannabinoid ve vanilloid reseptörler, bunların endojen ligandları ve bu bileşiklerin biyosentezi-metabolizmasında sorumlu enzimlerden oluşur (35).

Endokannabinoidlerin çeşitli SSS fonksiyonları (açlık düzenlenmesi, durum (*mood*) kontrolü, ödül, motor fonksiyon, immün cevap ve ağrı) üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (36).

CB1 reseptörler, internöronlarda, glutamerjik sonlarda, striatum'dan substantia nigra ve globus pallidus'a kadar GABA'rlık nöronal uçlarda yer alır (36, 37). CB1 reseptör stimülasyonu, GABA'nın geri alım (re-uptake)'ını azaltır. GABA inhibitör bir nörotransmitterdir, bu yüzden istemli hareketin azalmasıyla sonuçlanır, bu da parkinson semptomlarına benzemektedir (37). CB1 aracılı gaba ve glutamat salımının baskıladığı da gösterilmiştir (36). Anandamid'in TRPV1 üzerine içsel (intrinsik) etki gücü (efikasitesi), CB1 reseptörlerine olandan daha düşüktür (38). İn vitro çalışmalar, FAAH aktivitesinin inhibisyonunun anandamid'in TRPV1 üzerine gücünü arttırdığını göstermektedir (36). TRPV1, Ca'a geçirgen bir iyon kanalıdır, CB1'in aksine glutamat salımını arttırabilir. Glutamat NMDA reseptörlerine etki ederek ve Ca⁺² içeri akışını arttırarak nöronal nitrik oksit sentaz enzimini aktive edebilir ve NO üretimini arttırabilir (38).

Kannabinoid reseptörlerin keşfini takiben birçok endojen kannabinoid reseptör ligandı tanımlanmıştır (37). En çok çalışılan endokannabinoid, anandamid (AEA) ve 2-araşidonilgliserol (2-AG)'dür (39). Anandamid düzeyi, yüksek konsantrasyonda saptandığı farklı bazal gangliyon bölümleri hariç, genellikle tüm beyinde düşüktür (8). Anandamid, nöromodülatör olarak etki gösterir. Astrositlerde gap junction permeabilitesini düzenleyerek hücre içi iletişimi kontrol edebilir. Anandamid endotel ile etkileşen arterlerin düz kas hücrelerinin membran potansiyelini hiperpolarize eder. Hemorajik şok sonrasında anandamid salımı artmıştır (40). Son zamanlarda ikinci bir endokannabinoid, 2-AG izole edilmiştir (37).

Endokannabinoid sistemin, nöronlara zarar veren farklı uyarılara cevapta aktive olduklarına dair kanıtlar vardır. Örneğin anandamid düzeyi, farklı etiyojideki nöronal hasar sonrası artmaktadır ve CB1 reseptörleri, hasar ya da inflamasyona cevapta beyin hücrelerinde artmaktadır (7).

Endokannabinoidler N ve P/Q tipi kalsiyum kanallarını kapatarak glutamat aracılı iletimi (CB1 aracılığıyla) inhibe etme yoluyla eksitotoksisiteyi önleyerek, pre ve postsinaptik

düzeyde Ca^{+2} içeri girişini azaltarak, fenol grubuna sahip çeşitli kannabinoidlerin antioksidan aktivitesiyle, tümör nekrozis faktör 1 α 'yı baskılayarak, fosfatidilinositol 3-kinaz ve protein kinaz B yolağını aktive ederek, ekstrasellüler düzenlenen kinazların fosforilasyonunu indükleyerek, transkripsiyon faktörleri ve nörotropinlerin sentezini indükleyerek nöroprotektif etki gösterirler (41).

Wise ve ark. FAAH (-/-), CB1 (-/-) ve wild tipi farelere (C57BL/6) anandamid uygulamışlardır. Anandamid, FAAH (-/-) farelerde analjezi, katalepsi ve hipotermi oluşturmuştur. Bu etkilerin CB1 (-/-) ve wild tipi farelerde oluşmaması, bu etkide bir CB1 reseptör mekanizmasının etkisini düşündürmüştür. Ayrıca anandamid tüm genotiplerde hipomotilite oluşturmuştur. Bu, anandamid'in lokomotor aktiviteyi CB1 reseptör ya da metabolizma ürünlerinden başka bir mekanizma ile etkileyebileceğini göstermiştir (42).

Rodent ve primat parkinson modellerinde ve parkinson hastalarında, dopamin tükenmesini takiben striatal endokannabinoid sistemin nörokimyasal ve nörofizyolojik değişmelere uğradığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerin birçoğu, fizyolojik dopaminerjik düzeyi düzeltildiğinde tersine dönmektedir (8). Dopamin tükenimini takiben, striatal fonksiyonu düzeltmek için, endojen bir dengeleyici (kompensatör) mekanizma oluşur. Deneysel 6-hidroksidopamin parkinson modelinde, striatum'daki dopamin kaybına, FAAH aktivitesinde bir azalma ile birlikte anandamid düzeyinde bir artış eşlik eder. İki olayın, striatal CB1 reseptör stimülasyonunu arttıracakı düşünülmektedir. Parkinson hastalarının striatum'unda, CB1 reseptör bağlamasında bir artış ve reseptör aktivasyon etkinliğinde bir artış bulunmuştur. Tedavi görmemiş parkinson hastalarında, serebrospinal sıvıda endojen kannabinoid anandamid'in arttığı gösterilmiştir (7). Hayvanlarda yapılan çalışmada parkinson hastalığının erken ve pre-semptomatik aşamalarında CB1 reseptörlerin azaldığı gözlenmiştir, bu hastalığın erken bir göstergesi olabilir (13). Parkinson hastalığı sırasında, endokannabinoidler başlangıçta indirekt yolağın GABA'erjik orta spin nöronlarına postsinapte olan nöronlarca sentezlenir. Ayrıca bu orta spin nöronlarından sentezlenebilir. Bu iki durum da hareketi (lokomosyon) tamir etmeye yardım edebilir. Böylece endokannabinoidlerin parçalanmasını inhibe etmek, parkinsonun erken döneminde etkili olabilir (43).

Hastalık ilerler ilerlemez parkinsonun major semptomları görülür, kannabinoid sinyal sistemi aşırı aktif hale gelir (13). Hastalığın ileri fazında endokannabinoidler, direkt yolağın GABA'erjik orta spin nöronlarına yayılabilir. Direkt yolak orta spin nöronları

hareketin başlamasıyla ilgilidir. Bu nöronlara yayılan endokannabinoid, ikincil inhibitör etki gösterir ve hareket bozukluğunu artırır (43). Bu aşırı aktivitenin genel olarak levodopa ile tersine çevrilmesi, parkinsonian bradikineziye karşı CB1 reseptör blokajının yararlı olabileceği fikrini desteklemektedir (13). Rodent ve primat deneysel parkinson modellerinde, endokannabinoid sinyal modülasyonunun, parkinsonian semptomları düzeltebileceği gösterilmiştir. CB1 reseptör aktivasyonunun, SNpc'da dopaminerjik nöronların uyarılma (*firing*) hızını artırdığı ve normalde D2 reseptörlerince aktive olan G proteinleri havuzunu aktive ettiği düşünülmektedir. Artan CB1 reseptör sinyali, glutamat salımını azaltabilir ve kortikostriatal sinapslarda, sinaptik plastisitenin spesifik formlarının oluşmasını (indüksiyon) hızlandırır, CB1 reseptör kaybı ve/ya da işlev bozukluğu, oksidatif stres ya da glial aktivasyon gibi diğer toksik uyarıları ağırlaştırabilir (6, 7).

CB1 reseptör agonistleri (ya da endokannabinoidlerin parçalanmasının inhibe eden maddeler) parkinson hastalığında yararlı etkiler göstermiştir. Bu etkilerin subtalamik çekirdeğin aşırı aktivitesi ile ilişkili tremoru azaltma, dopamin agonistleri ile etkileşerek belirli motor bozuklukları düzeltmek ya da nigral hücre hasarının ilerlemesinin geciktirilmesiyle (nöroprotektif özellikleri sonucunda) ilişkili olabileceği bildirilmiştir (6). Endokannabinoid düzeyinin, FAAH enziminin inhibe edilmesi ile artırılması, birkaç hayvan modelinde anti-inflamatuvar etkiyi arttırmıştır. *In vitro* çalışmalar, endokannabinoidlerin anti-inflamatuvar etkiyi, ekzojen kannabinoidler ile kıyaslanabilir düzeyde arttırdığını bildirmektedir. Anandamid düzeyinin, doğrudan artırılması ya da anandamid'in parçalanmasının/geri alınmasının (up-take) inhibe edilmesi yoluyla artırılması, proinflamatuvar sitokinlerin ve inflamatuvar mediyatörlerin seviyesini azaltır ve anti-inflamatuvar sitokinler (IL-10 gibi)'in salınımını artırır. Ayrıca astrosit kültürlerinde, anandamid'in IL-6'yı arttırdığı gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalar, anandamid'in anti-inflamatuvar etkisinin NF κ B aktivasyonunun inhibisyonu ve anti-inflamatuvar sitokin IL-10 üretiminin artırılması ile olabileceğini bildirmektedir (44).

Endokannabinoidlerin nöroinflamatuvar cevap üzerine etkisi *in vivo* olarak detaylı bir şekilde araştırılmamıştır. MS hayvan modelinde endokannabinoid geri alımının inhibisyonu ile anandamid düzeyinin artırılması omurilikte proinflamatuvar cevaba katkı sağlamıştır ve motor semptomları iyileştirmiştir (44).

Parkinson semptomlarının oluşmasından önce striatal dopamin kaybı % 80'den çok olması gerekir. Daha düşük dopamin tükenim seviyelerinde endokannabinoid sentezi

artarak davranışsal özelliklerin görülmesini engeller. Böylece FAAH, striatal CB1 reseptör sinyalinin selektif olarak etkileyerek ilaç geliştirmede hedef olarak gösterilebilir (24).

2.5.URB597

Anandamid'in iki basamaklı mekanizma ile parçalandığı gösterilmiştir. Anandamid ilk önce spesifik taşıyıcı ile plazma membranını geçer. Plazma membranını geçtikten sonra, spesifik enzim yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) aracılığıyla hızla araşidonik asit ve etanolamin'e metabolize olur. URB597, FAAH için belirgin selektivite gösterir, beyin anandamid seviyesini artırır. Kannabinoid reseptörler, anandamid'in taşınması ve monogliserol lipaz gibi diğer kannabinoid ilişkili hedefler üzerine etkisi yoktur, beyin 2-AG düzeyini değiştirmez. İn vitro deneylerde, URB597'nin metabolize olmamış anandamid'in birikmesine ve böylelikle beyin nöronlarından sızmasına neden olduğu gösterilmiştir. İn vivo bu etkinin, anandamid'in hücre dışında birikmesiyle ve sonrasında CB1 reseptör aktivasyonunun artmasıyla sonuçlandığı tahmin edilmektedir (9).

URB597 (sikloheksilkarbamik asit 3-karbamoilbifenil-3-il ester) kristal beyaz katıdır ve molekül ağırlığı 338.4 g/mol'dür. Yüksek membran permeabilitesine sahiptir. Isı, asit, peroksit, ışık, gastrik asit gibi şartlarında stabildir. Ratlara periton içine (i.p.) URB 597 enjeksiyonu, temel bir doza bağlı olarak beyinde FAAH inhibisyonu oluşturmuştur. URB597'nin yarı maksimal dozu (ID₅₀) 0.15 mg/kg'dır ve URB597 (0.3 mg/kg)'nin i.p. enjeksiyonu sonrasında FAAH inhibisyonu hızlıdır. Etki başlangıcı 15 dakikadan kısadır ve etkisi 12 saatten uzundur. Ratlarda 5 mg/kg, ip doza kadar tedavilerde, rotarod testinde bir bozukluk gözlenmemiştir (9).

Beyinde anksiyeteyi düzenleyen anahtar bölümlerde CB1 reseptör üretiminin yüksek olması, endokannabinoid sistemin anksiyeteyi kontrol etmede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Anandamid'in, CB1 reseptörleri aracılığıyla anksiyolitik benzeri davranış oluşturduğu hayvanlarda deneysel olarak gösterilmiştir. 0.08-0.1 mg/kg i.p. uygulanan URB597, farelerde anksiyolitik benzeri etkiler oluşturulmuştur. Düşük doz URB597 (0.07 mg/kg), anksiyete benzeri davranış üzerine önemli bir etki göstermemiştir (35). Fakat Seillier ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 0,3 mg/kg dozunda verilen URB597'nin PCP ile azaltılan (CB1 bağımlı) anksiyete benzeri davranışları tersine

çevirdiği gözlenmiştir (CB1-bağımsız bir yoldan) (45). URB597, iki hayvan depresyon modelinde denenmiştir. Kronik depresyon modelinde kilo alımının ve sükröz alımının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür, kronik URB597 uygulamasının, sükröz alımı ve kilo artışını normalize ettiği gösterilmiştir (46). Diğer bir çalışmada, akut URB597 (0.03-0.3 mg/kg, i.p.), tail suspansiyon testinde mücadele zamanında doza bağlı bir artış oluşturmuştur. 4 günlük URB597 (0.03-0.3 mg/kg, ip) tedavisinin benzer etki oluşturması, ilacın etkisine tolerans olmadığını gösterir. URB597'nin (0.5 mg/kg, i.p.), fare hot-plate testinde, ortalama antinosiseptik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bu etkiler, CB1 antagonisti rimonabant tarafından önlenmiştir. Akut URB597'nin (0.1-0.3 mg/kg, ip), ratlarda artrit ağrısında daha belirgin analjezik etki gösterdiği gözlenmiştir. Spontan hipertansif ratlardaki deneyler, parenteral URB597 uygulanmasının (0.1-1 mg/kg, i.p.), kan basıncı, kardiyak kantraktilite ve vasküler direnci normal hayvandaki seviyeye düşürdüğünü göstermiştir (9). Oküler dokularda fonksiyonel bir endokannabinoid sistemin varlığı gösterilmiştir, Anandamid, 2-AG ve bunların enzimleri retina ve çeşitli oküler dokularda bulunmuştur. Deneysel oküler hipertansiyon modelinde, FAAH enzim düzeyinde ve glutamat düzeyinde artış bildirilmiştir. Artan anandamid (FAAH inhibisyonu ya da anandamid'in stabil analogu methanandamid uygulanmasıyla) retinal hasarı azaltmıştır (47). Genç ve yaşlı ratlarda, optik sinir aksotomisini takiben tek başına ya da CB1 ve CB2 reseptör antagonistleri ile birlikte uygulanan URB597 (0.3 mg/kg), retinal gangliyon hücresi canlılığını arttırmıştır (48). Bazı nöronal yapılarda kannabinoid ve opioid reseptörlerin dağılımı, onların nosisepsiyon ve ilaç bağımlılığı gibi fizyolojik ve patolojik şartlarda etkileşme olasılığını desteklemektedir. CB1 reseptörlerin aktivasyonu ve blokajı, kesilme semptomlarını sırasıyla azaltır ve artırır. URB, morfin kesilme belirtileri (kilo kaybı, ıslak köpek titremesi vb)'ni 0.3 mg/kg dozuna kadar doza bağımlı olarak azaltmıştır. Daha yüksek dozlarda URB, çok büyük bir etki göstermemiştir. URB'nin (0.3 mg/kg) tek başına uygulanmasının, davranışsal etkisi olmadığı bildirilmiştir (48). Hayer ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, ip uygulanan URB597 (1 mg/kg, haftada 3 enjeksiyon) aterosklerotik plakta vasküler kollojen yapıları önemli oranda azaltmıştır, hücrede nötrofil birikimi önemli derecede artmıştır; fakat plak boyutunu etkilememiştir ve faredeki aterosklerotik plak duyarlılığını (*vulnerability*) arttırmıştır (49). Johnston ve ark.'ı MPTP ile lezyon oluşturulan ve levodopa tedavisi alan maymunlara oral olarak URB597 (10 mg/kg) uygulamışlardır. URB597 levodopa'nın neden olduğu

hiperaktiviteyi, levodopa'nın antiparkinsonian etkisini ve metabolizmasını etkilemeden, azaltmıştır (50).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. KİMYASALLAR

- Dimetil sülfoksid (DMSO, Sigma Aldrich Chemie, D5879),
- URB597 (Sikloheksilkarbamik asit 3'-karbamoil-bifenil-3il ester, Sigma Aldrich Chemie, U4133),
- MPTP hidroklorid (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin hidroklorid, Sigma Aldrich Chemie, M0896)

3.2. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

URB597 çok düşük dozda uygulandığı için, her gün stok çözeltisi (DMSO içinde) taze hazırlanarak kullanılmıştır. Bir gün öncesinden kalan MPTP çözeltisi (serum fizyolojikte çözülmüş) buzdolabında saklanarak ertesi gün de kullanılmıştır. DMSO ve serum fizyolojik kimyasal reaksiyona girdiği için ayrı enjeksiyonla verilmiştir.

3.3. HAYVANLAR

Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)'dan temin edilen 32 adet erkek BALB c türü fare (5-7 aylık), (yaşla birlikte MPTP duyarlılığı arttığı için farelerin yaşlanması beklenmiştir) deneyin yapılacağı anabilim dalına getirilerek deney ortam koşullarına alışması için iki gün bekletilmiştir. Deney zamanına kadar farelerin pellet yem ve suya erişimi engellenmemiştir. MPTP'nin hipotermi yapıcı etkisi düşünülerek enjeksiyon sonrası farelerin vücut ısısını korumak için ortam sıcaklığı kontrol edilmiştir.

3.4. DENEY PROSEDÜRÜ

Her grupta 8 fare olmak üzere 4 grup oluşturuldu:

- Kontrol grubu: İ.p. olarak DMSO (0.05 ml/30 g VA) ve serum fizyolojik uygulandı.
- MPTP grubu: İ.p. olarak 30 mg/kg MPTP-HCl (serum fizyolojik içinde çözülerek) ve DMSO (0.05 ml/30 g VA, i.p.) uygulandı.
- URB597+MPTP grubu: İ.p. olarak URB597 (0.3 mg/kg, DMSO içinde çözülerek) verildi, 1 saat sonra da MPTP-HCl (30 mg/kg, serum fizyolojik içinde, i.p.) uygulandı.
- URB597 grubu: İ.p. olarak URB597 (0.3 mg/kg, DMSO içinde çözülerek) ve serum fizyolojik uygulandı.

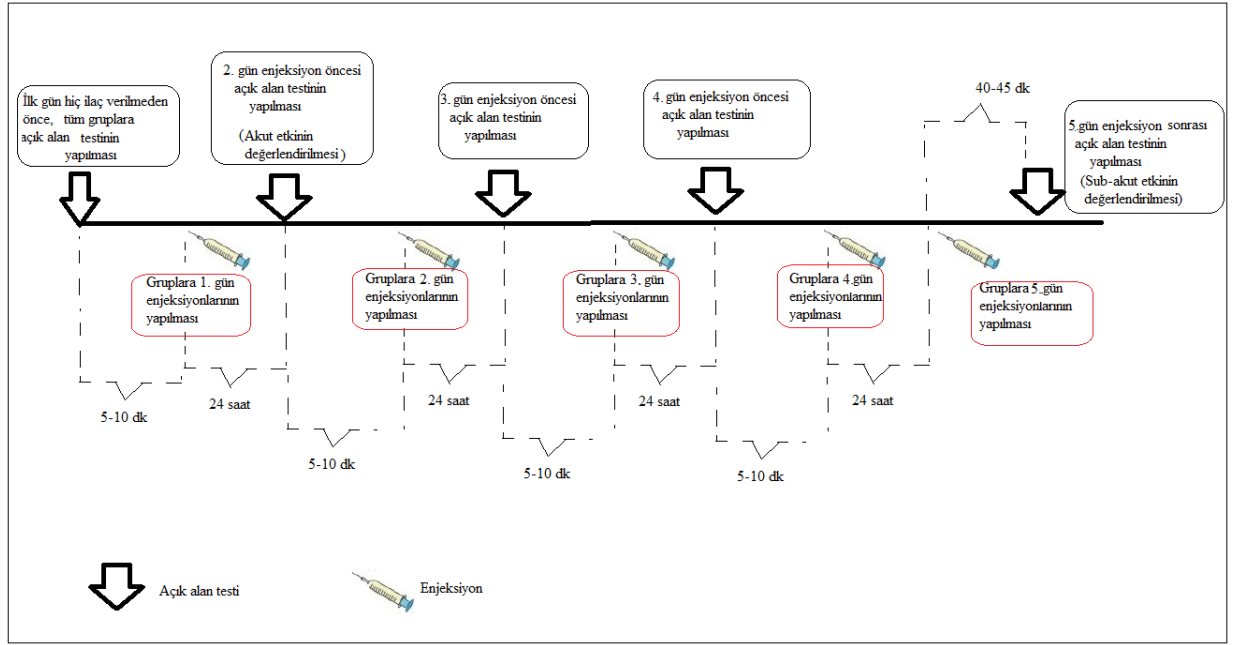
Uygulanan MPTP dozu ve uygulama süresine yapılan çalışmalar ve literatür bilgisi dikkate alınarak karar verilmiştir (28, 51, 52). URB597'nin dozu olarak FAAH enzim aktivitesini maksimum olarak bloke eden sistemik URB597 dozu (9, 53) seçilmiştir.

3.5. YÖNTEMLER

3.5.1. Lokomotor Aktivite Ölçümü

Farelerde akut ve subakut olarak lokomotor aktivite değerlendirildi. Subakut değerlendirmeler, akut değerlendirmenin takibinde aynı hayvan üzerinde yapıldı. Akut uygulama 2. gün yapılan açık alan testi (ilk gün enjeksiyonundan 24 saat sonra) ile

değerlendirildi. Subakut değerlendirme ise 5. günde yapılan açık alan testi ile değerlendirildi (Şekil 3.1).



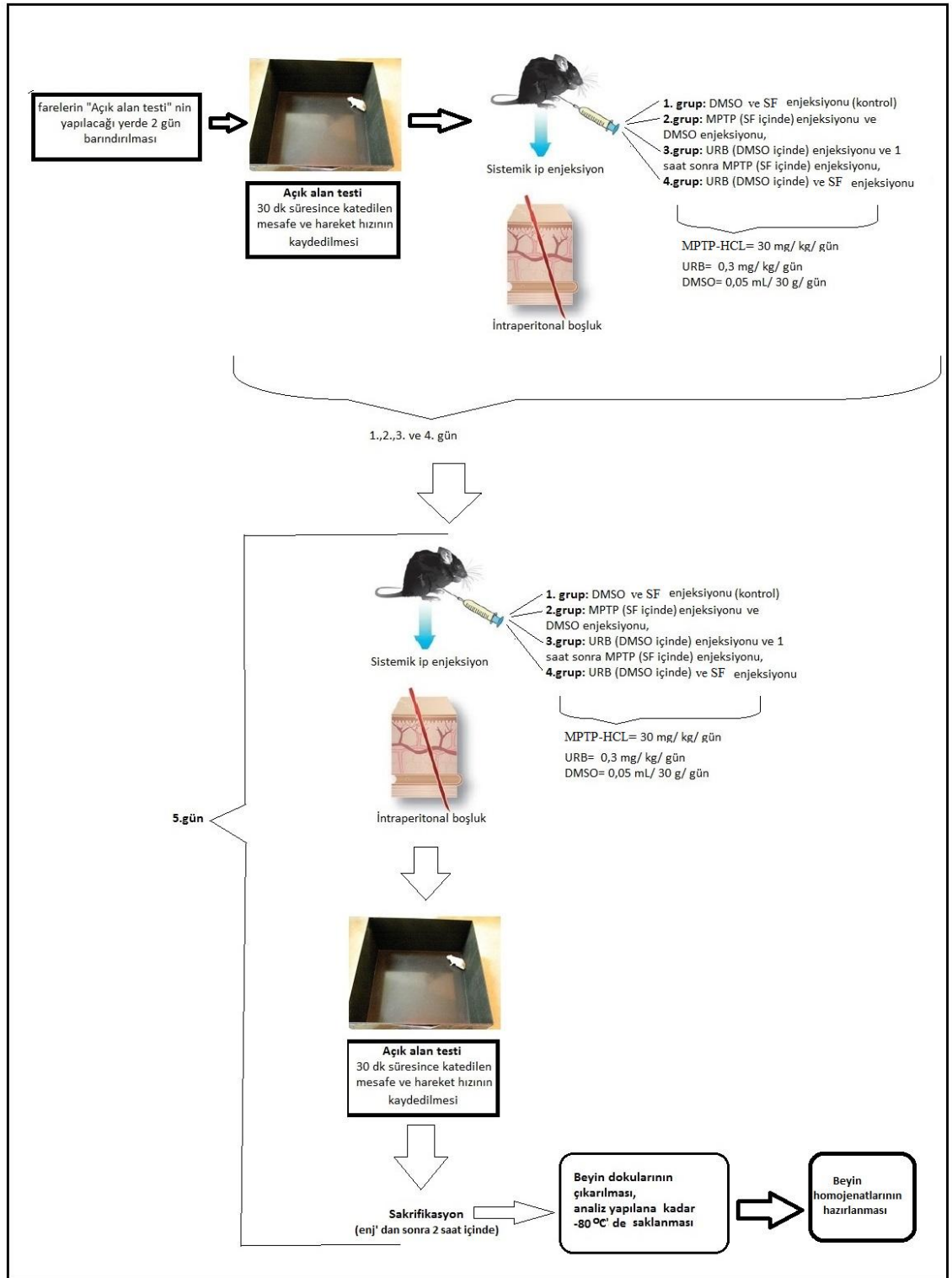
Şekil 3.1. Çalışma planının zaman çizelgesiyle gösterimi.

Çalışmanın ilk gününde (1. gün) farelere herhangi bir ilaç vermeden önce açık alan testi yapıldı. Bu testin sonunda gruplara 1. gün enjeksiyonları (kontrol grubuna DMSO ve SF, MPTP grubuna MPTP çözeltisi ve DMSO, URB+MPTP grubuna URB çözeltisi ve MPTP çözeltisi, URB grubuna URB çözeltisi ve SF) yapıldı. Akut uygulamanın 24. saatinde (2.günde) lokomotor aktivite açık alan testi ile ölçüldü ve takibinde 2. gün enjeksiyonları yapıldı. Sonraki günlerde de subakut etkinin değerlendirilmesi için açık alan testi (3. ve 4. günlerde ilaç enjeksiyonu öncesinde, 5. gün ise ilaç enjeksiyonu sonrasında) uygulandı (Şekil 3.2).

Açık alan testleri kare sert plastikten yapılmış siyah açık alan kutusu (40 cmx40 cm) kullanılarak yapıldı. Locomotor aktiviteler 30 dakika boyunca alanın üzerinde yer alan ve 'EthoVision XT 8.5, Noldus' programı ile bağlantılı olan bir video kamera ile kaydedildi. Spontan lokomotor aktivitenin belirlenmesi için, total katedilen mesafe (cm) ve hareket hızı (cm/sn) parametrelerinden yararlanıldı ve bu parametreler 30 dakika boyunca kaydedildi. Her ölçüm sonrası alanlar etil alkol ile temizlenerek ölçümlere devam edildi.

Ortam sıcaklığı sabit olmadığı için MPTP grubundan 1 fareye ve URB+MPTP grubundan 2 fareye ait lokomotor aktivite ölçümleri değerlendirilememiştir.

5.gün fareler açık alan testi sonrasında (son enjeksiyondan 2 saat sonra) ketamin anestezisi altında dekapite edildi. Farelerin beyinleri çıkarılarak enzim analizine kadar -80° C derin dondurucuda bekletilmiştir.

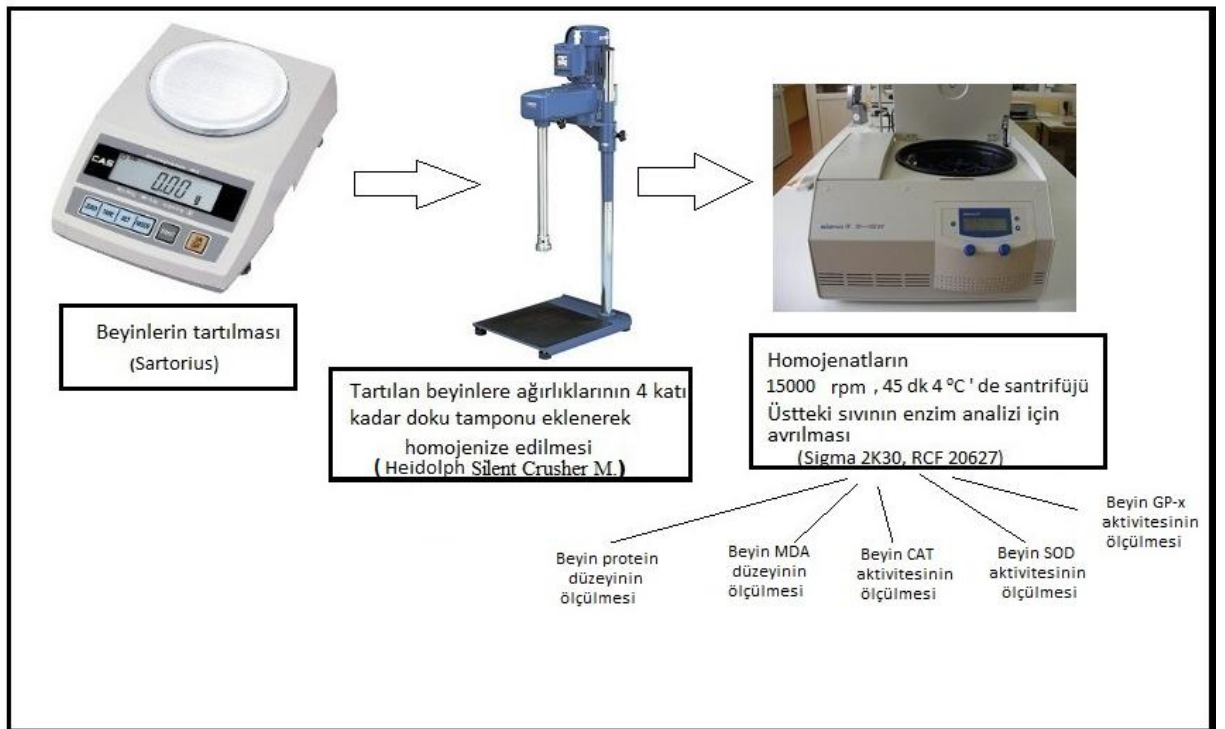


Şekil 3.2. Çalışma planının şematik gösterimi.

3.5.2.Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi

3.5.2.1.Beyin Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Tartılan beyin dokularına, ağırlıklarının 4 katı kadar doku tamponu eklendi, mekanik homojenizatörde homojenize (21.000 rpm'de 30 sn) edildi. Takibinde tüpler 45 dk santrifüj (+4°C, 20.000 rpm) edilerek üstteki sıvı kısım endorf tüplerine alındı. (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Beyin homojenatlarının hazırlanması.

3.5.2.2. Beyin Protein Düzeylerinin Ölçümü

Beyin protein düzeyleri, Lowry ve arkadaşlarının tanımladığı (54) ve Miller tarafından modifiye edilen metod (55)'a göre ölçülmüştür. Trozin ve triptofan rezidüleri, alkali bakır ve fenol reaktifleri ile reaksiyona girerek mavi renkli kompleks oluşturur. Bu metodun temeli, oluşan bu mavi renkli bileşiğin 540 nm'de ölçülmesine dayanır (56).

1.0 ml % 10'luk homojenat üzerine 1.0 ml bakır reaktifi eklendi ve tüpler 30 sn vortekslendi. 3.0 ml dilüe folin fenol reaktifi (1:10) eklendi ve tüpler 30 sn vortekslendi. Karışım su banyosunda (50 °C) 10 dk tutuldu. Oluşan mavi renkli bileşiğin absorbansı 540 nm'de okundu.

3.5.2.3. Beyin MDA Düzeylerinin Ölçümü

Doku MDA düzeyleri, Ohkawa (57)ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde ölçüldü. Bu metodun temeli, lipid peroksidasyon ürününün tiobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli bileşiğin renk yoğunluğunun ölçülmesine dayanır. Sonuçlar n mol/mg-protein olarak ifade edildi (56).

200 mikrolitre homojenat ve 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart çözeltisi ayrı ayrı vida kapaklı cam deney tüplerine konuldu (kör tüpüne ise deiyonize su koyuldu). Bu tüplerin üzerine 200 mikrolitre sodyum loril sülfat (%8.1'lik), 1.5 ml asetat tamponu, 1.5 ml tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (%0.8'lik) ve 600 mikrolitre deiyonize su eklendi. Tüplerin kapakları kapatılarak su banyosunda (95⁰C'de 1 saat) bekletildi. Tüpler buzlu su içinde soğutuldu ve 1.0 ml deiyonize su ve 5.0 ml n-bütanol-piridin (15:1) çözeltisi eklendi. Tüpler vortekslendi ve sonrasında santrifüj edildi (4000 rpm, 10 dk). Üst kısımda oluşan pembe renkli kısmın absorbansı (534.2 nm'de) köre karşı okundu. 1,1,3,3-tetraetoksipropan çözeltilerinin absorbansları ile standart eğri çizilerek numunelerin absorbansları nmol/mg protein'e dönüştürüldü.

3.5.2.4. Beyin CAT Aktivitesinin Ölçümü

Doku Katalaz aktivitesi, Luck (1965) tarafından tanımlandığı şekilde (58) yapılmıştır. Ölçümün temeli, örnekte var olan katalaz enziminin, hidrojen peroksiti parçalanması ve bu parçalanma sonucu 240 nm'deki absorbansın (0, 15, 30 ve 45. saniyelerdeki) azalması ilkesine dayanır. Sonuçlar k/g-protein olarak ifade edilmiştir.

Absorbansı (240 nm'de) 0.5'e ayarlanan hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi (fosfat tamponu içinde)'nden 2.95 ml alınarak üzerine 50 mikrolitre homojenat eklendi. Kör olarak H₂O₂ içermeyen fosfat tamponunun 2.95 ml'si üzerine 50 mikrolitre homojenat eklendi. 0., 15., 30. ve 45. saniyelerdeki absorbanslar kaydedildi.

3.5.2.5. Beyin SOD Aktivitesinin Ölçümü

SOD ölçümleri Sun ve arkadaşlarının (1988) tanımladığı şekilde (59) yapılmıştır. Bu metodun temeli, süperoksid radikali tarafından, nitro blue tatrazolyum indirgenmesinin inhibisyonuna dayanır.

Süperoksid radikalleri, ksantin ve ksantin oksidaz (XO) kullanılarak oluşturulur. Süperoksid radikalleri nitro blue tetrazolyum (NBT) ile mavi renkli formazon boyası oluşturur. Mavi renkli formazon ürününün absorbansı ölçülür.

Absorbanstaki azalma ve enzim aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar U/mg-protein olarak ifade edildi. 1 U SOD, NBT reaksiyon hızını % 50 inhibe eden protein miktarı olarak değerlendirildi (59).

Homojenattan kloroform/etanol karışımı kullanılarak hazırlanan ekstratın 0.5 ml'si üzerine 2.45 ml reaktif karışımı eklendi. Üzerine 50 mikrolitre ksantin oksidaz çözeltisi eklenerek su banyosu (25°C)'nda 20 dk bekletildi. 1.0 ml CuCl₂ eklenerek reaksiyonun durması sağlandı ve 560 nm'de absorban ölçüldü.

3.5.2.6. Beyin GSH-Px Aktivitesinin Ölçülmesi

Ölçümler Paglia ve Valentine (1967)'in tanımladığı yönteme (60) göre yapıldı. Bu metotun temeli GSH'n indirgenmesi ve yükseltgenmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonlar sırasında GSH miktarı değişmez. GSH, tersiyer bütül hidroperoksit (t-BOOH) ile GSH-Px katalizörlüğünde indirgenmiş GSH ve suya dönüşür. Bu reaksiyonla oluşan indirgenmiş GSH, indirgenmiş nikotinamid dinükleotid fosfat NADPH+H⁺ varlığında glutasyon redüktaz tarafından yeniden oksitlenir. NADPH+H⁺, ise NADP⁺'ye dönüşür. Bu dönüşüm 366 nm'de absorbanstaki azalma ile belirlenir.

1.0 ml fosfat tamponu, 0.1 ml etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), 0.1 ml sodyum azid (NaN₃), 0.1 ml NADPH+H⁺, 0.1 ml indirgenmiş GSH, 0.2 ml GSH-redüktaz ve 0.2 ml homojenat kullanıldı. Su banyosunda (37°C) 2-3 dk bekletildi ve 0.2 ml t-BOOH çözeltisi (distile su ile konsantrasyonu ayarlandı) eklendi ve 1 dk'daki absorban düşüşü kaydedildi. Sonuçlar U/g-protein olarak ifade edildi.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel hesaplamalar, SPSS 15.0 istatistik yazılım paketi kullanılarak yapıldı. Verilerin aritmetik ortama değerleri ve standart sapmalar hesaplandı.

Gruplar arasında enzim analizi değişkenlerindeki farklılıklar, normal dağılıma sahip değişkenler için tek yönlü varyans analiz prosedürü (tek yönlü ANOVA) ile p< 0.05 önem düzeyinde değerlendirildi. Grup içi gün bazında açık alan test değişkenlerini karşılaştırmak için Friedman varyans analizi kullanıldı. Bu testte fark gösteren grupları izole etmek için Student-Newman-Keuls Metod'u kullanıldı. Gruplar arasında gün bazında açık alan değişkenlerini karşılaştırmak için Kruskal Wallis tek yönlü varyans analizi yapıldı. Fark gösteren grupları izole etmek için Dunn's Metodu kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. AÇIK ALAN TEST SONUÇLARI

4.1.1. Kontrol Grubu Açık Alan Test Sonuçları

Friedman yinelenen (*repeated*) varyans analizi sonucunda günlere göre katedilen mesafe medyan değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P=0.463$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1.Kontrol grubuna ait günlere göre açık alan testinde katedilen mesafe.

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	8	6976,174	6341,503	8328,213
2. Gün	8	8580,413	6161,477	16184,052
3. Gün	8	5979,933	4494,679	6619,431
4. Gün	8	6248,339	5131,115	6973,618
5. Gün	8	5460,189	4566,653	6871,936

Friedman yinelenen varyans analizi sonucuna göre günlere göre hareket hızı medyan değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P=0,627$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait günlere göre açık alan testinde hız.

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	8	4,111	3,710	4,968
2. Gün	8	4,913	3,851	9,383
3. Gün	8	3,440	2,636	4,080
4. Gün	8	3,833	3,320	5,075
5. Gün	8	3,637	2,725	4,240

4.1.2. MPTP Grubu Açık Alan Test Sonuçları

Friedman yinelenen varyans analizi sonucuna göre günlere göre katedilen mesafe medyan değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P=0,087$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. MPTP grubuna ait günlere göre açık alan testinde katedilen mesafe.

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	7	13356,857	5693,711	19236,185
2. Gün	7	4502,453	3660,639	9257,689
3. Gün	7	5912,853	4710,199	8758,021
4. Gün	7	4645,078	3385,038	7594,288
5. Gün	7	4538,975	4087,286	6733,816

Friedman yinelenen varyans analizi sonuçlarına göre günlere göre hareket hızı medyan değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($P= 0,080$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. MPTP grubuna ait günlere göre açık alan testinde hareket hızı.

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	7	8,475	4,513	10,990
2. Gün	7	2,839	2,669	5,474
3. Gün	7	3,737	3,002	5,181
4. Gün	7	3,202	2,625	4,674
5. Gün	7	2,709	2,303	4,000

4.1.3. URB+MPTP Grubu Açık Alan Test Sonuçları

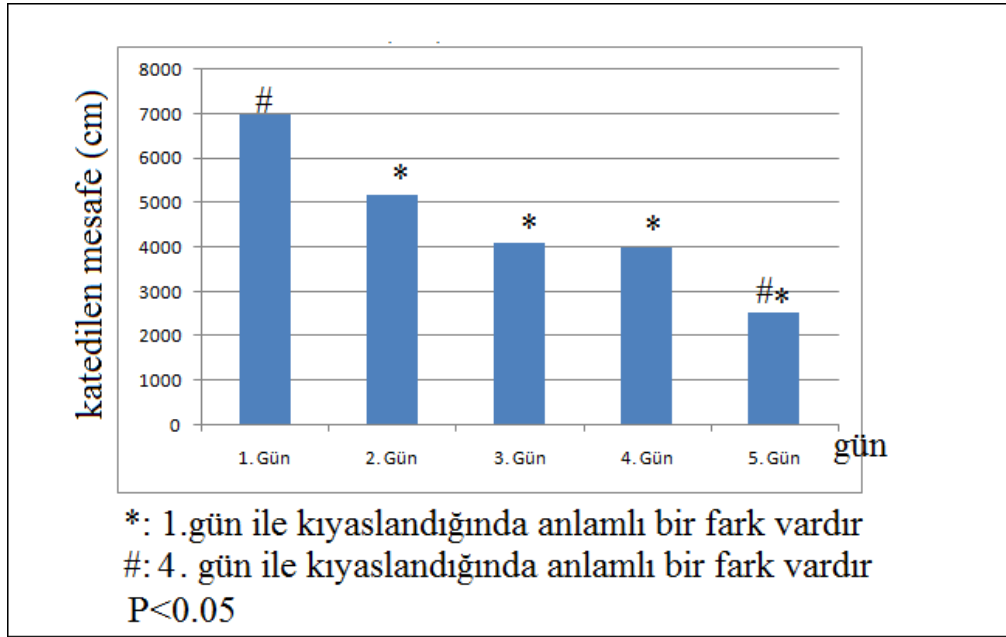
Friedman yinelenen varyans analizi sonucuna göre günler arasında katedilen mesafe medyan değerler arasında farklılıklar gözlemlendi ($P = < 0,001$). 1. ve 2. gün arasında anlamlı fark varken; 2., 3. ve 4. günler arasında bir fark bulunmadı. 4. ve 5. gün arasında anlamlı bir fark bulundu ($P < 0,05$) (tablo 4.5). URB+MPTP grubunda ilk günkü enjeksiyondan 24 saat sonra yapılan açık alan testi (akut uygulama sonrası)'nde katedilen mesafe ilk gün açık alan test ile kıyaslandığında önemli derecede azaldı. Subakut uygulama sonrasında yapılan açık alan testinde (5. gün yapılan) katedilen mesafe, önceki günler ile kıyaslandığında önemli şekilde azaldı (Şekil 4.1).

Tablo 4.5. URB+MPTP grubuna ait günlere göre açık alan testinde katedilen mesafe

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	6	^b 6974,376	6228,527	10348,008
2. Gün	6	^a 5185,362	4833,856	5608,208
3. Gün	6	^a 4121,600	3130,822	5073,138
4. Gün	6	^a 3986,613	2651,668	4448,194
5. Gün	6	^{ab} 2522,994	2184,462	2598,015

^a: 1. gün ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$).

^b: 4. gün ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$).



Şekil 4.1. URB+MPTP grubuna ait günlere göre açık alan testinde katedilen mesafe

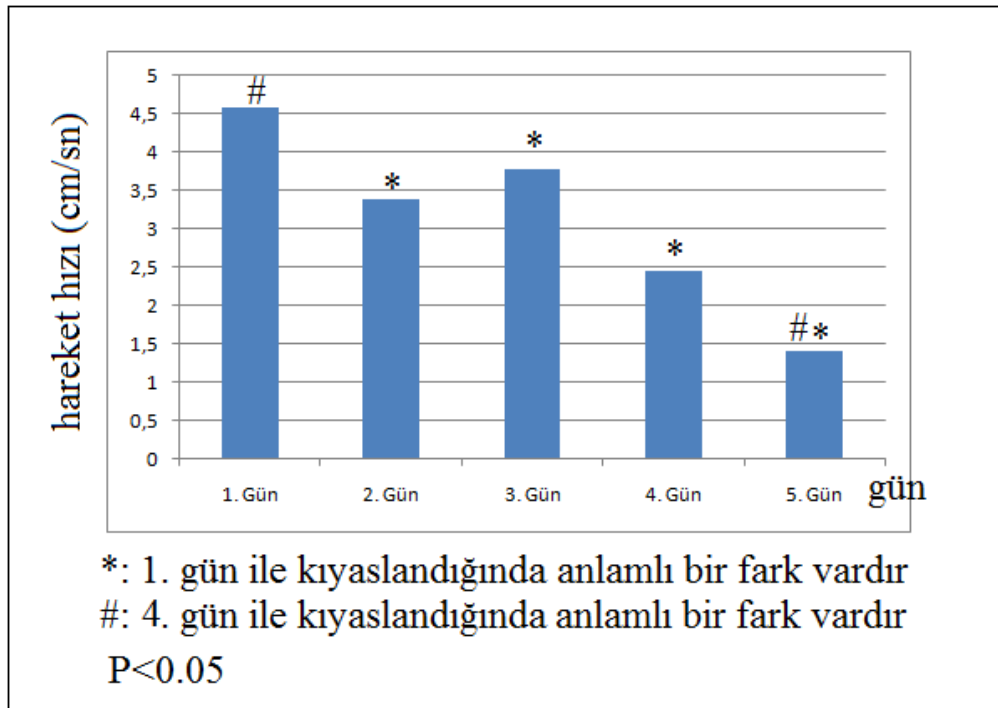
Friedman tekrarlı yinelenen varyans analizi sonucuna göre günler arasında hareket hızı medyan değerleri arasında farklılıklar gözlemlendi ($P= 0,003$). 1. ve 2. gün arasında anlamlı fark varken; 2., 3. ve 4. günler arasında bir fark bulunmadı. 4. ve 5. gün arasında anlamlı bir fark bulundu ($P< 0,05$) (tablo 4.6). URB+MPTP grubunda ilk günkü enjeksiyondan 24 saat sonra yapılan açık alan testi (akut uygulama sonrası)'nde hareket hızı ilk gün açık alan test ile kıyaslandığında önemli derecede azaldı. Subakut uygulama sonrasında yapılan açık alan testinde (5. gün yapılan) hareket hızı, önceki günler ile kıyaslandığında önemli şekilde azaldı (Şekil 4.2).

Tablo 4.6. URB+MPTP grubuna ait günlere göre açık alan testinde hareket hızı

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	6	^b 4,594	3,899	5,836
2. Gün	6	^a 3,385	2,773	3,681
3. Gün	6	^a 3,786	2,490	4,132
4. Gün	6	^a 2,459	2,146	4,362
5. Gün	6	^{ab} 1,405	1,216	1,470

^a: 1.gün ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$).

^b: 4.gün ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$).



Şekil 4.2. URB+MPTP grubuna ait günlere göre açık alan testinde hareket hızı.

4.1.4. URB Grubu Açık Alan Test Sonuçları

Friedman tekrarlı yinelenen varyans analizi sonucuna göre günlere göre katedilen mesafe medyan değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P = 0,056$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. URB grubuna ait günlere göre açık alan testinde katedilen mesafe

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	8	7791,347	5884,899	9756,774
2. Gün	8	9353,745	7268,884	10436,790
3. Gün	8	5959,078	4244,755	8259,551
4. Gün	8	6873,221	5565,850	8101,029
5. Gün	8	5810,592	4390,929	8504,595

Friedman yinelenen varyans analizi sonucuna göre günlere göre hareket hızı grupların medyan değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P= 0,434$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. URB grubuna ait günlere göre açık alan testinde hareket hızı

Gün	N	Medyan	% 25	% 75
1. Gün	8	4,880	3,485	6,084
2. Gün	8	6,156	4,633	6,684
3. Gün	8	4,906	3,552	5,558
4. Gün	8	4,093	3,141	8,624
5. Gün	8	4,955	3,173	5,879

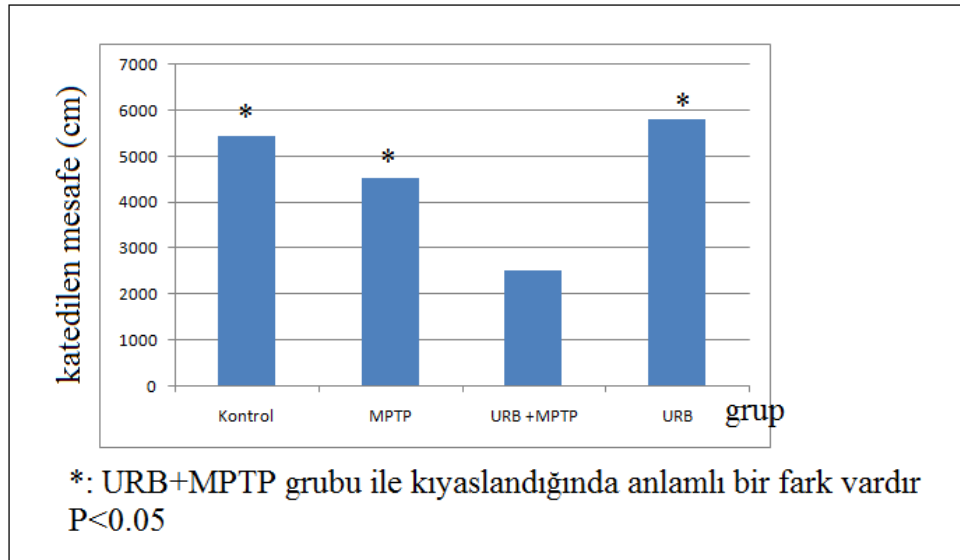
4.1.5. Gruplar Arasında Gün Bazında Katedilen Mesafe ve Hareket Hızı

Gruplar arasında katedilen mesafe parametresinde, akut uygulama sonrasında (2. gün), 3. ve 4. günlerde anlamlı bir fark bulunmadı (1. gün için $P= 0,803$, 2. gün için $P= 0.056$, 3. gün için $P= 0.304$, 4. gün için $P= 0.121$). Katedilen mesafe’de, subakut uygulama sonrasında (5. gün) gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P= 0.005$) (Tablo 4.9). 5. günde sadece URB+MPTP ile MPTP grubu arasında, kontrol ile URB+MPTP grubu arasında, URB ile URB +MPTP grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.3).

Tablo 4.9. Beşinci gün açık alan testinde katedilen mesafe

Grup	N	Medyan	% 25	% 75
Kontrol	8	^a 5460,189	4566,653	6871,936
MPTP	7	^a 4538,975	4087,286	6733,816
URB +MPTP	6	2522,994	2184,462	2598,015
URB	8	^a 5810,592	4390,929	8504,595

a: URB+MPTP grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulundu. $P<0.05$



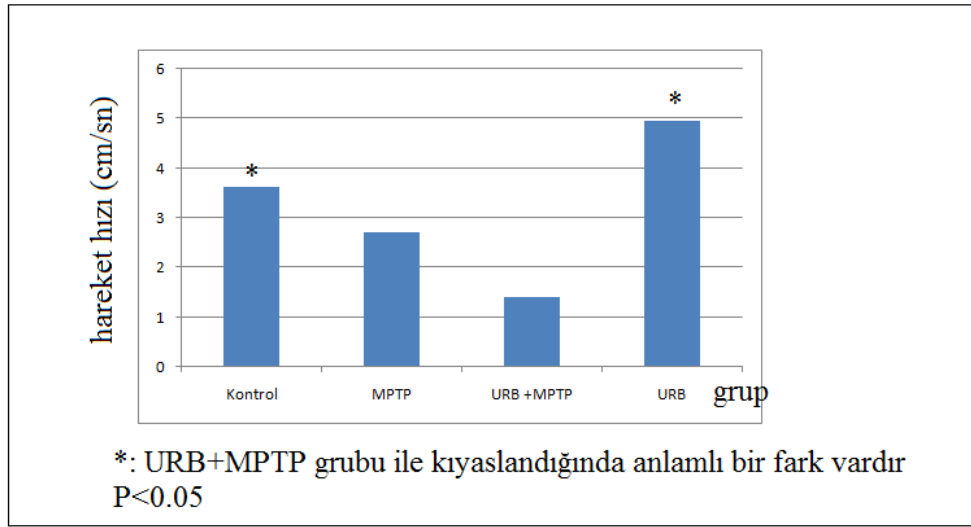
Şekil 4.3. Beşinci gün açık alan testinde katedilen mesafeler

Gruplar arasında hareket hızı parametresinde, akut uygulama sonrasında (2. gün), 3. ve 4. günlerde anlamlı bir fark bulunmadı (1. gün için $P= 0,510$, 2. gün için $P= 0.059$, 3. gün için $P= 0.416$, 4. gün için $P= 0.273$). Sadece subakut uygulama sonrasında (5. gün) gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($P= 0.004$) (Tablo 4.10). Subakut uygulama sonrasında (5. gün) sadece kontrol ile URB+MPTP grubu arasında, URB ile URB+MPTP grubu arasında anlamlı fark ($P<0,05$) bulunurken; MPTP ile URB+MPTP grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı (Şekil 4.4).

Tablo 4.10. Beşinci gün açık alan testinde hız

Grup	N	Medyan	% 25	% 75
Kontrol	8	^a 3,637	2,725	4,240
MPTP	7	2,709	2,303	4,000
URB +MPTP	6	1,405	1,216	1,470
URB	8	^a 4,955	3,173	5,879

a: URB+MPTP grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark bulundu ($P<0.05$).



Şekil 4.4. Beşinci gün açık alan testinde hızlar

4.2. BEYİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ

4.2.1. MDA Düzeyleri

Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (P=0,147) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Beyin MDA düzeyleri (nmol/mg-protein)

Grup	N	Ortalama
Kontrol	8	21,519±12,688
MPTP	8	26,832±6,790
URB+MPTP	8	19,498±6,443
URB	8	29,930±11,444

4.2.2.SOD Aktiviteleri

Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (P=0,360) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Beyin SOD aktiviteleri (U/mg-protein)

Grup	N	Ortalama
Kontrol	8	3,799±2,208
MPTP	8	5,093±0,778
URB+MPTP	8	4,018±0,988
URB	8	4,979±2,450

4.2.3. CAT Aktiviteleri

Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (P=0,395) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Beyin CAT aktiviteleri (k/g-protein)

Grup	N	Ortalama
Kontrol	8	4,239±3,061
MPTP	8	5,675±2,547
URB+MPTP	8	3,609± 1,204
URB	7*	4,928±2,708

*Spektrofotometrede okunamayan veri değerlendirmeye alınmamıştır.

4.2.4.GSH-Px Aktiviteleri

Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (P=0,373) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Beyin GSH-Px aktiviteleri (U/g-protein)

Grup	N	Atlanmış veri	Ortalama
Kontrol	8	1	62,093±45,502
MPTP	8	0	86,197±21,690
URB+MPTP	8	0	84,832±56,243
URB	8	0	101,287±38,361

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, proje önerisinde belirtildiği şekilde yürütülmüştür. BALB c farelere 5 gün boyunca i.p. enjeksiyonları (kontrol grubuna DMSO ve SF, ikinci gruba MPTP-HCl ve DMSO, üçüncü gruba URB597 ve takibinde MPTP-HCl, dördüncü gruba URB597 ve SF) yapılmıştır. Deney süresince her gün açık alan testi yapılmış ve 5. günde hayvanlar dekapite edilip beyin dokuları çıkarılarak hazırlanan beyin homojenatında oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, tek başına uygulanan URB597'nin kontrol grubu ile kıyaslandığında beyin homojenatında oksidatif stres parametreleri (SOD, CAT, GSH-Px, MDA) üzerine ya da açık alan testinde lokomotor aktivite parametreleri (katedilen mesafe, hareket hızı) üzerine bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Tek başına uygulanan MPTP-HCl, kontrol grubu ile kıyaslandığında lokomotor aktivitede anlamlı bir değişikliğe neden olmazken URB597'nin MPTP ile kombine kullanıldığı grupta 5. günde lokomotor aktivite, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Bu azalmanın 5. gün yapılan açık alan testinde anlamlı bulunması ise URB597'nin biriken etkisinin olduğunu düşündürmüştür.

MPTP uygulanan grupta beyin homojenatında oksidatif stres parametreleri kontrol ile kıyaslandığında artmış gibi görülmekle birlikte bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. URB597 ve MPTP'nin kombine verildiği grupta beyin homojenatında oksidatif stres parametreleri MPTP grubu ile kıyaslandığında azalmış gibi görülmektedir; fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. URB597'nin oksidatif stres parametreleri üzerine görülen bu olumlu yöndeki etkisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunmayışının nedeninin ölçümlerin spesifik beyin bölgelerinde yapılmamış olması olabileceğini düşündürmüştür. Enzim düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu değişimler, URB597'nin doza bağlı olarak MPTP'nin olumsuz etkilerini azaltabileceğini ve parkinsonun erken dönemlerinde oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür. URB597'nin oksidatif stres parametreleri üzerine olumlu etkisinin yanında lokomotor aktiviteyi baskılayıcı yöndeki etkisi, Parkinson hastalığının ileri dönemlerinde hareket üzerine olumsuz etkiler gösterebileceğini göstermiştir.

MPTP Parkinson modelinin çoğunlukla C57BL/6 farelerde denenmiş olması nedeniyle, bu çalışma özellikle BALB c farelere 30 mg/kg/gün dozunda 5 gün MPTP-HCl ve/ya da

0.3 mg/kg/gün dozunda 5 gün URB597 uygulanmasının, oksidatif stres parametreleri üzerine ve lokomotor aktivite üzerine etkisinin gözlenmesi açısından önemlidir ve bu çalışmanın ileride konu ile ilgili yapılabilecek benzeri çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Ertan S. Parkinson hastalığının klinik özellikleri, Nörolog Olmayanlar İçin Nöroloji Sempozyum Dizisi, 249-254, Ocak 2005, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.
2. Albin R, Young A, Penney J. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989;12: 366-75.
3. Erer S, Zarifoğlu M. Parkinson hastalığında güncel medikal tedavi yaklaşımları. *Parkinson Hast Hareket Boz Der* 2008; 11: 45-56.
4. Hung H, Lee E. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24: 76-81.
5. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanism and models. *Neuron* 2003; 39: 889-909.
6. Ruiz J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *British Journal of Pharmacology* 2009; 156: 1029-1040.
7. Filippo M, Picconi B, Tozzi A, et al. The endocannabinoid system in Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14: 2337-2344.
8. Pisani V, Madeo G, Tassone A, et al. Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease, *Movement Disorders* 2011; 26, 216- 220.
9. Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, et al. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews* 2006; 12: 21- 36.
10. Kayaalp O, Parkinson hastalığının ve diğer hareket bozuklukları ile Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar, İn: *Tıbbi Farmakoloji* (11. Baskı), 2. Cilt, Kayaalp O (editör), Hacettepe- Taş Kitapçılık, Ankara, 2005: 902.
11. Lau L, Breteler M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525-535.
12. Karakılıç A, Zerin M. Postür ve hareketin denetimi, İn: *Tıbbi Fizyoloji* (21. baskı), Ganong W (edit), *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (çeviri), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002: 210- 211.*
13. Orgado J, Ruiz J, Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Inter Review of Psychiatry* 2009; 21: 173-177.
14. Öztürk O. İdiyopatik Parkinson Hastalığında Depresyon, Anksiyete ve Kognitif Durum, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği, İstanbul 2006: 77.
15. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental Neurology* 2005; 193: 279- 290.
16. Ebadi M, Srinivasan S, Baxi M. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 1996; 48: 3-7.
17. Boyd J, Jang H, Shepherd K, et al. Response to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) differs in mouse strains and reveals a divergence in JNK signaling and COX-2 induction prior to loss of neurons in the substantia nigra pars compacta. *Brain Research* 2007; 1175: 107- 110.
18. Chen C, Yin M, Hsu C, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of four cysteine- containing agents in striatum of MPTP- treated mice. *Nutrition* 2007; 23: 590-592.
19. Tüzün S, Çifçili S, Uzuner A. Tremor II: Ayırıcı tanıda Parkinson. *Türk Aile Hek Derg* 2010; 14: 26-31.
20. Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological Reviews* 2000; 80: 954- 964.

21. Anthony Trevor, Bertham Katzung, Susan Masters. Parkinson ve diğer hareket bozukluklarında kullanılan ilaçlar, İn: Farmakoloji Sınav & Gözden Geçirme (6. baskı), Akkan G, Özyazgan S, Özgön G, Kutluata N ve Afşar S (çeviri editörü), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2005: 253.
22. Kayaalp O. Santral sinir sistemi farmakolojisinin temelleri, İn: Tıbbi Farmakoloji (11. Baskı), 1. Cilt, Kayaalp O (editör), Hacettepe- Taş Kitapçılık, Ankara, 2005: 629-630.
23. Gerfen C. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience* 2006; 9: 157- 158.
24. Brotchie J. CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson' s disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3: 56- 58.
25. Schmidt N, Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 2001; 108: 1263-1276.
26. Blesa J, Phani S, Lewis V, et al. Classic and new animal model of Parkinson' s disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 2012: 1-6.
27. Sedelis M, Hofele K, Auburger G, et al. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behavior Genetics* 2000; 30: 171-181.
28. Bove J, Perier C. Neutotoxin- based models of Parkinson' s disease. *Neurosci* 2012; 211: 56- 57.
29. Potashkin J, Blume S, Runkle N. Limitations of animal models of Parkinson' s disease. *SAGE- Hindawi Access to Research Parkinson' s disease* 2011; 2011: 1- 7.
30. Tillerson J, Caudle W, Revereon M, et al. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Experimental Neurology* 2002; 178: 80- 89.
31. Sedelis M, Schwarting R, Huston J. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson' s disease. *Behav Brain Research* 2001; 125: 109-121.
32. Karl T, Pabst R, Hörsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 69-83.
33. Sarne Y, Asaf F, Fishbein M, et al. The dual neuroprotective- neurotoxic profile of cannabinoid drugs. *British Journal of Pharmacology* 2011; 163: 1391- 1397.
34. Pisani V, Moschella V, Bari M, et al. Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Movement Disorders* 2010; 25: 920-923.
35. Zaitone S, Wakeil A, Ela S. Inhibition of fatty acid amide hydrolase by URB597 attenuates the anxiolytic- like effect of acetaminophen in the Mouse elevated plus-maze test. *Behavioural Pharmacology* 2012; 23: 417- 420.
36. Giuffrida A, Mahon L. In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: therapeutic implications in Parkinson' s disease and abuse liability. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 2010; 91: 90- 97.
37. Croxford J. Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs* 2003; 17: 179-190.
38. Lisboa S, Guimaraes F. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 2012; 62: 2455- 2462.
39. Murpy N, Cowley T, Blau C, et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit in long-term potentiation. *Journal of Neuroinflammation* 2012; 26: 2-9.

40. Sarker K, Obara S, Nakata M. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *Febs Letters* 2000; 472: 39-44.
41. Centonze D, Agro A, Bernardi G, et al. The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* 2007; 28: 182- 185.
42. Wise L, Shelton C, Cravatt B. Assessment of anandamide' s pharmacological effects in mice deficient of both fatty acid amide hydrolase and cannabinoid CB1 receptors. *European Journal of Pharmacology* 2007; 557: 45- 47.
43. Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature Publishing Group* 2008; 7: 441- 443.
44. Kerr D, Burke N, Ford G, et al. Pharmacological inhibition of endocannabinoid degradation modulates the expression of inflammatory immunological stressor. *Neuroscience* 2012; 204: 54- 56.
45. Seillier A, Giuffrida A. Inhibition of fatty acid amide hydrolase modulates anxiety-like behavior in PCP-treated rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2011; 98: 583– 586.
46. Bortolato M, Mangieri R, Fu J, et al. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biological Psychiatry* 2007; 62: 1104-1108.
47. Slusar J, Cairns E, Szczesniak A, et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 promotes retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of optic nerve axotomy. *Neuropharmacology* 2013; 72: 116- 117.
48. Shahidi S, Hasanein P. Behavioral effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on morphine withdrawal symptoms. *Brain Research Bulletin* 2011; 86: 118-121.
49. Hoyer F, Khoury M, Slomka H, et al. Inhibition of endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase increases atherosclerotic plaque vulnerability in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2014; 66: 126–132.
50. Johnston T, Huot P, Fox S, et al. Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibition Reduces L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Hyperactivity in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Lesioned Non-Human Primate Model of Parkinson's Disease. *JPET* 2011; 336: 423-430.
51. Hung H, Lee E. The mesolimbic dopaminergic pathway is more resistant than the nigrostriatal dopaminergic pathway to MPTP and MPP⁺ toxicity: role of BDNF gene expression. *Molecular Brain Research* 1996; 41: 16-26.
52. Knaryan V, Samantaray S, Varghese M, et al. Synthetic bovine proline-rich-polypeptides generate hydroxyl radicals and fail to protect dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Neuropeptides* 2006; 40: 291-295.
53. Morgese M, Cassano T, Cuomo V, et al. Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Role of CB1 and TRPV1 receptors. *Experimental Neurology* 2007; 208: 110–119.
54. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265- 275.
55. Miller G. Protein determination for large number of samples. *Analytical Chemistry* 1959; 31: 964.
56. Eraslan G, Kanbur M, Silici S, ve ark. Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72: 931- 937.
57. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *Journal of Lipid Research* 1978; 19: 1053- 1057.

58. Luck H. Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis*, H. Bergmeyer (ed.), Academic Press, New York, 1963: 885–898.
59. Sun Y, Oberley L, Li Y. A simple method for clinical assay of Superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497- 500.
60. Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1967; 70: 158-169.