



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇAN STRİATAL DİLİMLERİNDE ANOKSİ VE BENZERİ  
KOŞULLARIN NEDEN OLDUĞU DOPAMİN SALIVERİLMESİ:  
SALIVERİLMEDE SİGMA RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

**Dr. Murat GÜRSOY**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA – 2008**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇAN STRİATAL DİLİMLERİNDE ANOKSİ VE BENZERİ  
KOŞULLARIN NEDEN OLDUĞU DOPAMİN SALIVERİLMESİ:  
SALIVERİLMEDE SİGMA RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

**Dr. Murat GÜRSOY**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL**

**BURSA - 2008**

## İÇİNDEKİLER

<b><u>İçindekiler</u></b>	<b><u>i</u></b>
<b><u>Türkçe Özet</u></b>	<b><u>ii</u></b>
<b><u>İngilizce Özet</u></b>	<b><u>iii</u></b>
<b><u>Giriş</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>Gereç ve Yöntem</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>Bulgular</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>Tartışma ve Sonuç</u></b>	<b><u>28</u></b>
<b><u>Kaynaklar</u></b>	<b><u>38</u></b>
<b><u>Teşekkür</u></b>	<b><u>48</u></b>
<b><u>Özgeçmiş</u></b>	<b><u>49</u></b>

## ÖZET

Bu çalışma anoksi, aglisemi ve iskeminin neden olduğu dopamin (DA) saliverilmesi üzerine sigma reseptör ligandlarının koruyucu etkilerini ve varsa etkilerinin mekanizmasını aydınlatmak amacı ile yapılmıştır. Sıçan korpus striatum dilimlerinin anoksik, aglisemik veya iskemik koşullarda inkübe edilmeleri DA saliverilmesinde arttırırken, doku ATP düzeylerinde sırasıyla %40, %75 ve %91 oranında azalmalara neden oldu. Sigma reseptör ligandları haloperidol ve ifenprodil sadece anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini azaltırken, aglisemi ve iskeminin neden olduğu DA saliverilmelerini etkilemedi. Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini hemen tamamen önleyen ifenprodilin, doku ATP düzeyindeki azalmayı geriye döndürmemesi, inhibitör etkisinin doku ATP düzeyini korunması ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Sigma ligandlarının etkisinde glutamaterjik sistemin olası rolü, hem saliverilen glutamat miktarının ölçülmesi, hem de glutamat reseptör antagonistlerinin etkilerinin test edilmesi ile incelendi. Diğer taraftan, etkide revers DA transportunun olası blokajı ise, gözlenen etkilerin DA uptake blokörü nomifensinin etkileri ile karşılaştırılarak test edildi. Anoksik koşullarda glutamat saliverilmesinin artmaması, etkide glutamat saliverilmesindeki bir inhibisyonun majör rol oynamadığını işaret etmektedir. NMDA ve non-NMDA reseptör antagonistleri MK-801 ve CNQX anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine azaltıcı etki gösterebilir de, etki güçleri haloperidol ve ifenprodile göre çok düşük bulundu. Anoksi ve benzeri koşulların farmakolojik simülasyonu olan  $Na^+,K^+$ -ATPaz enziminin ouabain ile inhibe edilmesi DA saliverilmesini arttırırken, bu artışın haloperidol tarafından inhibe edildiği, ancak MK-801 tarafından etkilenmediği gözlemlendi. Sonuç olarak sigma ligandları ve glutamat reseptör antagonistlerinin, anoksi ve ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine farklı etki göstermeleri, sigma ligandlarının etkisinde glutamat reseptör blokajının rol oynamadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan, anoksi ve ouabainin neden olduğu DA saliverilmeleri üzerine DA uptake blokörü nomifensinin ile haloperidolün

etkilerinin yakın benzerlik göstermesi, sigma ligandlarının etkisinde revers DA transportundaki inhibisyon olasılığını güçlendirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Sigma reseptör ligandları, anoksi, dopamin, glutamat

## SUMMARY

### **Anoxia and anoxia-like conditions induced dopamine release from rat striatal slices - Role of sigma receptors.**

This study was performed to reveal (investigate) the protective effects of the sigma receptor ligands on anoxia, aglycemia and ischemia induced dopamine (DA) release and if any to enlighten the mechanisms underlying this effect. While the incubation of rat striatal slices in anoxic, aglycemic and ischemic conditions increased DA release, a decline was observed in the tissue ATP levels by 40%, 75%, 91% respectively. The sigma receptor ligands haloperidol and ifenprodil only reduced the anoxia-induced DA release whereas, aglycemia and ischemia induced DA releases stayed unaffected. While ifenprodil almost completely prevented the DA release, it was unable to reverse the ATP depletion within the tissue, which makes one conclude that the inhibitory effect is not related with the preservation of the tissue ATP levels. The possible contribution of glutamatergic system to the effect of sigma ligands was investigated with the measurement of glutamate release and with the assessment of the effects of glutamate receptor antagonists as well. Moreover, the contribution of the possible blockade of the reverse DA transportation in this effect was tested via the comparison of the observed effects with the effects of the DA uptake blocker nomifensine. While no rise was observed in the release of glutamate under anoxic conditions, it seems unlikely that an inhibition on the release of glutamate plays a major role in this effect. Although the NMDA and non-NMDA receptor antagonists MK-801 and CNQX exert a preventing effect on the anoxia-induced DA release, this effect was not as strong as haloperidol and ifenprodil. The inhibition of Na-K-ATPase enzyme by ouabain, which is the pharmacological simulation of anoxia and similar conditions, stimulated DA release and while haloperidol inhibited this release, MK-801 had no effect. As a result, the differential effect of sigma ligands and glutamate receptor antagonists on the anoxia and ouabain induced DA release makes one think

that glutamate receptor blockade does not play a role in the effect of sigma ligands. Moreover, the similar effect of the DA uptake blockers haloperidol and nomifensin on anoxia and ouabain induced DA release, fortifies the possible effect of reverse DA transport inhibition on the effect of sigma ligands.

**Key Words:** Sigma receptor ligands, anoxia, dopamine, glutamate

## GİRİŞ

Beyin insan vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına karşın perfüzyon oranı oldukça yüksek bir organdır. Enerji gereksinimi diğer birçok organdan daha fazla olan beyin, vücuda alınan glukozun yaklaşık %25, oksijenin ise %20'sini kullanır. Tükettiği oksijenin %90'dan fazlasını mitokondrial ATP sentezi için kullanan beyinde, normal kan akımı 45-60 ml/100 g/dakika, metabolik hız ise 1.3 – 1.8  $\mu\text{mol/g/dakika}$  kadardır (1).

Hücrede aerobik koşullar altında primer enerji kaynakları oksijen ve glukozdur. Bu koşullarda glukozun glikoliz, trikarboksilik asit siklusu (TCA) ve elektron transport zinciri aşamalarından geçmesi sonucu ATP ile birlikte  $\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CO}_2$  açığa çıkar. Glikoliz, hücre sitoplazmasında gerçekleşen ve glukozun piruvata parçalanması ile sonuçlanan, 2 mol ATP'nin üretildiği reaksiyonlar zinciridir. Ortamda oksijenin olmadığı koşullarda piruvat laktik aside dönüşür. Oksijen varlığında ise piruvat, dekarboksilasyonla asetil CoA'ya dönüştürülür ve mitokondriye geçip TCA sirkülüsüne katılır. Bu siklusda meydana gelen NADH ve  $\text{FADH}_2$ , glikoliz sırasında üretilen NADH ile beraber mitokondride elektron transport zincirine katılarak, enerji üretiminde kullanılırlar. Elektron transport zincirinde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu toplam 34 ATP açığa çıkar. Sonuçta aerobik metabolizma 2 tanesi glikoliz, 2 tanesi de TCA aşamasında olmak üzere net 38 ATP sentezi ile sonuçlanır (1).

Enerji metabolizmasının bozulması sonucu hücre içi ATP düzeyindeki ani azalma, hücre hasarlanmasına neden olabilecek birçok biyokimyasal ve hücreysel olayı tetikler. Bu olaylardan en önemlisi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPaz enziminin inhibisyonu ile gelişen membran depolarizasyonu (anoksik depolarizasyon) ve bunu takip eden voltaja bağımlı  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  kanallarının açılmasıdır. Membran depolarizasyonu, başta eksitatör amino asitler olmak üzere anoksi ve/veya iskemiye duyarlı birçok nörotransmitterin salıverilmesine neden olur. Hücre içinde serbest  $\text{Ca}^{++}$  düzeyindeki yükselme, bu iyonla bağlı enzim aktivitelerinde ve serbest radikal oluşumunda artış ile beraber yapısal



proteinlerin fosforilasyonu sonucu hasarlanmaya yol açan bir çok mekanizmanın tetiklemesine neden olmaktadır (2-5).

Beyin kan akımının azalması ve/veya kesintiye uğraması sonucu sinir hücrelerinde gözlenen fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile meydana gelen doku hasarının büyüklüğü bazı faktörlere yakından bağlıdır. Bu faktörlerden bir tanesi, beyin kan akımında meydana gelen *azalmanın derecesidir*. Yukarıda belirtildiği gibi, serebral kan akım hızı fizyolojik koşullarda yaklaşık olarak 45-60 ml/100 g/dakika arasındadır. Kan akım hızı 20 ml'ye azaldığı zaman beyin bunu tolere edilebilir. Ancak bu azalma, bilinç kaybı ve ensefalografide yavaşlamaya yol açabilir. Kan akımının 18 ml/100 g/dakika'nın altına inmesi, iyonik dengenin yavaş yavaş bozulmasına neden olur. Bu koşullarda, nöronlardaki aerobik metabolizma anaerobik metabolizmaya dönmeye başlar. Serebral kan akımının 10 ml/100 g/dakikanın altına inmesi durumunda ise membran bütünlüğünde bozulma, hücre içine aşırı  $Ca^{++}$  iyonu girişi ve geri dönüşümsüz doku hasarı ortaya çıkar (1).

İskemiye bağlı doku hasarının ortaya çıkmasını ve bunun büyüklüğünü belirleyen diğer bir faktör, *iskeminin süresidir*. Beyin dokusu, 18 ml/100 g/dakika serebral kan akımı hızına, herhangi bir doku hasarı olmaksızın 4 saat boyunca dayanabilmektedir. Bu süre serebral kan akım hızı 15 ml olduğunda 3.5 saat, 10 ml olduğunda 3 saat, 5 ml olduğunda ise 30 dakika kadardır. Sonuç olarak sürenin uzaması ve buna bağlı olarak oksijen ve glukozun uzun süre yeterli miktarlarda beyine ulaşamaması, doku hasarının ortaya çıkmasını ve hasarın büyüklüğünü belirleyen kritik bir faktördür (1). İskemiye bağlı hasarın büyüklüğünü belirleyen bir diğer faktör de, iskemiye maruz kalan *beyin bölgesidir*. Yapılan çalışmalar beyin farklı bölgelerinde iskemiye olan duyarlılığın ve meydana gelen hasarın büyüklüğünün farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Sırası ile hipokampusün CA1, CA4, CA3 bölgeleri, granül hücreleri, serebellumun purkinje, stellate ve basket, granül,

golgi hücreleri, striatum, serebral korteksin özellikle 2 ve 4. tabakaları iskemi ve benzeri koşullara duyarlılığı daha fazla olan beyin bölgeleridir (6).

Hücre iyon dengesinin sürdürülmesi önemli ölçüde ATP'ye bağımlılık gösteren aktif ve pasif transport sistemlerinin uyum içinde çalışması ile mümkündür. Sinir hücre membranının her iki tarafı arasında, bu aktif ve pasif transport sistemleri ile sağlanan yaklaşık 60 mV'luk bir potansiyel farkı söz konusudur. Hücrenin canlılığını devam ettirebilmesi için gerekli olan oksijen ve glukoz yeterli bir şekilde hücreye ulaşmadığı zaman hücre içi ATP düzeyi hızla azalmaya başlar ve kısa sürede ATP depoları boşalır. Hücre içi ATP depolarındaki bu boşalma sonucu ATP'ye bağımlı olarak çalışan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaz enzimi (sodyum pompası) inhibe olur (4).

İskemi veya anoksinin ilk 90 saniyesi içinde iyon dengesindeki değişiklikler yavaş bir şekilde gerçekleşir. Başlangıçta gözlenen en önemli değişiklik hücre içi pH'nın hafifçe düşmesi ve ekstrasellüler  $\text{K}^+$  konsantrasyonunun yine hafifçe yükselmesidir (1-8). Birkaç dakika sonra ekstrasellüler  $\text{K}^+$  konsantrasyonu aniden artarak yaklaşık 60 mM'a ulaşırken,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonlarında kısa süreli bir düşme meydana gelir. Ekstrasellüler  $\text{K}^+$  düzeyinin yükselmesi hücrenin -20 mV dolaylarında depolarize olmasına neden olur. *Anoksik depolarizasyon* olarak adlandırılan söz konusu bu durum, anoksiye maruz kalan dokudaki hücrelerin elektriksel olarak uyarılabilirliklerinin artmasına yol açar. Anoksik koşullarda hücre membranının  $\text{K}^+$  iyonlarına karşı geçirgenliğinin artmasında voltaj ve ATP'ye duyarlı  $\text{K}^+$  kanallarının rollerinin olduğu gösterilmiştir (1,3,4,8). Her ne kadar hücre içi ATP düzeyindeki düşme sonrası ATP'ye duyarlı  $\text{K}^+$  kanallarının aktive oldukları biliniyorsa da, voltaja duyarlı  $\text{K}^+$  kanallarının anoksik koşullarda nasıl aktive oldukları tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Hücre içi veya hücre dışı pH değişikliklerinin söz konusu  $\text{K}^+$  kanallarının aktivasyonundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (8).

Anoksi ekstrasellüler  $K^+$  konsantrasyonunu artırırken,  $Na^+$  ve  $Cl^-$  konsantrasyonlarında azalmaya, intrasellüler  $Cl^-$  konsantrasyonunda ise artmaya neden olur. Söz konusu bu değişiklikler ya membran potansiyelindeki değişikliklerle beraber, ya da bundan hemen sonra ortaya çıkar.  $Mg^{++}$  ile ilgili çalışmalar çok fazla değilse de, intrasellüler  $Mg^{++}$  konsantrasyonunun iskemiden bir süre sonra (örneğin akut iskemik stroktan bir gün sonra) anlamlı derecede yükseldiği gösterilmiştir (4).

Anoksi ve benzeri koşulların neden olduğu diğer bir önemli değişiklik intrasellüler  $Ca^{++}$  konsantrasyonundaki artıştır. Normal fizyolojik koşullarda sarkoplazmik retikulum ve mitokondri gibi  $Ca^{++}$  iyonlarını hücre içinde depolayan organeller yanında,  $Ca^{++}$ 'u hücre dışına pompalayan mekanizmalar sayesinde hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonu  $100\text{ nM}$ 'ın altındaki düzeylerde tutulur (5,6).

ATP üretiminin azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan depolarizasyon, voltaj ve reseptöre bağlı  $Ca^{++}$  kanallarının açılmasına neden olarak hücre içine  $Ca^{++}$  iyonlarının girişine izin verir. Hücre içi  $Na^+$  düzeyindeki yükselme de,  $Na^+-Ca^{++}$  değişimini aktive ederek hücre içine ilave  $Ca^{++}$  girişine yol açar. Diğer taraftan fosfolipaz C aktivasyonu gibi hücre içi organellerden  $Ca^{++}$  saliverilmesine neden olan mekanizmalar da hücre içi serbest  $Ca^{++}$  düzeyinin yükselmesine katkıda bulunur. Sonuç olarak, iskeminin başlangıcından 60–90 sn sonra ekstrasellüler  $Ca^{++}$  konsantrasyonu hızla  $1.2\text{--}1.5\text{ mM}$ 'dan  $0.2\text{--}0.5\text{ mM}$  düzeyine düşerken, intrasellüler serbest  $Ca^{++}$  düzeyi de  $60\text{--}90\text{ nM}$  dan  $20\text{--}200\text{ }\mu\text{M}$ 'a kadar yükselir (5,6).

Yapılan çalışmalar anoksinin hücre içi pH'sını düşürdüğünü ( $7.4$ 'den  $6.2$  dolaylarına) ve bu düşmenin membran potansiyelindeki değişikliklerden önce meydana geldiğini göstermektedir (1,2,8,9). Hücre içi pH'daki bu düşmenin ATP sentezi ve tüketilmesi arasındaki dengenin bozulması yanında, laktat oluşumundaki artmaya bağlı olması da olasıdır. Hücre içi pH'nın düşmesi ile ilgili bir diğer gözlem, asidozun yalnız başına iskemik

hasardan sorumlu olmadığı yönündedir. Laktat oluşumundaki artma ve asidoz iskemik beynin hemen her tarafında uniform bir şekilde gözlenirken, meydana gelen iskemik hasarda benzer bir homojenlik genellikle söz konusu değildir. Anoksi veya iskemi, hücre içi pH yanında hücre dışı pH'da da düşmeye neden olur. Hücre içi pH değişikliği ile hemen hemen eş zamanlı ortaya çıkan bu değişikliğin hidrojen iyonu ve laktatın sitoplazmadan ekstrasellüler ortama taşınmasına bağlı olduğu sanılmaktadır (1).

Anoksik-iskemik koşullarda glutamat saliverilmesinin artması ve saliverilen glutamatın da hücre içi  $Ca^{++}$  düzeyini yükselterek doku hasarlanmasından sorumlu mekanizmaları tetiklemesi, “*eksitotoksisite*” hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur (3,5,7,8,10,11). Normoksik koşullarda, istirahat halindeki hücrede ekstrasellüler glutamat konsantrasyonu 1-5  $\mu M$ 'dir. Ancak şiddetli iskemi eksitatör aminoasitlerin ekstrasellüler ortamdaki konsantrasyonlarını 10-60 kat arttırmakta ve sonuçta kortikal, hipokampal ve striatal bölgedeki glutamat düzeyi 35-500  $\mu M$ 'a ulaşabilmektedir. Orta dereceli iskemi esnasında veya in vitro koşullarda gözlenen glutamat yükselmesi ise, çok daha az düzeylerde (yaklaşık 2-5 kat) kalmaktadır (9,12).

Normal koşullarda sinir uçlarından glutamat saliverilmesi,  $Ca^{++}$  iyonlarına bağımlı veziküller ekzositoz yolu ile olur. Ancak iskeminin neden olduğu hücre içi ATP düzeyindeki azalma veziküller saliverilmeyi inhibe ettiği için, glutamat saliverilmesinin kısmen veya tamamen  $Ca^{++}$ 'dan bağımsız “revers transport” mekanizması ile meydana geldiği görüşü ağır basmaktadır. Taşıyıcılar aracılığı ile yapılan glutamat transportunun yönü, ortamdaki glutamat konsantrasyonuna değil, iyonik konsantrasyona bağlıdır. Normal koşullarda taşıyıcı molekül, bir glutamat anyonu ve iki  $Na^+$  kationunu hücre içine taşırken, bir  $K^+$  ve bir  $OH^-$  (veya  $HCO_3^-$ ) iyonu hücre dışına transport eder. Böylece her bir taşıma döngüsünde hücre içine bir pozitif yükün taşınması söz konusudur. İskemik/anoksik koşullarda olduğu gibi, membranın iki tarafı arasındaki iyon konsantrasyonundaki değişiklikler

(ekstrasellüler  $K^+$  ve intrasellüler  $Na^+$  konsantrasyonundaki artışlar veya intrasellüler  $K^+$  ve ekstrasellüler  $Na^+$  konsantrasyonundaki azalmalar) taşıyıcı mekanizmanın ters yönde çalışmasına neden olur. Gerek iyon konsantrasyonunda gözlenen değişiklikler ve gerekse uptake mekanizmasının stoikiometrisini temel alan hesaplamalar, anoksik depolarizasyon esnasında taşıyıcı mekanizmanın yeni bir denge oluşuncaya kadar glutamati hücre dışına transport ettiğini ve meydana gelen bu denge esnasında ekstrasellüler ortamdaki glutamat konsantrasyonunun nörotoksik düzeylere ( $>100 \mu M$ ) çıktığını göstermiştir (9).

İskemi esnasında ekstrasellüler konsantrasyonu artan glutamat, postsinaptik membrandaki iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerini aktive eder. İyonotropik glutamat reseptörlerinden NMDA reseptörlerinin uyarılması hücre içine  $Ca^{++}$ , AMPA ve kainat reseptörlerinin aktivasyonu ise  $Na^+$  ve  $Ca^{++}$  iyonlarının girişine neden olur (13). Metabotropik reseptörler ise ikincil haberci sistemleri üzerinden etki göstermektedir. Bu etkiler fosfoinositol hidrolizi, fosfolipaz C aktivasyonu, cAMP artışı,  $Ca^{++}$  ve  $K^+$  iyon kanalları üzerinden meydana gelmektedir (5).

Hücre içi  $Ca^{++}$  artışının birçok biyokimyasal mekanizmayı aktive ederek doku hasarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir.  $Ca^{++}$  artışına bağlı olarak fosfolipaz, ksantin oksidaz, endonükleaz, nitrik oksit sentaz, proteaz ve lipazların aktivasyonu söz konusu biyokimyasal mekanizmaların en bilinenleridir. Bu olaylar sonucu hücre içinde hidroksil ve superoksit radikalleri, peroksinitrit, ve hidrojen peroksit düzeylerinin artması sonucu lipidlerin oksidasyonu, proteinlerin nitritlenmesinin neden olduğu sinyal transdüksiyonunda bozulma ve DNA hasarı, hücrenin nekroz veya apoptoza girmesi ile sonuçlanan kısır bir döngüye yol açmaktadır (6,11,12,14,15).

Hücre içi  $Ca^{++}$  artışı, mitokondri membranının iç membran ile dış membranı arasında bulunan mitokondrial membran geçiş porlarının (MPT) açılmasına neden olmaktadır. Hücre içi  $Ca^{++}$  düzeyi artışından başka, diğer

bazı faktörler de (ATP ve endojen antioksidan düzeylerindeki azalma, serbest radikal düzeylerindeki artış gibi) bu porların açılmasını uyarmaktadır. MPT'nin açılması, mitokondrinin iç membranında depolarizasyon ile birlikte intermembran proteinlerin (sitokrom-c, apoptoz indükleyen faktör) saliverilmesine neden olur. Mitokondrilerde bu porların açılma sayısının fazlalığı ve ATP azalmasına bağlı olarak nekrotik veya apoptotik ölümle sonuçlanan hücre hasar ortaya çıkar (6). Hücre içi  $Ca^{++}$  düzeyinin yükselmesi, MPT açılmasından başka, kalpain, kalsinörin ve kaspaz aktivasyonunun tetiklediği mekanizmalar üzerinden de hücre hasarına katkıda bulunur. Serin proteazlar (doku tipi plazminojen aktivatörü, ürokinaz plazminojen aktivatörü), matriks metalloproteinazların aktivasyonu, interlökin-1 ve tümör nekroz faktör  $\alpha$  saliverilmesindeki artış da  $Ca^{++}$  ile ilişkili hasarın büyüklüğünde rol oynayan diğer mekanizmalardır (6).

İskemi ve benzeri koşulların sadece eksitatör amino asitlerin değil, diğer bazı nörotransmitterlerin de saliverilmesinde artmaya neden olduğu bilinmektedir. Nitekim benzer koşullarda DA saliverilmesinin de belirgin derecede arttığı ve saliverilen DA'nın meydana gelen doku hasarlanmasında rol oynayabileceğini gösteren sonuçlar bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda sıcak çarpmasının neden olduğu iskemi ve hücre ölümünün DA saliverilmesinin inhibisyonu ile azaltılabildiği (9,16,17) gösterilmiştir. Benzer şekilde, iskeminin neostriatumda neden olduğu hasarın büyüklüğü, tek taraflı substantia nigra lezyonu ile azaltılabiliyordu (18,19). İskemi veya benzeri koşullarda meydana gelen doku hasarlanmasında DA'nın etki mekanizması çok açık değilse de, DA'nın glutamat ile sinerjistik bir şekilde etkileşerek hasarlanmaya katkıda bulunduğu sanılmaktadır (10,20).

Bu çalışmanın konusu olan sigma reseptörleri, vücutta yaygın bir dağılım gösteren ve başlangıçta  $\kappa$ - ve  $\mu$ -opioid reseptörlerinden farklı bir opioid sistem reseptörü olarak tanımlanmış olsa da, bu reseptörler üzerinden meydana gelen bir çok etki non-spesifik opioid antagonistleri tarafından önlenememiştir (21). Diğer taraftan, sigma ligandlarının NMDA reseptörleri

üzerinde fensiklidin bağlanma bölgesine bağlanarak bu reseptörler üzerinden ortaya çıkan etkileri modüle etmesi nedeni ile sigma reseptörünün, gerçekte fensiklidin bağlanma bölgesi olduğu ileri sürülmüştür (21). Bununla beraber yeni yapılan çalışmalarla sigma reseptörlerinin opioid reseptörleri ve fensiklidin bağlanma bölgelerinden ayrı, morfinan, butirofenon, trisiklik antidepresan, fenotiyazin, poliaminler gibi yapıları farklı birçok maddeye afinitesi olan ve hücre membranında yerleşim gösteren bağımsız reseptörler olduğu kanıtlanmıştır (21-23). Konu ile ilgili yayınlara bakıldığında sigma reseptörlerine yüksek afinite gösteren ifenprodil için sigma-2 reseptör agonisti (24), sigma-2 reseptör antagonisti (25), veya sigma-1 reseptör ligandı (26) ifadelerinin kullanıldığı görülmektedir. Haloperidol için de, sigma reseptör ligandı (27) veya sigma-1 reseptör antagonisti (28) ifadeleri kullanılmaktadır. Yapılan yayınların önemli bir kısmında ise bu belirsizlik (veya çelişki) nedeniyle "sigma ligandları" ifadesi daha sık tercih edilmektedir (27,29,30). Bu nedenle çalışmamızda haloperidol ve ifenprodil için sigma ligandları ifadesi kullanılmıştır.

Sigma ligandlarının iskemik ve anoksik koşullarda meydana gelen doku hasarlanmasındaki rolleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, artan glutamat (31) ve DA (32) salıverilmesinin bu ilaçlar tarafından azaltıldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, sigma ligandlarının serebral iskemide korteks ve hipokampüste koruyucu etki gösterdiği (33-35), dopaminerjik nöronlarda NMDA'nın neden olduğu sitotoksik etkileri engellediği (36) ve sıçan retinasında iskeminin neden olduğu hasarı azalttıkları gösterilmiştir (37).

Sonuç olarak konu ile ilgili elde edilen bulgular, sigma ligandlarının anoksik/iskemik koşullarda terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir. Söz konusu etkilerdeki mekanizmaları çok net değilse de, glutamat ve DA salıverilmesindeki azalmanın ve/veya iyon kanallarının modülasyonunun etkilerine aracılık ettiği sanılmaktadır. Yapılan bu çalışma, sigma reseptörleri üzerine yüksek afinite gösteren haloperidol ve ifenprodilin anoksi ve benzeri koşulların neden olduğu DA salıverilmesi üzerine etkilerini

göstermeyi ve varsa gözlenen etkilerin mekanizmasını aydınlatmayı amaçlamaktadır.



## GEREÇ VE YÖNTEM

### **Genel:**

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır (25. 07. 2006/4). Çalışmada, U.Ü Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezinden temin edilen, 250-350 gram ağırlığında Wistar türü erkek ve dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar çalışmadan en az bir gün önce deney hayvanları merkezinden alınarak, sıcaklığı (18-24 °C) ve ışığı (12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) ayarlı odada, su ve yem alımları serbest bırakılarak, 4-6 kadarı bir kafeste olacak şekilde tutuldular.

### **Beyin dilimlerin hazırlanışı ve inkübasyonu:**

Her deney prosedüründe bir adet dişi, bir adet erkek sıçanın başları giyotinle kesildikten sonra beyinleri süratle çıkarıldı ve %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandırılmış fizyolojik soğuk Krebs içine alındı. Çalışmada kullanılan Krebs solüsyonunun kompozisyonu şöyledir: 120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glukoz, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, antioksidan olarak 0.3 mM askorbik asit ve 0.029 mM Na<sub>2</sub>EDTA. Anoksik inkübasyon ortamı, Krebs çözeltisinin önce vakum altında degaze edilmesi ve ardından %95 N<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandırılması sonucu elde edildi. Aglisemik ortam için glukoz içermeyen Krebs çözeltisi hazırlandı ve solüsyonun osmolaritesi glukoz ekimolar miktarda NaCl konsantrasyonunun arttırılması ile dengelendi. İskemik ortam ise, aglisemik Krebs çözeltisinin vakum altında degaze edilmesi ve ardından %95 N<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> karışımıyla gazlandırılması sonucu elde edildi. Çıkarılan beyinlerin her iki hemisferinden korpus striatumlar diseke edildikten sonra McIlwain doku dilimleyicisine (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) yerleştirildi ve 0.3 mm kalınlığında dilimlendi. Dilimlenen dokular soğuk Krebs içeren petri kabına alınarak yumuşak bir fırça yardımı ile birbirinden ayrılması sağlandı. Bu şekilde elde edilen dilimler, 2 ml Krebs içeren 4 bölmeli inkübasyon tüplerine, her bölmede bir dilim olacak şekilde yerleştirildi. İnkübasyon tüplerine

yerleştirilen dilimler 37°C 'lik su banyosunda 90 dakika boyunca preinkübasyon dönemine alındı. Bu dönem esnasında 2 ml'lik inkübasyon ortamı 10 dakika aralıklarla oksijenlendirilmiş taze Krebs ile değiştirildi. 90 dakikalık preinkübasyon dönemi sonrası striatal dilimler 60 dakika sürecek olan kontrol (normoksik), anoksik, aglisemik veya iskemik koşullarda inkübasyona bırakılarak, bu koşulların neden olduğu etkilerin incelenmesi amaçlandı. Bu dönem boyunca da inkübasyon ortamı 10 dakikada bir tazesi ile değiştirildi ve toplanan örnekler HClO<sub>4</sub> ile asitlendirilerek (son konsantrasyon 0.4 N) yapılması planlanan analizler için kullanıldı. Etkileri incelenecek ilaçlar preinkübasyon döneminin son 10 dakikası içinde ortama eklendi ve bunu takip eden 60 dakikalık deney süresince de bu ilaçların ortamda bulunmaları sağlandı. 60 dakikalık inkübasyon, beyin dilimlerinin 2 ml 0.4 N HClO<sub>4</sub> içine alınması ile durduruldu. Dokudaki ATP miktarı ölçüleceği zaman ise dilimler, 2 ml soğuk metanol (-30 °C) içerisine alınarak inkübasyonları sonlandırıldı. Dilimlerin homojenize edilmesi ile elde edilen homojenatlar doku DA, dihidroksi fenil asetik asit (DOPAC), ATP ve protein düzeylerinin ölçümü için kullanıldı.

### **Striatal dilimlerden salıverilen DA ve DOPAC' ın ekstraksiyonu ve ölçümü:**

Striatal dilimlerden salıverilen DA ve DOPAC miktarları alüminyum oksit (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ekstraksiyonunu takiben, elektrokimyasal dedektör bağlantılı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-EC) ile ölçüldü (38). HClO<sub>4</sub> içeren şişelerde toplanan örnekler üzerine (son HClO<sub>4</sub> konsantrasyonu 0.4 N) asitle yıkanmış 100 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> eklendi. 0.5 M Tris tamponundan (pH 8.6, %1 EDTA + %1 sodyum metabisülfid) 5 ml ilave edilmesinden sonra, ortam pH'sı 5 N NaOH ile 8.3-8.6 arasına ayarlandı. Şişelerin ağzı parafilm ile kapatıldı ve örneklerdeki DA ve DOPAC'ın Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'e bağlanmasını sağlamak için 10-15 dakika kadar çalkalandı. Şişelerin içerisindeki sıvı faz aspire edilip, şişelerdeki Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10 ml distile su ile 2 defa yıkandı. Son yıkama sonrası su tamamen aspire edildi ve şişelere 150 µl 0.4 N HClO<sub>4</sub> eklenerek, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'e bağlanmış DA ve DOPAC ile geri alındı. Bu şekilde elde edilen örneklerin 50

$\mu$ l' si HPLC-EC sistemine enjekte edilerek DA ve DOPAC düzeyleri ölçüldü. DA ve DOPAC standartları  $\text{HClO}_4$  ile asitlendirilmiş Krebs içinde hazırlandı (son  $\text{HClO}_4$  konsantrasyonu 0.4 N) ve örneklerle beraber aynı işlemlere tabi tutuldu.

DA ve DOPAC ölçümü için çift pistonlu likid kromatografi pompası (Jasco PU 980, Japan) ve elektrokimyasal dedektör (Hewlett Packard 1049, PA, USA) bağlantılı HPLC-EC sistemi kullanıldı. Sistemde analitik ayırım,  $\text{C}_{18}$  analitik kolonu (Macherey-Nagel GmbH & Co. K. G., Germany) ve akış hızı 1 ml/dakika olan mobil faz (0.15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M sodium octylsulphate, 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , %10 MeOH, pH 4.5) kullanılarak yapıldı. Working elektrod olarak karbon, referans elektrod olarak da katı gümüş elektrod içeren elektrokimyasal dedektör hücresinin potansiyeli 0.7 volta ayarlandı. Rhyedone marka enjeksiyon ünitesi kullanılarak örneklerin enjeksiyonu gerçekleştirildi. DA ve DOPAC'ın elektrokimyasal dedektör hücresinde okside olmaları sonucu açığa çıkan elektronların meydana getirdiği akım değişikliklerinin Hewlett Packard integratör (HP 3396, PA, USA) ile pik şeklinde çizdirilmesiyle kromatogramlar elde edildi. Örnek kromatogramların pik boyları, standartların pik boyları ile karşılaştırılarak örneklerdeki DA ve DOPAC miktarları hesaplandı.

#### **Dokuda DA ve DOPAC ölçümü:**

60 dakikalık inkübasyon sonunda 2 ml 0.4 N  $\text{HClO}_4$  içerisine alınan dilimler ultrasonik homojenizatör (Bandelin UW70) ile homojenize edildi. Elde edilen homojenatın 0.5 ml'si ependorf tüplere aktarılıp Beckman mikrofüjünde 5 dakika santrifüj edildi. 50  $\mu$ l süpernatant herhangi bir ön işleme alınmadan direk olarak HPLC-EC sistemine enjekte edildi. Dokulardaki DA ve DOPAC miktarları, elde edilen pik boylarının 0.4 N  $\text{HClO}_4$  içinde hazırlanmış standartların verdiği pik boyları ile karşılaştırılması ile hesaplandı. Doku DOPAC düzeyleri, DA düzeyinin %5 veya daha azı kadar olduğu için (çoğu zaman ölçülemeyecek seviyelerde), bu çalışmada değerlendirmeye alınmadı.

### **Saliverilen glutamat ölçümü:**

60 dakikalık inkübasyon sonunda toplanan örneklerdeki glutamat miktarı, kolon sonrası türevlendirme ünitesine bağlı kuaterner pompa (HP, G1311A), fluorometrik dedektör (HP, G1321A) ve autosampler (HP, G1329A) içeren bir HPLC sistemi ile ölçüldü. Sistemde analitik kolon olarak lityum exchange kolon (Pickering) ve mobil faz olarak Li280, Li750 ve rejenerasyon tamponları (Pickering) kullanıldı. Mobil fazların gradient oranları, kolon ve kolon sonrası reaksiyon sıcaklıkları literatürde belirtilen değerlere göre ayarlandı (39). Orto-fitalaldehid reaktif bileşikler 330 nm eksitasyon, 465 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü ve kromatogramlar bir bilgisayar programı ile analiz edildi (HP Chemstation, revision A.08.03., 847).

HClO<sub>4</sub> ile asitlendirilen (son HClO<sub>4</sub> konsantrasyonu 0.4 N) örnekler 5 dakika boyunca mikrofüjde santrifüj edildi ve pH'ları 0,25 M LiOH ile 2-2.5 arasına ayarlandı. Daha sonra süpernatantın bir kısmı (20 µl), herhangi bir işleme tabi tutulmadan HPLC sistemine enjekte edildi. Glutamat miktarları, örneklerin pik boylarının, glutamat standardlarının pik boylarıyla karşılaştırılması ile hesaplandı. Glutamat standardları HClO<sub>4</sub> ile asitlendirilmiş Krebs içinde hazırlandı ve örneklerle aynı işlemlere tabi tutuldu.

### **Striatal dilimlerden ATP'nin ekstraksiyonu ve ölçümü:**

Striatal dilimler 2 ml metanol (-30 °C) içerisinde homojenize edildi. Homojenatın 1 ml'si, 1ml formik asit (1 M ) ile karıştırılarak vortekslendi. Vorteks işlemi sonrası karışıma 2 ml kloroform eklendi. Tekrar vortekslenen örnekler +4 °C'de 10 dakika süresince 3000 x g'de santrifüj edildi. Üst fazdan 1 ml alınıp vakum altında kurutuldu (40). Kurutulan örneklerin bulunduğu tüplere 50 µl distile su konularak örnekler çözüldü ve bunların 20 µl'si HPLC sistemine enjekte edilerek ATP miktarları ölçüldü. Ölçüm için HPLC sisteminde Dynamax (250X4,6 mm 5µm, Waters) kolon, kuarterner pompa (HP, G1311A), DAD dedektör (HP, G1315A), autosampler (HP, G1329A) ile akış hızı 1 ml/dakika olan A (5 mM amonyum fosfat pH 2.8) ve B mobil

fazları (750 mM amonyum fosfat PH 3.7) kullanıldı. Örneklerle beraber ekstrakte edilerek hazırlanan standartların pik alanları, örneklerin pik alanları ile karşılaştırılarak örneklerdeki ATP miktarları hesaplandı.

HPLC ölçümleri sonucu hesaplanan DA, DOPAC, glutamat ve ATP miktarları, doku protein miktarlarına oranlanarak ifade edildi. Doku protein düzeyleri ise Lowry metoduna (41) göre, 50 µl doku homojenatı kullanılarak ölçüldü.

#### **Kullanılan kimyasal maddeler:**

DA, DOPAC, ifenprodil, haloperidol, MK-801, CNQX, ouabain, nomifensin, sodium octylsulphate, askorbik asit *Sigma*, ATP *Acros*, glutamat *RBI*, glutamat ölçümünde kullanılan tampon çözeltiler *Pickering*, diğer kimyasallar ise *Merck*'den temin edildi.

#### **İstatistiksel değerlendirme:**

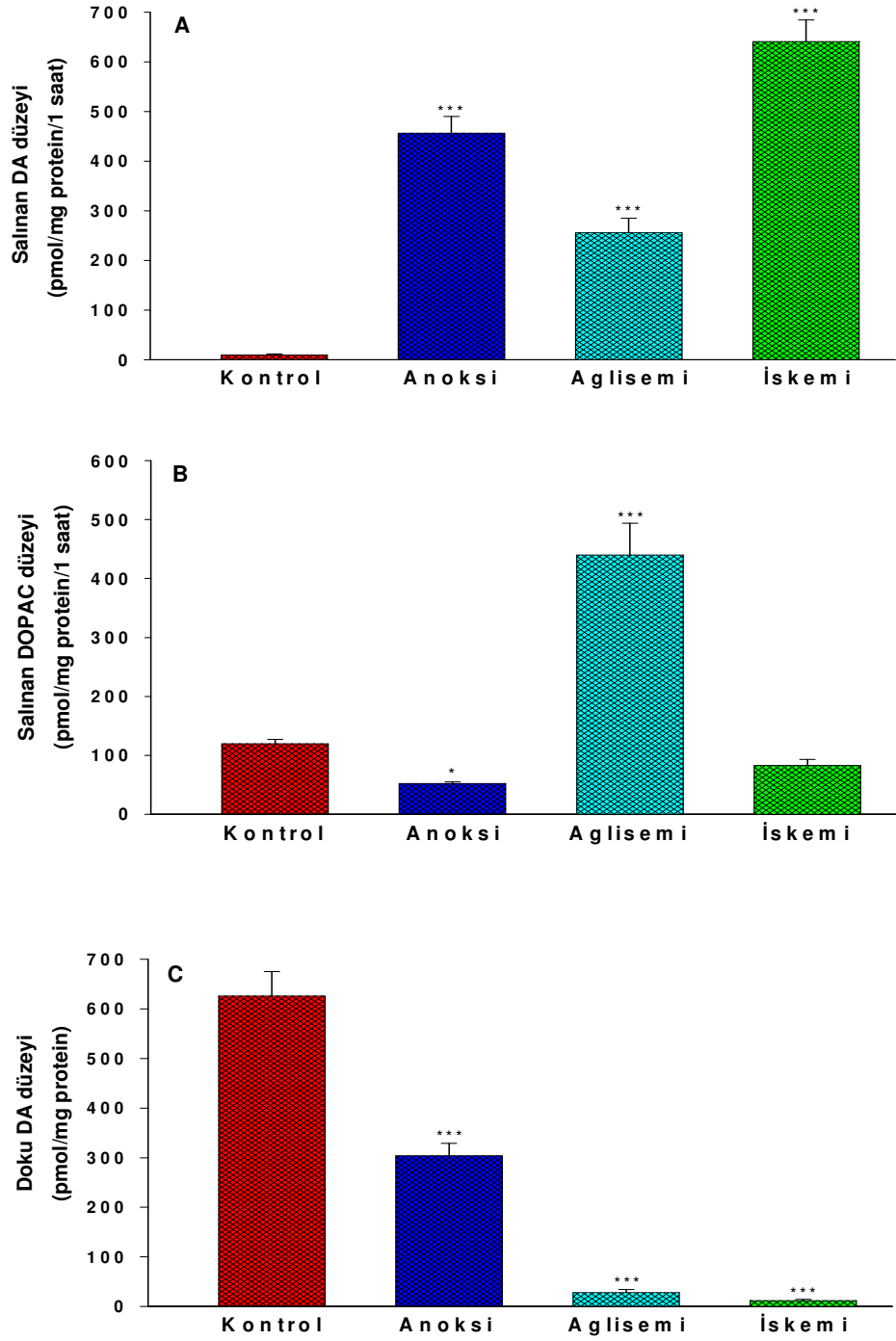
Çalışmalar sonucunda elde edilen bütün değerler ortalama  $\pm$  standart hata (SH) şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA ve bunu takiben Tukey testi ile, gerekli olduğunda ikili karşılaştırmalarda ise Student t testi kullanılarak yapıldı. *P* değerinin 0.05'den küçük olması durumunda, gözlenen farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistik işlemlerinde SigmaStat (versiyon 2.03) bilgisayar programı kullanıldı.

## BULGULAR

### 1. Anoksik, iskemik ve aglisemik koşulların DA, DOPAC saliverilmesi ve doku DA düzeylerine etkileri:

Preinkübasyon dönemi sonrasında 60 dakika boyunca kontrol (normoksik) inkübasyon ortamında inkübe edilen dilimlerden saliverilen DA ve DOPAC miktarları, sırası ile  $9 \pm 3$  ve  $120 \pm 7$  pmol/mg protein bulundu. Dilimlerin bir saat boyunca anoksik ortamda inkübe edilmeleri DA saliverilmesini  $456 \pm 34$  pmol/mg proteine çıkartırken, aynı sürede aglisemik koşullarda saliverilen DA miktarı  $256 \pm 29$  pmol/mg protein kadar ölçüldü (Şekil 1A). İnkübasyon ortamından oksijen ve glukozun birlikte çıkartılması ise (iskemi), dilimlerden saliverilen DA miktarını  $641 \pm 43$  pmol/mg proteine yükseltti.

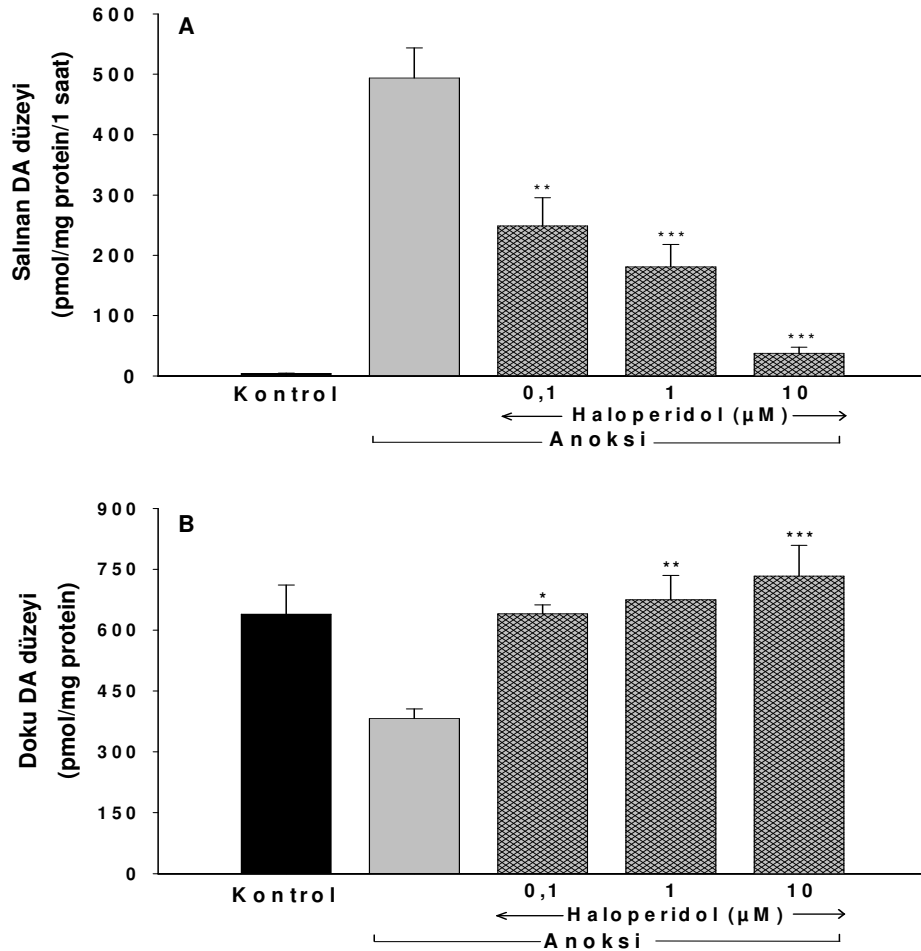
DA saliverilmesinde gözlenen artışın aksine DOPAC saliverilmesi, iskemik ve özellikle de anoksik koşullarda kontrole göre anlamlı derecede azalmış bulundu (Şekil 1B). Aglisemi ise striatal dilimlerden DOPAC saliverilmesinde yaklaşık 4 kat kadar bir artışa neden oldu; kontrol koşullarda  $120 \pm 7$  pmol/mg protein olan DOPAC saliverilmesi, aglisemik koşullarda  $440 \pm 54$  pmol/mg proteine yükseldi (Şekil 1B). Dilimlerden saliverilen DA ve DOPAC miktarları ile paralel olarak doku DA düzeyleri anoksik, aglisemik ve iskemik koşullarda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmış bulundu (Şekil 1C).



**Şekil 1: Anoksik, aglisemik ve iskemik koşulların striatal dilimlerden DA ve DOPAC salıverilmesi ile doku DA düzeyleri üzerine etkileri.** Preinkübasyon dönemi ardından dilimler 60 dakika kontrol, anoksik, aglisemik veya iskemik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon ortamınının 10 dakika aralıklarla yenisi ile değiştirilmesi sonucu elde edilen örnekler HClO<sub>4</sub> içinde toplandı ve dilimlerden salıverilen DA (Şekil 1A) ve DOPAC (Şekil 1B) miktarlarının ölçümü için kullanıldı. İnkübasyon sonrası dilimlerin homojenize edilmesi ile elde edilen homojenatlardan ise doku DA düzeyleri ölçüldü (Şekil 1C). Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama ± standart hata (SH) şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 14'tür. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

## 2- Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine sigma reseptör ligandlarının etkisi:

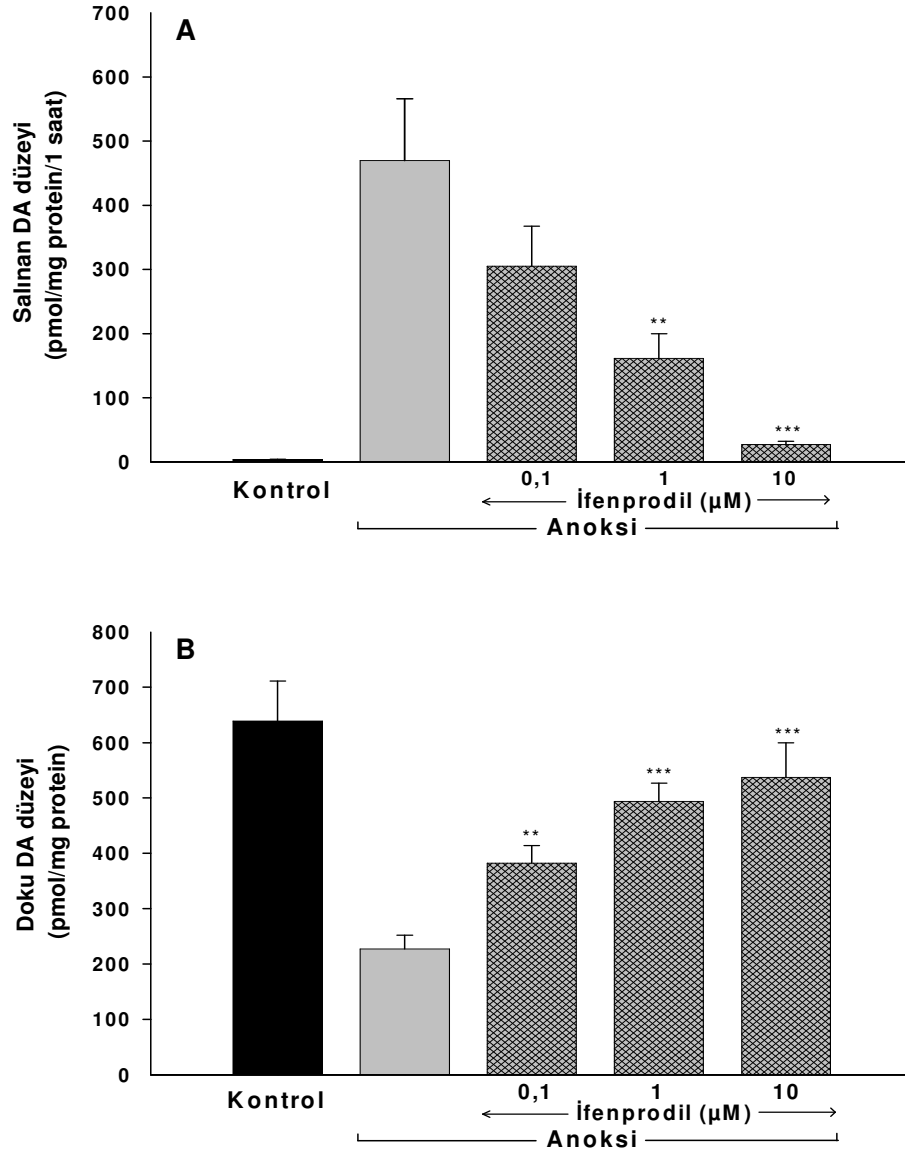
Bu çalışmada sigma reseptör ligandı olarak, sigma reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanan haloperidol ve ifenprodil kullanıldı. Preinkübasyon döneminin son 10 dakikası içinde ortama eklenen ve anoksik dönem boyunca ortamda kalması sağlanan haloperidol anoksinin neden olduğu DA saliverilmesinde doza bağlı bir azalmaya neden oldu (Şekil 2A). Saliverilmede gözlenen bu azalmaya paralel olarak, anoksinin neden olduğu doku DA düzeyindeki azalma da haloperidol tarafından önemli ölçüde önlendi (Şekil 2B).



**Şekil 2: Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi ve doku DA düzeyindeki azalma üzerine haloperidolün etkisi.** Preinkübasyon dönemi sonrasında striatal dilimler 60 dakika boyunca anoksik ortamda haloperidol varlığında veya yokluğunda inkübe edildi. Bu dönem boyunca toplanan inkübasyon ortamı dilimlerden saliverilen DA miktarının ölçümü için kullanıldı (Şekil 2A). İnkübasyon sonrası homojenize edilen dilimlerden ise doku DA miktarları ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama  $\pm$  SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 5'dir. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 anoksi grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.



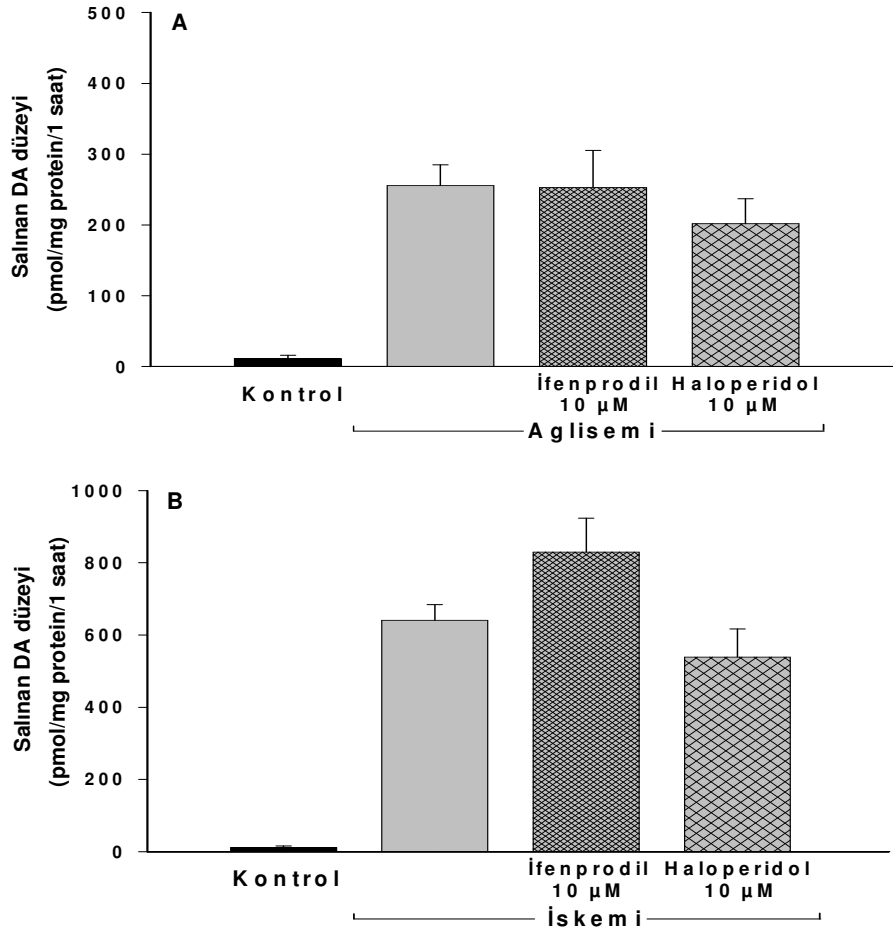
Çalışmada kullanılan diğer sigma reseptör ligandı ifenprodil de, hem anoksinin neden olduğu DA salıverilmesi, hem de doku DA düzeyindeki azalma üzerine haloperidol benzeri bir etki gösterdi (Şekil 3A ve 3B).



**Şekil 3: Anoksinin neden olduğu DA salıverilmesi ve doku DA düzeyindeki azalma üzerine ifenprodilin etkisi.** Preinkübasyon dönemi sonrasında striatal dilimler 60 dakika boyunca anoksik ortamda ifenprodil varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Bu dönem boyunca toplanan inkübasyon ortamı dilimlerden salıverilen DA miktarının ölçümü için kullanıldı (Şekil 3A). İnkübasyon sonrası homojenize edilen dilimlerden ise doku DA miktarları ölçüldü (Şekil 3B). Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama  $\pm$  SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 5'dir. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 anoksi grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

### 3- Aglisemi ve iskemiyin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine sigma reseptör ligandlarının etkisi:

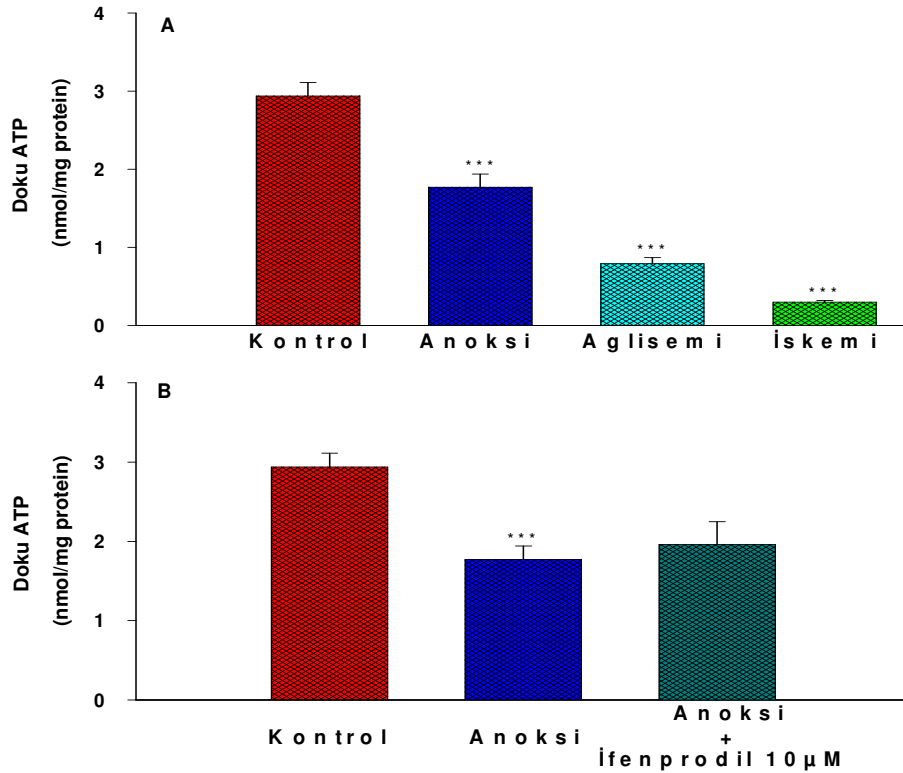
Çalışmanın bu bölümünde haloperidol ve ifenprodil'in aglisemik ve iskemik koşullardaki etkileri incelendi. Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini hemen tamamen önleyen 10 µM haloperidol, ne agliseminin (Şekil 4A), ne de iskemiyin neden olduğu DA saliverilmesini (Şekil 4B) anlamlı bir şekilde etkiledi. Benzer şekilde, ifenprodil de (10 µM) aglisemi ve iskemiyin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine etkisiz bulundu (Şekil 4A ve 4B). Diğer taraftan sigma reseptör ligandlarının bu koşullarda gözlenen DOPAC saliverilmesini anlamlı bir şekilde değiştirmedikleri gözlemlendi (bu bulgular gösterilmemiştir).



**Şekil 4: Aglisemi ve iskemiyin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine haloperidol ve ifenprodilin etkisi.** Striatal dilimler 60 dakika boyunca aglisemik veya iskemik koşullarda haloperidol ve ifenprodil ile inkübe edildi. Bu dönem boyunca toplanan inkübasyon ortamı dilimlerden saliverilen DA miktarının ölçümü için kullanıldı. Değerler ortalama ± SH şeklinde ifade edilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 5'dir. Haloperidol ve ifenprodil kullanıldığında elde edilen değerler, sadece aglisemik veya iskemik koşullarda elde edilen değerlerden anlamlı olarak farklı değerdir ( $p>0.05$ ).

#### 4- Anoksik, aglisemik ve iskemik koşullarda doku ATP düzeyindeki değişiklikler - Sigma reseptör ligandlarının etkisi:

Yapılan çalışmalarda hücre içi ATP azalmasının hasarı tetikleyen en önemli faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (4). Yaptığımız bu çalışmada, inkübasyon ortamından oksijenin çıkartılması ATP miktarında %40 azalmaya neden olurken, aglisemik veya iskemik koşullarda ATP düzeyindeki azalma oranları sırası ile %75 ve %91 olarak saptandı (Şekil 5A). ATP düzeyinde gözlenen bu azalmalar üzerine sigma reseptör ligandlarının etkisi ifenprodil kullanılarak test edildi. Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini hemen tamamen inhibe eden 10 µM ifenprodil, bu koşullarda gözlenen doku ATP düzeyindeki azalmayı anlamlı bir şekilde etkilemedi (Şekil 5B). Aglisemi ve iskeminin neden olduğu DA saliverilmesindeki artışı etkilemediği için, bu koşullarda gözlenen ATP düşüşleri üzerine ifenprodilin etkisi bu çalışma kapsamında test edilmedi.

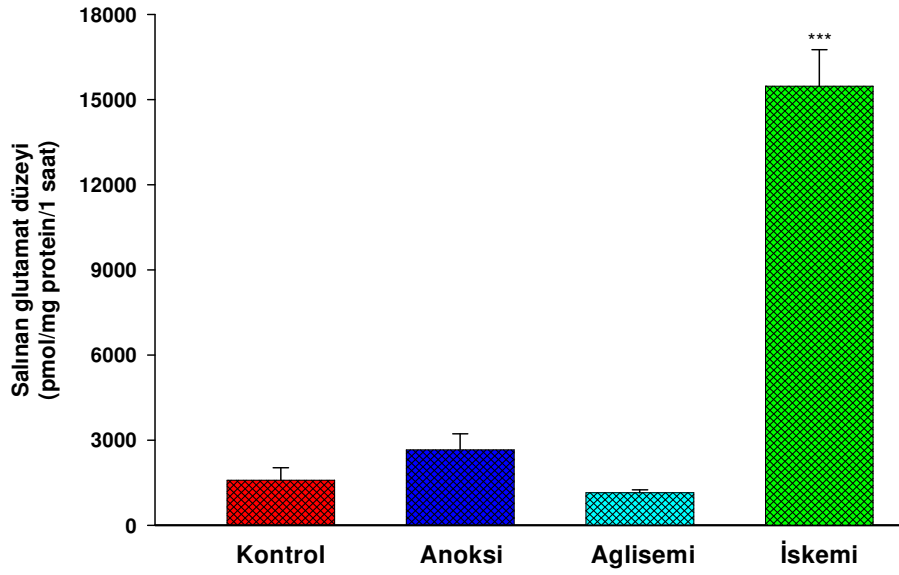


**Şekil 5: Anoksik, aglisemik, iskemik koşullarda doku ATP düzeylerindeki değişiklikler (Şekil 5A) ve sigma reseptör ligandı ifenprodilin etkisi (Şekil 5B).** Striatal dilimler 60 dakika normoksik, anoksik, aglisemik ve iskemik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası dilimler -30 °C'deki metanol içine alındı ve metod kısmında belirtilen şekilde doku ATP düzeyleri ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı 6'dır. \*\*\*p<0.001, kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

## **5- Anoksi, aglisemi ve iskeminin neden olduğu DA saliverilmesinde glutamatın rolü - Sigma reseptör ligandlarının etkisi:**

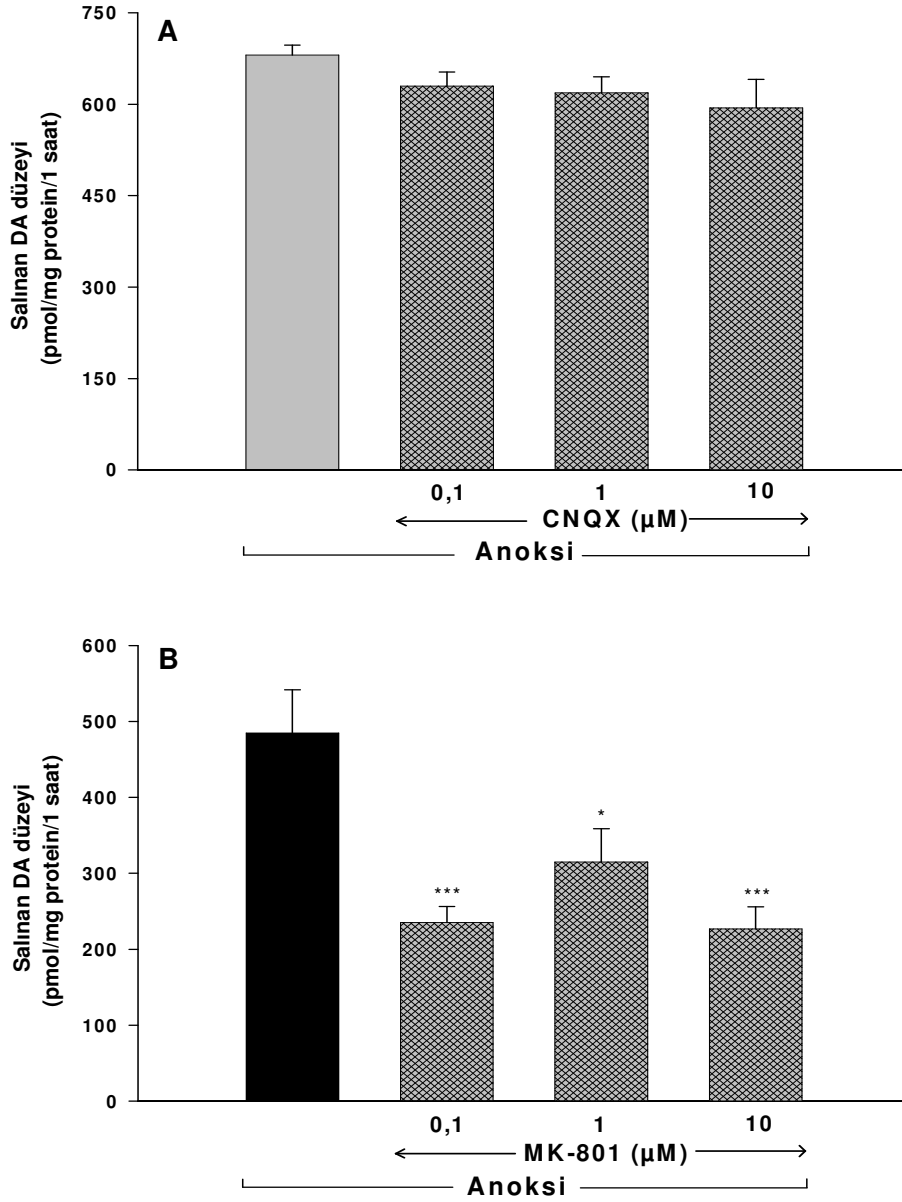
Giriş kısmında belirtildiği gibi, anoksi ve benzeri koşullarda meydana gelen doku hasarında glutamat ve bununla ilişkili olarak “eksitotoksisite” hipotezi oldukça önemsenmektedir. Bu nedenle çalışmanın bu bölümünde, anoksinin neden olduğu DA saliverilmesindeki artışta glutamatın olası rolü, ve varsa buna sigma reseptör ligandlarının etkisi araştırıldı. Glutamatın olası rolü ise, striatal dilimlerden DA ile aynı anda saliverilen glutamat miktarının ölçülmesi ve anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine glutamat reseptör antagonistlerinin etkilerinin incelenmesi ile test edildi.

Striatal dilimlerin 60 dakika boyunca anoksik koşullarda inkübe edilmeleri, DA saliverilmesinde gözlenen artışın aksine, glutamat saliverilmesinde anlamlı bir yükselmeye neden olmadı (Şekil 6). Dilimlerden DA yanında DOPAC saliverilmesinde de çok belirgin bir artışa neden olan aglisemi de glutamat saliverilmesi üzerine etkisiz bulundu. İnkübasyon ortamından oksijen ile birlikte glukozun çıkartılması ise (iskemi), glutamat saliverilmesini kontrol değeri olan  $1588 \pm 442$  pmol/mg protein'den  $15479 \pm 1282$  pmol/mg proteine yükseltti (Şekil 6). Bu bulgular, anoksik koşullarda meydana gelen DA saliverilmesinde, glutamat saliverilmesindeki bir artışın rol oynamadığını işaret etmektedir. Dolayısı ile bu koşullarda sigma reseptör ligandları haloperidol ve ifenprodilin neden oldukları DA saliverilmesindeki azalma, glutamat saliverilmesindeki bir inhibisyon ile ilişkili görülmemektedir. İskeminin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine etki göstermemelerine karşın, çalışmanın bu bölümünde haloperidol ve ifenprodilin iskeminin neden olduğu glutamat saliverimesine etkili olup olmadıkları da test edildi. İnkübasyon ortamına eklenen  $10 \mu\text{M}$  haloperidol bu koşullarda artan glutamat saliverilmesini anlamlı bir şekilde etkilemedi. Aynı konsantrasyondaki ifenprodil ise iskeminin neden olduğu glutamat saliverimesini  $17600 \pm 1560$  pmol/mg protein'den  $13099 \pm 574$  pmol/mg proteine düşürdü ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 6: Anoksik, aglisemik ve iskemik koşulların striatal dilimlerden glutamat saliverilmesi üzerine etkisi.** Preinkübasyon dönemi ardından dilimler 60 dakika kontrol, anoksik, aglisemik veya iskemik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon ortamınının 10 dakikada bir yenisi ile değiştirilmesi sonucu elde edilen örnekler asit içinde toplandı. Toplanan örneklerdeki glutamat miktarları materyal ve metod kısmında belirtildiği gibi ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama  $\pm$  SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 5'dir. \*\*\* $p < 0.001$ , kontrol grubuna göre grubuna anlamlı derecede farklıdır.

Yukarıdaki bulgular anoksinin neden olduğu DA saliverilmesinde glutamat saliverilmesindeki bir artışın rol oynamadığını işaret etmekle birlikte, glutamatın olası rolünü dışlayamaz. Saliverilmesinde artma olmasa bile, ekstrasellüler ortamdaki glutamatın bu koşullarda duyarlılığı artmış reseptörleri aracılığı ile DA saliverilmesindeki artışta rol oynaması olasıdır (8). Bu olasılık, glutamat reseptör antagonistlerinin anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine etkilerinin incelenmesi ile test edildi. Şekil 7A'da görüldüğü gibi AMPA reseptör antagonisti CNQX 10  $\mu$ M'da etki göstermezken, NMDA reseptör antagonisti MK-801 ise kullanıldığında anoksinin neden olduğu DA saliverilmesinde azalmaya neden oldu (Şekil 7B).



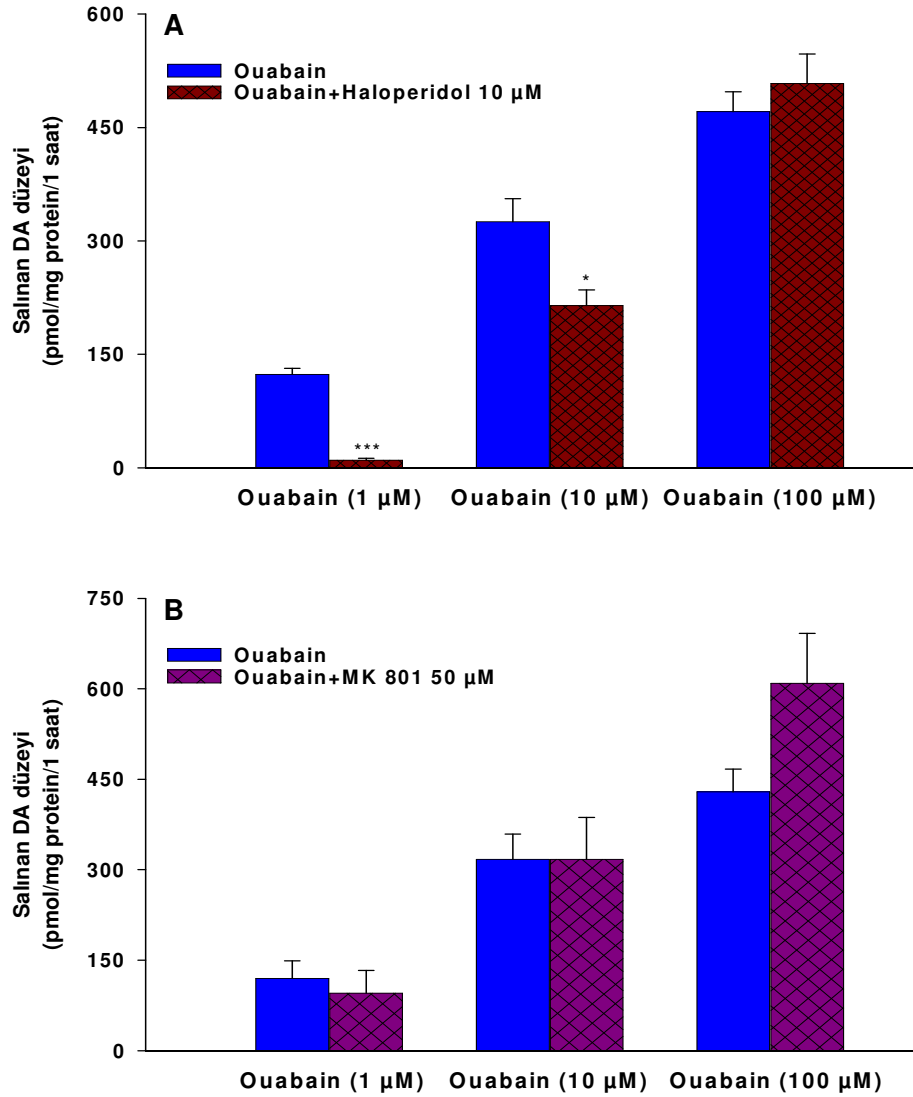
**Şekil 7: Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine glutamat reseptör antagonistleri CNQX (Şekil 7A) ve MK-801'in (Şekil 7B) etkileri.** Glutamat reseptör antagonistleri preinkübasyon döneminin son 10 dakikasında ortama eklendi ve 60 dakikalık anoksik dönemde ortamda bulunmaları sağlandı. Ortamın 10 dakikada bir yenisi ile değiştirilmesi sonucu elde edilen örnekler asit içinde toplandı ve dilimlerden saliverilen DA miktarının ölçümü için kullanıldı. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama  $\pm$  SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 5'dir. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  sadece anoksik ortamda elde edilen değerden anlamlı derecede farklıdır.

## **6. Ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi - Sigma reseptör ligandlarının ve glutamat reseptör antagonistlerinin etkisi:**

Anoksi benzeri koşulların neden olduğu en önemli etkilerin başında “anoksik depolarizasyon” olduğu ifade edilmişti. Bu koşullarda hücre içi ATP düzeyindeki düşüşün  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz enzim inhibisyonuna neden olduğu ve bu inhibisyonun yol açtığı depolarizasyonun ortaya çıkan doku hasarından sorumlu olduğu genel olarak kabul edilmektedir (3,4,8,10). Çalışmanın bu bölümünde inkübasyon ortamına eklenen ouabain ile  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz enzimi inhibe edilerek, anoksi etkisinin farmakolojik olarak taklit edilmesi ve bu koşullarda gözlenecek DA saliverilmesi üzerine sigma reseptör ligandlarının etkisinin test edilmesi amaçlandı. Yine bu bölümde, anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini azaltan MK-801’in etkisi de incelenerek, sigma reseptör ligandları ile NMDA reseptör antagonistlerinin etkilerinin benzerliği karşılaştırıldı.

Şekil 8A’da görüldüğü gibi inkübasyon ortamına eklenen ouabain konsantrasyona bağlı bir şekilde DA saliverilmesinde artmaya neden oldu. Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini hemen tamamen önleyen 10  $\mu\text{M}$  haloperidol, 1  $\mu\text{M}$  ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine de benzer güçte bir etki gösterdi ( $p < 0.001$ ).  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz enziminin 10  $\mu\text{M}$  ouabain ile inhibe edilmesi durumunda, haloperidol DA saliverilmesini inhibe etmekle birlikte, etki gücünde belirgin bir azalma gözlemlendi ( $p < 0.05$ , Şekil 8A). İnkübasyon ortamındaki ouabain konsantrasyonu 100  $\mu\text{M}$ ’a yükseltildiğinde ise haloperidol, aglisemik veya iskemik koşullarda olduğu gibi, artmış olan DA saliverilmesini anlamlı bir şekilde etkilemedi (Şekil 8A).

Anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine haloperidol benzeri etki gösteren MK-801 ise, sigma reseptör ligandının aksine, düşük konsantrasyonlarda ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine bile inhibe edici bir etki göstermedi (Şekil 8B).



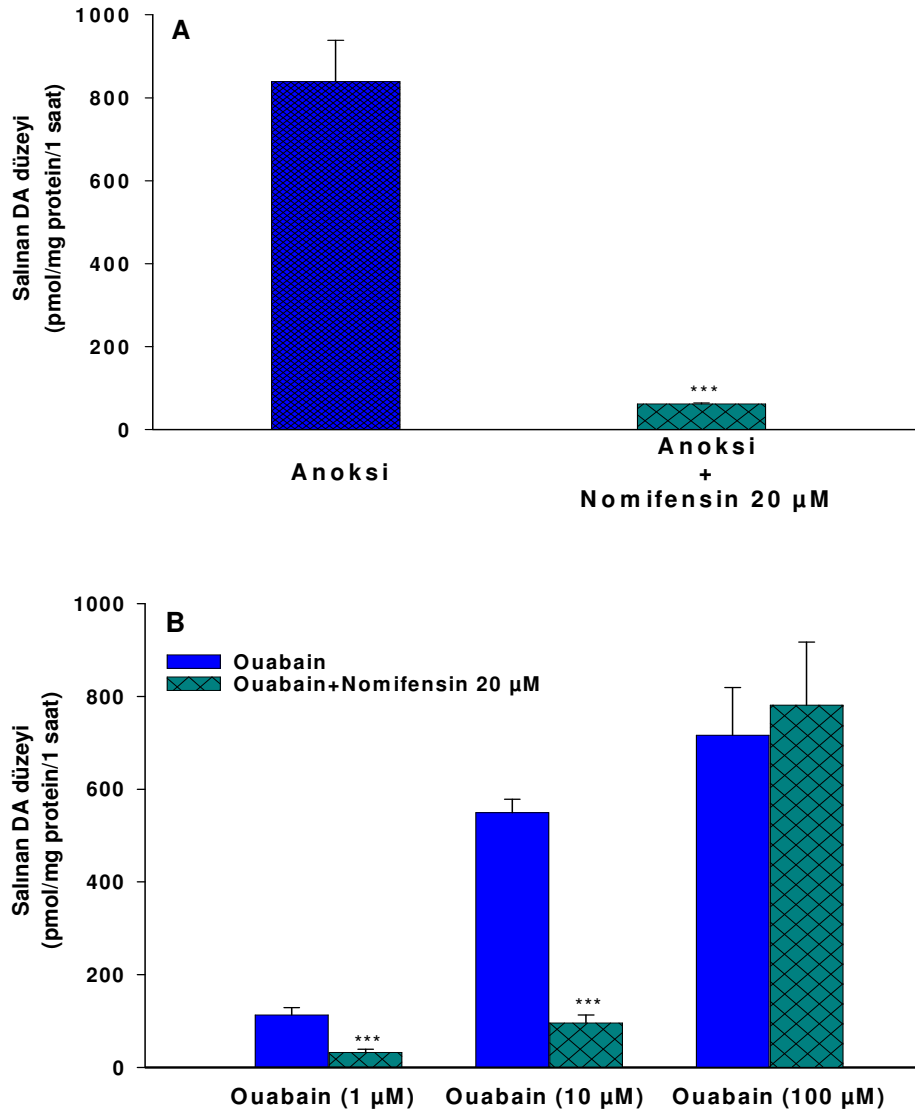
**Şekil 8: Ouabain neden olduğu DA saliverilmesi - Sigma reseptör ligandı haloperidol (Şekil 8A) ve NMDA reseptör antagonisti MK-801'in (Şekil 8B) etkisi.** Haloperidol ve MK-801 preinkübasyon döneminin son 10 dakikasında ortama eklendi ve 60 dakikalık ouabain inkübasyonu süresince ortamda bulunması sağlandı. İnkübasyon ortamının 10 dakika aralıklarla yenisi ile değiştirilmesi sonucu elde edilen örnekler asit içinde toplanarak dilimlerden saliverilen DA miktarının ölçümü için kullanıldı. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama  $\pm$  SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı 6-7'dir. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  sadece ouabain varlığında elde edilen değerlere göre anlamlı derecede farklıdır.

## 7. Anoksi ve ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine DA uptake blokörü nomifensinin etkisi:

Daha önce laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda anoksinin neden olduğu DA saliverilmesinin, DA uptake blokörü nomifensin tarafından hemen



tamamen önlendiği bulunmuştu (38). Bu nedenle anoksinin neden olduğu DA saliverilmesinde, diğer bazı çalışmalarda da gösterildiği gibi, revers transport mekanizmasının rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (42,43). Çalışmanın bu bölümünde, anoksi ve ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine nomifensinin etkisi test edilerek, sigma reseptör ligandları ile nomifensinin etkilerinin benzerliği karşılaştırıldı.



**Şekil 9: DA uptake blokörü nomifensinin anoksi (Şekil 9A) ve ouabainin (Şekil 9B) neden olduğu DA saliverilmesi üzerine etkisi.** Nomifensin preinkübasyon döneminin son 10 dakikasında ortama eklendi ve 60 dakikalık anoksi veya ouabain inkübasyonu süresince ortamda bulunması sağlandı. İnkübasyon ortamının 10 dakika aralıklarla yenisi ile değiştirilmesi sonucu elde edilen örnekler asit içinde toplanarak dilimlerden saliverilen DA miktarının ölçümü için kullanıldı. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama  $\pm$  standard hata (SH) şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı 6' dir. \*\*\*p<0.001 ouabain grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

Şekil 9A'da gösterildiği gibi nomifensin (20 µM), daha önce de gösterildiği gibi (38), anoksinin neden olduğu DA salıverilmesini hemen tamamen önledi. Diğer taraftan nomifensin, sigma reseptör ligandı haloperidol gibi, düşük konsantrasyonlarda ouabainin neden olduğu DA salıverilmesini önlerken ( $p<0.001$ ), inkübasyon ortamındaki ouabain konsantrasyonunun yükseltilmesi, nomifensinin koruyucu etkisinin azalmasına veya tamamen ortadan kalkmasına oldu (Şekil 9B).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak (19,20,38) dopaminerjik sinir uçlarından DA saliverilmesinin anoksik ve benzeri koşullara oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Söz konusu koşullarda meydana gelen doku hasarlanmasında glutamat yanında DA'in de olası katkısı farklı araştırmacı gruplar tarafından vurgulanmıştır (9,16,18,19). Bu nedenle, anoksik-iskemik koşullarda meydana gelen DA saliverilmesinin mekanizmasını aydınlatmak, saliverilmeyi azaltan veya ortadan kaldıran ve sonuç olarak doku hasarını önleyen yeni farmakolojik yaklaşımların geliştirilmesi bakımından önemlidir.

Giriş kısmında belirtildiği gibi, anoksi/iskeminin neden olduğu en önemli etkilerden bir tanesi, hücre içinde ATP düzeyinde meydana gelen ani azalmadır (3,4). Bunu sodyum pompası, yani  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz enziminin inhibisyonu, hücre içi  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarının yükselişi ile kendini gösteren "anoksik depolarizasyon" takip eder (4). Nitekim yapılan çalışmalarla, hücre içi ATP azalmasını önleyen veya hücre içinde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  artışını inhibe eden farmakolojik girişimlerin, anoksi-iskeminin neden olduğu doku hasarını azaltabildiği gösterilmiştir (44-46).

Anoksi-iskeminin neden olduğu doku hasarı ile ilgili olarak öne sürülen önemli görüşlerden bir tanesi "eksitotoksisite" hipotezidir. Buna göre anoksik depolarizasyon sonucu saliverilmesi ve sonuçta ekstrasellüler ortamdaki konsantrasyonu artan glutamat, reseptörlerini etkilemek sureti ile hasarlanmadan sorumlu biyokimyasal mekanizmaları aktive etmektedir (3,5,7,8,10,11). Diğer taraftan, glutamat saliverilmesindeki artış yanında, iskemi sonrasında NMDA reseptörlerinin glutamata olan yanıtlarının belirgin derecede arttığı, dolayısı ile glutamatın normoksik koşullarda meydana getirdiği etkinin, iskemi sonrası önemli ölçüde potansiyalize edildiği gösterilmiştir (44,47,48). NMDA NR2A alt ünitesinde upregülasyon (8,47),  $\text{Mg}^{++}$ 'un NMDA reseptörleri üzerindeki bloke edici etkisini azaltan protein

kinaz C aktivasyonu (49), anoksik-iskemik koşullarda saliverilmesi artan araşidonik asit (50), glutamat reseptör duyarlığında artmaya neden olan başlıca faktörlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak glutamat Saliverilmesinin veya reseptör duyarlığının azaltılması yanında, glutamat reseptör antagonistlerinin anoksi-iskeminin yol ağtığı doku hasarını önlemede etkili olduğu gösterilmiştir (45-47,51).

şekil 1'de görüldüğu gibi, striatal dilimlerin inkübe edildiği ortamdan oksijenin ııkartılması DA saliverilmesinde belirgin bir artışa neden olurken, DOPAC saliverilmesinde azalma gözlenmiştir. Bu koşullarda ortaya ııkan DA saliverilmesindeki artışın mekanizması daha sonraki bölümlerde detaylı bir şekilde tartışılacaktır. DA metabolizmasında rol oynayan monoaminoksidaz (MAO) enzimi, oksijene gereksinim gösteren bir enzim olduğu için (52), anoksik koşullarda gözlenen DOPAC ııkışındaki azalma, daha önce de belirtildiği gibi (38), muhtemelen DA metabolizmasındaki bir inhibisyonun sonucudur. İnkübasyon ortamından oksijen yerine glukozun ııkartılması, anoksik koşulda gözlendiği kadar olmasa da, DA saliverilmesinde anlamlı artışa neden oldu. Ancak anoksinin aksine, aglisemi DOPAC saliverilmesini yaklaşık 3 kat kadar arttırdı. İnkübasyon ortamından oksijen ile birlikte glukozun ııkartılması ise, DA saliverilmesini anoksi ve agliseminin neden olduğu salivermeden ıok daha fazla arttırırken (şekil 1A;  $p < 0.001$ ), DOPAC saliverilmesinde aglisemik koşullarda gözlenen artışın geriye döndüğu gözlendi (şekil 1B). şekil 1'deki DA ve DOPAC verileri topluca değerlendirildiğinde, aglisemik koşullarda saliverilen DA + DOPAC miktarının, iskemik koşullarda elde edilen değerlere oldukça yakın olduğu görüldü ( $p=0,733$ ). Bu bulgular, aglisemik koşullarda DA'in büyük bir kısmının MAO tarafından DOPAC'a dönüştürüldüğünü, ortamdan oksijenin de ııkartılması durumunda, söz konusu enzimin inhibe olması nedeni ile bu dönüşümün gerıekleşmediğini işaret etmektedir.

Anoksik/iskemik koşullarda gözlenen DA saliverilmesindeki artış, konu ile ilgili bütün ıalışmalarda rapor edilen ortak bir bulgu olmakla birlikte, bunun

mekanizması konusunda ileri sürülen görüşlerde farklılıklar söz konusudur. Yapılan çalışmaların bir kısmında DA saliverilmesinin  $Ca^{++}$  iyonlarına bağımlı bir mekanizma ile meydana geldiği ileri sürülürken (53), diğer çalışmalarda ise  $Ca^{++}$  iyonlarının saliverilmede rol oynamadığı rapor edilmiştir (54). Benzer şekilde, DA saliverilmesinde meydana gelen artışta glutamatın rolü ile ilgili olarak da çelişkili sonuçlara kolaylıkla rastlanabilir (55-57). Anoksi-iskemi ile ilgili in vitro çalışmalara bakıldığında, araştırmacıların değişik deneysel modeller kullandığı görülebilir. İnkübasyon ortamından sadece oksijen veya glukozun çıkartılması veya her ikisinin kısmen veya tamamen ortamdaki uzaklaştırılması sıklıkla kullanılan deneysel modeller arasındadır. Dolayısıyla kullanılan model farklılığının, gözlenen etkilerin mekanizmasında değişikliğe ve sonuç olarak bulguların farklı yorumlanmasına neden olması olasıdır.

ATP depleasyonu ve anoksik depolarizasyonun en önemli etkilerinden bir tanesi plazma membranının iki tarafı arasındaki  $Na^+$  ve  $K^+$  gradientinin bozulmasıdır (4). Söz konusu bu gradient, nörotransmitter taşıyıcı (uptake) sistemlerin çalışabilmesi için gereklidir (58). Bu nedenle  $Na^+,K^+$ -ATPaz enzim inhibisyonu, sadece anoksik depolarizasyona neden olmakla kalmaz, aynı zamanda taşıyıcı sistemlerin inhibisyonuna, hatta onların ters yönde çalışmalarına (reversed transport) neden olabilir (42,43,59). Gerçekten de, anoksik-iskemik koşullarda meydana gelen DA saliverilmesindeki artışın kısmen veya tamamen DA uptake sisteminin ters yönde çalışmasına bağlı olabileceği gösterilmiştir (38,49,60). Şekil 9'da gösterildiği gibi, DA uptake blokörü nomifensinin anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini hemen tamamen geriye döndürmesi, etkide uptake sisteminin ters yönde çalışmasının rolü olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Ancak anoksinin aksine, iskemi ve agliseminin neden olduğu DA saliverilmesindeki artışın nomifensin tarafından etkilenmemesi (38), oksijen ve/veya glukoz eksikliğinin derecesine göre saliverilmeden sorumlu mekanizmaların farklılık gösterebileceği olasılığını desteklemektedir.

Giriş kısmında ifade edildiği gibi yapılan çalışmalar sigma reseptör ligandlarının anoksi ve iskeminin neden olduğu nöron hasarına karşı terapötik değerlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Doku hasarlanmasında önemli rol oynayan eksitatör aminoasit saliverilmesindeki artışın sigma ligandları tarafından azaltıldığı in vitro iskemik modelde gösterilmiştir (31). Benzer şekilde iskeminin neden olduğu striatumdan DA saliverilmesi de bu ligandlar tarafından azaltılabilmıştır (32). Bazı sigma ligandlarının farelerde uygulanan serebral iskemi modelinde koruyucu rol oynadığı ve infarkt alanını azattığı rapor edilmiştir (33,34). Hipokampüsün C1A bölgesinde iskeminin neden olduğu M1 ve M2 reseptörlerdeki azalma, sigma ligandların uygulaması sonucunda anlamlı derecede önlenmiş ve bunun sigma ligandlarının koruyucu etkisi ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (35). Beyin dilimlerinde yapılan bir çalışmada ise, NMDA'nın dopaminerjik nöronlar üzerindeki toksik etkileri sigma lidandları ile geriye döndürülebilmıştır (36). Diğer taraftan sigma ligandlarının sıçan retinasında iskeminin neden olduğu ATP düşüşünü önlediği, LDH saliverilmesindeki artışı ise azalttığı gösterilmiştir (37). Sonuç olarak konu ile ilgili elde edilen bütün bulgular, sigma ligandlarının anoksik/iskemik koşullarda terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Sigma reseptör ligandlarının söz konusu etkilerdeki mekanizmaları çok net değilse de, glutamat ve DA saliverilmesinin inhibisyonu ve/veya iyon kanallarının modülasyonunun etkilerine aracılık ettiği sanılmaktadır (31,32,61). DA saliverilmesinin anoksik-iskemik koşullara çok duyarlı olması, glutamat ile birlikte DA'in de meydana gelen doku hasarlanmasına katkıda bulunması (10,20) ve yukarıda belirtildiği gibi bazı sigma ligandlarının nöroprotektif potansiyel göstermeleri bu çalışmanın çıkış noktasını oluşturmuştur.

Şekil 2A'dan çok net görüleceği gibi sigma reseptör ligandı haloperidol, anoksinin neden olduğu striatal dilimlerden DA saliverilmesini doza bağlı bir şekilde azalttı. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, doku DA

düzeyindeki azalmanın da haloperidol tarafından önlendiği gözlemlendi (Şekil 2B). Bu çalışmada test edilen diğer bir sigma ligandı ifenprodil de, anoksinin neden olduğu DA salıverilmesi ve doku DA düzeyindeki azalma üzerine haloperidol benzeri etki gösterdi (Şekil 3A ve 3B). Bu bulguların aksine, anoksinin neden olduğu DA salıverilmesini hemen tamamen önleyen konsantrasyonlardaki haloperidol ve ifenprodil (10 µM), ne agliseminin, ne de iskeminin neden olduğu DA salıverilmesindeki artışı anlamlı bir şekilde etkilemedi (Şekil 4A ve 4B). Bu bulgular, daha önce de belirtildiği gibi, oksijen ve/veya glukoz eksikliğinin derecesine göre, salıverilmeden sorumlu mekanizmaların farklılık gösterebileceği olasılığını kuvvetlendirmektedir (38).

Anoksi ve benzeri koşulların neden olduğu en önemli etkilerden bir tanesinin hücre içi ATP düzeyindeki azalma olduğu belirtilmişti (4). Haloperidol ve ifenprodilin gözlenen etkileri ile ilgili olarak akla gelen ilk olasılık, bu ilaçların daha önce rapor edildiği gibi (37), anoksinin neden olduğu ATP düşüşünü engelleyerek DA salıverilmesindeki artışı inhibe etmesidir. Bu olasılık, anoksi ve benzeri koşullarda meydana gelen doku ATP düzeyindeki değişiklikler ve varsa bu değişiklikler üzerine sigma reseptör ligandlarının etkilerinin incelenmesi ile test edildi. Şekil 5A'da görüldüğü gibi, striatal dilimlerin bir saat boyunca anoksik ortamda inkübe edilmeleri doku ATP düzeyinde yaklaşık %40 oranında bir azalmaya neden oldu. İnkübasyon ortamından sadece glukozun çıkartılması (aglisemi) veya oksijen ile birlikte glukozun çıkartılması (iskemi) ise, literatür bulguları ile uyumlu olarak ATP düzeyindeki azalmanın büyümesine neden oldu (62,63). Ancak, anoksinin neden olduğu DA salıverilmesini kontrole yakın düzeylere düşüren konsantrasyonlardaki ifenprodil'in (10 µM), doku ATP düzeyindeki azalmayı etkilemediği gözlemlendi (Şekil 5B). Bu bulgu, test edilen sigma reseptör ligandlarının DA salıverilmesi üzerine olan koruyucu etkilerinin, doku ATP düzeyindeki azalmanın önlenmesi ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

Anoksik-iskemik koşulların ekstrasellüler glutamat düzeyinde önemli artışlara neden olduğu, bunun da DA salıverilmesindeki artışta rol oynadığı

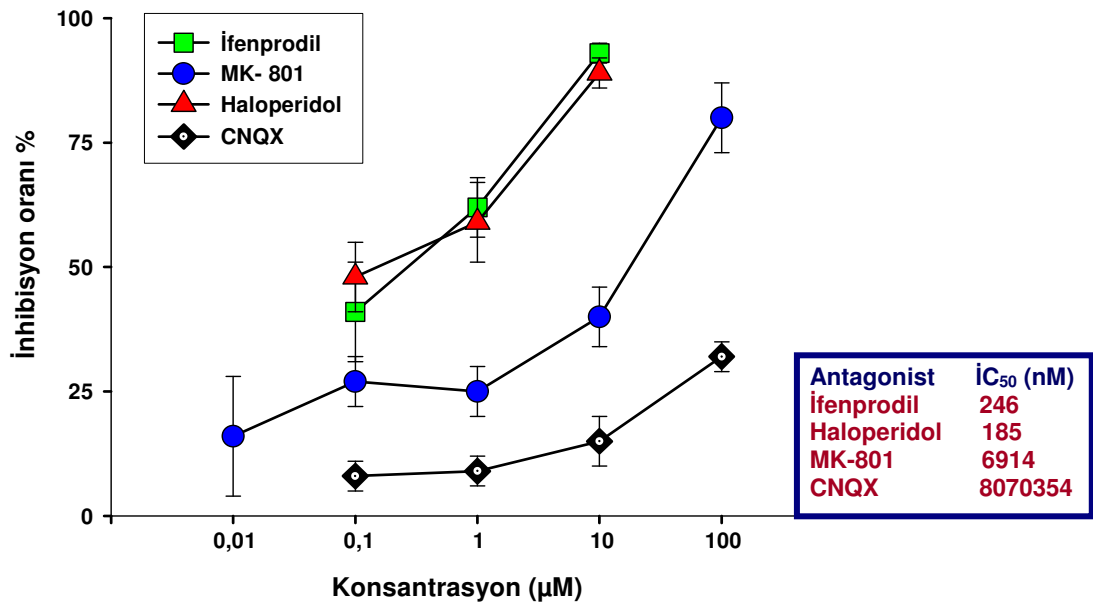
yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (64-68). Diğer taraftan, glutamat saliverilmesinde belirgin bir artma olmasa bile, bu koşullarda glutamat reseptör yanıtlarında meydana gelen artışın da DA saliverilmesini uyarabilmesi olasıdır (8). Dolayısı ile sigma reseptör ligandları haloperidol ve ifenprodilin glutamat saliverilesini azaltmak ve/veya reseptör aktivitesini bloke etmek sureti ile anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini inhibe etmesi akla gelen diğer bir olası mekanizmadır. Şekil 6'da gösterildiği gibi, striatal dilimlerin anoksik bir ortamda inkübe edilmeleri glutamat saliverilmesini etkilemezken, sadece iskemi ekstrasellüler glutamat düzeyini çok belirgin bir Şekilde arttırdı. Bu bulgu, anoksinin neden olduğu DA saliverilmesinin, glutamat saliverilmesindeki bir artışa bağlı olmadığını ifade etmektedir. Dolayısı ile haloperidol ve ifenprodilin anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine koruyucu etkilerini, glutamat saliverilmesindeki bir inhibisyonla ilişkilendirmek olası görülmemektedir.

Glutamat saliverilmesinde bir artma olmasa bile, anoksik-iskemik koşullarda glutamat reseptör duyarlılığında meydana gelen bir artışın da DA saliverilmesine katkıda bulunabileceği yukarıda tartışılmıştı. Sinaptozomlarda yapılan bir çalışmada, anoksik-iskemik koşullarda glutamat ve DA saliverilmesi arasında bir ilişki gösterilmesine karşın, NMDA ve non-NMDA antagonistlerinin (sırası ile MK-801 ve CNQX) DA saliverilmesindeki artışı değiştirmedeği bildirilmiştir (66). Bu bulguların aksine, striatal dilimlerde hipoksi-hipogliseminin uyardığı DA saliverimesinde NMDA reseptör-iyon kompleksinin büyük ölçüde katkısı olduğu rapor edilmiştir (69).

Bu çalışmada test edilen NMDA reseptör antagonisti MK-801, anoksinin neden olduğu DA saliverilesinde konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olurken, non-NMDA reseptör antagonisti CNQX ancak test edildiği en yüksek konsantrasyonda (100  $\mu$ M) DA saliverilmesini anlamlı bir Şekilde azalttı (Şekil 10). Bu bulgular anoksik koşullarda glutamat saliverilmesinde belirgin bir artma olmamakla birlikte, DA saliverilmesindeki artışta özellikle NMDA reseptör aktivasyonunun katkısını düşündürmektedir.



Bu düşünceden hareket ederek, haloperidol ve ifenprodilin de, MK-801 gibi NMDA reseptörüne bağlanarak anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini azaltabileceği akla gelen bir olasılıktır. Ancak söz konusu sigma reseptör ligandlarının NMDA reseptörlerine olan affiniteleri yüksek olmasına rağmen, NMDA reseptör antagonistlerinin sigma reseptörlerine olan affinitesi düşüktür (70-73). Bu çalışmada test edilen MK-801, CNQX, haloperidol ve ifenprodil'in anoksinin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine inhibitör etkileri şekil 10'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu inhibisyon eğrileri kullanılarak elde edilen IC<sub>50</sub> değeri CNQX ve MK-801 için, sırası ile 8070354 ve 6914 nM dır. İfenprodil için bu değer 246 nM bulunurken, haloperidol için hesap edilen IC<sub>50</sub> değeri 185 nM dır. Sigma reseptör ligandlarının düşük IC<sub>50</sub> değerleri, NMDA reseptör antagonistlerinin sigma reseptörlerine olan düşük afiniteleri ile ilgili literatür bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, kullandığımız sigma ligandlarının DA saliverilmesini azaltıcı etkilerinde, NMDA reseptör blokajının düşük bir olasılık olduğunu düşündürmektedir.



**Şekil 10: Sigma reseptör ligandları ile glutamat reseptör antagonistlerinin anoksik koşullarda striatal dilimlerden DA saliverilmesi üzerine etkileri.** Preinkübasyon döneminin son 10 dakikasında ve 60 dakika anoksik koşullarda striatal dilimlerin ilaçlar ile inkübe edilmesi sonucunda toplanan örneklerde sigma reseptör ligandları ifenprodil, halloperidol, ve glutamat reseptör antagonistlerinden NMDA reseptör antagonisti MK-801, AMPA reseptör antagonisti CNQX'in saliverilen DA düzeylerine olan etkisi ölçüldü. İlaçların anoksida DA saliverilmesini inhibe etme oranları hesaplanarak % inhibisyon oranı konsantrasyon grafiği yapılmıştır.Yapılan ölçümler sonucu elde edilen bulgular ortalama ± SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir grupta ölçüm sayısı en az 5'dir. Şekildeki verilerin IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması, Pharmacological Calculations Ver-4 kullanılarak yapılmıştır.

Daha önce de belirtildiği gibi, anoksik-iskemik koşulların neden olduğu en önemli etkilerin başında hücre içi ATP azalması ve buna bağlı olarak  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz enziminin inhibisyonu gelmektedir. Bu çalışmada, söz konusu enzimin farmakolojik inhibisyonu ile gözlenen DA salıverilmesi üzerine sigma reseptör ligandı haloperidol ile NMDA reseptör antagonisti MK-801'in etkileri de test edildi. Böylece anoksinin neden olduğu DA salıverilmesi üzerine koruyucu etki gösteren bu iki ilacın, enzimin farmakolojik inhibisyonu sonucu artan DA salıverilmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı. Şekil 8'de görüldüğü gibi striatal dilimlerin  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz inhibitörü ouabain ile inkübasyonu, DA salıverilmesinde konsantrasyona bağlı bir artışa neden oldu. Sigma reseptör ligandı haloperidol (10  $\mu\text{m}$ ), 1  $\mu\text{M}$  ouabain'in neden olduğu DA salıverilmesini, anoksik koşullarda gözlendiği gibi, hemen tamamen kontrol düzeylerine kadar azalttı (Şekil 8A). İnkübasyon ortamındaki ouabain konsantrasyonunun 10 veya 100  $\mu\text{M}$ 'a çıkartılması, haloperidolün koruyucu etkisinde, sırası ile azalmaya ve etkinin ortadan kalkmasına neden oldu (Şekil 8A). Bu bulgular, anoksik, aglisemik ve iskemik koşullarda gözlendiği gibi, inkübasyon ortamında ouabain konsantrasyonunun artması, dolayısı ile  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz inhibisyonunun derecesi ile orantılı olarak DA salıverilmesine neden olan mekanizma(ların) farklılık gösterdiğini işaret etmektedir. Ouabainin, düşük veya yüksek, test edildiği bütün konsantrasyonlarının neden olduğu DA salıverilmesi üzerine MK-801'in etki göstermemesi ise, haloperidolün MK-801'den farklı bir mekanizma ile etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Laboratuvarımızda daha önce yaptığımız çalışmalarda anoksinin neden olduğu DA salıverilmesinin DA uptake blokörü nomifensin ile hemen tamamen önlediği, dolayısı ile bu koşullarda gözlenen DA salıverilmesinin revers transport mekanizması ile meydana geldiği gösterilmişti (38). Sigma reseptör ligandlarının nomifensine benzer bir etki ile revers transport mekanizmasını inhibe etmeleri olasıdır. Bu olasılığın test edilmesi iki farklı yolla yapılabilir. Bunlardan bir tanesi, belki de direkt olanı, sigma reseptör ligandlarının nomifensin gibi DA geri alımı (uptake) üzerine olan etkilerinin

gösterilmesidir. Bu çalışmada haloperidol ve ifenprodilin DA uptake'ı üzerine etkileri test edilememekle birlikte, sigma ligandlarından haloperidolün DA uptake'ını doza bağımlı olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (74). Söz konusu olasılığın test edilmesi ile ilgili diğer bir yol, nomifensin ve haloperidolün DA saliverilmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırılmasıdır. Şekil 9A'da görüldüğü gibi nomifensin, sigma reseptör ligandları haloperidol ve ifenprodil gibi, anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini hemen tamamen inhibe etti. Her ne kadar bu çalışmada test edilmediyse de, daha önce yaptığımız çalışmada nomifensin'in, sigma reseptör ligandları gibi, aglisemi ve iskeminin neden olduğu DA saliverilmesini etkilemediği gösterilmişti (38). Diğer taraftan nomifensin, şekil 9B'de görüldüğü gibi ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine haloperidol benzeri bir etki gösterdi; düşük konsantrasyondaki ouabainin etkisi nomifensin ile tamamen inhibe edilirken, ortamdaki ouabain konsantrasyonunun yükseltilmesi, nomifensinin etkisinin azalmasına veya tamamen ortadan kalkmasına neden oldu. Nomifensin ve sigma ligandlarının etki profillerindeki bu yakın benzerlik, her iki farmakolojik ajanın benzer bir mekanizma ile anoksi veya ouabainin neden olduğu DA saliverilmesini azalttığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak buraya kadar tartışılan ve bu çalışmadan elde edilen bulgular;

1) Sigma reseptör ligandları haloperidol ve ifenprodilin striatal dilimleri anoksinin neden olduğu DA saliverilmesine karşı koruduklarını, ancak bu koruyucu etkilerini aglisemik ve iskemik koşullarda gösteremediklerini,

2) Haloperidol ve ifenprodilin koruyucu etkilerinin, anoksik koşullarda ortaya çıkan doku ATP düzeyindeki azalmanın önlenmesi ile ilişkili olmadığını,

3) Anoksik koşullarda glutamat saliverilmesinde bir artış söz konusu olmadığı için, koruyucu etkinin glutamat saliverilmesindeki bir inhibisyonla açıklanamayacağını,

4) Haloperidol ve ifenprodilin MK-801'den çok daha düşük bir IC<sub>50</sub> değeri ile anoksinin neden olduğu DA saliverilmesini inhibe etmeleri nedeni ile, etkide NMDA reseptör blokajının majör rol oynama olasılığının düşük olduğunu,

5) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaz inhibitörü ouabain'in neden olduğu DA saliverilmesinin, NMDA reseptör antagonisti MK-801'in aksine haloperidol tarafından inhibe edilmesi, bu iki maddenin farklı bir mekanizma ile etki gösterdiği görüşünü daha da kuvvetlendirdiğini,

6) Sigma reseptör ligandı haloperidol ile DA uptake inhibitörü nomifensinin, gerek anoksi ve gerekse ouabainin neden olduğu DA saliverilmesi üzerine etkilerinin benzer olması, her iki farmakolojik ajanın benzer bir mekanizma ile, muhtemelen revers DA transportunu inhibe ederek, etki gösterdiklerini düşündürmektedir

## KAYNAKLAR

- 1- Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, Warner DS. Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery*. 2002;51:289-301
- 2- Schurr A, Rigor BM. Cerebral ischemia revisited: New insights as revealed in vitro brain slice preparations. *Experientia*. 1989;45:684-95
- 3- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*. 1999;79:1432-1516
- 4- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death. *Trend Neurosci*. 1994;17:251-7
- 5- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 2000;1;179(S 1-2):1-33
- 6- Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med*. 2000;36(5):483-506
- 7- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2003;34(4-5):325-37
- 8- Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two faces of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci*. 1994;17 (9): 359-64

- 9- Globus MY, Ginsberg MD, Dietrich WD, Busto R, Scheinberg P. Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum. *Neurosci Lett.* 1987;5;80(3):251-6
- 10- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* 2000;106(6):723-31
- 11- Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 31;35(1):67-86
- 12- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-7
- 13- Kermer P, Klocker N, Bahr M. Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell Tissue Res.*1999; 298(3):383-95
- 14- H. Islekel , S. Islekel , G. Guner Biochemical Mechanism and Tissue Injury of Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Journal of Neurological Sciences* 2000;7:2:1984-2000
- 15- Macdonald RL, Stoodley M. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir.* 1998; 38(1):1-11
- 16- Lin MT, Kao TY, Chio CC, Jin YT. Dopamine depletion protects striatal neurons from heatstroke-induced ischemia and cell death in rats. *Am J Physiol.* 1995;269(2 Pt 2):H487-90
- 17- Petzelt C, Blom P, Schmehl W, Muller J, Kox WJ. Xenon prevents cellular damage in differentiated PC-12 cells exposed to hypoxia. *BMC Neurosci.* 2004;8;5(1):55

- 18- Xu ZC, Chwang W, Li X, Chen X, He P. Gender difference in dopamine concentration and postischemic neuronal damage in neostriatum after unilateral dopamine depletion. *Exp Neurol*. 1999;158(1):182-91
- 19- Buisson A, Callebert J, Mathieu E, Plotkine M, Boulu RG. Striatal protection induced by lesioning the substantia nigra of rats subjected to focal ischemia. *J Neurochem*. 1992; 59(3):1153-7
- 20- Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. *Neurosci Lett*. 1988;15;91(1):36-40
- 21- Guitart X, Codony X, Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174(3):301-19
- 22- Aydar E, Palmer CP, Djamgoz MB. Sigma receptors and cancer: possible involvement of ion channels. *Cancer Res*. 2004;1;64(15):5029-35
- 23- Monassier L, Bousquet P. Sigma receptors: from discovery to highlights of their implications in the cardiovascular system. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002;16(1):1-8
- 24- Monassier L, Manoury B, Bellocq C, Weissenburger J, Grenay H, Zimmermann D, Ehrhardt JD, Jaillon P, Baró I, Bousquet P. Sigma(2)-receptor ligand-mediated inhibition of inwardly rectifying K(+) channels in the heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(1):341-50
- 25- Shin EJ, Nah SY, Chae JS, Bing G, Shin SW, Yen TP, Baek IH, Kim WK, Maurice T, Nabeshima T, Kim HC. Dextromethorphan attenuates trimethyltin-induced neurotoxicity via sigma1 receptor activation in rats. *Neurochem Int*. 2007;50(6):791-9

- 26- Klouz A, Sapena R, Liu J, Maurice T, Tillement JP, Papadopoulos V, Morin D. Evidence for sigma-1-like receptors in isolated rat liver mitochondrial membranes. *Br J Pharmacol.* 2002;135(7):1607-15.
- 27- Shimazu S, Katsuki H, Takenaka C, Tomita M, Kume T, Kaneko S, Akaike A. Sigma receptor ligands attenuate N-methyl-D-aspartate cytotoxicity in dopaminergic neurons of mesencephalic slice cultures. *Eur J Pharmacol.* 2000;388(2):139-46.
- 28- Schetz JA, Perez E, Liu R, Chen S, Lee I, Simpkins JW. A prototypical Sigma-1 receptor antagonist protects against brain ischemia. *Brain Res.* 2007;21;1181:1-9
- 29- Whittemore ER, Ilyin VI, Woodward RM. Antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by sigma site ligands: potency, subtype-selectivity and mechanisms of inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282(1):326-38.
- 30- Church J, Fletcher EJ. Blockade by sigma site ligands of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurones. *Br J Pharmacol.* 1995;116(7):2801-10.
- 31- Lobner D, Lipton P. Sigma-ligands and non-competitive NMDA antagonists inhibit glutamate release during cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 1990;4;117(1-2):169-74
- 32- Goyagi T, Bhardwaj A, Koehler RC, Traystman RJ, Hurn PD, Kirsch JR. Potent sigma 1-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine provides ischemic neuroprotection without altering dopamine accumulation in vivo in rats. *Anesth Analg.* 2003;96(2):532-8.



- 33- Poignet H, Nowicki JP, Scatton B. Lack of neuroprotective effect of some sigma ligands in a model of focal cerebral ischemia in the mouse. *Brain Res.* 1992;20;596(1-2):320-4
- 34- Ajmo CT Jr, Vernon DO, Collier L, Pennypacker KR, Cuevas J. Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr Neurovasc Res.* 2006;3(2):89-98
- 35- O'Neill M, Canney M, Earley B, Junien JL, Leonard BE. The novel sigma ligand JO 1994 protects against ischaemia-induced behavioural changes, cell death and receptor dysfunction in the gerbil. *Neurochem Int.* 1996;28(2):193-207
- 36- Shimazu S, Katsuki H, Takenaka C, Tomita M, Kume T, Kaneko S, Akaike A. Sigma receptor ligands attenuate N-methyl-D-aspartate cytotoxicity in dopaminergic neurons of mesencephalic slice cultures. *Eur J Pharmacol.* 2000;28;388(2):139-46
- 37- Bucolo C, Marrazzo A, Ronsisvalle S, Ronsisvalle G, Cuzzocrea S, Mazzon E, Caputi A, Drago F. A novel adamantane derivative attenuates retinal ischemia-reperfusion damage in the rat retina through sigma1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 2006;536(1-2):200-3
- 38- Buyukuysal RL, Mete B. Anoxia-induced dopamine release from rat striatal slices: involvement of reverse transport mechanism. *J Neurochem.* 1999;72(4):1507-15
- 39- Grunau JA, Swaider JM. Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in Pickering lithium gradient system. *J Chromatogr.* 1992;594:165–171
- 40- Savci V, Wurtman RJ. Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J. Neurochem.* 1995;64(1):378-84

- 41- Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with folin fenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275
- 42- Adam-Vizi V. External  $Ca^{+2}$ -independent release of neurotransmitters. *J. Neurochem.* 1992;58:395–405
- 43- Levi G, Raiteri M. Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci.* 1993;16:415–419
- 44- Lyden P, Wahlgren NG. Mechanisms of action of neuroprotectants in stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2000;9(6 Pt 2):9-14
- 45- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(6):657-68
- 46- Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin.* 2006;24(1):1-21
- 47- Connick JH, Hanlon G, Roberts J, France L, Fox PK, Nicholson CD. Multiple sigma binding sites in guinea-pig and rat brain membranes: G-protein interactions. *Br J Pharmacol.* 1992;107(3):726-31
- 48- Nelson RM, Lambert DG, Richard Green A, Hainsworth AH. Pharmacology of ischemia-induced glutamate efflux from rat cerebral cortex in vitro. *Brain Res.* 2003;21;964(1):1-8
- 49- Wagner DA, Leonard JP. Effect of protein kinase-C activation on the  $Mg(2+)$ -sensitivity of cloned NMDA receptors. *Neuropharmacology.* 1996;35(1):29-36

- 50- Miller B, Sarantis M, Traynelis SF, Attwell D. Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature*. 1992;20;355(6362):722-5
- 51- Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci*. 2001;15;69(4):369-81
- 52- Mitra C, Guha SR. Differential activation of two monoamine oxidase types by oxygen. *Experientia*. 1983;15;39(3):270-2
- 53- Kim KW, Kim DC, Kim HY, Eun YA, Kim, HI, Cho KP. Ca<sup>2+</sup>-dependent and-independent mechanisms of ischaemia-evoked release of [<sup>3</sup>H]-dopamine from rat striatal slices. *Clin. Exp. Pharmac. Physiol*. 1995;22:301-302
- 54- Milusheva EA, Dóda M, Baranyi M, Vizi ES. Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>-dependent and independent release of [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neurochem Int*. 1996;28(5-6):501-7
- 55- Chaki S, Yoshikawa R, Okuyama S. Group II metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of dopamine release from slices of rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett*. 2006;14;404(1-2):182-6
- 56- Wu Y, Pearl SM, Zigmond MJ, Michael AC. Inhibitory glutamatergic regulation of evoked dopamine release in striatum. *Neuroscience*. 2000;96(1):65-72
- 57- Hu G, Duffy P, Swanson C, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW. The regulation of dopamine transmission by metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(1):412-6

- 58- Kanner BI, Bendahan A. Binding order of substrates to the sodium and potassium ion coupled L-glutamic acid transporter from rat brain. *Biochemistry* 1982;21:6327-6330
- 59- Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmac. Sci.* 1990;11:462-468
- 60- Remblier C, Pontcharraud R, Vandell B, Piriou A, Huguet F. Origin of extracellular dopamine increase induced by lactic acid striatal perfusion monitored by microdialysis in the awake rat. *NeuroReport* 1999;10:1961-1964
- 61- Wilke RA, Mehta RP, Lupardus PJ, Chen Y, Ruoho AE, Jackson MB. Sigma receptor photolabeling and sigma receptor-mediated modulation of potassium channels in tumor cells. *J Biol Chem.* 1999;274(26):18387-92.
- 62- Costa M, Shute B, Mergner WJ. Measurement of ATP synthesis and flocculent matrix densities in mitochondria as a function of 'in vitro' ischemia in the heart and liver of rats. *Pathobiology.* 1990;58(3):129-37
- 63- Canada AT, Coleman LR Jr, Fabian MA, Bollinger RR. Adenine nucleotides of ischemic intestine do not reflect injury. *J Surg Res.* 1993;55(4):416-21
- 64- Milusheva E, Doda M, Pasztor E, Lajtha A, Sershen H, Vizi ES. Regulatory interactions among axon terminals affecting the release of different transmitters from rat striatal slices under hypoxic and hypoglycemic conditions. *J Neurochem.* 1992;59(3):946-52

65- Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis.

*J Neurochem.* 1988;51(5):1455-64

66- Santos MS, Moreno AJ, Carvalho AP. Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke.* 1996;27(5):941-50

67- Rubio I, Torres M, Miras-Portugal MT, Sánchez-Prieto J. Ca<sup>2+</sup>-independent release of glutamate during in vitro anoxia in isolated nerve terminals. *J Neurochem.* 1991;57(4):1159-64

68- Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke.* 1996;27(5):913-8

69- Toner CC, Stamford JA. Characteristics of the NMDA receptor modulating hypoxia/hypoglycaemia-induced rat striatal dopamine release in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1997;11;340(2-3):133-43

70- E.B. De Souza, D. Clouet, and E.D. London Sigma, PCP and NMDA Receptors. *NIDA Res. Monograph Series.* 1993;13-40

71- Grimwood S, Richards P, Murray F, Harrison N, Wingrove PB, Hutson PH. Characterisation of N-methyl-D-aspartate receptor-specific [(3)H]ifenprodil binding to recombinant human NR1a/NR2B receptors compared with native receptors in rodent brain membranes. *J Neurochem.* 2000;75(6):2455-63

72- Lynch DR, Gallagher MJ. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by haloperidol: developmental and pharmacological characterization in native and recombinant receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;279(1):154-61.

73- Moison D, De Deurwaerdère P, Cagnotto A, Marrazzo A, Prezzavento O, Ronsisvalle G, Mennini T, Spampinato U. Intrastriatal administration of sigma ligands inhibits basal dopamine release in vivo. *Neuropharmacology.* 2003;45(7):945-53

74- Thompson TL, Bridges S, Miller C. Modulation of dopamine uptake in rat nucleus accumbens: effect of specific dopamine receptor antagonists and sigma ligands. *Neurosci Lett.* 2001;26;312(3):169-72

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana yardımcı olan ve uzmanlık tezimi hazırlamamda katkıları olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Levent R. BÜYÜKUYSAL'a olmak üzere Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Vahide SAVCI, Prof. Dr. İ. Hakkı ULUS, Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN, Doç. Dr. Sinan ÇAVUN ve Yard. Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY'a, uzmanlık eğitimimin boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Emre HAMURTEKİN'e, Dr. N. Cenk COŐKUN, Dr. Nesrin FİLİZ, Dr. Yurdan YILDIZ, Dr. Hakkı H. DOĞRU ve Biyolog Őevket DOĞRUSÖZ'e teşekkürlerimi sunarım

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren çalışmalarımda bana yardımcı olan abim ve dostum Kimyager Sami AYDIN'a, bana öğrettikleri için her zaman minnettar kalacağım.

Her zaman yanımda olarak bana her konuda yardımcı olan hayatımdaki en önemli dayanağım eşim Sibel'e ve tatlı kızım İdil'e, bugünlere gelebilmem için her türlü fedakarlığı yapan anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim

## **ÖZGEÇMİŞ**

02 Kasım 1978 yılında Erzurum'da doğdum. İlkokulu Aydın Güzelhisar İlkokulu'nda, Orta öğrenimimi Cumhuriyet Lisesinden ve lise öğrenimimi Aydın Lisesi'nde 1995 yılında mezun olarak bitirdim. Aynı yıl Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp öğretimime başladım. 2001 yılında tıp fakültesinden mezun olduktan sonra, 2002-2003 yıllarında Bursa'da pratisyen hekim olarak çalıştım. 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen bu eğitime devam ediyorum. Uzmanlık eğitimim boyunca çeşitli bilimsel projelerde görev aldım. Evliyim.