



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULAN YENİDOĞAN
SIÇANLARDA HİSTON DEASETİLAZ AKTİVİTESİNİN
NÖROPROTEKSİYONA ETKİSİ**

Türkan KOYUNCUOĞLU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Bursa-2014



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULAN YENİDOĞAN
SIÇANLARDA HİSTON DEASETİLAZ AKTİVİTESİNİN NÖROPROTEKSİYONA
ETKİSİ

Türkan KOYUNCUOĞLU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Tülin ALKAN

Bursa-2014

SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Türkan KOYUNCUOĞLU tarafından hazırlanan yenidoğan hipoksik-iskemik ensefalopati sıçan modelinde üridin tedavisiyle oluşturulan nöroproteksiyonda histon deasetilaz enzim aktivitesinin katılımının araştırılması konulu Yüksek Lisans tezi 16/06/2014 Pazartesi günü, 10:30-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Tülin ALKAN	
Üye	Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK	
Üye	Prof. Dr. Nevzat KAHVECİ	
Üye	Doç.Dr. Mehmet CANSEV	
Üye	Doç. Dr. Bülent GÖREN	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Metin PETEK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	14
3.1.Çalışma protokolü ve tedavi grupları.....	14
3.2.Hipoksik-iskemik beyin hasarının oluşturulması.....	14
3.3.İstatistiksel analiz.....	17
4.BULGULAR.....	18
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	22
6.KAYNAKLAR.....	26
7.TEŞEKKÜR.....	34
8.ÖZGEÇMİŞ.....	35

ÖZET

Neonatal hipoksik-iskemik beyin hasarı serebral palsy, epilepsi, öğrenme güçlüğü ve neonatal mortalite gibi nörolojik defisitlere sebep olur. Bu çalışmada, sağ kommon karotid arter oklüzyonu ile iskemi oluşturularak, hipoksiye maruz bırakılan sıçanlarda üridin tedavisi ile gözlemlenen nöroproteksiyonda histon asetilazların katılımı araştırıldı.

Anestezi altında yedi günlük sıçanlara sağ kommon karotid arter koterizasyonunu takiben 150 dakika süre ile hipoksik karışım solutuldu. Deney hayvanları; Sham grubu (n:8); intraperitoneal (i.p.) olarak serum fizyolojik uygulanan Kontrol grubu (n:14) ve i.p. 500 mg/kg doz üridin uygulanan Üridin grubu (n:14) olmak üzere 3 gruba ayrıldılar. Serum fizyolojik ve üridinin ilk dozu iskemi-hipoksi uygulamasından hemen sonra, 2. ve 3. dozları ise yavru sıçanlar sırasıyla 8 ve 9 günlük iken uygulandılar.

Bu çalışmada hipoksi-iskemi sürecinde 7 günlük yenidoğan sıçanlarda üridin uygulamasının histon deasetilaz aktivitesini azaltarak nöroprotektif etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Neonatal hipoksi-iskemi, histon deasetilaz, üridin.

SUMMARY

THE EFFECT OF HISTONE DEACETYLASE ACTIVITY ON NEUROPROTECTION IN NEWBORN RATS WITH HYPOXIC-ISCHEMIC BRAIN DAMAGE

Neonatal hypoxic -ischemic brain injury causes neurological deficit such as cerebral palsy, epilepsy, learning disability and neonatal mortality. In this study, in rats exposed to hypoxia forming ischemia via the right common carotid artery occlusion in the neuroprotection observed with uridine treatment whether the contribution of histone acetylases were investigated.

Seven-day old pups under anesthesia, mixture of hypoxic was inhaled for 150 minutes following the right common carotid artery cauterization. Subjects were divided into 3 groups including; Sham group (n:8); Control group (n:14) intraperitoneally (i.p.) administered with saline and Uridine group (n:14) injected i.p. with 500 mg/kg administered uridine.

The first dose of saline and uridine were performed immediately after the ischemia-hypoxia, 2. and 3. doses were respectively administered when the newborn pups were 8 and 9-day-old.

In this study, it is observed that uridine administration has influence on neuroprotective effect with reducing histone deacetylase activity in process of hypoxia-ischemia in 7-day-old newborn rats.

Key words: Neonatal hypoxia-ischemia, histone deacetylase, uridine.

1.GİRİŞ

Perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarı, bebeklerde ve çocuklarda akut mortalite ve nörolojik morbiditenin önemli bir nedenidir (1). Hipoksik- iskemik ensefalopati (HİE) serebral kan akımının azalmasıyla oluşan beyin hasarıdır. HİE' ye maruz kalan yenidoğanlarda mental retardasyon, epilepsi ve serebral palsi gibi pek çok nörodejeneratif defisit gelişmektedir (2).

Serebral iskemi hasarına eksitatör aminoasitlerin artması, iyonik dengesizlik, oksidatif stres ve inflamasyon sebep olmaktadır (3). Merkezi sinir sistemi hastalıklarının, insanda yerini tutan patofizyolojisini yansıtabilmek için tasarlanan in vitro ve in vivo modellerde terapötik gelişim çabaları olmuştur. Hİ beyin hasarını minimize etmek için hayvan modelleri oluşturularak deneysel çalışmalar yapılmıştır. Deneysel Hİ modellerde bir hasar durumunda, uyarıcı nörotransmitterlerin aşırı miktarda salınmasından yola çıkarak bunların antagonistleri nöronal hasarı azaltmak için denenmiştir. Beyin hasarında apoptotik proteinlerin aktive olduğu ve sayıca artmasından dolayı bu basamağın inhibe edilerek hasarın azaltılabileceği düşünülmüştür. İskemi sonrası üridin uygulamalarının apoptotik mekanizma üzerinden işlev görerek apoptoz ile sonuçlanan beyin hasarını azalttığını ileri süren çalışmalar yayınlanmıştır (4).

Histon deasetilaz inhibitörlerinin nörodejenaratif hastalıklarda terapötik etkileri rapor edilmiştir. Orta serebral arter oklüzyon modeli kullanılarak histon deasetilaz inhibitörlerinin ipsilateral hemisferde nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (5).

Bu çalışmada, neonatal HİE modelinde üridin uygulamasının nöroprotektif etkisinde histon asetilaz aktivitesinin rolü araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

Perinatal hipoksik-iskemik (Hİ) beyin hasarı, yenidoğan dönemi ölümlerinin ve nörolojik morbiditenin önemli nedenlerinden biridir. Hİ hasarın önemli bir kısmının doğum öncesi olduğu bildirilmektedir (6). Perinatal hipoksinin yenidoğan dönemindeki görülme sıklığı ise % 0,2-0,4 oranındadır (1). HİE' li yenidoğanların %20-50'si yenidoğan döneminde kaybedilmektedir. Hipoksik sürece maruz kalıp hayatını sürdürebilen yenidoğanların %25'inde ise mental retardasyon, epileptik nöbetler, serebral palsi, öğrenme ve davranış bozuklukları gibi kalıcı nörolojik hasarlar oluşabilmektedir (2,7).

HİE, yenidoğanda çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen solunumun başlama ve sürdürülmesindeki güçlük sonrasında, beynin oksijensiz kalması ile kalıcı beyin hasarının oluşmasıdır. HİE, kas tonusu ve reflekslerde baskılanma, bilinç düzeyinde bozulma ve çoğunlukla konvülsiyonla karakterize bir sendromdur (8). HİE' yi oluşturan temel neden, plasentadan yetersiz gaz değişimi veya gelişen postnatal patolojiler nedeniyle ventilasyonun pulmoner düzeyde bozulması ve böylece arteriyel hipoksemi, hiperkarbi ve asidoz gelişimidir (9).

Perinatal Hİ beyin hasarındaki temel fizyopatolojik mekanizma bozulmuş serebral kan akımıdır. Serebral kan akımındaki azalma sonucunda; asidoz, glutamat eksitotoksitesi, hücre içi Ca^{2+} birikimi, serbest radikal oluşumu ve oksidatif stres gibi beyin hasarının hücresele düzeydeki temelini oluşturan fizyopatolojik mekanizmalar devreye girmektedir (10). İnflamasyon, apoptozis ve hücre ölümü ile sonlanan bu döngünün olası mekanizmalarını anlamak beyin hasarının önlenmesi için son derece önemlidir.

Hİ süreçte devam eden hipoksi birkaç dakika içinde serebral kortekste enerji metabolizmasının dengesini bozarak, nöronal glukoz ve oksijen ihtiyacını artırır. Fetusun serebral metabolizması ve hücreye gerekli olan enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için yeterli düzeydeki adenosin trifosfat (ATP) eldesi ancak anaerobik glikolizis hızının artırılması ile sağlanabilir. Enerji yokluğu durumunda oksidatif metabolizma anaerobik metabolizmaya dönüştüğü için, laktat yapımı ile bir miktar ATP elde edilmesine rağmen ATP hızlı bir şekilde azalmaya başlar. Sonuçta, gelişen asidoz iskemik dokunun iyileşmesini önler. Hİ beyin hasarında asidoz oluşumunda mitokondriden H^+ salınması, iyon dengesinin bozulması, Ca^{2+} tamponlanması ve ödem gibi çok sayıda mekanizma devreye girmektedir (11).

ATP konsantrasyonunun azalması ile membran depolarizasyonu ve membran geçirgenliğindeki bozulma Na^+ - K^+ ATPaz pompasını devre dışı bırakarak nöronal membranda belirgin iyon değişikliklerine neden olur (2). Hücre içinde Na^+ , Cl^- ve Ca^{2+} düzeyi artar. Hücre içi normal Ca^{2+} düzeyi; metabolik düzenlemede, nörotransmitter salınımında rol oynarken aynı zamanda hücre içinde ikinci mesajcı olarak da fonksiyon görmektedir. Bu nedenle nöron içindeki Ca^{2+} dengesi hayati önem taşır (12-15). Ca^{2+} 'un hücre içine farklı kanallar aracılığı ile girdiği bilinmektedir. Hİ beyin hasarında ekstrasellüler glutamat düzeyinin artması, N-metil-D-Aspartat (NMDA) kanallarını aktive ederek hücre içi kalsiyum artışına neden olur (6,16). NMDA reseptör kanalları aracılığıyla hücre içine giren Ca^{2+} eksitotoksik hücre ölüm nedenidir (17).

Normal serebral fonksiyonların devamlılığı için eksitatör ve inhibitör nörotransmitter dengesi önem taşır. Beyinde baskın eksitatör bir nörotransmitter olan glutamat (12,18-22), beyin dokusundaki tüm eksitatör presinaptik terminallerde bulunmaktadır. Glutamat presinaptik veziküllerde depolanır ve membranın depolarizasyonu sonucu kalsiyum aracılığı ile presinaptik sinir uçlarından salgılanır (23). Postsinaptik membranlarda etkinliğini; iyonotropik reseptörler; NMDA, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propiyonik asit (AMPA) ve Kainat (KA) reseptörleri (24) ve G-protein ilişkili metabotropik glutamat reseptörleri aracılığı ile göstermektedir (25). Glutamat; görme, işitme, somatosensör fonksiyonlar, öğrenme ve hafıza aracılı nöronal yollarda nörotransmitter olarak işlev görmektedir (26, 27). NMDA reseptörlerinin dağılımı ve moleküler özelliklerinin perinatal nöronal hasarda önem taşıdığı (28) ve glutamat eksitotoksitesinin Hİ hasarın oluşumundaki ana etmenlerden olduğu bildirilmiştir (29).

NMDA reseptörleri etkisini Ca^{2+} iyon kanalları üzerinden gösterirken (30), AMPA ve KA reseptörlerinin etki mekanizması Na^+ girişini sağlayan iyon kanalları üzerinden göstermektedir (30). AMPA ve KA reseptörleri ile karşılaştırıldığında, NMDA reseptör kompleksinin Ca^{2+} geçirgenliğinin 5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (31,32). NMDA reseptörleri yoluyla hücre içine giren fazla miktardaki Ca^{2+} iyonları glutamat eksitotoksitesisi nedeniyle nöron ölümüne sebep olmaktadır (10,33, 34).

İskemik hasar sonrası gerek NMDA kanallarının aktivasyonu ile hücre içi Ca^{2+} artışı, Ca^{2+} -bağımlı lipazlar ve fosfolipaz enzimlerini aktive ederek, serbest yağ asitlerinin salgılanması gerekse hasar sonrası gelişen mitokondriyal harabiyet serbest radikallerin oluşumunu arttırmaktadır (11). Aynı zamanda oluşan serbest radikaller; proteinler, lipidler ve ekstrasellüler matriks glikozaminoglikanları gibi molekülleri de parçalarlar.

Literatürde serbest radikallerin nöronal glutamat salınımını arttırdığı bildirilmektedir (11,35-37). Serbest radikal tutucuların glutamat salınım düzeyindeki etki derecesine bağlı olarak nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmektedir (23). Global iskemi oluşturulan çalışmalarda, serbest radikaller üzerine etki gösteren süperoksid dismutazın normalden fazla ekspresyonunun hipokampal CA1 hücre ölümünü %50 oranında azaltıp nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmektedir (38-40).

Hücre ölümü, apoptotik hücre ölümü ve nekrotik hücre ölümü olarak sınıflandırılmaktadır (41). Mitokondriyal DNA hasarı sonucu, oksijen radikalleri, Ca^{2+} artışı, glutamat reseptör aktivasyonundaki artış ile tehlikeye giren beyin hücreleri nekroz veya apoptozise gidebilir (10). Nekrotik ölümden, hücre içine aşırı sıvı girmesi ile hücre membranı bütünlüğünü kaybeder, bunun sonucunda hücre içi materyallerin hücre dışına çıkışı gerçekleşir. Nekrotik hücre lizise uğrar. Nekrotik hücre ölümünde hücre içeriği ekstraselüler ortama salıverildiğinden inflamasyon oluşmaktadır. Apoptozis programlanmış hücre ölümüdür ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve Deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonu ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümünde morfolojik kriterlere göre membran bütünlüğü ve organellerin yapısal bütünlükleri korunmaktadır. Apoptotik hücre makrofajlar tarafından fagosite edilmesinden dolayı inflamasyon görülmez (42).

Apoptozis, enerji kullanımına bağlı olarak gerçekleşen DNA parçalanması işlemidir. Apoptotik mekanizmada, mitokondri ve apoptotik moleküller rol oynamaktadır. Apoptotik süreçte yer alan enzimler proteazlar, endonükleazlar ve lipazlardır. Bu enzimlerin aktivasyonu ile hücre apoptotik sürece gider. Bu süreçte DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme ve metabolik bozukluklar sonucu hücre içi kaynaklı sinyallerin rolü vardır. Proteolitik olaylar zincirini kaspazların birbirini aktive etmesi başlatmaktadır.

Apoptozisi başlatanlar kaspaz-2, -8, -9 ve -10'u içermektedir. Kaspaz-3, -6, -7 ise efektör gruptur. Apoptotik hücre ölümünde Bcl-Xs, Bak, Bad, Bax gibi pro-apoptotik moleküller ve Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w gibi anti-apoptotik moleküller rol oynar. Bcl-2 üyeleri mitokondriyal membran iyon permeabilitesi üzerine hücre ölümü ya da sağkalımında etki gösterir. Glutamat eksitotoksitesi, oksidatif stres ve diğer faktörler mitokondriyal membran hasarına sebep olur. Bax, mitokondride çatlaklar oluşturarak sitokrom-c' nin sitoplazmaya salınımına yol açar. Sitokrom c' nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi bir hücrenin apoptozis yoluna girmiş olduğunu gösterir. Sitokrom-c sitoplazmik protein olan apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır ve onu

aktive eder, ardından ATP' nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur ve daha sonra bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9' a dönüşmesini sağlar. Takiben aktif kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve DNA fragmentasyonuna neden olur. (11,42-48). Geçici serebral iskemi sonrası kaspaz-3 aktivitesinin gecikmiş nöronal ölüme aracılık ettiği bildirilmiştir (49). Neonatal HİE sıçan modelinde, iskemi sonrası 24. saatte ipsilateral talamusta dejenere olan nöronlarda apoptozis meydana geldiği gözlemlenmiştir (50), üridin uygulamaları ile ipsilateral hemisferde apoptozis indikatörü aktif kaspaz-3 düzeyleri ve ekspresyonunun anlamlı derece azaldığı gösterilmiştir (4).

MSS' nin gelişmesinde, motor nöronlar büyük sayılara ulaşır. Optimum sayıda nöronun, optimum sayıda sinaptik bağlantı içinde olabilmesi için nöron kayıpları gereklidir. Terminal bağlantı oluşturamayan nöronlar apoptozisle yok edilir. Bu ise fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (42).

Neonatal Hİ sıçan modelinde, kaspaz inhibitörleri serebral hipoksi-iskemi sonrası uygulandığında nöroproteksiyon sağlamıştır (51). Fokal iskemi modelinde de kaspaz inhibitörleri kaspaz enzim aktivasyonunu engelleyerek apoptotik hücre ölümüne karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (52).

Anormal histon asetilasyonu veya histon asetilasyon mekanizmasının bozulmuş dengesi, nörodejenerasyon ile bağlantılı olmuştur (53,54). Protein asetilasyonu çeşitli hücresel fonksiyonları düzenleyen önemli post-translasyonel modifikasyon olarak ortaya çıkmıştır.













Hücrelerde protein asetilasyonu, işlevsel olarak antagonist iki enzim sınıfı ile yapılmaktadır: Protein asetilazlar ve deasetilazlar (55). Hücre içindeki DNA kromatin olarak paketlenir. Kromatinin yeniden şekillenmesi ve transkripsiyonel regülasyonu, mikrotübül dinamikleri ve intraselüler transport, metabolizma ve yaşlanma gibi çoklu hücresel fonksiyonları düzenleyen önemli post-translasyonel modifikasyonlar protein asetilasyonun dâhil olduğu süreçleri ifade etmektedir. Kromatinin temel yapısal birimi olan nükleozom, histon proteinlerinin oktamer yapısı etrafında sarılı DNA'nın ~147 baz çiftlik oluşumudur. Bir histon oktameri H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden ikişer tane içerir (56). Her histon proteini, lizin kalıntıları ile bir N-terminale sahiptir. Asetilasyon, histonların N-terminal lizin kalıntılarının ε-amino grubuna bir asetil grubunun eklenmesi ile gerçekleşir ve histon modifikasyonları içinde önemli bir yer tutar.

Protein komplekslerinin biyolojik işlevlerini modüle eden temel olay bir asetil grubu ile kovalent bağlanan spesifik lizin kalıntılarının modifikasyonudur. Histon asetilasyonu dinamik bir işlem olup, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) tarafından regüle edilir. Histonların (kromatinlerin ana bileşenleri) asetilasyonunu modüle etmelerinden dolayı, birçok araştırma bu proteinlerin canlı hücre fonksiyonlarında ve çeşitli hastalıklardaki rolleri üzerine odaklanmıştır. Histon asetilasyon düzeyleri protein substratına asetil grubunu ekleyen ya da asetil grubunu uzaklaştıran HAT ve HDAC' ların aktivitelerine bağlıdır. HAT' lar histon proteinin lizin aminoasitinden asetillenmesini sağlar, bu DNA ve histonlar arasındaki sağlam yapının gevşemesini sağlar. Gevşek kromatin yapısı, transkripsiyon faktörlerinin hedef gene ulaşmasını kolaylaştırır.

Deasetilasyon ise DNA ve histonları sıkı bir şekilde tutar ve böylece transkripsiyonun gerçekleştirilmesine izin verilmez. Bu nedenle, kromatin yapısı ve gen ifadesine başlıca yön veren HAT ve HDAC aktivitesi arasında karşılıklı etkileşim olduğu bildirilmiştir (55).

Sıçan beyrinde, yüksek çözünürlüğe sahip in situ hibridizasyon ve görüntüleme teknikleri kullanılarak 11 HDAC izoformunun geniş kapsamlı gen ekspresyon haritalaması yapılmıştır (57). HDAC ailesi sınıf I, sınıf IIa ve IIb, sınıf III ve sınıf IV olmak üzere 5 ana alt birimden oluşmaktadır (Şekil-1) (57).

Sınıf I HDAC' lar HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3 ve HDAC 8 enzimlerini içermektedir. HDAC1 ve 2 baskın olarak nukleusta lokalizedir, HDAC3 ise nukleus ve sitoplazma arasında bir mekik gibi uzanır. Sinir sisteminde HDAC1' in aktivitesinin etkisi henüz tam olarak açık değildir, ancak nöronal gelişme ve farklılaşmada önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (58). HDAC2' nin nöronal farklılaşmada bir katılımının olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (59). HDAC3 yüksek oranda serebellar granül hücrelerde eksprese edilir. HDAC3 nöronal sağkalım ve hastalıklar arasında bir rol oynamaktadır. HDAC3' ün Hungtinton hastalığı (HD) modelinde poliglutaminin toksisitesini artırdığı bildirilmiştir (60). Gen ekspresyonu seri analizleri ile HDAC8' in araştırıldığı bir çalışmada, HDAC8' in merkezi ve periferik sinir dokuda yer almadığı, beyin tümör dokusunda ise HDAC8 tespit edildiği bildirilmiştir (61).

Sınıf	Nüfuz bölgesi organizasyonu	Nöron lokalizasyonu	Sinir Sistemi Fenotipleri
I	HDAC1 	Nukleus > Akson	Beyin yapısı anormallikleri
	HDAC2 	Nukleus	
	HDAC3 	Nukleus > Akson	Gelişmiş uzun süreli bellek
	HDAC8 	Nukleus>Sitoplazma	İntrakranial hemoraji
IIa	HDAC4 	Nukleus > Akson	Eksensefali, Öğrenme / LTP defekti
	HDAC5 	Nukleus > Akson	Gecikmiş akson rejenerasyonu
	HDAC7 	Nukleus>Sitoplazma	--
	HDAC9 	Nukleus>Sitoplazma	--
IIb	HDAC6 	Nukleus < Akson	Hiperaktivite, anksiyolitik
	HDAC10 	Nukleus<Sitoplazma	--
III	Sirtuinler 	-	--
IV	HDAC11 	-	--

Şekil-1: Sınıf I, II, III ve IV HDAC' ların protein yapılarının karşılaştırılması ve hücre içi lokalizasyonu (Cho ve ark (62), çalışmasından uyarlanmıştır)

Sınıf II HDAC' lar iki alt gruptan oluşur: Sınıf II a HDAC' lar 4, 5, 7 ve 9; sınıf II b HDAC' lar 6 ve 10. Sınıf IIa HDAC' lar nükleus ve sitoplazma arasında uzanır. HDAC4'ün kültür serebellar granül nöronlarında nöronal apoptozise aracılık ettiği gözlemlenmiştir (63). HDAC5'in HD'da kortikal nöronlarda lokalize olduğu (64) ve serebellar granül nöronlarda apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (65). HDAC9 aktivitesi, dendrit gelişiminin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. HDAC9'un dendritik dalların büyümesini azalttığı, ancak HDAC9 uzaklaştırılırsa dendritik büyümeyi desteklediği bildirilmiştir (66). Deneysel çalışmalarda HDAC6'nın akson hasarında ya da merkezi sinir sisteminin patolojik durumlarında önemli bir rol oynadığını ancak normal nöronal gelişim sırasında bir rolü olmadığını gösterilmiştir (67,68). İn vitro immünopresipitasyon analiz yöntemleri ile HDAC10'un, HDAC3 ve HDAC4'e eşdeğer bir seviyede Asetil-Histon H4 peptidini substrat olarak deasetile ettiği gösterilmiştir (69).

Sınıf III HDAC; Sirtuinler (SIRT 1-7) ailesini oluşturur. SIRT' lar yapısal ve fonksiyonel olarak diğer HDAC' lardan farklılık göstermektedir (55). Diğer HDAC sınıfları çinko-bağımlı HDAC' lar olarak bildirilirken (62), SIRT'lar kofaktör olarak

NAD⁺'e bağılı bir sınıf olarak tanımlanmıştır. SIRT ailesinin nöronal gelişim ve onarımında bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (62).

Sınıf IV HDAC enzimi olan HDAC11 yapısal olarak sınıf I ve II' den farklıdır ve baskın olarak nükleusta lokalizedir (55). HDAC11,-3,-5 beyinde yüksek oranda eksprese edilir, HDAC10,-9,-7 ise düşük oranlarda eksprese edilir. HDAC11' in önemli oranda eksprese edildiği bölgeler CA1, CA3 ve dentat gyrus' tur, ayrıca granül hücre tabakası ve purkinje hücre tabakasında da eksprese edildiği bildirilmiştir (57). Tüm HDAC' lar incelendiğinde sadece HDAC11' in purkinje hücre tabakasında eksprese edildiği bulunmuştur (57).

Pirimidinler baz, nükleozid ve nükleotid formlarında bulunurlar. Pirimidin bazları esas olarak DNA ve Ribonükleik asit (RNA)'nın yapısına katılırlar. Sitozin hem DNA hem de RNA'nın yapısında bulunurken, timin sadece DNA'nın urasil ise sadece RNA'nın yapısında bulunur. Pirimidin bazlarına riboz veya 2-deoksiriboz formunda bir şeker molekülünün eklenmesiyle pirimidin nükleozidleri oluşur. Pirimidin nükleotidleri ise nükleozidlere fosfat gruplarının eklenmesiyle oluşur.

Eklenen fosfat gruplarının sayısı o nükleotidin ismini belirler; bir, iki ya da üç fosfat grubu eklendiğinde nükleozid ismine sırasıyla mono-, di- ya da tri- fosfat ekleri getirilir.

Pirimidin bileşikleri vücutta de novo yolak ve kurtarma yolağı adlı mekanizmalar üzerinden sentezlenirler (70). Pirimidin biyosentezinin de novo yolağında önce karbomoil fosfat'tan üridin-5'-monofosfat (UMP) oluşur, daha sonra nükleotid kinaz enziminin katalizlenen ardışık reaksiyonlarla ATP' den elde edilen fosfat grupları UMP'ye aktarılarak sırasıyla üridin-5'-difosfat (UDP) ve üridin-5'-trifosfat (UTP) sentezi gerçekleşir.

Sitidin-5'-trifosfat (CTP) sentezi CTP sentaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla UTP' den meydana gelir. Sentez için gereken amin grubu glutaminden elde edilir. Timin nükleotidleri DNA'nın yapısına katıldıklarından deoksi formda sentezlenirler. Kandan alınan pirimidin nükleozidleri dokunun ana pirimidin kaynağını oluşturur.

2.1.Pirimidinlerin Biyolojik Aktiviteleri

Nükleik asitlerin (RNA ve DNA) yapı taşları olmalarının yanı sıra pirimidinler hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması gibi fizyolojik olayları kontrol eden biyokimyasal yolaklarda rol alırlar.

2.1.1.Protein glikozilasyonu: Glikoprotein sentezinde kullanılan şekerler özellikle UDP' ye bağlanarak aktive edilmelidir. Glikozaminoglikanlar (GAG) glikozile bir bileşik

sınıfıdır. GAG' lar hemen hemen her dokuda ekstrasellüler matriksin biyosentezinde rol alırlar (71). Glikolizasyon ve galaktokolizasyon yollarındaki defektler kognitif bozukluklara yol açar.

2.1.2.Fosfolipid ve glikosfingolipidlerin sentezi: Hücre membranlarının temel bileşenleri fosfolipidlerdir ve fosfolipid miktarlarının korunması membran bütünlüğünün sağlanması ve optimal akışkanlığının belirlenmesinde hayati rol oynar. Beyinde en bol bulunan fosfolipid olan fosfatidilkolin'in ve bir diğer temel fosfolipid olan fosfatidiletanolamin'in sentezi Kennedy yolağı adlı mekanizma üzerinden gerçekleşir (72). Hücre içindeki CTP havuzu sitidin'in refosforilasyonundan ya da üridin'in metabolizmasından oluşabilir. Sitidin' e nazaran daha etkin bir şekilde kan-beyin bariyerini (KBB) geçebilen dolaşımdaki üridin, beyin dokusunda CTP sentezinin ana kaynağını oluşturur (73). Bunun bir sonucu olarak hücre içi UTP düzeyleri yeni sentezlenen fosfolipid miktarının temel belirleyicisidir (74,75).

2.1.3. Glikojen sentezi: Glikojen vücudun ana glikoz depo formunu oluşturan bir polisakkariddir. Temel olarak karaciğer ve kaslarda yapılır, ancak beyin, uterus ve diğer dokularda da sentezi mevcuttur. Glikojen molekülünün zincir uzaması her basamakta UDP-glukoz' dan gelen bir glukoz molekülünün eklenmesiyle gerçekleşir ve her reaksiyonda bir UDP molekülü salıverilir (76). Glikojen üretimini kontrol eden glikojen sentaz enziminin aktivitesi ve protein düzeyleri UTP ve glukoz bulunabilirliğine bağlı hücre içi UDP-glukoz düzeyleri tarafından düzenlenir.

Hücre içi UTP konsantrasyonlarındaki bir azalma glikojen sentezini de azaltır ve bu durum kültür medyumuna üridin ilavesiyle düzeltilebilir (76). Ayrıca glukoz yoksunluğu hücre içi UDP-glukoz depolarının boşalmasına yol açar. Bu durum da glikojen sentaz aktivitesini inhibe ederek glikojen sentaz mRNA' sını ve protein düzeylerini azaltır (77).

2.2.Beyinde Pirimidin Bileşikleri

Beyinde de novo pirimidin sentezinin varlığı karaciğere kıyasla daha düşük oranda olsa da kanıtlanmıştır (78). Beyin pirimidin düzeylerinin ne derece de novo senteze bağımlı olduğu bilinmese de dolaşımdaki sitidin ve üridin'in elektrofizyolojik aktivite ve karbonhidrat ve fosfolipid içeriğinin sürekliliği için hayati olduğu bilinmektedir (79,80). Bu yüzden beyin dolaşımdaki pirimidinlere ihtiyacı bulunmaktadır ki bu da pirimidinlerin plazma konsantrasyonları ve taşıyıcı proteinlerinin beyin pirimidin düzeyini belirlemede önemli olduğunu düşündürmektedir.

Deney hayvanlarında üridin ve sitidin'in plazma konsantrasyonlarını arttıran oral (74) veya parenteral (81) tedaviler bu pirimidinlerin beyin düzeylerini de arttırmaktadır.

Pirimidin nükleozidleri iki farklı taşıyıcı protein ailesi olan Konsantre Edici Nükleozid Taşıyıcısı (Concentrative nucleoside transporter; CNT) (82) ve Dengeleyici Nükleozid Taşıyıcısı (Equilibrative Nucleoside Transporter; ENT) (83) bireyleri vasıtasıyla hücrelere alınırlar. CNT ailesi sodyum-bağımlı yüksek afiniteli taşımadan, ENT ailesi ise sodyumdan bağımsız düşük afiniteli taşımadan sorumludurlar. Dışarıdan verilen pirimidin nükleotidleri fosfat gruplarını kaybederek kana üridin ve sitidin olarak geçerler (84).

Üridin ve sitidin'in beyin hücrelerine alınması için önce KBB üzerindeki taşıyıcılar aracılığıyla beyin ekstrasellüler sıvısına sonra da hücre zarındaki taşıyıcı proteinler tarafından hücre içine alınması gerekir. CNT ve ENT ailesinin üyeleri hem KBB hem de hücre zarları üzerinde bulunmaktadır (73). Bu sayede kanda bulunan serbest nükleozidlerin beyin hücrelerine alınması mümkün olmaktadır. Dışarıdan verilen sitidin ve üridin'in beyne geçmesi bu taşıyıcılar aracılığıyla olsa da, literatür bilgisi insanda fizyolojik koşullarda üridin'in sitidin'e göre daha kolay beyne geçiyor olabileceğini işaret etmektedir (73).

HDAC inhibitörleri, hücre kültürü ve hayvan modelleri oluşturularak çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda terapötik bir ajan olarak çalışılmaktadır (85). HDAC inhibitörleri kullanılarak yapılan deneysel bir çalışmada, HDAC inhibitörlerinin genişletilmiş poliglütamin tekrarlı nöronlarda oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı görülmüş ve bu nedenle HD, Amyotrofik Lateral Skleroz, Parkinson hastalığı ve inme dâhil olmak üzere pek çok nörolojik hastalıklar için uygun bir terapötik madde olabileceği bildirilmiştir (48). Çinko-bağımlı HDAC inhibitörleri farklı kimyasal yapılarına göre kategorize edilmiştir. HDAC inhibitörleri hidroksamatlar, alifatik asitler, siklik peptitler ve benzamidler dâhil olmak üzere birçok yapısal sınıfa ayrılmıştır (86, 87). Trichostatin A (TSA), Suberoilanilid hidroksamik asit (SAHA) en iyi bilinen hidroksamat sınıfı inhibitörlerdir. Alifatik asitler arasında Valproik asit (VPA) ve Sodyum Bütirat (SB) gibi asitler laboratuvarlarda geniş ölçüde çalışılmaktadır (88,89).

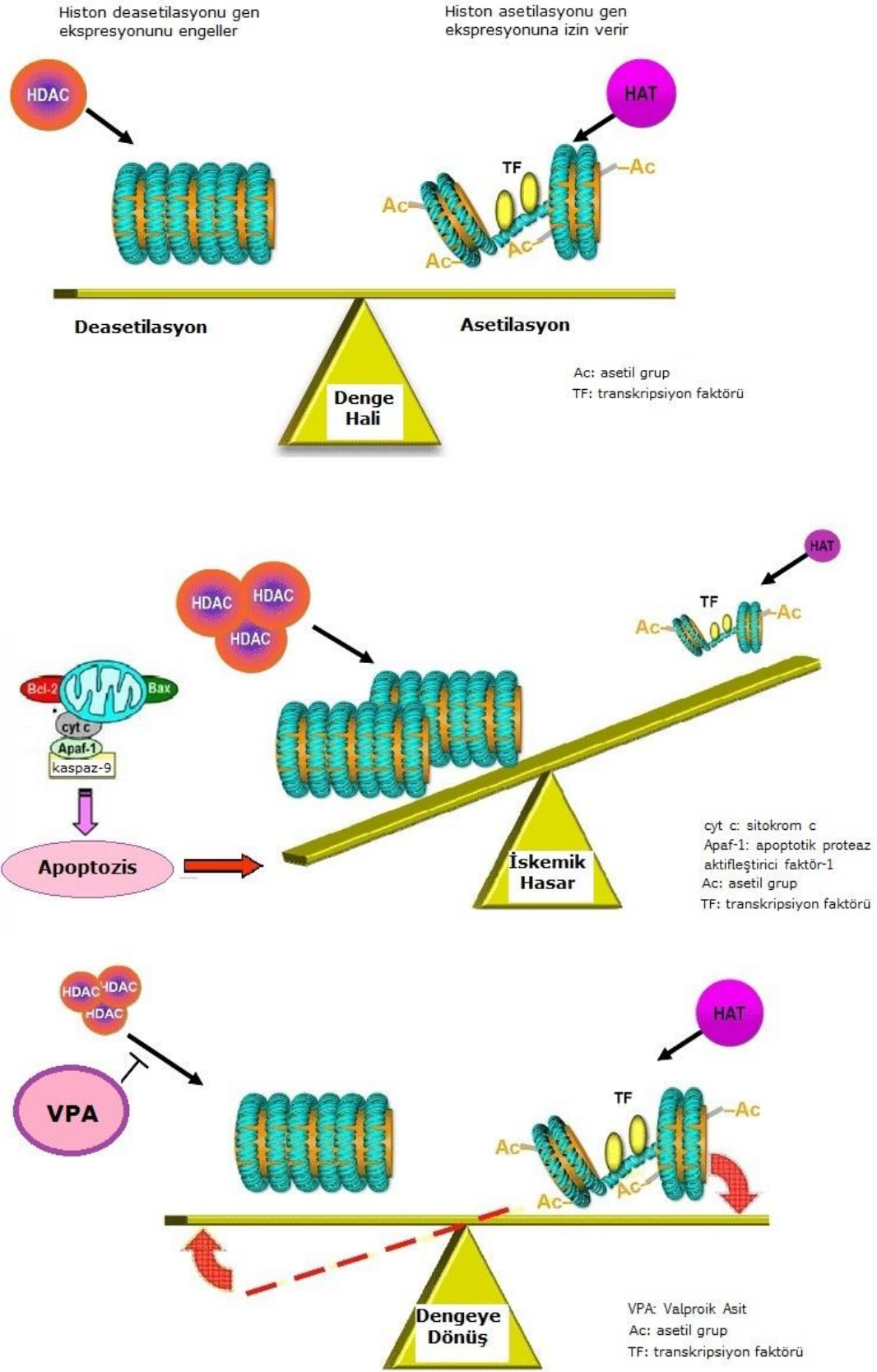
Güçlü bir hidroksamik asit HDAC inhibitörü olan TSA'nın, iskemi modelinde hasar sonrası beyin infarktını azalttığı ve psikomotor testlerde nörolojik performansı artırdığı gösterilmiş olup, hasar sonrası sitoprotektif protein düzeylerindeki azalmayı baskıladığı bildirilmiştir (90). TSA, iskemik beyin hasarında histon asetilasyonunun önemli bir rolü olduğunu gösteren in vitro ve in vivo serebral iskemi modellerinde beyin hasarını azaltarak güçlü bir nöroproteksiyon sağlamıştır (91,92).

Fokal serebral iskemide, SAHA tedavisinin normal beyinde Asetil-Histon H3 asetilasyonunu arttırdığı ve iskemik beyinde histon deasetilasyonunu engellediği gösterilmiş olup, beyin hasarı sonrası hem normal hem de iskemik beyinde Hsp70 ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonunu arttırmıştır (53).

Neonatal iskemik sıçan modelinde, SB tedavisi ile Asetil-Histon H3 protein düzeylerinin azalması engellenmiş, iskemik beyinde SB tedavisinin nörogenezisi uyardığı gösterilmiştir (93). Fokal serebral iskemide, SB inhibitörü ile tedavinin Asetil-Histon H3 protein düzeyindeki azalmayı baskıladığı, pro-apoptotik hücrelerin sayısını azalttığı ve motor, duyu ve refleks performansı artırdığı bildirilmiştir (90). Fokal iskemide, SB uygulanması sonucu beyin infarkt hacminin azaldığı gösterilmiş olup, aynı çalışmada in vitro oksidatif stres-indüklü nöronal ölüm modelinde de SB inhibitörünün kortikal nöronlarda nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (94).

VPA, klinik olarak bipolar bozukluk, epilepsi, migren gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda kullanılan, FDA tarafından onaylanmış (95) geniş-spektrumlu bir antikönsülandır (96). İskemide sıçan modeli oluşturularak yapılan deneysel çalışmalarda, hasar sonrası VPA uygulamasının beyin infarkt hacmini ve nörolojik kayıpları azalttığı gösterilmiştir (5, 90). Global iskemide (88) ve neonatal global iskemide sıçan modelinde (97) hasar sonrası VPA ile tedavinin nöroprotektif özellik gösterdiği bildirilmiştir. Mitokondriyal yapının korunmasıyla bağlantılı olarak HDAC inhibitörlerinin uygulanması, oksijen- glukoz yoksunluk modelinde izole edilmiş optik sinirin sağkalımını da desteklediği rapor edilmiştir (98). Tüm bu HDAC inhibitörlerinin uygulanması ile, kortikal nöronal kültürlerde Asetil-Histon H4 asetilasyonunda bir artış meydana getirdiği gösterilmiştir (94).

Deneysel çalışmalarda HDAC inhibitörleri ile apoptotik süreci azaltmak mümkün hale getirilmiştir. Serebral iskemide hasarda anti-apoptotik mekanizmaların beyin hasarını azalttığı bildirilmiştir (99). Geçici ve kalıcı fokal serebral iskemide modellerinde VPA'nın nöroprotektif etkisi, iskemik alanda hasar sonrası kaspaz-3 aktivasyonunda bir azalma ile ortaya konulmuştur (5). VPA'nın anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (100). Bir transkripsiyon faktörü ve pro-apoptotik protein olan p53 up-regülasyonunun da VPA tarafından bastırıldığı gösterilmiştir (90) (Şekil-2).



Şekil-2: HDAC inhibitörleri HDAC' ları inhibe eder ve transkripsiyonel aktiviteyi kolaylaştırarak histon asetilasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Saha ve ark. (101), 2006 çalışmasından uyarlanmıştır)

Fokal serebral iskemide sıçan modeli oluşturularak yapılan çalışmada, iki sitoprotektif faktör Bcl-2 ve Akt seviyelerinin iskemide sonrası azaldığı ve bu azalmanın TSA enjeksiyonu ile engellendiği gösterilmiştir (90). SB inhibitörünün ise iskemik sıçanlarda Akt seviyelerinin kaybını önlediği ve pro-apoptotik protein p53 ün artışını engelleyerek anti-apoptotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (90). İntraserebral hemoraji inme sıçan modelinde de VPA'nın anti-apoptotik aktivitesi araştırılmıştır. VPA'nın, kaspaz aktivitesini engellediği, pro-apoptotik Bax düzeylerini azalttığı, anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-xl düzeylerini artırdığı, apoptotik TUNEL-pozitif hücrelerin sayısını azalttığı ve Asetil-Histon H3 asetilasyon düzeylerini artırdığı bildirilmiştir(102). Travmatik beyin hasarı sonrası VPA uygulamasının apoptotik hücrelerin sayısını anlamlı derecede azalttığı gözlemlenmiştir (103).

Bu sonuçlar göstermiştir ki; HDAC inhibitörlerinin iskemik hasar sonrası uygulanması apoptotik süreci baskılayarak nöroproteksiyon sağlamaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızın amacı 7 günlük yenidoğan sıçanlarda oluşturulan Hİ beyin hasarını takiben oluşan beyin hasarını, histon deasetilaz enzim aktivitesini ve Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 protein düzeylerini serum fizyolojik tedavisi alan neonatal sıçanların beyinlerindekiyle karşılaştırmak suretiyle üridin tedavisinin sağladığı nöroproteksiyonda histon deasetilaz enzim aktivitesinin nöroproteksiyon yönünden olası katkısını araştırmaktır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızın deney protokolü Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 2013-14/03 sayılı karar ile onaylandı. Çalışmada Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, doğdukları gün 1. gün olarak kabul edilen Spraque Dawley cinsi sıçanlar cinsiyet farkı gözetmeksizin kullanıldı. Yedi günlük olduklarında, 12 gr ve üzeri ağırlıktaki yavru sıçanlara modifiye Levine modeli (2) uygulanarak Hİ beyin hasarı oluşturuldu. Deney hayvanları sıcaklığı 18-24°C ve 12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde ışığı ayarlanmış odada, her bir kafeste anne ve yavruları olacak şekilde su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular.

Bu çalışma, “KUAP(T)-2013/76” proje numarası ile Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

3.1.Çalışma Protokolü ve Tedavi Grupları

Çalışmada kullanılan yavru sıçanlar 7 günlük olduklarında randomize olarak 3 gruba ayrıldı.

Sham Grubu (n:8); orta hat boyun insizyonu yapıldı ve insizyon yeri kapatıldı. İskemi ve hipoksi uygulanmadı. 150 dakika boyunca deney düzeneğinin içinde tutularak 37°C’ de oda havası solutuldu.

Kontrol Grubu (n:14); iskemi ve hipoksi uygulandı. Deney hayvanlarına 150 dakika boyunca 37°C’de hipoksik karışım solutuldu (Bu karışım %92 azot ve %8 oksijen içerir). İntraperitoneal (i.p.) yolla 1 dizyem %0,9 NaCl uygulandı.

Üridin Grubu (n:14); iskemi ve hipoksi uygulandı. Deney hayvanlarına 150 dakika boyunca 37°C’ de hipoksik karışım solutuldu. İ.p. yolla 1 dizyem 500 mg/kg üridin uygulandı [Not: Bu doz önceki bir çalışmada nöroprotektif etkinliği kanıtlanan tedavi dozudur (4)].

Üridin ve %0,9 NaCl’un ilk dozu hipoksi uygulamasından hemen sonra, 2. ve 3. dozları ise yavru sıçanlar sırasıyla 8 ve 9 günlük iken uygulandılar.

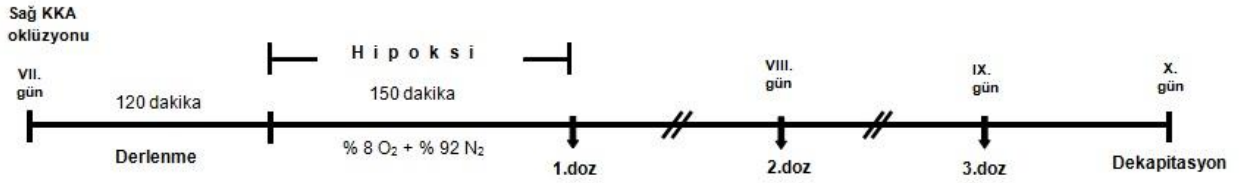
3.2.Hipoksik-İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

İnhale İzofloran (Rhodia, Bristol, İngiltere) anestezisi uygulanarak (104) deney hayvanları supin pozisyonunda, boyunları hiperekstansiyona getirilerek orta hattan vertikal olarak 0,5 cm’lik cilt, cilt altı insizyonu yapıldı.

Sağ kommon karotid arter, operasyon mikroskobu (Opmi 99, Carl Zeiss, Almanya) altında 6/0 ipek ile askıya alınarak koterize edildi. İnsizyon yeri onarıldı. Cerrahi girişim ortalama 3 dakikayı aşmadı.

Yavru sıçanlar, anne yanında 120 dakika derlenme sürecini takiben üçerli gruplar halinde 450 ml hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlara aktarıldılar. Düzenek aracılığıyla nemlendirilmiş %92 azot ve %8 oksijen karışımı 150 dakika solutuldu. Hipoksik karışımın monitorizasyonu ortak giriş hattına bağlanan anestezi gaz monitörü (Minor 612, AMS Türkiye) ile sabit tutuldu. Hipoksi süresince deney düzeneği 37°C sıcaklıktaki su banyosu içinde bulunduruldu. Hipoksi düzeneği içinde 150 dakikalık süre tamamlanmadan solunumu duran deney hayvanlarına resüsitasyon uygulanmayıp çalışmadan çıkarıldı.

Çalışmanın deney akış şeması Şekil-3'te gösterilmiştir.



Şekil -3: Deneysel Basamakların Şematik Diyagramı (KKA: Kommon karotid arter)

Üçüncü doz üridin uygulamasından 24 saat sonra yavru sıçanlar iki gruba ayrıldı. Anestezi altında yapılan dekapitasyonu takiben bir gruptan beyin homojenatları ve diğer gruptan da beyin kesitleri elde edildi. Beyin homojenatlarından ticari bir kit (USCN Life Science Inc, Hubei, Çin) kullanılarak HDAC aktivitesi ve moleküler biyolojik olarak Asetil-Histon 3 ve Asetil-Histon 4 protein düzeyleri incelendi.

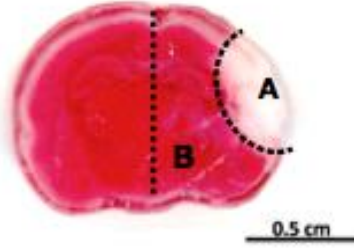
Koronal kesit elde etmek için hızla çıkarılan beyinler soğutulmuş yenidoğan beyin matriksi (ASI Instruments, ABD) üzerine bırakıldı. İki mm kalınlığında seri koronal kesitler; bregmanın 2 mm anteriorundan, I. koronal kesit ve 2 mm posteriorundan, II. koronal kesit olacak şekilde alındı. Takiben kesitler 2, 3, 5-Trifeniltetrazolyum klorid (TTC) boyama yöntemi kullanılarak lezyon alanı hesaplaması için kullanıldı. Bu işlemler her bir tedavi grubu için tekrarlandı.

3.3.TTC Boyama

%1'lik TTC (Sigma, St Louis) solüsyonu 100 ml fosfat tamponu (pH 7,4) içinde 1mg TTC çözdürülmek suretiyle her boyama için taze olarak hazırlandı. Beyin kesitleri bu solüsyon içinde 37°C' de 30 dakika boyandı. Her 10 dakikada bir beyin kesitleri ters düz edildi. Boyamadan sonra beyin kesitleri %4 paraformaldehit bulunan tüplere aktarıldı ve 4°C'de saklandı.

3.4.İskemik İnfarkt Hacminin Ölçümü

İskemik infarktın değerlendirilmesi daha önceki çalışmalarda tanımlandığı gibi yapıldı (3). %4 paraformaldehit içerisinde bulunan beyin kesitleri alınıp dijital görüntüleri profesyonel bir fotoğraf makinası (Nikon- D7000) yardımı ile elde edildi. TTC ile boyanmayan infarkt alanları belirlenip bir görüntü-analiz yazılımı (Scion Image, Scion Corporation, ABD) kullanılarak, infarkt hacim yüzdesi hesaplandı (Şekil-4). İnfarkt hacim yüzdesinin hesaplanmasında $[(\text{İnfarkt alanı } A1 + A2 + \dots + An) \times 2 \text{ mm}] / (\text{Sağlam hemisfer alanı } B1 + B2 + \dots + Bn) \times 2 \text{ mm}] \times 100$ formülü kullanıldı (105).



Şekil-4: TTC boyama ile infarkt alanının belirlenmesi

3.5.HDAC Aktivitesinin Ölçümü

HDAC aktivitesi analizleri için yavru sıçanların sağ beyin yarı kürelerinden elde edilen homojenatlar kullanıldı. HDAC aktivitesi her gruptan 5 sıçanın ipsilateral hemisfer homojenatlarında üretici firmanın talimatları doğrultusunda kolorimetrik bir kit (USCN Life Science Inc, Hubei, Çin) kullanılarak ölçüldü. Absorbans değerleri spektrofotometre ile 405 nm'de okundu ve sonuçlar ortalama absorbans değerlerinin yüzdesi olarak ifade edildi.

3.6. Western Blot Analizleri

Total protein içerikleri Lowry yöntemine göre tayin edilen homojenatlar (her gruptan n:8) eşit hacimde Laemmi solüsyonu ile muamele edilerek 5 dakika kaynatıldı. Örnekler eşit miktarda protein içerecek şekilde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE; Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) elektroforetik olarak yürütülüp protein bantları poliviniliden florür (PVDF) membranlara (Millipore, Temecula, CA, ABD) aktarıldı. Bu membranlar birinci antikolar olan anti-Asetil-Histon H3 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, ABD) ve anti-Asetil-Histon H4 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, ABD) ile gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün uygun ikinci antikolarla (1:5000; GE Healthcare UK, Buckinghamshire, İngiltere) 1 saat inkübe edilen membranlar kemiluminesans deteksiyon kitiyle (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, İngiltere) muamele edilip oluşan kemiluminesans film baskı makinesinde (Hyperprocessor RPN1700; Amersham Life Science, Buckinghamshire, İngiltere) fotoğraf filmine (Kodak Medical X-ray film; Carestream Health, Fransa) bastırıldı. Film üzerinde tespit edilen protein bantlarının dijital görüntüleri transparan adaptörlü tarayıcı (UMAX Powerlook 1000, Atlanta, GA, ABD) kullanılarak elde edildi. Bantların dansitesi Image J programı kullanılarak analiz edildi ve Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 proteinlerinin ekspresyonları Sham grubuna göre yüzde değişim olarak sunuldu. Bu işlemlerin tamamlanmasını takiben membranların üzerindeki birinci ve ikinci antikolar özel bir solüsyon (Restore Western Blot Stripping Buffer; Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) kullanılarak uzaklaştırıldı ve örneklerde eşit miktarda protein yüklendiğinin kontrolü amacıyla membranlar anti-beta-tubulin (Sigma, St. Louis, MO, ABD) ve devamında uygun ikinci antikor ile yeniden muamele edildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Sigma Plot 12.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata (SH) olarak sunuldu. İkili karşılaştırmalar “Student t testi” ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar için Tek Yönlü Varyans Analizi’ni (ANOVA) takiben post-hoc Tukey testi kullanıldı. Tüm karşılaştırmalarda $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

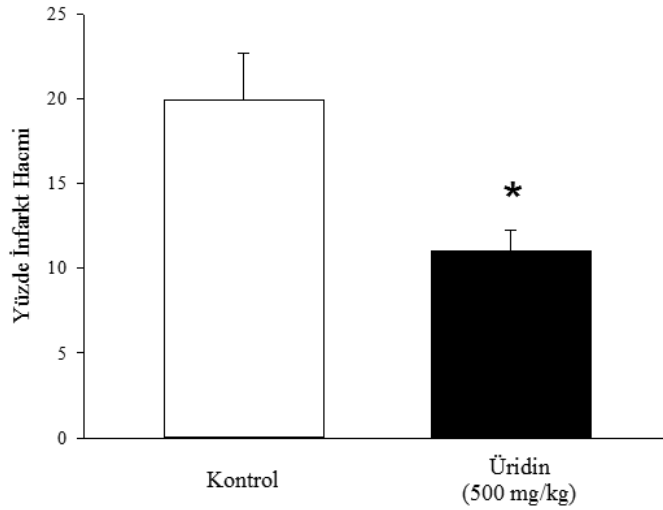
4.BULGULAR

Sham grubunda hipoksik-iskemik hasar bulunmadığından bu gruptaki sıçanlardan TTC boyama için örnek kullanılmadı. TTC boyamalar ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubunda $19,89 \pm 2,79$ olarak hesaplanan infarkt hacmi, üridin verilen grupta $11,00 \pm 1,20$ olarak hesaplandı. Üridin uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan yüzde infarkt hacmindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p < 0.05$) (Tablo-1, Şekil-5, Resim-1).

Tablo-1: TTC Boyama ile Hesaplanan İpsilateral Hemisferdeki İnfarkt Hacim Yüzdeleri

	% İnfarkt Hacmi \pm SH
Kontrol	19,89 \pm 2,79
Üridin (500mg/kg)	11,00 \pm 1,20*

(* $p < 0.05$, kontrole göre).



Şekil-5: TTC Boyama ile Belirlenen İpsilateral Hemisferdeki Yüzde İnfarkt Hacim Grafiği. (* $p < 0,05$, Student t testi kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, n:6).



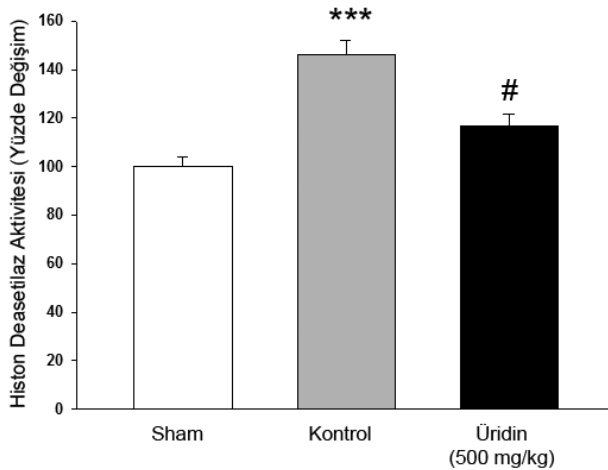
Resim -1: Grupların Koronal Beyin Kesitlerinin TTC Boyama Görüntüleri.

HDAC aktivitesi, sham grubundan elde edilen ortalama absorbans değerlerinin yüzdesi olarak ifade edildi. HDAC aktivitesi kontrol grubunda %146,4'e yükselirken ($p < 0,001$) üridin grubunda ise %116,6'ya düştü ($p < 0,05$) (Tablo-2, Şekil-6).

Tablo-2: İpsilateral Hemisferdeki HDAC Aktivitesi Yüzdeleri

	HDAC Yüzdesi \pm SH
Sham	100,00 \pm 4,01
Kontrol	146,40 \pm 5,75***
Üridin (500mg/kg)	116,60 \pm 5,05[#]

(*** $p < 0,001$, Sham grubu ile kıyaslandığında ve [#] $p < 0,05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında.)



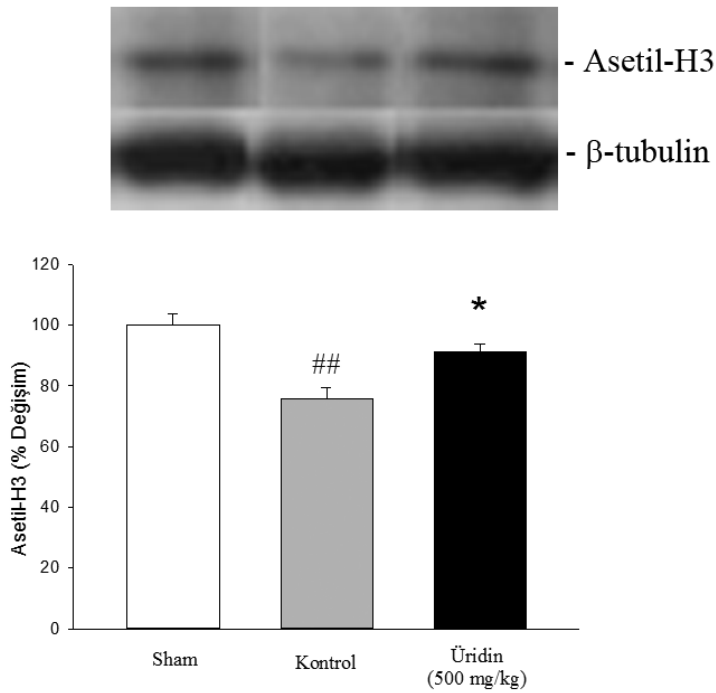
Şekil-6: HDAC Aktivitesi Sham, Kontrol ve Üridin grubu örneklerinin ortalama absorbans değerlerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Tek Yönlü Varyans Analizini takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır (** $p < 0,001$, Sham grubu ile kıyaslandığında ve [#] $p < 0,05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında). Her grupta n:5.

Asetil-Histon H3 protein düzeyleri, sham grubundaki protein bantlarının ortalama dansitelerinin yüzdesi olarak sunuldu. Asetil-Histon H3 düzeyleri kontrol grubunda %75,79'a düşerken ($p < 0,001$), üridin grubunda %91,11'e yükseldi ($p < 0,05$) (Tablo-3, Şekil-7).

Tablo-3: Western Blot Analizi ile Hesaplanan Asetil-Histon H3 Protein Düzeyleri

	Asetil-Histon H3 Protein Düzeyleri \pm SH
Sham	100,00 \pm 3,72
Kontrol	75,79 \pm 3,49 ^{##}
Üridin (500mg/kg)	91,11 \pm 2,83*

(* $p < 0,05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında ve ^{##} $p < 0,001$, Sham grubu ile kıyaslandığında).



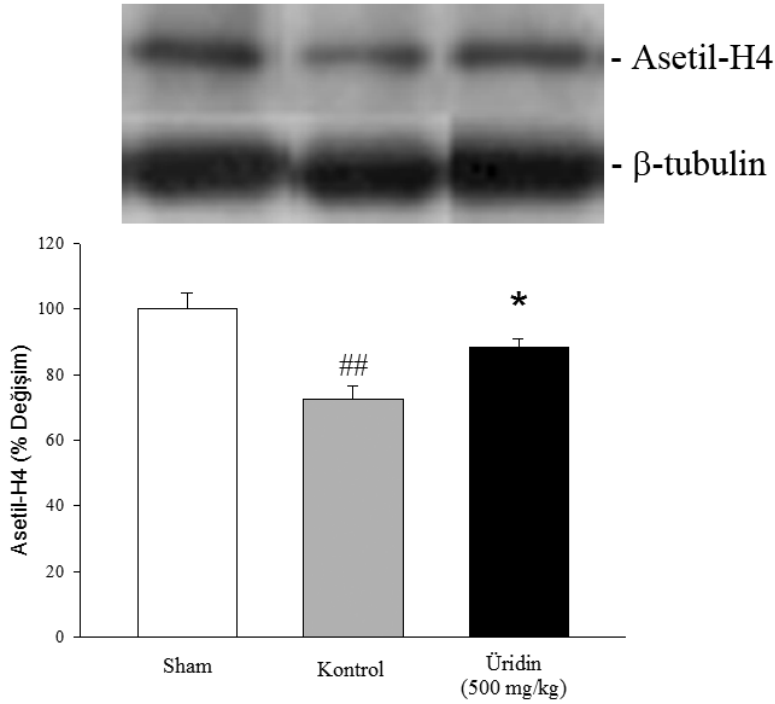
Şekil-7: Asetil-Histon H3 Protein Düzeyleri. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiksel analiz Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapıldı. Aynı membranlardan değerlendirilen β -tübülin miktarları arasında anlamlı fark bulunamadı (n:8) (* $p < 0,05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında ve ^{##} $p < 0,001$, Sham grubu ile kıyaslandığında).

Asetil-Histon H4 protein düzeyleri, sham grubundaki protein bantlarının ortalama dansitelerinin yüzdesi olarak sunuldu. Asetil-Histon H4 düzeyleri kontrol grubunda %75,52'ye düşerken ($p<0,001$), üridin grubunda %88,35'e yükseldi ($p<0,05$) (Tablo-4, Şekil-8).

Tablo-4: Western Blot Analizi ile Hesaplanan Asetil-Histon H4 Protein Düzeyleri

	Asetil-Histon 4 Protein Düzeyleri \pm SH
Sham	100,00 \pm 4,99
Kontrol	75,52 \pm 3,98 ^{##}
Üridin (500mg/kg)	88,35 \pm 2,38*

(* $p<0,05$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ve ^{##} $p<0,001$, sham grubu ile kıyaslandığında).



Şekil-8: Asetil-Histon H4 Protein Düzeyleri. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiksel analiz Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapıldı. Aynı membranlardan değerlendirilen β -tübülin miktarları arasında anlamlı fark bulunamadı (n:8) (* $p<0,05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında ve ^{##} $p<0,001$, Sham grubu ile kıyaslandığında).

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Hİ beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda üridin'in nöroprotektif etkinliğinde HDAC enzim aktivitesinin olası rolü araştırılmıştır. Sonuçlarımız Hİ beyin hasarında üridin tedavisi ile beyin infarkt hacmindeki anlamlı azalmaya, HDAC aktivitesindeki azalmanın ve aynı zamanda Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 protein düzeylerindeki artışın eşlik ettiğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, literatürde ilk defa üridin'in HDAC aktivitesini inhibe ettiğini işaret etmekte ve üridin tedavisinin Hİ beyin hasarını azaltmadaki muhtemel mekanizmasına ışık tutmaktadır.

Çalışmamızda, 7 günlük sıçanlarda tek taraflı kommon karotid arter ligasyonu ve ardından %8 oksijen ve %92 azot'tan oluşan karışımın solutulduğu modifiye Levine modeli kullanıldı (1). Hİ beyin hasarı ligasyonun gerçekleştirildiği hemisferle sınırlıdır ve başlıca serebral korteks, subkortikal ve periventriküler beyaz cevher, striatum/talamus ile hipokampusta (CA1, CA3, DG) gözlenmektedir. Karşı hemisferde hasarın meydana gelme ihtimali çok düşüktür (1). Yedi günlük yavru sıçanların beyni 32-34 haftalık insan fetüsünün beynine histolojik olarak benzer olduğundan, bu çalışmada kullandığımız modifiye Levine modeli insanlardaki HİE için kabul gören bir modeldir (2,105).

Üridin, KBB'ni geçebilen bir pirimidin nükleozididir (73, 74,106). Kan dolaşımında ve dokularda serbest olarak bulunabildiği gibi, dokularda fosfat bağlı nükleotid formunda da bulunur (73). Dışarıdan verilen üridin'in sinir sisteminde bir takım etkileri olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, bir üridin kaynağı olan UMP'nin oral yolla tek doz olarak verilmesini takiben beyinde fosfolipid sentezinin hız kısıtlayıcı basamağında ortaya çıkan CDP-kolin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (74). Üridin içeren gıdalarla kronik olarak beslenen erişkin deney hayvanlarının beyinde sinaptik oluşumların miktarının arttığı bildirilmiştir (75, 107,108). Benzer şekilde anneleri üridin içeren gıdalarla beslenen yavru sıçanların beyinde de sinaptik oluşumların sayıca arttığı gözlenmiştir (109). Bu bulgular üridin'in normal koşullarda beyin sinaptik yapılanmasını arttırdığını düşündürmekte ve üridin içeren deneysel tedavilerin öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını hangi mekanizmayla arttırıyor olabileceğine ışık tutmaktadır (110,111).

Üridin tedavisinin nörodejeneratif koşullar altındaki etkinliği ise deneysel Parkinson modelinde incelenmiştir. İntrastriatal yolla 6-hidroksidopamin enjeksiyonu kullanılarak oluşturulan deneysel Parkinson modelinde üridin içeren gıdalarla beslenen sıçanların d-amfetamin ile indüklenen rotasyonel davranışında azalma ve striatum'daki dopamin

seviyeleri, tirozin hidroksilaz aktivitesi ve tirozin hidroksilaz protein düzeyleri gibi dopaminerjik parametrelerinde iyileşmeler gözlenmiştir (112). Bu bulgular üridin'in nörodejeneratif koşullarda beyin hasarını iyileştirebileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgulara dayanarak yapılan önceki bir çalışmada üridin tedavisinin yenidoğan sıçanlarda hipoksik-iskemik beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir (4). Bu çalışmada 7 günlük sıçanlara 100, 300 ve 500 mg/kg'lık 3 farklı üridin dozu i.p. yolla 3 gün boyunca uygulanmış ve hem 300 hem de 500 mg/kg dozlarının apoptotik aktiviteyi baskılayarak nöroproteksiyon sağladığı gözlemlenmiştir(4). 500 mg/kg üridin dozunun 300 mg/kg dozuna göre daha etkin bir nöroproteksiyon sağladığı bildirilmesi nedeniyle, tez çalışmamızda da aynı deneysel protokol takip edilerek üridin 500 mg/kg dozunda kullanılmıştır.

Asetilasyon önemli bir post-translasyonel protein modifikasyonudur ve önemli intraselüler yolların düzenlenmesinden sorumludur. Protein asetilasyonu, asetil-koenzim A'dan alınan bir asetil parçasının proteindeki bir lizin kalıntısının ε-amino grubuna transferidir (113). HAT enzimleri proteinlerdeki lizin kalıntılarında asetil grupları eklerken, HDAC' lar ise bu asetil gruplarını uzaklaştırır (114). Hücre asetilasyon dengesi normal koşullar altında HAT ve HDAC enzimleri tarafından sağlanmaktadır. Bu enzimler arasındaki orantısal dengenin normal hücre fonksiyon için gerekli olduğu ve hastalık durumlarında histon asetilasyon seviyelerinin HAT ve HDAC' lerin aktivitelerine bağlı olduğu bildirilmiştir (115).

Normal beyin gelişiminde nöral progenitör hücrelerin nöronlara farklılaşması nörona özgü genlerin üzerindeki baskılanmanın kaldırılması için sinyallerin genom transdüksiyonunu gerektirir. HDAC3, HDAC5 ve HDAC9 hedef genleri aktive ederek nörogenez ve farklılaşmayı indüklerler. HDAC1 ve HDAC2 de bu sürece progenitör transkriptleri susturarak ve nörogenik programı başlatmak suretiyle katılırlar. Akson ve dendritlerin gelişimi de HDAC' lerin fonksiyonuna bağlıdır (62).

Örneğin, farelerin nöronal progenitor hücrelerinde bulunan HDAC1 ve HDAC2 genleri susturulduğunda bu hücreler olgun nöronlara farklılaşmadan hücre ölümüne uğramış ve sonuçta ortaya çıkan yüzeyel kortikal tabakalardaki defekt nedeniyle neonatal fareler doğumdan sonraki 7. günde ölmüşlerdir (116).

Nörodejeneratif koşullarda ise HAT aktivitesinde bir azalma ile birlikte HDAC aktivitesinin arttığı ve aşırı deasetilasyon gerçekleştiği bilinmektedir (53, 117,118). Bu nedenle HDAC inhibitörlerinin nöroprotektif etkinlik gösterebilecekleri öne sürülmüş ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde HDAC inhibisyonu son yıllardaki araştırmaların

odak noktası haline gelmiştir (63, 115, 119,120). Bu konuda yapılan birçok çalışmada HDAC inhibitörlerinin beyin iskemi modellerinde (53,90, 94) nöroproteksiyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir. HDAC inhibitörlerinin ayrıca motor, duyu ve refleks testlerinde nörolojik performansı artırdığı gösterilmiştir (5,90).

Literatürde en yaygın olarak bilinen HDAC inhibitörleri; VPA, SB ve TSA' dır (121). VPA, klinikte bipolar bozuklukların tedavisinde bir duygu-durum düzenleyici olarak ve epilepsi ile ilişkili konvülsif nöbetleri içeren pek çok nörolojik bozuklukların tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır (122). Deneysel çalışmalarla VPA' nın, NMDA' ya bağlı eksitasyonu azalttığı (123), Na⁺ kanalları, Ca⁺² kanalları ve voltaj-kapılı K⁺ kanallarını bloke ettiği gösterilmiştir (124). VPA' nın nöroprotektif etkinliği deneysel nörodejenerasyon modellerinde de incelenmiş (125) ve apoptotik hücre ölümünü azaltarak nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (124).

İskemik beyin hasarı oluşturulan deneysel modellerde ise yine VPA' nın nöroprotektif bir ajan olduğu ortaya konmuştur (126, 127). Örneğin, geçici global iskemi modelinde iskemiden 72 saat sonra uygulanan VPA tedavisi ile Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 düzeylerinde belirgin derecede bir artış olduğu, iskemi/reperfüzyon ile indüklenen nöronal ölümün azaldığı ve ayrıca uzamsal bilişsel performanstaki kayıpların anlamlı derecede iyileştiği bildirilmiştir (88). VPA' nın etkileri Hİ beyin hasarı yapılan 7 günlük yenidoğan sıçanlarda da incelenmiş ve apoptozisi baskılamak suretiyle nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (97).

Bu bilgilerin ışığında, tez çalışmamızda apoptozisi baskılayarak nöroprotektif etkinlik gösterdiği bilinen üridin' in (4) Hİ beyin hasarını azaltmadaki olası etki mekanizması histon asetilasyonu yönünden araştırıldı. Sonuçlarımız, üridin verilen grupta HDAC aktivitesinin baskılandığını ve Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 düzeylerinin arttığını göstermektedir. Çalışmamız literatürde ilk kez üridin' in HDAC enzimini inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Önceki çalışmalarda Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 proteinlerinin özellikle iskemik hasarda rolü olduğu bildirilmiştir (88, 93). Örneğin, geçici global iskemi oluşturulan sıçanlarda VPA çalışmasının (88) yanı sıra, HDAC inhibitörü olarak SB kullanılan bir başka çalışmada serebral iskemi sonrası dentat girus' ta azalan Asetil-Histon H3 seviyelerinin SB tedavisi ile arttığı tespit edilmiştir (93). Bu nedenle tez çalışmamızda Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 proteinlerinin düzeyleri incelenmiş ve üridin tedavisini takiben bu proteinlerin düzeylerinin arttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmamızda Hİ beyin hasarını takiben 3 gün ard arda 500mg/kg i.p. yolla uygulanan üridin tedavisinin nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir. Bulgumuz önceki çalışmada (4) elde edilen verileri doğrular niteliktedir. Bu çalışmada ek olarak HİE sıçan modelinde üridin'in nöroprotektif etkinliğine aracılık eden muhtemel mekanizma araştırılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler üridin tedavisiyle sağlanan nöroproteksiyona HDAC inhibisyonunun aracılık ettiğini ve bunun sonucunda Asetil-Histon H3 ve Asetil-Histon H4 düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımız literatürdeki ilk gözlemlerdir ve üridin'in iskemik hasarı azaltmadaki etki mekanizmasının ortaya çıkarılması için literatüre anlamlı katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

1. VANNUCCI SJ, HAGBERG H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 3149-3154, 2004.
2. VANNUCCI RC, VANUCCI SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci*, 835: 234-249, 1997.
3. EH L, DALKARA T, MOSKOWITZ MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neuroscience*, 4: 399-415, 2003.
4. CANSEV M, MINBAY Z, GOREN B, YAYLAGUL EO, CETINKAYA M, KOKSAL N, ALKAN T. Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurosci Lett*, 542: 65-70, 2013.
5. REN M, LENG Y, JEONG MR, LEEDS PR, AND CHUANG DM. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochemistry*, 89: 1358-136, 2004.
6. MENKES JH, HARVEY B. Sanrat. Perinatal asphyxia and trauma. *Child Neurology*, 401-455,2000.
7. STANLEY F. Survival and cerebral palsy in low birthweight infants: implications for perinatal care. *Pediatric and Perinatal Epidemiology*. 6: 298-310,1992.
8. NELSON KB, LEVITAN A. How much of neonatal encephalopathy is due to birth asphyxia? *Am J Dis Child*,145(11): 1325-31, 1991.
9. GRAHAM EM. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol*, 199(6): 587-95, 2008.
10. DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-397,1999.
11. VANNUCCI RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-Ischemia: Relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res*, 27: 317-326, 1990.
12. CHOI DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1: 623-634, 1988.
13. STEIN DT, VANNUCCI RC. Calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 8:834-842, 1988.
14. BEAL MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. 6;3338- 3344, 1992.
15. LIPTON SA. Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci*,16(12):527-32, 1993.
16. CHAN PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*,21: 2-14, 2001.
17. SIMPSON PB, CHALLISS J, NAHORSKI SR. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *TINS*, 18: 299-306, 1995.
18. JOHNSTON MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol*, 15(3):234-240, 2005.
19. GORDON KE, SIMPSON J, STATMAN D, SILVERSTEIN FS. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis. *Stroke*, 22(7):928-32, 1991.
20. LUCAS DR, NEWHUSE JP: The toxic effect of sodium Lglutamate on the inner layers of the retina. *JAMA Arch Ophthalmol*, 58: 193-201, 1957.

21. OLNEY JW. Excitotoxic Amino Acids and Neuropsychiatric Disorders. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 30: 47-71, 1990.
22. OLNEY JW. Excitatory transmitters and epilepsy-related brain damage. Int Rev Neurobiol, 27: 337-62, 1985.
23. VOLPE JJ. Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection. Ment Retard Dev Disabil Res Rev,7:56-64, 2001.
24. JOHNSTON MV. Developmental aspects of NMDA receptor agonists and antagonists in the central nervous system. Psychopharmacol Bull, 30(4):567–575,1994.
25. MILLER RJ. G-protein linked glutamate receptors. Seminars Neurosci, 6:105-15,1994.
26. JOHNSTON MV, COYLE JT. Development of central neurotransmitter systems. Ciba Found Symp, 86: 251–270, 1981.
27. KAMURO K, TENOKUCHI Y. Familial periventricular nodular heterotopia. Brain Dev, 15(3):237-41,1993.
28. JOHNSTON MV. Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. Brain Dev, 17(5):301–306,1995.
29. SILVERSTEIN FS, NAIK B, SIMPSON J. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: an in vivo microdialysis study. Pediatr Res, 30(6):587-90,1991.
30. FADEN AL, DEMEDINK P, PANTER SS, VINK R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. Sci, 244: 798-800, 1989.
31. GÖRGÜLÜ A, KIRIS T. Eksitator aminoasidler ve Eksitotoksisite. Bölüm 1. Türk Nöroşirürji Dergisi, 15: 33-38, 2005.
32. SCHNEGGENBURGER R, ZHOU Z, KONNERTH A, NEHER E. Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. Neuron, 11: 133-143, 1993.
33. SHENG ZH, RETTIG J, TAKAHASHI M, CATTERALL WA. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. Neuron, 13(6):1303-13, 1994.
34. FORDER JP, TYMIANSKI M. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic proteins, radicals, and oxidant molecules. Neurosci,158(1):293–300,2009.
35. CHAN PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. Brain Pathol, 4: 59–65,1994.
36. CHAN PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke, 27: 1124–1129, 1996.
37. GULDIKEN B, DEMIR M, GULDIKEN S, TURGUT N, BAGUENA M, IBANEZ J, NOGUER M, TURGUT B, TUGRUL A. Oxidative stress and total antioxidant capacity in diabetic and nondiabetic acute ischemic stroke patients. Clin Appl Thromb Hemost, 15(6):695-700, 2009.
38. MURAKAMI K, KONDO T, EPSTEIN CJ, CHAN PH. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. Stroke 28: 1797–1804,1997.
39. CHAN PH, KAWASE M, MURAKAMI K, CHEN SF, LI Y, CALAGUI B, REOLA L, CARLSON E, EPSTEIN CJ. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. J Neurosci, 18: 8292–8299,1998.
40. ALKAN T, GÖREN B, VATANSEVER E, SARANDÖL E. Effects of Hypoxic Preconditioning in Antioxidant Enzyme Activities in Hypoxic- Ischemic Brain Damage Immature Rats. Turkish Neurosurgery, 18(2), 165-171,2008.

41. MACMANUS JP, LINNIK MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab*,17(8): 815-32, 1997.
42. ENGIN K, ÖZYARDIMCI N. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, Avrupa Tıp Kitapçılık, Bursa, sayfa 1-15, 2001.
43. ADAMS JM. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Cory S. Science*, 281(5381):1322-6. 1998.
44. FATEMI A, WILSON MA, JOHNSTON MV. Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Term Infant. *Clin Perinatol*, 36(4): 835, 2009.
45. FADEN AI, LEMKE M, SIMON RP. N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J Neurotrauma*, 5: 33-45, 1988.
46. FADEN AI, SIMON RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23: 623-626, 1988.
47. FADEN AI, ELLISON JA, NOBLE LJ. Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spinal cord injury. *Eur J Pharmacol*, 175:165-174, 1990.
48. RYU H, LEE J, OLOFSSON BA. Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an sp1-dependent pathway. *Proc. Natl Acad Sci*, 100: 4281–4286, 2003.
49. CHEN J, NAGAYAMA T, JIN K, STETLER RA, ZHU RL, GRAHAM SH, SIMON RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Journal of Neurosci*, 4914-4928, 1998.
50. NORTHINGTON FJ, FERRIERO DM, MARTIN LJ. Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxia-ischemia is programmed cell death. *Dev Neurosci*, 23(3):186-91, 2001.
51. ABAS F, ALKAN T, GOREN B, TASKAPILIOGLU O, SARANDOL E, TOLUNAY S. Neuroprotective effects of postconditioning on lipid peroxidation and apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Turk Neurosurg*. 20(1):1-8, 2010.
52. FINK K, ZHU J, NAMURA S, SHIMIZU-SASAMATA M, ENDRES M, MA J, DALKARA T, YUAN J, MOSKOWITZ MA. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(10):1071-6, 1998.
53. FARACO G. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol. Pharmacol*, 70: 1876–1884, 2006.
54. SADRI-VAKILI G, CHA JH. Histone deacetylase inhibitors: a novel therapeutic approach to Huntington's disease (complex mechanism of neuronal death). *Curr Alzheimer Res*, 3(4):403-8. 2006.
55. KAZANTSEV AG, THOMPSON LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 7(10):854-868, 2008.
56. KIEFER JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn*, 236: 1144-56, 2007.
57. BROIDE RS, REDWINE JF, AFTAHI N. Distribution of Histone deacetylases 1–11 in the rat brain, *J Mol Neurosci*, 31(1): 47–58, 2007.
58. CUNLIFFE VT. Histone deacetylase 1 is required to repress Notch target gene expression during zebrafish neurogenesis and to maintain the production of motoneurons in response to hedgehog signalling. *Development*, 131: 2983–2995, 2004.

59. ROMM E, NIELSEN JA, KIM JG, HUDSON LD. Myt1 family recruits histone deacetylase to regulate neural transcription. *J. Neurochem*, 93: 1444–1453, 2005.
60. BATES EA, VICTOR M, JONES AK, SHI Y, HART AC. Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to huntingtin polyglutamine toxicity. *J. Neurosci*, 26: 2830–2838, 2006.
61. DE RUIJTER AJ, VAN GENNIP AH, CARON HN, KEMP S, VAN KUILENBURG AB. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370: 737–74, 2003.
62. CHO Y, CAVALLI V. HDAC signaling in neuronal development and axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiol*, 27: 118–126, 2014.
63. BOLGER TA, YAO TP. Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death. *J. Neurosci*, 25: 9544 – 9553, 2005.
64. HOSHINO M, TAGAWA K, OKUDA T. Histone deacetylase activity is retained in primary neurons expressing mutant huntingtin protein. *J. Neurochem*, 87: 257–267, 2003.
65. LINSEMAN DA, BARTLEY CM, LE SS, LAESSIG TA, BOUCHARD RJ, MEINTZER MK, LI M, HEIDENREICH KA. Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J. Biol. Chem*, 278: 41472–41481, 2003.
66. SUGO N, OSHIRO H, TAKEMURA M, KOBAYASHI T, KOHNO Y, UESAKA N, SONG WJ, YAMAMOTO N. Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. *Eur J Neurosci*, 31: 1521- 1532, 2010.
67. WITTE H, NEUKIRCHEN D, BRADKE F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol*, 180:619- 632, 2008.
68. RIVIECCIO MA, BROCHIER C, WILLIS DE, WALKER BA, D'ANNIBALE MA, MCLAUGHLIN K, SIDDIQ A, KOZIKOWSKI AP, JAFFREY SR, TWISS JL. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci*, 2009.
69. FISCHER DD, CAI R, BHATIA U, ASSELBERGS FA, SONG C, TERRY R, TROGANI N, WIDMER R, ATADJA P, COHEN D. Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem*, 277: 6656 – 6666, 2002.
70. BARNES LA. Paul Gyorgy, 1893-1976. *J Pediatr*, 127(5):840-1, 1995.
71. AEBI M, HENNET T. Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol*, 11(3):136-41, 2001.
72. KENNEDY EP, WEISS SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, 222(1):193-214, 1956.
73. CANSEV M. Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Res. Rev*, 52: 389–97, 2006.
74. CANSEV M, WATKINS CJ, VAN DER BEEK EM, WURTMAN RJ. Oral Uridine 5-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils. *Brain Res*, 1058: 101–108, 2005.
75. WURTMAN RJ, ULUS IH, CANSEV M, WATKINS CJ, WANG L, MARZLOFF G. Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Res*, 1088: 83-92, 2006.

76. HAUGAARD ES, FRANTZ KB, HAUGAARD N. Effect of uridine on cellular UTP and glycogen synthesis in skeletal muscle: stimulation of UTP formation by insulin. *Proc Natl Acad Sci*, 74(6):2339-42, 1977.
77. HIGUITA JC, THELESTAM M, KATZ A. Glucose starvation results in UDP-glucose deficiency and inactivation of glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys*. 425(2):242-8, 2004.
78. BOURGET PA, TREMBLAY GC. Pyrimidine biosynthesis in rat brain. *J Neurochem*,19(7):1617-24,1972.
79. GEIGER A, YAMASAKI S. Cytidine and uridine requirement of the brain. *J Neurochem*, 1(2):93-100, 1956.
80. BENZI G, VILLA RF, DOSSENA M, VERCESI L, GORINI A, PASTORIS O. Role of drugs in recovery of metabolic function of rat brain following severe hypoglycemia. *Neurochem Res*, 9(7):979-92, 1984.
81. PETERS GJ, SHARMA SL, LAURENSSE E, PINEDO HM. Inhibition of pyrimidine de novo synthesis by DUP-785. *Invest New Drugs*, 5(3):235-44, 1987.
82. GRAY JH, OWEN RP, GIACOMINI KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*, 447:728-734, 2004.
83. BALDWIN SA, BEAL PR, YAO SY, KING AE, CASS CE, YOUNG JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, 447(5):735-43, 2004.
84. WURTMAN RJ, REGAN M, VLUS I, YU L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem Pharmacol*, 60: 989-992, 2000.
85. HARRISON IF, DEXTER DT. Epigenetic targeting of histone deacetylase: Therapeutic potential in Parkinson's disease? *Pharmacology & Therapeutics*, 140:34–52, 2013.
86. MORRISON BE, MAJDZADEH N, MELLO SRD. Histone deacetylases: Focus on the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci*, 64: 2258–2269, 2007.
87. DOKMANOVIC M, CLARKE C AND MARKS PA. Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Mol Cancer Res*, 5: 981-989, 2007.
88. XUAN A, LONG D, LI J, JI W, HONG L, ZHANG M, ZHANG W. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats. *Life Sciences*, 90:463-468, 2011.
89. DASH PK, ORSI SA, ZHANG M, GRILL RJ, PAT S, ZHAO J, MOORE AN. Valproate Administered after Traumatic Brain Injury Provides Neuroprotection and Improves Cognitive Function in Rats. *PLoS ONE*, 5(6): 2010.
90. KIM HJ, ROWE M, REN M, HONG JS, CHEN PS, CHUANG D-M. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Thera*, 321: 892–901, 2007.
91. YILDIRIM F. Inhibition of histone deacetylation protects wild type but not gelsolin deficient mice from ischemic brain injury. *Exp. Neurol*, 210: 531–42, 2008.
92. YILDIRIM F, JI S, KRONENBERG G, BARCO A, OLIVARES R, BENITO E, DIRNAGL U, GERTZ K, ENDRES M, HARMS C, MEISEL A. Histone Acetylation and CREB Binding Protein Are Required for Neuronal Resistance against Ischemic Injury. *PLoS One*, 18;9(4), 2014.
93. KIM HJ, LEEDS P, ANDCHUANG DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J. Neurochem*, 110:1226–1240, 2009.

94. LANGLEY B, D'ANNIBALE MA, SUH K, AYOUB I, TOLHURST A, BASTAN B, YANG L, KO B, FISHER M, CHO S, BEAL MF, RATAN RR. Pulse inhibition of histone deacetylases induces complete resistance to oxidative death in cortical neurons without toxicity and reveals a role for cytoplasmic p21(waf1/ cip1) in cell cycle-independent neuroprotection. *J Neurosci*, 28: 163–176, 2008.
95. GOTTLICHER, M. Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann. Hematol*, 83: 91–92, 2004.
96. CÁRDENAS-RODRÍGUEZ N, COBALLASE-URRUTÍA E, RÍVERA-ESPÍNOSA L, ROMERO-TOLEDO A, SAMPIERÍ A, ORTEGA-CUELLAR D, MONTESÍNOS-CORREA H, FLORIANO-SÁNCHEZ E, CARMONA-APARÍCIO L. Modulation of Antioxidant Enzymatic Activities by Certain Antiepileptic Drugs (Valproic Acid, Oxcarbazepine, and Topiramate): Evidence in Humans and Experimental Models. *Oxid Med Cell Longev*, 2013.
97. KABAKUS N, AY I, AYSUN S, SOYLEMEZOGLU F, OZCAN A, CELASUN B. Protective Effects of Valproic Acid Against Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *J Child Neurol*, 20: 582- 587, 2005.
98. BALTAN S, MURPHY SP, DANILOV CA, BACHLEDA A, MORRISON RS. Histone deacetylase inhibitors preserve white matter structure and function during ischemia by conserving ATP and reducing excitotoxicity. *J Neurosci*, 31: 3990–3999, 2011.
99. XU Q, XU RX, ZHANG SZ, ZHANG WM. Protective effect of exogenous superoxide dismutase against rat midbrain dopaminergic neuron apoptosis induced by 6-hydroxydopamine. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 23(11):1156-60, 2003.
100. CHEN G, ZENG WZ, YUAN PX, HUANG LD, JIANG YM, ZHAO ZH, MANJÍ HK. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem*, 72(2):879-82,1999.
101. SAHA RN, PAHAN K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ*, 13(4): 539-550, 2006.
102. SINN DI, KIM SJ, CHU K, JUNG KH, LEE ST, SONG EC. Valproic acid-mediated neuroprotection in intracerebral hemorrhage via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation. *Neurobiol Dis*, 26: 464–72, 2007.
103. TAI YT, LEE WY, LEE FP, LIN TJ, SHIH CL, WANG JY, CHIU WT, HUNG KS. Low Dose of Valproate Improves Motor Function after Traumatic Brain Injury. *BioMed Research International*, 1-8, 2014.
104. SCHWARTZ PH, MASSARWEH WF, VINTERS HV, WASTERLAIN CG. A rat model of severe neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*, 23(4):539-546, 1992.
105. TANIGUCHI H, ANDREASSON K. The Hypoxic Ischemic Encephalopathy Model of Perinatal Ischemia. *J. Vis. Exp*, 21: 2008.
106. CANSEV M. Involvement of uridine-nucleotide-stimulated P2Y receptors in neuronal growth and function. *Cent. Nerv. Sys. Agents Med. Chem*, 7: 223–229, 2007.
107. CANSEV M, ULUS IH, SAKAMOTO T, WURTMAN RJ. Use of phosphatide precursors to promote synaptogenesis. *Annu. Rev. Nutr*, 29: 59-87, 2009.
108. SAKAMOTO T, CANSEV M, WURTMAN RJ. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res*, 1182: 50-59, 2007

109. CANSEV M, MARZLOFF G, SAKAMOTO T, ULUS IH, WURTMAN RJ. Giving uridine and/or docosahexaenoic acid orally to rat dams during gestation and nursing increases synaptic elements in brains of weanling pups. *Dev Neurosci*, 31(3):181-92, 2009.
110. HOLGUIN S, MARTINEZ J, CHOW C, WURTMAN R. Dietary uridine enhances the improvement in learning and memory produced by administering DHA to gerbils. *FASEB J*, 22(11):3938-46, 2008.
111. HOLGUIN S, HUANG Y, LIU J, WURTMAN R. Chronic administration of DHA and UMP improves the impaired memory of environmentally impoverished rats. *Behav Brain Res*, 191(1):11-6, 2008.
112. CANSEV M, ULUS IH, WANG L, MAHER TJ, WURTMAN RJ. Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Res*, 62: 206-209, 2008.
113. GIBSON CL, MURPHY SP. Benefits of histone deacetylase inhibitors for acute brain injury: a systematic review of animal studies. *J. Neurochem*, 115: 806-813, 2010.
114. WADE PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet*, 10: 693–698, 2001.
115. SHEIN NA, SHOHAMI E. Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents for Acute Central Nervous System Injuries. *Mol Med*, 17(5-6): 448-456, 2011.
116. MONTGOMERY RL, HSIEH J, BARBOSA AC, RICHARDSON JA, OLSON EN: Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci*, 106:7876-7881, 2009.
117. BARDAI FH, D'MELLO SR. Selective toxicity by HDAC3 in neurons: regulation by Akt and GSK3 β , *Journal of Neuroscience*, 31 (5): 1746–1751, 2011.
118. ROUAUX C, JOKIC N, MBEBI C, BOUTILLIER S, LOEFFLER JP, BOUTILLIER AL. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J*, 22: 6537–49, 2003.
119. DURHAM B. Novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors with improved selectivity for HDAC2 and 3 protect against neural cell death. *Bioscience Horizons*, 5: 2012.
120. CHEN YT, ZANG XF, PAN J, ZHU XL, CHEN F, CHEN ZB, XU Y. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39: 751–758, 2012.
121. LECCA D, CERUTI S. Uracil nucleotides: from metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation. *Biochem. Pharmacol*, 75: 1869–81, 2008.
122. MCELROY SL, KECK PE JR, POPE HG JR, HUDSON JI. Valproate in psychiatric disorders: literature review and clinical guidelines. *J Clin Psychiatry*, 50: 23–29, 1989.
123. ZEISE ML, KASPAROW S, ZIEGLGANSBERGER W. Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. *Brain Res*, 544:345–348, 1991.
124. KANAI H, SAWA A, CHEN RW, LEEDS P, CHUANG DM. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogen J*, 4(5):336–44, 2004.

125. CHUANG DM, LENG Y, MARINOVA Z, KIM HJ, CHIU CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*, 32(11):591–601, 2009.
126. FESSLER EB, CHIBANE FL, WANG Z, CHUANG DM. Potential roles of HDAC inhibitors in mitigating ischemia-induced brain damage and facilitating endogenous regeneration and recovery. *Curr Pharm Des*, 19(28): 5105-20, 2013.
127. LIU XS, CHOPP M, KASSIS H, JIA LF, HOZESKA-SOLGOT A, ZHANG RL. Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke. *Neurosci*, 220:313–321, 2012.

7.TEŞEKKÜR

Sayın Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK hocama ve bu tez konusunu bana öneren, her açıdan yol gösteren ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Tülin ALKAN'a, enzim aktivitesi analizlerinin gerçekleştirilmesini ve değerlendirilmesini sağlayan, ayrıca tez süresince yardımcı olan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Mehmet Cansev'e, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin tüm çalışanlarına ve hayatımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

8.ÖZGEÇMİŞ

15 Kasım 1987 tarihinde Konya’da doğdum. Fatih Sultan Mehmet İlköğretim okulunda ilk ve orta öğrenimimi tamamladım. Konya Lise’sinde lise öğrenimimi tamamladıktan sonra 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandım. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans yaparken, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atanıp yatay geçiş yaptım.