

## Fötal Nöral Greftlerin Korpus Striatum İnnervasyonlarının Farmakolojik Yönden İncelenmesi

Muammer DOYGUN\*  
Ender KORFALI\*\*  
Mehmet ULUÇAY\*\*\*  
Vahide SAVCI\*\*\*\*  
İ. Hakkı ULUS\*\*\*\*\*

### ÖZET

*İntraparenkimal veya intraventriküler 6-OHDA verilerek tek veya çift taraflı SN harabiyeti yapılan erişkin sıçanlara 15-16 günlük fetuslardan alınan ventral mezensefalon greftleri konularak, denerve edilmiş KS da greftlerin reinnervasyon üzerindeki etkileri incelendi. İmplantasyondan 3 ay sonra KS'larda yapılan TOH aktivitesi ölçümlerinde; tek taraflı SN destruksiyonu yapılan sıçanlarda aynı tarafta, bilateral destruksiyon yapılan grupta ise her iki KS'da enzim düzeylerinde % 84 oranında düşüş gözlemlendi (p < 0.005). Greftlemeden sonra tek taraflı destruksiyon yapılan sıçanlarda aynı taraf KS'da TOH aktivitesi artarken (p < 0.001), karşı ta-*

- 
- \* Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı.  
\*\* Prof. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı.  
\*\*\* Araş. Gör.; U.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı.  
\*\*\*\* Araş. Gör.; U.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı.  
\*\*\*\*\* Prof. Dr.; U.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı.

raf KS'da artış olmadı. Enzim düzeyindeki artış, ilaçla uyarılmış dönme testleriyle de teyid edildi. Bilateral SN destrüksiyonu yapılan grupta ise tek taraflı konan greftin sağ ve sol KS'un TOH aktivitesini normal değerlerin % 43'üne yükselttiği saptandı ( $p < 0.01$ ). Sonuç olarak iki taraflı Parkinson Hastalığı belirtileri olan hastalarda tek taraflı greftin konulmasının yeterli olabileceği kanısına varıldı.

## SUMMARY

### Pharmacologic Evaluation of Innervations of Corpus Striatum in Fetal Neural Grafts

The effect of 15-16 day old fetal ventral mesencephalic neural grafts on the reinnervation of CS were studied after denervation of SN after intra-parenchymal and intra-ventricular administration of 6-OH-DA. 3 months after grafting there was 168 % ( $p < 0.001$ ) and 126 % ( $p < 0.001$ ) increase in TOH activity in unilateral and bilateral lesioned group respectively compared to sham group. Also the improvement of TOH activity were supported with normalization of drug-induced turning movements. These results concludes that unilateral grafting in bilateral affected Parkinson's diseased patients might be enough for bilateral improvement.

## GİRİŞ

Substansiya Nigra (SN) aynı taraf Korpus Striatumun (KS) dopaminerjik projeksiyonunu nigrostriatal yolla sağlar<sup>1</sup>. SN'nin bilateral veya unilateral dejenerasyonu Parkinson Hastalığının (PH) ortaya çıkmasına neden olur<sup>2,3,4,5,6,7</sup>.

Çalışmamızda unilateral ve bilateral SN destrüksiyonu yapılan sıçanlarda dopaminerjik greftlerin etkileri araştırıldı.

DeneySEL çalışmalarda ve greft konulan Parkinsonlu hastalarda greftlemeden sonra iyileşmenin iki taraflı olması klinik uygulamalardaki önemliliği yönünden bu konunun araştırılması gereğini ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda SN harabiyeti yapılan sıçanlarda Korpus Striatuma (KS) konulan fetal greftlerin etkileri araştırıldı.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 68 adet Wistar cinsi deney başlangıç ağırlıkları 180-220 g olan dişi sıçanlar kullanıldı. Greft olarak aynı cins ve yaştaki sıçanların 15-16 günlük fötusları kullanıldı.



Deney başlangıcında 18 sıçan normal grubu oluşturmak için ayrıldı. Kalan 50 sıçan iki gruba ayrılarak birinci grubun (n: 22) sağ SN'sına steriotoksik olarak 6-OHDA verildikten bir hafta sonra amfetamin (1.5 mg/kg-İP) verilerek dönme testleri yapıldı. Amfetamin enjeksiyonundan 30 dakika sonra destrüksiyon yapılan sıçanlarda dakikada 10-12 defa lezyon tarafına doğru dönüş gözlemlendi. Dönme testinde lezyon pozitif sonuç veren sıçanlar iki gruba ayrıldı. Dönme testi negatif olan 6 sıçan ise deney dışı bırakıldı.

**1. Sham Grubu:** Sağ SN steriotoksik olarak 6-OHDA ile destrükte edildi ve 10 gün sonra sağ KS'a kavite açıldı (n: 8).

**2. Graft Grubu:** Sağ SN'ya kimyasal harabiyet yapıldıktan sonra sağ KS'a kavite açıldı ve 15-16 günlük fötusların ventral mezensefalonundan alınan 2-3 mm<sup>3</sup>lük doku parçası implante edildi (n: 8).

İkinci grupta (22) ise sağ lateral ventrikül içine 25 µl içinde 250 µg 6-OHDA ihtiva edecek şekilde 6-OHDA enjekte edildi ve bilateral destrüksiyon yapıldı.

Bu gruptaki sıçanlar ikiye ayrıldı.

**1. Sham Grup:** İntraventricüler enjeksiyon yapıldıktan 15 gün sonra sağ KS üzerine kavite açıldı. Başka hiçbir işlem yapılmadı (n: 10).

**2. Graft Grubu:** 6-OHDA enjeksiyonundan 15 gün sonra sağ KS üzerine kavite açıldı ve kavitasyondan 10 gün sonra kavite içine fetal mezensefalon implante edildi (n: 12).

Bütün cerrahi girişimler steril şartlarda, mikroskop altında ve tiopental anestezisi (35 mg/kg) ile yapıldı. SN destrüksiyonu König ve Klippel'in Steriotaksik atlasına göre (Bregmadan 4.2 mm posterior, 1.1 mm lateral, duradan 7.5 mm derine) 8 mikrogram 6-OHDA (Sigma Chemical Company) 0.2 mg/ml askorbik asit içeren 0.4 µl tuzlu su içinde 0.3 mm'lik Hamilton enjektörü ile 4 dakika içinde verilerek yapıldı<sup>8</sup>. İntraventricüler 6-OHDA enjeksiyonu yine aynı yazarların önerdiği şekilde Bregmadan 0.5-1 mm posterior ve 1.5-1.6 mm lateralde 1.5 mm derine yapıldı. Graft yerinin hazırlanmasında Björklund ve Stenevi'nin teknikleri kullanıldı<sup>9</sup>. Sağ koronel sütürün 1 mm ön, sagittal sütürün 1 mm lateraline 2-3 mm çapında kraniyektomi yapılarak kortikal dokular aspire edildi ve KS görünür hale getirildi.

Donör olarak kullanılacak fötusların hazırlanmasında Das ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı<sup>10</sup>. Graftlerin alınması ve yerine konması yine aynı yazarların tekniğine uygun olarak yapıldı. Graftleme kavite açıldıktan 10 gün sonra gerçekleştirildi. Graftler 15-16 günlük gebe sıçanların fötuslarının (Crown-rump length 14-15 mm) mezensefalonlarından alınarak hazırlandı<sup>11</sup>.

Greftlemeden 3 ay sonra tek taraflı SN destrüksiyonu yapılan sıçanlarda Amfetamin verilerek (1.5 mg/kg-İP) dönme testleri tekrarlandı. Sham grupta dönme testleri tüm sıçanlarda pozitif sonuç verirken, greft grubunda negatif sonuç verdi.

Tüm gruplardaki sıçanlar dönme testleri yapıldıktan bir hafta sonra dekapite edilerek buzlu cam üzerinde KS'ları hızlı disseksiyonla çıkarıldı. Tirozin Hidroksilaz Aktivitesi (TOH) ölçülene kadar  $-21^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. TOH aktivitesi ölçümü Waymire ve arkadaşlarının tanımladıkları yöntemle yapıldı<sup>12</sup>. Sonuçlar saatte mg protein başına oluşan radyoaktif karbonhidroksit ( $^{14}\text{CO}_2$ ) olarak hesaplandı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi haline getirilerek değerlendirildi.

## BULGULAR

SN'ya 6-OHDA enjeksiyonundan bir hafta sonra Amfetamin verilerek (1.5 mg/kg, İP) yapılan dönme testlerinde tüm sıçanlarda dakikada 10-12 defa lezyon tarafına (sağa) doğru döndüğü görüldü. Dekapitasyondan bir hafta önce sıçanlar tekrar dönme testlerine tabi tutuldular. Sham operasyon grubunda aynı şekilde lezyon tarafına doğru dakikada 10-12 defa dönme gözlenirken, normal ve greft gruplarında dönme gözlenmedi.

Greftlemeden 3 ay sonra yapılan dekapitasyonda Sham operasyon gruplarında KS'da boş kavite gözlenirken, greft gruplarında kavite içinde KS ile iştirakli greft dokusu saptandı.

Tek taraflı SN destrüksiyonu yapılan gruplarda KS'da yapılan TOH aktivitesi ölçümlerinde (Tablo: I) Sham Grupta normal sıçan grubuna göre sağ

**Tablo: I - Grupların Sağ ve Sol Korpus Striatumlarındaki TOH Değerleri Bulgular Ortalama  $\pm$  Ortalama Standart Hata Olarak Belirtilmiştir**

TEK TARAFLI DES.	Gruplar	n	TOH AKTİVİTESİ (%)	
			Sağ KS	Sol KS
TEK TARAFLI DES.	Normal Grup	6	100 $\pm$ 5.4	100 $\pm$ 5.1
	Sham Grup	5	16 $\pm$ 8.1*	100 $\pm$ 12
	Greft Grubu	5	43 $\pm$ 5.4**	100 $\pm$ 2.6
BİLATERAL DES.	Normal Grup	8	100 $\pm$ 6.3	100 $\pm$ 8.0
	Lezyon Grubu	10	19 $\pm$ 3.8*	20 $\pm$ 4.1
	Greft Grubu	12	43 $\pm$ 6.3**	51 $\pm$ 8.5**

\*  $p < 0.005$  Sham grup normal grupla karşılaştırıldığında

\*\*  $p < 0.001$  Greft grubu sham grupla karşılaştırıldığında



KS'da % 84'lük bir düşme saptandı. Greft grubunda ise lezyon grubunda saptanan değerlerden % 168'lik bir artış ( $p < 0.001$ ) saptandı. Sol KS TOH değerlerinde tüm gruplarda anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

Bilateral destrüksiyon yapılan gruplarda (Tablo: I) KS'da yapılan TOH aktivitesi ölçümlerinde normal gruba göre sham grupta bilateral olarak ortalama % 80 oranında bir düşüş saptandı. Greft grubunda ise sağ ve sol KS'da TOH aktivitesinde % 126'lık bir artışla normal değerlerin % 43'üne kadar yükseldi ( $p < 0.001$ ).

İstatistiki değerlendirmelerde student "t" testi kullanıldı.

## TARTIŞMA

İntraventricüler veya parankimal nörotoksik maddelerle KS'da unilateral veya bilateral harabiyet yaparak dopaminerjik sistemde önemli bir enzim olan TOH aktivitesinde azalma olduğu değişik deneylerle gösterilmiştir<sup>4,5,13,14</sup>. SN'da elektriksel olarak yapılan harabiyet sonrası KS'da dopamin çıkışında azalma olduğu da gösterilmiştir<sup>15</sup>.

6-OHDA SN ya tek taraflı olarak verildiğinde sistem tek taraflı destrüksiyona uğratılabilmekte ve hemiparkinson modeli de oluşturulabilmektedir<sup>16</sup>.

Çalışmamızda, tek taraflı SN destrüksiyonu yapılarak aynı taraf korpus striatumda TOH aktivitesi % 86 oranında destrüksiyona uğratılırken karşı tarafın normal kontrol düzeyinde kaldığı gözlemlendi. Aynı bulgular daha önce yapılan çalışmalarda da saptanmış ve SN'nın aynı taraf KS'un dopaminerjik innervasyonunu sağladığı gösterilmiştir<sup>2,4</sup>. Greftlemeden 3 ay sonra ise sağ tarafta TOH aktivitesinde Sham gruba göre % 168'lik bir artış saptandı. Bu artış klinik olarak dönme testlerinde düzelme ile de gösterildi.

Bilateral dopaminerjik sistem destrüksiyonu yapılan sıçanlarda her iki KS'da TOH aktivitesi % 81 oranında düşürülmüş ve KS'a tek taraflı fötal septal mezensefalon implantasyonları ile bilateral olarak reinnervasyon sağlanmıştır. Bu durum diğer greft çalışmalarında da gözlenmiş ve reinnervasyonun greftli tarafta yapılan dopaminin, diffüzyonla karşı taraf KS'u etkilemesine veya destrüksiyondan sonra dopaminerjik sistemde kalan nöronların Nerve Growth Factor gibi faktörlerin etkisiyle hiperaktivite göstermelerine bağlanmıştır<sup>17</sup>.

Dopaminerjik sistemdeki destrüksiyon bilateral olduğunda tek taraflı konan greft bilateral etki gösterirken, tek taraflı destrüksiyonda aynı tarafa etki etmektedir. Parkinson hastalığı nedeni ile kaudat nukleusa greft implantasyonu yapılan hastalarda da iyileşme bilateral olmaktadır<sup>18</sup>. Sonuç olarak tek taraflı SN destrüksiyonu yapılarak hemiparkinson modeli oluşturulan sıçanlarda fötal do-

paminerjik greftlerin etkileri tek taraflı olurken, bilateral destrüksiyonda etki çift taraflı olmaktadır. Bu sonuç Parkinson Hastalığında tek taraflı greftlemenin yeterli olabileceğini göstermektedir.

Fötal transplantlarla ilgili klinik çalışmaların başlaması nörolojik hastalıkların tedavisinde önemli bir yaklaşım yolu açmıştır. Şu andaki çalışmalar gelişen insan nöral transplantasyonunu daha yaygın hale getirmeye yöneliktir. Bu çalışmalar aynı zamanda beyin transplantasyonundan sonra nöral fonksiyonun restorasyonundan sorumlu mekanizmayı da açıklamaya yardımcı olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. HORNYKIEWICZ, O.: Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmac. Rev.*, 18: 925-964, 1966.
2. UNGERSTEDT, U.: Histochemical studies on the effect of intracerebral and intraventricular injections of 6-hydroxydopamine neurons in the rat brain, In: 6-hydroxydopamine and Catecolamine Neurons, Eds.: Malmfors, T., H., North-Holland Publishing Co. Amsterdam-London, 1971, pp. 101, 127.
3. BREESE, G.R.: Chemical and immunochemical lesions by spesific neurotoxic substances and antisera, In: Handbook of Psycopharmacology, Vol. 1, Eds.: Iversen, L.L., Iversen, S.D., Snyder, H., S., Plenum Press, New York-London, 1975, pp. 137-189.
4. IVERSEN, L.L., URETSKY, N.J.: Regional effects of 6-hydroxydopamine on catecolamine containing neurons in rat brain and spinal cord, *Brain Res.*, 24: 364-367, 1970.
5. BREESE, G.R., TRAYLOR, T.D.: Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine, *Br. J. Pharmacol.*, 42: 88-89, 1971.
6. URETSKY, N.J., IVERSEN, L.L.: Effects of 6-hydroxydopamine on catecolamine containing neurons in the rat brain, *J. Neurochem.*, 17: 269-278, 1970.
7. UNGERSTEDT, U.: 6- hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: The Tuning Syndrome. *Pharmac. Ther. B.* 2: 37-40, 1976.
8. KÖNIG, J.F.R., KLIPPEL, R.A.: The Rat Brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and the lower parts of the brainstem, Williams and Wilkins, Baltimore, 1963.
9. BJÖRKLUND, A., STENEVI, U.: Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants, *Brain. Res.*, 177: 555-560, 1979.



10. DAS, G.D., HALLAS, B.H.: Transplantation of brain tissue in the brain of adult rats. *Experientia*, 34: 1304-1306, 1978.
11. DAS, G.D., HALLAS, B.H., DAS, K.G.: Transplantation of neural tissues in the brains of laboratory mammals: Technical details and comments, *Experientia*, 35: 143-153, 1979.
12. WAYMIRE, J.C., BJUR, R., WEINER, N.: Assay of tyrosine hydroxylase by coupled decarboxylation of DOPA formed from 1-14 C-L-Tyrosine *Anal. Biochem.*, 43: 588-600, 1971.
13. KORFALI, E.: Sıçanlarda Denerve Edilmiş Korus Stiriatumun Fötal Dopaminergic Nöron Greftleriyle Reinnervasyonu, Bursa Üniv. Tıp Fak., Doçentlik Tezi, 1981.
14. SUNDSTROM, E., LUTHMAN, J., GOLDSTEIN, M.: Time course of MPTP-Induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system in C57 BL/6 mice. *Brain. Res. Bull.* 21(2): 257-263, 1988.
15. FAULL, R.L.M., LAVERTY, R.: Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Experimental Neurology* 23: 332-340, 1969.
16. FREED, W., PERLOW, M.J., KAROUM, F., SEIGER, A., OLSON, L., HOFFER, B.J., WYATT, R.J.: Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: Long-term behavioral, biochemical and histochemical studies, *Ann. Neurol.* 8: 510-519, 1980.
17. MADRAZO, I., DRUCKER-COLIN, R., DIAZ, V., MARTINEZ-MATA, J., TORRES, C., BECERRIL, J.J.: Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's Disease, *N. Eng. J. Med.* 316: 831-834, 1987.
18. KORFALI, E., DOYGUN, M., BEKAR, A., ULUÇAY, M., OĞUL, E.: Parkinson Hastalığında Fötal Ventral Mezensefalon İmplantasyonu, Uludağ Üniv. Tıp Fak. Dergisine yayın için kabul edildi. 1991.

Yard. Doç. Dr. Muammer DOYGUN

U.Ü. Tıp Fakültesi

Nöroşirürji Anabilim Dalı

BURSA