T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

KUPRİZON İLE OLUŞTURULMUŞ DEMİYELİNİZASYON MODELİNDE GABA-B AGONİSTİ BAKLOFENİN ETKİLERİ

Dr. ENES KARABULUT

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2013

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

KUPRİZON İLE OLUŞTURULMUŞ DEMİYELİNİZASYON MODELİNDE GABA-B AGONİSTİ BAKLOFENİN ETKİLERİ

Dr. ENES KARABULUT

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ZELİHA YAZICI

İSTANBUL 2013

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın tüm aşamalarında ve farmakoloji eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Zeliha Yazıcı'ya,

Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Gökhan Akkan, Prof. Dr. Cihat Küçükhüseyin, Prof. Dr. Aydın Barlas, Prof. Dr. Dündar Okan Yıllar ve Doç. Dr. Sibel Özyazgan'a,

Tezimin bilimsel ve laboratuar çalışmaları süresince bilgi ve birikimiyle her zaman yanımda olan Prof. Dr. Öner Süzer ve tezimin ağır yükünü benimle paylaşan değerli çalışma arkadaşım Dr. Ali Boray Başcı'ya,

Açık alan testinin hazırlanmasında ve kayıtların değerlendirilmesinde destek olan değerli çalışma arkadaşım Uzm. Ecz. Oruc Allahverdiyev'e,

Histolojik incelemelerde desteklerini esirgemeyen Histoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Faruk Alkan, Dr. Gamze Tanrıverdi, Erengül Tokay ve Mediha Özeren'e,

İstatistiksel analizlerin yapılmasında destek olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ethem Erginöz'e,

Birlikte çalışma fırsatını bulduğum Dr. Kerim Karaoğlu, Uzm. Ecz. Hande Erdal ve diğer çalışma arkadaşlarım ile başta Necmi Türker olmak üzere tüm Farmakoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23681

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
TABLOLAR iii
ŞEKİLLER iv
RESİMLER v
KISALTMALAR vi
ÖZET 1
ABSTRACT 2
1. GİRİŞ 3
2. GENEL BİLGİLER 6
2.1. Multipl Skleroz'un Histopatolojisi 6
2.2. Deneysel MS Modelleri 11
2.2.1. Kuprizon Modeli 12
2.3. MS Kliniği ve Tedavisi 20
2.3.1. Baklofenin Klinik Özellikleri 21
2.4. GABAerjik İleti ve GABA-B Reseptörü 23
2.4.1. GABA Nörotransmitteri 23
2.4.2. GABA-B Reseptörü 23
2.4.3. Nöronal Hasar Modeli Olarak İskemide GABAerjik İleti 24
2.4.4. Nöroimmün Hasar Modeli Olarak MS'da GABAerjik İleti 25
2.5. Glial Hücrelerde GABA-B Reseptörü 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
4. BULGULAR 39
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇ 72
7. KAYNAKLAR 73
ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ 93

TABLOLAR

Tablo 1. Kuprizonun vücut ağırlığı üzerine etkisi 40

Tablo 2. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin vücut ağırlığı, lokomotor aktivite ve anksiyete üzerine etkisi 43

Tablo 3. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi 47

Tablo 4. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin glial hücrelere etkisi 61

ŞEKİLLER

Şekil 1. Miyelin kılıf 7

Şekil 2. Çalışma modeli ve deney grupları 31

Şekil 3. Kuprizonun vücut ağırlığı üzerine etkisi 41

Şekil 4. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin vücut ağırlığı üzerine etkisi 41

Şekil 5. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin lokomotor aktivite üzerine etkisi 44

Şekil 6. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin anksiyete üzerine etkisi 44

Şekil 7. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi 48

Şekil 8. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi 48

Şekil 9. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendrosit sayısına etkisi 53

Şekil 10. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendroglia sayısına etkisi 53

Şekil 11. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin mikroglia sayısına etkisi 58

Şekil 12. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin astrosit sayısına etkisi 58

RESİMLER

Resim 1. C57BL/6 türü erkek farelere kuprizon uygulaması 30

Resim 2. Açık Alan testi 33

Resim 3. İntrakardiyak perfüzyon düzeneği 34

Resim 4. Farede intrakardiyak perfüzyon uygulaması 35

Resim 5. Korpus kallosum 37

Resim 6. Luksol fast mavisi (LFB) ile korpus kallosumda histolojik olarak miyelin boyama 49

Resim 7. Anti-miyelin temel protein (MBP) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak miyelin proteini boyama 50

Resim 8. Anti-nörit büyüme inihibitörü A (NogoA) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak oligodendrosit boyama 54

Resim 9. Anti-oligodendrosit transkripsiyon faktör 2 (Olig2) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak oligodendroglia boyama 55

Resim 10. Anti-iyonize kalsiyum bağlayan adaptör molekül 1 (Iba1) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak mikroglia boyama 59

Resim 11. Anti-glial fibriler asidik protein (GFAP) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak astrosit boyama 60

KISALTMALAR

MS	: Multipl skleroz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
PSS	: Periferik sinir sistemi
GABA	: Gama amino bütirik asit
GAD	: Glutamik asit dekarboksilaz
GABA-T	: GABA transaminaz
GAT	: GABA transporter
DOE	: Deneysel otoimmun ensefalomiyelit
TMEV	: Theiler's murine ensefalomyelitis virus
NFkB	: Nükleer faktör kappa b
MAP	: Mitojen aktive protein
IL	: İnterlökin
TNF	: Tümör nekroz faktör
NO	: Nitrik oksit
IFN	: İnterferon
IGF	: İnsulin benzeri büyüme faktörü
MBP	: Miyelin temel protein
PLP	: Proteolipid protein
MOG	: Miyelin oligodendrosit glikoprotein
MAG	: Miyelin ilişkili glikoprotein
CNP	: Siklik nükleotid fosfodiesteraz
Olig	: Oligodendrosit transkripsiyon faktör
GFAP	: Glial fibriler asidik protein

ÖZET

Amaç: Biz bu çalışmada, multipl sklerozda spastisite tedavisinde kullanılan baklofenin, kuprizonla oluşturulan demiyelinizasyona ve kuprizondan sonra gelişen remiyelinizasyona olası etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: C57BL/6 türü erkek farelerde, beş hafta kuprizon verilerek demiyelinizasyon ve sonrasında kuprizon diyetten çıkarılarak remiyelinizasyon oluşturuldu. Normal miyelinizasyon, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerinde 2 ve 5 mg/kg baklofen intraperitoneal yoldan uygulandı. Farelerin koronal beyin kesitlerinde oligodendrosit, oligodendroglia, mikroglia ve astrosit hücre sayıları histolojik ve immunohistokimyasal açıdan incelendi ve miyelinizasyon değerlendirildi.

Bulgular: Normal miyelinizasyon döneminde, baklofen mikroglia sayısındaki azalmanın dışında bir etki göstermedi. Baklofen demiyelinizasyon döneminde miyelinizasyonu arttırdı. Demiyelinizasyon döneminde azalan oligodendrosit ve oligodroglia hücreleri baklofenin etkisiyle daha fazla azaldı. Bu dönemde artan mikroglia ve astrosit hücreleri baklofenin etkisiyle azaldı. Baklofen remiyelinizasyon döneminde ise miyelinizasyonu azalttırken oligodendrosit ve oligodendroglia hücrelerini arttırdı. Bu dönemde azalan mikroglia sayısı ise baklofenin etkisiyle daha fazla azaldı. Ancak bu dönemde azalan astrosit sayısını değiştirmedi.

Sonuç: Elde ettiğimiz verilere göre, multipl sklerozda spastisite tedavisinde kullanılan baklofen demiyelinizasyon döneminde miyelinizasyonu arttırmaktadır. Ancak bu bize baklofenin demiyelinizasyonu önlediğini göstermemektedir. Çünkü elde ettiğimiz sonuçlara göre baklofen miyelinizasyon için gerekli olan oligodendrosit sayılarını azaltmaktadır. Remiyelinizasyon döneminde ise baklofen oligodendrosit ve oligodendroglia sayılarını arttırmasına rağmen miyelinizasyonda pozitif bir etki oluşturmamakta, aksine azaltmaktadır. Sonuç olarak bu çalışmamızda, baklofenin deneysel multipl skleroz modelinde, demiyelinizasyon sürecinde hasarı arttırdığı ve remiyelinizasyon sürecinde rejenerasyonu engellediği gösterilmiştir.

ABSTRACT

Aims: In this study we aimed to investigate the effects of baclofen used in the treatment of spasticity in multiple sclerosis, on cuprizone induced-demyelination and remyelination models.

Materials and methods: In male C57BL/6 mice, demyelination was induced by adding cuprizone to diet for 5 weeks, while remyelination was developed by removing cuprizone from diet. Baclofen 2 and 5 mg/kg was given intraperitoneally to mice during normal myelination, demyelination and remyelination period. Oligodendrocyte, oligodendroglia, microglia and astrocyte cell numbers were analyzed and myelination was evaluated in coronal sections of mice brain histologically and immunohistochemically.

Results: During normal myelination period, baclofen did not show any other effect apart from decrease in microglia cell count. Baclofen increased myelination during demyelination period. The decreased number of oligodendrocyte and oligodendroglia in demyelination phase was much more reduced by baclofen treatment. Besides this, increased number of microglia and astrocyte cell during the demyelination period was decreased by baclofen. In remyelination phase, baclofen decreased the myelination but increased the oligodendrocyte and oligodendroglia cell number. During this phase, the decreased number of microglia cells was much more reduced by baclofen. However, the reduced number of astrocytes remained unchanged in this period.

Conclusion: According to the data, obtained from the present study, baclofen a drug used in the treatment of spasticity in multiple sclerosis increased myelination during demyelination period. However, our findings suggested that baclofen did not prevent demyelination because of decreased number of oligodendrocyte, as it is required for myelination. Even though increase in number of oligodendrocyte and oligodendroglia during remyelination phase by baclofen did not show any positive effect on myelination rather than decreased the myelination. Consequently, from this study we concluded that in experimental model of multiple sclerosis baclofen increased damage in demyelination period and inhibits regeneration in remyelination phase.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl Skleroz (MS), genç erişkinlerde en sık görülen non-travmatik nörodejeneratif bir hastalıktır. MS'un karakteristik özellikleri arasında, merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu, kronik ve otoimmun bir inflamasyon, lokalize demiyelinizasyon odakları ve progresif seyirde gelişen yetersiz remiyelinizasyon yer alır (1). MS'da, oligodendrosit hücre membranı olan ve aksonların etrafını sararak ileti hızını arttıran miyelin kılıfa karşı reaktive olan T lenfositler, perivasküler parenkimde, periferden gelen monositler ve beyinde bulunan glial hücreler ile birlikte inflamasyona neden olur (2). İnflamasyonda bu hücrelerden salınan sitokin ve diğer faktörler, oligodendrosit hasarıyla önce demiyelinizasyona, ardından aksonal dejenerasyon ve nöron hücre kaybına neden olur (1). İnflamatuar süreçte artan astrosit ve mikrogliaların, hem hasarı arttıran hem de hasarı sınırlandırıp rejenerasyona katkıda bulunan fonksiyonları vardır (3, 4).

Kuprizonla oluşturulan deneysel toksik demiyelinizasyon modeli, periferal immün yanıttan bağımsız olarak, demiyelinizan bir hasara karşı spesifik glial hücre yanıtının incelenmesine olanak sağlar. Kuprizon, deney hayvanlarında oligodendrosit apoptozuna neden olarak demiyelinizasyona yol açan bir toksindir. Farelerin yemine 5-6 hafta süresince % 0.2 oranında kuprizon eklenmesiyle, korpus kallosumda belirgin demiyelinizasyon ortaya çıkar. Bu sürenin sonunda, kuprizon diyetten çıkarılırsa kısa bir sürede remiyelinizasyon gelişir (5).

Kuprizonla gelişen demiyelinizan hasara yanıt olarak, hasar alanında mikroglia ve astrosit hücrelerinde belirgin artış gerçekleşir. Mikroglial hücreler, kuprizonla oluşan apoptotik oligodendrositleri ve miyelin kalıntılarını fagosite ederek ortamdan uzaklaştırır (6). Astrositler hasar alanına mikroglia ve oligodendrosit öncü hücre göçünü ve proliferasyonu sağlar (7). Astrosit ve mikroglialardan salınan sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri, öncü hücrelerin proliferasyonu, göçü ve farklılaşarak olgun oligodendrositlere dönüşmesini sağlar (8).

Baklofen, MS hastalarında görülen spastisite tedavisinde onaylı bir ilaç olarak kullanılmaktadır (9). Klinik olarak antispastisite, antinosiseptif, antitussif, bronkodilatatör etkilerinin yanında madde bağımlılığını azalttığı, kan basıncını arttırdığı ve bazı kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (10). Ayrıca baklofenin hiperfajiye neden olduğu, vücut ağırlığı ve lokomotor aktiviteyi azalttığı da çalışmalarda gösterilmiştir (11, 12).

Baklofen selektif gama amino bütirik asit (GABA)-B agonisti bir ajandır. GABA MSS'nin majör inhibitör nörotransmitteridir (13). GABA, etkisini nöronlarda bulunan reseptörleri üzerinden gösterir. GABA reseptörleri etki mekanizması olarak iyonotropik (GABA-A, GABA-C) ve metobotropik (GABA-B) reseptörler olmak üzere ikiye ayrılır. GABA-A hızlı inhibisyondan, GABA-B ise yavaş ve geç inhibisyondan sorumludur (10). Presinaptik GABA-B reseptörleri voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını inhibe ederek nörotransmitter salınımını baskılar, postsinaptik yerleşimli GABA-B reseptörleri ise adenilil siklaz inhibisyonu ile ve Kir3 tipi potasyum kanallarını aktive ederek postsinaptik membran hiperpolarizasyonuna neden olur (14). GABA-B reseptörleri MSS'nde en sık, talamik çekirdekler, serebellum, serebral korteks ve spinal kordun dorsal boynuzunda bulunur. (10, 15).

GABA-B reseptörlerinin uyarılması, nörodejeneratif veya iskemik durumlarda, glutamat salınımını ve nitrik oksid sentaz ekspresyonunu azaltarak nöroprotektif sonuçlar ortaya çıkarır. GABA-B agonisti baklofenin sıçanlarda iskemiye bağlı anormal davranışları ve ölümleri azalttığı, sıçan hipokampal kesitlerinde, iskemiyle artan nöron hücre hasarının, baklofen ile anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (16, 17). Ancak, MS'da spastisite tedavisinde kullanılan baklofenin, MS'da ve deneysel hayvan modellerinde patolojik süreçlere ne gibi etkilerde bulunduğu, şu ana kadar çalışılmamıştır. GABA-B aracılı iletinin haricinde, GABAerjik sistemin deneysel MS modellerinde nöroprotektif etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. GABA-A agonisti topiramat ve muskimolün, GABA transaminaz inhibitörü vigabatrin ve gabakulinin deneysel otoimmun ensefalomiyelit (DOE) gelişimini, semptomların şiddetini ve histolojik incelemelerde inflamatuar odakların sayısını düşürdüğü gösterildi (18). Diğer bir çalışmada, Sternberg ve ark. yapısal bir GABA analoğu olan akamprosatın DOE gelişme sıklığını düşürdüğünü, semptomların ortaya çıkma zamanını ve şiddetini azalttığını gösterdiler (19).

MSS'nde nöron hücrelerinin yanı sıra glial hücrelerde de GABA-B reseptörleri çalışılmıştır. MSS'nde miyelin oluşumunda görevli olan oligodendrositlerde, GABA-B reseptörlerinin varlığı ve fonksiyonlarına yönelik bilgiler kısıtlıdır. Yapılan iki çalışmada olgun oligodendrositte GABA-B reseptörünün olmadığı ya da çok zayıf ekspresyon gösterdiği bulunmuştur (20, 21). Luyt ve ark.'nın yaptığı çalışmada, GABA-B reseptörünün olgun oligodendrositlerde zayıf ekspresyon gösterirken öncü hücrelerde daha fazla olduğu gösterildi (21). Yine bu çalışmada, öncü hücre kültürüne baklofen eklendiğinde, hücre proliferasyonunun ve göçünün arttığı gösterildi. Periferik sinir sisteminde myelin oluşturan

hücre olan schwann hücrelerinde ise GABA-B reseptörleri ve baklofenin schwann hücrelerinin proliferasyonunu ve miyelin üretimini baskıladığı gösterildi (22).

Astrosit ve mikrogliaların GABA-B reseptörlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (20, 23, 24). Lee ve ark.'nın çalışmalarında, aktive astrosit veya mikroglial hücrelere baklofen verildiği durumda; hücrelerde nükleer faktör kappa b (NFkB) ve mitojen aktive protein (MAP) kinaz aktivitesinde, hücrelerden interlökin (IL) 6 ve tümör nekroz faktör (TNF)-alfa salınımında ve bu hücrelerin nöral hücre üzerine olan nörotoksik etkilerinde belirgin azalma gösterilmiştir (25).

Biz bu çalışmada, MS'da spastisite tedavisinde kullanılan baklofenin, farelerde kuprizonla oluşturulan demiyelinizasyona, kuprizon sonrası gelişen remiyelinizasyona ve bu süreçlerde değişen glial hücre sayılarına etkilerini incelemeyi amaçladık. Yine kuprizon ve baklofen uygulamalarının farelerde ortaya çıkardığı vücut ağırlığı, aktivite ve anksiyete değişimlerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MULTİPL SKLEROZ'UN HİSTOPATOLOJİSİ

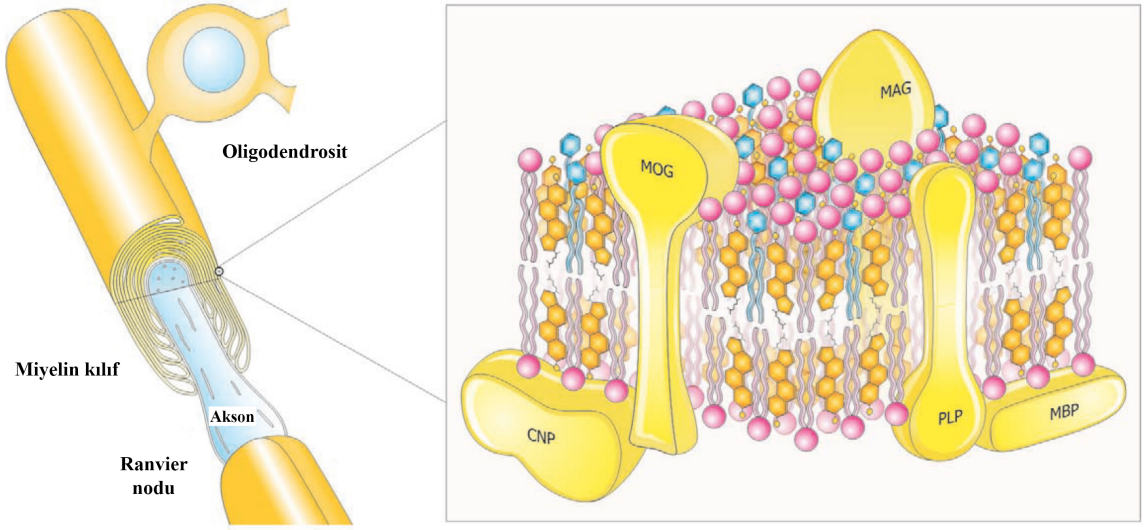
MS genç erişkinlerde en sık görülen non-travmatik nörodejeneratif bir hastalıktır. MS'un karakteristik özellikleri arasında, MSS tutulumu, kronik ve otoimmun bir inflamasyon, inflamasyonla oluşan lokalize demiyelinizasyon odakları ve progresif seyirle gelişen yetersiz remiyelinizasyon yer alır (1).

MSS'nde görülen inflamasyon perivasküler alanda ve sıklıkla beyaz cevherde adına plak denilen lezyonlara neden olur. Bu plaklar periventriküler alan ve optik sinirde de görülebilir (26). Bu inflamatuar süreç, plakların dışında, kortikal atrofi ve germinal merkez benzeri B lenfosit üretim alanlarının oluşmasına da neden olur. Plakların yapısı histopatolojik olarak incelendiğinde dört farklı mekanizma ile lezyonların oluştuğu görülmüştür (27): Tip-I: T lenfosit ve makrofajlar, Tip-II: T lenfosit ve makrofajlarla birlikte antikor ve komplemanlar (en sık), Tip-III: oligodendrosit distrofisi ve apoptozisi ve Tip-IV: primer oligodendrosit hasarı (viral, iskemik ve toksik nedenlerle).

2.1.1. MS'da oligodendrosit hasarı ve demiyelinizasyon

Oligodendrosit hücreleri, MSS'nde aksonların etrafını saran ve ileti hızını arttıran miyelin kılıfın yapımından sorumlu hücrelerdir (28). Miyelin oligodendrosit hücrelerinin plazma membranıdır. Miyelin kılıf aksonal sodyum kanallarını ranvier nodlarında kümeleyerek nodlar arası sıçrayıcı tarzda hızlı iletiyi sağlar (29). Akson lifinin etrafını saran bu miyelin kılıf, aksonal aksiyon potansiyelinin ileti hızını, miyelinize olmayan aksonlara göre yaklaşık 100 kat arttırır. Miyelin kılıfın diğer bir önemli özelliği de aksonun etrafını sararak zararlı etkenlere karşı aksonal yapıyı korumasıdır (28).

Miyelin lipid ve proteinlerden oluşan bir hücre membranıdır (30, Şekil 1). Miyelinin kuru ağırlığının % 70'ini kolesterol, fosfolipid ve glikosfingolipidler oluşturur. Miyelin yapısında bulunan bazı poteinler ise miyelin temel protein (myelin basic protein, MBP), proteolipid protein (PLP), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG), miyelin ilişkili glikoprotein (myelin associated glycoprotein, MAG) ve siklik nükleotid fosfodiesteraz (cyclic nucleotide phosphodiesterase, CNP) (31). Bu proteinlere karşı geliştirilen antikorlar, immunohistokimyasal incelemelerde miyelin yapısını görüntülemede kullanılır.



Şekil 1. Miyelin kılıf (30 nolu kaynaktan uyarlanmıştır**).**

MS farklı mekanizmalarla oligodendrosit hasarına neden olarak aksonlarda demiyelinizasyona yol açar. MS'da oligodendrosit hasarını açıklayan otoimmun teoriye göre, periferde bakteriyel ya da viral antijenlerle tetiklenen inflamasyon, miyeline karşı reaktive olmuş T lenfositlerini oluşturur. Bu T lenfositler lenfoid organlarda çoğalarak MSS'e geçer. Reaktive T lenfositler beyin ve spinal korddaki post-kapiller venüllerde endotelden sızarak perivasküler parenkimde, periferden gelen monositler ve beyinde bulunan glial hücreler ile birlikte inflamasyona neden olur. İnflamasyonda bu hücrelerden salınan sitokin ve diğer faktörler, oligodendrosit hasarıyla önce demiyelinizasyona, ardından aksonal dejenerasyon ve nöron hücre kaybına neden olur (1, 2).

MS'da oligodendrosit hasarını açıklayan diğer bir teoriye göre ise primer bir oligodendropati sonrası gelişen demiyelinizasyon vardır ve inflamasyon bu hasara yanıt olarak gelişir. Ancak oligodendropati teorisinde primer oligodendrosit hasarını neyin başlattığı bilinmemektedir. Oligodendropatiye neden olduğu düşünülen bazı etkenler arasında oksidatif hasar, glutamat toksisitesi, mitokondriyel hasar ve otoantikorlar yer almaktadır (28).

2.1.2. Oligodendrosit öncü hücreleri ve remiyelinizasyon

Embriyogenez ve postnatal dönemde nöral kök hücrelerinden gelişen oligodendrosit öncü hücreleri, erişkin dönemde MSS'nde prolifere olan hücrelerin yaklaşık % 5'ini oluşturmaktadır. Öncü hücreler, erişkin beyninde iki alanda lokalizasyon gösterir: hipokampal dentat girus ve subventriküler zon (32).

Oligodendrosit öncü hücrelerinde eksprese edilen oligodendrosit transkripsiyon faktör (Olig) 2, araştırmalarda bu hücrelerin tanımlanmasında kullanılır. Öncü hücrelerde Olig2 ekspresyonlarının artmasıyla, olgun oligodendrosite doğru gelişim artar (33). Olig2 çoğunlukla oligodendrosit öncü hücrelerinde eksprese edilir ve hücre maturasyonu arttıkça ekspresyonu azalır. Olig2, immunohistokimyasal incelemelerde öncü hücrelerde kuvvetli, ancak olgun hücrelerde zayıf ekspresyon gösterir.

Primer miyelinizasyon, öncü hücrelerin olgun oligodendrositlere dönüşmeye devam ettiği postnatal döneme kadar devam eder (34). MS gibi oligodendrosit hasarına neden olan hastalıklarda ortaya çıkan demiyelinizasyondan sonra ise remiyelinizasyon gelişir. Oligodendrosit kaybı yaşandığında, diğer sağlıklı oligodendrositler bu kaybı karşılamaz. Bu kayıp öncü hücrelerden gelişen yeni oligodendrosit oluşumu ile yerine konur.

Periferik sinir sisteminde (PSS) miyelin schwann hücreleri tarafından üretilir. Periferal aksonlarda eksprese olan nörogulin, schwann hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak aksonal miyelinizasyonu başlatır (35). Ancak MSS'nde aksonal miyelinizasyon çok daha komplikedir ve tam olarak hangi mekanizmanın akson oligodendrosit bağlantısını sağlayarak miyelinizasyona yol açtığı bilinmemektedir.

Öncü hücrelerden miyelin üreten olgun oligodendrositlerin gelişimi, nöronal aktivite ile bağlantılıdır. Öncü hücreler nöronlarla sinaptik bağlantılara sahiptir ve bu hücrelere gelen sinaptik uyarı hücre gelişimini uyarır (36). Aksonlarda aksiyon potansiyelinin baskılanması ise aksonal miyelinizasyonu azaltır. Gri cevherde bulunan glutamaterjik ve GABAerjik nöronlarlardan gelen iletiler, her iki uyarı tipinde de öncü hücrelerde depolarizasyona yol açar (37, 38). Akson-öncü hücre sinaptik bağlantısı, aynı zamanda beyaz cevherde de (korpus kallosumda) gösterildi (39, 40).

MSS'ni etkileyen bir çok hasar modelinde, öncü hücre sayısı artar. MS gibi oligodendrosit hasarıyla demiyelinizasyona yol açan hastalıklarda bu artış gerçekleştiği gibi, spinal kord hasarında da öncü hücre sayısı artar (41). Nöron ve diğer glial hücrelerden salınan nörotransmitterler, büyüme faktörleri ve sitokinler öncü hücre proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını etkiler. Diğer yandan, oligodendrositlerde üretilen miyelin, olgun hücrelere farklılaşmayı baskılar (3).

MS'da özellikle kronik dönemde belirgin remiyelinizasyon yetersizliği vardır (42). Remiyelinizasyon kapasitesinin azalması, oligodendrosit öncü hücre sayılarındaki azalmadan veya olgun oligodendrositlere farklılaşmadan kaynaklanan sorunlardan dolayı azalmış yeni

oligodendrosit oluşumuna bağlı olarak gerçekleşir. Demiyelinizasyon-remiyelinizasyon atak sayısı fazla olan bazı hastalarda, öncü hücre sayılarındaki belirgin azalma bulunmuştur. Ancak diğer bazı MS hastalarında yeterli öncü hücre bulunmasına rağmen, olgun hücrelere farklılaşma bozukluğu, yetersiz remiyelinizasyona yol açar. Oligodendrosit farklılaşmasında öne çıkan bazı faktörler remiyelinizasyon kapasitesinin azalmasında rol oynayabilir. Bu faktörler arasında, nörotransmitterler (glutamat), büyüme faktörleri (insulin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1)), aksonal elektriksel aktivite ve akson-öncü hücre bağlantıları yer almaktadır.

2.1.3. Mikrogliozis

Kemik iliğinden köken alan mikroglia hücreleri, MSS'nin doğal immunitesinden sorumlu olan lokalize makrofajlarıdır (43). Mikroglialar MSS'ndeki hücrelerin % 10'unu oluşturur. Bu hücreler özellikle gri cevherde yoğunlaşmıştır ve beyaz cevherde daha az miktarlarda bulunur.

Mikroglialar normalde beyinde dinlenme halindeyken (resting state), patolojik koşullarda aktive olur (activated state) (44). MSS'nde hasara uğramış hücrelerden salınan bazı moleküller mikroglial hücrelerin aktive olmasına ve hasar alanına toplanmasına neden olur. Enfeksiyon, strok ve nörodejenerasyon gibi birçok patolojide beyin parenkiminden hasar alanına toplanan mikroglialar, sitokin salınımı ve fagositozla hasarı kontrol altına alır. Mikroglialar fagositozla infeksiyöz ajanları, hasar kalıntılarını (debris) ve apoptotik hücreleri ortamdan uzaklaştırır (45, 46).

MS'da mikroglial aktivitenin artması hem dejenerasyona hem de rejenerasyona neden olur. Mikrogliaların baskılandığı deneysel otoimmun MS modelinde, klinik belirtilerin gerilediği ve MSS'nde görülen inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir (47). Mikroglialar, fagositozla miyelin debrisini ortamdan uzaklaştırarak, rejenerasyona da katkı sağlar. Mikroglial fagositozun yetersiz olduğu koşullarda, miyelin debrisinin ortamdan uzaklaştırılmasındaki yetersizliğe bağlı olarak, remiyelinizasyonun azaldığı gösterilmiştir (3).

2.1.4. Reaktif Astrogliozis

MSS'nde iki tür astrosit vardır. Protoplazmik astrositler gri cevherde yer alırken, fibröz astrositler beyaz cevherde bulunur (4). Her iki astrosit türü de kan damarlarıyla bağlantı halindedir. Nöronal aktiviteyle bağlantılı olarak, astrositlerden salınan bazı faktörler

(prostaglandin, nitrik oksit (NO)), kan damarlarını etkileyerek, lokal kan akışını kontrol altında tutar (48). Ayrıca, astrosit hücrelerinin damarlara gönderdiği uzantılar, kan-beyin bariyerinin devamlılığını sağlar. Astrositler, aynı zamanda nöronlarla sinaptik bağlantılara sahiptir. Ancak bu hücreler aksiyon potansiyeli oluşturamaz. Bu bağlantılarda astrositin temel görevi nöral iletinin devamlılığını sağlamaktır. Astrositler, aksonlara glikojen desteği sağlayarak, salgıladığı büyüme faktörleriyle aksonal rejenerasyona katkıda bulunarak ve nörotransmitterlerin metabolizmasında görev alarak, nöral iletinin devamlılığını sağlar (4).

Astrositlerde eksprese edilen glial fibriler asidik protein, (GFAP) immunohistokimyasal çalışmalarda astrositleri tanımlamada kullanılır. MSS'ni etkileyen herhangi bir patolojik durum, karakteristik olarak GFAP ekspresyonunda artışın ve hipertrofik astrositlerin görüldüğü reaktive astrogliozisin oluşmasına neden olur. Bu patolojik koşulların etki derecesine göre farklı düzeylerde reaktive astrogliozis gelişir (49). Sistemik enfeksiyonlarda görülen hafif-orta şiddetli astroglioziste, astrositte GFAP dahil, birçok genin ekspresyonu artar ve hücre hipertrofisi görülür. MSS'nde lokalize lezyon veya enfeksiyonlarda görülen şiddetli astroglioziste, yukarıdaki belirtilere ek olarak astrosit proliferasyonu gelişir. Travma, iskemi ve otoimmun inflamasyonda (MS gibi), bu belirtilere glial skar dokusu da dahil olur. Astrosit hücrelerinin biraraya gelerek oluşturduğu glial skar dokusu, inflamatuar hücre göçünü engelleyerek hasar alanını sınırlandıran bir bariyer işlevi görür.

MS'da astrosit hücrelerinin, hem demiyelinizasyonu arttıran, hem demiyelinizasyonu kısıtlayan hem de remiyelinizasyonu arttıran fonksiyonları vardır (50). Astrositlerden salınan proinflamatuar sitokin ve kemokinler, MS'da inflamatuar hasara neden olan lenfosit, makrofaj ve mikroglialardan sitokin salınımını arttırarak ve bu hücrelerin hasar alanına göçünü sağlayarak demiyelinizan hasarı arttırır. Aynı zamanda, astrositlerden inflamasyonu sınırlandıran anti-inflamatuar sitokinler de salınır. Hasar alanında toplanan astrositlerin oluşturduğu glial skar dokusu ise, bu alana diğer inflamatuar hücrelerin toplanmasını engelleyen bir bariyer fonksiyonu görerek demiyelinizan hasarı kısıtlar. Aktif inflamasyondan sonra görülen remiyelinizasyonda ise, astrositlerden salınan büyüme faktörleri ve sitokinler, öncü hücrelerden yeni olgun oligodendrosit gelişimini arttırarak remiyelinizasyona katkıda bulunur (4).

2.2. DENEYSEL MS MODELLERİ

Deney hayvanlarında oluşturulan MS modelleri üç başlık altında toplanabilir (51): 1- Otoimmun model: Deneysel otoimmun/allerjik ensefalomiyelit (DOE), 2- Virüsle indüklenen model: Theiler's murine ensefalomyelitis virus (TMEV) ile indüklenen demiyelinizasyon, 3- Toksik demiyelinizasyon modeli: lisolesitin veya kuprizon ile indüklenen demyelinizasyon.

Deneysel otoimmun/allerjik ensefalomiyelit

Deneysel MS modelleri arasında bugüne kadar en sık çalışılan otoimmun modeldir. Bu model, MS'te görülen inflamatuar süreçleri, inflamasyonla ortaya çıkan doku hasarını ve bu hasar sonucu oluşan klinik etkileri çalışmakta en uygun modeldir (52). Bu modelde ortaya çıkan hasar, MS'da görülen tip-1 ve tip-2 lezyonlarına (inflamatuar özellikteki lezyonlar) benzemektedir. Otoimmun model, T lenfositlerini uyaran bir adjuvanın, bir miyelin proteini ile birlikte deney hayvanına enjekte edilmesi esasına dayanır (53). Adjuvana ve birlikte verilen miyelin proteinine karşı reaktive edilen T lenfositleri, periferden MSS'e geçerek perivasküler alanda inflamasyona ve beligin demiyelinizasyona neden olur. Reaktive T lenfositleri, in vitro şartlarda oluşturularak veya otoimmun model oluşturulmuş bir hayvandan alınarak, normal bir deney hayvanına enjekte edildiğinde de otoimmun model oluşturulabilir. Otoimmun model oluşturulmuş deney hayvanlarında, inflamasyonun şiddetiyle korele olarak alt ekstremiteden başlayıp yukarı doğru ilerleyen progresif bir paralizi gelişir. Bu model, fare, sıçan, gine domuzu, tavşan ve diğer bir çok deney hayvanında çalışılmıştır. Bununla birlikte en sık, C57BL/6 türü dişi farelerde çalışılmaktadır.

Virüsle indüklenen model

MS'un insanlarda ilk defa nasıl başladığı veya bir kimsenin nasıl MS hastalığına yakalandığı bilinmemektedir. Bu konuda ortaya atılan teorilerden biri de hastalığın viral kaynaklı bir ensalomiyelit olabileceği yönündedir. Ancak şu ana kadar isbatlanmış MS'a yol açan bir virus yoktur ve uygun çevresel şartlarda Epstein Barr virüsünün hastalıktan sorumlu olabileceği en güncel yaklaşımdır (54).

Virüsle indüklenen modelde en sık uygulanan virus olan TMEV'in farelerde flaksid paraliziye yol açtığı ilk defa 1934 yılında Theiler tarafından gösterilmiştir. Bu modelde ortaya çıkan patoloji ve özellikle klinik MS'a çok benzemektedir. TMEV özellikle spinal kordda kronik inflamatuar demiyelinizasyona yol açar. Ortaya çıkan klinik MS'da görülen kronik-

progresif seyirli MS'a benzemektedir. Viral model uygulanan farelerde arka ayak zayıflığı, spastisite ve mesane inkontinansı ortaya çıkar. Son olarak model sıklıkla farelerde ve en sık SJL türü farelerde çalışılmıştır (51).

Toksik demiyelinizasyon modeli

Kuprizon ve lisolesitin, demiyelinizasyon oluşturmak için en sık kullanılan toksik maddelerdir. Bu modelde MS'un tüm inflamatuar ve klinik süreçleri çalışılmaz. Toksik demiyelinizasyon modeli temelde, spesifik olarak oluşturulan demiyelinizan hasara beynin yanıtını anlamakta kullanılır. Ayıca toksik hasar ortadan kaldırıldıktan sonra gelişen iyileşme mekanizmaları da sıklıkla çalışılmaktadır. Toksik demiyelinizasyon hasarı, MS'da görülen tip-3 ve tip-4 lezyonlarına (oligodendrosit hasarı) karşılık gelmektedir (51).

Fosfolipaz A2 aktivatörü olan lisolesitin, direk spinal korda enjekte edildiğinde, miyelin hasarına yol açarak demiyelinizasyona neden olur. Lisolesitinin hasar mekanizması immün aracılı değildir ancak bu hasara yanıt olarak demiyelinizasyon alanında glial hücre artışı olur. Bu modelde spesifik olarak MSS'nde gelişen hasara yanıt mekanizmaları çalışılmaktadır. Yine bu model kolaylıkla kedi, tavşan, sıçan ve fare gibi birçok deney hayvanında çalışılmıştır. Diğer toksik demiyelinizasyon modeli olan kuprizon modeline aşağıda ayrıntılı bir şekilde yer verilecektir.

2.2.1. Kuprizon Modeli

Kuprizon, deney hayvanlarında nöro ve hepatotoksik özellikler göstererek belirgin kilo kaybı, arka ayaklarda zayıflık, letarji ve mortaliteye neden olur. Kuprizonla yapılan deneysel çalışmalarda, histopatolojik olarak beyin ödemi, hidrosefali, status spongiozus, demiyelinizasyon, astrogliozis ve oligodendrosit dejenerasyonu gösterilmiştir. İlk çalışmalarda, Carlton kuprizon verdiği farelerin serebellumunda beyin ödemi ve demiyelinizan hasarı gösterdi (55). Ardından Suzuki, kuprizonla miyelinde ve oligodendrositlerde vakuolizasyonu gösterdi (56). Blakemore ise sistematik olarak ilk defa süperior serebellar pedünkülde, kuprizonun oligodendrosit dejenerasyonuna yol açarak demiyelinizasyona neden olduğunu gösterdi (57).

Ardından Matsushima ve ark. demiyelinizasyonun kolaylıkla anlaşılabildiği ve bugün kuprizon modelinin histopatolojik incelemelerinde en sık incelenen bölge olan korpus kallosumda, kuprizonun demiyelinizan etkisini gösterdiler (58). Çalışmalarında kuprizonun korpus kallosumdaki etkilerini göstermenin yanı sıra bugün en sık kullanılan kuprizon

modelinin ayrıntılarını da ortaya koydular. Önceki çalışmalarda kuprizonun sistemik etkileriyle birlikte demiyelinizasyonun da oluştuğu kuprizon uygulama dozu, sıklıkla diyete % 0,5 oranında karıştırıldığı dozdu (57). Bu araştırmalarında ise % 0,1-0,5 aralığındaki dozlar farklı uygulama sürelerinde deney hayvanlarının diyetine karıştırdılar. Çalışmalarının sonucunda, 8-10 haftalık erkek C57BL/6 türü farelerin yemlerine, beş hafta süresince % 0,2 oranında kuprizon karıştırılmasıyla, korpus kallosumda en net demiyelinizasyon ve karaciğerde en düşük toksisite elde etmişlerdir.

2.2.1.1. Etki Mekanizmasi

Kuprizonun nörotoksik etkisini açıklayan ve bugün en fazla kabul gören çalışmaya göre, kuprizon bakır şelasyonuna neden olup, bakır ve bakır bağımlı enzimlerin aktivitesinde yetersizliğe neden olarak toksik etki ortaya çıkarır (59). Ancak güncel çalışmalarda farklı sonuçlar da bulunmuştur. Zatta ve ark. kuprizonun beyin bölgeleri dahil pek çok organda bakır ve çinko düzeylerini arttırdığını gösterdiler (60). Bu çalışmaya göre plazma ve beyinde bulunan serbest kuprizon direk hücresel etkiyle, hücre içi metal iyon dengesini bozarak, nörotoksik etki gösterir. Ancak diğer bir çalışmada Benetti ve ark. kuprizon-bakır kompleksinin duodenal membran ve nöronal plazma membranından geçemediğini, bu kompleksin karaciğer ve beyinde birikmediğini ve nöron üzerine direk bir toksik etkisinin olmadığını gösterdilerdir (61). Bu ekibinin görüşüne göre diyetle verilen kuprizon, diyet içindeki bakırla kompleks oluşturup bakır emilimini azaltarak toksik etki ortaya çıkarır.

2.2.1.2. Oligodendrosit hasarı

Kuprizon, mitokondride bakır bağımlı enzimlerin aktivitesinde bozulmaya neden olarak hücreyi apoptozise götürür. Bu mitokondriyel hasar ilk çalışmalarda karaciğer ve beyinde gösterildi (56). Korpus kallosum kesitlerinde yapılan elektron mikroskobi incelemesinde ve kuprizon eklenmiş glial hücre kültüründe, oligodendrosit hücrelerinde genişlemiş mitokondriler gösterildi (62, 63). Diğer bir çalışmada, deney hayvanlarının beyin dokusunun proteomik analizinde, kuprizon uygulamasının en fazla mitokondriyel fonksiyonları etkilediği gösterildi (64). 3-6 hafta kuprizon uygulanmış farelerin beyninden ve kuprizon eklenmiş glial hücre kültüründen alınan mitokondrilerde, mitokondriyel kompleks-I, I-III ve II-III aktivitelerinin azaldığı gösterildi (65). Yine bu çalışmada, glial hücre kültüründe, oksidan düzeylerinin de arttığı gösterildi.

Kuprizon, glial hücre kültüründe ve deney hayvanlarının MSS'nde, özellikle korpus kallosum bölgesinde, apoptozise yol açarak olgun oligodendrosit sayısını ciddi düzeylerde düşürür (62, 66). Kuprizon diyetinin ikinci gününden itibaren oligodendrositlerde erken evre apoptosis bulguları görülür (63). Üç haftalık kuprizon uygulamasının 6, 10 ve 21. günlerinde histolojik olarak incelenen korpus kallosum kesitlerinde, artan sayılarda büzüşmüş-fragmente apoptotik oligodendrositler gösterildi (66). Bu çalışmada TUNEL metodu ve immunohistolojik incelemelerle bu hücrelerin apoptotik oligodendrositler olduğu ve astrosit ya da mikroglial hücrelerde apoptosis olmadığı gösterildi.

Kuprizon uygulamasının ilk iki haftasında kaspas-3 bağımlı bir apoptosis görülür (66). Kuprizon aracılı oligodendrosit hasarında kaspas-3 bağımlı apoptozisi etkileyen birçok faktör gösterildi. Siklooksijenaz-2 (COX-2) enziminin, kuprizon modelinde kaspas-3 bağımlı apoptozisi indüklediği gösterildi (67). Yapılan çalışmada bir haftalık kuprizon diyetiyle eksprese olan kaspas-3'ün, COX-2 geni silinmiş farelerde aktivitesinin azaldığı gösterildi. Kuprizon modelinde glial hücrelerden salınımı artan TNF-alfa'nın, kuprizon eklenmiş glial hücre kültüründe, kaspas-3 aktivitesini arttırarak oligodendrosit apoptozisini arttırdığı gösterildi (65). MS lezyonlarında ve kuprizonla indüklenen demiyelinizan hasarda astrositlerde seramid biyosentezinin arttığı gösterilmiştir (68). Bu çalışmada, glial hücre kültürüne seramid eklendiği durumda, oligodendrositlerde kaspas-3 bağımlı bir mekanizma ile apoptozisi arttırdığı gösterildi.

Kuprizon uygulamasının üçüncü haftasından itibaren oligodendrosit apoptozisin mekanizması değişir. Bu dönemden itibaren oligodendrosit apoptozisi, apoptoz indükleyici faktör (AIF) bağımlıdır. Tip-3 MS lezyonlarında (oligodendrosit distrofisi ve apoptozisi) ve kuprizon diyetinin üçüncü haftasında korpus kallosumda artmış AIF ekspresyonu gösterildi (69).

2.2.1.3. Demiyelinizasyon

Kuprizon verilen deney hayvanlarının korpus kallosumunda miyelin proteinlerinin ekspresyonları da azalır. Miyelin proteinlerinin mRNA ekspresyonları kuprizon uygulamasının henüz ilk haftasında kontrol grubuna göre belirgin olarak (11-115 kat) azaldığı gösterildi (66). Miyelin protein ekspresyonlarındaki bu azalma kuprizon uygulamasının 3-4 haftasına kadar devam eder (70). Üç haftalık kuprizon diyetinin sonunda MBP, MAG, seramid galaktozil transferaz gibi miyelin proteinleri mRNA düzeylerinin, kontrolün % 10'u kadar olduğu bulundu (71).

Kuprizon diyetiyle, miyelin proteinlerinin yanı sıra miyelin lipidleri de azalır. Korpus kallosumda miyelin-spesifik lipid olan serebrosidin, kuprizonla 6 haftada % 65 ve 12 haftada % 78 oranlarında azaldığı bulundu (70). Bu çalışmaya göre, serebrosid konsantrasyonlarındaki bu ciddi azalmada, serebrosid sentezinin azalmasının yanı sıra serebrosid katabolizmasıyla ortaya çıkan kalıntıların (miyelin debrisi) mikroglia hücreleri tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılmasının da rolü vardır. Yine bu çalışmayla, kuprizon uygulamasıyla korpus kallosumda kolesterol düzeyleri ve sentezinin de azaldığı gösterildi.

Kuprizonla oluşan demiyelinizan hasar, oligodendrosit apoptozisinden ve miyelin gen ekspresyonlarındaki azalmadan sonra ortaya çıkar. 4-6 hafta kuprizon diyeti ile beslenen deney hayvanlarının korpus kallosumunda yapılan histolojik incelemede, miyelin boyayan LFP boyama ile belirgin demyelinizasyon gösterildi (71, 72). Bölgenin elektron mikroskobi incelemesinde, üçüncü haftada aksonlar normal görünümdeyken, sonraki günlerde başlayan demyelinizasyon ile beş haftada axonların büyük çoğunluğunda demyelinizasyon görüldü (63). Kuprizon üç hafta diyete eklendiğinde MBP ve CNP miyelin proteinleri ile yapılan immünohistolojik incelemelerde, kontrole göre bir farklılık gözlenmedi (66). Dört haftalık kuprizon uygulamasıyla, korpus kallosumunda, MBP, MOG ve PLP ekspresyonlarında kısmi azalma saptandı (72). Aynı çalışmaya göre, kuprizon altı hafta uygulandığında PLP ve MOG immün boyamalarında ciddi azalma görülürken, MBP proteininde artış görüldü. Diyete katılan kuprizonun oranı attırıldığında ise (% 0,2'den 0,3'e), dört haftada yine kısmi azalma gözlenirken, altı haftalık uygulamada tüm miyelin proteinlerinde belirgin azalma görüldü.

2.2.1.4. Mikrogliozis

Kuprizonla gelişen demiyelinizan hasara yanıt olarak, hasar alanında mikroglial hücre artışı gerçekleşir. Mikroglial hücre artışı, oligodendrosit apoptozisinin görüldüğü kuprizon diyetinin ilk haftasında başlar, Üçüncü haftadan itibaren çok daha belirgin bir artış vardır, 4-5 hafta arasında pik yapar, ardından azalmaya başlar ve kuprizon diyetinin kesilmesi ile hızlıca kontrol düzeylerine düşer (58, 72, 73). Artan mikroglialaların büyük bir kısmını, kemokinler aracılığıyla beyin parenkiminden hasar alanına toplanan mikroglialar ve mikroglia hücre proliferasyonu oluşturur. Hasar alanındaki mikroglialaların küçük bir kısmını ise kan beyin bariyeri sağlam olmasına rağmen periferden gelen makrofajlar oluşturur (74, 75).

Kuprizon, mikroglia hücrelerinde apoptozise neden olmaz (66). Kuprizon diyetiyle artan mikroglialar ağırlıklı olarak fagositoz yapar ve antijen sunma fonksiyonları ise düşüktür.

Mikroglialar, apoptotik oligodendrositleri ve hasarlı miyelin kalıntılarını fagosite eder. Bu fagositik fonksiyonlarını, özellikle TREM-2b reseptörleri üzerinden gösterir (6). Mikroglialar fagositozun yanında oligodendrosit apoptozisini de arttırır. Mikroglialardan salınan TNF-alfa'nın, kuprizon eklenmiş oligodendrosit hücre kültüründe, oligodendrosit hücre sayısını azaltığı gösterilmiştir (65).

Mikrogliaların rejenerasyonda da önemli fonksiyonları vardır. Bu hücrelerden salınan TNF-alfa, IL-1beta, IGF1 gibi faktörler, oligodendrosit öncü hücrelerinin olgun oligodendrositlere farklılaşmasını arttırır (6). Miyelin debrisini fagosite ederek hem remiyelinizasyon döneminde yeni miyelin yapımı için kolesterol kaynağı olur hem de oligodendrosit öncü hücre gelişimini baskılayan miyelin debrisini ortamdan uzaklaştırır (76).

2.2.1.5. Astrogliozis

Demiyelinizan hasara yanıt olarak artan diğer bir glia hücre de astrositlerdir. Kuprizon diyetinin astrosit üzerine direk toksik bir etkisi yoktur ve apoptosis bulguları veya genişlemiş mitokondriler bu hücrelerde görülmez (63, 66). Kuprizon diyetinin ilk haftasında hipertofik astrositler görülür ve üçüncü haftasından itibaren belirgin astrosit artışı vardır (58). Astrosit sayısındaki artış, oligodendrosit apoptozisi ve mikrogliozisten sonra, demiyelinizasyonun ortaya çıkmasına paralel bir dönemde gerçekleşir (73). Ancak kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra hızlıca azalan mikroglianın aksine, astrositlerde kısmi bir azalma görülse de kontrol düzeylerinde kadar azalma, uzun bir süre gerçekleşmez (77).

Astrositler kuprizon hasarında, hem hasarı arttıran hem de iyileştiren fonksiyonlar gösterir. MS lezyonlarında ve kuprizonla indüklenen demyelinizan hasarda, astrositlerde artan seramid biyosentezinin, oligodendrositlerde kaspas-3 bağımlı bir mekanizma ile oligodendrosit apoptozisini arttırdığı gösterilmiştir (68). Diğer yandan astrosit artışı veya fonksiyon göstermesinin genetik olarak engellendiği çalışmalarda, miyelin debrisinin ortamdan uzaklaştırılmasının ve remiyelinizasyonun azaldığı gösterilmiştir. Astrositlerde sitokin üretiminde önemli rolü olan NFkB'nin genetik olarak silindiği bir çalışmada azalan sitokin ve kemokin ekspresyonlarına paralel olarak, demiyelinizasyon, gliosis ve oligodendrosit öncü hücre sayısı da azalmıştır (78). Astrositleri baskılanan transgenik hayvanlara, kuprizon uygulandığı diğer bir çalışmada astrositten salınan CXCL-10 kemokininin azalarak hasar alanına mikroglial toplanmanın azaldığı gösterilmiştir (7). Azalan mikroglia düzeylerine paralel olarak hasarlı miyelinlerin ortamdan uzaklaştırılması da

gecikmiştir. Hem astrosit sayısının düşüklüğü hem de ilgili beyin bölgesindeki ortamdan uzaklaştırılmamış miyelin kalıntıları sonucu daha az remiyelinizasyon gelişir.

2.2.1.6. Aksonal hasar

Kuprizon uygulamasının korpus kallosumda bulunan aksonlar üzerine etkisi değerlendirildiğinde, dört haftada aksonların tamamına yakını demiyelinize olurken, altı haftada % 50'si demiyelinizedir. Altı haftalık kuprizon diyetinde aksonların yarısında görülen demiyelinizasyon, dördüncü haftadan sonra başlayan remiyelinizasyon ile ilişkilidir. Kuprizon uygulaması demiyelinize aksonların sayısını değiştirdiği gibi, dönemsel olarak akson çapı ve miyelin kalınlığında da değişikliklere neden olur. Kuprizon uygulandığı dönemde akson çapı ve miyelin kalınlığı azalırken, kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra her iki parametre de artar. Ancak remiyelinize aksonun miyelin kalınlığı kontrol grubuna göre daha ince kalır (79).

Korpus kallosumda yapılan elektrofizyolojik incelemelerde, aksiyon potansiyelinde amplitüd ve ileti hızının kuprizon uygulanma süresine göre giderek azaldığı gösterildi. Aksonal iletide önemli olan ranvier nodları ve bu bölgede bulunan iyon kanallarının da kuprizon uygulamasıyla değiştiği gösterildi. Kuprizon diyetiyle gelişen demiyelinizasyon nedeniyle nodal yapıda bulanan caspr proteini ve Na kanalları belirgin düzeylerde azalırken, juxtaparanodal bölgede bulunan K kanalları akson boyunca daha geniş alanda dağılım gösterdi. Aksonal hasarı gösteren NF-200, APP ve SMI-32 düzeyleri de kuprizon uygulamasıyla üç haftadan itibaren arttığı ve altı haftalık uygulamada belirgin aksonal hasar görüldü. Bu dönemde aksonal bağlantılar kesilmiş ve aksonlar genişlemiştir (80).

2.2.1.7. Oligdendrosit öncü hücrelerinde artış ve remiyelinizasyon

Kuprizonla oluşan demiyelinizan hasara karşı gelişen gliozis, rejenerasyona da katkıda bulunur. Bu rejenerasyon sürecinde, apoptozise uğrayan oligodendrositlerin yerine yeni oligodendrositler gelerek aksonların etrafında remiyelinizasyon oluşturur. Remiyelinizasyon sürecinde yeni oligodendrositler, oligodendrosit öncü hücrelerinden farklılaşır. Bu öncü hücreler, kuprizon diyetinin ikinci haftasından itibaren subventriküler zonda artmaya başlar, ardından sırasıyla fornikse ve korpus kallosuma göç eder. Korpus kallosumda artan öncü hücre sayısı dördüncü haftada pik yapar ve kuprizonun diyetten çıkarıldığı remiyelinizasyon döneminde de yüksek kalmaya devam eder (81). Astrosit ve mikroglialardan salınan TNF-

alfa, IL1-beta ve IGF-1 gibi sitokin ve büyüme faktörleri öncü hücrelerin korpus kallosumda birikmesini, burada prolifere olmasını ve olgun oligodendrositlere farklılaşmasını arttırır (8).

Beş haftalık kuprizon diyetiyle korpus kallosumda oluşturulan demiyelinizasyonun ardından, kuprizon diyetten çıkarılırsa, iki-üç hafta gibi kısa bir sürede belirgin remiyelinizasyon gelişir. Kuprizon sonrası henüz ikinci günde hipertrofik oligodendrositler ve kısmi remiyelinize aksonlar görülürken, iki hafta sonra aksonların büyük çoğunluğu remiyelinize olmuştur (63). Yine MBP, PLP ve CNPase gibi miyelin proteinleri de dördüncü günde immün boyamalarda görülürken, iki hafta sonra kontrol düzeylerine ulaşır (72).

2.2.1.8. Kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve periferden lenfosit geçişi

MS'da ve otoimmun MS modeli olan DOE'te kan-beyin bariyeri geçirgenliği artmıştır. Patogenezin önemli bir parametresi olan kan-beyin bariyeri geçirgenliğindeki bu artış, MSS'ndeki perivasküler inflamasyondan ve semptomlardan önce de vardır. Ancak kuprizon modelinde kan-beyin bariyeri intaktır. Kuprizon diyeti alan deney hayvanlarında yapılan çalışmada, kuprizonun sıklıkla demiyelinizan etkisini gösterdiği süperior serebellar pedinkülde, kan damarlarındaki kan-beyin bariyerinin intakt olduğu gösterilmiştir (82).

Kuprizon modelinde, demiyelizan hasar alanında T lenfositlerde anlamlı bir değişiklik yoktur (76). Kan-beyin bariyerinin sağlam olması lenfosit geçişine izin vermez. Diğer yandan çalışmalarda kuprizonun T lenfositleri baskıladığı da gösterilmiştir. DOE oluşturulan deney hayvanlarına kuprizon verildiğinde, kliniğin şiddetinin azaldığı ve T lenfosit yanıtının baskılandığı gösterilmiştir (83, 84). Diğer bir çalışmada ise CD4+ hücrelere antijen sunma fonksiyonu olan MHC-II'lerin, kuprizon modelinde arttığı ancak antijen sunma fonksiyonu yerine mikrogliaların sitokin üretimi ile ilgili hücre içi sinyal iletimi fonksiyonlarına katıldığı gösterilmiştir (85).

2.2.1.9. Kuprizona Duyarlı Bölgeler

Kuprizonun oligodendrosit hasarına neden olarak oluşturduğu demiyelinizan hasar, ilk defa Blakemore ve ark. tarafından süperior serebellar pedinkülde gösterildi (57). Ardından Matsushima ve ark. demiyelinizasyonun kolaylıkla anlaşılabildiği ve bugün kuprizon modelinin histopatolojik incelemelerinde en sık incelenen bölgesi olan korpus kallosumda, kuprizonun demiyelinizan etkisini ortaya koydular (58).

MSS'nde bölgesel olarak kuprizona farklı düzeylerde duyarlılık vardır ve beynin pek çok kısmında bu demiyelinizan hasar gösterilmiştir. Korteks , hipokampüs ve bazal ganglia bu demiyelinizan hasarın gösterildiği diğer alanlardır (86-88). Ancak kuprizona dirençli bölgeler de vardır. Spinal kordda, optik ve siyatik sinirde demiyelinizan hasar çok azdır ya da yoktur (63, 89).

Korpus kallosumun da farklı anatomik bölgeleri ve anatomik olarak komşu alanları kuprizona farklı duyarlılık gösterir. Kaudal korpus kallosumda tam demiyelinizasyon görülürken, rostral bölgede kısmi hasar ortaya çıkar (90). Yine medial korpus kallosum ve cingulumun medial tarafında ciddi hasar varken, lateral korpus kallosum, cingulumun lateral tarafı ve forniks kuprizon hasarına direnç gösterir (91).

2.2.1.10. Kuprizonun Diğer Etkileri

Vücut ağırlığı

Kuprizonun deney hayvanlarında kilo kaybına neden olduğu veya kilo alımını engellediği birçok çalışmada gösterilmiştir (58, 90, 92). Beş hafta kuprizon uygulamanın, kontrol grubuna göre vücut ağırlığı artışını azalttığı gösterilmiştir (92). Diğer bir çalışmada, beş haftalık kuprizonun besin alımı üzerine bir etkisi görülmemiştir (90). Steelman ve ark.'nın yaptığı bu çalışmaya göre, kuprizon diyetinin ilk haftasında belirgin kilo kaybı vardır ve kuprizon alımı devam ettikçe kilo alımı engellenmektedir. Kuprizon alımı süresince kontrole göre vücut ağırlığı belirgin düşüktür. Beş haftanın ardından kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra, hızlı kilo alımı gerçekleşir ve yalnızca bir haftada kontrol grubu kilolarına erişilir.

Lokomotor aktivite ve anksiyete

Kuprizon uygulanıp açık alan testinde lokomotor aktivite ve anksiyete değerlendirmesine tabi tutulan deney hayvanlarında ortaya çıkan sonuçlar, çalışmalarda farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda kuprizonun lokomotor aktiviteyi azalttığı gösterilirken (92), diğer birçok çalışmada bir etki bulunamamıştır (93, 94). Anksiyete değerlendirmesinde ise, kuprizon uygulamasının 3-4 haftalarında ve kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra anksiyetede azalma bulunmuştur (93). Ancak diğer bir çalışmada beş haftalık kuprizon uygulamasının anksiyeteyi arttırdığı gösterilmiştir (92).

2.2.1.11. Kuprizon modelinde deney hayvanı seçimi

Kuprizonun toksik etkileri ilk defa Swiss albino farelerde çalışıldı (55). Sonraki çalışmalarda birçok fare türünde araştırmalar yapılmış olsa da, net ve tutarlı demiyelinizan etki elde edilemedi (7, 95). Bugün kuprizon çalışmalarında, sonuçların netliği ve tutarlılığı açısından en sık C57BL/6 türü erkek farelerde çalışılmaktadır. Bununla birlikte, her ne kadar sıçanlarda kuprizonla demiyelinizasyon çalışmalarında yetersiz histopatolojik veri elde edilmiş olsa da Adamo ve ark. iki hafta süresince üç haftalık sıçanların yemlerine % 0,6 oranında kuprizon karıştırarak ciddi demiyelinizasyon elde etmişlerdir (96).

2.3. MS KLİNİĞİ VE TEDAVİSİ

MS hastalarında klinik seyir değişkendir (97). MS'da en sık görülen klinik seyir Relapsing Remitting MS (RRMS)'tir. RRMS'da hastalık, seyri öngörülemeyen relaps ve remisyon ataklarıyla seyreder. Bu ataklar saatler ve günler içinde ortaya çıkar, 2-6 hafta devam eder, sonrasında hasta remisyona girer ve bazen hasta, bu tek ataktan sonra tamamen iyileşir (benign MS). RRMS seyirli hastaların 10 yılda % 50'sinde ve 20 yılda % 90'ında progresif seyirli MS (Sekonder Progresif MS – SPMS) gelişir. Hastaların bir kısmında ise başlangıçtan itibaren semptomlarda, bir yıl veya daha uzun süren sürekli kötüleşme haliyle giden bir progresif seyir vardır (Primer Progresif MS – PPMS). Ve bazen progresif seyirli başlayan hastalığa süperimpoze ataklar eklenebilir (Progresif Relapsing MS – PRMS).

MS'da görülen lezyonlar beyin ve spinal kordda MSS'nin tüm fonksiyonlarına zarar verebilir. Hastada görülen semptomlar lezyonun tutulum yerine göre değişir. En sık görülen semptomlar arasında; yorgunluk, otonom sinir sistemi problemleri, kognitif bozukluklar, depresyon, optik nörit, spastisite, transvers miyelit, ürogenital bozukluklar ve duysal sorunlar bulunmaktadır (98).

MS'un kesin bir tedavisi yoktur. Tedavi, hastalığın klinik seyrine yönelik tedavi, atak tedavisi ve semptomatik tedavi olmak üzere üç başlık altında değerlendirilir. Hastalığın klinik seyrine yönelik en sık immunmodulatör ilaçlar kullanılır (99). Başlangıç tedavisinde uygulanan bu immunmodulatör ilaçlar arasında interferon (IFN) beta ve glatiramer asetat yer alır. Hastalığın değişken klinik seyrine ve tedaviye cevaba göre, bir monoklonal antikor olan natalizumab ve bir immunsupresif ajan olan mitoksantron da MS tedavisinde kullanılır. MS ataklarının tedavisinde metilprednizolon uygulanır. Metilprednisolona reaksiyon geliştiği

durumlarda deksametazon ve steroide cevap alınamayan durumlarda intravenöz immunglobulin uygulanabilir.

MS'un semptomatik tedavisinde, her bir semptoma yönelik ilaç tedavisi, bu semptomlara benzer yan etkileri olan başka ilaçlardan kaçınma ve ek besin desteği ile hasta eğitimi yer almaktadır. Kullanılan bazı ilaçlar arasında yorgunluk için modafinil, amantadin; kognitif bozukluklar için glukokortikoidler; affektif bozukluklar için selektif serotonin geri alım inhibitörleri; spastik nörojen mesane için antikolinerjik ilaçlar; ağrı için gabapentin ve spastisite için baklofen yer almaktadır (9).

2.3.1. Baklofenin Klinik Özellikleri

Baklofen selektif GABA-B agonisti bir ajandır. Klinik olarak antispastisite, antinosiseptif, antitussive ve bronkodilatatör etkilerinin yanında madde bağımlılığını azalttığı, kan basıncını arttırdığı ve bazı kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (10). Baklofen klinikte spastisite tedavisinde onaylı bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Özellikle MS hastalarında görülen spastisite tedavisinde kullanılır.

Spastisite, MS'da görülen kortikal veya spinal lezyonlara bağlı olarak ortaya çıkar. Spastisite, "üst motor nöron sendromunun bir komponenti olarak, germe refleksinin hipereksitabilitesinden kaynaklanan, aşırı kas seyirmeleri ve tonik germe reflekslerinde (kas tonusu) hıza bağımlı artmayla karakterize bir motor bozuluk" olarak tanımlanır (100). Ağrı ve kas krampları da spastisiteye eşlik eder. Spastisitenin derecesi modifiye Ashwarth skalası ile değerlendirilir (101). Pozitif ve negatif belirtileri vardır. Pozitif belirtileri arasında; hızlı gerilmeye artmış yanıt, antagonist kaslarda kontraksiyon, hiperaktif derin tendon refleksleri, klonus, anormal kutanöz refleksler ve kas sertliği yer alır. Negatif belirtileri arasında ise; kordinasyon kaybı, azalmış hareket, artmış güçsüzlük ve yorgunluk vardır (9).

Baklofen spastisite tedavisinde oral veya intratekal yoldan uygulanır. Oral baklofen, sıklıkla hafif ve orta dereceli spastisitede kullanılır. Uygulamada spastiteye yanıt alana kadar doz arttırımına gidilir. Yan etkileri arasında uyuşukluk, bulantı, ağız kuruluğu ve baş dönmesi vardır. Oral tedavide baklofenin yanısıra tizanidin, dantrolen veya benzodiazepin kullanılır. Yüksek doz oral baklofen kullanımında tolerans ve ciddi yan etki riski yüksek olduğu için intratekal kullanıma geçilir. İntratekal baklofen (İTB) 1992 yılında ciddi spastisite tedavisinde kullanılmak üzere FDA'den onay almıştır. İTB, programlanabilir bir pompaya bağlı kateterle

intratekal alana baklofen uygulanması esasına dayanır. Daha düşük dozlarda baklofen uygulandığı için daha az yan etki riski vardır (9, 102).

Baklofenin diğer bir etkisi aktiviteyi azaltmasıdır. Baklofenin deney hayvanlarında lokomotor aktiviteyi azalttığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. 5 ve 10 mg/kg dozlarında baklofenin kullanıldığı bir çalışmada, açık alan testinde lokomotor aktiviteyi azaltmıştır (11). Başka bir çalışmada, 1.25 ve 2.5 mg/kg dozlarındaki baklofen, nikotinin indüklediği hiperaktiviteyi azaltmıştır (103). Bu etki morfinin indüklediği hiperaktivitede de gösterilmiştir (104).

Diğer yandan baklofenin bağlandığı GABA-B reseptör yolağının inhibe edildiği durumlarda lokomotor aktivite artar. GABA-B(1b) reseptör geni silinmiş farelerde, aktivite kontrol grubuna göre daha fazla çıkmıştır (105). GABA-B reseptör uyarısıyla aktifleşen GIRK/Kir3 tipi K kanalı geni silinmiş farelerde yapılan açık alan testinde; aktiviteyi gösteren total mesafe artmış ve merkezi alana giriş artarak daha az anksiyete belirtisi ortaya çıkmıştır (106). Başka bir çalışmada, açık alan testinde GABA-B reseptör antagonisti bir ajan aktiviteyi arttırmıştır (107).

Baklofenin besin alımı ve vücut ağırlığı üzerine etkileri de çalışılmıştır. Baklofen hiperfajiye yol açarak besin alımını arttırır. Akut veya kronik baklofen uygulamasının fare veya sıçanlarda besin alımını arttırdığı gösterilmiştir (12, 108, 109). Ancak baklofenin vücut ağırlığı üzerine etkisine yönelik çalışmalarda, farklı sonuçlar bulunmuştur. Patel ve ark., sıçanlara 24-27 gün süresince uyguladıkları 1 ve 2 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını değiştirmedigini, ancak 4 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını azalttığını gösterdiler (12, 109). Bonaventura ve ark. ise, farelere uygulanan 5 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını değiştirmediğini gösterdiler (110). Ancak diğer bir çalışmada ise baklofen reseptörü GABA-B (1b) geni silinmiş farelerin vücut ağırlığının kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (105).

2.4. GABAERJİK İLETİ VE GABA-B RESEPTÖRÜ

2.4.1. GABA Nörotransmitteri

GABA MSS'nin majör inhibitör nörotransmitteridir. GABA beyin dokusunda Roberts ve Frankel tarafından, purkinje hücrelerinin inhibitör etkisini taklit ettiği Obata ve ark. tarafından ve purkinje hücrelerinde immunohistokimyasal olarak GABA sentezleyen enzim Saito ve ark. tarafından ilk defa gösterildi (13, 111, 112).

Hücrede GABA sentezleyen enzim glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimidir. Sinir uçlarında GAD65 ve sitoplazmada GAD67 lokalizasyonuyla iki tür GAD enzimi bulunmaktadır. GABA, GABA transaminaz (GABA-T) enzimiyle glutamata metabolize olur. GABA-T enzimi, hem GABAerjik hem de GABAseptif hücrelerde bulunarak sadece GABAerjik hücrelerde bulunan GAD enziminden daha yaygın olarak bulunmaktadır.

MSS'nde azalmış GABA aktivitesindeki değişimler bazı hastalıklarla birliktedir. Azalmış GABA sistemi aktivitesinde epilepsi, spastisite, stres, uyku bozukluğu, depresyon, bağımlılık ve ağrı görülürken, artmış GABA aktivitesinde şizofreni görülür (113). Diğer yandan serebral iskemide, kafa travmasında ve subaraknoidal hemorajide ölçülebilir GABA artışı vardır (114).

2.4.2. GABA-B Reseptörü

GABA, etkisini nöronlarda bulunan reseptörleri üzerinden gösterir. GABA reseptörleri etki mekanizması olarak iyonotropik (GABA-A, GABA-C) ve metobotropik (GABA-B) reseptörler olmak üzere ikiye ayrılır. GABA-A ve GABA-C hücrelerde klor (Cl^-) kanallarına etki edip hücre içi Cl^- düzeylerlerini arttırarak inhibitör etki gösterir. GABA-B reseptörleri ise G proteinine bağlı reseptör ailesindendir (115). Sinaptik alanda GABA-A hızlı inhibisyondan, GABA-B ise yavaş ve geç inhibisyondan sorumludur (10).

GABA-B, inhibitör etkisini G_α alt ünitesine bağlanıp adenilat siklaz aktivitesini azaltarak ve $G_{\beta\gamma}$ alt ünitesine bağlanıp kalsiyum kanal aktivitesini azaltarak ve potasyum kanal aktivitesini arttırarak gösterir (10). GABA-B reseptörleri pre ve post sinaptik sinir uçlarında bulunmaktadır. Presinaptik GABA-B reseptörleri voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını inhibe ederek nörotransmitter salınımını baskılar, postsinaptik yerleşimli GABA-B reseptörleri ise adenilil siklaz inhibisyonu ile ve Kir3 tipi potasyum kanallarını aktive ederek postsinaptik membran hiperpolarizasyonuna neden olur (14).

GABA-B reseptörü ilk defa otonomik sinir terminalinde, GABA-A antagonisti bikukuline duyarsız ve baklofene duyarlı (baklofen GABA-A reseptörüne etkisiz), tanımlandı (116). Ardından GABA-B'yi kodlayan ilk cDNA (GABA-B1a ve GABA-B1b) ve diğer bir cDNA tanımlandı (GABA-B2) (15, 115). İki majör GABA-B reseptör isoformu (B1 ve B2) ve birçok alt tipi (B1a-g) vardır (116). MSS nöronlarında GABA-B1 ve B2 çoğunlukla birlikte eksprese olurlar. Heterodimerik bir birliktelikle reseptör işlevsel olarak çalışır (10). GABA-B1, GABA bağlarken GABA-B2 sinyali hücre içine iletir (14).

GABA-B reseptörleri MSS'nde en sık, talamik çekirdekler, serebellum, serebral korteks ve spinal kordun dorsal boynuzunda bulunur (10). GABA-B, MSS'nin yanı sıra PSS'nde de tanımlanmıştır. Aslında GABA-B ilk defa PSS'nde, otonomik sinir terminalinde tanımlanmıştır (116). Bunun yanı sıra sıçanlarda siyatik sinirde de gösterilmiştir (22).

2.4.3. Nöronal Hasar Modeli Olarak İskemide GABAerjik İleti

İskemide GABA-B'nin selektif agonisti baklofenin, nöroprotektif özellikler gösterdiği bir çok çalışmada ortaya konmuştur. Sıçan hipokampal kesitlerinde uygulanan in vitro oksijen-glukoz yoksunluğu (deprivasyon) modelinde, floresan mikroskopide iskemiyle artan nöron hücre ölümünün, baklofen ile anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (17). Bir başka çalışmada 20 mg/kg baklofenin sıçanlarda iskemiye bağlı anormal davranışları ve ölümleri azalttığı ama kendisinin de kan basıncını arttırıp intraserebral hemorajiye neden olarak ciddi ölümlere neden olduğu gösterilmiştir (16). Gerbil türü deney hayvanlarında oluşturulan in vivo iskemi-reperfüzyon modelinde, farklı dozlarda baklofenin (25, 50, 100 mg/kg) histolojik incelemelerde korteks, korpus striatum, talamus ve özellikle hipokampüste nöronal hasarda anlamlı derecede iyileşmeye neden olduğu gösterildi (117). Sıçan kortikostriatal kesitlerinde uygulanan in vitro iskemi modelinde, elektrofizyolojik çalışmalarda iskemiyle kaybolan alan potansiyelleri, baklofen ve GABA-A agonisti muskimol ile birlikte anlamlı düzeyde artmıştır (118).

Baklofen yukarıda anlatıldığı üzere iskemide nöronal hasarı azaltır. Bu etkisini nöronal hasarda rol alan glutamat ve NO düzeylerini azaltarak gösterir. In vivo iskemi modelinde, baklofen, sıçan striatum ve hipokampüsünde eksitotoksik etkili glutamat düzeylerini düşürür (119, 120). Baklofen, nNOS fosforilasyonunu arttırarak NO düzeylerini düşürür ve bu etkisiyle sıçanlarda oluşturulan in vivo iskemi modelinde, iskemiyle artmış NO aracılı hipokampal dejenerasyonu azaltır (121). Cheng ve ark.'nın çalışmalarında, NO üretiminde rol alan PSD95, nNOS, iNOS ve nitrotirozin + hücre sayılarının, sıçanlarda oluşturulan in vivo

iskemi modelinde, artış gösterdiği ve bu artışın ferulik asit ile tersine çevrildiği gösterilmiştir. GABA-B antagonisti saklofen ise ferulik asitle sağlanan nöroprotektif ektiyi tersine çevirmiştir. Yine ferulik asitin nöroprotektif etkileri sonucunda apoptozda rol alan kaspas-3, bax, sitokrom c ve fosfo MAP kinaz düzeyleri ile apoptotik hücre sayısı düşürülmüş ve bu etkiler saklofen ile tersine çevrilmiştir. Bu çalışmada ferulik asitin GABA-B1 düzeylerini de anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiş ve ferulik asitin iskemik koşullarda artan nöronal NO aracılı apoptozisi önleyici etkisini GABA-B reseptörleri üzerinden gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (122).

İskemik koşullarda GABA nörotransmitteri ve GABA-A reseptörü üzerinden aktivite gösteren bir çok ajan benzer ve farklı mekanizmalarla nöroprotektif sonuçlar ortaya çıkarmışlardır. Bu nöroprotektif etkiler; GABA-A reseptörüne bağlanarak GABA'nın etkisini arttıran diazepam, GABA-A reseptörü üzerinden etki gösteren klometiazol GABA ve GABA düzeylerini arttıran GABA-T inhibitörleri vigabatrin ve taurin analogları ve yapısal bir GABA analoğu olan gabapentin ile yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (123-126).

2.4.4. Nöroimmün Hasar Modeli Olarak MS'da GABAerjik İleti

Baklofen, MS kliniğinde, spastisite tedavisinde kullanılan bir ajandır. Çalışmalarda trigeminal nevralji ve nörojen mesane gibi MS'da sıklıkla rastlanan semptomlarda da etkinliği gösterilmiştir. Ancak, MS'da görülen birçok semptomda faydalı olduğu gösterilen baklofenin, MS'da ve deneysel hayvan modellerinde patolojik süreçlere ne gibi etkilerde bulunduğuna, literatürde rastlanmamıştır.

MS hastalarının kanında, beyin omirilik sıvılarında (BOS) ve posmortem kortikal dokularında yapılan incelemelerde, GABA, GAD, GABA-A reseptörü ve GABAerjik internöron proteinleri olan parvalbumin, kolesistokinin ve takikinin düzeyleri düşük bulunmuştur (127-130).

DOE geliştirilmiş deney hayvanlarında da GABAerjik iletide rol alan moleküllerde belirgin azalma gösterilmiştir. DOE geliştirilmiş deney hayvanlarının spinal kordlarında GABA, GABA geri alımı ve GAD düzeylerinin azaldığı ve hipokampal GABAerjik internöronlarda belirgin azalma gösterilmiştir (131-133). DOE geliştirilmiş farelerin spinal kordunda GABA transporter-1 (GAT-1) mRNA ve protein düzeyleri de düşük bulunmuştur (134). Yine bu çalışmada, GAT-1 geni silinmiş farelerde DOE indüklendiğinde; klinik belirtilerin DOE kontrol grubuna göre çok daha şiddetli olduğu, histolojik incelemelerde

spinal kordda daha fazla hücresel infiltrasyon (T lenfosit, granülosit, makrofaj ve B lenfosit) ve demyelinizasyon varlığı ile dalak ve spinal kordda IFN-gama, TNF-alfa, IL-6, IL-17 ve IL-23 sitokinlerinin düzeylerinde daha fazla artış gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, DOE geliştirilmiş farelerden alınarak hazırlanan strital kesitlerde yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda, farelerde motor defisit geliştiği dönemde, GABA aktivitesinin bir ölçütü olan inhibitör postsinaptik akım düşük bulunmuştur (135). GABA aktivitesindeki bu azalma, striatumda bulunan GABAerjik parvalbumin (+) internöronlarında histolojik olarak gösterilen azalmaya bağlanmıştır. DOE indüklenen gruplarda western blot analizlerinde de parvalbumin ekspresyonları düşük bulunmuş ve nöron hücre kültüründe Th1 sitokinlerinin parvalbumin mRNA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Rossi ve ark. bir sonraki çalışmalarında, normal fare kortikostriatal kesitlerini MS hastalarından aldıkları BOS ile yıkayarak, BOS'da bulunan birçok sitokinin GABA aktivitesi üzerine etkisini değerlendirdiler (136). MS'lu hastaların BOS'u striatal postsinaptik iletiyi düşürdü ancak bu azalma GABA-A antagonisti bikukulin ve IL-1beta antagonisti ile tersine çevrildi. Böylece MS'lu hastaların BOS'unda bulunan Il-1beta'nın farelerin striatumunda bulunan GABA-A reseptörü üzerinden GABA aktivitesini düşürdüğü gösterilmiş oldu. Başka bir çalışmada da TNF-alfa'nın GABA-A ekspresyonunu ve inhibitör sinaptik iletiyi düşürdüğü gösterilmişti (137). Bu çalışmalarla MS'un akut döneminde yükselen proinflamatuar sitokinlerle inhibitör nöral ileti arasındaki bağlantı ortaya çıkarılmış oldu.

MS ve DOE modelinde, GABA nörotransmitteri ve GABA-A reseptörleri üzerinden GABAerjik inhibitör yolakta artışa neden olan faktörlerin, nöroprotektif sonuçlar ortaya çıkardığı gösterilmiştir. GABA-A aracılı kortikal inhibisyonda artış, Th2 lenfositlerinden salınan nöroprotektif etkili IL-13 düzeylerinin, MS hastalarının BOS'unda artmasıyla korelasyon gösterir (135). Bu GABA-A aracılı kortikal inhibisyon ile IL-13 artışının birlikteliği, MS hastalarında düşük düzeylerde bulunan amiloid-beta ve incelmiş retinal sinir kalınlığında artışa da neden olmaktadır.

DOE gelişiminde GABA'nın nöroprotektif etkileri de pek çok çalışmada gösterilmiştir. GABA-A agonisti topiramat ve muskimolün ve GABA-T inhibitörü vigabatrin ve gabakulinin DOE gelişimini, semptomların şiddetini ve histolojik incelemelerde inflamatuar odakların sayısını düşürdüğü gösterildi (18). Bu ajanlar in vitro şartlarda; antijen sunan hücrelerden salınan IL-1beta ve IL-6 salınımını düşürerek, T lenfosit proliferasyonunu ve sitokin üretimini düşürdü. Diğer bir çalışmada, Sternberg ve ark. yapısal bir GABA analoğu olan akamprosatın DOE gelişme sıklığını düşürdüğünü, semptomların ortaya çıkma zamanını ve şiddetini

azalttığını gösterdiler (19). Bu çalışmada akamprosatın TNF-alfa düzeylerini düşürdüğü ve histolojik incelemelerde inflamasyonu ve demyelinizasyonu azalttığı da gösterilmiştir. GABA-A reseptörüne bağlanarak GABA'nın etkisini arttıran diazepamın da DOE insidansını anlamlı derecede düşürdüğü gösterilmiştir (138). Bu çalışmada diazepamın, sıçan spinal kordunun histolojik incelemelerinde inflamatuar infiltrasyonu düşürdüğü gösterilmiş, hücresel (MBP'ne karşı gelişen gecikmiş tip hipersensitivite) ve hümoral immun yanıt (serum anti-MBP IgG düzeyleri) diazepam alan gruplarda daha düşük bulunmuştur.

2.5. GLİAL HÜCRELERDE GABA-B RESEPTÖRÜ

2.5.1. Oligodendrositlerde GABA-B reseptörü

MSS'nde miyelin kılıf oluşumundan sorumlu glial hücre olan oligodendrositlerde GABA-B reseptörünün varlığına yönelik bilgiler zayıftır. Yapılan iki çalışmada olgun oligodendrositte GABA-B reseptörünün olmadığı ya da çok zayıf ekspresyon gösterdiği bulunmuştur (20, 21). Luyt ve ark.'nın yaptığı çalışmada, GABA-B reseptörünün olgun oligodendrositlerde zayıf ekspresyon gösterirken oligodendrosit öncü hücrelerinde daha fazla olduğu gösterildi. Çalışmada, öncü hücrelerde bulunan GABA-B reseptörünün alt tipleri ve reseptörün fonksiyonel çalışabilmesi gerekli bu alttipler arasındaki heterodimerik yapı da gösterildi. Ayrıca bu hücrelerde forskolin ile indüklenen siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerinin baklofen ile düşürüldüğü de gösterilerek, GABA-B'nin fonksiyonel olarak aktif olduğu gösterildi. Öncü hücrelerde cAMP düzeylerindeki değişimlerin oligodendrosit farklılaşması, çoğalması ve göçünde etkili olduğu gösterilmişti (139, 140). Luyt ve ark.'larının çalışmasında bulunan önemli bulgulardan biri de baklofenin öncü hücre göçünü ve proliferasyonunu arttırması oldu.

PSS'nde miyelin üretiminden sorumlu hücre olan schwann hücrelerinde de GABA-B1 ve B2 reseptör alt tipleri gösterildi (22). Ancak GABA-B reseptörü miyelinizasyon yapmayan formdaki schwann hücrelerinde lokalizasyon gösterdi (141). Sıçan siyatik sinirinden alınan schwann hücre kültüründe, baklofen hücre içi cAMP düzeylerini azaltarak, hücre proliferasyonunu ve miyelin protein ekspresyonunu inhibe ettiği gösterildi (22). Ayrıca GABA-B1 geni silinmiş sıçanlarda, siyatik sinirde miyelin protein ekspresyonunun arttığı gösterildi (142).

2.5.2. Mikroglialarda GABA-B reseptörü

MSS'nin lokalize makrofajları olan mikroglialar da GABA-B reseptörü ve altünitelerini eksprese eder (20, 24). Kuhn ve ark.'nın gösterdiği ilk bulgularda, aktive mikroglialara kronik GABA uyarısıyla IL-6 ve IL-12 düzeylerinde azalma görülürken, TNF-alfa ve NO düzeyleri değişmemiştir. Ancak Lee ve ark.'nın yakın zamanda yayınladıkları çalışmalarında, mikroglialarda bulunan GABA-B reseptörünün uyarılmasının, inflamatuar bir uyarıya karşı mikroglial immun yanıtı baskılandığı yönünde olmuştur (25). Çalışmada, LPS veya IFN-gama ile uyarılan aktive mikroglial hücrelere GABA-B agonisti baklofen verildiği durumda; hücrede NFkB ve MAP kinaz aktivitesinde, hücreden IL-6 ve TNF-alfa salınımında ve mikroglianın nöral hücre üzerine olan nörotoksik etkisinde bir azalma gösterilmiştir.

Beyin dışındaki periferik organlarda bulunan makrofajlarda da GABA-B reseptörleri ve anti-inflamatuar etki gösterilmiştir. Sıçan dizindeki sinoyval membranda bulunan makrofaj benzeri A hücrelerinde GABA-B reseptör alt ünitelerinin ekspresyonu gösterildi (143). Yine başka bir çalışmada alerjik kontakt dermatit oluşturulmuş deney hayvanlarında, baklofenin kemokin düzeylerini azaltarak inflamasyon alanına lökosit infiltrasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir. Aynı çalışmada baklofenin, insan kanındaki lökositlerde TNF-alfa düzeylerini düşürdüğü de gösterilmiştir (144).

2.5.3. Astrositlerde GABA-B reseptörü

Astrositte GABA-B reseptörlerinin varlığına yönelik ilk bulgular Albrecht ve ark.'nın yaptığı çalışmayla ortaya kondu (23). Çalışmada, kortikal astrosit hücre kültürüne GABA ve GABA-B agonisti baklofen uygulandığında, ortama GABA-A antagonisti bikukulin verildiğinde değişmeyen, hücre dışına kalsiyum çıkışında bir azalma görüldü. Bu çalışmayla ilk defa astrositte GABA nörotransmitterinin GABA-B reseptörü aracılığıyla hücre dışına kalsiyum çıkışında azalmaya neden olduğu gösterildi. Bu çalışma, beynin farklı bölgelerinden (serebellum, beyin sapı, spinal kord) alınarak hazırlanan astrosit hücre kültürlerinde GABA-B reseptörünün varlığı ve baklofenin hücre içi kalsiyum düzeylerini arttırdığı gösterilerek desteklendi (145, 146).

Ardından GABA-B reseptör alttipleri GABA-B1 ve B2, hipokampüste ve astrosit hücre kültüründe gösterildi (20, 147, 148). Lopez ve ark.'nın yaptığı çalışmada postnatal ikinci haftada sıçan hipokampal formasyonunda bulunan astrositlerde GABA-B1a/b gösterilirken, GABA-B2 reseptör alttipi gösterilemedi (147). Oka ve ark.'nın yaptığı çalışmada, astrosit

hücre kültüründe forskolin ile aktive edilmiş adenilil siklaz aktivitesinin baklofen ile düşürüldüğü ve bu etkinin GABA-B antagonistleriyle doz bağımlı olarak tersine çevrildiği gösterildi (148). Böylece bu çalışmayla GABA-B'nin astrositlerde de nöronlarda olduğu gibi adenilil siklazı azalttığı gösterilmiş oldu.

GABA-B reseptörlerinin astrositlerdeki fonksiyonlarına yönelik yapılan bir çalışmada, Lee ve ark., baklofenin hücrede antiinflamatuar bir etkinlik gösterdiğini bulmuştur. Bu etkisini, hücrede NFkB ve MAP kinaz aktivitesini baskılayarak, hücreden IL-6 salınımını azaltarak ve astrositin nöral hücre üzerine olan nörotoksik etkisini azaltarak gösterir (25).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

Çalışmada 8-12 haftalık C57BL/6 türü erkek fareler (*İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü*) kullanıldı (5). Deneysel çalışmalar İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Laboratuvarı ve Tıbbi Farmakoloji AbD Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney hayvanları dörderli gruplar halinde ayrı kafeslerde barındırılıp, onikişer saatlik aydınlık-karanlık sürelerinde, havalandırma-nem kontrolünün olduğu koşullarda tutuldu ve yem-su erişimi serbest bırakıldı. Deneysel çalışmalar İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun olarak yürütüldü.

3.2. Kuprizon Uygulaması

Deneysel demiyelinizasyon oluşturmak için farelere beş hafta süresince % 0,2 oranında kuprizon içeren yem verildi. Remiyelinizasyon oluşturmak için, yine beş hafta kuprizon verildi, ardından kuprizon diyetten çıkarıldı ve iki hafta süresince normal yem verildi (63). Normal miyelinizasyon için beş hafta süresince kuprizonsuz normal yem verildi. Deney hayvanlarının yemi firmadan (*MBD Yem Tic.*) toz halinde alındı. Yem kafes içine sabitlenen petri kabına kondu ve herbir kafesteki yem günlük hazırlandı (Resim 1).



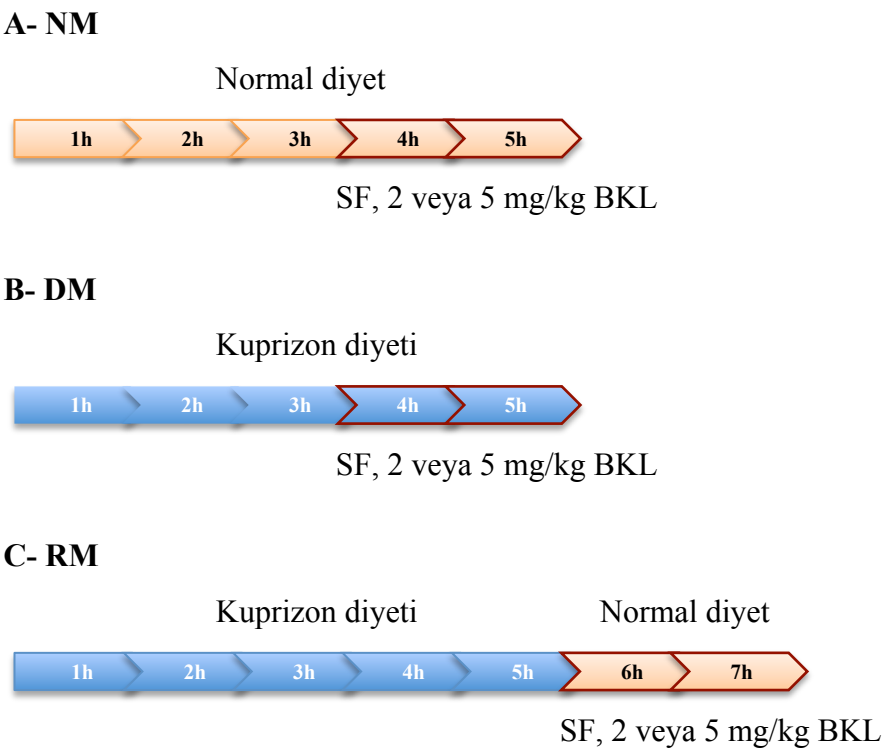
Resim 1. C57BL/6 türü erkek farelere kuprizon uygulaması

3.3. Baklofen Uygulaması

2, 5 mg/kg dozlarında ve 10 ml/kg hacminde intraperitoneal yoldan uygulanan (±) baklofen (*Sigma*), % 0,9 serum fizyolojik (SF) içinde çözünerek hazırlandı (109, 149). Baklofenin kontrolü olarak aynı hacimde SF uygulandı. Baklofen iki hafta süresince günlük tek doz uygulandı. Enjeksiyonlar gün içinde 15:00 - 17:00 saatleri arasında uygulandı.

Baklofen ve SF enjeksiyonları, beş hafta kuprizonlu yem veya kuprizonsuz normal yem verilen farelerde son iki hafta (4. ve 5. hafta) uygulandı. Beş hafta kuprizon diyetinden sonra kuprizon diyetten çıkarılıp iki hafta normal diyete devam edilen farelerde ise, enjeksiyonlar kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra (6. ve 7. hafta) uygulandı.

3.4. Deney Grupları



Şekil 2. Çalışma modeli ve deney grupları. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen ve h: hafta.

Normal miyelin (NM): Beş hafta normal diyet verilen farelere 4. ve 5. haftalarda SF, 2 veya 5 mg/kg baklofen (BKL) enjeksiyonları uygulandı (Şekil-2A). Deney grupları: NM-SF grubu (n=7), NM-2mgBKL grubu (n=7), NM-5mgBKL grubu (n=8).

Demiyelinizasyon (DM): Beş hafta kuprizon verilen farelere, 4. ve 5. haftalarda SF, 2 veya 5 mg/kg baklofen enjeksiyonları uygulandı (Şekil-2B). Deney grupları: DM-SF grubu (n=8), DM-2mgBKL grubu (n=8) ve DM-5mgBKL grubu (n=8).

Remiyelinizasyon (RM): Beş hafta kuprizon diyetinden sonra kuprizon diyetten çıkarılıp iki hafta normal diyete devam edilen farelerde, kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra (6. ve 7. hafta) SF, 2 veya 5 mg/kg baklofen enjeksiyonları uygulandı (Şekil-2C). Deney grupları: DM-SF grubu (n=8), DM-2mgBKL grubu (n=8) ve DM-5mgBKL grubu (n=8).

Çalışma 72 adet fare üzerinde uygulandı ancak deney tamamlanmadan 2 fare öldü.

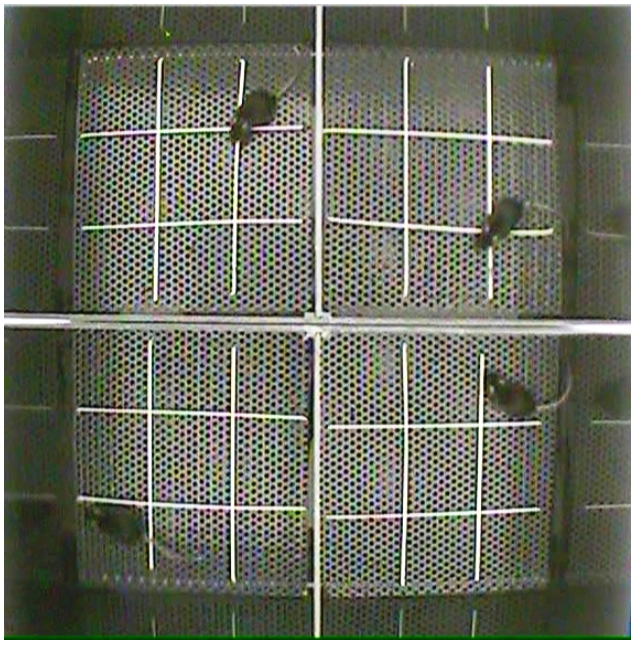
3.5. Vücut Ağırlığı

Beş hafta normal diyet veya kuprizon diyeti ile beslenen ve son iki haftasında serum fizyolojik uygulanan iki grupta, haftada bir vücut ağırlığı ölçümleri yapıldı. Ayrıca tüm gruplarda, baklofen veya SF enjeksiyonlarının uygulandığı iki haftalık dönemin başlangıcında ve sakrifikasyondan önce vücut ağırlığı ölçümleri yapıldı. Vücut ağırlığı, başlangıç değerlere göre yüzde değişim olarak hesaplandı.

3.6. Açık Alan Testi

Açık alan testi deney hayvanlarının aktiviteleriyle birlikte duygu durumunu değerlendiren bir testtir. Sıklıkla zemini merkez ve perifer alanlara ayrılan pleksiglas bir kutuya alınan deney hayvanlarında; belirli bir süredeki toplam katettiği mesafe veya alanlar arası geçiş sayısı (lokomotor aktivite) ve merkez alanda katettiği mesafe veya geçirdiği süre (anksiyete) değerlendirilir. Deney hayvanlarının merkezden uzakta, yan duvarlara daha yakın periferik alanlarda daha fazla zaman geçirmesi anksiyetik davranışı ifade eder (150).

Açık alan testi yan duvarları siyah renkli pleksiglastan ve zemini ızgaradan hazırlanan 30x30x30 cm'lik kutuda yapıldı (Resim 2). Kutunun zemini her biri 10 cm^2'den oluşan dokuz kareye ayrıldı. Dört kutu yan yana getirilerek aynı anda dört farenin aktivitesi, kutunun zemininden itibaren bir metre yükseğe sabitlenen kamerayla çekim yapılarak bilgisayara kaydedildi. Tüm gruplarda son enjeksiyondan 30 dakika sonra teste alınan fareler, zeminin ortasına bırakıldıktan sonra kamerayla çekime başlandı ve 10 dakika kayıt yapıldı (149).



Resim 2. Açık Alan testi

Tüm deney gruplarında sakrifikasyondan önce açık alan testine alınan farelerde lokomotor aktivite ve anksiyete değerlendirildi. Lokomotor aktivite için toplam kare geçiş sayısı ve anksiyete için merkez kareden geçiş sayısının toplam kare geçiş sayısına yüzde oranı hesaplandı ve % merkez kare olarak ifade edildi.

3.7. İntrakardiyak Perfüzyon

3.7.1. Araç – Gereç

Peristaltik pompa, serum fizyolojik, % 10 nötral formaldehit, serum seti, kelebek iğnesi (23G), insülin enjektörü ve iğnesi, beher, buz ve buz kabı, saklama kabı, ketamin, ksilazin, cerrahi alet seti, maket sünger ve ışık kaynağı (Resim 3).

3.7.2. İntrakardiyak Perfüzyon

- Serum seti hortumu peristaltik pompaya bağlandı.
- Kelebek iğnesinin hortumu, peristaltik pompada bulunan serum seti hortumuna bağlandı.
- Bir behere serum fizyolojik, diğer bir behere % 10'luk nötral formaldehit konarak buz kabının içinde tutuldu.



Resim 3. İntrakardiyak perfüzyon düzeneği

- Tüm sistemden hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde birkaç defa serum geçirildi.
- Peristaltik pompa 0.5 ml/dk'dan fazla olmayacak bir şekilde ayarlandı.
- Farede 50-150 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin ile anestezi sağlandı.
- Anesteziye giren fare maket süngerde, sırtüstü insülin enjektör iğnelerinin yardımıyla el ve ayaklarından gerdirilerek sabitlendi.
- Deri ve abdomen karın bölgesinden göğüs kafesine kadar açıldı. Ardından karaciğeri net bir şekilde izleyebilmek için yanlara doğru da açılarak her iki taraftan gerdirilip sabitlendi.
- Göğüs kafesi boyna kadar açıldı, altta diyafragma her iki tarafta açıldı ve göğüs kafesi kalbi ortaya çıkaracak şekilde iki taraflı sabitlendi.
- Perfüzyon pompasındaki serum setine bağlı olan kelebek iğnesiyle sol ventriküle (5 mm) girildi, hemen ardından sağ atrium kesildi ve pompa çalıştırıldı (Resim 4).
- İlk 10 dakika sistemden serum fizyolojik geçirilerek kan uzaklaştırıldı.
- Bu dönemde perfüzyonun sağlandığı karaciğerde ilk 3-5 dakika içinde solmanın gözlenmesiyle ortaya kondu. Eğer bu dönemde karaciğer koyu kırmızı rengini koruyor ya da burundan serum geliyorsa kelebek iğnesinin ucu sol ventrikül içinde olmayabileceği göz önüne alınarak kelebek iğnesi sol ventrikül içinde olacak şekilde yeniden ayarlandı.



Resim 4. Farede intrakardiyak perfüzyon uygulaması

- Serum fizyolojik ile perfüzyon sonrası perfüzyon pompasında bulunan serum hortumunun diğer ucu, içinde serum bulunan beherden çıkarılıp hızlıca içinde formaldehit bulunan behere alındı. Formaldehit verme süresi 30 dakikada tutuldu.
- Başta bu değişim döneminde olmak üzere tüm perfüzyon süresince pompa düzeneğinde hava kabarcığının olmadığından emin olundu.
- Formaldehit farenin vücuduna ulaştıktan sonra, kuyruk kesilerek, kesi yerinden formaldehit çıkışı gözlendi.
- İntrakardiyak perfüzyon uygulamasından sonra farenin başı bir makasla gövdesinden ayrıldıktan sonra kafa derisi ve beynin etrafını saran kemik yapı hassas bir şekilde beyne zarar vermeyerek uzaklaştırıldı ve beyin çıkarıldı.
- Çıkarılan beyin dokusu % 10 nötral formaldehit içeren bir saklama kabına alınarak +4°C'de saklandı.

3.7.3. Takip – Parafin blok – Kesit alma

Nötral formaldehitten çıkarılan beyin dokuları, serebrum ile serebellum arasından bir bıçakla kesildi ve ardından belirli aralıklarla etil alkol serilerinden geçirildi, Ardından parafin ile fiksasyona tabi tutuldu, Parafine gömülmüş serebral beyin bloklarından mikrotom ile 5 µm kalınlığınlığında seri koronal kesitler alındı. Kesitler, Sidman'ın fare beyin atlasına göre 240-290 aralığında alındı (151).

3.7.4. LFB – PAS boyama

Kesitler toluolde deparafinize edildikten sonra, etil alkol (% 100, 95) serilerinden geçirildi. % 1 oranında Luksol fast mavisi (Luxol fast blue, LFB, *Solvent Blue 38, Sigma*) solüsyonu hazırlandı: 1 gr LFB + 100 ml % 95 etil alkol + 5 ml % 10 asetik asit. Preparatlar, LFB solüsyonu içinde 57°C'de bir gece bekletildi, Ardından % 95 etil alkol, distile su, % 0,05 lityum karbonat, % 70 etil alkol ve distile su serilerinden geçirildi. LFB ile miyelinize alanlar boyandıktan sonra, arka plan boyaması olarak rutin periodik asit şift (PAS) boyaması yapıldı.

3.7.5. İmmunohistokimya

Kesitler deparafinizasyon işlemi için toluol, etil alkol (% 100, 96, 90, 70) ve distile su serilerinden geçirildi. Bazı immun boyamalarda (Iba1, MBP) deparafinizasyondan sonra sitrat tamponu ile antijen retrieval işlemi uygulandı. Ara yıkamaları PBS ile yapılan kesitlere, sırasıyla hidrojen peroksit ve blok solüsyonu damlatıldı. Ardından primer antikor [myelin için anti-MBP (1:200, *Bioss*), oligodendroglia için anti-Olig2 (1:500, *Millipore*), olgun oligodendrosit için anti-NogoA (1:100, *Bioss*), astrosit için anti-GFAP (1:250, *Bioss*), mikroglia için anti-Iba1 (1:250, *Bioss*)] damlatılan kesitler bir gece oda ısısında bekletildi (7, 152). Sonraki gün sırasıyla sekonder antikor (Biotin Goat anti-Mouse + Rabbit IgG) ve Streptavidin-Peroksidaz damlatıldı. Kesitlerdeki immun boyama AEC (kırmızı) ve DAB (kahverengi) kitleriyle ile ortaya çıkarıldı. Herbir immun boyamada AEC ve DAB kitleri farklı sürelerde (5-20 dakika) bekletilerek boyanın ortaya çıkması sağlandı. Ardından hematoksilen ile bir dakika karşıt boyama yapılarak hücre çekirdekleri ortaya çıkarıldı ve lam üzerine kapatma sıvısı (Aqueous Mounting Medium) damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.7.6. Değerlendirme

LFB ve immunohistokimya boyaması yapılan koronal kesitlerden, fotomikroskop (*Olympus BX61*) yardımıyla resim çekimi yapıldı. Çekimler, koronal beyin kesitlerinde korpus kallosum bölgesinde yapıldı (Resim 5). LFB ve MBP boyama yapılan kesitlerde 100X büyütmede ve glial hücrelerin boyandığı kesitlerde 400X büyütmede çekilen resimler kaydedildi. Resimlerin görüntü kalitesi Adobe Photoshop CS6 programı ile arttırıldıktan sonra değerlendirildi.

LFB ve MBP boyamada değerlendirme, myelinizasyon skorlaması ile yapıldı (153):

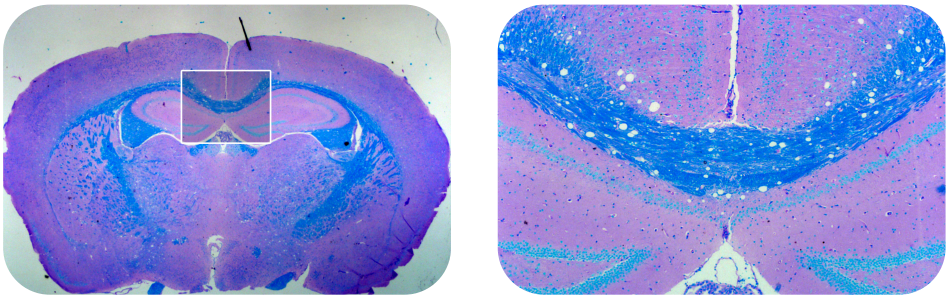
3 – medial korpus kallosum normal, tamamen myelinize

2 – kısmi/hafif demyelinizasyon

1 – belirgin/ciddi demyelinizasyon

0 – medial korpus kallosumun tamamı demyelinize

İmmunohistokimya boyama yapılan hücrelerde değerlendirme, korpus kallosumda 0,033 mm^2'lik bir alanda immunpozitif hücreler sayılarak yapıldı (8). Alandaki hücre sayıları mm^2 başına düşen hücre sayısı hesaplanarak değerlendirildi. Hematoksilen ile yapılan karşıt boyamada gösterilen hücrelerdeki immunopozitiflik dikkate alındı ve hücre dışı immun boyamalar sayılmadı (154).



20X 100X

Resim 5. Korpus kallosum. 5 µm kalınlığındaki kesitler luksol fast mavisi ve periodik asit şift ile boyandı.

3.7.7. İstatistik

İstatistiksel analiz SPSS-21 (*IBM*) programı ile yapıldı. Haftalık vücut ağırlığı değişiminde, bağımlı grupların genel analizi Friedman testi ile, bağımsız iki grubun karşılaştırması ise Mann Whitney U testi ile değerlendirildi ve $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Vücut ağırlığı değişimi, lokomotor aktivite, anksiyete ve miyelin skorlamasında, bağımsız gruplar arası fark Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Kruskal Wallis testinde $p<0,05$ olan gruplarda Bonferroni düzeltmesi uygulanarak Mann Whitney U ile ikili karşılaştırmalar yapıldı ve $p<0,016$ değeri anlamlı kabul edildi. Glial hücre sayılarının gruplar arası farkı tek yönlü varyans analizinin (one way analysis of variance, ANOVA) ardından Tukey testi ile değerlendirildi ve $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler Ortalama ± Standart hata olarak gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı

Kuprizon verilen süreçte haftalık, SF veya baklofen uygulamaları yapılan süreçte ise başlangıçta ve sakrifikasyondan önce vücut ağırlığı ölçümleri yapıldı. Vücut ağırlığı, başlangıç değerlere göre % değişim olarak hesaplandı. Elde edilen veriler, haftalık değerlendirmeler için Tablo 1, Şekil 3'te ve enjeksiyonların uygulandığı dönemdeki değerlendirmeler için Tablo 2, Şekil 4'te gösterildi.

Kuprizonun vücut ağırlığına etkisi

Beş hafta kuprizon verilen süreçte, kuprizon vücut ağırlığını azaltmasına rağmen, haftalar arası vücut ağırlığı değişim değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı. Beş hafta süresince normal diyet verilen grupta ise, haftalık vücut ağırlığı değerleri anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$). Gruplar arası haftalık değişim değerleri karşılaştırıldığında ise, kuprizon grubuna göre normal diyet verilen grupta daha fazla vücut ağırlığı artışı bulundu. (1 hafta: % 9,21, 2 hafta: % 13, 3 hafta: % 14,49, 4 hafta: % 12,43, 5 hafta: % 16,61 ve $p<0,05–0,01$).

SF enjeksiyonlarının yapıldığı dönemde ise, kuprizon grubu normal diyet verilen grupla karşılaştırıldığında, vücut ağırlığı değişiminde anlamlı bir fark oluşmadı.

Kuprizon sonrası dönemde vücut ağırlığı

Vücut ağırlığı artışını engelleyen kuprizon, beş haftadan sonra diyetten çıkarılıp iki hafta kuprizonsuz normal diyete devam edildiğinde, vücut ağırlığında anlamlı bir artış bulundu. Kuprizon sonrası dönemdeki vücut ağırlığı değişimi, hem kuprizon grubuna hem de normal diyet verilen gruba göre anlamlı düzeyde arttı (sırasıyla % 12,17 $p<0,01$ ve % 10 $p<0,01$).

Baklofenin vücut ağırlığına etkisi

Normal diyet verilen farelere uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre veya kendi arasında, vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadı.

Kuprizonla birlikte uygulanan baklofenin vücut ağırlığına etkisi

Kuprizon verilen farelere uygulanan 2 mg/kg baklofen, hem SF hem de 5 mg/kg baklofen uygulanan gruba göre vücut ağırlığını anlamlı düzeyde arttırdı (sırasıyla % 6,18 p<0,016 ve % 4,94 p<0,001). Ancak 5 mg/kg baklofen, SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi.

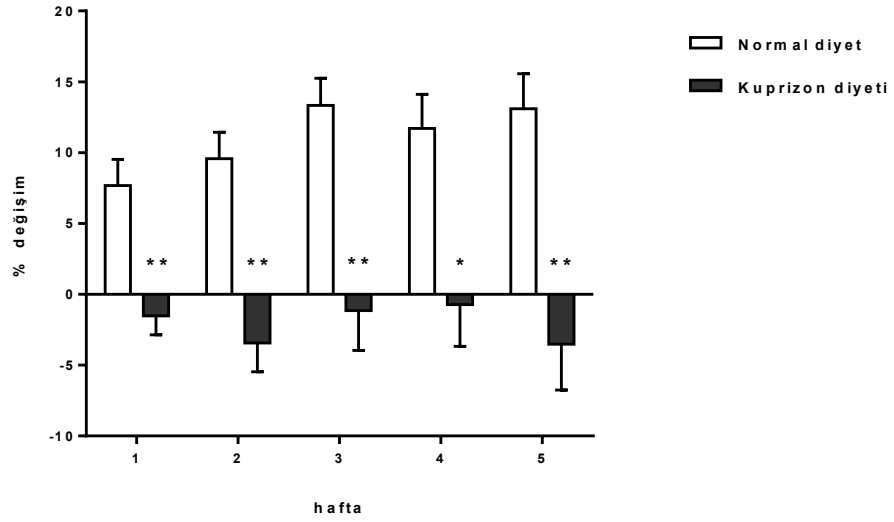
Kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin vücut ağırlığına etkisi

Beş hafta kuprizon verilen, ardından kuprizon diyetten çıkarılıp iki hafta kuprizonsuz normal diyete devam edildiği dönemde uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadı.

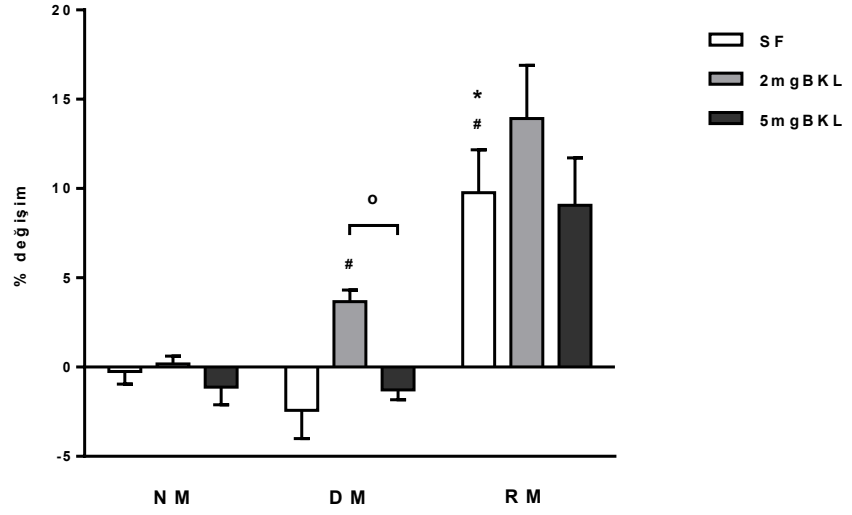
Tablo 1. Kuprizonun vücut ağırlığı üzerine etkisi.

Grup	**Vücut Ağırlığı (% değişim)**					
	1 hafta	2 hafta	3 hafta	4 hafta	5 hafta	Friedman
NM-SF grubu O (Min-Maks)	6,57 (1,39-16,75)	8,59 (3,7-18,95)	14,98 (6,94-20,94)	11,11 (4,63-22,51)	13,04 (5,91-24,08)	< 0,05
DM-SF grubu O (Min-Maks)	-2,66 ((-5,31)-6,47)	-5,38 ((-9,14)-8,82)	-2,17 ((-10,66)-14,71)	-3,01 ((-11,17)-14,71)	-2,87 ((-14,72)-12,35)	> 0,05
Mann Whitney	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,05	< 0,01	

NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, O (Min-Maks): Ortanca (Minimum-Maksimum)



Şekil 3. Kuprizonun vücut ağırlığı üzerine etkisi. % değişim: Yüzde vücut ağırlığı değişimi. *p<0,05 ve **p<0,01. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Şekil 4. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin vücut ağırlığı üzerine etkisi. % değişim: Yüzde vücut ağırlığı değişimi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,016, DM-SF grubuna göre #p<0,016 ve DM grubundaki 2 ve 5 mg/kg baklofen grupları arasındaki fark ^{0}p<0,001. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.

4.2. Açık Alan Testi

Tüm deney gruplarında, sakrifikasyondan önce açık alan testine alınan farelerde lokomotor aktivite ve anksiyete değerlendirildi. Lokomotor aktivite için toplam kare geçiş sayısı ve anksiyete için merkez kareden geçiş sayısının toplam kare geçiş sayısına oranının yüzdesi hesaplandı ve % merkez kare olarak ifade edildi. Elde edilen veriler Tablo 2'de ve verilerden hareketle hazırlanan grafikler, lokomotor aktivite için Şekil 5'te ve anksiyete için Şekil 6'da gösterildi.

Kuprizon ve kuprizon sonrası dönemde lokomotor aktivite ve anksiyete

Normal diyet verilen, kuprizon verilen ve kuprizon sonrası döneme devam edilen gruplar arasında yapılan genel karşılaştırmada ne lokomotor aktivite ne de anksiyete değerlerinde anlamlı bir fark oluşmadı.

Baklofenin lokomotor aktivite ve anksiyeteye etkisi

Normal diyet verilen farelere uygulanan baklofen, SF uygulanan gruba göre hem 2 mg/kg hem de 5 mg/kg dozlarında lokomotor aktiviteyi anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,016$). Ancak dozlar arası bir fark bulunamadı. Anksiyete değerlendirmesinde ise, SF ve baklofen grupları arasında anlamlı bir fark oluşmadı.

Kuprizonla birlikte uygulanan baklofenin lokomotor aktivite ve anksiyeteye etkisi

Kuprizon verilen farelere uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında ne lokomotor aktivite ne de anksiyete değerlerinde anlamlı bir fark oluşturmadı.

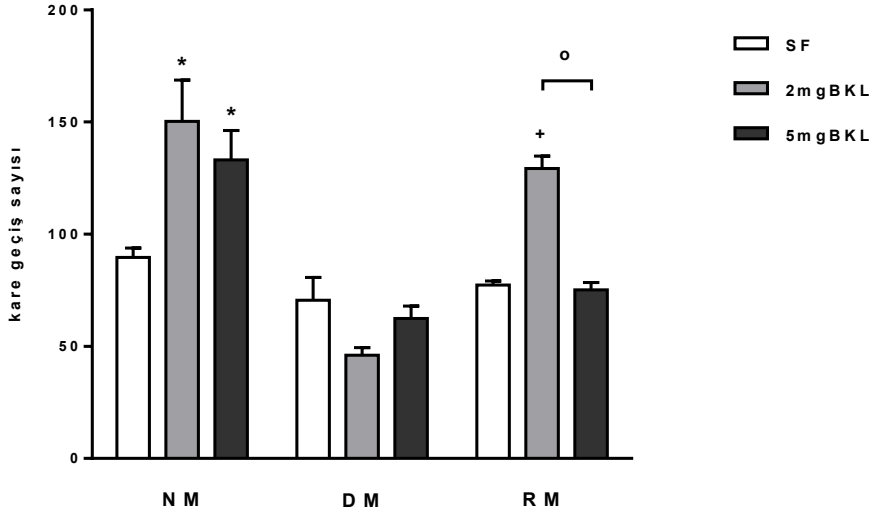
Kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin lokomotor aktivite ve anksiyeteye etkisi

Beş hafta kuprizon verilen, ardından kuprizon diyetten çıkarılıp iki hafta normal diyete geçildiği dönemde uygulanan 2 mg/kg baklofen, hem SF hem de 5 mg/kg baklofen uygulanan gruba göre lokomotor aktiviteyi anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,001$). Ancak 5 mg/kg baklofen, SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı. Anksiyete değerlerinde ise 5 mg/kg baklofen, bu süreçte hem SF hem de 2 mg/kg baklofen uygulanan gruba göre % merkez kare değerini azaltarak anksiteyi anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,016$). Ancak 2 mg/kg baklofen, SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi. Bu dönemde görülen diğer bir bulgu da, 2 mg/kg baklofen uygulanan grupta ki bir farede beşinci gün epileptik nöbet gözlendi.

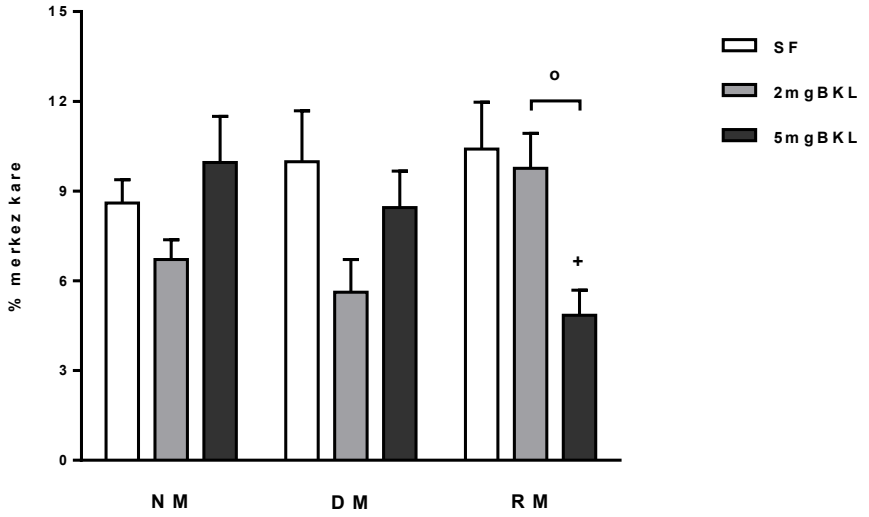
Tablo 2. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin vücut ağırlığı, lokomotor aktivite ve anksiyete üzerine etkisi.

Ana Grup	Alt Grup	Vücut Ağırlığı (% değişim)	Lokomotor Aktivite (Kare Geçiş Sayısı)	Anksiyete (% Merkez Kare)
NM grubu				
	SF	0,41 ((-3,15)-2,6)	89 (73-109)	8,26 (6,85-12,94)
O (Min-Maks)	2mgBKL	0,42 ((-1,22)-2,37)	132 (101-225)	7,11 (3,79-9,14)
	5mgBKL	-1,71 ((-3,97)-3,7)	133 (88-188)	8,8 (4,29-18,05)
Kruskall Wallis		> 0,05	< 0,05	> 0,05
	SF – 2mgBKL	-	< 0,016	-
Mann Whitney U	SF – 5mgBKL	-	< 0,016	-
	2mgBKL – 5mgBKL	-	> 0,016	-
DM grubu				
	SF	-3,3 ((-7,62)-5,32)	79 (31-104)	9,4 (4,81-19,35)
O (Min-Maks)	2mgBKL	3,07 (1,86-6,1)	45 (32-65)	5,38 (1,54-11,9)
	5mgBKL	-1,54 ((-3,02)-1,73)	62 (41-83)	8,54 (2,41-12,9)
Kruskall Wallis		< 0,05	> 0,05	> 0,05
	SF – 2mgBKL	< 0,016	-	-
Mann Whitney U	SF – 5mgBKL	> 0,016	-	-
	2mgBKL – 5mgBKL	< 0,001	-	-
RM grubu				
	SF	11,07 (0,41-18,4)	76,5 (71-86)	9,47 (5,13-16,88)
O (Min-Maks)	2mgBKL	13,63 ((-1,64)-27,09)	128 (108-152)	9,77 (4,41-14,81)
	5mgBKL	8,83 (0-20,95)	75,5 (60-88)	4,77 (1,22-9,33)
Kruskall Wallis		> 0,05	< 0,05	< 0,05
	SF – 2mgBKL	-	< 0,001	> 0,016
Mann Whitney U	SF – 5mgBKL	-	> 0,016	< 0,016
	2mgBKL – 5mgBKL	-	< 0,001	< 0,016
NM – DM – RM (SF grupları)				
Kruskall Wallis		< 0,05	> 0,05	> 0,05
	NM – DM	> 0,016	-	-
Mann Whitney U	NM – RM	< 0,016	-	-
	DM – RM	< 0,016	-	-

NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen, O (Min-Maks): Ortanca (Minimum-Maksimum).



Şekil 5. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin lokomotor aktivite üzerine etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,016, RM-SF göre +p<0,001 ve RM grubunda 2 ve 5 mg/kg baklofen grupları arasındaki fark ^{0}p<0,001. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Şekil 6. Kuprizonla birlikte veya kuprizon sonrası dönemde uygulanan baklofenin anksiyete üzerine etkisi. % merkez kare: Açık alan testinde merkez kareden geçiş sayısı / toplam kare geçiş sayısı x 100. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. RM-SF grubuna göre +p<0,016, 2 ve 5 mg/kg baklofen grupları arasındaki fark ^{0}p<0,016. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.

4.3. Histolojik ve İmmunohistokimyasal İnceleme

4.3.1. Miyelinizasyon

Korpus kallosumda miyelinizasyon, histolojik olarak LFB veya immunohistokimyasal olarak anti-MBP antikoru ile boyamaya tabi tutulmuş kesitlerde değerlendirildi. Fotomikroskop ile kesitlerden alınan görüntülerde miyelinizasyon skorlaması yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 3'te, verilerden hareketle hazırlanan grafikler LFB için Şekil 7'de, MBP için Şekil 8'de ve kesitlerden alınan görüntüler LFB için Resim 6'da, MBP için Resim 7'de gösterildi.

Kuprizonun miyelinizasyona etkisi

Beş hafta süresince farelerin yemine % 0,2 oranında eklenen kuprizon, korpus kallosumda belirgin demiyelinizasyona yol açtı. Kuprizon verilmeyen normal miyelin grubuyla ile karşılaştırıldığında, kuprizon hem LFB hem de MBP tutulumunu anlamlı düzeyde azalttı ($p<0,001$).

Kuprizon sonrası dönemde miyelinizasyon

Kuprizonla oluşan demiyelinizan hasardan sonra kuprizon diyetten çıkarılıp iki hafta normal diyete devam edildiğinde belirgin remiyelinizasyon gelişti. Demiyelinizasyon dönemi ile karşılaştırıldığında hem LFB hem de MBP tutulumu anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$). Normal miyelin grubu ile karşılaştırıldığında ise, MBP tutulumunda bir fark bulunmazken, daha az LFB tutulumu görüldü ($p<0,016$).

Baklofenin miyelinizasyona etkisi

Kuprizon verilmeyen normal miyelinli farelere uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında LFB ve MBP tutulumunda anlamlı bir fark oluşturmadı.

Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyona etkisi

Demiyelinizan hasar sürecinde kuprizonla birlikte uygulanan 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre MBP tutulumunu arttırdı ($p<0,016$). Ancak hem SF grubuyla karşılaştırıldığında 2 mg/kg dozunda hem de dozlar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Yine bu süreçte uygulanan 5 mg/kg baklofen, SF grubuna göre LFB tutulumunu da arttırdı, ancak LFB boyamada ortaya çıkan fark, istatiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı ($p=0,082$). LFB boyamada, gruplar arası genel karşılaştırmada anlamlı fark oluşurken ($p<0,05$), ikili karşılaştırmalarda bir fark bulunamadı.

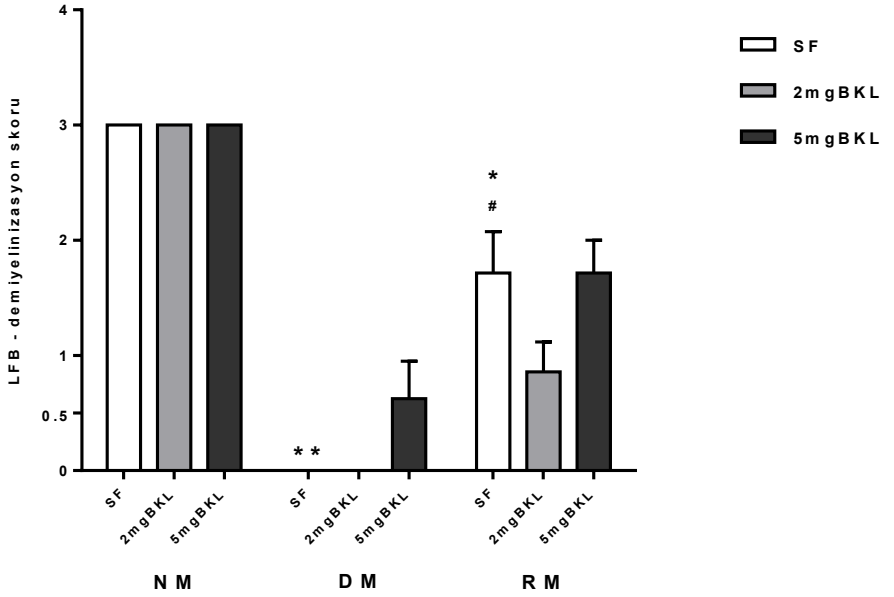
Baklofenin kuprizon sonrası dönemde gelişen remiyelinizasyona etkisi

Remiyelinizasyon sürecinde uygulanan 2 mg/kg baklofen, SF verilen gruba göre MBP tutulumunu azalttı ($p<0,016$). SF grubuyla karşılaştırıldığında, 5 mg/kg baklofen de her ne kadar MBP tutulumunu belirgin olarak azaltmış olsa da, bu fark istatiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı ($p=0,031$ ve anlamlılık değeri $p<0,016$). Ayrıca dozlar arası karşılaştırmada da bir fark bulunamadı. Yine remiyelinizasyon sürecinde uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, bu süreçte SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında LFB tutulumunda anlamlı bir fark oluşturmadı.

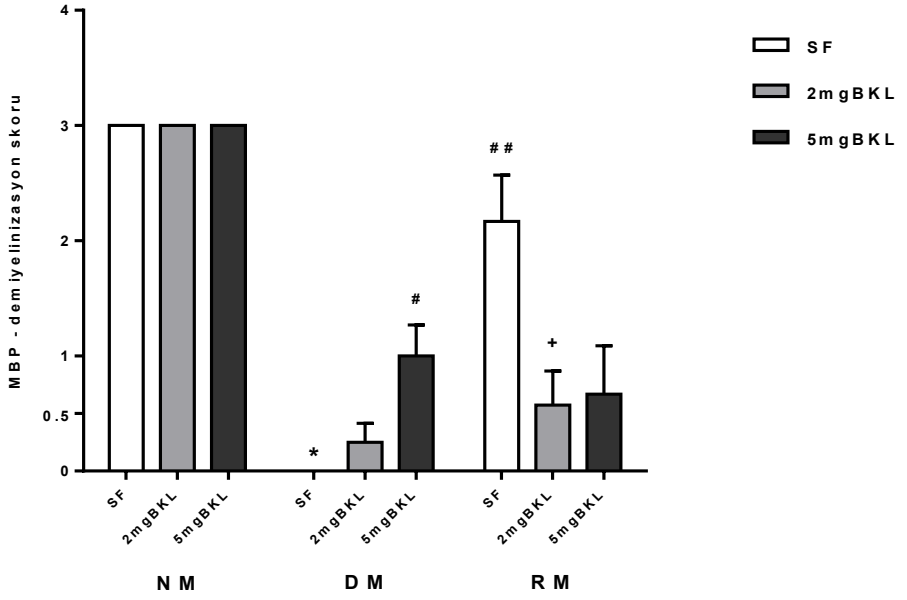
Tablo 3. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi.

Ana Grup	Alt Grup	LFB	MBP
NM grubu			
	SF	3 (3-3)	3 (3-3)
O (Min-Maks)	2mgBKL	3 (3-3)	3 (3-3)
	5mgBKL	3 (3-3)	3 (3-3)
Kruskall Wallis		> 0,05	> 0,05
	SF – 2mgBKL	-	-
Mann Whitney U	SF – 5mgBKL	-	-
	2mgBKL – 5mgBKL	-	-
DM grubu			
	SF	0 (0-0)	0 (0-0)
O (Min-Maks)	2mgBKL	0 (0-0)	0 (0-1)
	5mgBKL	0 (0-2)	1 (0-2)
Kruskall Wallis		< 0,05	< 0,05
	SF – 2mgBKL	> 0,016	> 0,016
Mann Whitney U	SF – 5mgBKL	> 0,016	< 0,016
	2mgBKL – 5mgBKL	> 0,016	> 0,016
RM grubu			
	SF	1 (1-3)	2.5 (1-3)
O (Min-Maks)	2mgBKL	1 (0-2)	0 (0-2)
	5mgBKL	2 (1-3)	0 (0-2)
Kruskall Wallis		> 0,05	< 0,05
	SF – 2mgBKL	-	< 0,016
Mann Whitney U	SF – 5mgBKL	-	> 0,016
	2mgBKL – 5mgBKL	-	> 0,016
NM – DM – RM (SF grupları)			
Kruskall Wallis		< 0,05	< 0,05
	NM – DM	< 0,001	< 0,001
Mann Whitney U	NM – RM	< 0,016	> 0,016
	DM – RM	< 0,001	< 0,001

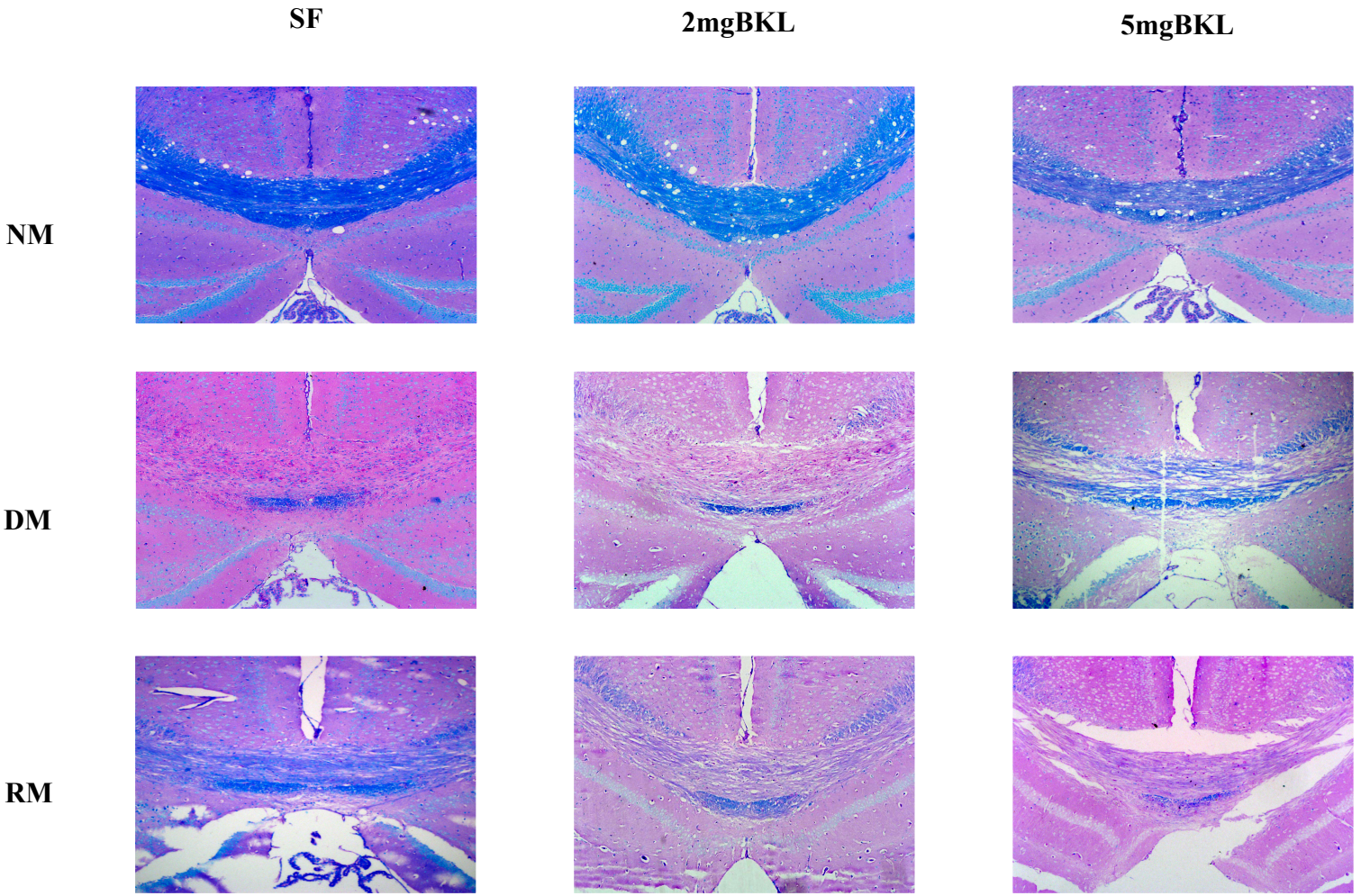
LFB: Luksol fast mavisi (Miyelin), MBP: Miyelin temel protein (Miyelin), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen, O (Min-Maks): Ortanca (Minimum-Maksimum).



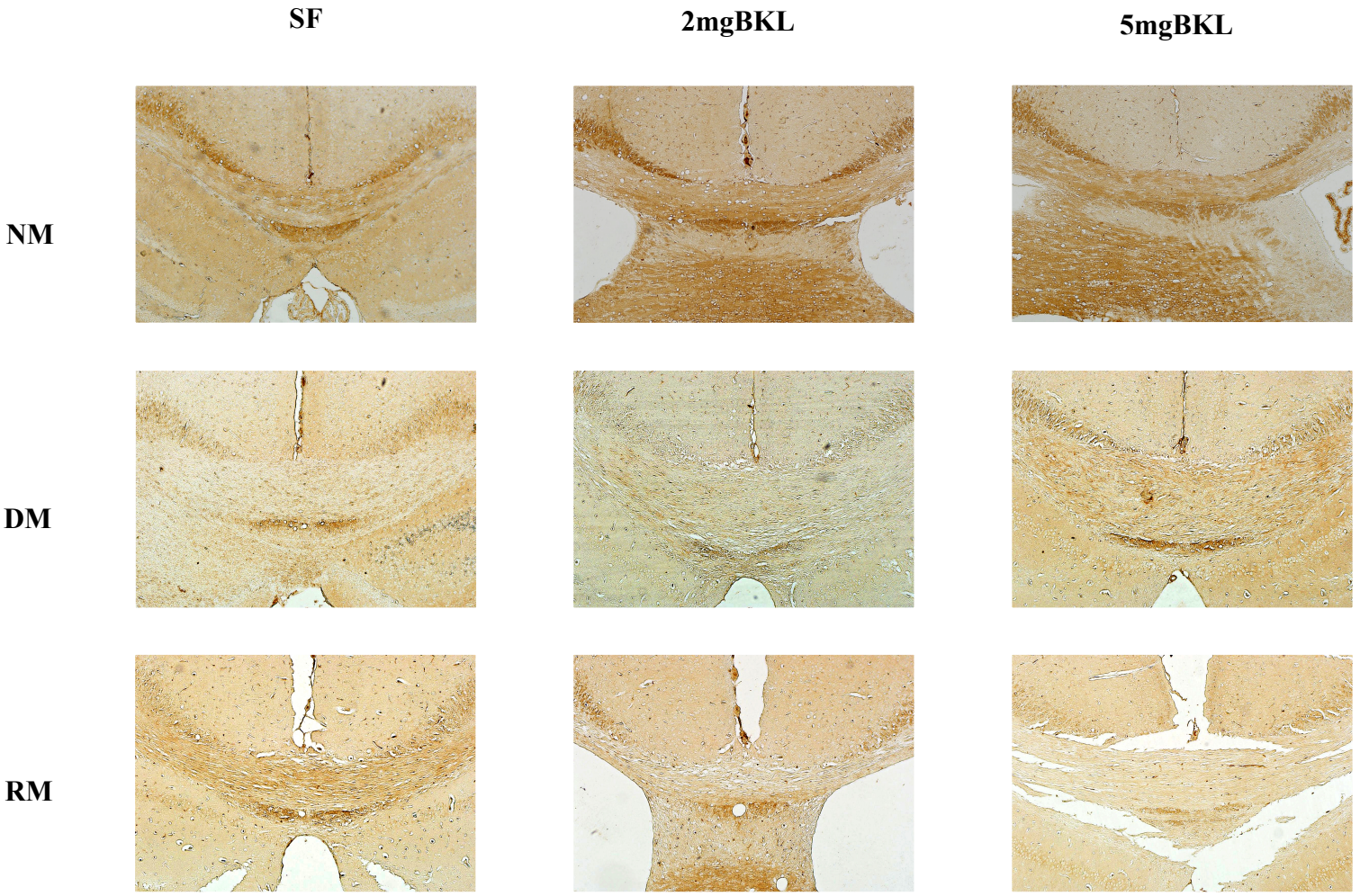
Şekil 7. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi. LFB: Luksol fast mavisi (miyelin), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,016, **p<0,001 ve DM-SF grubuna göre #p<0,001. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Şekil 8. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi. MBP: Miyelin temel protein (miyelin), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,001, DM-SF grubuna göre #p<0,016, ##p<0,001 ve RM-SF grubuna göre +p<0,016. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Resim 6. Luksol fast mavisi (LFB) ile korpus kallosumda histolojik olarak miyelin boyama. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. Görüntüler 100X büyütmede çekildi.



Resim 7. Anti-miyelin temel protein (MBP) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak miyelin proteini boyama. Baklofenin kuprizonla oluşan demiyelinizasyon ve kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyona etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. Görüntüler 100X büyütmede çekildi.

4.3.2. Oligodendrosit ve oligodendroglia sayıları

Korpus kallosumda oligodendrosit hücreleri anti-NogoA antikoruyla ve oligodendroglia hücreleri anti-Olig2 antikoruyla immunohistokimyasal boyamaya tabi tutulmuş kesitlerde değerlendirildi. Fotomikroskop ile kesitlerden alınan görüntülerde belirli bir alandaki hücre sayıları, hücre sayısı/mm^2 olarak hesaplandı. Elde edilen veriler Tablo 4'te, verilerden hareketle hazırlanan grafikler NogoA için Şekil 9'da, Olig2 için Şekil 10'da ve kesitlerden alınan görüntüler NogoA için Resim 8'de, Olig2 için Resim 9'da gösterildi.

Demiyelinizasyon döneminde oligodendrosit ve oligodendroglia sayıları

Demiyelinizasyon döneminde NogoA+ oligodendrosit sayısı, normal miyelin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,05$). Bu dönemde Olig2+ oligodendroglia sayısı da normal miyelin grubuna göre azaldı ($p<0,05$).

Remiyelinizasyon döneminde oligodendrosit ve oligodendroglia sayıları

Remiyelinizasyon döneminde NogoA+ oligodendrosit sayısında, demiyelinizasyon dönemiyle karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık ortaya çıkmadı. Normal miyelin grubuyla karşılaştırıldığında ise anlamlı düzeyde daha az sayıda NogoA+ oligodendrosit bulundu ($p<0,01$). Olig2+ oligodendroglia sayısında da demiyelinizasyon dönemiyle karşılaştırıldığında bir fark oluşmazken, normal miyelin grubuna göre daha az sayıda Olig2+ oligodendroglia bulundu ($p<0,001$).

Baklofenin normal miyelinizasyonda oligodendrosit ve oligodendroglia sayılarına etkisi

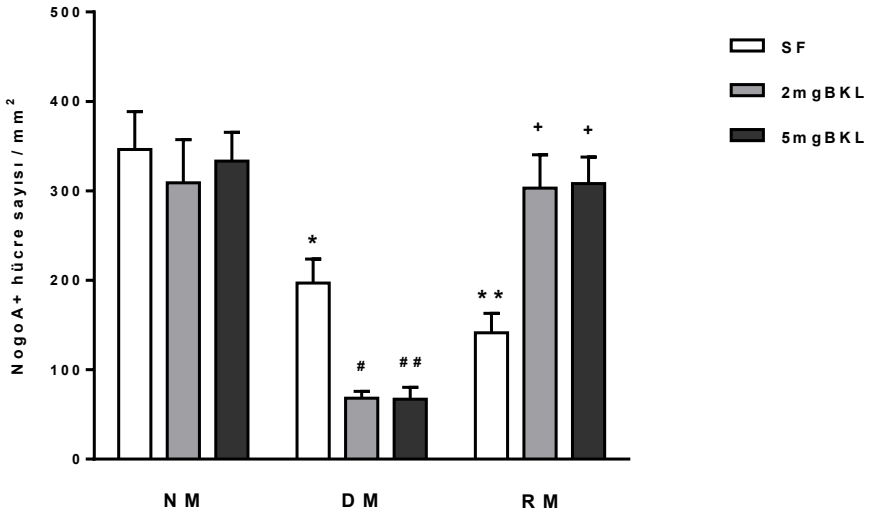
Normal miyelin gruplarına uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında NogoA+ oligodendrosit sayısında anlamlı bir fark oluşturmadı. Yine normal miyelinizasyonda Olig2+ oligodendroglia sayısında da gruplar arasında bir fark oluşmadı.

Baklofenin demiyelinizasyon döneminde oligodendrosit ve oligodendroglia sayılarına etkisi

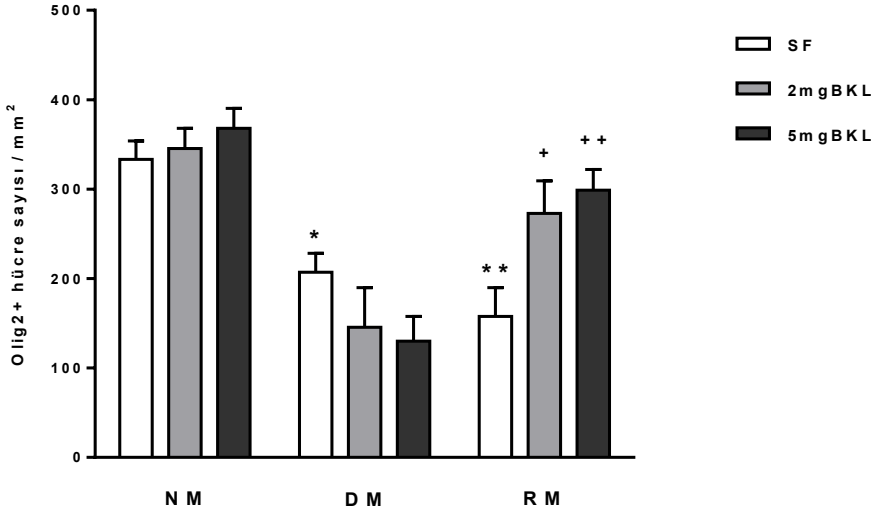
Demiyelinizasyon sürecinde kuprizonla birlikte uygulanan baklofen, SF uygulanan gruba göre NogoA+ oligodendrosit sayısını hem 2 mg/kg hem de 5 mg/kg dozlarında anlamlı düzeyde azalttı ($p<0,001$). Ancak dozlar arası bir fark oluşmadı. Her iki doz baklofen de, demiyelinizasyon döneminde Olig2+ oligodendroglia sayısında anlamlı bir fark oluşturmadı.

Baklofenin remiyelinizasyon döneminde oligodendrosit ve oligodendroglia sayılarına etkisi

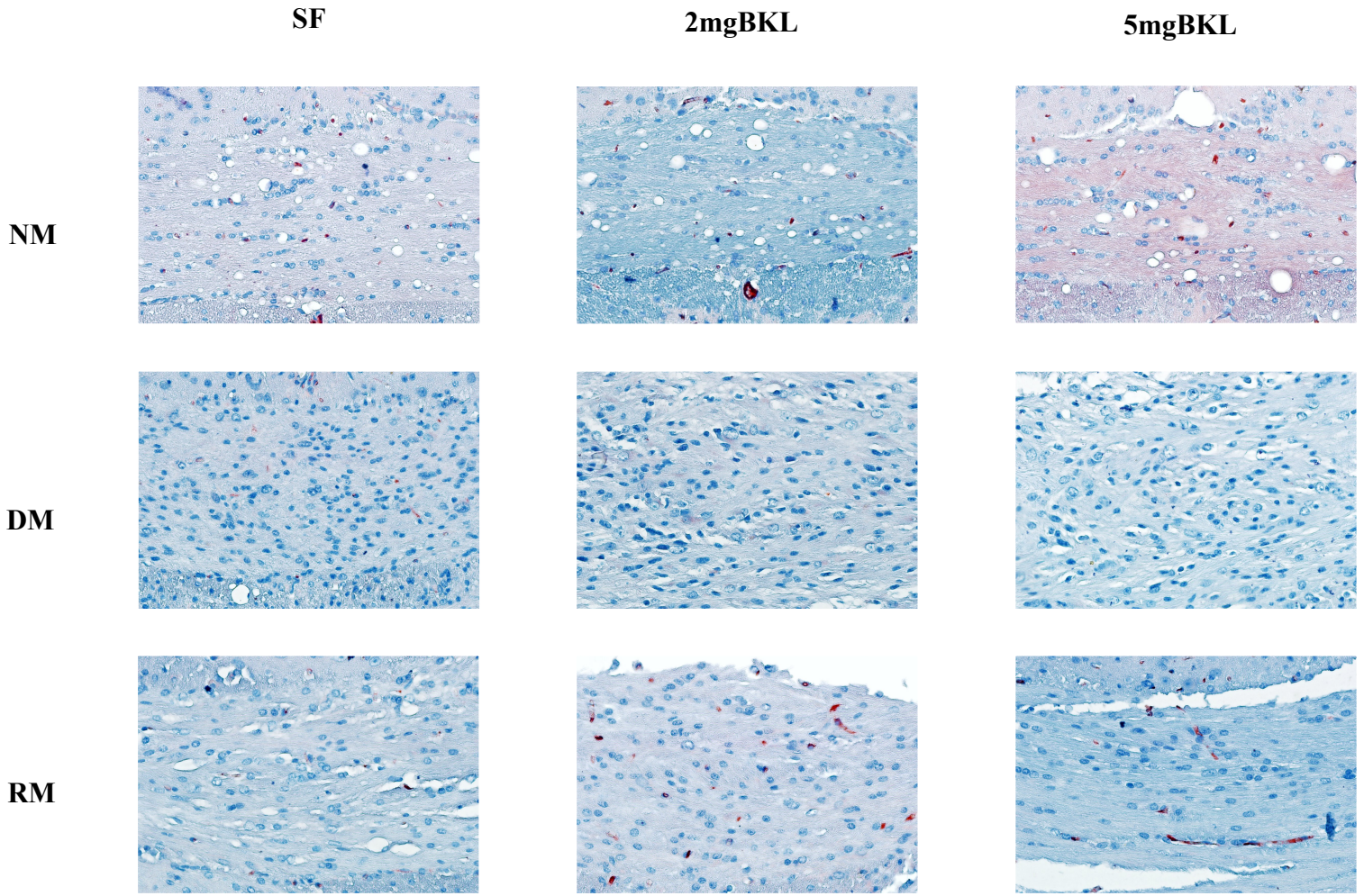
Remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofen, SF uygulanan gruba göre NogoA+ oligodendrosit sayısını hem 2 mg/kg hem de 5 mg/kg dozlarında anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,01$). Ancak dozlar arası bir fark oluşmadı. Baklofen, remiyelinizasyon sürecinde Olig2+ oligodendroglia sayısını da, SF grubuna göre hem 2 mg/kg hem de 5 mg/kg dozlarında arttırdı (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). Ancak yine dozlar arası bir fark oluşmadı.



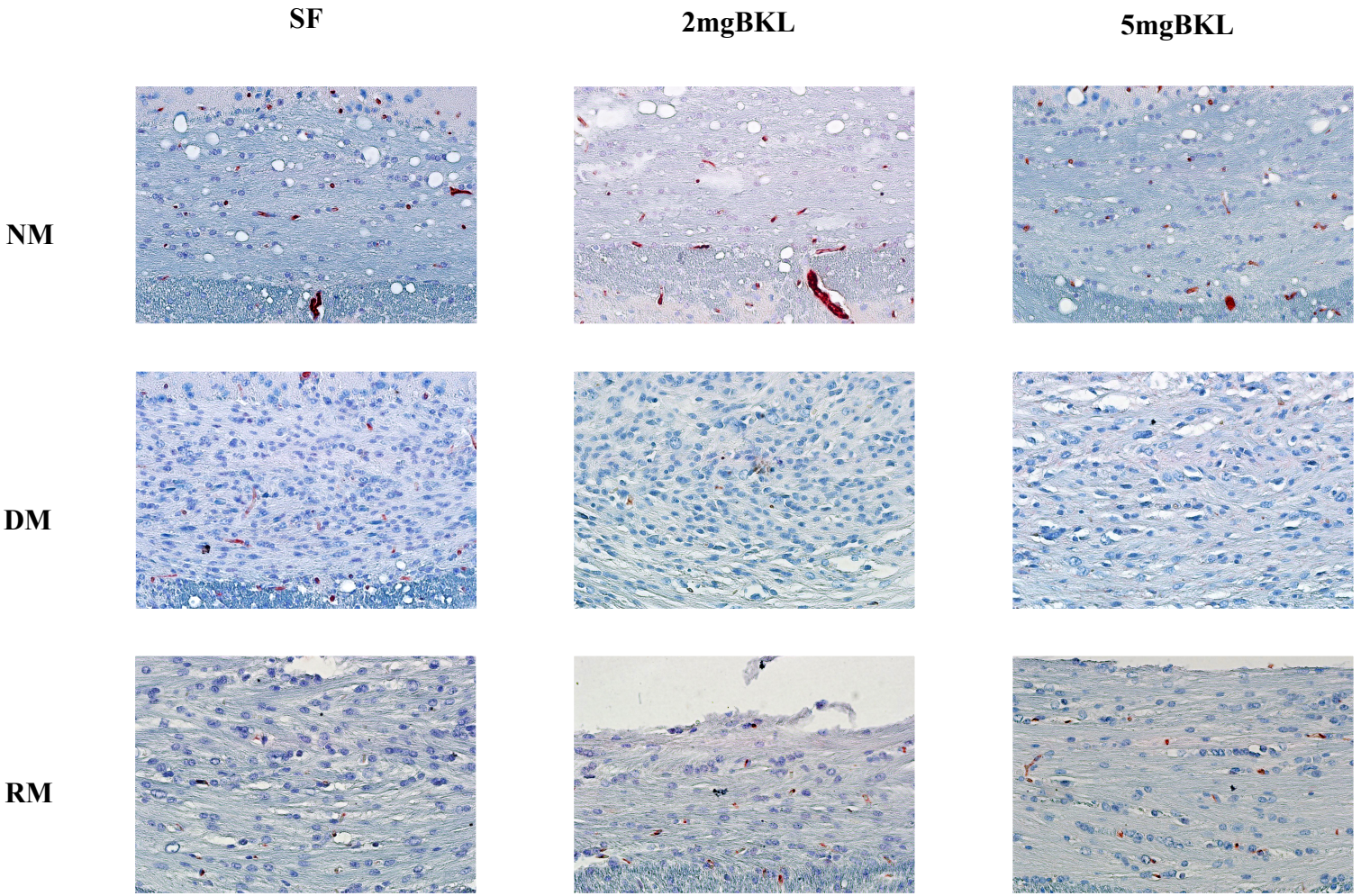
Şekil 9. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendrosit sayısına etkisi: NogoA: Nörit büyüme inhibitörü A (oligodendrosit), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,05, **p<0,01, DM-SF grubuna göre #p<0,01, ##p<0,001 ve RM-SF grubuna göre +p<0,01. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Şekil 10. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendroglia sayısına etkisi. Olig2: Oligodendrosit transkripsiyon faktör 2 (Oligodendroglia), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna *p<0,01, **p<0,001 ve RM-SF grubuna göre +p<0,05, ++p<0,01. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Resim 8. Anti-nörit büyüme inihibitörü A (NogoA) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak oligodendrosit boyama. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendrosit sayısına etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. Görüntüler 400X büyütmede çekildi.



Resim 9. Anti-oligodendrosit transkripsiyon faktör 2 (Olig2) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak oligodendroglia boyama. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendroglia sayısına etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. Görüntüler 400X büyütmede çekildi.

4.3.3. Mikroglia sayısı

Korpus kallosumda mikroglia hücreleri anti-Iba1 antikoru ile immunohistokimyasal boyamaya tabi tutulmuş kesitlerde değerlendirildi. Fotomikroskop ile kesitlerden alınan görüntülerde belirli bir alandaki hücre sayıları, hücre sayısı/mm^2 olarak hesaplandı. Elde edilen veriler Tablo 4'de, verilerden hareketle hazırlanan grafik Şekil 11'de ve kesitlerden alınan görüntüler Resim 10'da gösterildi.

Demiyelinizasyon döneminde mikroglia sayısı

Demiyelinizasyon döneminde Iba1+ mikroglia sayısı, normal miyelin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$).

Remiyelinizasyon döneminde mikroglia sayısı

Remiyelinizasyon döneminde Iba1+ mikroglia sayısı, demiyelinizasyon dönemiyle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,001$). Ancak normal miyelin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık ortaya çıkmadı.

Baklofenin normal miyelinizasyonda mikroglia sayısına etkisi

Normal miyelin gruplarına uygulanan 2 mg/kg baklofen, SF grubuna göre Iba1+ mikroglia sayısını anlamlı düzeyde azaltırken ($p<0,01$), 5 mg/kg baklofen bir fark oluşturmadı. 5 mg/kg ile karşılaştırıldığında, 2 mg/kg baklofende daha az Iba1+ mikroglia bulundu ($p<0,05$).

Baklofenin demiyelinizasyon döneminde mikroglia sayısına etkisi

Demiyelinizasyon sürecinde kuprizonla birlikte uygulanan 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre Iba1+ mikroglia sayısını anlamlı düzeyde azaltırken ($p<0,001$), 2 mg/kg dozunda bir fark oluşmadı. Dozlar arası farka bakıldığında, 5 mg/kg baklofendeki Iba1+ mikroglia sayısı 2 mg/kg'dan daha az bulundu ($p<0,05$).

Baklofenin remiyelinizasyon döneminde mikroglia sayısına etkisi

Remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofen, SF uygulanan gruba göre hem 2 mg/kg hem de 5 mg/kg dozunda Iba1+ mikroglia sayısını anlamlı düzeyde azalttı ($p<0,05$). Ancak dozlar arası bir fark oluşmadı.

4.3.4. Astrosit sayısı

Korpus kallosumda astrosit hücreleri anti-GFAP antikoru ile immunohistokimyasal boyamaya tabi tutulmuş kesitlerde değerlendirildi. Fotomikroskop ile kesitlerden alınan görüntülerde belirli bir alandaki hücre sayıları, hücre sayısı/mm^2 olarak hesaplandı. Elde edilen veriler Tablo 4'de, verilerden hareketle hazırlanan grafik Şekil 12'de ve kesitlerden alınan görüntüler Resim 11'de gösterildi.

Demiyelinizasyon döneminde astrosit sayısı

Demiyelinizasyon döneminde GFAP+ astrosit sayısı, normal miyelin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$).

Remiyelinizasyon döneminde astrosit sayısı

Remiyelinizasyon döneminde GFAP+ astrosit sayısı, demiyelinizasyon dönemiyle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,001$). Ancak remiyelinizasyondaki astrosit sayısı, normal miyelin grubuna göre belirgin düzeyde yüksek olmasına rağmen (RM: 661,62 ± 80,71 ve NM: 371,21 ± 33,6), bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı ($p=0,15$).

Baklofenin normal miyelinizasyonda astrosit sayısına etkisi

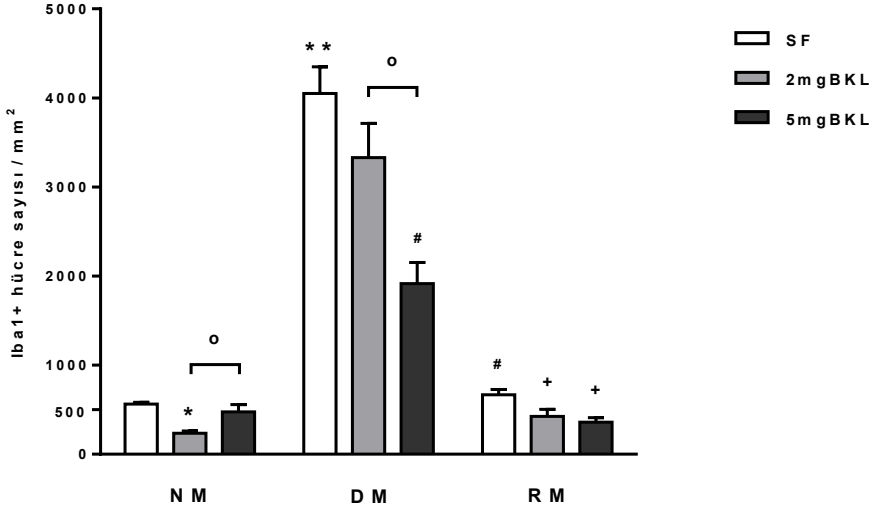
Normal miyelin gruplarına uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında GFAP+ astrosit sayısında anlamlı bir fark oluşturmadı.

Baklofenin demiyelinizasyon döneminde astrosit sayısına etkisi

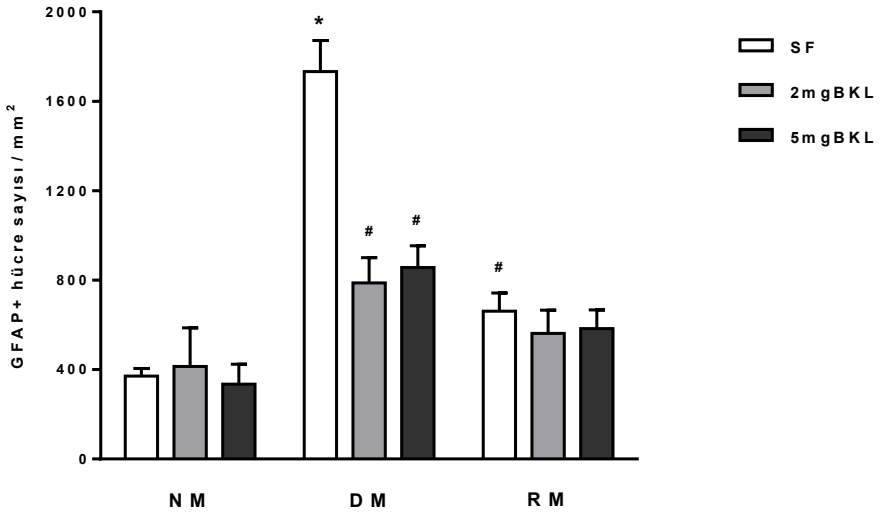
Demiyelinizasyon sürecinde kuprizonla birlikte uygulanan baklofen, bu süreçte SF uygulanan gruba göre GFAP+ astrosit sayısını hem 2 mg/kg hem de 5 mg/kg dozlarında anlamlı düzeyde azalttı ($p<0,001$). Ancak dozlar arası bir fark bulunamadı.

Baklofenin remiyelinizasyon döneminde astrosit sayısına etkisi

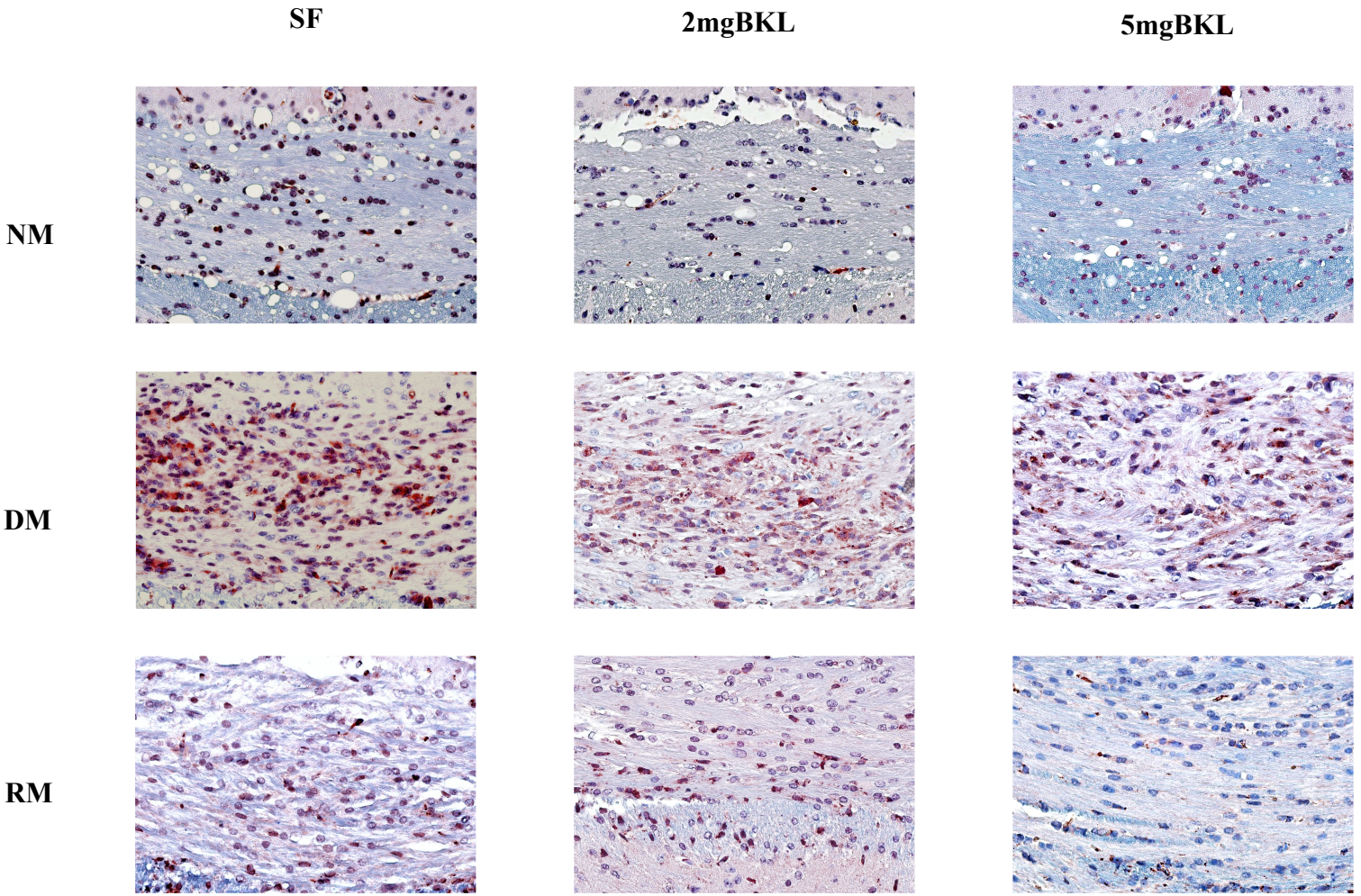
Remiyelinizasyon sürecinde uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofen, bu süreçte SF uygulanan gruba göre ve kendi arasında GFAP+ astrosit sayısınında anlamlı bir fark oluşturmadı.



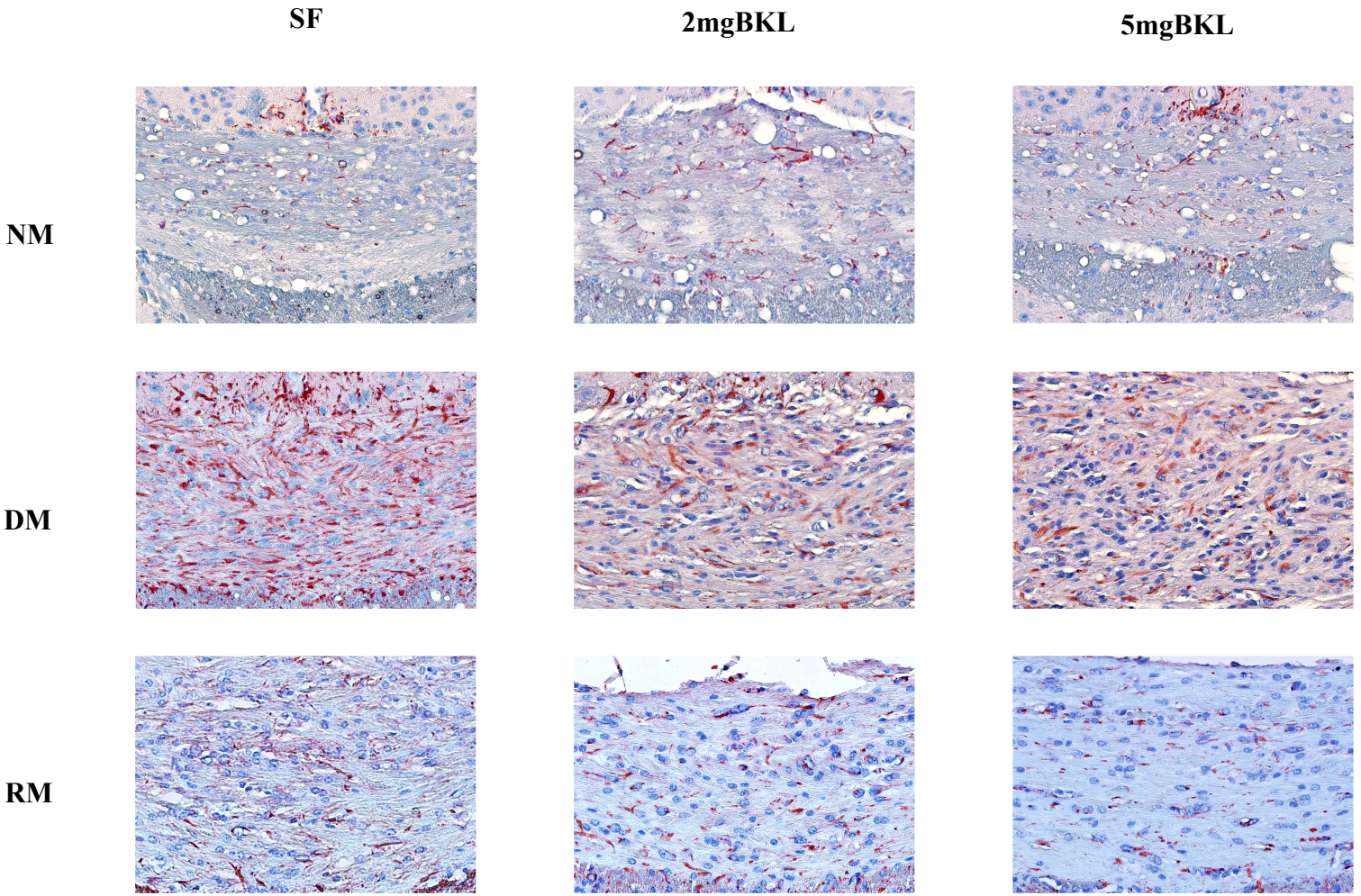
Şekil 11. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin mikroglia sayısına etkisi. Iba1: İyonize kalsiyum bağlayan adaptör molekül 1 (Mikroglia), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,01, **p<0,001, DM-SF grubuna göre #p<0,001, RM-SF grubuna göre +p<0,05 ve NM ve DM gruplarındaki 2 ve 5 mg/kg baklofen grupları arasındaki fark ^{0}p<0,05. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Şekil 12. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin astrosit sayısına etkisi: GFAP: Glial fibriler asidik protein, NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. NM-SF grubuna göre *p<0,001 ve DM-SF grubuna göre #p<0,001. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi.



Resim 10. Anti-iyonize kalsiyum bağlayan adaptör molekül 1 (Iba1) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak mikroglia boyama. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin mikroglia sayısına etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. Görüntüler 400X büyütmede çekildi.



Resim 11. Anti-glial fibriler asidik protein (GFAP) antikoru ile korpus kallosumda immunohistokimyasal olarak astrosit boyama. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin astrosit sayısına etkisi. NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen. Görüntüler 400X büyütmede çekildi.

Tablo 4. Demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin glial hücrelere etkisi.

Ana Grup	Alt Grup	NogoA	Olig2	Iba1	GFAP
NM grubu					
	SF	346,32 ± 42,27	333,33 ± 64,04	562,77 ± 19.68	371.21 ± 33,6
Ort ± SH	2mgBKL	309,09 ± 48,3	345,45 ± 22,68	236,36 ± 26,07	414,14 ± 172,61
	5mgBKL	333,33 ± 32,02	367,97 ± 45,54	476,19 ± 81,72	335,17 ± 88,81
ANOVA		> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
	SF – 2mgBKL	-	-	< 0,01	-
Tukey	SF – 5mgBKL	-	-	> 0,05	-
	2mgBKL – 5mgBKL	-	-	< 0,05	-
DM grubu					
	SF	196,97 ± 26,82	207,07 ± 21,31	4050,51 ± 299,16	1733,33 ± 139
Ort ± SH	2mgBKL	68,18 ± 7,58	145,45 ± 44,33	3329,12 ± 385,41	787,88 ± 112,22
	5mgBKL	67,10 ± 13,17	129,87 ± 27,83	1915,58 ± 236,02	856,06 ± 98,12
ANOVA		< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05
	SF – 2mgBKL	< 0,01	-	> 0,05	< 0,001
Tukey	SF – 5mgBKL	< 0,001	-	< 0,001	< 0,001
	2mgBKL – 5mgBKL	> 0,05	-	< 0,05	> 0,05
RM grubu					
	SF	141,41 ± 21,66	157,58 ± 32,35	666,67 ± 61,61	661,62 ± 80,71
Ort ± SH	2mgBKL	303,03 ± 37,41	272,73 ± 36,7	424,24 ± 78,73	561,47 ± 104,09
	5mgBKL	308,08 ± 29,71	298,70 ± 23,31	359,31 ± 50,55	583,62 ± 83,33
ANOVA		< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05
	SF – 2mgBKL	< 0,01	< 0,05	< 0,05	-
Tukey	SF – 5mgBKL	< 0,01	< 0,01	< 0,05	-
	2mgBKL – 5mgBKL	> 0,05	> 0,05	> 0,05	-
NM – DM – RM (SF grupları)					
ANOVA		< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
	NM – DM	< 0,05	< 0,01	< 0,001	< 0,001
Tukey	NM – RM	< 0,01	< 0,001	> 0,05	> 0,05
	DM - RM	> 0,05	> 0,05	< 0,001	< 0,001

NogoA: Nörit büyüme inhibitorü A (Oligodendrosit), Olig2: Oligodendrosit transkripsiyon faktör 2 (Oligodendroglia), Iba1: İyonize kalsiyum bağlayan adaptor molekül 1 (Mikroglia), GFAP: Glial fibriler asidik protein (Astrosit), NM: Normal miyelin, DM: Demiyelinizasyon, RM: Remiyelinizasyon, SF: Serum fizyolojik, BKL: Baklofen, Ort ± SH: Ortalama ± Standart hata.

5. TARTIŞMA

5.1. Vücut Ağırlığı

Kuprizonun deney hayvanlarında, kilo kaybına neden olduğu veya kilo alımını engellediği birçok çalışmada gösterilmiştir (58, 90, 92) Steelman ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre, kuprizon besin alımını değiştirmemiştir, kuprizon diyetinin ilk haftasında belirgin kilo kaybı vardır, kuprizon alımı devam ettikçe kilo alımı engellenmektedir ve kontrole göre vücut ağırlığı belirgin düşüktür (90). Beş haftanın ardından kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra ise hızlı kilo alımı gerçekleşir ve yalnızca bir haftada kontrol grubu kilolarına erişilir. Biz de çalışmamızda kuprizonun kilo alımını engellediğini gösterdik. Yine kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra vücut ağırlığının arttığını gösterdik.

Akut veya kronik baklofen uygulamasının fare veya sıçanlarda besin alımını arttırdığı gösterilmiştir (12, 108, 109). Baklofenin vücut ağırlığı üzerine etkisine yönelik çalışmalarda ise farklı sonuçlar bulunmuştur. Patel ve ark. sıçanlara 24-27 gün süresince uyguladıkları 1 veya 2 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını değiştirmedigini, ancak 4 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını azalttığını gösterdiler (12, 109). Bonaventura ve ark. ise farelere uygulanan 5 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını değiştirmediğini gösterdiler (110). Çalışmamızda 2 ve 5 mg/kg baklofenin ne normal diyetle ne de kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra uygulandığında vücut ağırlığına bir etkisini bulamadık. Ancak kuprizonla birlikte uygulanan 2 mg/kg baklofenin vücut ağırlığını arttırdığını gösterdik. Beklentimiz baklofenin ya direk kendi etkisiyle ya da besin alımını arttırıp kuprizon toksisitesini arttırarak kilo kaybına neden olabileceği yönündeydi. Ancak beklentimizin aksine 2 mg/kg baklofen kuprizon toksisitesini azaltarak kuprizonla oluşan kilo kaybını önledi.

5.2. Açık Alan testi

Lokomotor aktivite

Birçok çalışmada kuprizonun lokomotor aktiviteyi etkilemediği gösterilmiştir (93, 94). Ancak güncel bir çalışmada Ye ve ark. kuprizonun lokomotor aktiviteyi azalttığını gösterdiler (92). Biz ise çalışmamızda kuprizonun lokomotor aktiviteyi etkilemediğini gösterdik.

Mead ve ark. farelere uygulanan 2,5 – 20 mg/kg arası dozlarda baklofenin aktiviteyi azalttığını gösterdiler (155). Boas ve ark. sıçanlara uygulanan 5 ve 10 mg/kg baklofen

enjeksiyonlarının lokomotor aktiviteyi azalttığını ancak 0,6, 1,25 ve 2,5 mg/kg dozlarının bir etki göstermediğini buldular (11). Diğer bir çalışmada Bortolato ve ark. farelere uygulanan 2,5 ve 5 mg/kg baklofenin aktiviteyi değiştirmediğini ancak 10 mg/kg dozunda belirgin azalma olduğunu gösterdiler (149). Ancak Car ve ark. sıçanlara uygulanan 0,25 mg/kg baklofenin aktiviteyi arttırdığını gösterdiler (156). Biz çalışmamızda literatür verilerinin aksine, normal diyet verilen farelere uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofenin aktiviteyi arttırdığını gösterdik. Ancak kuprizon verdiğimiz farelerde aktivite değişmediği halde, kuprizon diyeti verilen farelere uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofenin aktivite üzerinde bir etki oluşturmadığını bulduk. Ye ve ark. çalışmalarında kuprizonun lokomotor aktiviteyi azalttığını göstermişlerdi (92). Ye'nin çalışmasına dayanarak normal diyetle verildiğinde aktivitede artışa neden baklofenin bu etkisini kuprizonun önlediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra uyguladığımız 2 mg/kg baklofenin normal diyetle uygulandığı zamanki etkisine benzer olarak aktiviteyi arttırdığını gösterdik. Ancak 5 mg/kg baklofenin normal diyetle uygulandığında gösterdiği etkinin aksine lokomotor aktivitede bir etki oluşturmadığunu bulduk.

Anksiyete

Kuprizonun anksiyete üzerine etkisi çalışılan araştırmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur. Pons ve ark. kuprizonun üç ve dördüncü haftasında anksiyetenin kontrole göre azaldığını, beş ve altıncı haftasında değişmediğini ve altıncı haftada kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra onikinci haftada kontrole göre azaldığını gösterdiler (93). Xu ve ark. ise altı haftaya kadar uygulanan kuprizonun anksiyeteyi değiştirmediğini gösterdiler (94). Ancak diğer bir çalışmada Ye ve ark. beş haftalık kuprizon uygulamasının anksiyeteyi arttırdığını gösterdiler (92). Biz çalışmamızda beş hafta verdiğimiz kuprizonun anksiyeteyi değiştirmediğini gösterdik. Beş hafta uyguladıktan sonra kuprizonu diyetten çıkarıp iki hafta normal diyete devam eden farelerde de anksiyetenin değişmediğini gösterdik.

Anksiyete benzeri davranışların araştırıldığı çalışmalarda baklofenin farelerde anksiyete üzerine bir etkisi bulunamadı (157, 158). Biz de çalışmamızda normal diyet veya kuprizon diyeti verilen farelere uygulanan baklofenin anksiyete üzerine bir etkisini gözlemedik. Yine kuprizon diyetten çıkarıldıktan sonra uygulanan 2 mg/kg baklofenin de anksiyeteye bir etkisini bulamadık. Ancak bu dönemde uygulanan 5 mg/kg baklofenin anksiyeteyi arttırdığını gösterdik.

Sonuç olarak beş hafta kuprizon verilen ardından kuprizon diyetten çıkarılıp iki hafta normal diyete geçildiği dönemde uygulanan 5 mg/kg baklofenin sadece normal diyetle uygulandığında ortaya çıkardığı etkilere göre, hem lokomotor aktivite hem de anksiyete değerlerinde belirgin farklılık oluştuğunu gözledik. Kuprizondan sonra uygulanan 5 mg/kg baklofenin kuprizonla beyinde oluşan dejenerasyonu arttırarak ya da rejenerasyonu önleyerek ortaya çıkarmış olabileceğini düşünmekteyiz.

5.3. Histolojik İnceleme

Demiyelinizasyon dönemi

Çalışmamızda beş hafta kuprizonla deneysel demiyelinizasyon modeli oluşturduğumuz farelerde, 2 ve 5 mg/kg baklofenin demiyelinizasyona ve bu süreçte değişen glial hücre sayılarına olası etkilerini araştırdık.

Öncelikle LFB ve MBP ile boyamalara tabi tuttuğumuz koronal beyin kesitlerinde, kuprizon korpus kallosum bölgesinde her iki boyanın da tutulumunu azaltarak belirgin demiyelinizasyona yol açtı. Kuprizon verilmeyen gruplarda 2 ve 5 mg/kg baklofen her iki boyamada da miyelinizasyonu etkilemedi. Kuprizonla birlikte uyguladığımızda ise 5 mg/kg baklofen MBP ve LFB tutulumunu arttırarak demiyelinizasyonu azalttı. Ancak LFB boyamada ortaya çıkan fark istatiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı. 2 mg/kg baklofende ise her iki boyamada da bir fark oluşmadı.

Bir sonraki aşamada kuprizonla oluşan demiyelinizasyonun miyelin üreten hücre olan oligodendrosit sayılarındaki azalmaya bağlı olarak ortaya çıktığını bulduk. Olgun oligodendrositleri gösteren NogoA ve oligodendroglial seri hücrelerini gösteren Olig2 antikorlarıyla yaptığımız immunohistokimyasal incelemelerde, kuprizon korpus kallosumda oligodendrosit ve oligodendroglia sayılarını azalttı. Kuprizon verilmeyen gruplarda 2 ve 5 mg/kg baklofen her iki hücre sayısında da anlamlı bir fark oluşturmadı. Kuprizonla birlikte uyguladığımız durumda ise 2 ve 5 mg/kg baklofen kuprizonla birlikte SF uygulanan gruba göre oligodendrosit sayısını anlamlı düzeyde azalttı ancak oligodendroglial hücre sayısında bir değişiklik oluşturmadı.

Kuprizonun korpus kallosum bölgesinde demiyelinizasyona yol açtığı bir çok çalışmada gösterilmiştir. Korpus kallosumda demiyelinizasyon histolojik olarak LFB tutulumunda azalma, immunohistokimyasal olarak miyelin proteinlerinin (MBP, PLP, MOG vs.)

ekspresyonlarındaki azalma ve elektron mikroskobi çalışmalarında demiyelinize aksonların gösterilmesi ile ortaya konmuştur (63, 71, 72). Kuprizonun bu demiyelinizan etkisi, MSS'nin miyelin üreten hücresi olan oligodendrositleri apoptozise uğratmasının sonucu olarak ortaya çıkar (66). Kuprizonun oligodendrositlerde apoptozise neden olup hücre sayısını azaltmasına bağlı olarak, kuprizon uygulamasının üçüncü haftasından itibaren korpus kallosumda gösterilebilen bu demiyelinizan etki, beşinci haftada en yüksek düzeye ulaşır (71). Biz de çalışmamızda beş hafta verilen kuprizonun korpus kallosum bölgesinde oligodendrosit ve oligodendroglia sayısını azaltarak demiyelinizasyona neden olduğunu saptadık.

Oligodendrositlerde GABA-B reseptör ekspresyonuna dair literatür verileri zayıftır. Charles ve ark. tarafından yapılan çalışmada, sıçan spinal kordunda yer alan oligodendrositlerde GABA-B reseptörü gösterilememiştir (20). Diğer bir çalışmada Luyt ve ark., in vitro ortamda GABA-B reseptörlerinin oligodendrosit öncü hücrelerinde bulunduğunu, ancak bu öncü hücreler olgun oligodendrosit formuna farklılaşınca, GABA-B reseptör ekspresyonun belirgin düzeyde azaldığını gösterdiler (21). Yine bu çalışmada, GABA-B agonisti baklofenin oligodendrosit öncü hücre proliferasyonunu ve göçünü arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, baklofen kuprizon verilmeyen gruplarda oligodendrosit ve oligodendroglia hücre sayısını değiştirmedi ve dolayısıyla miyelinizasyona da bir etki oluşturmadı. Kuprizonla birlikte uyguladığımızda ise 2 ve 5 mg/kg baklofen oligodendrosit sayısını kuprizonun etkisinden daha fazla azalttı. Ancak baklofenin oligodendrosit sayısını azaltmasının sonucu olarak gelişmesi beklenen daha az miyelinizasyonun aksine, 5 mg/kg baklofen miyelin (MBP) ekspresyonunu arttırdı.

Bu bulgularımızda cevaplanmayı bekleyen iki temel soru karşımıza çıkmaktadır: Oligodendrositler, literatür verilerine göre, GABA-B reseptörü eksprese etmezken ve baklofen oligodendrosit öncü hücre göçünü ve proliferasyonunu arttırırken, nasıl oluyor da bir GABA-B reseptör agonisti olan baklofen, kuprizonla birlikte uygulandığında oligodendrosit sayısını daha fazla azaltır? İkinci soru ise baklofenin etkisiyle azalmış oligodendrositlerin olduğu koşullarda nasıl oluyor da oligodendrositlerde üretilen miyelinin ekspresyonu artar? Bu noktada baklofenin oligodendrosit sayısını azaltması ve miyelin protein ekspresyonunu arttırmasıyla, diğer glial hücreler olan mikroglia ve astrosit sayıları üzerinde gösterdiği etkiler arasında bir bağlantı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlantıya tartışmanın ilerleyen bölümlerinde ayrıntılı bir şekilde yer vereceğiz.

Kuprizonun oligodendrosit ve oligodendroglial hücre sayılarını azaltarak demiyelinizasyona yol açtığını gösterdikten sonra, demiyelinizan hasara yanıt olarak korpus

kallosumda mikroglia ve astrosit sayılarının arttığını gösterdik. Mikroglia hücrelerini gösteren Iba1 ve astrosit hücrelerini gösteren GFAP antikorlarıyla yaptığımız immunohistokimyasal incelemelerde, kuprizon korpus kallosumda mikroglia ve astrosit sayılarını arttırdı. Kuprizon verilmeyen gruplarda 2 mg/kg baklofen mikroglia sayısını azaltı ancak 5 mg/kg baklofenin böyle bir etki oluşturmadı. Yine kuprizonsuz ortamda her iki doz baklofen astrosit sayısında anlamlı bir fark ortaya çıkarmadı. Kuprizonla birlikte uyguladığımızda ise 5 mg/kg baklofen, kuprizonla artan mikroglia sayısını anlamlı düzeyde azalttı ancak 2 mg/kg baklofen bir etki oluşturmadı. Yine kuprizonlu ortamda uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofen, her iki dozda da kuprizonla artan astrosit sayısını anlamlı düzeyde azalttı.

Korpus kallosumda kuprizon ile gelişen demiyelinizan hasara yanıt olarak, hasar alanında glial hücre artışı gerçekleşir. Mikroglial hücre artışı, oligodendrosit apoptozisinin görüldüğü kuprizon diyetinin ilk haftasında başlar, üç haftadan itibaren çok daha belirgin bir artış vardır ve 4-5 hafta arasında pik yapar (58, 73). Korpus kallosumda artan mikrogliaların ana kaynağı, beynin diğer bölgelerinden gelen mikroglialar ve proliferasyondur. Ancak düşük bir oranda periferal makrofajlar da hasar alanında tesbit edilmiştir (74, 75). Bizim çalışmamızda da kuprizon mikroglia sayısını arttırdı.

Mikrogliada GABA-B reseptörleri, bir çok çalışmada gösterilmiştir. Otopsi materyalinden veya sıçan embriyosundan alınarak hazırlanan hücre kültüründe in vitro ve sıçan beyninin histolojik kesitlerinde in vivo şartlarda, mikrogliaların GABA-B reseptörlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (20, 24, 25). Bu in vivo çalışmada, mikroglial aktivasyonun uyarılmasıyla GABA-B reseptör ekspresyonun arttığı da gösterildi. Ancak mikroglia hücre kültüründe GABA veya baklofen ile uyarılan bu GABA-B reseptörlerinin, mikroglial aktiviteyi baskıladığı yönünde sonuçlar bulundu. Lee ve ark.'nın çalışmalarında, aktive mikroglial hücrelere baklofen verildiği durumda; hücrede NFkB ve MAP kinaz aktivitesinde, hücreden IL-6 ve TNF-alfa salınımında ve mikroglianın nöral hücre üzerine olan nörotoksik etkisinde azalma gösterildi (25). Biz ise çalışmamızda, kuprizon verilmeyen gruplarda 2 mg/kg, kuprizonla birlikte verildiğinde ise 5 mg/kg baklofenin mikroglia sayısını azalttığını saptadık.

Demiyelinizan hasara yanıt olarak artan diğer bir glial hücre de astrositlerdir. Astrosit sayısındaki artış, oligodendrosit apoptozisi ve mikrogliozisten sonra demiyelinizasyonun ortaya çıkmasına paralel bir dönemde gerçekleşir (73). Kuprizon diyetinin ilk haftasında hipertofik astrositler görülürken, üçüncü haftadan itibaren belirgin astrosit artışı vardır (58). Biz de çalışmamızda, kuprizonun astrosit sayısını arttırdığını saptadık.

Astrositlerde de GABA-B reseptör ekspresyonu bir çok çalışmada gösterildi (20, 23, 145). GABA-B reseptörlerinin astrositlerdeki fonksiyonlarına yönelik yapılan çalışmada, Lee ve ark. baklofenin astrositlerde, mikroglialarda olduğu gibi, hücresel aktiviteyi baskıladığını gösterdiler (25). Çalışmamızda, kuprizon verilmeyen gruplarda baklofenin bir etkisi görülmezken, kuprizonla birlikte verildiğinde ise 2 ve 5 mg/kg baklofenin astrosit sayısını azalttığını saptadık.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler kuprizonla oluşan demiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin korpus kallosumda miyelinizasyonu arttırdığını, oligodendrosit, mikroglia ve astrosit sayılarını ise azalttığını göstermektedir.

Astrosit hücreleri baskılanmış transgenik deney hayvanlarına verilen kuprizonun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, korpus kallosumda demiyelinizasyonun gelişmediği ancak oligodendrosit sayısında belirgin azalmanın olduğu gösterildi (7). Astrositleri baskılanmış bu transgenik hayvanların korpus kallosum kesitlerinde yapılan elektron mikroskobi incelemesinde, kuprizonla miyelin hasarının oluştuğu ancak bu hasarlı miyelin debrisinin ortamdan uzaklaştırılamadığı için demiyelinizasyonun oluşmadığı gösterildi. Demiyelinizan hasar sürecinde artan mikrogliaların, miyelin debrisini fagosite ederek ortamdan uzaklaştırdığı bilinmektedir (46). Astrositlerin baskılandığı bu deney modelinde, korpus kallosuma mikroglial toplanmanın azaldığı gösterildi. Bu çalışma ile astrositlerin baskılandığı şartlarda, mikroglia hücre sayısının da azaldığı ve hasarlı miyelinlerin ortamdan uzaklaştırılamadığı gösterilmiş oldu. Çalışmamızda gösterilen baklofenle artmış miyelin ekspresyonun, yine baklofenin azalttığı astrosit ve mikroglia hücrelerine bağlı olarak, ortamdan uzaklaştırılamamış miyelin kalıntısı olabileceğini düşünmekteyiz.

Eğer baklofen oligodendrosit apoptozisini önleyerek demiyelinizasyonu azaltmış yani miyelin artışı sağlamış olsaydı, çalışmamızda oligodendrosit sayısını da kuprizona rağmen azalmamış olarak bulmamız gerekirdi. Nitrik oksit sentaz geni silinmiş deney hayvanlarına kuprizonun verildiği bir çalışmada, demiyelinizasyon azalmış, mikroglia sayısı düşmüş ve astrositik infiltrasyon hiç gelişmemiştir (159). Buraya kadar, çalışmamızla benzer sonuçların bulunduğu bu deneysel modelde, kuprizonun oligodendrosit hücre sayısını çok az değiştirdiği gösterilmiş ve demiyelinizasyondaki azalma, oligodendrosit apoptozisinde azalmaya bağlanmıştır. Bu çalışmadan da hareketle, çalışmamızda gösterdiğimiz baklofenin etkisiyle belirgin azalmış oligodendrositlerin olduğu koşullarda artan miyelin tutulumunun, astrosit ve mikroglia sayılarındaki azalmaya bağlı olarak ortamdan temizlenemeyen miyelin kalıntısı olabileceğini düşünmekteyiz.

Cevaplanmayı bekleyen diğer soru bir ise, oligodendrositlerde GABA-B reseptörü olmadığı ya da zayıf ekspresyon gösterdiği kabul edildiği takdirde, kuprizonla birlikte verilen 2 ve 5 mg/kg baklofenin kuprizonla birlikte SF verilen gruba göre oligodendrosit sayısını nasıl azalttığıdır.

Oligodendrosit öncü hücrelerinin kuprizon diyetinin ikinci haftasından itibaren korpus kallosuma göç etmeye başladığı ve dördüncü haftada en yüksek düzeylerine ulaştığı gösterilmiştir (81). Oligodendrositlerin ise kuprizonun etkisiyle 3-4 hafta arasında en düşük düzeylerine indiği ve kuprizon verilmeye devam edildiği halde, öncü hücrelerden gelişen yeni oligodendrositlerle bu sayının yeniden artmaya başladığı gösterilmiştir (7). Kuprizon diyeti devam ederken öncü hücrelerden gelişen yeni oligodendrosit sayısındaki artış başka çalışmalarda da gösterilmiştir (81).

Demiyelinizan hasarda artan astrosit ve mikroglialardan salınan TNF-alfa, IL-1beta, IGF-1, CXCR4 gibi sitokin ve kemokinlerin öncü hücrelerin korpus kallosumda birikmesini, burada prolifere olmasını ve olgun oligodendrositlere farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (8). Yine TNF-alfa veya NO genleri silinmiş deney hayvanlarında oluşturulan kuprizon modelinde, oligodendrosit öncü hücre sayısında belirgin azalma bulunmuştur (8, 159). Bu verilerin yanı sıra, diğer bir önemli çalışmada miyelin kalıntısının öncü hücrelerin olgun oligodendrositlere farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (3).

Çalışmamızda görülen oligodendrosit sayısında baklofenin etkisiyle ortaya çıkan azalma, kuprizon uygulaması devam ederken öncü hücrelerden gelişen yeni oligodendrosit sayısındaki azalmaya bağlı olabilir. Bu azalma, baklofenin etkisiyle oluşan astrosit ve mikroglia sayılarındaki azalmadan ve ortamdan uzaklaştırılamamış miyelin kalıntısından kaynaklanabilir.

Ancak burada bahsedilmesi gereken diğer bir önemli çalışma da Luyt ve ark.'nın, oligodendrosit öncü hücrelerinde GABA-B reseptörlerinin fonksiyonlarına yönelik yaptığı çalışmadır (21.) Bu çalışmada, in vitro koşullarda, öncü hücrelerde bulunan GABA-B reseptörlerinin baklofenle uyarılmasıyla, öncü hücre proliferasyonunun ve göçünün arttığı gösterilmiştir. Ancak bu verinin aksine bulgularımızda baklofen, yukarıda da bahsedildiği üzere, kuprizonla oluşan demiyelinizasyon modelinde oligodendrositleri azaltmıştır. Baklofenin, in vivo koşullarda, demiyelinizasyon modelinde oligodendrosit öncü hücrelerindeki etkisini inhibe eden etken veya etkenler, araştırılmaya değer bir çalışma konusu olabilir.

Remiyelinizasyon dönemi

İkinci aşamada remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin etkilerini araştırdık. Beş hafta kuprizonla demiyelinizan hasar oluşturduğumuz farelerde, beş haftanın sonunda kuprizonu diyetten çıkardık ve iki hafta süresince fareleri iyileşme periyoduna aldık. Kuprizon kesildikten sonra gelişen bu remiyelinizasyon periyodunda uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofenin, remiyelinizasyona ve glial hücrelere olası etkilerini araştırdık.

LFB ve MBP ile boyamalara tabi tuttuğumuz koronal beyin kesitlerinde, korpus kallosum bölgesinde her iki boya tutulumu da, demiyelinizasyon dönemine göre artarak belirgin remiyelinizasyon gelişti. Kuprizon verilmeyen grupla karşılaştırdığımızda ise MBP tutulumunda bir fark oluşmadı, LFB tutulumu ise anlamlı düzeyde daha düşük bulundu. Kuprizon kesildikten sonra uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofen ise MBP tutulumunda azalmaya neden olarak remiyelinizasyon gelişimini önledi. Ancak 5 mg/kg baklofenin etkisiyle ortaya çıkan fark, istatiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı. LFB tutulumunda ise her iki doz baklofende de bir etki gözlenmedi.

Remiyelinizasyon döneminde, korpus kallosumda NogoA ile oligodendrosit ve Olig2 ile oligodendroglia hücre sayılarını araştırdık, ancak demiyelinizasyon dönemiyle karşılaştırdığımızda arada anlamlı bir fark bulamadık. Kuprizon verilmeyen grupla karşılaştırdığımızda ise her iki hücre de anlamlı düzeyde daha az sayıda olduğunu saptadık. Remiyelinizasyon sürecinde, kuprizon kesildikten sonra uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofen ise hem oligodendrosit hem de oligodendroglia sayılarını anlamlı düzeyde arttırdı.

Kuprizon uygulamasıyla demiyelinizasyon oluşturulan farelerde, kuprizon diyetten çıkarılıp normal diyete devam edilirse, korpus kallosumda belirgin remiyelinizasyon ortaya çıkar. Bu remiyelinizasyon, kuprizon kesildikten iki hafta sonra, LFB ile histolojik, MBP ile immunohistokimyasal ve elektron mikroskobi çalışmaları ile gösterilmiştir. Remiyelinizasyon, kuprizon uygulamasının dördüncü haftasında pik yapan oligodendrosit öncü hücrelerinden gelişen yeni oligodendrositlerle oluşur (63, 71, 72). Kuprizon sonrası henüz ikinci günde hipertrofik oligodendrositler ve kısmi remiyelinize aksonlar görülürken, iki hafta sonra yeni oluşan oligodendrositlerle aksonların büyük çoğunluğunda remiyelinizasyon gösterilmiştir (63). Bizim çalışmamızda da kuprizon kesildikten sonra belirgin remiyelinizasyon gelişti. Ancak demiyelinizasyon dönemiyle karşılaştırıldığında, remiyelinizasyon gelişimine paralellik göstermesini beklediğimiz oligodendrosit ve oligodendroglia hücre sayılarında anlamlı bir artış bulamadık. Kuprizon kesildikten sonra gelişen remiyelinizasyonu, kuprizonun apoptotik stresinden kurtulan ve yeni gelişen

oligodendrositlerin oluşturduğunu düşünmekteyiz. Kuprizon sonrası iki haftalık iyileşme periyodu, remiyelinizasyonu göstermek için yeterli ancak oligodendrosit artışını göstermek için erken olabilir.

Remiyelinizasyona neden olan oligodendrosit öncü hücrelerinde GABA-B reseptörlerinin eksprese edildiğinden ancak oligodendrositlerde bu reseptörlerin olmadığından veya düşük ekspresyon gösterdiğinden bahsetmiştik (20, 21). Yine Luyt ve ark.'nın, baklofenin, öncü hücrelerde proliferasyon ve göç artışına neden olduğunu gösterdiği çalışmasına değinmiştik (21). Biz de çalışmamızda, remiyelinizasyon sürecinde uygulanan baklofenin oligodendrosit ve oligodendroglia sayısını anlamlı düzeyde arttırdığını saptadık. Ancak baklofenle artan oligodendrosit ve oligodendroglia sayısına paralel olarak artmasını beklediğimiz remiyelinizasyon değişmedi ya da 2 mg/kg baklofen, MBP protein ekspresyonlarını anlamlı düzeyde azalttı.

Miyelinizasyon öncü hücrelerin göç, proliferasyon ve olgun oligodendrositlere farklılaşma evrelerinin ardından olgun oligodendrositlerin miyelinize olmayan aksonlarla karşılıklı etkileşimine dayanan bir süreçtir (34). Akson ve oligodendrosit etkileşimiyle gerçekleşen miyelinizasyonun mekanizması PSS'nde açıkça tanımlanmış olmasına rağmen, MSS'nde net bir mekanizma gösterilememiştir. PSS aksonlarında üretilen bir büyüme faktörü olan nörogulin, schwann hücresindeki erb reseptörüne bağlanarak miyelinizasyonu başlatan bir sinyal oluşturur (35). Ancak MSS'nde nörogulin ile yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar gösterilmiştir. Taveggia ve ark. çalışmalarında nörogulin geni silinmiş deney hayvanlarında bozulmuş oligodendrosit çoğalması, farklılaşması ve miyelinizasyonu geliştiğini gösterdiler (160). Diğer bir çalışmada Brinkmann ve ark. tüm nörogulin isoformlarının genetik olarak silindiği hayvanlarda MSS'nde normal miyelinizasyon geliştiğini gösterdiler (161).

Çalışmalarda nörogulinin GABA salınımını ve aktivitesini arttırdığı gösterilmesine rağmen (162, 163), GABAerjik sistemin etkilendiği durumlarda aksonda nörogulin ekspresyonlarının nasıl değiştiğine dair bir veri bulamadık. Remiyelinizasyon döneminde baklofenin etkisiyle görülen olgun oligodendrosit artışına rağmen miyelinizasyondaki azalma, MSS'ndeki miyelinizasyon mekanizmasının baskılanmasına bağlı gelişmiş olabilir. Baklofenin demiyelinizan bir hasardan sonra gelişen remiyelinizasyon döneminde akson oligodendrosit bağlantısını nasıl etkilediği, nörogulin ekspresyonuna muhtemel etkileri ve miyelinizasyon sürecini etkileyen başka etkenlere olası etkilerinin araştırılmaya değer bir çalışma konusu olabileceğini düşünmekteyiz.

Son olarak, kuprizonla oluşan demiyelinizan hasara yanıt olarak artan astrosit ve mikroglia sayılarının, remiyelinizasyon döneminde anlamlı düzeyde azaldığını saptadık. Kuprizon verilmeyen grupla karşılaştırdığımızda ise mikroglia sayısında anlamlı bir fark oluşmadı. Ancak remiyelinizasyon dönemi astrosit sayısı her ne kadar kuprizon verilmeyen gruba göre yüksek olsa da bu fark istatiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı. Remiyelinizasyon sürecinde uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofe, mikroglia sayısını azalttı ancak astrosit sayısına bir etki göstermedi.

Demiyelinizasyon döneminde korpus kallosumda artan mikrogliaların, remiyelinizasyonda hızlı bir düşüşle kontrol düzeylerine kadar azaldığı gösterilmiştir (6, 75). Bizim çalışmamızda da kuprizon kesildikten sonra mikroglia sayısının azaldı.

Çalışmalarda mikrogliaların GABA-B reseptörlerini eksprese ettiği ve baklofenin mikroglial aktiviteyi baskıladığı bilgilerine yer verilmişti (24, 25). Biz ise çalışmamızda, kuprizon kesildikten sonra uygulanan 2 ve 5 mg/kg baklofenin mikroglia sayısını azalttığını saptadık.

Demiyelinizasyon döneminde hasara yanıt olarak artan astrositler, remiyelinizasyon döneminde de kontrol düzeylerine göre yüksek kalır. Demiyelinizasyon dönemine göre azalan veya değişmeyen astrosit sayısı, bu dönemde hücresel olarak aktif formdadır (77, 164, 165). Ancak demiyelinizyon döneminde artmış olan astrosit hücre proliferasyonun, remiyelinizasyon ile belirgin düzeyde azaldığı gösterilmiştir (165). Çalışmamızda, demiyelinizasyon döneminde artan astrosit sayısının, kuprizon kesildikten sonra anlamlı düzeyde azaldığını gösterdik. Ancak anlamlı düzeyde fark oluşturmasa da, remiyelinizasyon dönemi astrosit sayısının, kuprizon verilmeyen gruba göre yüksek kaldığını gördük.

Çalışmalarda astrositlerin GABA-B reseptörlerini eksprese ettiği ve baklofenin astrositlerde hücresel aktiviteyi baskıladığı, bilgilerine yer verilmişti (20, 25). Ancak bizim çalışmamızda remiyelinizasyon döneminde uyguladığımız 2 ve 5 mg/kg baklofen astrosit sayısını değiştirmedi.

6. SONUÇ

Multipl skleroz genç erişkinlerde en sık görülen non-travmatik nörodejeneratif bir hastalıktır. MS'in karakteristik özellikleri arasında, merkezi sinir sistemi tutulumu, kronik ve otoimmun bir inflamasyon, inflamasyonla oluşan lokalize demiyelinizasyon odakları ve progresif seyirle gelişen yetersiz remiyelinizasyon yer alır. Baklofen MS kliniğinde, spastisite tedavisinde kullanılan bir ajandır. Çalışmalarda trigeminal nevralji ve nörojen mesane gibi MS'da sıklıkla rastlanan semptomlarda da etkinliği gösterilmiştir. Ancak, MS'da görülen birçok semptomda faydalı olduğu gösterilen baklofenin, MS'da ve deneysel hayvan modellerinde patolojik süreçlere ne gibi etkilerde bulunduğu çalışılmamıştır.

Biz bu çalışmada, MS'un deneysel hayvan modeli olan kuprizon modelinde, baklofenin glial hücreler ve myelinizasyon üzerine etkilerini ilk defa gösterdik. Ayrıca bu çalışmayla baklofenin glial hücreler üzerine etkileri in vivo bir modelde ilk defa gösterilmiş oldu. Elde ettiğimiz verilere göre, MS'da spastisite tedavisinde kullanılan baklofen demiyelinizasyon döneminde miyelinizasyonu arttırmaktadır. Ancak bu bize baklofenin demiyelinizasyonu önlediğini göstermemektedir. Çünkü elde ettiğimiz sonuçlara göre baklofen miyelinizasyon için gerekli olan oligodendrosit sayılarını azaltmaktadır. Remiyelinizasyon döneminde ise baklofen oligodendrosit ve oligodendroglia sayılarını arttırmasına rağmen miyelinizasyonda pozitif bir etki oluşturmamakta, aksine azaltmaktadır. Sonuç olarak bu çalışmamızda, baklofenin deneysel MS modelinde, demiyelinizasyon sürecinde hasarı arttırdığı ve remiyelinizasyon sürecinde rejenerasyonu engellediği gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? Annu Rev Neurosci. 2008; 31: 247-69.

2. Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N. Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendrogliopathy. Clin Rev Allergy Immunol. 2012; 42: 26-34.

3. Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. J Neurosci. 2006; 26: 328-32.

4. Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment Cell Mol Life Sci. 2008; 65: 2702-20.

5. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. Brain Pathol. 2001; 11: 107-16.

6. Voss EV, Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? Neurobiol Dis. 2012; 45: 519-28.

7. Skripuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, Pul R, Voss E, Berger K, Kipp M, Baumgärtner W, Stangel M. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. Brain. 2013; 136: 147-67.

8. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci. 2001; 4: 1116-22.

9. Erwin A, Gudesblatt M, Bethoux F, Bennett SE, Koelbel S, Plunkett R, Sadiq S, Stevenson VL, Thomas AM, Tornatore C, Zaffaroni M, Hughes M. Intrathecal baclofen in multiple sclerosis: too little, too late? Mult Scler. 2011; 17: 623-9.

10. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. Pharmacol Rev. 2002 Jun; 54(2): 247-64.

11. Villas Boas GR, Zamboni CG, Peretti MC, Correia D, Rueda AV, Camarini R, Brunialti-Godard AL, Boerngen-Lacerda R. GABA(B) receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. Pharmacol Biochem Behav. 2012 Aug; 102(2): 233-40.

12. Patel SM, Ebenezer IS. Effects of chronic systemic administration of the GABA(B) receptor agonist baclofen on food intake and body weight in rats. Eur J Pharmacol. 2010 Jun 10;635(1-3): 129-34.

13. Saito K, Barber R, Wu J, Matsuda T, Roberts E, Vaughn JE. Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Feb; 71(2): 269-73.

14. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. Physiol Rev. 2004 Jul; 84(3): 835-67.

15. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. Nature. 1998 Dec 17; 396(6712): 683-7.

16. Jackson-Friedman C, Lyden PD, Nunez S, Jin A, Zweifler R. High dose baclofen is neuroprotective but also causes intracerebral hemorrhage: a quantal bioassay study using the intraluminal suture occlusion method. Exp Neurol. 1997 Oct; 147(2): 346-52.

17. Dave KR, Lange-Asschenfeldt C, Raval AP, Prado R, Busto R, Saul I, Pérez-Pinzón MA J Ischemic preconditioning ameliorates excitotoxicity by shifting glutamate/gamma-aminobutyric acid release and biosynthesis. Neurosci Res. 2005; 82: 665-73.

18. Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steinman L. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 2580-5.

19. Sternberg Z, Cesario A, Rittenhouse-Olson K, Sobel RA, Leung YK, Pankewycz O, Zhu B, Whitcomb T, Sternberg DS, Munschauer FE. Acamprosate modulates experimental autoimmune encephalomyelitis. Inflammopharmacology. 2012; 20: 39-48.

20. K.J. Charles, J. Deuchars, C.H. Davies, and M.N. Pangalosa. GABAB receptor subunit expression in glia. Molecular and Cellular Neuroscience 2003; 214–223.

21. Luyt K, Slade TP, Dorward JJ, Durant CF, Wu Y, Shigemoto R, Mundell SJ, Váradi A, Molnár E. Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. J Neurochem. 2007; 100: 822-40.

22. Magnaghi V, Ballabio M, Cavarretta IT, Froestl W, Lambert JJ, Zucchi I, Melcangi RC GABAB receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression. Eur J Neurosci. 2004; 19: 2641-9.

23. Albrecht J, Pearce B, Murphy S. Evidence for an interaction between GABAB and glutamate receptors in astrocytes as revealed by changes in Ca2+ flux. Eur J Pharmacol. 1986; 125: 463-4.

24. Kuhn SA, van Landeghem FK, Zacharias R, Färber K, Rappert A, Pavlovic S, Hoffmann A, Nolte C, Kettenmann H. Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. Mol Cell Neurosci. 2004; 25: 312-22.

25. Lee M, Schwab C, McGeer PL. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity Glia. 2011; 59: 152-65.

26. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. Ann Neurol. 2009; 66: 739-53.

27. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of pathogenesis in multiple sclerosis: implications for promotion of remyelination. Ann Neurol. 2000 Jun; 47(6): 707-17.

28. Bradl M, Lassmann H . Oligodendrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010; 119: 37-53.

29. Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. Nat Rev Neurosci. 2006 Dec; 7(12): 932-41.

30. Podbielska M, Hogan EL. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? Mult Scler. 2009; 15: 1011-29.

31. Lemke G. The molecular genetics of myelination: an update. Glia. 1993; 7: 263-71.

32. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. J Neurosci. 2006; 26: 7907-18.

33. Copray S, Balasubramaniyan V, Levenga J, de Bruijn J, Liem R, Boddeke E. Olig2 overexpression induces the in vitro differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes. Stem Cells. 2006; 1001-10.

34. Piaton G, Gould RM, Lubetzki C. Axon-oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair J Neurochem. 2010; 114: 1243-60.

35. Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. Neuron. 2005; 47: 681-94.

36. Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B, Lubetzki C. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93: 9887-92.

37. Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE Nature. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. 2000; 405: 187-91.

38. Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. Nat Neurosci. 2004; 7 : 24-32.

39. Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D. Vesicular glutamate release from axons in white matter. Nat Neurosci. 2007 Mar; 10(3): 311-20.

40. Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. Nat Neurosci. 2007 Mar; 10(3): 321-30.

41. Schonberg DL, Popovich PG, McTigue DM. Oligodendrocyte generation is differentially influenced by toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4-mediated intraspinalmacrophage activation. J Neuropathol Exp Neurol. 2007; 66: 1124-35.

42. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? Nat Rev Neurosci. 2002; 705-14.

43. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. Brain Res Rev. 2007; 53: 344-54.

44. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 2005; 308: 1314-8.

45. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci. 2007; 10: 1387-94.

46. Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. Neuroscience. 2009;158: 1030-8.

47. Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, Waisman A, Rülicke T, Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. Nat Med. 2005; 11: 146-52.

48. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR Trends. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. Neurosci. 2009; 32: 160-9.

49. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010; 119: 7-35.

50. Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis. Glia. 2007; 55: 1300-12.

51. Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. Pathophysiology. 2011; 18: 21-9.

52. Linker RA, Lee DH. Models of autoimmune demyelination in the central nervous system: on the way to translational medicine. Exp Transl Stroke Med. 2009; 1: 5.

53. Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Curr Protoc Immunol. 2010; 15: 15.

54. Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus andmultiple sclerosis. PLoS One. 2013; 9: 8.

55. Carlton WW. Response of mice to the chelating agents sodium diethyldithiocarbamate, alpha-benzoinoxime, and biscyclohexanone oxaldihydrazone. Toxicol Appl Pharmacol. 1966; 8: 512-21.

56. Suzuki K, Kikkawa Y. Am J Pathol. Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone. 1969; 54: 307-25..

57. Blakemore WF. Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. J Neurol Sci. 1973; 20: 63-72.

58. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. J Neuroimmunol. 1998; 92: 38-49.

59. Venturini G. Enzymic activities and sodium, potassium and copper concentrations in mouse brain and liver after cuprizonetreatment in vivo. J Neurochem. 1973; 21: 1147-51.

60. Zatta P, Raso M, Zambenedetti P, Wittkowski W, Messori L, Piccioli F, Mauri PL, Beltramini M. Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. Cell Mol Life Sci. 2005; 62: 1502-13.

61. Benetti F, Ventura M, Salmini B, Ceola S, Carbonera D, Mammi S, Zitolo A, D'Angelo P, Urso E, Maffia M, Salvato B, Spisni E. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration Neurotoxicology. 2010; 31: 509-17.

62. Cammer W. The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. J Neurol Sci. 1999 ; 168: 116-20.

63. Acs P, Komoly S. Selective ultrastructural vulnerability in the cuprizone-induced experimental demyelination. Ideggyogy Sz. 2012; 65: 266-70.

64. Werner SR, Saha JK, Broderick CL, Zhen EY, Higgs RE, Duffin KL, Smith RC. Proteomic analysis of demyelinated and remyelinating brain tissue following dietary cuprizone administration. J Mol Neurosci. 2010; 42: 210-25.

65. Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Uña AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF .The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. Neurochem Res. 2007; 32: 279-92..

66. Hesse A, Wagner M, Held J, Brück W, Salinas-Riester G, Hao Z, Waisman A, Kuhlmann T. In toxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent Neurobiol Dis. 2010; 37: 362-9.

67. Palumbo S, Toscano CD, Parente L, Weigert R, Bosetti F. The cyclooxygenase-2 pathway via the PGE_2 EP2 receptor contributes to oligodendrocytes apoptosis in cuprizone-induced demyelination. J Neurochem. 2012; 121: 418-27.

68. Kim S, Steelman AJ, Zhang Y, Kinney HC, Li J. Aberrant upregulation of astroglial ceramide potentiates oligodendrocyte injury. Brain Pathol. 2012; 22 : 41-57..

69. Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Setalo G Jr, Borgulya G, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. Brain. 2010; 133: 822-34.

70. Jurevics H, Largent C, Hostettler J, Sammond DW, Matsushima GK, Kleindienst A, Toews AD, Morell P. Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. J Neurochem. 2002; 82: 126-36.

71. Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK. Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. Mol Cell Neurosci. 1998; 12: 220-7.

72. Lindner M, Heine S, Haastert K, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Grothe C, Baumgärtner W, Stangel M. Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination. Neuropathol Appl Neurobiol. 2008; 34: 105-14.

73. Buschmann JP, Berger K, Awad H, Clarner T, Beyer C, Kipp M. Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. J Mol Neurosci. 2012; 48: 66-76..

74. McMahon EJ, Suzuki K, Matsushima GK. Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. J Neuroimmunol. 2002; 130: 32-45.

75. Remington LT, Babcock AA, Zehntner SP, Owens T. Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. Am J Pathol. 2007; 170: 1713-24.

76. Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, Boddeke HW. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. Glia. 2012; 60: 306-21.

77. Hibbits N, Yoshino J, Le TQ, Armstrong RC. Astrogliosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination. ASN Neuro. 2012; 30: 393-408.

78. Raasch J, Zeller N, van Loo G, Merkler D, Mildner A, Erny D, Knobeloch KP, Bethea JR, Waisman A, Knust M, Del Turco D, Deller T, Blank T, Priller J, Brück W, Pasparakis M, Prinz M. IkappaB kinase 2 determines oligodendrocyte loss by non-cell-autonomous activation of NF-kappaB in the central nervous system. Brain. 201; 134: 1184-98.

79. Mason JL, Langaman C, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK. Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. Neuropathol Appl Neurobiol. 2001 Feb; 27(1): 50-8.

80. Crawford DK, Mangiardi M, Xia X, López-Valdés HE, Tiwari-Woodruff SK. Functional recovery of callosal axons following demyelination: a critical window Neuroscience. 2009; 164: 1407-21.

81. Mason JL, Jones JJ, Taniike M, Morell P, Suzuki K, Matsushima GK. Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. J Neurosci Res. 2000; 61: 251-62.

82. Bakker DA, Ludwin SK. Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. J Neurol Sci. 1987; 78: 125-37.

83. J Emerson MR, Biswas S, LeVine SM. Cuprizone and piperonyl butoxide, proposed inhibitors of T-cell function, attenuate experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice. Neuroimmunol. 2001; 119: 205-13.

84. Maña P, Fordham SA, Staykova MA, Correcha M, Silva D, Willenborg DO, Liñares D. Demyelination caused by the copper chelator cuprizone halts T cell mediated autoimmune neuroinflammation. J Neuroimmunol. 2009; 210: 13-21.

85. Hiremath MM, Chen VS, Suzuki K, Ting JP, Matsushima GK. MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. J Neuroimmunol. 2008 Oct 15; 203(1): 23-32.

86. Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki PN, Kotsiari A, Skuljec J, Trebst C, Stangel M. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination Brain Res. 2009; 1283: 127-38.

87. Norkute A, Hieble A, Braun A, Johann S, Clarner T, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M. Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the mouse hippocampus. J Neurosci Res. 2009; 87: 1343-55.

88. Pott F, Gingele S, Clarner T, Dang J, Baumgartner W, Beyer C, Kipp M. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. Brain Res. 2009; 11: 37-49.

89. Herder V, Hansmann F, Stangel M, Skripuletz T, Baumgärtner W, Beineke A. Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system.Neuropathol Appl Neurobiol. 2011; 37: 676-84.

90. Steelman AJ, Thompson JP, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication Neurosci Res. 2012; 72: 32-42.

91. Schmidt T, Awad H, Slowik A, Beyer C, Kipp M, Clarner T. Regional heterogeneity of cuprizone-induced demyelination: topographical aspects of the midline of the corpus callosum. J Mol Neurosci. 2013; 49: 80-8.

92. Ye JN, Chen XS, Su L, Liu YL, Cai QY, Zhan XL, Xu Y, Zhao SF, Yao ZX. Progesterone alleviates neural behavioral deficits and demyelination with reduced degeneration of oligodendroglial cells in cuprizone-induced mice. PLoS One. 2013; 8.

93. Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. . Toxicol Lett. 2007. 30; 169: 205-13.

94. Xu H, Yang HJ, McConomy B, Browning R, Li XM. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mouse exposed to cuprizone: effects of antipsychotics. Front Behav Neurosci. 2010. 18; 4: 8.

95. Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK. SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. Brain Pathol. 2009; 19: 467-79.

96. Adamo AM, Paez PM, Escobar Cabrera OE, Wolfson M, Franco PG, Pasquini JM, Soto EF. Remyelination after cuprizone-induced demyelination in the rat is stimulated by apotransferrin. Exp Neurol. 2006; 198: 519-29.

97. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology. 1996; 46: 907-11.

98. Sá MJ. Physiopathology of symptoms and signs in multiple sclerosis. Arq Neuropsiquiatr. 2012; 70: 733-40.

99. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. Clin Neurol Neurosurg. 2010; 112: 365-85.

100. Lance JW. What is spasticity? Lancet. 1990 Mar 10; 335(8689): 606.

101. Bohannon RW, Smith MB. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. Phys Ther. 1987 Feb; 67(2): 206-7.

102. Haselkorn JK, Loomis S. Multiple sclerosis and spasticity. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2005 May; 16(2): 467-81.

103. Lobina C, Carai MA, Froestl W, Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F, Gessa GL, Colombo G. Activation of the GABA(B) Receptor Prevents Nicotine-Induced Locomotor Stimulation in Mice. Front Psychiatry. 2011; 2: 76.

104. Woo SH, Kim HS, Yun JS, Lee MK, Oh KW, Seong YH, Oh SK, Jang CG. Inhibition of baclofen on morphine-induced hyperactivity, reverse tolerance and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity. Pharmacol Res. 2001 Apr; 43(4): 335-40.

105. Jacobson LH, Bettler B, Kaupmann K, Cryan JF. GABAB1 receptor subunit isoforms exert a differential influence on baseline but not GABAB receptor agonist-induced changes in mice. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Dec; 319(3): 1317-26.

106. Pravetoni M, Wickman K. Behavioral characterization of mice lacking GIRK/Kir3 channel subunits. Genes Brain Behav. 2008 Jul; 7(5): 523-31.

107. Tsai ML, Crutchley M, Boyce R, Ma J, Boon F, Cain DP, Leung LS. Long-lasting auditory gating deficit accompanied by GABA(B) receptor dysfunction in the hippocampus after early-life limbic seizures in rats. Physiol Behav. 2012 Jun 25; 106(4): 534-41.

108. Ebenezer IS, Prabhaker M. The effects of intraperitoneal administration of the GABA(B) receptor agonist baclofen on food intake in CFLP and C57BL/6 mice. Eur J Pharmacol. 2007 Aug 13; 569(1-2): 90-3.

109. Patel SM, Ebenezer IS. The effects of chronic intraperitoneal administration of the GABA B receptor agonist baclofen on food intake inrats. Eur J Pharmacol. 2008 Sep 28; 593(1-3): 68-72.

110. Bonaventura MM, Crivello M, Ferreira ML, Repetto M, Cymeryng C, Libertun C, Lux-Lantos VA. Effects of GABAB receptor agonists and antagonists on glycemia regulation in mice. Eur J Pharmacol. 2012 Feb 29; 677(1-3): 188-96.

111. Roberts E, Frankel S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. J Biol Chem. 1950 Nov;187(1): 55-63.

112. Obata K, Ito M, Ochi R, Sato N. Pharmacological properties of the postsynaptic inhibition by Purkinje cell axons and the action of gamma-aminobutyric acid on deiters NEURONES. Exp Brain Res. 1967; 4(1): 43-57.

113. Blum BP, Mann JJ. The GABAergic system in schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol. 2002 Jun; 5(2): 159-79.

114. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Al-Rawi PG, Kett-White CR, Gupta AK, Maskell LB, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. Increases in GABA concentrations during cerebral ischaemia: a microdialysis study of extracellular amino acids. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002 Jan; 72(1): 99-105.

115. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature. 1997 Mar 20; 386(6622): 239-46.

116. Bowery NG, Doble A, Hill DR, Hudson AL, Shaw JS, Turnbull MJ, Warrington R. Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. Eur J Pharmacol. 1981 Apr 24; 71(1): 53-70.

117. Lal S, Shuaib A, Ijaz S. Baclofen is cytoprotective to cerebral ischemia in gerbils. Neurochem Res. 1995 Feb; 20(2): 115-9.

118. Costa C, Leone G, Saulle E, Pisani F, Bernardi G, Calabresi P. Coactivation of GABA(A) and GABA(B) receptor results in neuroprotection during in vitro ischemia. Stroke. 2004 Feb; 35(2): 596-600.

119. Ouyang C, Guo L, Lu Q, Xu X, Wang H. Enhanced activity of GABA receptors inhibits glutamate release induced by focal cerebral ischemia in rat striatum. Neurosci Lett. 2007 Jun 13; 420(2): 174-8.

120. Tanaka S, Tsuchida A, Kiuchi Y, Oguchi K, Numazawa S, Yoshida T. GABAergic modulation of hippocampal glutamatergic neurons: an in vivo microdialysis study. Eur J Pharmacol. 2003 Mar 28; 465(1-2): 61-7.

121. Zhou C, Li C, Yu HM, Zhang F, Han D, Zhang GY. Neuroprotection of gamma-aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in cerebral ischemia. J Neurosci Res. 2008 Oct; 86(13): 2973-83.

122. Cheng CY, Su SY, Tang NY, Ho TY, Lo WY, Hsieh CL. Ferulic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis by enhancing GABA(B1) receptor expression in transient focal cerebral ischemia in rats. Acta Pharmacol Sin. 2010 Aug; 31(8): 889-99.

123. Schwartz RD, Huff RA, Yu X, Carter ML, Bishop M. Postischemic diazepam is neuroprotective in the gerbil hippocampus. Brain Res. 1994 May 30; 647(1): 153-60.

124. Cross AJ, Jones JA, Baldwin HA, Green AR. Neuroprotective activity of chlormethiazole following transient forebrain ischaemia in the gerbil. Br J Pharmacol. 1991 Oct; 104(2): 406-11.

125. Ricci L, Valoti M, Sgaragli G, Frosini M. Taurine-like GABA aminotransferase inhibitors prevent rabbit brain slices against oxygen-glucose deprivation-induced damage. Amino Acids. 2012 Jun; 42(6): 2139-47.

126. Kale A, Börcek AÖ, Emmez H, Yildirim Z, Durdağ E, Lortlar N, Kurt G, Doğulu F, Kılıç N. Neuroprotective effects of gabapentin on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. J Neurosurg Spine. 2011 Sep; 15(3): 228-37

127. Manyam NV, Katz L, Hare TA, Gerber JC 3rd, Grossman MH. Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurologic disorders. Arch Neurol. 1980 Jun; 37(6): 352-5.

128. Qureshi GA, Baig MS. Quantitation of free amino acids in biological samples by high-performance liquid chromatography. Application of the method in evaluating amino acid levels in cerebrospinal fluid and plasma of patients with multiple sclerosis. J Chromatogr. 1988 Dec 28; 459: 237-44.

129. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. Ann Neurol. 2006 Mar; 59(3): 478-89.

130. Demakova EV, Korobov VP, Lemkina LM. [Determination of gamma-aminobutyric acid concentration and activity of glutamate decarboxylase in blood serum of patients with multiple sclerosis]. Klin Lab Diagn. 2003 Apr; (4): 15-7.

131. Gottesfeld Z, Teitelbaum D, Webb C, Arnon R. Changes in the GABA system in experimental allergic encephalomyelitis-induced paralysis. J Neurochem. 1976 Sep; 27(3): 695-9.

132. Musgrave T, Tenorio G, Rauw G, Baker GB, Kerr BJ. Tissue concentration changes of amino acids and biogenic amines in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Neurochem Int. 2011 Aug; 59(1): 28-38.

133. Ziehn MO, Avedisian AA, Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. Lab Invest. 2010 May; 90(5): 774-86.

134. Wang Y, Feng D, Liu G, Luo Q, Xu Y, Lin S, Fei J, Xu L. Gamma-aminobutyric acid transporter 1 negatively regulates T cell-mediated immune responses and ameliorates autoimmune inflammation in the CNS. J Immunol. 2008 Dec 15; 181(12): 8226-36.

135. Rossi S, Muzio L, De Chiara V, Grasselli G, Musella A, Musumeci G, Mandolesi G, De Ceglia R, Maida S, Biffi E, Pedrocchi A, Menegon A, Bernardi G, Furlan R,Martino G, Centonze D. Impaired striatal GABA transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Behav Immun. 2011 Jul; 25(5): 947-56.

136. Rossi S, Studer V, Motta C, De Chiara V, Barbieri F, Bernardi G, Centonze D. Inflammation inhibits GABA transmission in multiple sclerosis. Mult Scler. 2012 Nov; 18(11): 1633-5.

137. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. J Neurosci. 2005 Mar 23; 25(12): 3219-28.

138. Bibolini MJ, Chanaday NL, Báez NS, Degano AL, Monferran CG, Roth GA. Inhibitory role of diazepam on autoimmune inflammation in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience. 2011 Dec 29; 199: 421-8.

139. Raible DW, McMorris FA. Cyclic AMP regulates the rate of differentiation of oligodendrocytes without changing the lineage commitment of their progenitors. Dev Biol. 1989 Jun; 133(2): 437-46.

140. Othman T, Yan H, Rivkees SA. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. Glia. 2003 Nov; 44(2): 166-72.

141. Procacci P, Ballabio M, Castelnovo LF, Mantovani C, Magnaghi V. GABA-B receptors in the PNS have a role in Schwann cells differentiation? Front Cell Neurosci. 2012; 6: 68.

142. Magnaghi V, Ballabio M, Camozzi F, Colleoni M, Consoli A, Gassmann M, Lauria G, Motta M, Procacci P, Trovato AE, Bettler B. Altered peripheral myelination in mice lacking GABAB receptors. Mol Cell Neurosci. 2008 Mar; 37(3): 599-609.

143. Tamura S, Watanabe M, Kanbara K, Yanagawa T, Watanabe K, Otsuki Y, Kinoshita M. Expression and distribution of GABAergic system in rat knee joint synovial membrane. Histol Histopathol. 2009 Aug; 24(8): 1009-19.

144. Duthey B, Hübner A, Diehl S, Boehncke S, Pfeffer J, Boehncke WH. Anti-inflammatory effects of the GABA(B) receptor agonist baclofen in allergic contact dermatitis. Exp Dermatol. 2010 Jul 1; 19(7): 661-6.

145. Hösli E, Hösli L. Evidence for GABAB-receptors on cultured astrocytes of rat CNS: autoradiographic binding studies. Exp Brain Res. 1990; 80(3): 621-5.

146. Nilsson M, Eriksson PS, Rönnbäck L, Hansson E. GABA induces Ca2+ transients in astrocytes. Neuroscience. 1993 Jun; 54(3): 605-14.

147. López-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairén A, Luján R. Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. Hippocampus. 2004; 14(7): 836-48.

148. Oka M, Wada M, Wu Q, Yamamoto A, Fujita T. Functional expression of metabotropic GABAB receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 17; 341(3): 874-81.

149. Bortolato M, Frau R, Orrù M, Fà M, Dessì C, Puligheddu M, Barberini L, Pillolla G, Polizzi L, Santoni F, Mereu G, Marrosu F. GABAB receptor activation exacerbates spontaneous spike-and-wave discharges in DBA/2J mice. Seizure. 2010 May; 19(4): 226-31.

150. Karl T, Pabst R, von Hörsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. Exp Toxicol Pathol. 2003 Jul; 55(1): 69-83.

151. http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html

152. Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, Owens T, Brück W. Nogo-A is a Reliable Oligodendroglial Marker in Adult Human and Mouse CNS and in Demyelinated Lesions. J Neuropathol Exp Neurol. 2007 Mar; 66(3): 238-46.

153. Torkildsen Ø, Brunborg LA, Thorsen F, Mørk SJ, Stangel M, Myhr KM, Bø L. Effects of dietary intervention on MRI activity, de- and remyelination in the cuprizone model for demyelination. Exp Neurol. 2009 Jan; 215(1): 160-6.

154. Moharregh-Khiabani D, Blank A, Skripuletz T, Miller E, Kotsiari A, Gudi V, Stangel M. Effects of Fumaric Acids on Cuprizone Induced Central Nervous System De- and Remyelination in the Mouse. PLoS One. 2010 Jul 23; 5(7): e11769.

155. Mead AJ, Little HJ. Do GABAB receptors have a role in causing behavioural hyperexcitability, both during ethanol withdrawal and in naive mice? Psychopharmacology (Berl). 1995 Jan; 117(2): 232-9.

156. Car H, Wioeniewska RJ. Effects of baclofen and L-AP4 in passive avoidance test in rats after hypoxia-induced amnesia. Pharmacol Rep. 2006 Jan-Feb; 58(1): 91-100.

157. Varani AP, Balerio GN. GABA(B) receptors involvement in the effects induced by nicotine on anxiety-related behaviour in mice. Pharmacol Res. 2012 May; 65(5): 507-13.

158. Li X, Risbrough VB, Cates-Gatto C, Kaczanowska K, Finn MG, Roberts AJ, Markou A. Comparison of the effects of the GABAB receptor positive modulator BHF177 and the GABAB receptor agonistbaclofen on anxiety-like behavior, learning, and memory in mice. Neuropharmacology. 2013 Jul; 70: 156-67.

159. Liñares D, Taconis M, Maña P, Correcha M, Fordham S, Staykova M, Willenborg DO. Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. J Neurosci. 2006 Dec 6; 26(49): 12672-81.

160. Taveggia C, Thaker P, Petrylak A, Caporaso GL, Toews A, Falls DL, Einheber S, Salzer JL. Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. Glia. 2008 Feb; 56(3): 284-93.

161. Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Müller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM,Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave KA. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. Neuron. 2008 Aug 28; 59(4): 581-95.

162. Woo RS, Li XM, Tao Y, Carpenter-Hyland E, Huang YZ, Weber J, Neiswender H, Dong XP, Wu J, Gassmann M, Lai C, Xiong WC, Gao TM, Mei L. Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. Neuron. 2007 May 24;54(4):599-610.

163. Matsukawa R, Hirooka Y, Ito K, Sunagawa K. Inhibition of Neuregulin-1/ErbB Signaling in the Rostral Ventrolateral Medulla Leads to Hypertension through Reduced Nitric Oxide Synthesis. Am J Hypertens. 2013 Jan; 26(1): 51-7.

164. Trebst C, Heine S, Lienenklaus S, Lindner M, Baumgärtner W, Weiss S, Stangel M. Lack of interferon-beta leads to accelerated remyelination in a toxic model of central nervous system demyelination. Acta Neuropathol. 2007 Dec; 114(6): 587-96.

165. Chen LP, Li ZF, Ping M, Li R, Liu J, Xie XH, Song XJ, Guo L. Regulation of Olig2 during astroglial differentiation in the subventricular zone of a cuprizone-induced demyelination mouse model. Neuroscience. 2012 Sep 27; 221: 96-107.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokul : Malatya Y. K. B. İlkokulu, 1989-1994
Ortaokul : Malatya İ. H. Ortaokulu, 1994-1997
Lise : Malatya H. A. A. Lisesi, 1997-2000
Üniversite : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2000-2007
Uzmanlık : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 2008-2013

İLETİŞİM BİLGİLERİ

E-mail : esamenes@gmail.com
Telefon : 0555 5602183