DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI TRİNİTROBENZENSÜLFONİK ASİT VE ETANOLLE İNDÜKLENEN KOLİTİN ŞİDDETİNİ DEĞİŞTİRİR

Furkan Seçil*, Hüseyin Emre Can*, Hüseyin Furkan Karakoç*, Nurefşan Dalgıç*, Şeyma Böyükyılmaz*

Arş. Gör. Tuğba Karamahmutoğlu, Arş. Gör. Dr. Zarife Nigar Özdemir Kumral,
Arş. Gör. Sevil Arabacı Tamer,
Dr.Leyla Semiha Şen, Arş. Gör. Ayça Karagöz,
Doç. Dr.Dilek Akakın, Prof. Dr. Filiz Onat, Prof. Dr. Yaşar İnci Alican,

Danışman: Prof. Dr. Neşe İmeryüz

**Eşit şekilde katılım göstermiştir*

MaSCo
Marmara Student Congress

Sunum Kodu: DS202

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ 1983

SUNUM AKIŞI

- Giriş
- Amaç

- Materyal ve metot
- Bulgular

- Sonuç
- Tartışma

GİRİŞ

Her şey rafta gördüğümüz bir kitapla başladı.

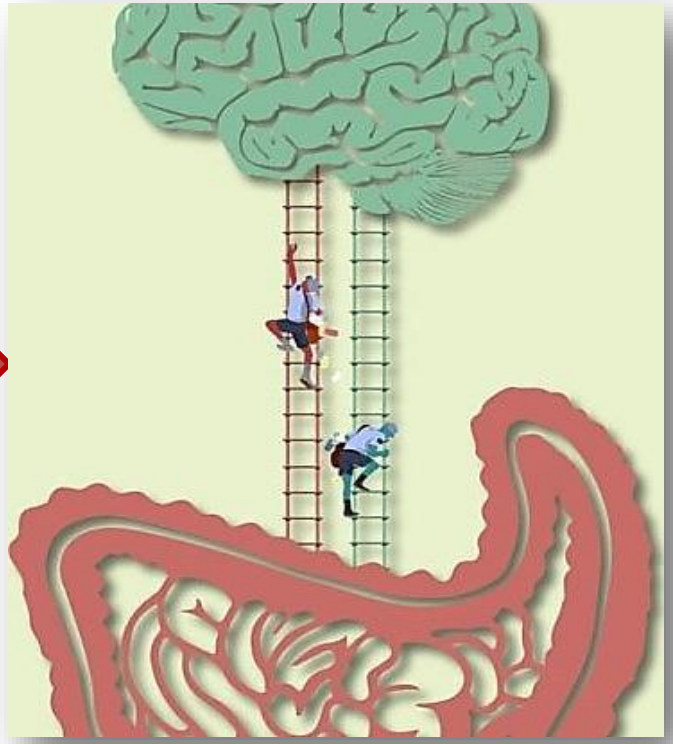
GİRİŞ

Parkinson , yaşla birlikte prevelansı artan ve **en sık görülen ikinci** nörodejeneratif hastalıktır.

İnflamatuvar bağırsak hastalarında Parkinson Hastalığı (PH) prevalansı artmıştır ama hastalığın seyrini nasıl etkilediği bilinmiyor.

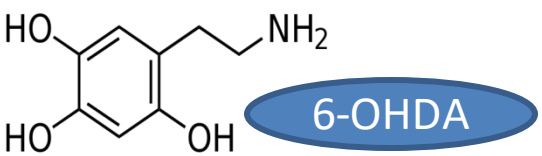
GİRİŞ

- Deneysel PH'da
  - *enterik sinir sisteminde,*
  - *motor fonksiyonlarda*
  - *çekal mikrobiyota değişiklik*
  - bağırsak inflamasyonu üzerindeki etkisi ?

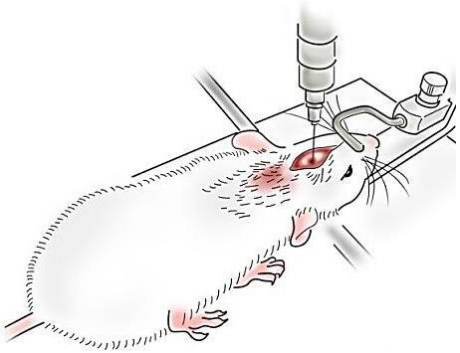


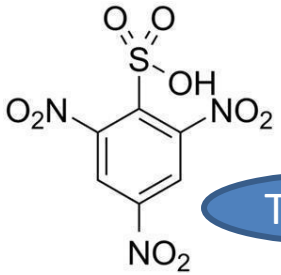
AMAÇ

- Deneysel olarak PH modeli oluşturulmuş sıçanlarda deneysel kolit modeli oluşturulduktan sonra hedef dokular üzerinde inflamasyonun ağırlık derecesini ortaya koymaktır
  - *6-OHDA enjeksiyonu ile strionigral sistem dopaminerjik nöronları hasarlanmış olan sıçanlarda → trinitrobenzensülfonik asit-etanol (TNBS-E) ile kolit oluşturulması → beyin ve bağırsaktaki hasarla birlikte inflamasyonun ağırlık derecesini irdelemek.*



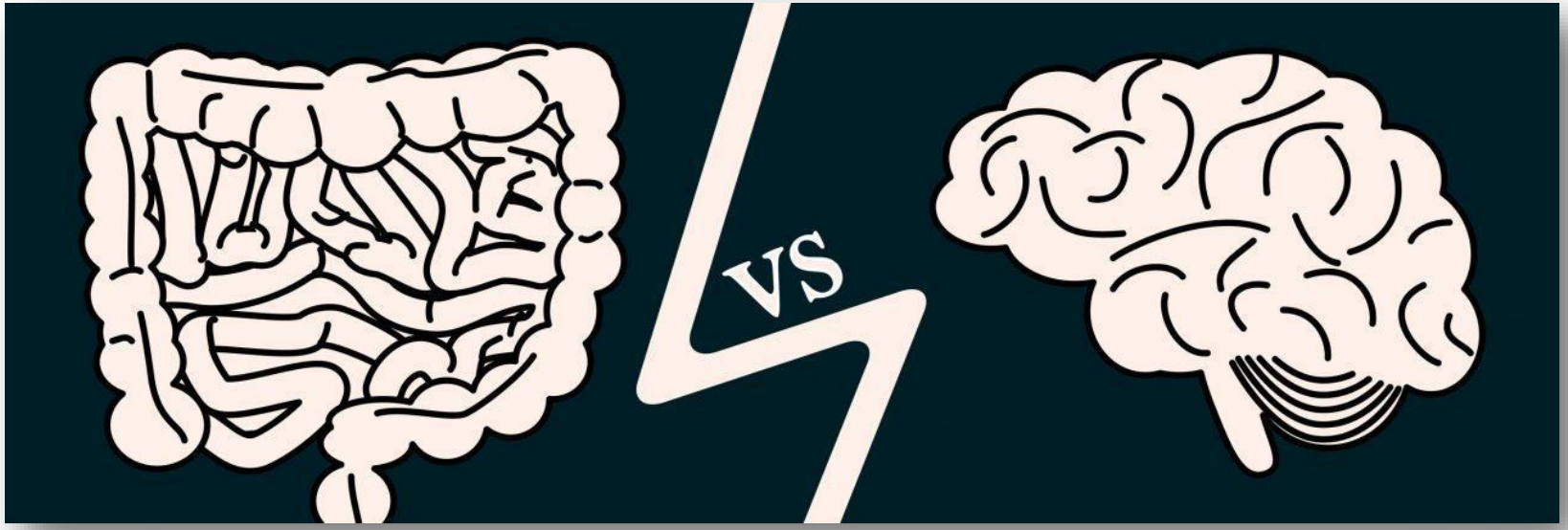
6-OHDA





TNBS-E

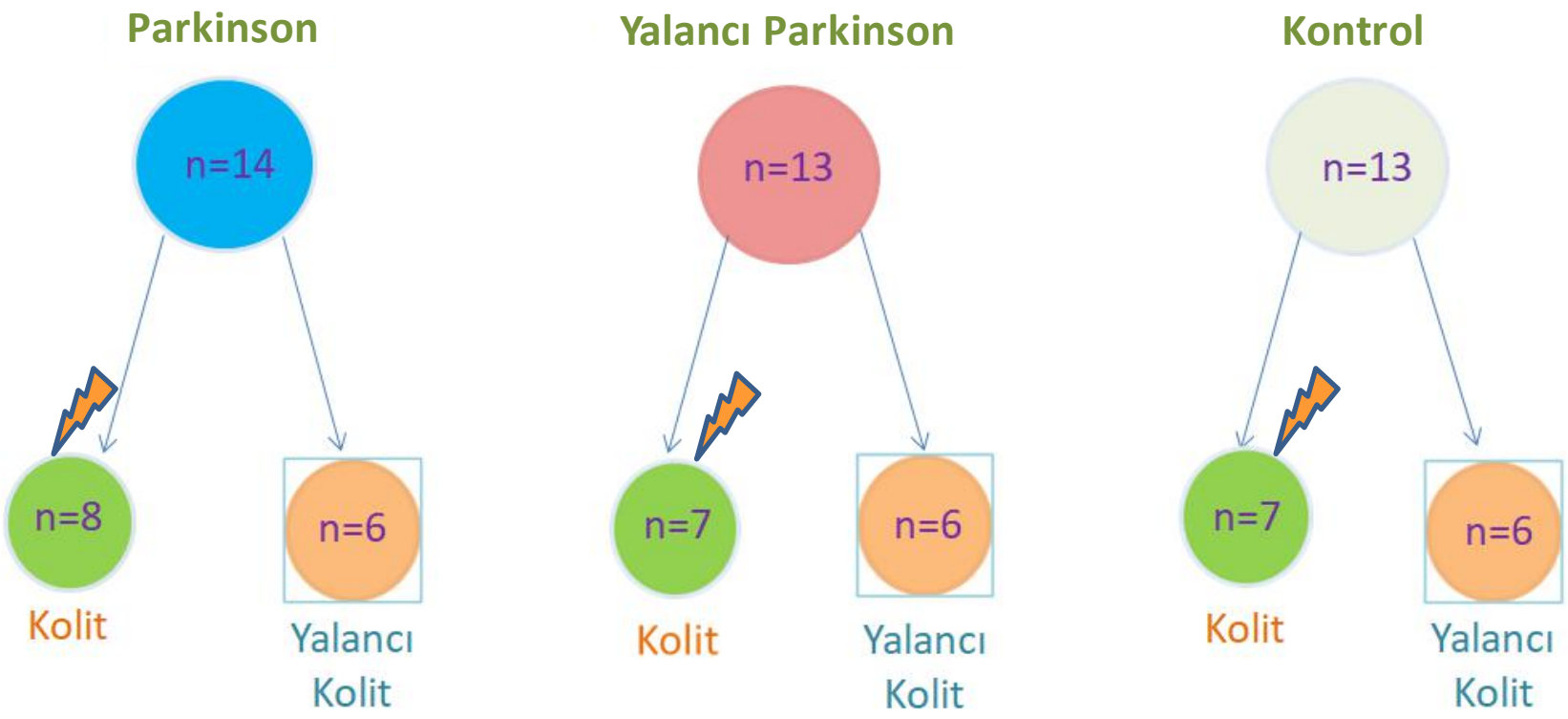
SORUMUZ



PARKİNSON HASTALIĞI KOLİTİN ŞİDDETİNİ DEĞİŞTİRİR Mİ?

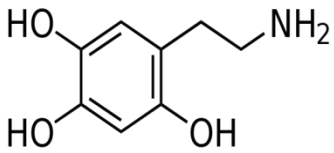
Materyal ve Metot

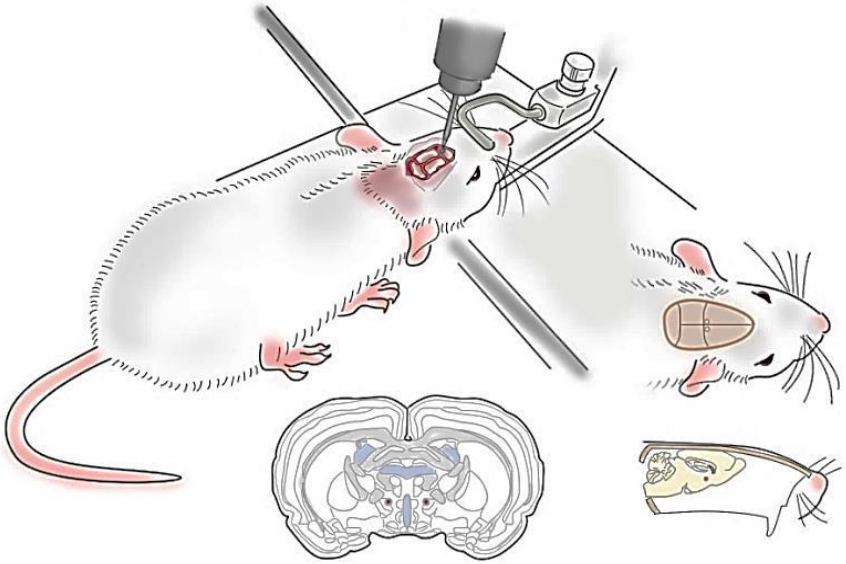
- Etik onam: DEHAMER (104.2018.mar)
- 18 haftalık (300-500 g)
- Erkek Sprague Dawley Sıçanlar



Deneysel Parkinson Hastalığı Modeli

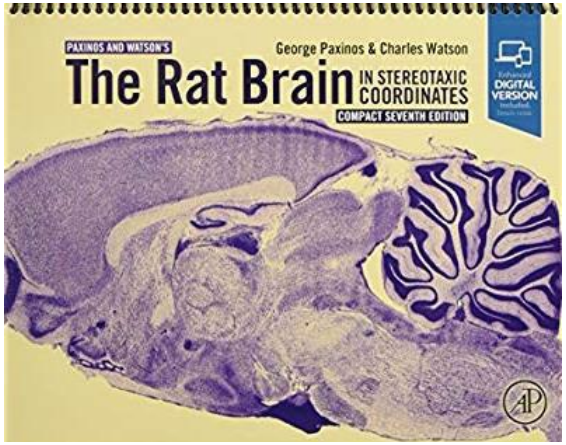
6-Hidroksidopamin (6-OHDA)





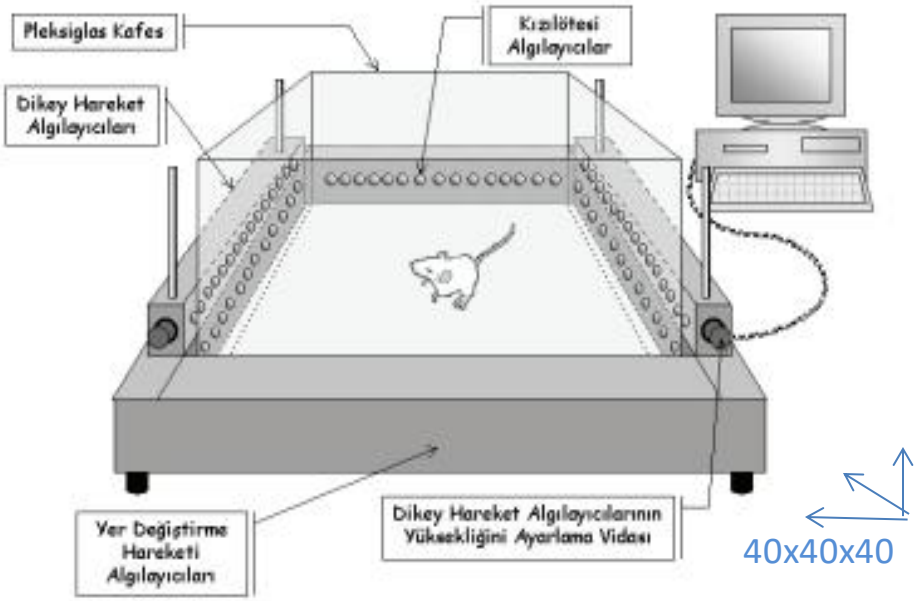
- 2 mg/ml olacak şekilde, 5 mg 6-OHDA % 0,2 askorbik asit içeren 2,5 ml steril serum fizyolojik içinde çözüldü.
- 4 µl enjeksiyon 4 dakikada yapıldı.
- Sıçan beyin atlası Paxinos ve Watson (1998) kullanılarak medial önbeyin demetine enjeksiyon yapıldı.

(Koordinatları: AP: - 2,6 mm, ML: - 1,8 mm, V: 8,5 mm)

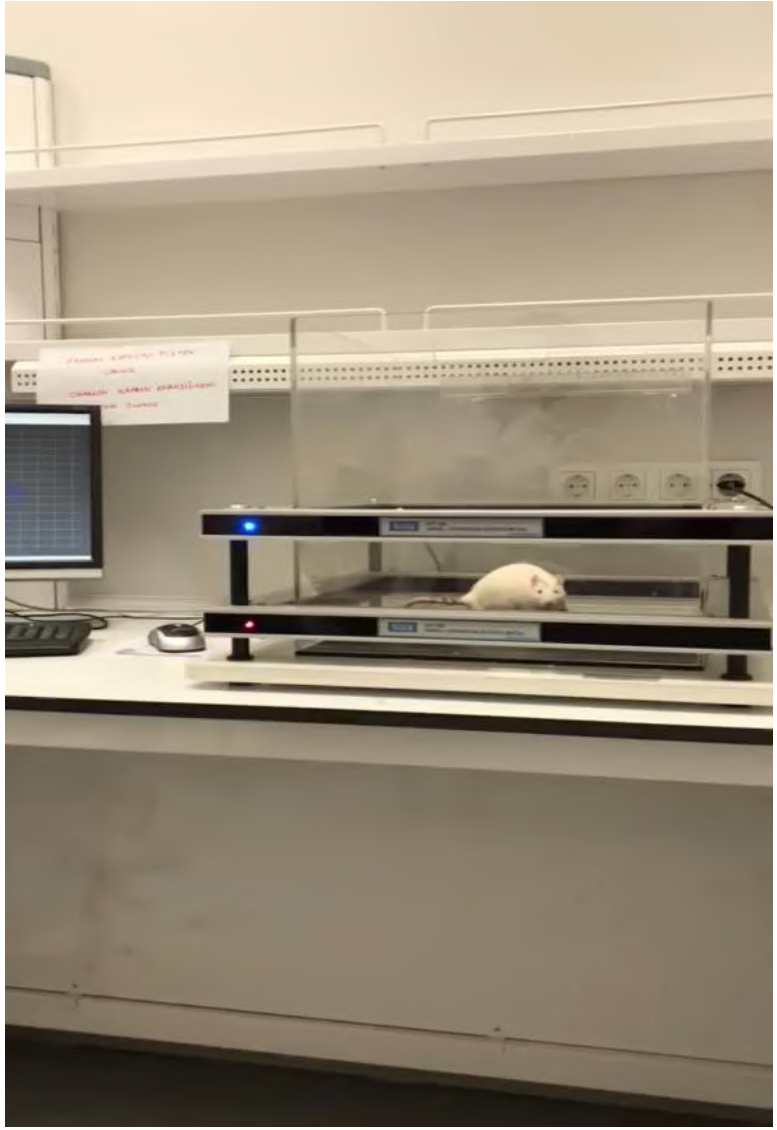


Locomotor Aktivite Testi

Horizontal | **Vertical** | **Ambulatuvar**



FARADAY KAFESİ

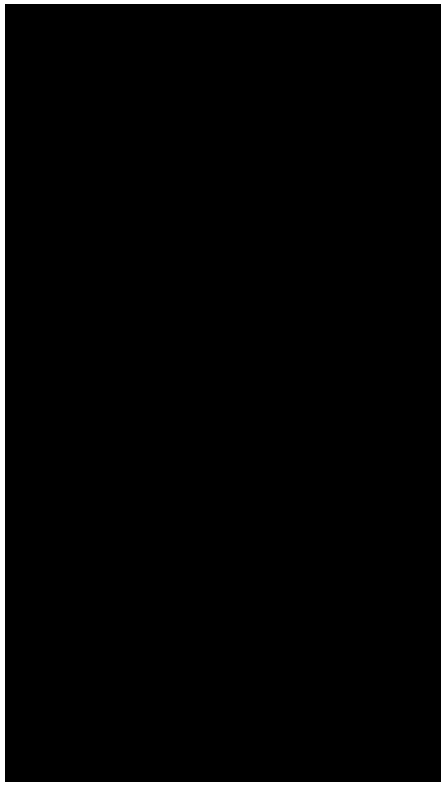


Apomorfin Dönme Testi

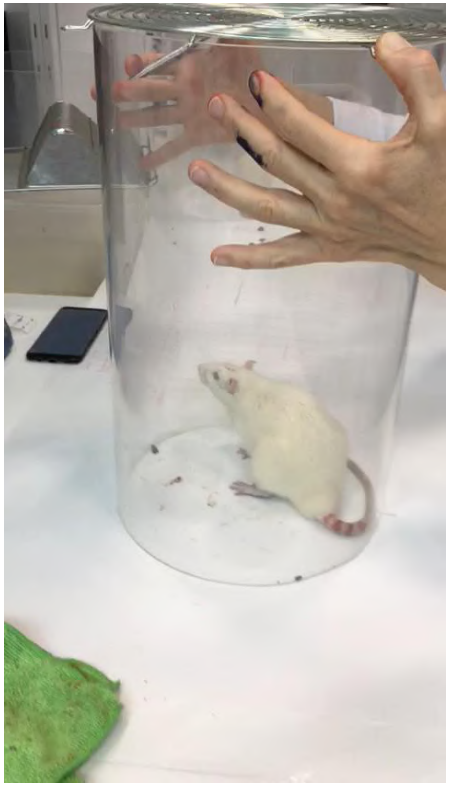
APOMORFİN (Dopamin agonisti)

- ✓ dopamine reseptörlerini stimüle eder
- ✓ striatal aktivitede etkilenmemiş tarafa göre asimetrik bir artışa neden olur
- ✓ Lezyonlu tarafa kontralateral olacak şekilde hızlı, tekrarlayan bir dönüş gerçekleşir.

Parkinson



Yalancı Parkinson



- ➢ 0,05 mg/kg dozunda apomorfin
- ➢ 0,1 ml/100 gr olacak şekilde deri altı enjeksiyon

30 dakika içerisindeki sola veya sağa tam (360 derece) dönüş sayısı sayıldı.

Deneklerin PH'nın oluşturulması teyidi amaçlı Pati Değme Testi de yapılmıştır. !

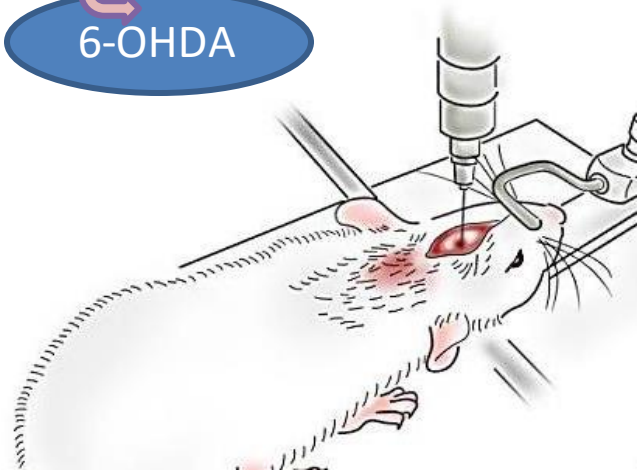
Deney Süreci

- Ağırlık ölçümü
- Yem tüketimi
- Pelet (dışkı) sayısı
- Pelet (dışkı) ağırlığı

- Ağırlık ölçümü
- Ora-çekal transit ölçümü
- DEKAPİTASYON
- Kolon
- Beyin
- Karaciğer
- Dalak
- Mide

1. gün — 7. gün — 14. gün — 21. gün — 28. gün — 36. gün — 39. gün

6-OHDA



- ✓ Lokomotor testi
- ✓ Pati değme testi
- ✓ Apomorfin testi

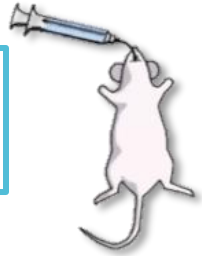
TNBS ile kolit indüklenmesi

- Myeloperoksidaz aktivitesi (MPO)
- Glutatyon (GSH)
- Malondialdehit (MDA)
- Histopatolojik incelemeler
- Makroskobik skorlama

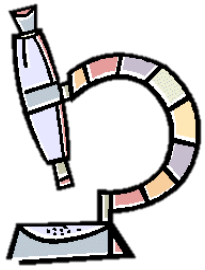
✓ 1 ml %50 v/v etanolde 30 mg TNBS (intrarektal)

Doku Ölçümleri

Ora-çekal transit zamanı



Histolojik incelemeler

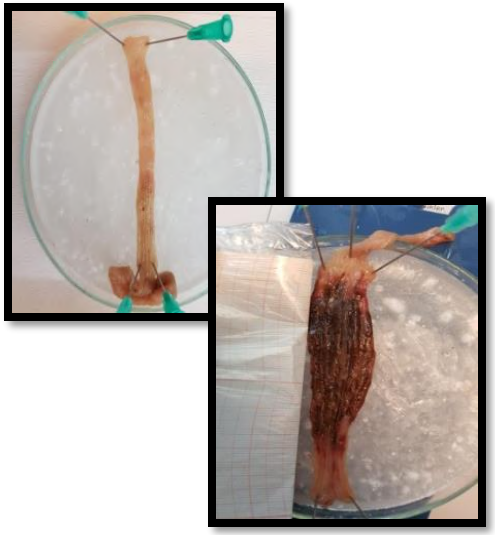


McWafferty Makroskobik Skorlama

Spektrofotometrik

- **GSH** — Antioksidan glutatyon seviyeleri
- **MPO** — Nötrofil birikimini gösteren miyeloperoksidaz aktivitesi
- **LP(MDA)** — Oksidatif strese bağlı doku hasarını gösteren Lipid Peroksidasyonu

0=Normal Görünüm 1=Fokal Hiperemi,ülser yok 2=ülserleşme hiperemi veya bağırsak duvar kalınlaşması olmaksızın 3= 1 alanda ülserleşme ve inflamasyon 4=2 veya daha fazla alanda ülserleşme ve/veya inflamasyon 5=Kolon boyunca 1cm'den daha uzun bir segmentte majör hasar 6-10= Kolon boyunca 2cm'den daha uzun bir alanda majör hasar (artan her cm hasar alanı için skor 1 puan artmaktadır.)



Analiz

İstatistiksel Analiz

- Verilerin Analizinde

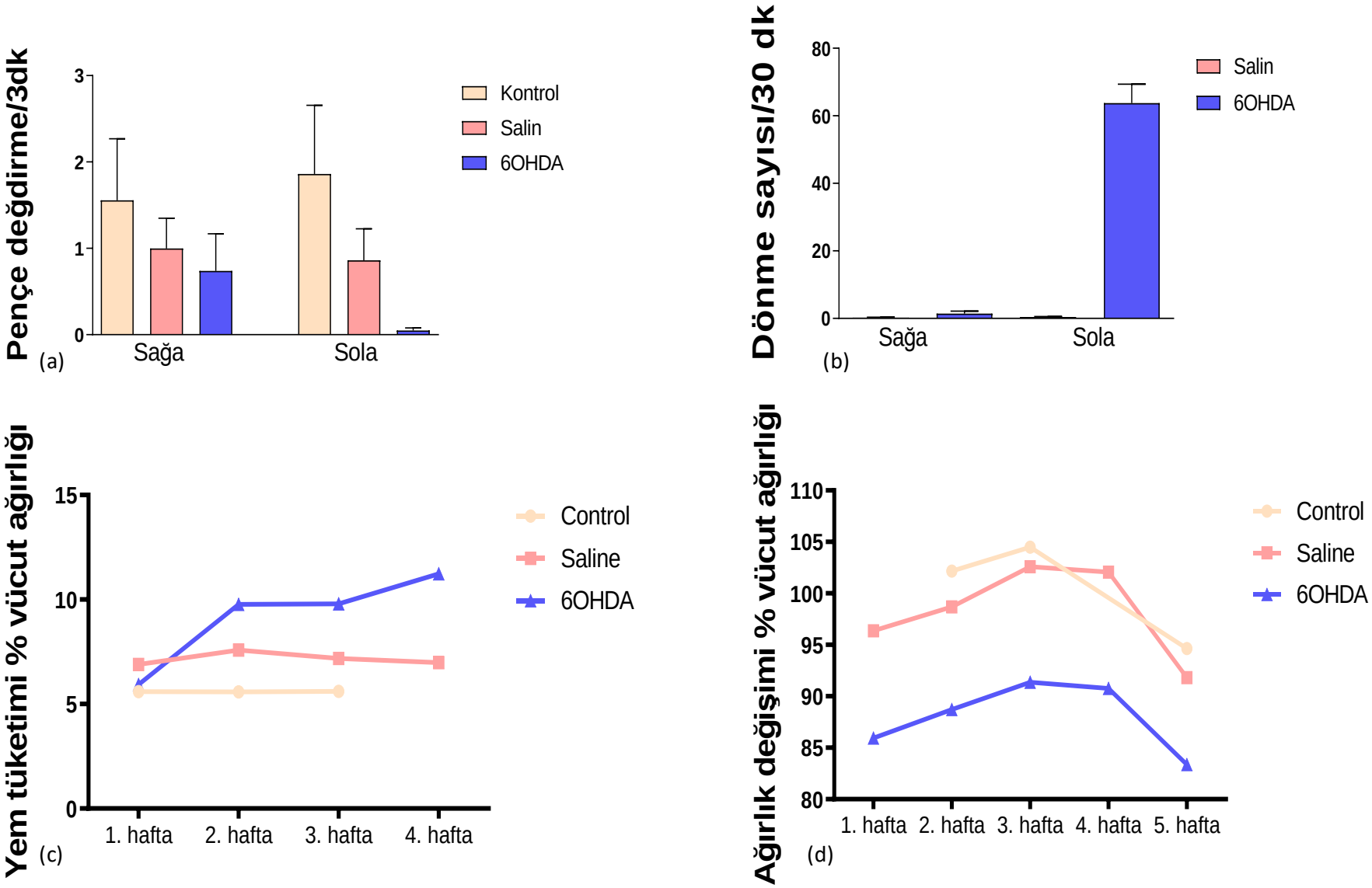
  - Ki Kare
  - Tek Yönlü ANOVA
  - Çift Yönlü ANOVA

- GraphPad Prism 6.0

- $p<0.05$

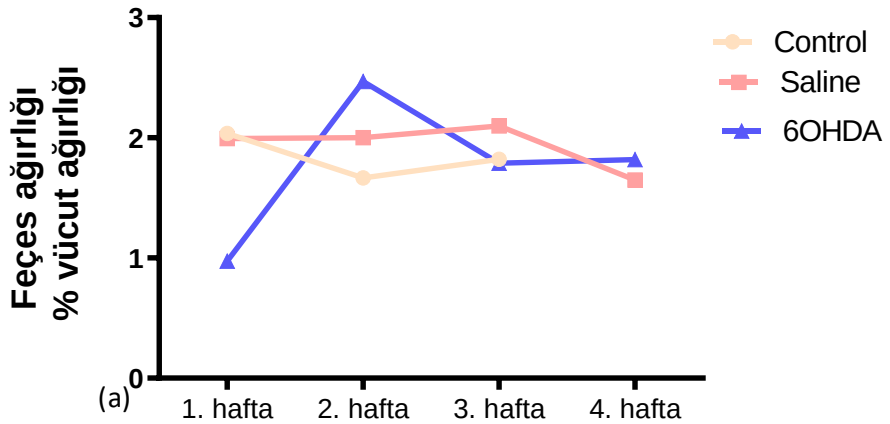
BULGULAR

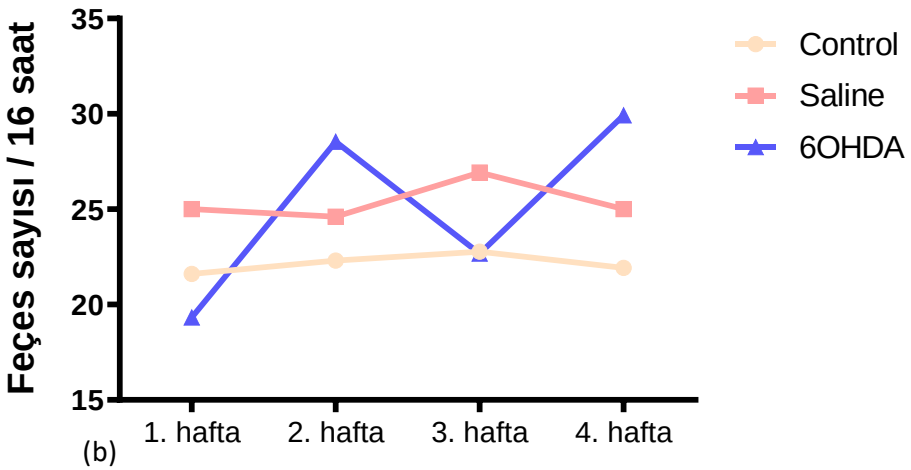
Bulgular

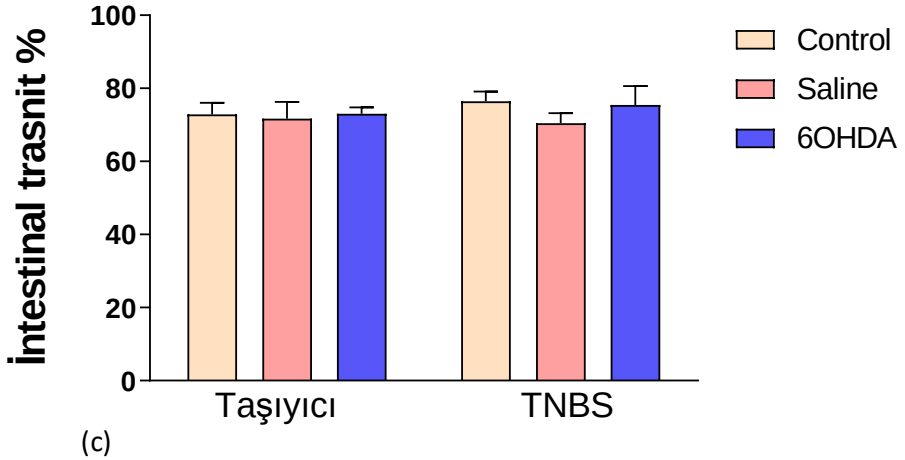


Şekil 1. Çalışma gruplarında pençe değdirme sayısı (a) , apomorfin injeksiyonunu izleyen 30 dakika boyunca dönme sayısı (b) , yem tüketimi g/gün/100g vücut ağırlığı (c), merkezi sinir sistemi injeksiyonunu izleyen haftalarda vücut ağırlığı(g) (d). (*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre)

Bulgular- İntestinal Motor Fonksiyon

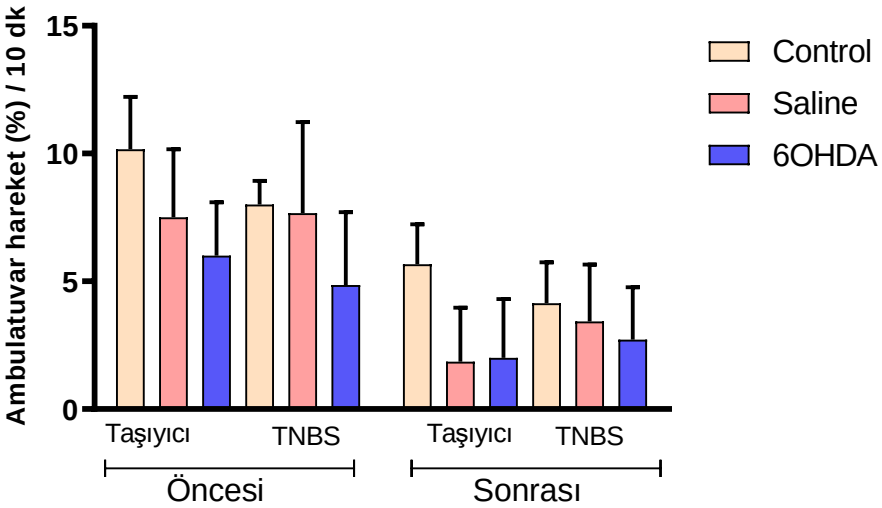


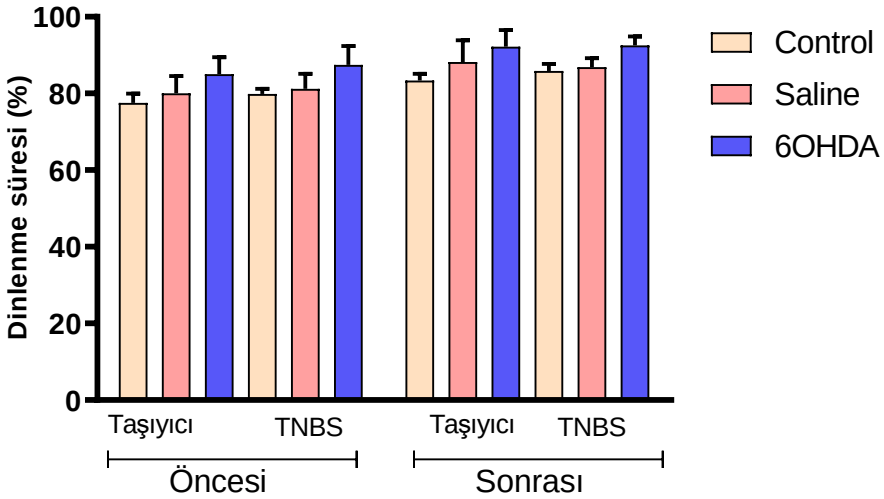




Şekil 6. Vücut ağırlığının yüzdesi olarak ifade edilen feçes ağırlığı (a), Vücut ağırlığının yüzdesi olarak ifade edilen pellet ağırlığı zamanla değişimi (b) İntestinal transit zamanı (c) .(*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre)

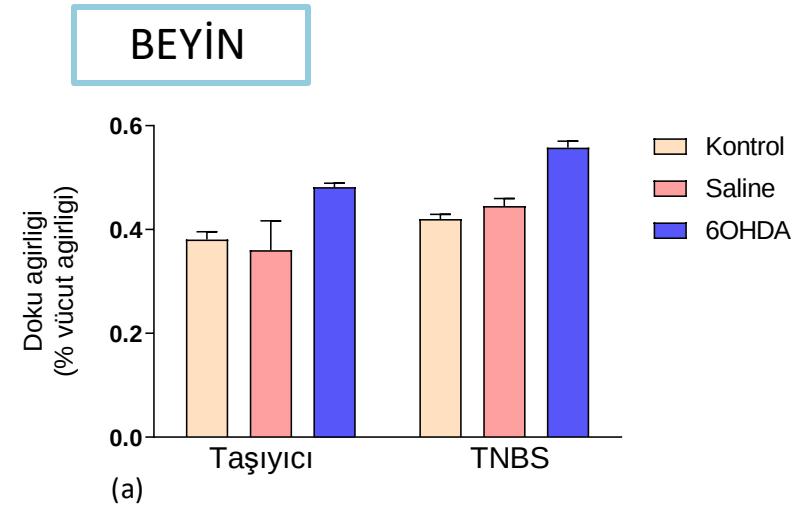
Bulgular-Lokomotor Değerlendirme

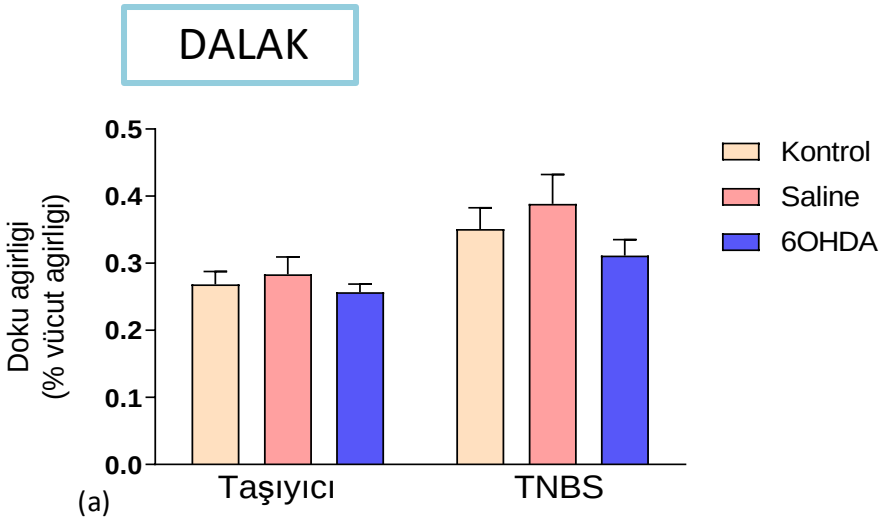


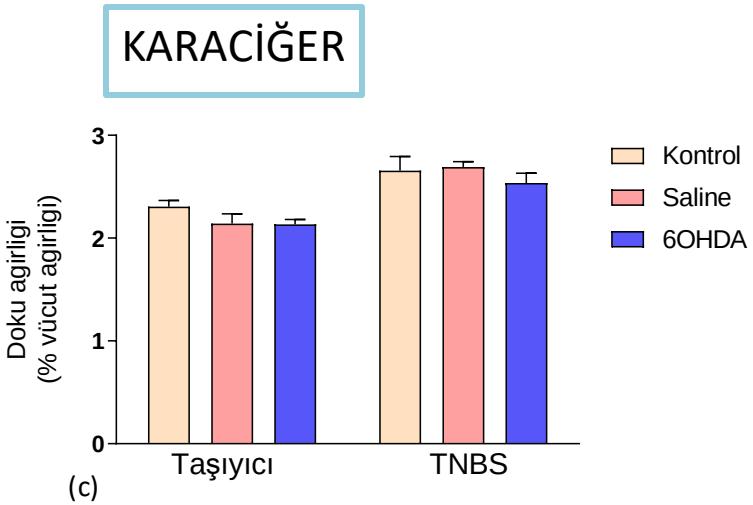


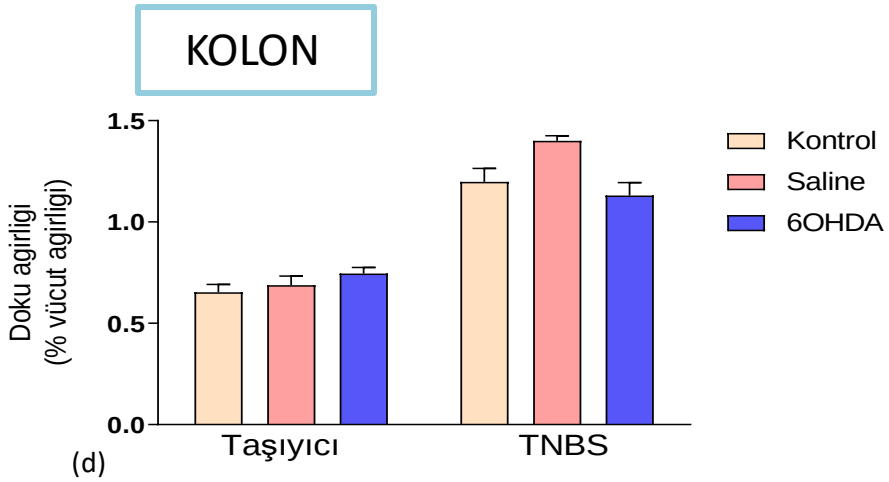
Şekil 7. 10 dakikadaki; ambulatuvar hareket yüzdesi (a), dinlenme süresi (b) .(*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre)

Bulgular- Organ Ağırlığı



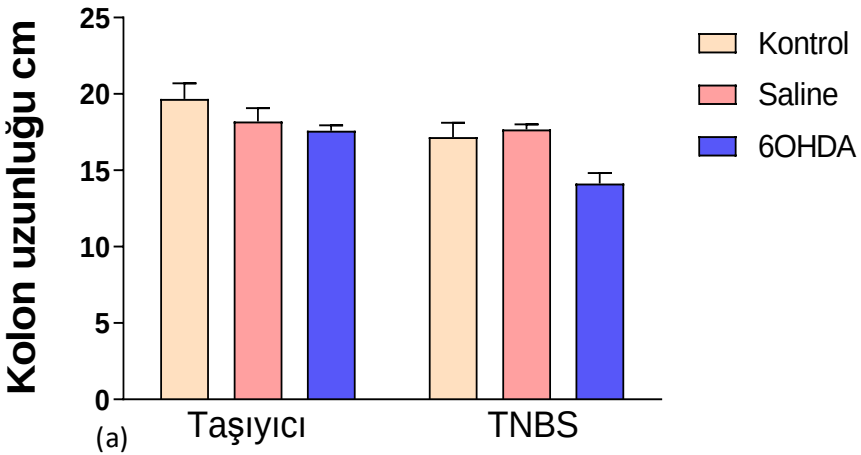


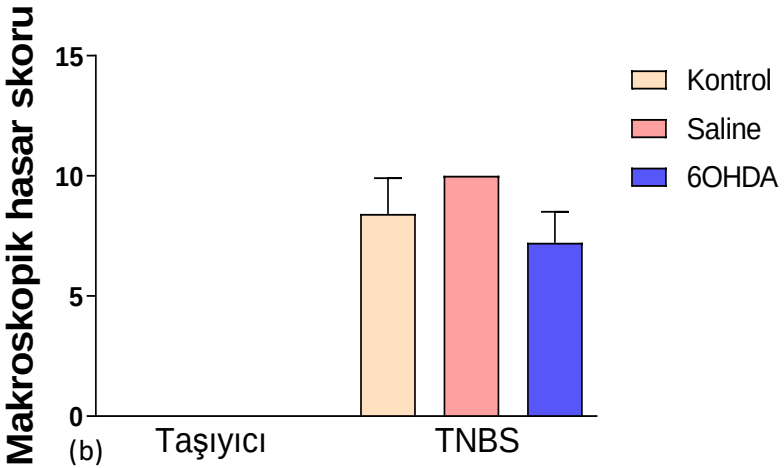


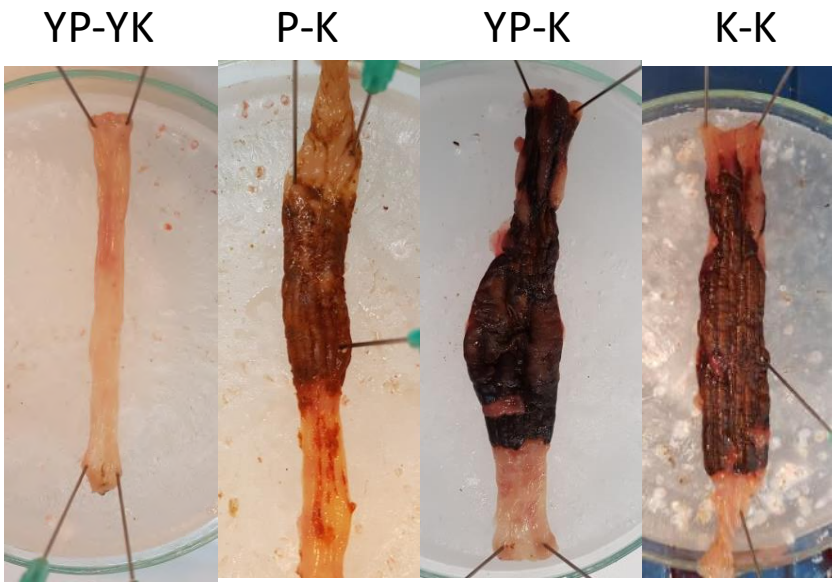


Şekil 2. Vücut ağırlığının yüzdesi cinsinden beyin (a), dalak (b), karaciğer (c) ve kolon (d) ağırlığı.(*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre)

Bulgular

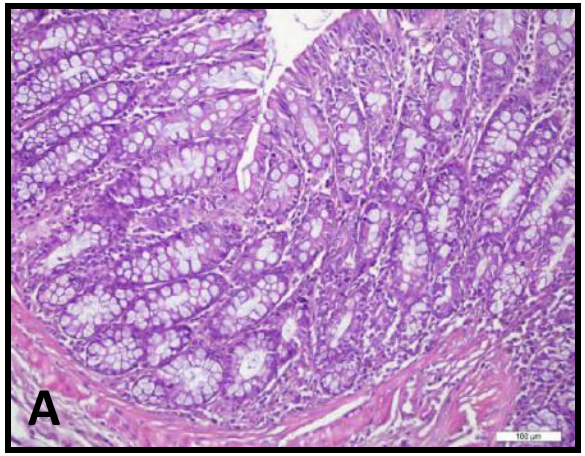


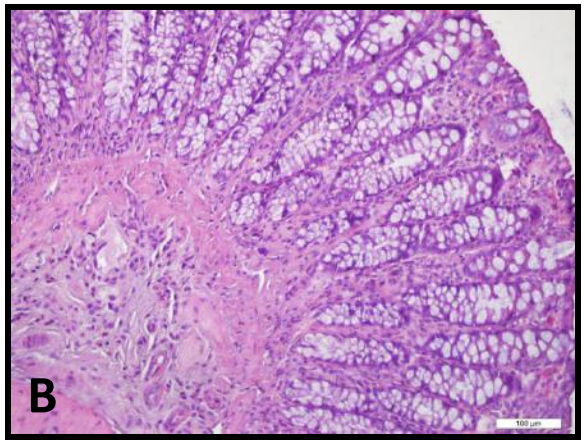


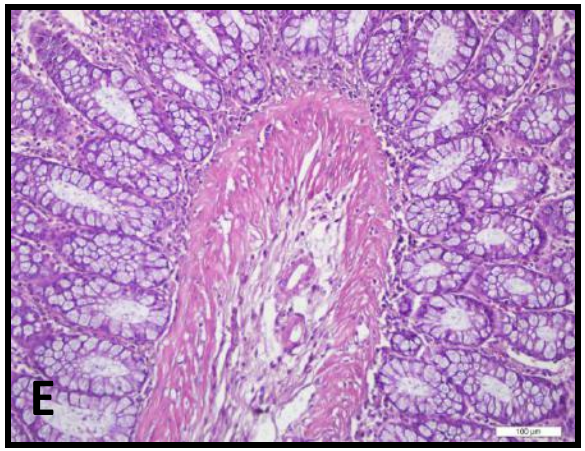


(A)

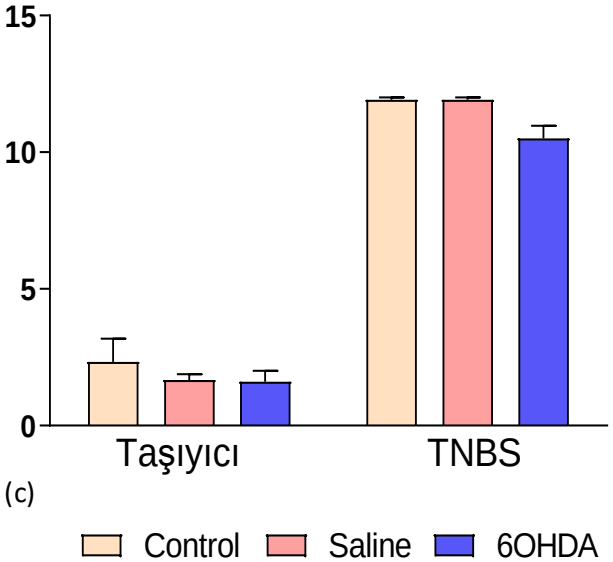
Şekil3. Kolon uzunluğu (a) ve makroskopik hasar skoru (b), mikroskopik hasar skoru (c) .(*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre). Resim1.Kolon Makroskopisi (YP-YK)Yalancı Parkinson- Yalancı Kolit,(P-K) Parkinson-Kolit, (YP-K) Yalancı Parkinson-Kolit , (K-K)Kontrol-Kolit.

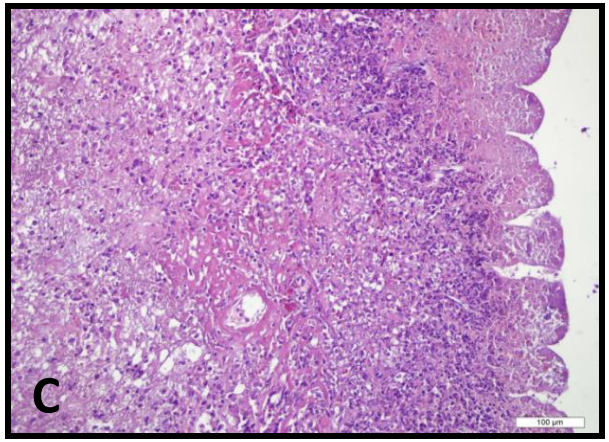


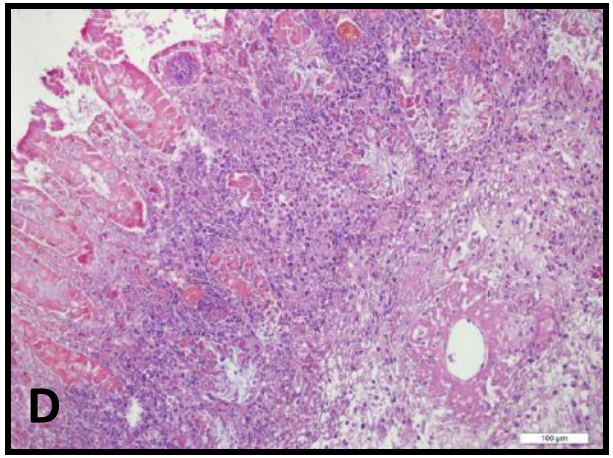


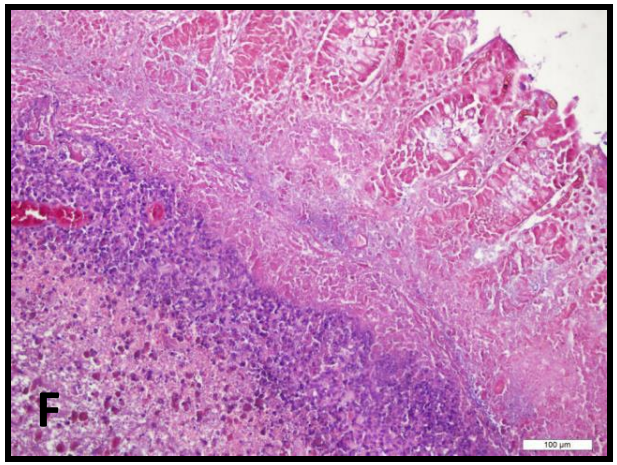


Mikroskopik Hasar Skoru









A, Yalancı Parkinson Yalancı Kolit
B , Parkinson Yalancı Kolit
C , Yalancı Parkinson Kolit
D , Parkinson Kolit
E , Kontrol Yalancı Kolit
F , Kontrol Kolit

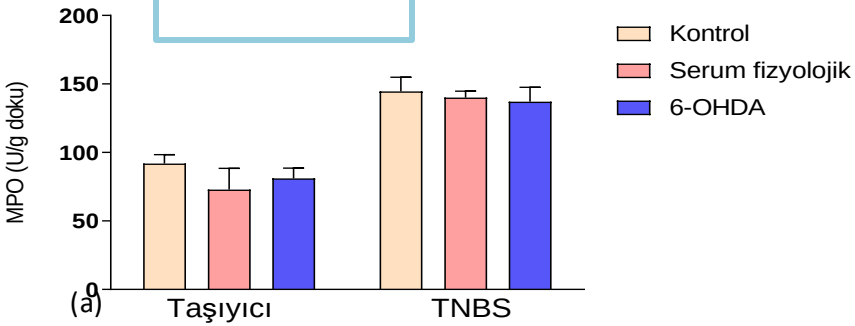
Şekil 4. Mikroskopik Hasar Skoru (c) .(*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre

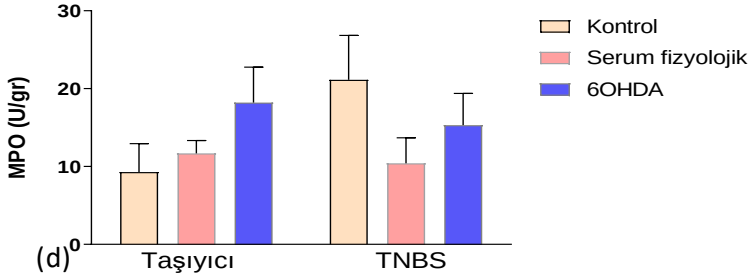
Bulgular-MPO/GSH/MDA

KOLON

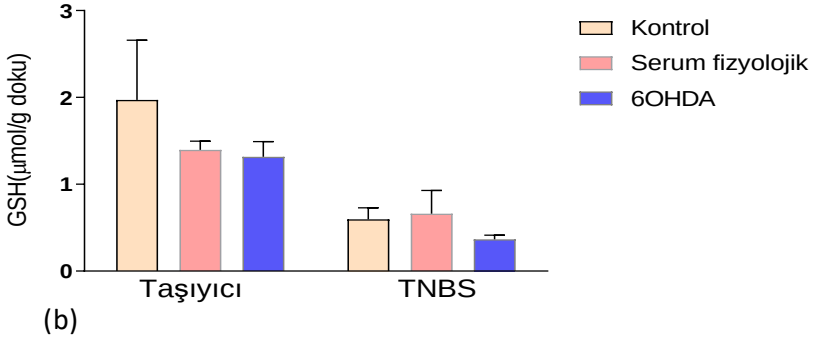
BEYİN

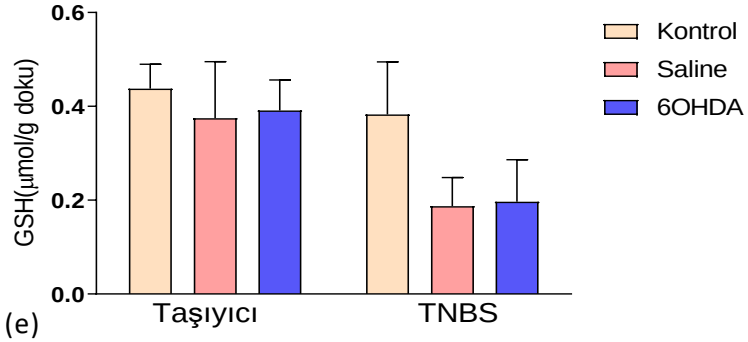
MPO



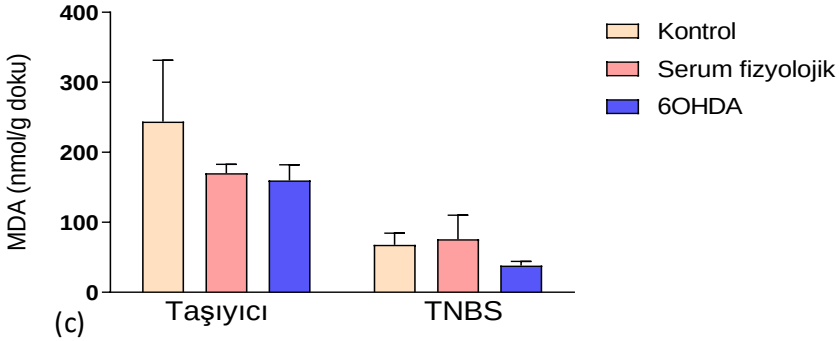


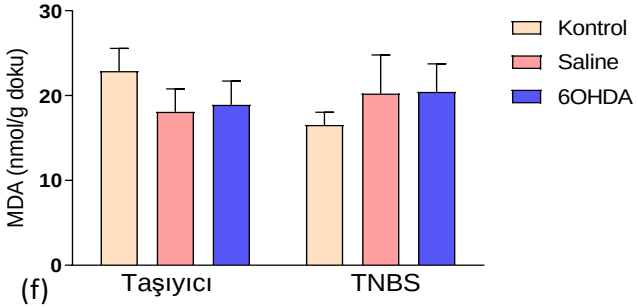
GSH





MDA





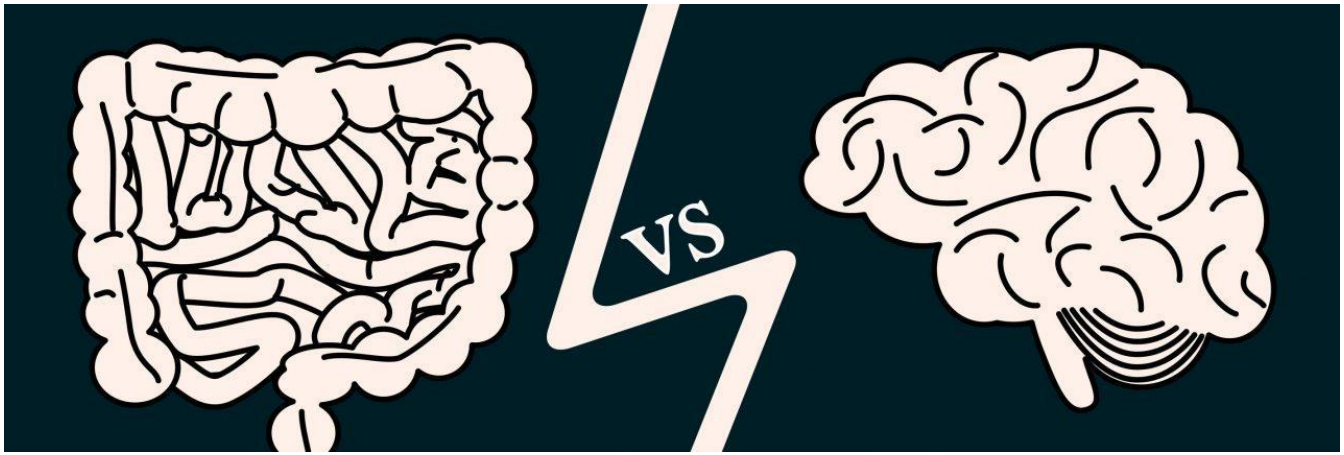
Şekil 4. Kolon dokusunda Miyeloperoksidaz aktivitesi (a), Glutatyon (b), Malondialdehit (c); Beyin dokusundaki Miyeloperoksidaz aktivitesi (d), Glutatyon (e), Malondialdehit (f). (*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001, TNBS tedavisine göre; +p<0,05, ++p<0,01, 6-OHDA grubuna göre)

SONUÇ

- **Parkinsonlu sıçanlar daha fazla yem tüketmesine rağmen kaybettiği kiloyu geri alamadı**.
- İntestinal transit ve kolon motolitesi değişmedi
- Locomotor aktivitede, 6-OHDA tedavisiyle istiharette geçirilen süre arttı
- Hareketli geçirilen zaman azaldı. Parkinsona kolitin eklenmesi anlamlı bir değişiklik yapmadı.
- **Mikroskopik ve makroskopik kolit skoru bakımından parkinson grubunda, yalancı parkinson grubuna göre kolit ağırlığının derecesi daha hafifti.**
- **Hem 6-OHDA hem TNBS tedavisi beyin ağırlığını artırdı. TNBS-E tedavisiyle beyinde GSH azaldı ,MPO değişmedi.**
- **6-OHDA ve TNBS-E tedavisi kolon ağırlığını artırdı. TNBS-E tedavisiyle kolonda MPO arttı GSH azaldı**
- TNBS tedavisiyle dalak ve karaciğer ağırlığı arttı

SORUNUN CEVABI

PARKİNSON HASTALIĞI KOLİTİN ŞİDDETİNİ DEĞİŞTİRİR Mİ?



- Parkinson hastalığı kolitin şiddetini azalttı.
- Kolit antioksidan kapasiteyi azalttı, beyin ağırlığı ve lipid peroksidasyon ürünlerini arttırdı.

TARTIŞMA

- 2018 Ocak ayında yayınlanan '<u>Bidirectional Neural Interaction Between Central Dopaminergic and Gut Lesions in Parkinson's Disease Models</u>' isimli benzer bir çalışma bulunmaktadır.

Sıçanlara	→	Bilateral 6-OHDA enjeksiyonu +-vagatomi
Farelere	→	DSS Kolit +-vagatomi

<u>SONUÇ</u>

- Kolonda **asetil kolin** ve **toplam kolin** seviyesi **azaldı.**
- Kolondaki **dopamine** miktarı **arttı.**
- **Seratonin** ve **nöradrenalin değişmedi.**

TARTIŞMA

- 2019 Ocak ayında yayınlanan '<u>Local Gastrointestinal Injury Exacerbates Inflammation and Dopaminergic Cell Death in Parkinsonian Mice</u>' isimli benzer bir çalışma bulunmaktadır.

LİTARETÜR	FARKIMIZ	BİZİM ÇALIŞMAMIZ
Fare modelinde; **MPTP** intoksikasyonuyla parkinson, **DSS** ile de kolit yapılmıştır ve 2 ajanda **eş zamanlı** olarak uygulanmıştır.		**Sıçan** modelinde; **6-OHDA** enjeksiyonu yaparak parkinson yapmaya çalıştık.Apomorfin testiyle parkinson olduğu **doğrulanmış** sıçanları **TNBS-E** ile indükledik.
MPTP tüm dopaminerjik sistemi harap ediyor.		Stereotaksi yöntemiyle 6-OHDA enjeksiyonu yapıp spesifik harabiyet yaptık.
DSS ⇨ TH_2'ye yatkın 'Ülseratif Kolit'		TNBS-E ⇨ TH_1,Hapten aracılı 'Crohn'a benzeyen kolit'
Parkinson olan ve olmayan gruplarda kolitin şiddetinde farklılık yoktu.		Parkinsonlu sıçanlarda, yalancı parkinsonlu sıçanlara göre kolit şiddeti daha hafifti.

<u>ORTAK BULGULAR</u>

Parkinsonlu sıçan ve farelerde kilo kaybı görülmüştür.
Dalak ağırlığında artış ortak bulgulardır.

Yapılması Planlananlar

- Tirozin hidroksilaz (Dopaminerjik nöron kaybını tespit için)
- Neun markerı (Mature nöron sayısını tespit etmek için)
- GFAP (Glial hücre hasarını tespit etmek için)
- NF-kappa B (İnflamasyon markerı)
- IBA-1 (Mikroglial Aktivasyon markerı)

TARTIŞMA

Sınırlılıklar

- İmmünhistokimyasal çalışmalar bütçe yetersizliğinden dolayı yapılamadı.
- Beyin dokusu histolojisi yetiştirilemedi.

Öneriler

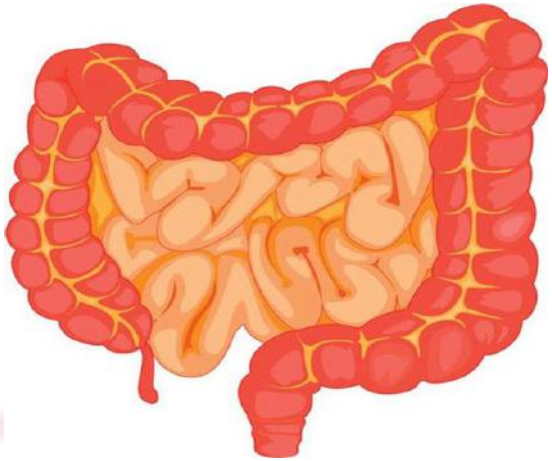
- Hem Parkinson hastalığı olan hem de inflamatuar bağırsak hastalığı olanların uzun zamanlı takibi bu hasta grubunda; farklı bir tedavi ihtiyacının olup olmadığını gösterecektir.

YENİ SORULAR,YİNE ÇALIŞMALAR ☺

? Dopaminerjik sistemin hasarı kolondaki inflamatuar yanıtı nasıl azaltıyor, aracıları ve yolakları nedir?

? İnflamatuar bağırsak hastalarında karşılaşılan parkinson hastalığının seyri kolit olmayan kimselerdekinden farklı mı, tedavisinde bir değişiklik gerekir mi?

? Parkinson hastalarında haptenle indüklenen inflamasyon nasıl seyrediyor?



KAYNAKÇA

[1] [Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.Neurobiol Aging 2003; 24: 197-211 [PMID: 12498954],Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Klos KJ, Ahlskog JE. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. Parkinsonism Relat Disord 2009; 15 Suppl 3: S1-S5 [PMID:20082965 DOI: 10.1016/S1353-8020(09)70769-2]

[2] [Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, Pellene A, Calandra CR, Gutiérrez C, Micheli FE, Benarroch EE. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol* 2013; 260: 1332-1338 [PMID: 23263478 DOI: 10.1007/s00415-012-6801-2]]

[3] Dauer, W. and S. Przedborski, Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron, 2003. 39(6): p. 889-909.

[4] Saner, A. and H. Thoenen, Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. Mol Pharmacol, 1971. 7(2): p. 147-54

[5] Javoy, F., et al., Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. Brain Res, 1976. 102(2): p. 201-15.

[6] Zhang, W., T. Wang, Z. Pei, D.S. Miller and X. Wu *et al.*, 2005. Aggregated alphasynuclein activates microglia: A process leading to disease progression in Parkinson`s disease. FASEB J., 19: 533-542. Esposito, E., D.V. Matteo and D.G. Giovanni, 2007. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. Exp. Neurol., 205: 295-312.

[7] Jiang, Q., Z. Yan and J. Feng, 2006. Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. J. Biol. Chem., 281: 9391-9400.

[8] Baba, Y., A. Kuroiwa, R.J. Uitti, Z.K. Wszolek and T. Yamada, 2005. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. Parkinsonism Relat. Disorders, 11: 493-498.

[9] Minghetti, L., M.A. Ajmone-Cat, M.A. de Berardinis and R. de Simone, 2005. Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: Roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. Brain Res. Brain Res. Rev, 48: 251-256.

[10] Cho, B.P., D.Y. Song, S. Sugama, D.H. Shin and Y. Shimizu *et al.*, 2006. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. Glia, 53: 92-102.

[11] Esposito, E., D.V. Matteo and D.G. Giovanni, 2007. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. Exp. Neurol., 205: 295-312.

[12] McGeer, P.L. and E.G. McGeer, 2004. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson`s disease. Parkinsonism Relat. Disorders, 10: S3-S7.

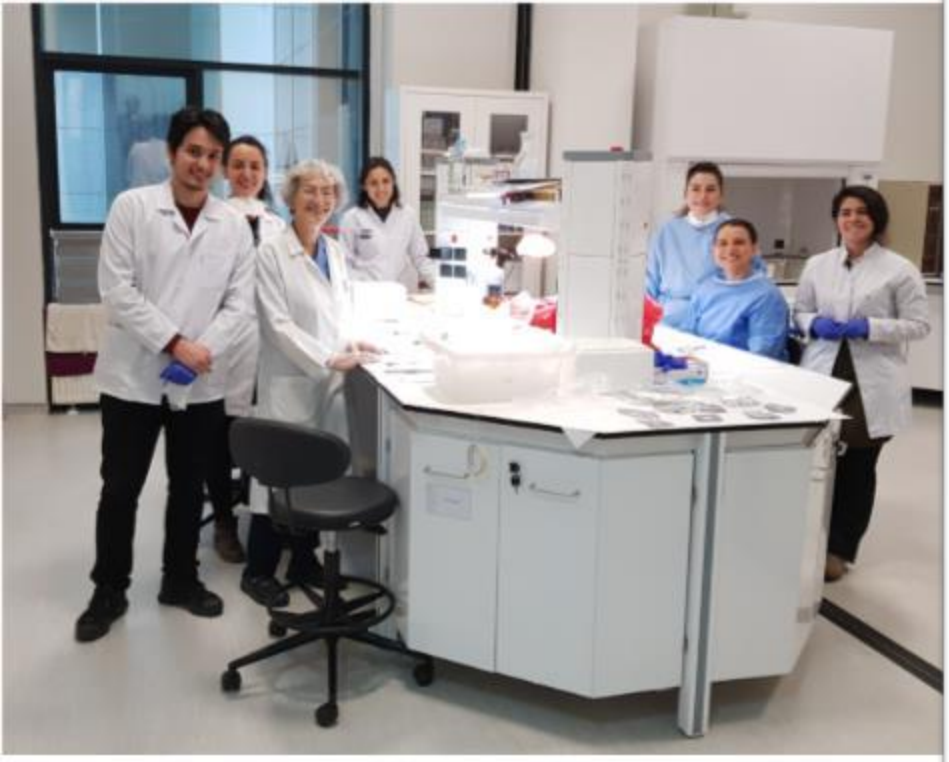
[13] Dehmer, T., M.T. Heneka, M. Sastre, J. Dichgans and J.B. Schulz, 2004. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson`s disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. J. Neurochem., 88: 494-501.

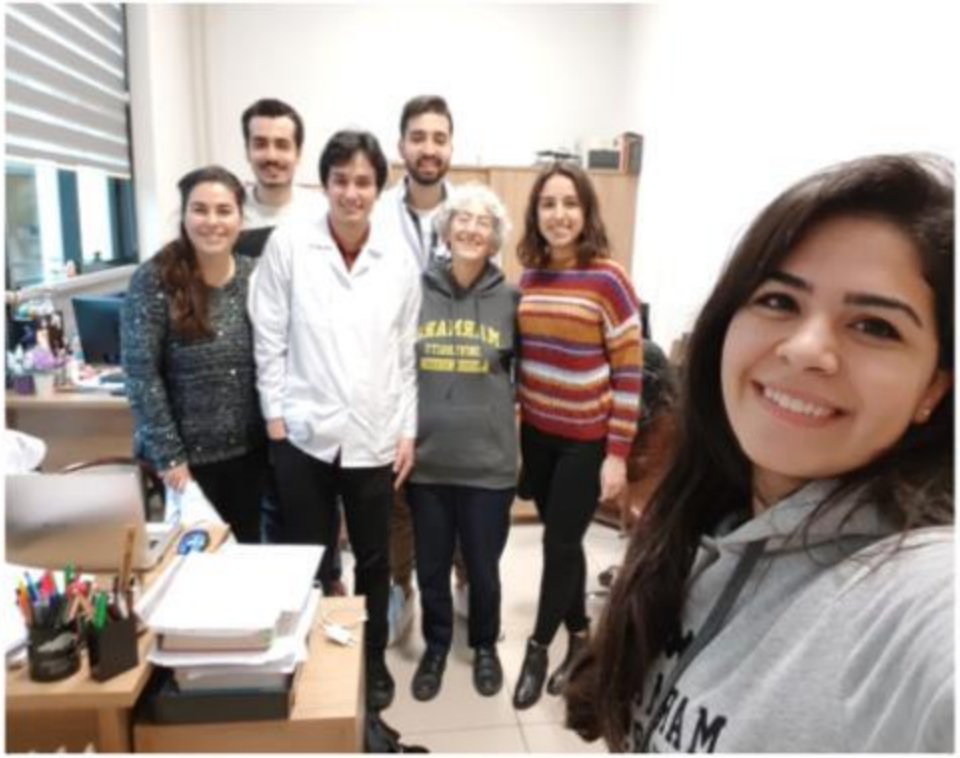
[14] McGeer, P.L., K. Yasojima and E.G. McGeer, 2001. Inflammation in Parkinson`s disease. Adv. Neurol., 86: 83-89.

[15] Jiang, J., G.G. Borisenko, A. Osipov, I. Martin and R. Chen *et al.*, 2004. Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells. J. Neurochem., 90: 1036-1049.

[16] Dugan, L.L. and DW. Choi, 1999. Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Oxidative Stress. Raven Press, New York, pp: 711-730.

[17] Teismann, P., J.B. Schulz and D.C. Wu, 2004. Cellular pathology of Parkinson`s disease: Astrocytes, microglia and inflammation. Cell Tissue Res., 318: 149-161. Esposito, E., D.V. Matteo and D.G. Giovanni, 2007. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. Exp. Neurol., 205: 295-312.





TEŞEKKÜR EDERİZ

☺