



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEBRA BALIKLARINDA ROTENON İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE BİYOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER MEKANİZMALAR İLE ÇEŞİTLİ
NÖROPROTEKTİF AJANLARIN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

İLKNUR YURTSEVER

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. EBRU IŞIK ALTURFAN

İSTANBUL- 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program türü : Doktora

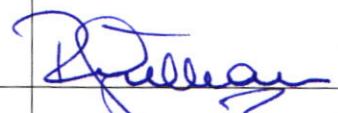
Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)

Tez Sahibi : İlknur Yurtsever

Sınav Tarihi ve Saati : 17.12.2019

Tez Başlığı : Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Deneysel Parkinson Modelinde Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizmalar ile Çeşitli Nöroprotektif Ajanların Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza
Danışman	Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Prof. Dr. Ayşen Yarat (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Prof. Dr. Rezzan Gülhan (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı (İstanbul Medipol Üniversitesi)	
Üye	Prof. Dr. İlhan Onaran (İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa)	

ONAY

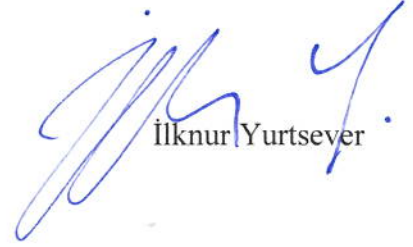
Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun08.01.2020.....tarih ve36.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



İlknur Yurtsever

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince Biyokimya Anabilim Dalı'na girdiğim günden beri engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim, her yönüyle kendime örnek aldığım değerli danışman hocam **Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan'a**,

Doktora eğitimim öncesinde ve devamında bir hocadan çok anne şefkati ve sevgisi ile beni kucaklayan, desteklerini her daim hissettiğim kıymetli hocam **Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye**,

Doktora eğitimim boyunca eğitimi en iyi şekilde almamız için gerekli ortam ve şartları sağlayan Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Azize Şener** ile değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Ayşen Yarat** ve Sayın **Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı** ve Sayın **Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay'a**,

Çalışma ortamını paylaştığımız ve yardımlarını esirgemeyen ve güzzel anılar paylaştığım **tüm çalışma arkadaşlarıma**,

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen **AİLEME**,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xi
RESİM LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Parkinson Hastalığı	5
4.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri.....	6
4.2.1. Motor belirtiler.....	6
4.2.1.1. Titreme	6
4.2.1.2. Bradikinezi.....	6
4.2.1.3. Postural instabilite.....	7
4.2.1.4. Distoni.....	8
4.2.2. Motor dışı belirtiler	8
4.2.2.1. Otonom fonksiyondaki bozukluklar.....	9
4.2.2.2. Uyku bozuklukları.....	10
4.2.2.3. Nöropsikiyatrik belirtiler ve demans.....	11
4.2.2.4. Duyusal belirtiler.....	13
4.3. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi	13
4.3.1. α -Sinükleinler.....	13
4.3.2. PTEN kaynaklı indüklenen kinaz 1 (PINK 1).....	14
4.3.3. Lösence zengin tekrarlayan kinaz 2 (LRRK2)	15
4.4. Parkinson Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stresi ve Mitokondri Fonksiyon Bozukluğu	16
4.4.1. Endoplazmik retikulum stresiyle başatme mekanizmaları.....	17
4.4.2. Mitokondriyel fonksiyon bozukluğu.....	18
4.4.3. Kalsiyumun rolü.....	19
4.4.4. Sigma 1 reseptörü (Sig-1R).....	20

4.4.4.1.	Sigma 1 reseptörünün yapısı	21
4.4.4.2.	Sigma 1 reseptörünün nöron korunum etkisi	21
4.4.4.2.1.	ER ve mitokondriyal fonksiyonun modülasyonu.....	21
4.4.4.2.2.	ROS üretiminin zayıflatılması	22
4.4.4.2.3.	Ca ²⁺ -homeostazı ve glutamat aktivitesi	23
4.4.4.2.4.	Glial aktivitenin modülasyonu	23
4.4.5.	Voltaj bağımlı anyon kanal proteini (VDAC).....	23
4.5.	Parkinson Hastalığında Enflamasyonun Rolü.....	24
4.5.1.	NF-κB ve NF-κB aktive eden protein (NKAP).....	24
4.5.2.	Tümör nekroz faktörü	25
4.5.3.	Toll benzeri reseptör 4a.....	26
4.5.4.	Interlökin 21	27
4.6.	Fluvoksamin.....	27
4.7.	Rifampisin.....	29
4.8.	Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modeli	30
5.	GEREÇ ve YÖNTEM	32
5.1	Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü	32
5.2.	Kullanılan Cihazlar	33
5.3.	Kullanılan Kimyasallar	33
5.4.	Maruziyet Uygulanması.....	34
5.5.	Lokomotor Aktivite Testi (Bretaud ve ark., 2004)	35
5.6.	Gen İfadesi Analizi (RT-PCR).....	36
5.6.1.	cDNA sentezi	37
5.6.2.	RT-PCR analizi	38
5.6.3.	Delta delta C _t (Eşik döngü sayısı) metodu ile veri analizi	38
5.7.	Western Blot Analizi.....	39
5.8.	Mitokondri İçi Kalsiyum Ölçümü.....	40
5.9.	İstatistiksel Analizi.....	40
6.	BULGULAR.....	42
6.1.	Grupların Locomotor Aktivite Sonuçları.....	42
6.2.	RT-PCR Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	43
6.2.1.	Parkinson ilişkili genlerin RT-PCR Analizi.....	43
6.2.1.1.	<i>gamma syn</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları.....	43
6.2.2.	Oksidatif stres ilişkili genlerin RT-PCR Analizi	44
6.2.2.1.	<i>pink1</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	44
6.2.2.2.	<i>lrrk2</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	45

6.2.2.3.	<i>vdac</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	46
6.2.3.	İnflamasyon ilişkili genlerin RT-PCR Analizi.....	47
6.2.3.1.	<i>nkap</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	47
6.2.3.2.	<i>tnfa</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları.....	48
6.2.3.3.	<i>tlr4a</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	49
6.2.3.4.	<i>Il21</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	50
6.2.4.	Kalsiyum ilişkili genlerin Rt-PCR Analizi	51
6.2.4.1.	<i>sigma1</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları	51
6.3.	Grupların Western Blot Analizi Sonuçları.....	52
6.3.1.	PARK7/DJ1 western analiz sonucu	52
6.3.2.	Sigma 1 western analiz sonucu	53
6.3.3.	NKAP western analiz sonucu	54
6.3.4.	Gamma sinüklein western analiz sonucu	55
6.4.	Grupların Mitokondriyel Kalsiyum Ölçümü Sonuçları	56
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	57
8.	KAYNAKLAR	67
9.	EKLER	98
	EK-1. Yayın Kabul Yazısı	98
	EK-2. Etik Kurul Onayı	99
10.	ÖZGEÇMİŞ	100

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

1p35-p36: 1'inci kromozomda 35 ve 36'ıncı lokuslar arası

5-HT: Serotonin

6-OHDA: L-dihidroksifenilalanin

α : Alfa

actb1: Beta aktin

ALS: Amiyotrofik lateral skleroz

APEX2: Askorbat peroksidaz 2

ATF6: Transkripsiyon faktörü 6

ATF4: Transkripsiyon faktörü 4

ATP: Adenozin trifosfat

ATP13A2: PARK9

β : Beta

Bcl-2: B-lenfoma hücresi 2

BHDP: N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl) piperazine

BiP: İmmunoglobulin bağlayıcı protein

Ca²⁺: Kalsiyum iyonu

CD4: Yardımcı T hücreleri

CD8: Yardımcı T hücreleri

cDNA: Tamamlayıcı DNA

C_t: Eşik döngü sayısı

DA: Dopaminerjik

DC: Dendritik hücreler

ddH₂O: Duple distile su

DJ-1 (PARK7): Parkinsonizm ilişkili deglikaz

dj-1: Parkinsonizm ilişkili deglikaz geni

DNA: Deoksiribo nükleik asit

eIF2a: Ökaryotik başlatıcı faktör 2a

ER: Endoplazmik retikulum

ERAD: Endoplazmik retikulum aktivasyonu ile yıkım

E3: Ubikuitin ligaz

Flu: Fluvoksamin

FRET: Floresans Rezonans Enerji Transferi

γ: Gamma

Glu: Glutamat

Grp78: Glukoz regule eden protein (78 kDa)

GTP: Guanozin triosfat

GTPaz: Guanozin trifosfatı yıkan enzim

Hz: Hertz

ICP: İndüktif eşleşmiş plazma

IL-1β: İnterlökin 1β

IL-6: İnterlökin-6

IL-21: İnterlökin-21

IL21: İnterlökin-21 geni

IP3R: İnozitol 1, 4, 5-trifosfat reseptör

Ire1: İnozitol gerektiren enzim 1

K: Kontrol

LB: Levi cisimleri

L-DOPA: L-3,4-dihidroksifenilalanin

LPS: Lipopolisakkarid

LRRK2 (PARK8): Lösence zengin tekrarlayan kinaz 2

***lrrk2*:** Lösence zengin tekrarlayan kinaz 2 geni (Zebra balığında)

MAM: Mitokondri ilişkili endoplazmik retikulum membranları

mm-Hg: Milimetre civa

MPP+: 1-metil-4-fenilpiridinyum

MPTP: 1-metil-4 fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

MSS: Merkezi sinir sistemi

Na⁺: Sodyum iyonu

ND7/21: Fare nöroblastoma hücre hattı

NF-κB: Nüklear faktör kappa B

NKAP: NF-κB aktive eden protein

***nkap*:** NF-κB aktive eden proteini kodlayan gen

NKT: Doğal öldürücü T hücreleri

NMDA: N-metil-D-aspartat

NQO1: NAD(P): kinin oksidoredüktaz 1

Pael-R: Parkin ilişkili endotelin reseptörü

PARK1/4: α-sinüklein

***park7*:** DJ1 proteinini kutlayan gen

PBS: Fosfat tampon tuzu tablet

PH: Parkinson hastalığı

PD: Parkinson's disease

PDHK1: Piruvat dehidrogenaz kinaz 1

PINK1 (PARK6): PTEN kaynaklı indüklenen kinaz 1 (İnsanda)

***pink1*:** PTEN kaynaklı indüklenen kinaz 1 geni (Zebra balığında)

PRE-084: 2-(4-Morpholinethyl) 1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride

***Parkin*:** Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligaz (Zebra balığında)

Rab: G-protein

RNA: Ribonükleik asit

REM: Hızlı göz hareketleri

Rif: Rifampisin

ROS: Reaktif oksijen türleri

Rot: Rotenon

SA4503: 1-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine dihydrochloride

Sig-1R: Sigma 1 reseptörü

SNpc: Substansiya nigra pars compacta

SSRI: Serotonin geri alım inhibitörleri

***tlr4a*:** Toll benzeri reseptör 4a geni

TLR4a: Toll benzeri reseptör 4a proteini

***tnf-α*:** Tümör nekroz faktör-α geni

TNF-α: Tümör nekroz faktör-α proteini

UCHL-1: Ubikuitin karboksi-terminal hidroliz L1

UPR: Katlanmamış protein cevabı

VDAC: Voltaj bağımlı anyon kanal proteini

vdac: Voltaj bağımlı anyon kanal proteinini kodlayan gen

WD: Triptofan (W)-aspartik asit (D) tekrarları

XBP1: X-box bağlayıcı protein 1



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Deneylerde kullanılan kimyasallar.....	33
Tablo 2. Gen ekspresyon düzeyleri ölçülen genlere ait primer dizileri.....	36
Tablo 3. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (I).....	37
Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (II)	37
Tablo 5. RT-PCR reaksiyon bileşenleri	38
Tablo 6. RT-PCR döngü ayarları.....	38



RESİM LİSTESİ

Resim 1. ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi.....	32
Resim 2. Zebra balıklarında karın içi enjeksiyon	35
Resim 3. Lokomotor aktivite testi	36



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Fluvoksamin'in yapısı	28
Şekil 2. Ansa köprüsü ve naftol halkasını içeren rifampisin yapısı	29
Şekil 3. Kontrol ve maruziyet gruplarının lokomotor aktivite analizi sonuçlarının karşılaştırması grafiği.....	42
Şekil 4. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>gamma syn</i> mRNA ekspresyon sonuçları grafiği.	43
Şekil 5. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>pink1</i> mRNA ekspresyon sonuçları grafiği.....	44
Şekil 6. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>lrrk2</i> mRNA ekspresyon sonuçları grafiği.	45
Şekil 7. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>vdac</i> RNA ekspresyon sonuçları grafiği.	46
Şekil 8. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>nkap</i> RNA ekspresyon sonuçları grafiği.	47
Şekil 9. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>tnfa</i> RNA ekspresyon sonuçları grafiği.	48
Şekil 10. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>tlr4a</i> RNA ekspresyon sonuçları grafiği	49
Şekil 11. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>Il21</i> RNA ekspresyon sonuçları grafiği.	50
Şekil 12. Kontrol ve maruziyet gruplarının <i>sigma 1</i> mRNA ekspresyon sonuçları grafiği.....	51
Şekil 13. Kontrol ve maruziyet gruplarının PARK7/DJ1 proteini western blot analiz sonuçları.	52
Şekil 14. Kontrol ve maruziyet gruplarının Sigma 1 proteini western blot analiz sonuçları.	53
Şekil 15. Kontrol ve maruziyet gruplarının NKAP proteini western blot analiz sonuçları.	54
Şekil 16. Kontrol ve maruziyet gruplarının gamma sinüklein proteini western blot analiz sonuçları.....	55
Şekil 17. Kontrol ve maruziyet gruplarının mitokondriyal kalsiyum analiz sonuçları.. ..	56

Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Deneysel Parkinson Modelinde Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizmalar ile Çeşitli Nöroprotektif Ajanların Etkilerinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı: İlknur Yurtsever

Danışman: Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan

Anabilim Dalı: Biyokimya Anabilim Dalı (ECZ)

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı, zebra balığında rotenon ile oluşturulan Parkinson hastalığı (PH) modelinde fluvoksamin ve rifampisin olası koruyucu etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Yetişkin zebra balıkları 3 hafta boyunca boyunca rotenona, rotenon ile beraber fluvoksamin ile rifampisinine maruz bırakılmıştır. Lokomotor aktivite testi uygulandıktan sonra beyinleri dokusunda PH, kalsiyum ve inflamasyon metabolizması ilişkili gen ifadeleri RT-PCR, proteinler Western Blot ile kalsiyum analizi ise ICP (indüktif eşleşmiş plazma) yöntemi ile yapılmıştır.

Bulgular: 3 haftalık rotenon maruziyeti sonunda kontrol grupları ile kıyaslandığında lokomotor aktivitelerinde, mitokondriyel kalsiyum düzeylerinde, *tlr4a* ekspresyon düzeyinde ve Park 7 miktarlarında azalma; *sigma 1*, *tnfa*, *pink 1*, *lrrk2*, *il21* ve *vdac* ekspresyon düzeylerinde ve Nkap'ın hem mRNA ekspresyon hem de protein düzeylerinde artma belirlenmiştir. Rifampisin, rotenon grubuna göre 3. hafta sonunda lokomotor aktiviteyi, *pink1*, *tlr4a* ekspresyonunu ve kalsiyum düzeylerini arttırmış, gamma sinüklein, *tnfa*, *lrrk2*, *nkap*, *il21*, *vdac* ekspresyon düzeylerini ve *sigma 1* azaltmıştır. Fluvoksamin ise *pink1*, *lrrk2*, *vdac* ekspresyon düzeylerini azaltmış, *tlr4a* ve *sigma 1* reseptörü ekspresyonu ve Park 7 miktarı arttırmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda rotenon ile oluşturulan bu modelin zebra balıklarında PH oluşturmak için uygun olduğunu göstermiş ve literatürde ilk defa fluvoksamin ile rifampisin deneysel PH modelinde inflamasyon ve kalsiyum hemostazını PH gelişiminde etkili genler ile *tlr4a*, *NF-κB*, *nkap*, *tnfa* ve *il21* üzerinden etkilediği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Parkinson hastalığı, rotenon, rifampisin, fluvoksamin, zebra balığı

Investigation of the Biochemical and Molecular Mechanisms and Various Neuroprotective Agents in Rotenone Induced Experimental Parkinson Model in Zebrafish

Name of the Student: İlknur Yurtsever

Advisor: Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan

Department: Department of Biochemistry (ECZ)

2. ABSTRACT

Objective: The aim of our study was to investigate the possible protective effect of fluvoxamine and rifampicin in a zebrafish rotenone-induced Parkinson's disease (PD) model.

Materials and Metods: Adult zebrafish were exposed to rotenone, rotenone together with fluvoxamine and rifampicin for 3 weeks. After locomotor activity test, calcium and inflammation metabolism-related gene expressions in the brain tissue of PD were analyzed by RT-PCR, proteins by Western Blot and calcium analysis by the ICP method.

Results: After 3 weeks of rotenone exposure, locomotor activities, mitochondrial calcium levels, *tlr4a* expression levels, and Park 7 levels were decreased compared to control groups; increased expression levels of *sigma-1*, *tnfa*, *pink 1*, *lrrk2*, *IL21* and *vdac*, and both gene expression and protein levels of Nkap. Rifampicin is increased locomotor activity, *pink1* and *tlr4a* expressions and calcium levels at the end of the 3rd week compared to the rotenone group, and is decreased expression levels of *gamma synuclein*, *tnfa*, *lrrk2*, *nkap*, *il21*, *vdac* and amoun of protein sigma-1. Fluvoxamine is decreased the expression levels of *pink1*, *lrrk2*, *vdac*, and increased the *tlr4a* and *sigma-1* expression and amount of protein Park 7.

Conclusion: In our study, it was shown that rotenone-induced model is suitable for PH formation in zebra fish, and for the first time in the literature, fluvoxamine and rifampicin have been shown to influence inflammation and calcium hemostasis in the experimental PD model by genes effective in the development of PH which are *tlr4a*, *NF-κB*, *nkap*, *tnfa* and *il21*.

Keywords: Parkinson's disease, rotenone, rifampicin, fluvoxamine, zebrafish

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya üzerinde ilerleyen yaşla beraber milyonlarca kişiyi etkileyen ilerleyici nörodejeneratif bir bozukluk olan Parkinson Hastalığı (PH) oranının, yaşlı nüfusun artması ile beraber önümüzdeki yıllarda artmaya devam etmesi beklenmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sporadik geç başlangıçlı PH'nin vakaların % 90'ını oluşturduğunu, geriye kalanının ise ailesel kaynaklı erken başlangıç vakaları olduğunu göstermiştir (Jankovic ve Tintner, 2001).

Mevcut tedaviler ile günümüzde PH için sadece semptomlar tedavi edilebilmekte ancak nöronal dejenerasyon yavaşlatılamamakta veya önlenememektedir. PH için en yaygın kullanılan tedavi seçeneği olan levodopa, dopamin replasmanı amaçlı uygulanır ancak tedavinin yararlı etkileri hastalığın ilerlemesiyle giderek azalır (Lewitt, 2008).

Yapılan birçok araştırmaya rağmen, PH'nin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekte, oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon, ubiquitin-proteazom sisteminin bozulması ve nöroinflamasyon gibi birçok patojenik mekanizma önerilmektedir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hem idiyopatik hem de ailesel PH'nin patogenezinde anahtar bir unsur olarak kabul edilir. Kalsiyum, nöronal ve glial hücreler için çok önemlidir ve nörodejeneratif hastalık mekanizmaları kalsiyum homeostazındaki bozukluklarla yakından ilişkilidir. Hücre yaşamını ve ölümünü kontrol eden mitokondrial proteinlerden biri, mitokondriyal porin olarak da bilinen voltaj bağımlı anyon kanalıdır (VDAC). Mitokondriyal dış zarda bulunan VDAC, mitokondriyal metabolitlerin giriş ve çıkışında bekçi olarak işlev görür ve kalsiyum dengesinde çok önemlidir (Shoshan-Barmatz ve ark., 2010). Şaperon reseptörü olarak Sigma-1, endoplazmik retikulum üzerinde bulunur ve kalsiyumun endoplazmik retikulumdan mitokondriye geçişinde rol oynayarak hücresel stres ve kalsiyum dengesini düzenler (Hayashi ve Su, 2007). Tüm bu bilgilerin yanısıra son yıllardaki çalışmalar PH'de nigrostriatal dejenerasyonda inflamasyonun rolünü kuvvetle desteklemektedir .

Ticari isim olan Lovox olarak bilinen Fluvoxamine, seçici bir serotonin (5-HT) geri alım inhibitörüdür (SSRI) (Coleman ve Block, 1982; Hashimoto ve ark., 2007). Bir antidepresan olarak, flüvoksamin, şizofreni ve majör depresif bozukluk gibi nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Ek olarak, bu ilacın, hücre fonksiyonunun düzenlenmesi ve hayatta kalma, nörotransmitter salınımı, kalsiyum sinyalleme, iltihaplanma, endoplazmik stres, mitokondrial stres, sinaptogenez de dâhil olmak üzere birçok sinir mekanizmasında yer alan Sig-1R (Sigma 1 reseptörü) üzerinde agonist aktivite gösterdiği gösterilmiştir (Hall ve ark., 2009; Maurice ve Su, 2009; Nguyen ve ark., 2017; Su ve ark., 2010; Urani ve ark., 2002)

Geniş spektrumlu bir antibiyotik olan rifampisin, çeşitli deneysel çalışmalarda PH dâhil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda önemli nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir. Altta yatan etki mekanizması, artmış dopaminerjik hücre sağkalımı, azalmış alfa sinüklein toksisitesi, mitokondriyal ve endoplazmik retiküler stresin stabilizasyonu ve nihayetinde önemli nöroprotektif etkiyle sonuçlanan nöroinflamasyonun azalmasını içermektedir (Bi ve ark., 2014)

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 22.2018.mar prokol kodlu etik kurul onayı ile yürütülmüştür. Bu çalışmada, zebra balıklarında rotenon ile oluşturulan PH modelinde rifampisin PH gelişimindeki oksidatif stres ve inflamasyon üzerine etkilerini gen ekspresyon seviyesinde ve protein düzeyinde incelenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, bir Sigma-1 reseptör agonisti olan flüvoksaminin mitokondri içi kalsiyum düzeyleri üzerine etkisi ve bu yolak üzerinden PH gelişimindeki mitokondriyel stres ve inflamasyon ile ilişkili gen ve proteinler üzerinde olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır (Selkoe, 2004). PH ilk olarak 1817'de James Parkinson (York, 2017) tarafından tanımlanmıştır. PH, ventral mezensefalonda dopamin üreten sinir hücrelerini etkiler. PH'nın tüm belirtileri, hipokinezi, istirahat titremeleri, harekete geçme zorluğu veya hareketin durması zorluğu, donuk yüz ve postural refleks bozukluğu gibi motor işlev bozuklukları ile ilişkilidir (Gantchev ve ark., 1996; Jankovic, 2008). PH belirtileri kişiden kişiye farklılık gösterir. Bu hastalığın belirtileri zaman geçtikçe değişir ve parkinsonizm olarak tanımlanmaktadır (Chastan ve ark., 2009). Parkinsonizm, bu nörodejeneratif hastalığın karakteristiği olmayan diğer belirti ve semptomlara ek olarak PH'nın en çok bilinen semptomlarının görüldüğü sahip bir sendromdur (Gilks ve ark., 2005). Parkinsonizm terimi, ilaç toksisitesine bağlı parkinsonizm (Lotharius ve O'Malley, 2000), beyin hasarına bağlı parkinsonizm (Dauer ve Przedborski, 2003) ve nöron dejenerasyonuna bağlı parkinsonizm gibi bilinen nedenleri olan sendrom için tanımlanmaktadır (Luk ve ark., 2012; Ricaurte ve ark., 1987; Surmeier ve ark., 2017). PH'nin motor bozukluklarına bağlı ana patolojik bulgular striatumda dopamin kaybına neden olan substantia nigra pars compacta'nın (SNpc) dopaminerjik nöronlarının (DA) bozulmasıdır (Luk ve ark., 2012). PH belirtileri, substantia nigra'nın %5-60'ının bozulmasından ve striatumdan dopamin seviyesinin %80-85'inin azalmasından sonra ortaya çıkar. Serotoninerjik ve katekolaminerjik beyin sapı nöronlarının dejenerasyonu meydana gelir. Sağ kalan nöronlar Levi cisimlerini (LB'ler) içerir (Gray ve McNaughton, 2003). PH hastalarının orta beyinleri, SNPC ve locus coeruleus'ta pigmentasyon kaybını ortaya koymaktadır. Diğer beyin bölgeleri daha az etkilenir. Pigmentli nöronlar nadirdir ve küçük hücre dışı melanin birikintileri, ölmekte olan nöronlardan türetilir. Bazı rezidüel nöronlar atrofiktir ve bunların birkaçı küresel, eozinofilik sitoplazmik inklüzyonlar olarak görselleştirilen LB'leri içerir. Hastalığın uygun bir şekilde tanımlanabilmesi için PH'nın geniş klinik bulgularının sistematik bir şekilde tanımlanması esastır. Genetik varyantlar veya

mutasyonlar, nörogörüntüleme deformasyonları ve diğer araştırmalar, tanı konmasına yardımcı olabilecek ve risk altındaki kişilerin tanınmasına izin verebilecek olası biyobelirteçlerdir. PH'nın semptomlarını yönetmek için çok sayıda ilaç vardır, ancak PH'nın ileri evrelerinde daha az başarıya sahiptirler.

4.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri

Parkinson hastalığı, motor ve non-motor semptomlarla kendini gösterir. Parkinson hastalığının klasik bulguları motor semptomlardır. 1967'de Hoehn ve Yahr tarafından 183 Parkinson hastasına bakarak yazılmıştır (Hoehn ve Yahr, 2001). Bunlar istirahat titremesi, bradikinezi, postural instabilite ve sertliği içerir.

4.2.1. Motor belirtiler

4.2.1.1. Titreme

Parkinson'da genellikle tek taraflı olan titreme görülür. Titreme tipik olarak başlangıçta bir ekstremitede görülür (bazen sadece bir parmağını veya baş parmağını içerir). Titreme klasik esansiyel titremeden (8-10 Hz (Hertz)) daha yavaştır (4-6 Hz) ve ekstremitelerde bir durma pozisyonundayken en belirgindir ("istirahat titremesi" terimi, tamamen yanıltıcıdır, çünkü tamamen gevşeme, sıklıkla titremeyi ortadan kaldırır). Bu hareket ile bastırılır. Daha az yaygın olmasına rağmen, baş, çene ve dili de kapsar. Bazı hastalar için, klasik parkinson titremesi hastalığın tek belirtisidir. Bu, titreme baskın Parkinson hastalığı olarak adlandırılır. Bu hastalar sonunda Parkinson hastalığının başka semptomlarını geliştirir (Hayes, 2019).

4.2.1.2. Bradikinezi

Bradikinezi, hareketin yavaşlaması ve karmaşık motor görevlerinin basitleştirilmesi anlamına gelir. Hareket kendiliğinden azalır. Bu, Parkinson hastalığının "maskeli yüzler"inde (hypomimia olarak da bilinir) kendini gösterir. Göz kırpması hızı azalır ve gözler daha açıktır, dik dik bakan bir görünüm verir. Yüz kasları daha az hareket eder, böylece yüz daha az duygusal olur. Durum ilerledikçe ağız genellikle biraz açık kalır. Konuşma, beraber söylenen kelimelerle daha yumuşak ve monoton hale gelir. Kendiliğinden yutma azalır ve yutma mekaniği etkilenir ve salya akımı ile sonuçlanır. Parkinson hastalığında, salya akımı tükürük üretimindeki

artıştan değil, tükürüğü etkin bir şekilde idare edememekten kaynaklanmaktadır (Bagheri ve ark., 1999). El hareketleri daha da kısıtlanır. Parmakla dokunma normal hıza sahip olabilir ancak hareketin genliği azalır. Alternatif hareket zorlaşır ve sık sık “donma” olur. Bu, motor fonksiyonun aralıklı olarak durdurulmasına karşılık gelir. Bir kaşıkla karıştırmak veya dişlerini fırçalamak gibi şeyler yapmak daha zor hale gelir. Yazma sıkışık ve küçük olur (mikrografi). Sonunda hasta sandalyeden kalkmakta zorlanır. Yürüyüşteki değişiklikler, genellikle asimetric olarak, kol salınımında bir azalma ile not edilir. Hastanın atağının uzunluğu azalır ve beraberinde kol hareketi tamamen kaybolabilir. Hasta artık dönen bir mili tek hareketle açamaz, ancak açmak için birden fazla küçük adım kullanarak açabilir. Sonunda hasta öne veya arkaya eğilerek yürüyebilecektir. Hastanın gövdesi ayaklarından “öne geçecek” ve “sinirlilikten gelen hızlı yürüme eğilimi” denilen dengesini yeniden kazanmak için küçük adımlar atması gerekecektir. Hastalık ilerledikçe bu, hastanın düşmesine neden olabilir (Park ve ark., 2015). Bununla birlikte, düşme genellikle hastalıkta daha sonra meydana gelir. Bir hasta hastalığın erken döneminde düşme eğilimindeyse, Parkinson hastalığı dışında bir tanı düşünülmelidir.

4.2.1.3. Postural instabilite

Postural stabilite hastalık sürecinin erken döneminde veya sonrasında etkilenebilir, böylece düşmelere ve yaralanmalara neden olabilir. Erken düşmeler genç başlangıçlı hastalar için atipiktir ancak yaş PH’da düşmeler için bağımsız bir risk faktörüdür (Williams-Gray ve ark., 2006) ve yaşlılarda hastalık ilk kez bir düşmeden sonra teşhis edilir. Wood ve ark. (2002), düşme geçiren 109 Parkinson hastanın %68’inin, ortalama yaşının 75 ve ortalama hastalık süresinin 3 yıl olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada, PH’lı bireylerin %62’sinin düştüğü bildirilmiştir (Stolze ve ark., 2004). Yaşlılık dışındaki düşme olasılığını arttıran faktörler arasında hastalık süresi, demans, simetrik başlangıç, postural ve otonomik instabilite bulunur (Williams-Gray ve ark., 2006; Wood ve ark., 2002).

Ağıza ilişkin motor hastalıkları yaygındır. Çok sessiz ve aceleci konuşma gibi konuşma bozuklukları hastaların yarısından fazlasında görülür (Perez-Lloret ve ark.,

2012), % 40-80 arasında yutkunma sorunları bildirilmiştir (Kalf ve ark., 2011) ve hastaların dörtte birinde tükürüğün toplandığını bildirmiştir (Kalf ve ark., 2012).

4.2.1.4. Distoni

Distoni, PH'da başka bir motor belirtidir. Distoni, sıklıkla anormal hareketler, duruşlar veya her ikisinin de eşlik ettiği sürekli bir kas kasılmasını açıklar. Bu nadiren PD'de ön tanısal bir semptom olabilir (Tolosa ve Compta, 2006), ancak distonik semptomlar çoğunlukla hem tıbbi hem de cerrahi olarak tedaviyle ilişkilidir (Jankovic ve Tintner, 2001).

4.2.2. Motor dışı belirtiler

Motor belirtileri ortaya çıkmadan ve tanı konulmadan önce, hastalar çeşitli motor öncesi semptomlara sahip olabilir. Bunlar tanıdan 10 yıl veya daha uzun bir süre önce başlayabilir (Schrag ve ark., 2015) ve motor olmayan semptomların sunumu tanıyı geciktirebilir (O'Sullivan ve ark., 2008). Henüz tedaviye başlamamış yeni tanı konmuş 109 hastanın çalışması, duygusal tutulum eksikliği ve ilgisizlik (apati), aşırı gündüz uykusu, uyku problemleri ve kabızlık gibi semptomların tanı öncesi hastaların%60-70'inde ortaya çıkabileceğini ve bu belirtilerin normal kontrollerden daha yaygın olduğunu göstermiştir. Diğer motor öncesi belirtiler arasında haz alınamaması, koku ve tat kaybı, duygudurum bozuklukları, aşırı terleme, yorgunluk ve ağrı yer almaktadır. Kabızlık, rüyayı etkileyici davranışlar (REM (uykunun istemsiz göz hareketlerinin yapıldığı evresi) davranışı uyku bozukluğu), sık sık kabuslar, gündüz uyuşukluğu ve postprandial dolgunluğun, motor semptomların başlamasından 10 yıl önce ortaya çıktığı bildirilmiştir (Pont-Sunyer ve ark., 2015). Depresyon ve anksiyete, tanı konmadan çok önce de ortaya çıkabilir (Chen ve Marsh, 2013). Premotor semptomlar hastadan hastaya değişir, ancak PH'da diğer motor veya motor dışı semptomlar klinik seyrinde görülebilirken devam ederler. Hastalığın ilerleyen safhalarında, motor olmayan semptomlar genellikle hastalar için motor semptomlardan daha sıkıntılı hale gelir (Sveinbjornsdottir, 2016).

Motor olmayan semptomlar burada otonom fonksiyon, uyku bozuklukları, bilişsel ve psikiyatrik bozukluklar ve duyuşsal semptomlardaki bozukluklara ayrılır (Sveinbjornsdottir, 2016).

4.2.2.1. Otonom fonksiyondaki bozukluklar

Otonomik disfonksiyon tanıdan önce mevcut olabilir veya hastalığın ilerlemesi ile belirgin hale gelebilir veya ilaçla indüklenebilir (Koike ve Takahashi, 1997). Tüm otonomik fonksiyon alanları etkilenebilir ve bunun hastaların %50'den fazlasının günlük yaşamını etkilediği bildirilmiştir (Jost, 2003). Otonomik disfonksiyon, hem merkezi hem de periferik postganglionik otonom sinir sisteminin katılımı nedeniyle göz önünde bulundurulur (Jost, 2003). Ortostatik hipotansiyon hastaların %30-40'ını etkiler. Bu, 3 dakika içinde en az 60 derece olacak şekilde baş yukarıda dikey yatış pozisyonunda, sistolik kan basıncında > 20 mm-Hg (milimetre civa) veya diyastolik kan basıncında > 10 mm-Hg düşüş olarak tanımlanır (Lahrman ve ark., 2006). Dik duruş varsayıldığında beynin hipotansiyona bağlı hipoperfüzyonu baş dönmesi, görme bozuklukları ve bilinç kaybına neden olabilecek bozulmuş biliş neden olabilir. PD'de kan basıncı düşüşü birkaç dakika sürebilir (Jost, 2003). PD'nin süresi, ortostatik hipotansiyonun ortaya çıkması ile ilgili olmayabilir (Jost ve Augustis, 2015). Yaşlı PD hastalarında, bu temel olarak gıda alımından sonra ortaya çıkabilir (Iodice ve ark., 2011). Gastrointestinal semptomlar yaygındır. Gastrointestinal kanalın postprandial dolgunluk ve gastrik retansiyon gibi semptomlarla hareketliliğinde yavaşlama vardır, ancak yavaş geçiş kabızlığı en yaygın olanıdır, %70-80'inde görülür (Jost, 2010; Jost ve Eckardt, 2003). Hastalar ayrıca, rektal sfinkter fonksiyon bozukluğu nedeniyle rektal tahliyede zorluk yaşayabilir (Mathers ve ark., 1989).

İdrar kontrol bozuklukları idrar sıklığı, aciliyet ve idrarı tutamamayı içerir (Jost, 2003). Sık görülen nokturi, hastaların %60'ı tarafından bildirilir ve detrüsör aşırı aktivitesinden kaynaklanır (Yeo ve ark., 2012). Eretil disfonksiyon erkeklerde sık görülür (Sakakibara ve ark., 2011). Aşırı terleme (hiperhidroz) gibi otonom dermatolojik semptomlar da olabilir. Bu, diskinezilerle veya dopaminerjik ilaçların düşük kan konsantrasyonlarıyla ilişkili olabilir, ancak hastalığın süresiyle korele görünmemektedir (Hirayama, 2006). İlerlemiş hastalıkta tükürük salgılamasıyla ilgili

sıkça soruna rağmen, tükürük sekresyonunun PH'da azaldığı görülmektedir (Cersosimo ve ark., 2009). Seboreik keratoz, hastaların% 18,6'sında bildirilen dermatolojik yüz ve kafa derisi hastalığıdır (Fischer ve ark., 2001). Sıklıkla alın derisinin soyulmasıyla ilişkili olan yüzün orta kısmında yağ artışı vardır. Bunun nedeni belirsiz.

4.2.2.2. Uyku bozuklukları

PH nöropatolojisinin, fizyolojik uyku döngüsünün modülasyonunda rol oynayan anatomik yapıları ve merkezi nörotransmitterleri etkilediği bilinmektedir. Polisomnografik bulgular, sağlıklı kontrollere kıyasla uyku dalgalarının yapısındaki değişiklikleri göstermiştir, ancak PH ile ilgili farklı semptomların tıbbi tedavisi de gece uykusunu bozabilir (Larsen ve Tandberg, 2001; Monderer ve Thorpy, 2009). Etkilenen hastaların yaklaşık üçte ikisinde çeşitli uyku bozuklukları görülebilir (Mehta ve ark., 2008).

Parçalı uyku en yaygın olanıdır (Porter ve ark., 2008). Uyku çalışmaları, hastaların daha sık uyuma ve gece sık uyanma eğilimi gösterdiğini göstermiştir (Yong ve ark., 2011). Yatakta sık dönme sıkıntısı, sık noktürya, nokturnal tremor ve depresyon gibi diğer PH semptomları da parçalı uykuya neden olabilir (Gibb ve Lees, 1988).

Aşırı gündüz uykulu olma durumunun aşırı olması hastaların %50'sinde olduğu (Monderer ve Thorpy, 2009) ve kısmen dopaminerjik ilaçlar tarafından indüklenebileceği tahmin edilmektedir (Knie ve ark., 2011). Uyku sendromları da PH'da kontrollerden daha yaygındır. Bunlar, hastaların rüyalarında ve gerçeğe yansıyan tekmeleme ve dövme davranışlarını sergilediği REM davranış uyku bozukluğunu içerir. Klinik olarak bu durum PH'da %27-32 oranında sıklıkla ortaya çıktığı bildirilmiştir (Monderer ve Thorpy, 2009), ancak semptomlar motor semptomların ortaya çıkmasından yıllar önce ortaya çıkabilir (Hickey ve ark., 2007). Periyodik bacak hareketleri olan veya olmayan huzursuz bacak sendromu hastalar arasında kontrollerden daha yaygındır (Monderer ve Thorpy, 2009). Huzursuz bacak sendromu, otururken ya da uzanırken bacakları rahatlatıcı hareketleri yapmak için bir

dürtüdür; buna karşın, uykuda periyodik bacak hareketleri, genellikle eş tarafından gözlemlenen uyku sırasında alt uzuvların ritmik sarsıntısından oluşur.

Her ne kadar uyku sırasında solunumun aralıklı olarak durduğu tıkalı uyku apnesi PH'da iyi bilinmesine rağmen (Monderer ve Thorpy 2009), tüm çalışmalar hastalar arasında bu bulgunun prevalansında artma olduğunu göstermemiştir (Zeng ve Couture, 2013). Dopaminerjik tedavi alan hastalarda uykuya neden olduğu için normal uyuşukluk olmadan meydana gelen ani uyku krizleri bildirilmiştir. Neredeyse mevcut tüm dopaminerjik ilaçların uyku ataklarına neden olabileceği görülmektedir (Larsen ve Tandberg, 2001) ve dopaminerjik tedavi alımı bu durumdan etkilenebilir (Brodsky ve ark., 2003).

4.2.2.3. Nöropsikiyatrik belirtiler ve demans

Görme halüsinasyonları ve yanılsamalar PH'da sık görülür ve bildirildiğine göre hastaların %3 ila 40'ında görülür (Onofri ve ark., 2007). Neredeyse tüm anti-parkinson ilaçlarının halüsinasyonlar ve psikozları indüklediği bildirilmiş olmasına rağmen, ilaç tedavisinden önce görsel halüsinasyonların da olduğu bildirilmiştir (Pagonabarraga ve ark., 2016). Hastalığın neden olduğu amigdala ve hipokampustaki nöropatolojik değişikliklerin etiyolojiye katıldığı görülmektedir (Williams-Gray ve ark., 2006). Sık sık, insanların, küçük hayvanların veya nesnelerin görüntüleri düşünülür veya halüsinasyonlar birden fazla içeriğe sahip olabilir. Görüntüler tanıdık olabilir veya olmayabilir. Saniyelerden dakikalara kadar sürebilirler ve gün içerisinde tekrarlayabilirler (Holroyd ve ark., 2001). Genellikle, demansız hastalar sezgilerini korur ve halüsinasyonlar genellikle tehdit edici değildir. Daha az yaygın olarak, halüsinasyonlar koku (McAuley ve Gregory, 2012), işitsel (Inzelberg ve ark., 1998) ve dokunsaldır (Fenelon ve ark., 2002). Bir çalışma, görsel bileşenlerin vakaların %10'unda olmadığını göstermiştir (Papapetropoulos ve ark., 2008). Varlık hissi ve görsel yanılsamalar gibi küçük görsel olaylar hastaların %17-72'sini ve sanrıların yaklaşık %5'ini etkiler (Fenelon ve Alves, 2010). Daha fazla dopaminerjik tedavi yüklemesi halüsinasyonlarla ilişkilendirilebilir, ancak hastalık şiddeti, bilişsel bozukluk, depresyon, ileri yaş ve daha kötü görme keskinliği de önemli olabilir (Fenelon ve Alves, 2010; Holroyd ve ark., 2001).

İlerlemiş hastalık ile hastalar, genellikle, e e yönelik zulüm fikirleri veya şüpheleri olan paranoyak yanılsamalar geliştirebilirler (Williams-Gray ve ark., 2006). Psikoz ortaya çıkarırsa, bu genellikle yüksek dozda ilaç kullanan hastalarda hastalık sürecinin geç döneminde olur veya ya , kognitif bozukluk ve depresyon öyküsü ile ilişkilendirilebilir (Thanvi ve ark., 2005).

Dopaminerjik tedavi ayrıca öfori / hipomani, zayıf organizasyon becerileri, aşırı duygusallık, anormal istifçilik veya kumar oynama ve risk alma davranışı gibi davranışsal anormallikleri de tetikleyebilir (O'Sullivan ve ark., 2009). Risk alma davranışı kumar oynamaya, hızda s r   veya aşırı harcamaya yansıyabilir. Dopamin disregülasyon sendromu veya dürtü kontrol bozuklukları olarak beraber adlandırılan bu semptomlar giderek daha fazla kabul edilmektedir (Evans ve Lees, 2004). Bu semptomların, dopaminerjik tedavi yüküyle ve muhtemelen diğerlerinden daha fazla dopamin reseptörü agonist ilaçları ile ilişkili olduğu görünmektedir (Ceravolo ve ark., 2010; O'Sullivan ve ark., 2009). Dopamin disregülasyon sendromu, nispeten genç başlangıçlı hastalığı olan erkeklerde en sık görülür (Ceravolo ve ark., 2010).

Kognitif bozulma ve demans PH'da sık görülür ve erken veya geç olabilir (Williams-Gray ve ark., 2007; Williams-Gray ve ark., 2006). En erken semptomlar yürütücü işlevlerle, yani hedefe yönelik davranışı planlamak ve organize etmek ile ilgili problemleri içerir, ancak görsel-disfonksiyon bozukluğu, konuşma akıcılı ındaki bozukluk ve hafıza bozukluğu da görülür (Williams-Gray ve ark., 2006). Demansın ilerlemesi nöropatolojik değişikliklerin kortikal beyin yapılarına yayılması ile koreledir (Irwin ve ark., 2012). Hafif bilişsel bozulmanın, PH'da sağlıklı bireylerden iki kat daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Aarsland ve ark., 2009). PH'nin başlangıcından ziyade ya ın kendisi, PH'daki demans olayı ile ilişkilidir (Aarsland ve ark., 2007) ve hastalık şiddetinin demans riskinin en güçlü belirleyicisi olduğu bildirilmiştir (Riedel ve ark., 2008). Ortalama hastalık süresi 5 yıl olan ve ortalama ya ı 69 olan 141 PH hastasıyla 6 yıl süren bir araştırmada, uzunlamasına bir çalışmada demansın 1 yılda %8,5'den 6. yılda %50'e yükselen birikimli risk olduğu gösterilmiştir (Pigott ve ark., 2015).

Depresyon ve anksiyete, PH'da diğer yaygın semptomlardır. Bir meta-analiz, hastaların    te birinin klinik olarak anlamlı depresyonu olduğunu bildirirken, majör

bir depresif bozukluğun % 17 oranında olduğu bildirilmiştir (Reijnders ve ark., 2008). Depresyon ve anksiyete, hastalığın ciddiyetini ilerletmek de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle ilgili olabilir (Schrag ve ark., 2001). Anksiyete ve depresyon dopaminerjik tedavi ile birlikte kaybolabilir, ancak hastalığın uzun süren klinik seyrinde kalıcı veya tekrarlayıcı olabilir.

4.2.2.4. Duyusal belirtiler

Duyusal semptomlar PH'da sık görülür. Azalan veya kaybedilen koku alma duyusu hastaların en az% 80'inde bulunur ve bu genellikle motor semptomlardan çok önce ortaya çıkar (Doty ve ark., 1988). Vücut bölümlerinde belirsiz anormal duyular algılanabilir ve bu duyular tedavi ile ilişkili olarak dalgalanabilir (Bayulkem ve Lopez, 2011). Hastaların %40-85'i tarafından ağrı bildirilmektedir (Broen ve ark., 2012). Ortaya çıkan semptom ekstremitte ağrısı olabilir ve genelde donmuş omuz veya dejeneratif omurga hastalığı olarak yanlış teşhis edilir (Williams-Gray ve ark., 2009). En sık olarak ekstremitte ağrısı görülürken, oral, torakal, karın ve genital ağrı da ortaya çıkabilir (Waseem ve Gwinn-Hardy, 2001). Beş farklı tipte ağrı tanımlanmıştır, bunlar; kas-iskelet sistemi, radiküler-nöropatik, distonik, merkezi nöropatik ağrı ve ağrıya bağlı huzursuzluk (akatzizi-oturma durumunda ortaya çıkan ve artan ağrı) (Ford, 2010). Kas iskelet sistemi ağrısı hastaların neredeyse yarısı tarafından bildirilir, ancak bu ağrı bu yaş grubunda sık görülür ve her zaman PH ile ilişkili olmayabilir. Distonik, radiküler ve merkezi nöropatik ağrı daha az yaygındır (Broen ve ark., 2012).

4.3. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi

PH patogenezinde, hastalığın gelişmesinde merkezi olan alfa (α)-sinüklein agregasyonu ile birtakım mekanizmalar ortaya konmuştur. Anormal protein klirensi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve nöroinflamasyonun PH'nın başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynadığını gösteren birçok çalışma mevcuttur.

4.3.1. α -Sinükleinler

Beyindeki doğal α -sinüklein, tanımlanmış bir üçüncül yapı (Burre ve ark., 2013) olmaksızın çoğunlukla katlanmamış formdadır, ancak sulu çözeltilerde toplanmaya dirençli stabil tetramerlerde mevcut olabilir (Bartels ve ark., 2011). Hücre zarlarını

oluşturan fosfolipitler gibi negatif yüklü lipitler ile etkileşime girdiğinde, α -sinüklein N-terminali (Eliezer ve ark., 2001) vasıtasıyla a-helisel yapılara katlanır. PH'da α -sinüklein, agregaya eğilimli beta (β) tabaka zengini bir amiloid benzeri yapıyı benimser. Aslında, yanlış katlanmış α -sinüklein, LB'ler içerisinde 5-10 nm uzunluğunda filamentler olarak bulunur. Serin 129 fosforilasyonu, ubiquitination ve C-terminali trunkasyonu dahil anormal α -sinüklein agregasyonuna yol açan konformasyonel değişiklikler için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (Barrett ve Timothy Greenamyre, 2015; Fujiwara ve ark., 2002). Bu nedenle, PH beyinde, katlanmamış monomerler, çözünür oligomerler, protofibriller ve yüksek moleküler ağırlıkta çözünmeyen fibriller de dâhil olmak üzere farklı α -sinüklein türleri bulunur (Baba ve ark., 1998). Kemirgenlerde yapılan son çalışmalar, en fazla nörotoksik α -sinüklein türünün, olgun çözünmeyen fibrillerden ziyade, erken oligomerik form olduğunu göstermiştir (Karpınar ve ark., 2009; Winner ve ark., 2011). Fibril α -sinükleinin aksine bu oligomerlerin artan toksisitesi hücre bazlı analizlerde doğrulanmıştır (Winner ve ark., 2011). α -sinüklein oligomerik türleri anormal protein toplanmasını “tohumlama” ve hızlandırma yeteneğine sahiptir ve Danzer ve arkadaşları (2011) bunun beyinde α -synüklein patolojisinin yayılmasının altında yatan mekanizma olabileceğini öne sürmüşlerdir (Danzer ve ark., 2009).

4.3.2. PTEN kaynaklı indüklenen kinaz 1 (PINK 1)

PINK1 Parkin'i kusurlu mitokondriye yönlendirmesi için gereklidir. PINK1, tek bir N-terminal transmembran alanı olan bir mitokondriyal proteindir. Sağlam bir mitokondride, PINK1 mitokondride degrade edilerek sürekli düşük seviyelerde tutulur (Sun ve ark., 2012).

Serin / treonin kinaz PINK1 ve RING ailesi ubiquitin ligaz Parkinin, yakın zamanda, mitokondriyal otofaji (mitofaji) ile mitokondrinin ortadan kaldırılmasındaki bozuklukta rol oynadığı gösterilmiştir. Mitofajinin, hücreleri fonksiyonel olarak kusurlu mitokondri birikimi ve reaktif oksijen türlerinin üretiminin artmasının zararlı etkilerinden koruduğu düşünülmektedir. E3 ligaz aktivasyonu ile hasarlı ve fonksiyonu bozulmuş mitokondrinin otofajik yıkımının başlatılması için parkin, PINK1 tarafından fosforile edilir. PINK1 mitokondri fonksiyonu bozulduğu zaman mitokondri dış membranında birikir ve hücreden

hasarlı mitokondrinin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır (van der Merwe ve ark., 2015).

Her iki proteindeki mutasyonlar, PH'nin ailesel formları ile ilişkilidir (Sun ve ark., 2012). *PINK1*, kromozomun 1p35-p36 bölgesinde (1'inci kromozomda 35 ve 36'ıncı lokuslar arası) bulunmaktadır ve mutasyonu otozomal resesif erken başlangıçlı levodopa duyarlı PH'de hastalığın yavaş gelişen formunda gösterilmiştir (Valente ve ark., 2001).

4.3.3. Lösince zengin tekrarlayan kinaz 2 (LRRK2)

Lösün bakımından zengin tekrarlayan kinaz 2 (LRRK2) insanlarda PARK8 / LRRK2 geni tarafından kodlanır (Paisan-Ruiz ve ark., 2004; Zimprich ve ark., 2004). LRRK2 genindeki genetik varyasyonlar Parkinson hastalığı (PH), Crohn hastalığı ve Hansen hastalığı dahil birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Blanca Ramirez ve ark., 2017; Boddu ve ark., 2015; Delamarre ve Meissner, 2017; Lill, 2016; Lin ve Farrer, 2014; Liu ve Lenardo, 2012). LRRK2'de dominant kalıtsal mutasyonlar, ailesel PH'nın en yaygın nedenidir ve sporadik geç başlangıçlı Parkinsonizm'in %2'sine karşılık gelir (Ferreira ve Massano, 2017; Li ve ark., 2014).

LRRK2 geni, bir ankirin benzeri ve bir lösün-zengin tekrar bölgesi, bir Rab (G-protein) benzeri GTPaz (guanozin trifosfatı yıkan enzim) domaini, bir tirozin-kinaz benzeri domaini ve bir WD (Tryptofan (W)-aspartik asit (D) tekrarları) benzeri domaini içeren büyük birçok domainli protein kinazı kodlar. LRRK2'nin, homeostaz ve hücre sağkalımı için kritik olan çeşitli hücresel süreçleri düzenlediği görülmektedir. LRRK2'nin, sinaptik vezikül geri dönüşüm/endositoz (Arranz ve ark., 2015; Beccano-Kelly ve ark., 2014; Carrion ve ark., 2017; Ferreira ve Massano, 2017; Inoshita ve ark., 2017; Maas ve ark., 2017; Matta ve ark., 2012) ve dopamin reseptör kaçakçılığını (Rassu ve ark., 2017) düzenlemek için nörit morfolojisini ve karmaşıklığını (Chan ve ark., 2011; Civiero ve ark., 2015; Dachsel ve ark., 2010; Heo ve ark., 2010; MacLeod ve ark., 2006; Paus ve ark., 2013; Plowey ve ark., 2008) kontrol ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, LRRK2, inflamasyonu, protein parçalanmasını, mitokondriyal ve otofaji/lizozomal fonksiyonları (Bang ve ark., 2016; Heo ve ark., 2010; Liu ve ark., 2011; Manzoni ve Lewis, 2017; Moehle ve ark., 2012; Saez-

Atienzar ve ark., 2016; Tong ve ark., 2010; Yan ve Liu, 2017) düzenleyen iç içe geçmiş yollara bağlanmıştır.

4.4. Parkinson Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stresi ve Mitokondri Fonksiyon Bozukluğu

İnklüzyon cisimlerinin oluşumu ve protein agregasyonu ile ilişkili Parkinson hastalığı, amiotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ER ile ilişkili olduğu bulunmuştur. İkinci en sık görülen nörodejeneratif hastalık olan PD'de, substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik (DA) nöronlar geri dönüşümsüz olarak bozulmaktadır. Parkin (Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligaz, PARK2), DJ-1 (Parkinsonizm ilişkili deglükaz-PARK7), PTEN'in neden olduğu varsayılan kinaz 1 (PINK1; PARK6) ve ATP13A2 (PARK9), otozomal resesif PH'de yer aldığı bilinen genlerdir. α -sinüklein (PARK1/ 4), lösin bakımından zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2; PARK8) ve ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz L1 (UCHL-1; PARK5), otozomal dominant PH ile ilişkili genlerdir (Omura ve ark., 2013; Unal ve Emekli-Alturfan, 2019). PH'da, katlanmamış proteinlerin endoplazmik retikulum (ER) ile ilişkili yıkılmasını, LRRK2 ve α -sinükleinin, ERAD'ın (endoplazmik retikulum aktivasyonu ile yıkım) E3 aktivitesi (ubiquitin ligaz) için substratları olması nedeniyle yıkıldığı bildirilmiştir (Ding ve Goldberg, 2009; Imai ve ark., 2000). Bu nedenle ER stresinin PH ilerlemesi için önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Parkin ayrıca ubiquitin moleküllerini halka parmak motiflerini içeren E3 kısmı ile bağlayabildiğinden proteazomal bozulmaya da katılır. Yanlış katlanmış Parkin ile ilişkili endotelin reseptörü benzeri reseptör (Pael-R) Parkin tarafından yıkılır.

Parkin mutasyonları, E3 aktivitesinin kaybına, katlanmış Pael-R'nin birikmesine ve sonunda ER stresinin neden olduğu hücre ölümüne yol açabilir (Mizuno ve ark., 1998). Pael-R'nin sporadik PH'da Levi cisimlerinin çekirdeğinde biriktiği gösterilmiştir (Murakami ve ark., 2004).

4.4.1. Endoplazmik retikulum stresiyle başetme mekanizmaları

UPR'nin (katlanmamış protein cevabı) amacı ER'nin adapte edilmesini ve fonksiyonlarını yeni koşullara karşı sürdürmesini sağlamaktır. Adaptasyon mekanizmaları, ER'de protein katlanmasından sorumlu genlerin ekspresyonunu stimüle etmeyi ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkılmasını ve uzaklaştırılmasını içerir.

Katlanmamış proteinlerin ER'de birikmesi, UPR'de transmembran ER proteinlerinin salınmasına neden olur. Bu proteinlerin en önemlileri PERK, Ire1 (inozitol gerektiren enzim 1) ve transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır. Transmembran ER proteinlerinin N-terminalleri ER şaperone Grp78 (glukoz regule eden protein (78 kDa)) tarafından tutulur ve C-terminus sitozolde bulunur. Katlanmamış proteinlerin birikmesi, transmembran sinyal moleküllerinin salınımını sağlayarak UPR oluşumuna yol açar (Schroder ve Kaufman, 2005; Shen ve ark., 2004). UPR farklı şekillerde gerçekleşir. Bunlardan biri, ökaryotik başlatıcı (initiation) faktör 2a'nın (eIF2a) alfa alt ünitesinin fosforilasyonunu indükleyen ve böylece protein sentezini inhibe eden protein kinaz RNA benzeri ER kinazın aktivasyonudur (Harding ve ark., 2000). Grp78 uzaklaştırılmasından sonra PERK, oligomerize olur ve otofosforilize olarak eIF2a'nın fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna yol açar. Bu, mRNA translasyonunun inhibe edilmesine neden olur ve sonunda ER üzerindeki protein yükünü azaltır (Harding ve ark., 2000).

Diğer bir etki ise, katlanmayan proteinlerin ER ile ilişkili degradasyon tarafından yıkılmasıdır. UPR ayrıca, ER chaperonların, transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), PERK ve inositol gerektiren enzim-1 (IRE1) aktivasyonunu aktive ederek etkisiyle uygun protein katlanmasını sağlar (Haze ve ark., 1999). ER stresi, ATF6'nın proteazlar tarafından yıkılmasına yol açarak çekirdekte ER chaperonlarını aktive eden aktif ATF6 fragmanı p50'nin salınmasına neden olur (Omura ve ark., 2013).

PERK dimerizasyon ve otofosforilasyonu, eIF2a'nın fosforilasyonuna ve inhibisyonuna yol açar ve mRNA translasyonunun başlangıcını azaltır. Bununla birlikte, ER şaperonların transkripsiyonunu aktive eden Transkripsiyon faktörü 4 (ATF4) mRNA'nın translasyonu, fosforile edilmiş eIF2a varlığında artar. IRE1 otofosforilasyonu ve oligomerizasyonu, IRE1 endoribonükleazını aktive eder ve X-

box bağlayıcı protein 1 (XBP1) transkripsiyon faktörünü uyararak ERAD ve protein katlama genlerini düzenler (Lee ve ark., 2003; Omura ve ark., 2013).

Adaptasyon başarılı olmazsa, ER yolları konak (host) savunması ile ilgili bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B aktivasyonunu uyarır. Artmış ve uzamış ER stresi, proteazların, kinazların, transkripsiyon faktörlerinin ve B-lenfoma hücresi 2 (Bcl-2) familyası proteinlerinin aktivasyonu dahil olmak üzere hücrenin apoptotik yollara gitmesine neden olur (Xu ve ark. 2005).

4.4.2. Mitokondriyel fonksiyon bozukluğu

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hem idiyopatik hem de ailesel PH'nın patogenezinde anahtar bir unsur olarak kabul edilir (Moon ve Paek, 2015). PH beyinlerinin SNPC'sinde yapılan erken ölüm sonrası çalışmalar, elektron taşıma zincirinin hayati bir bileşeni olan mitokondriyal kompleks I'in eksik olduğunu bildirmiştir. Bu veriler mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve PH arasındaki ilk doğrudan bağlantılardan birini sağlamıştır (Schapira ve ark., 1990). Kompleks-I eksikliği, sağlıklı deneklere göre PH hastalarının iskelet kası ve trombositlerinde de bulunmuştur (Bindoff ve ark., 1991; Krige ve ark., 1992). MPTP (1-metil-4 fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin) maddesinin kötüye kullanımının kalıcı Parkinson semptomlarına (Elbaz ve ark., 2009) neden olduğu keşfedildikten sonra ortaya çıkan diğer kanıtlar, postmortem incelemede dopaminerjik hücre kaybını ortaya çıkarmıştır (Langston ve ark., 1999). Takip çalışmaları, oksitlendiğinde MPTP'nin DA nöronlar tarafından alındığını ve kompleks-I inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir (Nicklas ve ark., 1985). Rotenon ve paraquat gibi mitokondriyal kompleks-I aktivitesini bozan diğer toksinler ve pestisitler, hayvanlarda ve potansiyel olarak insanlarda da Parkinson fenotipine ve DA hücre kaybına neden olur (Tanner ve ark., 2011). Mitokondriyal kompleks-I'deki kusurlar, enerji tükenmesinden dolayı DA hücre ölümünü yönlendirmede çok önemli olabilir (Moon ve Paek, 2015).

Mitokondrinin PH patogenezindeki rolüne işaret eden diğer bir önemli ipucu, ailesel PH'a neden olduğu bilinen genlerin çoğunun, mitokondriyal homeostazda rol oynadığıdır. Bir örnek olarak, PINK1 ve parkin (sırasıyla PARK2 ve PARK6) genlerinin her ikisi de, mitofaji (Pickrell ve Youle, 2015) olarak adlandırılan bir işlem olan, işlevsiz mitokondrinin çıkarılmasını düzenleyen yolun hayati bileşenleri

olmasıdır. Her iki gende fonksiyon kaybı mutasyonları bozulmuş mitokondriyal kalite kontrolüne neden olur ve otozomal resesif PH'a neden olur (Kitada ve ark., 1998; Valente ve ark., 2001).

Son olarak, α -sinükleinin kendi başına mitokondriyal fonksiyona müdahale ettiği bilinmektedir. Örneğin, α -sinüklein mitokondriyal membranla etkileşime girebilir ve organellerin içinde birikebilir. Bu da kompleks-I aktivitesinin zarar görmesine neden olur ve sonuçta mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stresin artmasına neden olur (Devi ve ark., 2008; Luth ve ark., 2014). Daha yeni bir çalışma oligomerik (ancak monomerik veya fibriller olmayan) α -sinüklein ve mitokondriyal reseptör TOM20 arasında bir etkileşim olduğunu bildirmiştir (Di Maio ve ark., 2016). Bu etkileşim mitokondriyal protein ithalat makinelerinin bozulmasına, solunumun azalmasına ve aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olmuştur.

4.4.3. Kalsiyumun rolü

Kalsiyum iyon (Ca^{2+}) sinyali, nöronal ve glial hücrelerin bakımı için çok önemlidir ve SSS'nin patolojik koşulları, Ca^{2+} homeostazındaki bozukluklarla yakından ilişkilidir. Ca^{2+} 'nın düzensizliğinin hücre sel sinyalleme engellediği ve hücre ölümüne yol açan mitokondriye zarar verdiği öne sürülmüştür (Ludtmann ve Abramov, 2018).

SSS'deki başlıca uyarıcı nörotransmitter olan Glutamat (Glu), zardaki spesifik reseptörlerle etkileşime girer ve öğrenme ve hafıza dahil olmak üzere birçok nörolojik fonksiyonda görev yapar. Bununla birlikte, sürekli glutamat salımı, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin kalıcı aktivasyonuna yol açarak nöronal eksitotoksositeye neden olur. NMDA reseptörlerinin kalsiyumu sodyum ile birlikte taşınmasından dolayı, kalıcı aktivasyonu hücre içi kalsiyum seviyelerini artırır ve bu da kalsiyum homeostazının bozulmasına ve nekrotik hücre ölümüne yol açar (Nguyen ve ark., 2015).

Kalsiyum hemostazının bozulmasının nedeni, membran potansiyeline bağlı mitokondriyal matrikse kalsiyum alımının bir sonucu olarak mitokondriyal gözenek açıklığının uyarılmasıdır (Choi ve ark., 2013). Buna göre, artan hücre içi kalsiyum ile birlikte eksitotoksosite, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı ve PH

(Lau ve Tymianski, 2010) dahil olmak üzere farklı merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarında nörodejenerasyon ile ilgili önemli rollere sahiptir.

Normal olarak arttırılmış sitozolik Ca^{2+} , mitokondri ve ER tarafından tamponlanabilir veya Na^+ (Sodyum iyonu)/ Ca^{2+} değiştiricileri (NCX) ve Ca^{2+} adenozin trifosfataz (ATPase) aracılığıyla hücre dışı boşluğa ihraç edilebilir (Lytton ve ark., 2002). Bununla birlikte PH'da L tipi Ca^{2+} kanalları kendiliğinden aktiftir, yüksek sitozolik Ca^{2+} akışına neden olur (Surmeier ve Schumacker, 2013). Ayrıca α -sinüklein'in, hücre dışı Ca^{2+} geçişine izin veren plazma membran gözenekleri oluşturarak sitozolik Ca^{2+} seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Zakharov ve ark., 2007). Öte yandan, mitokondriyal Ca^{2+} akışının PH'da yaygın bir fenotip olup olmadığı bilinmemekle birlikte, mitokondriyal Ca^{2+} homeostazının PH patolojisinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (Ludtmann ve Abramov, 2018).

4.4.4. Sigma 1 reseptörü (Sig-1R)

Sigma reseptörünün başlangıçta G protein-bağlantılı opioid reseptörlerinin bir alt tipi olduğu öne sürülmüştür (Piao ve ark., 2003). Bununla birlikte, bir dizi daha sonraki deney, sigma reseptörünün nalokson ve GTP'ye (guanozin trifosfat) duyarsız olduğunu doğrulamıştır (Piao ve ark., 2003; Wilke ve ark., 1999) reseptörünün bir alt türü olan sigma-1 reseptörü (Sig-1R), varlığı 1970'lerde ilk kez önerildiğinden beri büyük ölçüde gizemli olmasına rağmen, ligandları çeşitli durumlarda terapötik potansiyel göstermiştir (Piao ve ark., 2003). Hücresel düzeyde, Sig-1R'nin ana eylem bölgesi ER'dir (Su ve ark., 2010). Bununla birlikte, son zamanlarda, mitokondriyal ile ilişkili ER membranı (MAM) olarak adlandırılan ER zarının özel bir alt bileşeninde oldukça zengin olduğu gösterilmiştir (Hayashi ve Su, 2005). Sig-1R ligandları, iyon kanalı aktivitesi, nöronal ateşleme, nöronal farklılaşma, kanser büyümesi ve hücre ölümlü / apoptozis gibi hücresel fonksiyonları ve ayrıca madde bağımlılığı (örn. kokain ve metamfetamin kötüye kullanımı), depresyon, şizofreni, amiotrofik lateral skleroz ve Alzheimer hastalığı gibi nörolojik ve nöropsikiyatrik bozukluklar ile ilgili davranışları modüle eder (Maurice ve Gogvadze, 2017; Mavlyutov ve ark., 2010; Mavlyutov ve ark., 2013; Su ve ark., 2010). Sig-1R ligandlarının benzersizliği, etki tarzlarındadır. Deney hayvanlarında, yalnızca patolojik koşullar altında, özellikle ER veya mitokondriyal stres altında terapötik bir

etki gösterirler ve normal naif hayvanlarda etkisi yoktur (Hayashi ve Su, 2007; Hayashi ve Su, 2004; Maurice ve Gogvadze, 2017; Nguyen ve ark., 2017). Genel olarak fizyolojik veya davranışsal işlevleri normalleştirmek için hareket ederler (Hayashi ve Su, 2004). Sig-1R ligandlarının benzersiz "normalleştirici" etkisi, Sig-1R'nin stres proteini olma ve moleküler şaperon gibi özelliklerine kısmen katkı sağlayabilir.

4.4.4.1. Sigma 1 reseptörünün yapısı

Son çalışmalar Sig-1R'nin ER membranında oligomerler (örneğin trimerler) oluşturduğunu ve bir Sig-1R ligand bağlama cebi yarattığını belirlemiştir (Schmidt ve ark., 2016; Su ve Hayashi, 2003). Kristallografik bir çalışma, Sig-1R'nin, proteinin ortasında tek bir transmembran domainine sahip olduğunu gösterdi, ancak diğer çalışmalar, iki transmembran domaini olan modeller önermiştir (Ortega-Roldan ve ark., 2015; Penke ve ark., 2018; Schmidt ve ark., 2016). Her ne kadar kristallografik çalışma sitoplazmik ortamda lokalize olan C-terminalini önermesine rağmen, biyolojik ve fizyolojik olarak ilgili membranları kullanan son bir çalışma Sig-1R'nin C-terminalini içeren uzun bir ER lümenal domainine sahip olduğunu açıkça göstermiştir (Mavlyutov ve ark., 2017; Schmidt ve ark., 2016) askorbat peroksidaz 2 (yani APEX2) ekli Sig-1R'yi ND7/23 hücrelerinde (fare nöroblastoma hücre hattı) veya dorsal kök ganglion nöronlarında ifade ederek, göstermiştir ki 1) Sig-1R'nin N-terminali, sitozole, C-terminali ER lümene; 2) transmembran alanı, 1-80 arasındaki amino asitler arasında bulunur. C-terminal hidrofobik alanı oligomerlerin oluşumunda rol oynuyor gibi görünmektedir (Schmidt ve ark., 2016). Boyut eleme kromatografisi, Sig-1R ligandlarının Sig-1R oligomerizasyonunda değişikliklere aracılık ettiğini gösterdi (Gromek ve ark., 2014). Bu arada, FRET (Floresans rezonans enerji transferi) çalışmaları ayrıca Sig-1R agonistlerinin ve antagonistlerinin sırasıyla oligomer ayrışması ve stabilizasyonuna neden olduğu yönündeki önceki bulguyu da desteklemektedir (Mishra ve ark., 2015; Yano ve ark., 2018).

4.4.4.2. Sigma 1 reseptörünün nöron korunum etkisi

4.4.4.2.1. ER ve mitokondriyal fonksiyonun modülasyonu

Bir şaperone olarak Sig-1R, UPR'yi modüle eder. Normal koşullar altında Sig-1R, başka bir ER-chaperone BiP (immunoglobulin bağlayıcı protein) ile bir kompleks oluşturan MAM'da hareketsiz durumdadır (Hayashi ve Su, 2010). ER stresi veya ligand stimülasyonundan sonra Sig-1R, BiP'den ayrışır ve UPR'nin 3 ana dalının aktivitesini modüle eder (PERK, IRE1a, ATF6). ER stresi ayrıca Sig-1R ekspresyonunun düzenlenmesi ile de ilişkilidir.

Sig-1R aşırı ekspresyonu, muhtemelen doğrudan protein-protein etkileşimi ile PERK ve ATF6'nın aktivasyonunu azaltarak hücre sağkalımını artırır. Sig-1R'nin düşük aktivitesi, IRE1a'nın konformasyonunu bozar ve hücre sağkalımını azaltır (Mori ve ark., 2013).

Sig-1R ligandları, örneğin mitokondriyal fonksiyonu iyileştirir, örn. agonist N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl) piperazine (BHDP) sıçan karaciğer hücrelerini korumuştur. Bir başka agonist olan SA4503 (1-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-4-(3-phenylpropyl) piperazine dihydrochloride), kardiyomiyositleri iskemik strese karşı korumuştur. Sig-1R agonistleri mitokondriyal solunum ve adenosin trifosfat (ATP) sentezini korudu (Francardo ve ark., 2014; Karch ve Goate, 2015). ER-stres altında Sig-1R, BiP kompleksinden ayrışır, daha sonra doğrudan IP3R3 (inozitol 1, 4, 5-trifosfat reseptör 3) ile etkileşime girer ve yapısını stabilize eder. IP3R3 sırayla Ca^{2+} alımını ve hücre sağkalımını artırır (Hayashi ve Su, 2007).

Sig-1R, mitokondriyi hedef alan pro- ve anti-apoptotik sinyalleri de düzenleyebilir: reseptör aktivasyonu, Bcl-2 ifadesini artırır, yüksek Bcl-2 seviyesi, IP3R (inozitol 1, 4, 5-trifosfat reseptör) ile etkileşime girerek, IP3R aracılı mitokondriyal Ca^{2+} alımını ve ATP üretimini artırır (Rizzuto ve ark., 2009; Yang ve ark., 2007).

4.4.4.2.2. ROS üretiminin zayıflatılması

Sig-1R knockout veya knockdown farelerin dokularında oksidatif hasarda artış olduğu gösterilmiştir (Pal ve ark., 2012). Sig-1R'nin aktivasyonu, muhtemelen ROS-nötrleştirici proteinlerin modülasyonu, antioksidan tepki elementlerinin (NAD(P): kinin oksidoredüktaz 1 (NQO1), süperoksit dismutaz (Wegleiter ve ark., 2014) düzenlenmesi yoluyla ROS birikimini azaltır.

4.4.4.2.3. Ca^{2+} -homeostazi ve glutamat aktivitesi

Sig-1R'lerin aktivasyonu, glutamatın (Glu) eksitotoksik etkisini azaltabilir. Aşırı Glu etkileri iskemik inme ve travma gibi akut olaylar sırasında veya daha hafif olabilir, ancak AD, PD, HD ve ALS gibi kronik NDD'lerde uzayabilir (Rousseaux ve Greene, 2016).

Hücre içi Ca^{2+} homeostazının düzenlenmesi, Sig-1R ligandlarının nöroptoteksiyon gerçekleştirdiği ana mekanizmalardan biridir. (+)- Pentazosin, primer sıçan kortikal nöronlarında toksik glutamat konsantrasyonunda Ca^{2+} -akışını modüle eder (Klette ve ark., 1995). Sig-1R agonistleri, Na-azid - glukoz yoksunluğu iskemisi modelinde hücre içi Ca^{2+} yükselmesini hafifletir (Katnik ve ark., 2006). Sig-1R, IP3R3 reseptörlerinin stabilizasyonu yoluyla mitokondri içine Ca^{2+} girişini teşvik ederek ER Ca^{2+} konsantrasyonlarının normalleştirilmesiyle hücre sağkalımına katılır (Hayashi ve Su, 2007). Sig-1R'lerin belirli şartlar altında aktivasyonu, eksitotoksik hasarın başlıca araçları olan NMDA reseptörlerini inhibe eder (Hazell, 2007; Zhang ve ark., 2011).

4.4.4.2.4. Glial aktivitenin modülasyonu

Sig-1R ligandları, inme ve ALS'nin kemirgen modellerinde reaktif astroglıyozu iyileştirebilir (Ajmo ve ark., 2006; Peviani ve ark., 2014). Benzer şekilde, Sig-1R ligandları, PH ve ALS hayvan modellerinde mikrogial aktiviteyi modüle ederek, hem M1 hem de M2 tipi mikrogial cevapları etkiler (Francardo ve ark., 2014; Katnik ve ark., 2006; Peviani ve ark., 2014). Sig-1R, enflamatuar ve onarıcı mikrogial tepkileri dengeleyerek nöroprotektif ve nöro-onarım etkilere neden olur: ALS model bir hayvanın PRE-084 (2-(4-Morpholinethyl) 1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride) ile tedavi edilmesi, nöronal onarım ile ilişkili glial hücre sayısını arttırdı (Peviani ve ark., 2014).

4.4.5. Voltaj bağımlı anyon kanal proteini (VDAC)

Son yıllarda yapılan araştırmalar, mitokondrinin hücresel enerji üretiminin çok ötesindeki işlevleri olduğu görüşünü geliştirmiştir. Mitokondrinin hücre sinyal olaylarında, organlar arası iletişim, yaşlanma, hücre çoğalması, hastalıklar ve hücre ölümünde çok önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu nedenle mitokondri,

apoptozun (programlanmış hücre ölümü) düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar ve hücre yaşamına veya ölüme yol açan hücrel kararların mekanı olarak hizmet eder. Hücre yaşamını ve ölümünü kontrol eden mitokondrial proteinlerden biri, mitokondriyal porin olarak da bilinen voltaj bağımlı anyon kanalıdır (VDAC). Mitokondriyal dış zarda bulunan VDAC, mitokondriyal metabolitlerin giriş ve çıkışında kapı bekçisi olarak işlev görür, böylece mitokondri ile hücrenin geri kalanı arasındaki etkileşimi kontrol eder. VDAC ayrıca mitokondri aracılı apoptozda anahtar bir oyuncudur. Dolayısıyla, mitokondrinin metabolik ve enerjik fonksiyonlarını düzenlemenin yanı sıra, VDAC'ın, çeşitli ligandlar ve proteinlerle birleşmesinin aracılık ettiği çeşitli hücre sağkalımı ve hücre ölümü sinyallerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Shoshan-Barmatz ve ark., 2010).

4.5. Parkinson Hastalığında Enflamasyonun Rolü

4.5.1. NF- κ B ve NF- κ B aktive eden protein (NKAP)

NF- κ B (Nükleer faktör kappa B), enflamatuvar yanıtlar ve antiapoptotik etkileriyle çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen, birçok yolda tanımlanmış bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B'nin regülasyonunun bozulması, romatoid artrit ve kanser gibi çok çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynar. NF- κ B, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin-1 (IL-1) ve lipopolisakkarid (LPS) gibi farklı uyarıcılar ile aktive edilir. NF- κ B aktive eden protein (NKAP) TNF- α ve IL-1 ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunda son yıllarda tanımlanmış nükleer bir regülatör proteindir. NKAP ekspresyonun baskılanmasının TNF- α IL1 ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2003).

Başlangıçta Chen ve ark (2003) tarafından NF- κ B aktivasyonunun düzenleyicisi olarak tanımlanan NKAP, çeşitli hücrel fonksiyonlara sahiptir. NKAP'ın PTEN veya hücrel metabolizma veya kanserin düzenlenmesi ile bağlantılı olduğu bilinmemektedir. NKAP'ın, PDHK1 (Piruvat dehidrogenaz kinaz 1) ifadesini düzenleyen NF κ B'yi aktive etme kabiliyeti göz önüne alındığında fosfo-proteomik verilerden kaynaklanan PTEN efektör adayı olarak NKAP'a öncelik verilmiştir.

PH'a neden olan hastalık mekanizmaları iyi anlaşılmamasına rağmen, son yıllardaki çalışmalar bu hastalıktaki nigrostriatal dejenerasyonda inflamasyonun rolünü kuvvetle desteklemektedir (Dauer ve Przedborski, 2003). Bu çalışmalardan bazılarında nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlara erken müdahalenin hastalık insidansını yavaşlattığı gösterilmiştir. Ayrıca, önemli mikrogial aktivasyonun hasar görmüş veya ölmekte olan dopaminerjik nöronlara yakın bölgelerde gerçekleştiği gösterilmiştir (Ghosh ve ark., 2007).

Proinflamatuvar moleküllerin promotör bölgeleri, NF- κ B için DNA bağlanma bölgesini içerir. Ayrıca, NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu, proinflamatuvar moleküllerin indüksiyonunu azaltır. Bu sonuçlar, NF- κ B'nin inflamasyonun önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. NF- κ B regülasyonunun Parkinson hastalığında da önemli olduğu düşünülmektedir. Mikrogial hücrelerin aracılık ettiği kronik inflamasyon, beyinde dopamin üreten nöronların ölümüne katkıda bulunan temel süreçtir. Bu mikrogial hücreler tarafından enflamatuvar ürünlerin üretimi, PH'de gelişen yavaş ve yıkıcı süreci karakterize eder. NF- κ B, inflamasyonda kritik 200'den fazla genin ekspresyonunu ve mikrogial hücre içindeki immün tepkisini kontrol eden bir proteindir ve NF- κ B'nin ekspresyonunu inhibe etmeyi amaçlayan tedavilerin, PH'nin ilerlemesinin yavaşlatılmasında başarılı olacağına inanılmaktadır (Hayden ve Ghosh, 2008).

4.5.2. Tümör nekroz faktörü

İlk olarak yağ dokuda makrofajlardan elde edildiği tanımlanan TNF- α , immün işleyişi düzenleyen çok fonksiyonlu bir sitokindir. Tnf- α işlevlerini Tip 1 ve Tip 2 TNF- α reseptörleri üzerinden gösteren 26 kDa ağırlığında bir serum proteindir. En önemli üretim yerleri; T lenfositler, uyarılmış makrofajlar ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerdir. Az miktarda ise düz kas hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve kanser hücrelerinde üretilirler (Naylor ve ark., 1993).

TNF- α salgı proteini olmasının yanı sıra transmembran proteini olarak da üretilir ve homotrimerik yapıya sahiptir (Li ve ark., 2000). TNF- α kompleks işlevleri olan bir sitokindir. TNF- α 'nın bölgesel salınımı akut hastalık durumlarında vücut için yararlıdır. Bu faydasını vasküler endotel tabakasındaki adhezyon proteinlerinin

yapımını artırarak, nötrofil ve makrofajlar başta olmak üzere bağışıklık hücrelerinin enfekte olmuş veya doku tahribatına uğramış bölgeye göçünü sağlayarak gösterir.

Ayrıca TNF- α fagositleri uyararak onların patojenleri ve yıkım sonrası oluşan hücre parçalarını yok etmelerine aracı olur. Bunların yanı sıra yüksek konsantrasyonda TNF- α 'ya uzun süre boyunca maruz kalmanın sonucunda ciddi hasarlar oluşabilir. Yüksek TNF- α miktarının toksik şok ve travma hastalarında metabolizma hasarı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2000).

TNF- α , reseptörleri ile bağlantı kurduğunda iki farklı sinyal iletim mekanizmasını uyarılabilir: Birincisi NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa B) aktivasyonudur. NF- κ B hücre çoğalması, hücre canlılığı, bağışıklık sistemi, apoptoz ve farklı proteinlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B hematopoietik hücrelerin ya da solid tümörlerin gelişmesinde görev alır. Sağlıklı hücrelerde NF- κ B aktif değildir. Kanser hücrelerinde NF- κ B'nin inhibe edilmesinin hücre döngüsünü durdurduğu ve hücreyi apoptoza götürdüğü saptanmıştır. TNF etkisi ile NF- κ B'nin inhibitörünün yıkımı sağlanarak, NF- κ B aktivasyonu gerçekleştirilir (Bharti ve Aggarwal, 2002).

4.5.3. Toll benzeri reseptör 4a

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ilk olarak *Drosophila*'daki protein içeriğinde tanımlanmıştır. Daha sonra, mikrobiyal enfeksiyona karşı doğal bağışıklığın sağlanmasındaki önemi kabul edildi ve TLR4, TLR ailesinde ilk tanımlanmış memeli homologudur. Kazanılmış immünitinin aksine, doğal immünite, patojenik istilaya karşı ilk savunma hattıdır. TLR üyeleri çoğunlukla astrositler ve nöronlardan ziyade mikroglia da ifade edilir. TLR4, sıklıkla mikroglia da ifade edilmesine rağmen, bakteriyel LPS'ye cevap olarak astrositler ve nöronlarda da üretilir (Li ve ark., 2000; Wright, 1999).

Enflamatuvar belirteçler üzerine yapılan çalışmalarda, TLR'lerin yaşlanma ile ilgili nörodejeneratif hastalıklarda yer aldığını göstermiştir. Nöronal fonksiyon bozukluğu durumunda, farklı proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler, ayrıca çeşitli reaktif oksijen türlerini açığa çıkaracak şekilde bazı hücre içi sinyal kaskadını

başlatırlar. Nöronlara ek olarak, mikroglia ve astrositler de bu sinyal kaskadından etkilenir. Bu süreç, hücrenin hayatta kalması için faydalı, etkisiz veya zararlı olabilir. TLR'ler, her ikisi de nöroenflamasyondan sorumlu olan ve farklı yaşa bağlı nörolojik koşulların patogenezi ile bağlantılı olan NF-B ve pro-IL-1 β 'yi (pro-interlökin 1 β) aktive etmek için aşağı akış yolunu aktive eder.

TLR4 ayrıca farklı hayvan modellerinde beyinde TNF- α , IL-1 β ve interlökin-6 (IL-6) üretimi gibi enflamatuvar sitokinlerin uyarılmasının yanı sıra, NF- κ B'nin glial hücre ekspresyonu ve aktivasyonunda da önemli bir rol oynar. Hem TLR2 hem de 4 sinyali, glial hücrelerin ve diğer enflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunda rol oynar ve beyindeki enflamasyonda etkilidir (Teng ve ark., 2009).

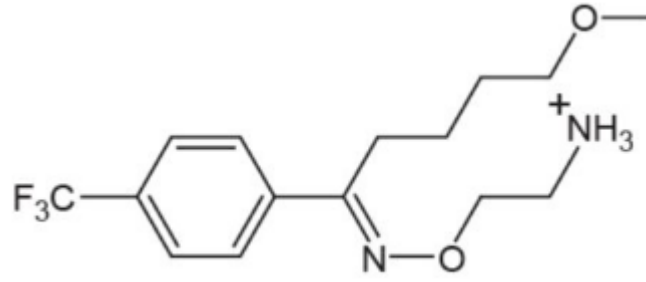
4.5.4. Interlökin 21

İnterlökin-21 (IL-21), esas olarak T hücreleri ve doğal öldürücü T (NKT) hücreleri tarafından üretilen pleiotropik bir tip I sitokindir. Bu sitokin, CD4⁺ ve CD8⁺ yardımcıT hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler (DC'ler) dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere çok çeşitli hücre tipleri üzerinde farklı etkilere sahiptir.

IL-21 stimülasyonu, immün yanıtların indüklenmesine veya baskılanmasına neden olabilir, bu nedenle IL-21 ile ilişkili immünoterapötik ajanların klinik kullanımı sırasında IL-21'in hem uyarıcı hem de bastırıcı etkilerinin göz önünde bulundurulması gerekir. IL-21'in biyolojik etkileri ayrıca mikro-ortamdaki diğer sitokinlerin veya sinyal moleküllerinin varlığından da etkilenir.

4.6. Fluvoksamin

Ticari isim olan Lovox olarak bilinen Fluvoxamine, seçici bir seratonin (5-HT) geri alım inhibitörüdür (SSRI) (Coleman ve Block, 1982; Hashimoto ve ark., 2007) (Şekil 1). Bir antidepresan olarak, fluvoksamin, şizofreni ve majör depresif bozukluk gibi nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Dalle ve ark., 2016; Dalle ve Mabandla, 2018; Niitsu ve ark., 2012).



Şekil 1. Fluvoksamin'in yapısı

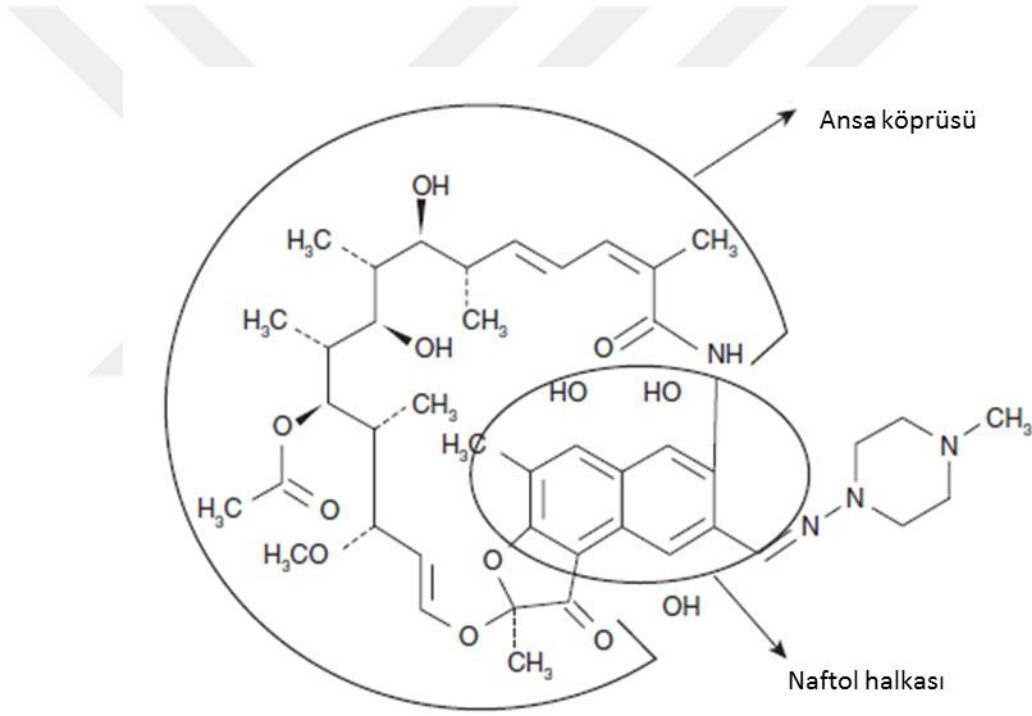
Ek olarak, bu ilaç, hücre fonksiyonunun düzenlenmesi ve hayatta kalma, nörotransmitter salınımı, kalsiyum sinyalleme, iltihaplanma, endoplazmik stres, mitokondrial stres, sinaptogenez de dahil olmak üzere birçok sinir mekanizmasında yer alan sigma-1 reseptöründe (Sig-1R) (Hashimoto ve ark., 2007) agonist aktivite sunar (Hall ve ark., 2009; Maurice ve Su, 2009; Nguyen ve ark., 2017; Su ve ark., 2010; Urani ve ark., 2002). Sig-1R, özellikle mitokondriye bağlı ER membranlarında bulunan ve beynin hücresel farklılaşması, nöroplastisitesi, nöron korunumu ve beynin kognitif çalışması ile ilişkili olduğu düşünülen ligand-düzenlenmiş (ligand-regulated) endoplazmik retikulum şaperondur (Hayashi ve Su, 2007; Marrazzo ve ark., 2005; Maurice ve Gogvadze, 2017; Takebayashi ve ark., 2004). Fluvoxamin'in nöronları korumak için hem motor hem de motor olmayan komplikasyonlarda etkili olabileceği düşünülmektedir. Fluvoxamine, nörotransmitter serotonini bağlayan ve inhibitör nörotransmisyonu aracılık eden 5-HT1A reseptörü ile L-DOPA'nın (L-3,4-dihidroksifenilalanin) neden olduğu motor karmaşıklıklarını koruyabilir (Ichimaru ve ark., 1995). Ayrıca, 6-OHDA (L-dihidroksifenilalanin) ile indüklenmeden önce fluvoksamin ile muamele edilmesinin, anksiyete benzeri davranış sergileyen bir Parkinson sıçan modelinde dejenerasyonu sağlayan DA nöronlarında hassasiyetin azaldığı ve Parkinsonian non-motor problemleri hedefleyerek DA nöronlarının korunabileceği gösterilmiştir (Dalle ve ark., 2016).

Fluvoxamine ayrıca nöronlar üzerinde antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere sahiptir (Dalle ve ark., 2017). Maternal olarak ayrılmış sıçanlar ile çalışılmış bir çalışmada, fluvoksamin maruziyeti sonrası stresli sıçanın prefrontal korteksindeki lipid preoksidasyon seviyelerinin azaldığı, antidepresanlar üzerine yapılan diğer

çalışmalarda stresli hayvanlarda oksidatif stresi azalttığını göstermesi çalışmalarıyla tutarlıdır (Dalle ve ark., 2017).

4.7. Rifampisin

Rifampisin, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve *Nocardia mediterranei*'nin fermentasyon ürünlerine aittir (Acocella, 1978; Chao ve ark., 1996; McGeer ve McGeer, 2013; Mindermann ve ark., 1993; Yulug ve ark., 2014). Rifampisin, esasen ilacın beyin parankimine BBB boyunca taşınmasından sorumlu olan bir lipofilik alifatik ansa zinciri (Tomiya ve ark., 1996) (şekil 1) tarafından yayılan bir nafto-hidrokinon kromoforundan oluşur (Acocella, 1978; Mindermann ve ark., 1993).



şekil 2. Ansa köprüsü ve naftol halkasını içeren rifampisinin yapısal formülü (Campbell ve ark., 2001)

Rifampisin, uygulamadan 1-4 saat sonra maksimum serum konsantrasyonuna ulaşır ve plazma yarı süresi 2-5 saattir (Acocella, 1978; Mindermann ve ark., 1993). Geleneksel anti-enfeksiyöz etkisinin ötesinde, rifampisin ayrıca çeşitli deneysel çalışmalarda önemli nöroprotektif etki de sergiler. Rifampisinin

nöroprotektif etkisi, Parkinson hastalığı ve multisistemik atrofi dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda gösterilmiştir. Altta yatan etki mekanizması, artmış dopaminerjik hücre sağkalımı, azalmış alfa sinüklein toksisitesi ve kritik sitoprotektif şaperon ve anti-apoptotik proteinlerin (yani, glikoz düzenleyici protein 78 ve Bcl-2) modülasyonu yoluyla mitokondriyal ve endoplazmik retiküler stresin stabilizasyonu ile ilişkili olan MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinyum) kaynaklı apoptozu içerir (Bi ve ark., 2011; Li ve ark., 2004; Li ve ark., 2014; Lin ve ark., 2017; Low ve ark., 2014; Ubhi ve ark., 2008). Ayrıca, rifampisin serbest radikal hasarını hafifletebileceğini ve nihayetinde önemli nöroprotektif etkiyle sonuçlanan nöroinflamasyonu azaltabildiğini gösteren hızla yinelenen kanıtlar vardır (Kilic ve ark., 2004). Örneğin, son zamanlarda yapılan bir çalışma, rifampisinin, Parkinson hastalığında rifampisinin potansiyel anti-enflamatuvar rolünü destekleyebilen nükleer faktör-kappa B'yi baskılayarak, toll benzeri reseptör 2'yi (TLR2) ve mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK) azaltabileceğini göstermiştir (Bi ve ark., 2013; Bi ve ark., 2011; Kim ve ark., 2009).

Rifampisin, Mycobacterium tuberculosis ve diğer mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılan bir makrosiklik antibiyotiktir [8]. Çeşitli hastalık modellerinde nöroprotektif etkilere yol açtığı bildirilmiştir (Cummings, 2004; Estus ve ark., 1997; Hardy ve Higgins, 1992; Philipson ve ark., 2010). Epidemiyolojik çalışmalar, rifampisin kullanan leprozili hastaların, demans insidansının anlamlı derecede düşük olduğunu ve rifampisin olmayanlara kıyasla amiloid-beta birikiminin azaldığını göstermiştir (Estus ve ark., 1997; Hardy ve Higgins, 1992). Kilic ve arkadaşları (Kilic ve ark., 2004) rifampisinin, MPP⁺ zehirlenmesinden sonra dopaminerjik nöronlarda sağkalımların kontrol kültürlerine kıyasla anlamlı şekilde arttırdığını bulmuşlardır. Rifampisin kan-beyin bariyerinden geçebilir, bu nedenle periferik uygulama terapötik etkiler oluşturmak için yeterlidir. In vivo çalışmalar, rifampisinin, fare beyinlerinin nigrostriatal dopamin nöronlarında MPTP ile indüklenen nörodejenerasyonu azalttığını göstermiştir (White ve ark., 2005).

4.8. Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modeli

Rotenoidler ailesinden bir kimyasal olan Rotenon, deneysel PH modellerini uyarmak için en çok kullanılan kimyasallardan biridir. Rotenoidler, çeşitli bitkilerin

gövdelerinde, tohumlarında ve köklerinde kendiliğinden oluşan doğal sitotoksik kimyasallardır (Bové ve ark., 2005; Xiong ve ark., 2012). Rotenon su ve toprakta kolayca bozulur, ortamda yarılanma ömrü 1-3 gündür. PH oluşum olasılığı rotenona maruz kalma ile çok düşüktür. Rotenon, insanlar tarafından yalnızca oral yoldan kullanıldığında PH'ye neden olabilir. Rotenon bağırsaklardan tamamen emilmesine rağmen, karaciğer tarafından yavaşça metabolize edilir (Bové ve ark., 2005).

Rotenonun lipofilik yapısı, kan beyin bariyerini kolayca geçmesini ve organellerde birikmesini sağlar. Hücrede mitokondriyel kompleks I'ı ve proteosomal aktiviteyi inhibe eder ve ROS oluşumuna neden olur (Hisahara ve Shimohama, 2010). MPTP'den farklı olarak, rotenon, a-syn fibrillerinin oluşumunu indükler (Xiong ve ark., 2012). Yüksek doz rotenona maruz kalan fertilizasyondan sonra 24 saatte embriyo fenotiplerinde bozulmalar bildirilmiştir. Maruziyetin dördüncü gününden sonra, larva ölümüne neden olan etkiler çok şiddetli hale geldi (Bretaud ve ark., 2004). Rotenon, a-syn birikimine neden olur ve yakın zamanda yapılan çalışmalar PARKIN ve PINK1 geninin silinmesini, DJ-1 geninin susturulmasının ve a-syn'in aşırı ekspresyonunun, rotenon kaynaklı toksisiteyi arttırdığını göstermiştir (Franco ve ark., 2010).

Rotenon maruz kalan yetişkin zebra balıklarında, azalmış motor fonksiyon ve dopamin seviyesi ve bozulmuş olfaktör fonksiyon gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Zebra balığı embriyoları rotenona maruz kaldığında, ventral diensefalonda azalmış dopamin miktarı ve diensefalonda artan oksidatif hasar belirteçleri ve apoptotik aktivite bildirilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü

Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamızda Boğaziçi Üniversitesi'nden temin edilen ve ZEBTEC akvaryum sisteminde barındırılan yetişkin yabani tip AB suşu zebra balıkları deneylerimizde kullanılmıştır. Zebra balıkları bilgisayar kontrollü ZEBTEC akvaryumda barındırılmıştır (Resim 1). Günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak sirkadiyen ritimleri oluşturulmuştur. Sıcaklık ve nem sırasıyla 28 ± 1 °C ve %61 olarak ayarlanmış ve otomasyon sitemle sabit tutulmuştur. Sistemin suyunun pH'sı 6,9-7,2 arası ayarlanmış ve sabit tutulmuştur. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon sistemi ile balıkların ortam temizliği sağlanmıştır. Günde iki kez kuru yem ve bir kez de canlı yem ile toplam üç kez beslenmişlerdir.



Resim 1. ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi

5.2. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 1’de verilmiştir.

Vortex	V-1 PLUS, Biosan
Santrifüj	Sigma 1-16K, Sigma
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
RT-PCR	Rotor Gene-Q, Qiagen
DNA-RNA izolasyon cihazı	QIAcube, Qiagen
Homojenizatör	Tissuelyser LT, Qiagen
Buzdolabı	İndesit TAA 12 V
Akvaryum	Zebtec mini sistem
pH metre	Hanna HI 2211
Magnetik karıştırıcı	Witeg Wisd Hotplate Stirrer MSH
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Otomatik pipetler	Rainin
SDS-PAGE Jel Sistemi	Mini-Protean Electrophoresis System, BioRad
Blotlama Sistemi	Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad
Jel Görüntüleme Sistemi	ChemiDoc XRS+, BioRAD

5.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullandığımız maddeler analitik saflıktadır. Sigma, Merck, Fisher Bioreagents, Acros, Biovision, TRC Canada ve Bio-Optica firmalarından tedarik edilmiş ve kullanılmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Süt Tozu	LabScientific, M-0841
TEMED	Fisher Scientific, BP150-100
Amonyum Persülfat	Fisher Scientific, BP179-100
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific, 78505
β -merkaptoetanol	Sigma A., M6250
Glycine	Sigma A., 50046
Tris-Base	Sigma A., 10708976001
Sodyum Chloride	Sigma A., S7653
Tween-20	Sigma A., P9416
SDS	Sigma A., 71725
RNA İzolasyon Kiti	Qiagen, 74104
cDNA Sentez Kiti	Qiagen, 330404

Tablo 2. Deneylerde kullanılan kimyasallar (devam)

Anti-Sigma-1R Antikoru	Abcam, ab151288
Anti-PARK7/DJ1 Antikoru	Abcam, ab11251
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam, ab6789
NKAP Polyclonal Antibody	Thermo Scientific, PA5-70748
Mitokondri İzolasyon Kiti	Thermo Scientific, 89801
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad, 1705060
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10%	BioRad, 1610183
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	BioRad, 1704270
Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate	Sigma A., S3401
iBright™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, LC5615
Rabbit polyclonal, antiserum 1, N-terminal Peptide	Synaptic Systems 128 002
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam, ab6721
Rotenon	Sigma A., 45656
Fosfat Tampon Tuzu Tablet (PBS)	Sigma A., P4417
Rifampisin	Sigma A., R3501
Fluvoksamin Maleate	Sigma A., F2802
Tricaine	Sigma A., A5040

5.4. Maruziyet Uygulanması

Yetişkin Zebra balıklarında maruziyet grupları;

- ✓ Kontrol (K)
- ✓ Rotenon (2 mg/kg)
- ✓ Rotenon (2 mg/kg) +Rifampisin (20 mg/kg)
- ✓ Rotenon (2 mg/kg) +Fluvoksamin (20 mg/kg)

Maruziyet gruplarındaki balıklar sistem suyu bulunan tanklarda her grupta 20 hayvan olacak şekilde barındırılmıştır. Tanklarda akvaryumlarında yaşadıkları ortamı oluşturmak için sistem suyu kullanılmış ve gerekli oksijen pompaları bağlanmıştır.

Rotenon ve rifampisin kimyasalları sıvı yağ (Yudum marka) içerisinde, fluvoksamin ise distile suda çözünmüştür. Kimyasallar hayvanlara karın içi enjeksiyon ile verilmiştir (Resim 2). Enjeksiyon öncesi 4mg/ml Tricaine solüsyonu içerisinde anestezi yapılmıştır. Hayvanların enjeksiyondan minimum oranda etkilenmeleri için insülin enjektörü kullanılmıştır.

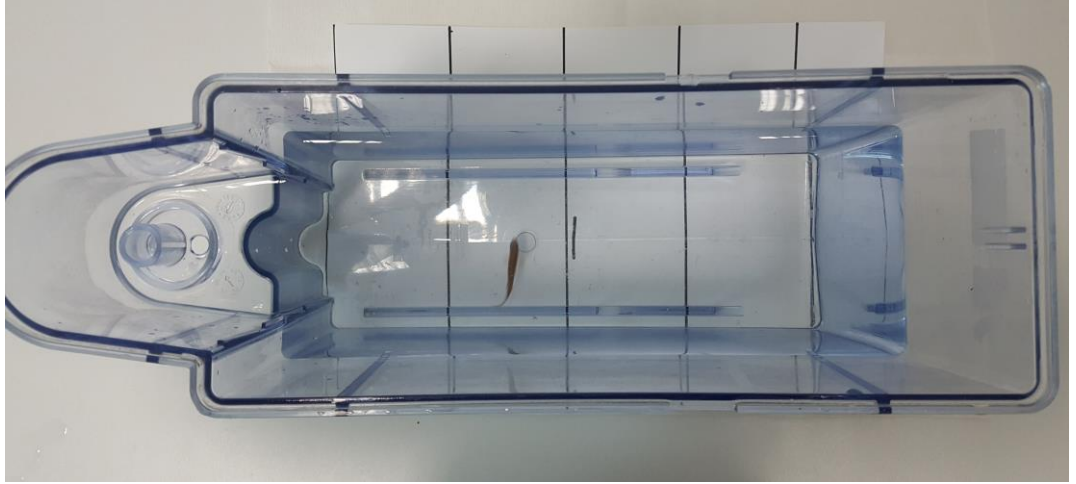
Haftada iki kez olmak üzere su değişimi yapılmış ve iki günde bir su içindeki atık maddeler pipet ile toplanarak temizlenmiştir. Maruziyet süresi 3 hafta olarak uygulanmıştır. Kontrol grupları ise 2 hafta boyunca herhangi bir maruziyete bırakılmaksızın sistem suyunda tutulmuştur.



Resim 2. Zebra balıklarında karın içi enjeksiyon

5.5. Lokomotor Aktivite Testi (Bretaud ve ark., 2004)

Maruziyet sonrasında her gruptaki balıklara hareketliliklerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek için lokomotor aktivite testi uygulanmıştı. Bu amaçla boyutları (25 cm x 9 cm x 6,25 cm) ve hacmi (1,5 L) olan tank kullanılmıştır. Bu tankın alt kısmına görülebilecek şekilde eşit uzaklıkta (6,25 cm) dik çizgiler çizilerek 5 dk boyunca Zebra balıklarının hareketleri izlenmiştir ve geşitikleri çizgiler sayılmıştır (Resim 3). Zebra balıkları izleme tankına alındıklarında sakinleşmesi için bir süre beklendikten sonra süre başlatılmıştır.



Resim 3. Lokomotor aktivite testi

5.6. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR)

Maruziyet sonrası gen ifadeleri analizi için çıkarılan beyin dokuları (her gruptan 5 adet) RLT Lizis tamponu içinde homojenize edilmiştir (Tissue lyser, Qiagen). Bu homojenatlardan mRNA (mesajcı ribonükleik asit) elde edilerek tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi yapılmış ve daha sonrasında *gamma sinüklein*, *sigma-1*, *vdac*, *nkap*, *pink1*, *dj-1*, *lrrk2* ve *beta aktin 1 (actb1)* ifade düzeyleri RT SYBR Green kiti (Qiagene, Almanya) kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagene, Almanya) ile analiz edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 2. Gen ekspresyon düzeyleri ölçülen genlere ait primer dizileri

RT-PCR Analizi Yapılan Genlerin Primer Dizileri 5-->3	
<i>gamma sinüklein</i>	F: GAGACTATGGTCGCCTCTGC
	R: CTATATGTGGCGCGTGAGGT
<i>sigma-1</i>	F: TTTGTGGGCAACTTGCGATG
	R: AACGACCTGAATGTCCACCG
<i>vdac</i>	F: TTACCAGCGCGAGCACATTA
	R: CTCTCTGGGAAAGTGAGCCG
<i>nkap</i>	F: CGAGGTCAAGGGAAAGGGAC
	R: TCGCGATGAAGGCTTCTTGT
<i>pink-1</i>	F: GGGAAAGGTTGTAACGCAGC
	R: GCTTGTGGGCATGAAGGAAC

RNA izolasyonu için, beyin dokuları RLT lizis tamponu eklenerek homojenize edilmiştir. Daha sonra lizata etanol eklenerek RNA'nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli koşullar sağlanmış ve örnekler RNeasy spin kolonuna aktarılmıştır. Total RNA membrana bağlandığında kontaminantların da yıkanması ile RNA elüsyonu RNase-free su içinde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma, yıkanma ve elüsyon işlemleri Qiacube (Qiagen) izalasyon cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, RT2 First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan örnek hazırlama protokolü aşağıdaki gibidir.

5.6.1. cDNA sentezi

- 1) İzole edilen RNA örnekleri ve diğer bileşenler buz üzerinde çözündürülür ve kullanmadan önce hassas şekilde vortekslenir.
- 2) Her gen için Tablo 4'te belirtilen şekilde karışım hazırlanır.

Tablo 3. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (I)

Bileşenler	Miktar
Total RNA	5 µl
dNTP karışımı (10mM)	1 µl
Nükleaz-free Su	9,5 µl

- 3) Karışım 5 dakika boyunca 65°C'de ve ardından 1 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilip, kısa bir santrifüj edilir.
- 4) Her gene ait karışımın üzerine Tablo 5'de belirtilen bileşenler eklenir.

Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler (II)

Bileşenler	Miktar
5X RT Buffer	4 µl
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0,5 µl
OneScript® Plus RTase (200 U/µl)	1 µl

- 5) Karışımı hassas şekilde vorteksleyip, kısa santrifüj sonrası 15 dakika 50°C'de inkübe edilir.
- 6) Reaksiyonu sonlandırmak için karışım 5 dakika 85°C'de inkübe edilir.

5.6.2. RT-PCR analizi

- 1) BrightGreen 2X qPCR MasterMix, cDNA, primerler ve nükleaz-free su buz üzerinde eritilir.
- 2) Tablo 6’da belirtildiği üzere toplam reaksiyon miktarı 10 µl olacak şekilde bileşenlerin uygun miktarları ile karışım hazırlanır.

Tablo 5. RT-PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
BrightGreen 2X qPCR MasterMix	5 µl
İleri (F) Primer (10 µM)	0,3 µl
Geri (R) Primer (10 µM)	0,3 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz-free Su	3,4 µl

- 3) Karışım hazırlandıktan sonra pipetleme yöntemi ile karıştırılıp, spin yapılır.
- 4) Karışımlar Rotor-Gene Q cihazına yerleştirilip Tablo 7’de belirtilen döngü serilerinde reaksiyon gerçekleştirilir.

Tablo 6. RT-PCR döngü ayarları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Tutunma/Uzama	60°C	60 sn	

Housekeeping gen olarak *actb1* kullanılmıştır. Örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

5.6.3. Delta delta C_t (Eşik döngü sayısı) metodu ile veri analizi

Verilerin analizi house keeping gen *actb1* ile normalizasyona dayalı delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metodu kullanılarak yapılmıştır.

Bu yöntem ile PCR’da belirlenen eşik değeri döngü sayısı (threshold cycle number = C_t), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırılır. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki C_t değeri farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip $\Delta\Delta C_t$ oranı belirlenerek bulunur. “Housekeeping” genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler. Bu amaçla kullanılan gen bölgeleri arasında β -aktin, albumin, β -globin, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Karşılaştırmalı C_t metodu aynı zamanda $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$ olarak bilinmektedir (Yuan ve ark., 2008).

$$[\Delta\Delta C_t] = [\Delta C_t, \text{örnek}] - [\Delta C_t, \text{referans}]$$

Bu formülde $[\Delta C_t, \text{örnek}]$, ilgilenilen örneğe ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değeri farklılığıdır. $[\Delta C_t, \text{referans}]$ ise kontrole ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değeri farklılığıdır (Yuan ve ark., 2008).

5.7. Western Blot Analizi

Her gruba ilişkin NKAP, gamma (γ)-sinüklein, PARK-7 ve Sig-1R proteinlerin western analizi için her gruptan 3 beyin dokusu “M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent” kullanılarak homojenize edilmiştir ve total protein elde edilmiştir. Toplam protein miktar ölçümleri Qubit Protein Assay Kit ile yapılarak, SDS-PAGE için her örnekten kuyucuk başına 30 μ g olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Analiz edilen proteinlerin miktar karşılaştırmaları için Aktin-Beta kontrol proteini kullanılmıştır. Western blot analizi için yapılan işlemler şöyledir:

1. Örnekler %10’luk SDS-PAGE ile yürütülmüştür. Yürütme sırasında Thermo-LC5615 kodlu protein marker kullanılmıştır.
2. Yürütme bittikten sonra jeller 3-5 dakika ddH₂O’da (duble distile su) yıkanır.
3. Stack kağıtları ve nitrosellüloz membran transfer tamponunda 5 dakika inkübe edilir.
4. Transfer kasedi üzerinde Stack → Membran → Jel → Stack sırası gözetilerek sandviç yapılır. Bu sırada her kat yerleştirildikten sonra hava kabarsığı kalmaması için merdane ile üzerinden geçilir ve çıkan tampon çözelti kaset kapatıldıktan sonra eğilerek akıtılır.
5. Transfer işlemi 1,3 amper, 5 volt’da 5 dakika yapılır.

6. Transfer sonrası membran, TBS-T (%0,1 Tween 20 içeren Tris tamponu, pH 7,6) çözeltisinde 5 dakika çalkalanır.
7. TBS-T çözeltisi dökülüp, %5 süt tozu ile membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında karışır halde inkübe edilir.
8. Uygun konsantrasyonda hazırlanmış olan pirmer antikorların 10 ml'si ile +4°C'de gece boyu karışır şekilde inkübe edilir.
9. Membran 3 tekrarlı olmak üzere 5 dakika TBS-T ile yıkanır.
10. Uygun konsantrasyonda hazırlanmış sekonder antikorların 10 ml'i ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.
11. İnkübasyon sonrası 3 tekrarlı olacak şekilde 5 dakika TBS-T ile membranlar yıkanır.
12. Membran görüntüleme için, ECL solüsyonunun uygun oranları ile 5 dakika inkübe edilir.
13. Membran görüntülenir.

Sig-1R, PARK-7, NKAP için kullanılan primer antikorlar, 1/500 oranında kullanılmıştır. Gamma-sinüklein için kullanılan primer antikor, 1/200 oranında kullanılmıştır. Sekonder antikorların oranı ise 1/3000 olarak hazırlanmıştır.

5.8. Mitokondri İçi Kalsiyum Ölçümü

Maruziyet sonrası mitokondri içi kalsiyum seviyelerinin değişip değişmediğini analiz etmek için her gruptan 4 beyin olacak şekilde mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Mitokondri içi kalsiyum tayini için, izole edilen mitokondriler %10 Tween 20 içeren 1 ml serum fizyolojik içerisinde süspanse edilip, 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. İçerisinden 50 µl alınarak protein miktar tayini yapıp, dokular arasında miktar farkı hakkında bilgi edinilmiştir. Kalan homojenezat 1/200 oranında %0,05 TritonX içeren %0,2 Nitrik asit çözeltisi ile seyreltilmiştir. Kalsiyum ölçümü ICP-OES yöntemi ile kalsiyumun 317,933 nm dalga boyu ölçümü kullanılarak yapılmıştır.

5.9. İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi One Way Anova sonrası Post Hoc Tukey Çoklu Karşılaştırma Analizi kullanılarak Graph Pad 7 İstatistik programı ile yapılmıştır.

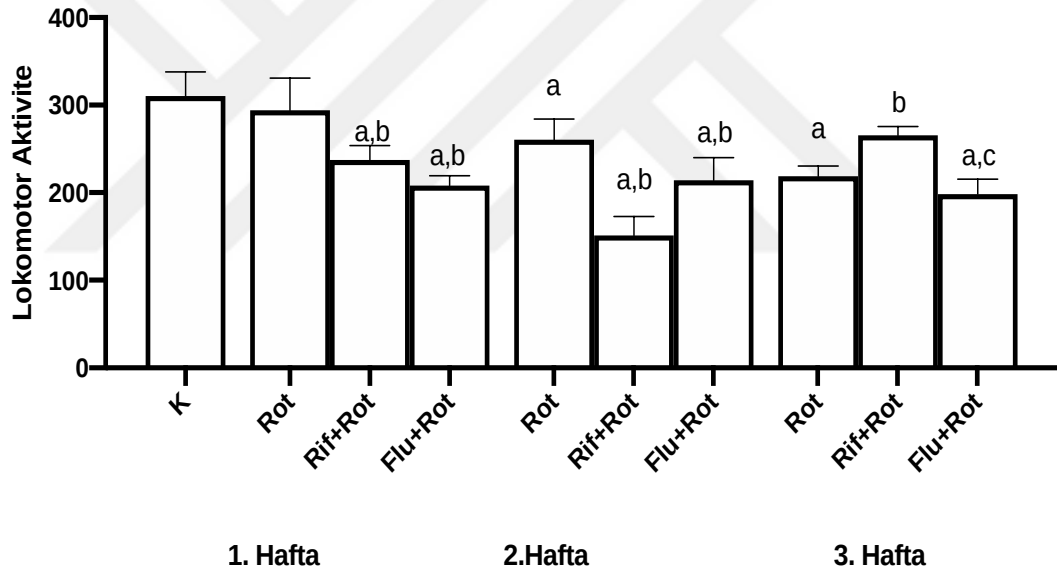
Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma şeklinde verilmiş, $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.



6. BULGULAR

6.1. Grupların Lokomotor Aktivite Sonuçları

Grupların lokomotor aktivite analizi sonuçları Şekil 3'te gösterilmiştir. Rotenon grubunda lokomotor aktivite 2. ve 3.hafta sonunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Rif (Rifampisin)+Rot (Rotenon) ve Flu (Fluvoksamin)+Rot gruplarında 1. ve 2. hafta sonunda Rot ve K gruplarına göre lokomotor aktivite azalmıştır ($p<0,05$). 3. Hafta sonunda Rif+Rot grubunda lokomotor aktivite Rot grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).



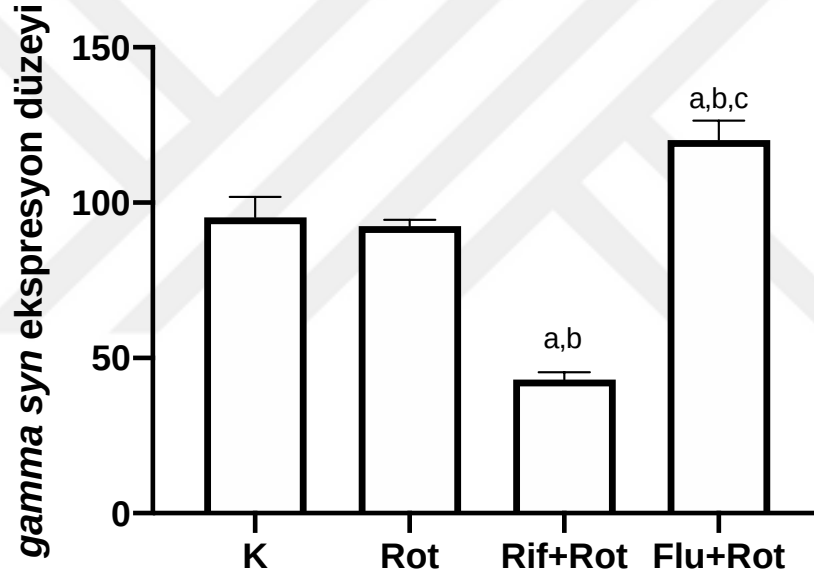
Şekil 3. Kontrol ve maruziyet gruplarının lokomotor aktivite analizi sonuçlarının karşılaştırması grafiği. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a,b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2. RT-PCR Ekspresyon Analizi Sonuçları

6.2.1. Parkinson ilişkili genlerin RT-PCR Analizi

6.2.1.1. *gamma syn* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *gamma syn* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 6'de gösterilmiştir. Rif+Rot grubunda *gamma syn* ekspresyon düzeyi Rot grubuna göre anlamlı derecede azalmış, Flu+Rot grubunda ise Rot grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

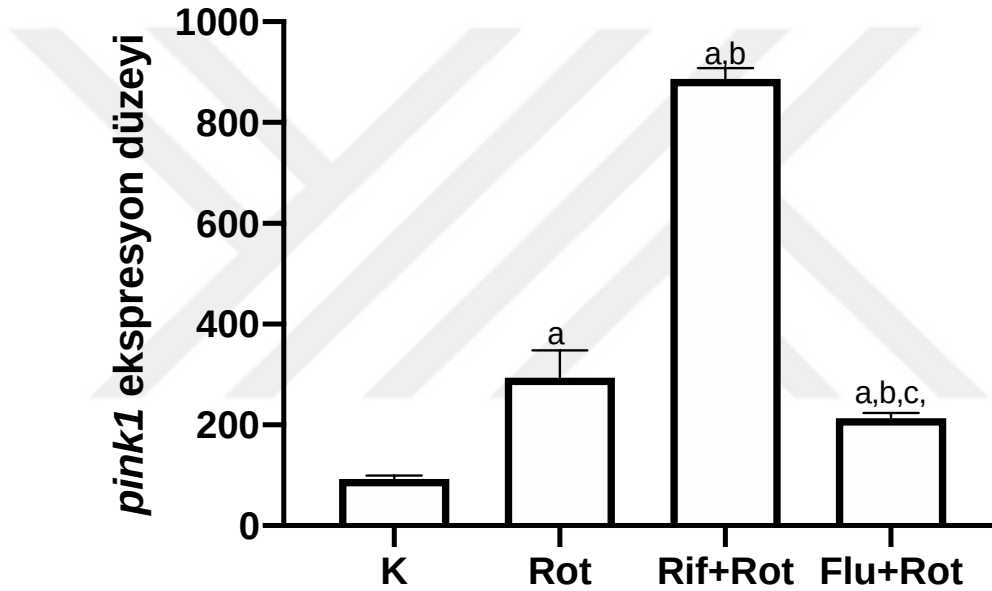


Şekil 4. Kontrol ve maruziyet gruplarının *gamma syn* mRNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2.2. Oksidatif stres ilişkili genlerin RT-PCR Analizi

6.2.2.1. *pink1* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

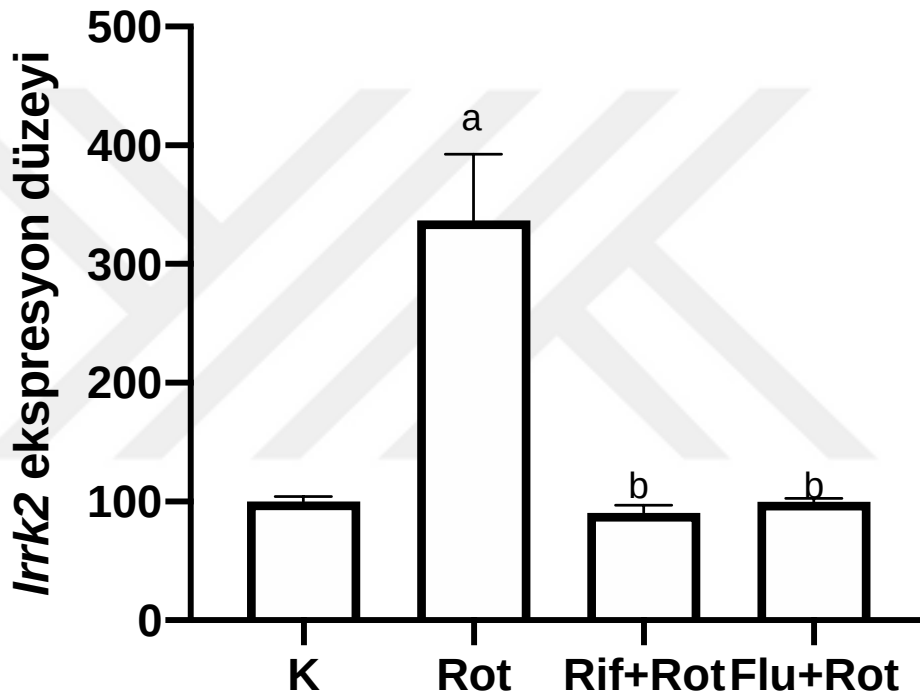
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *pink1* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 4’de gösterilmiştir. Tüm Rot gruplarında K grubuna göre *pink1* mRNA ekspresyonları artmıştır ($p<0,05$). Rif+Rot grubunda *pink1* mRNA ekspresyon düzeyi Rot grubuna göre anlamlı derecede artmış, Flu+Rot grubunda ise anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 5. Kontrol ve maruziyet gruplarının *pink1* mRNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2.2.2. *lrrk2* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

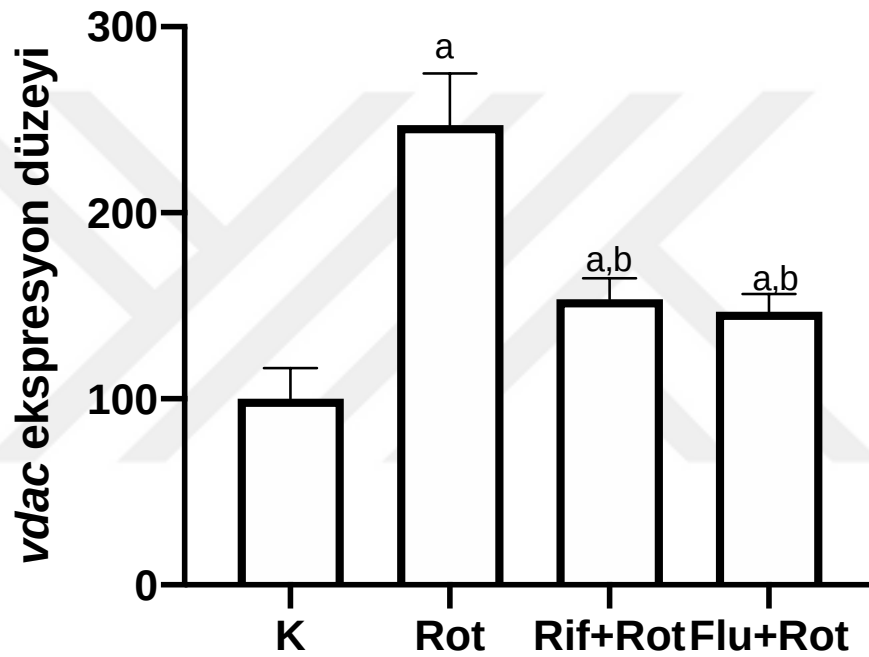
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *lrrk2* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 5’da gösterilmiştir. Rot grubunda K grubuna göre *lrrk2* mRNA ekspresyonları anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Rif+Rot ve Flu+Rot grubunda *lrrk2* mRNA ekspresyon düzeyi Rot grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 6. Kontrol ve maruziyet gruplarının *lrrk2* mRNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2.2.3. *vdac* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *vdac* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 12’te gösterilmiştir. Rot grubunda *vdac* mRNA ekspresyon düzeyleri K grubuna göre artmıştır. K grubu ile kıyaslandığında Rif+Rot ve Flu+Rot gruplarında *vdac* mRNA ekspresyonu artmış, Rot grubu ile kıyaslandığında ise azalmıştır ($p<0,05$).

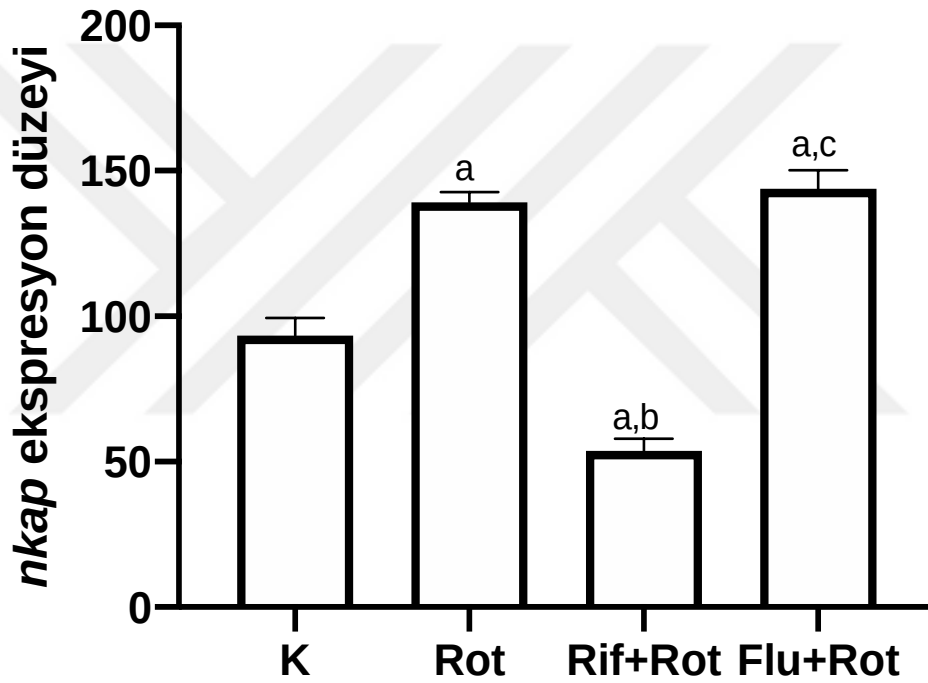


Şekil 7. Kontrol ve maruziyet gruplarının *vdac* RNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamli fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamli derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamli derecede farklıdır.

6.2.3. İnflamasyon ilişkili genlerin RT-PCR Analizi

6.2.3.1. *nkap* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

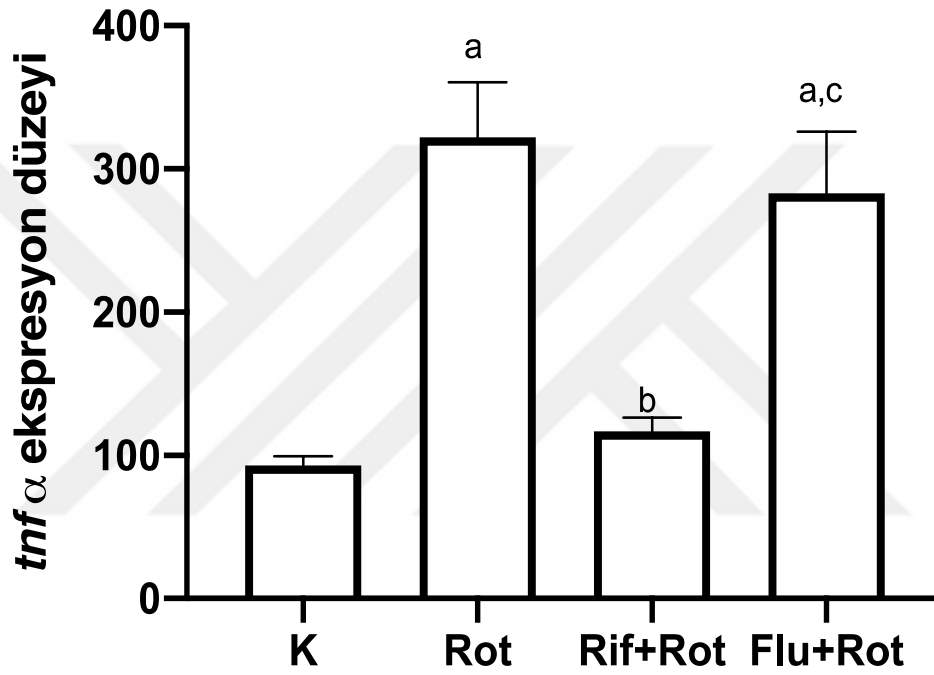
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *nkap* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 8’da gösterilmiştir. Rot ve Flu+Rot gruplarında *nkap* mRNA ekspresyon düzeyleri K grubuna göre artmış, Rif+Rot grubunda ise azalmıştır ($p<0,05$). Rif+Rot grubunda *nkap* ekspresyon düzeyi Rot grubuna göre azalmış, Flu+Rot grubunda ise Rot grubunda göre artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 8. Kontrol ve maruziyet gruplarının *nkap* RNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2.3.2. *tnfa* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

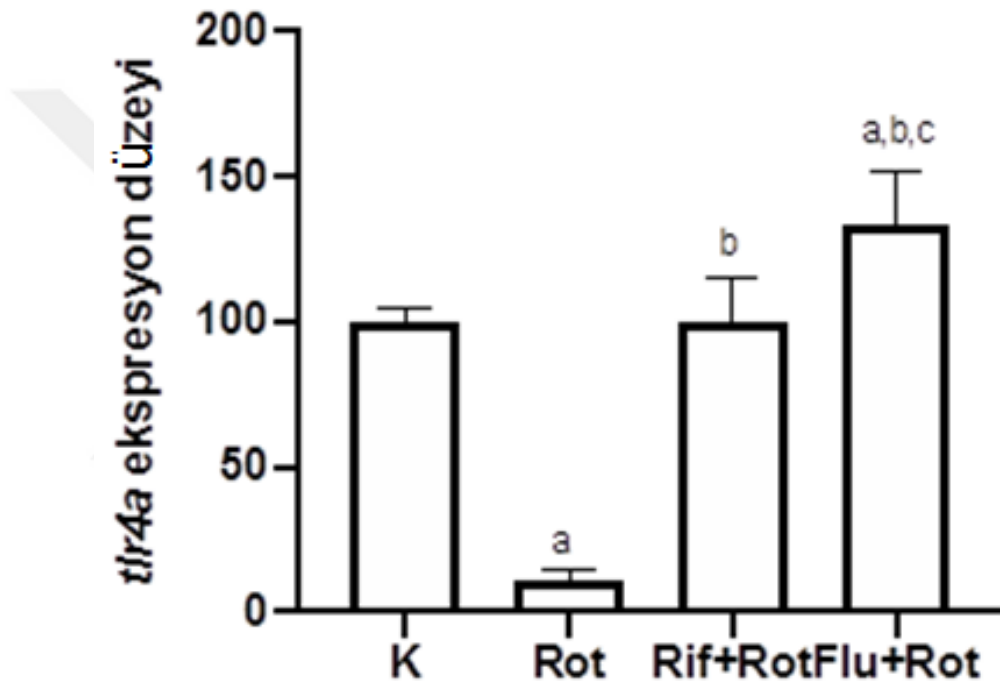
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *tnfa* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 9'da gösterilmiştir. Rot ve Flu+Rot gruplarında *tnfa* mRNA ekspresyon düzeyleri K grubuna göre artmıştır. Rot grubu ile kıyaslandığında Rif+Rot grubunda *tnfa* mRNA ekspresyonu azalmıştır ($p<0,05$). Flu+Rot grubunda *tnfa* mRNA ekspresyonu Rif+Rot grubuna göre artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 9. Kontrol ve maruziyet gruplarının *tnfa* RNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamli fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamli derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamli derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamli derecede farklıdır.

6.2.3.3. *tlr4a* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

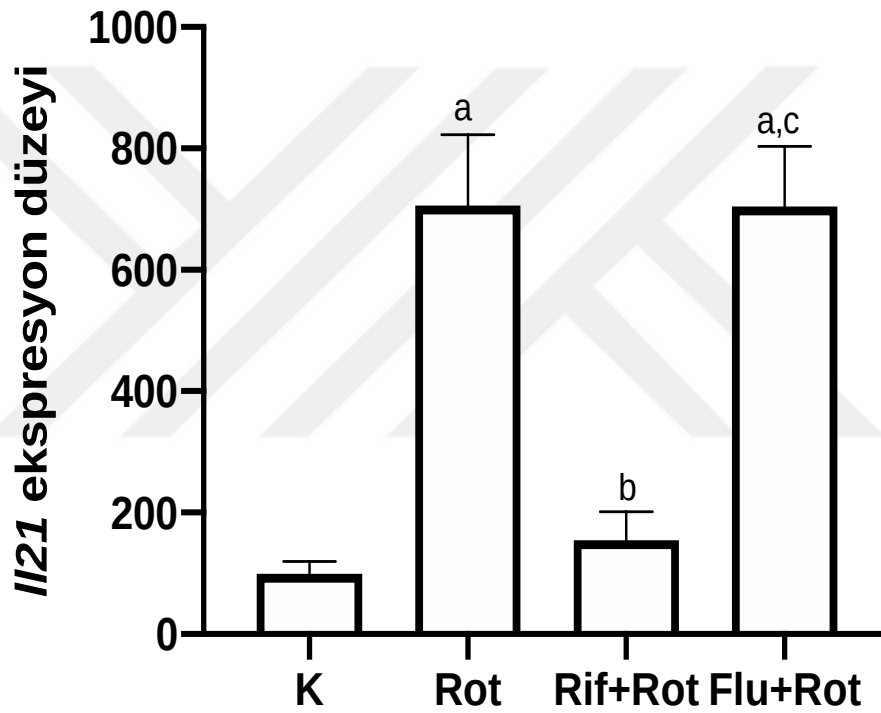
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *tlr4a* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 10'de gösterilmiştir. Rot grubunda *tlr4a* mRNA ekspresyon düzeyleri K grubuna göre azalmıştır. Rot grubu ile kıyaslandığında Rif+Rot ve Flu+Rot gruplarında *tlr4a* mRNA ekspresyonu artmıştır ($p<0,05$). Flu+Rot grubunda *tlr4a* mRNA ekspresyonu Rif+Rot grubuna göre artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 10. Kontrol ve maruziyet gruplarının *tlr4a* RNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2.3.4. *Il21* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *Il21* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 11’de gösterilmiştir. Rot grubunda *Il21* mRNA ekspresyon düzeyleri K grubuna göre artmıştır. Rot grubu ile kıyaslandığında Rif+Rot grubunda *Il21* mRNA ekspresyonu azalmıştır ($p<0,05$). Flu+Rot grubunda *Il21* mRNA ekspresyonu Rif+Rot grubuna göre ve K grubunda göre artmıştır ($p<0,05$).

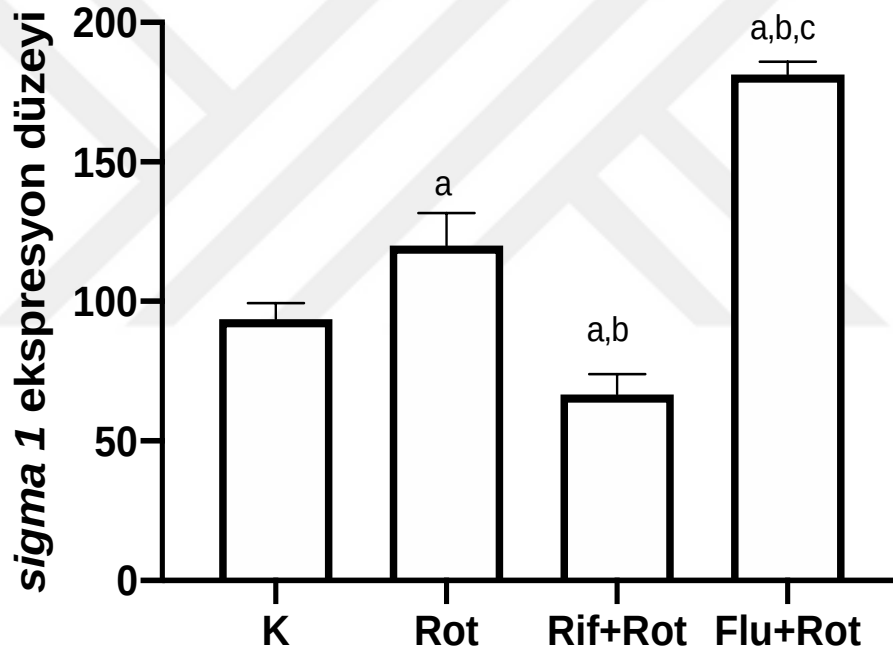


Şekil 11. Kontrol ve maruziyet gruplarının *Il21* RNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.2.4. Kalsiyum ilişkili genlerin Rt-PCR Analizi

6.2.4.1. *sigma1* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot *sigma1* mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 7’de gösterilmiştir. Rot ve Flu+Rot gruplarında *sigma1* mRNA ekspresyon düzeyleri K grubuna göre artmış, Rif+Rot grubunda ise azalmıştır ($p<0,05$). Rif+Rot grubunda *sigma1* ekspresyon düzeyi Rot grubuna göre azalmış, Flu+Rot grubunda ise Rot grubunda göre artmıştır ($p<0,05$).

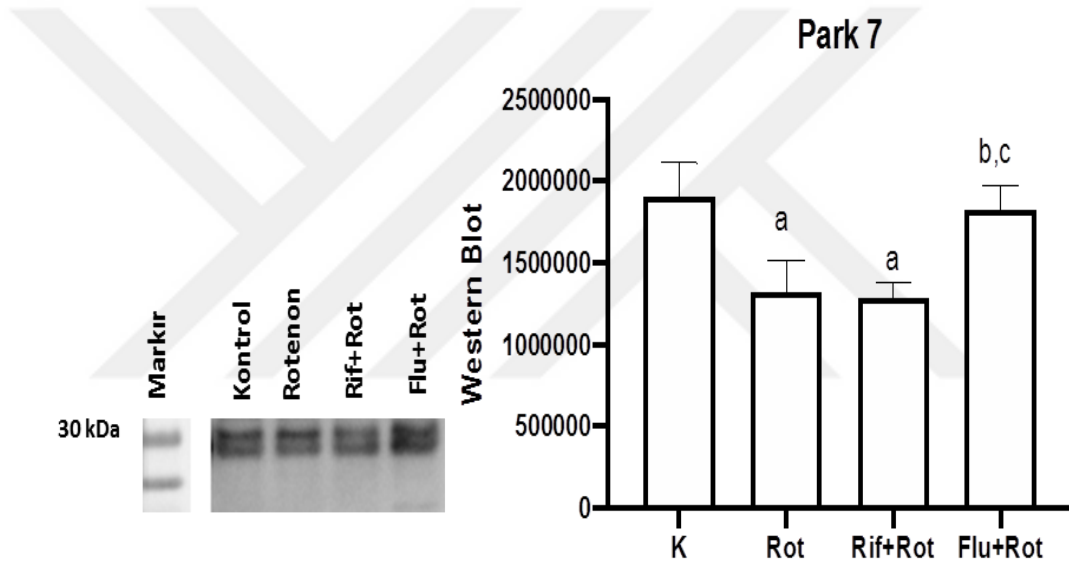


Şekil 12. Kontrol ve maruziyet gruplarının *sigma 1* mRNA ekspresyon sonuçları grafiği. Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -aktin amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.3. Grupların Western Blot Analizi Sonuçları

6.3.1. PARK7/DJ1 western analiz sonucu

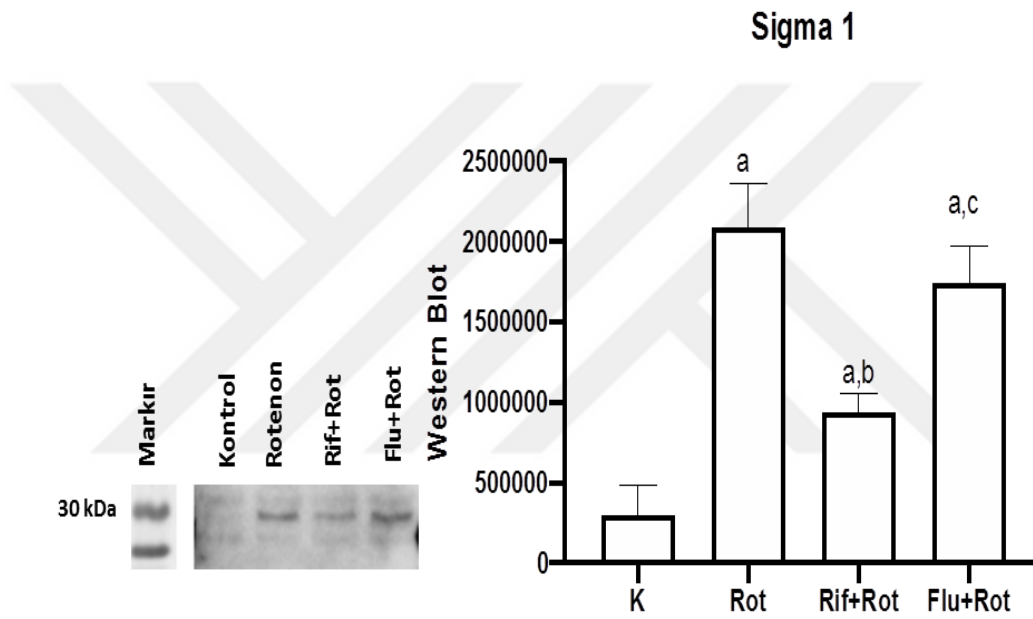
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot Park 7 proteini Western analizi sonucu karşılaştırması Şekil 13’de gösterilmiştir. Rot, Rif+Rot gruplarında Park 7 düzeyleri K grubuna göre azalmıştır. Rot grubu ve Rif+Rot grubu ile kıyaslandığında Flu+Rot gruplarında Park 7 düzeyleri artmış, Rot grubu ile kıyaslandığında ise azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 13. Kontrol ve maruziyet gruplarının PARK7/DJ1 proteini western blot analiz sonuçları. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.3.2. Sigma 1 western analiz sonucu

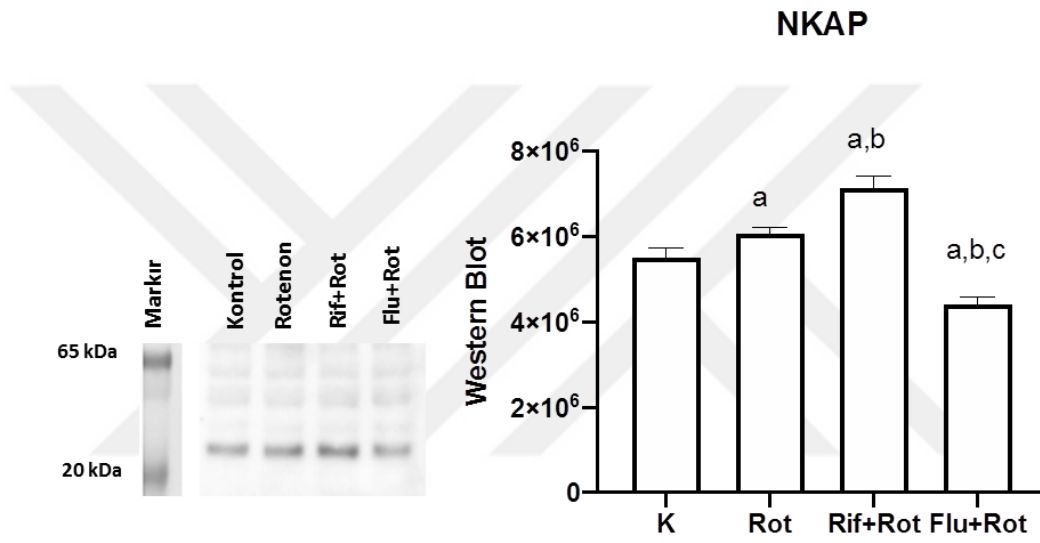
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot Sigma-1 proteini Western analizi sonucu karşılaştırması Şekil 14'te gösterilmiştir. Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot gruplarında Sigma-1 proteini Kontrol grubuna göre artmıştır. Rot grubu ile kıyaslandığında Rif+Rot grubunda Sigma-1R proteini azalmış, Flu+Rot grubunda ise Sigma-1R proteini artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 14. Kontrol ve maruziyet gruplarının Sigma 1 proteini western blot analiz sonuçları. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.3.3. NKAP western analiz sonucu

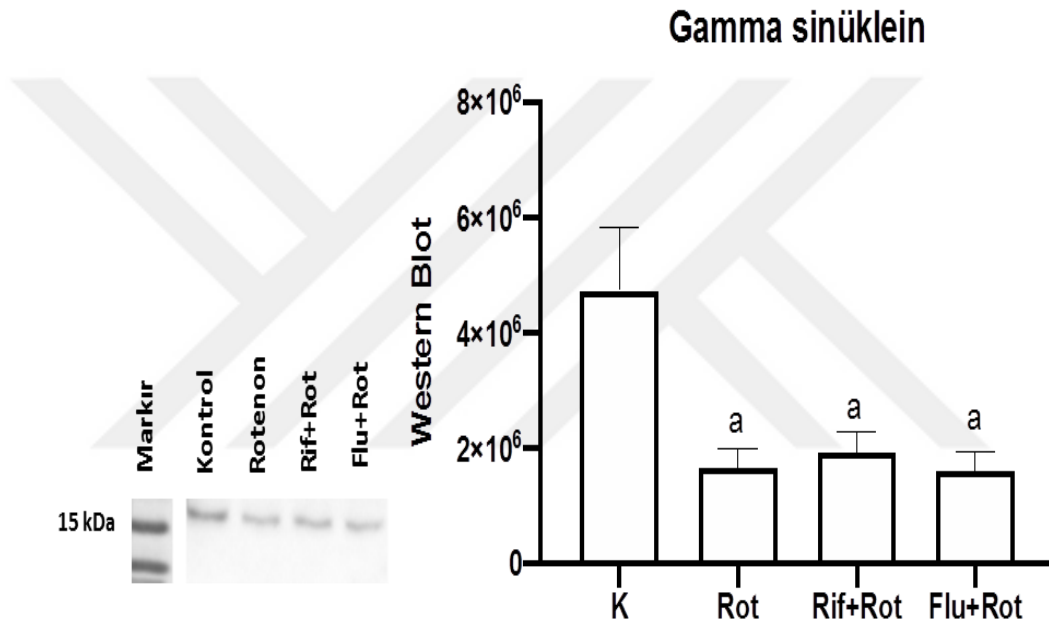
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot NKAP proteini Western analizi sonucu karşılaştırması Şekil 15’da gösterilmiştir. Rot, Rif+Rot gruplarında NKAP düzeyleri Kontrol grubuna göre artmış, Flu+Rot grubunda azalmıştır. Rot grubu ile kıyaslandığında Rif+Rot grubunda NKAP protein düzeyleri anlamlı derecede artmış, Flu+Rot grubunda ise NKAP protein düzeyleri anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 15. Kontrol ve maruziyet gruplarının NKAP proteini western blot analiz sonuçları. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.3.4. Gamma sinüklein western analiz sonucu

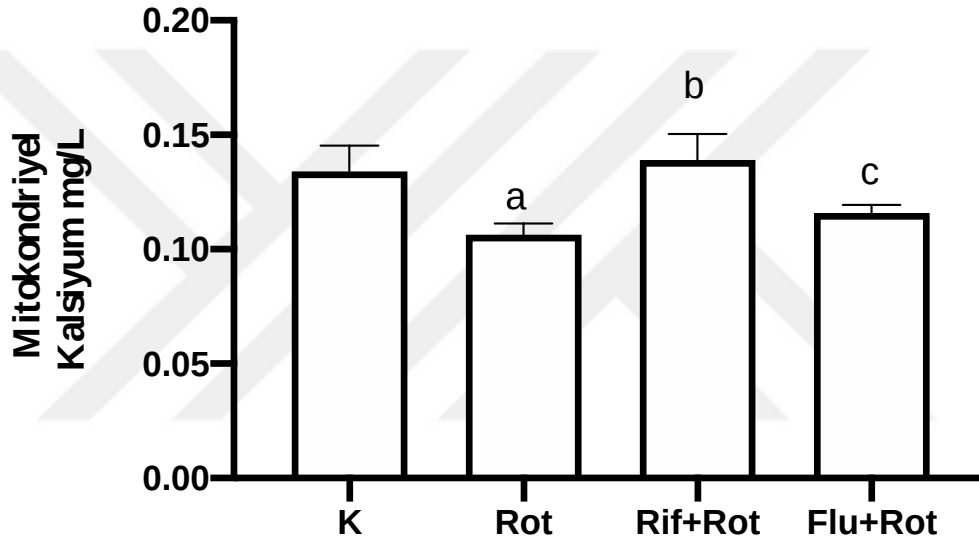
Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot gamma sinüklein proteini western analizi sonucu karşılaştırması Şekil 16'de gösterilmiştir. Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot gruplarında gamma sinüklein düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot grupları arasında gamma sinüklein protein düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 16. Kontrol ve maruziyet gruplarının gamma sinüklein proteini western blot analiz sonuçları. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

6.4. Grupların Mitokondriyel Kalsiyum Ölçümü Sonuçları

Kontrol, Rot, Rif+Rot ve Flu+Rot gruplarının mitokondriyel kalsiyum analizleri sonuçları karşılaştırması Şekil 17’de gösterilmiştir. Rot grubunda mitokondriyel kalsiyum düzeyi ortalaması Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Mitokondriyel kalsiyum düzeyi ortalaması Rif+Rot grubunda Rot grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Flu+Rot grubunda ise Rif+Rot grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 17. Kontrol ve maruziyet gruplarının mitokondriyal kalsiyum analiz sonuçları. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a,b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; Rot: Rotenon; Rif+Rot: Rifampisin+Rotenon; Flu+Rot: Fluvoksamin+Rotenon, a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; b $p<0,05$ Rot grubundan anlamlı derecede farklı; c $p<0,05$ Rif+Rot grubundan anlamlı derecede farklıdır.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, zebra balıklarında rotenon ile oluşturulan PH modelinde rifampisin ve fluvoksaminin lokomotor aktivite, mitokondriyel kalsiyum düzeyleri, PH ile ilişkili gen ve proteinlere etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre 3 haftalık rotenon maruziyeti uygulanan zebra balıklarında kontrol grupları ile kıyaslandığında lokomotor aktivitelerinde, mitokondriyel kalsiyum düzeylerinde, *tlr4a* ekspresyon düzeyinde ve Park 7 miktarlarında azalma; sigma 1 reseptörü, *tnfa*, *pink 1*, *lrrk2*, *il21* ve *vdac* ekspresyon düzeylerinde ve Nkap'ın hem mRNA ekspresyon hem de protein düzeylerinde artma belirlenmiştir.

Çalışmamızda rotenon maruziyeti durumunda rifampisin uygulanması, rotenon grubu ile kıyaslandığında lokomotor aktiviteyi 3. hafta sonunda arttırmıştır. Rotenon grubu ile kıyaslandığında rifampisin verilmesi, gamma sinüklein, *tnfa*, *lrrk2*, *nkap*, *il21*, *vdac* ekspresyon düzeylerini ve sigma 1 reseptörünün hem ekspresyonunu hem de protein düzeylerini azaltmış, *pink1*, *tlr4a* ekspresyonunu ve mitokondriyel kalsiyum düzeylerini arttırmıştır.

Çalışmamızda rotenon maruziyeti durumunda fluvoksamin uygulanması, 1. ve 2. haftaların sonunda lokomotor aktiviteyi rotenon grubuna göre azaltmış, 3. haftada ise değiştirmemiştir. Fluvoksamin uygulanması mitokondriyel kalsiyum düzeylerini rotenon grubuna göre arttırmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fluvoksamin uygulanması sonucunda *pink1*, *lrrk2*, *vdac* ekspresyon düzeyleri azalmış, *tlr4a* ekspresyonu ve Park 7 miktarı artmıştır. Nkap protein düzeyi azalırken ekspresyon düzeyi değişmemiştir. Sigma 1 reseptörünün ekspresyonu rotenon grubuna göre artmıştır ancak protein düzeyi rotenon grubuna göre azalmıştır. Rotenon grubu ile kıyaslanınca gamma sinükleinin mRNA ekspresyonu artarken protein düzeyi değişmemiştir.

Rotenon lipofilik yapılı bir pestisittir ve diğer toksik ajanların tersine kan beyin bariyerini geçip hücre içinde mitokondri de dahil olmak üzere organellerde birikim yapmaktadır. Rotenon, mitokondride kompleks 1'e bağlanmak sureti ile solunum

zincirini inhibe eder ve oksidatif strese neden olur. Rodentlerde deneysel amaçlı PH benzeri belirtiler oluşturmak amacı ile yaygın şekilde kullanılan rotenonun son yıllarda zebra balıklarında da PH modeli olarak uygunluğu gösterilmiştir. 3 haftalık rotenon uygulamasının yetişkin zebra balıklarında motor ve motor olmayan PH benzeri semptomlara neden olduğunu bildirmiş ve kontrol grubundaki balıklar ile karşılaştırıldığında, rotenona maruz bırakılan balıklarda, motor fonksiyonda bozulma göstergesi olarak yüzme hızında azalma göstermiştir (Wang ve ark., 2017). Aynı çalışmada rotenon maruziyetinin balıklarda anksiyete ve depresyon benzeri davranışlara ve olfaktör disfonksiyona neden olduğu da göstermiştir. Bu semptomlar, balıkların beyindeki dopamin miktarı azaltması ile ilişkilendirilmiş ve rotenonun zebra balıklarında PH oluşturmak için uygun bir ajan olduğu modeli olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2017).

Başka bir çalışmada yetişkin zebra balıkları 28 gün boyunca 5 µg / L rotenona maruz bırakmış ve motiliteleri her hafta 5 dakika boyunca gözlemlemiştir. Çalışmada ayrıca ELISA yöntemi kullanarak dopamin düzeylerini ve immünohistokimyasal olarak sinüklein ifadesi incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda rotenon motiliteyi ve dopamin miktarını azaltmış, sinüklein ifadesini ve nöronal hücrelerin apoptozunu ve agregasyonunu arttırarak PH'ye neden olmuştur (Khotimah ve ark., 2015). Çalışmamızda da bu çalışmalara uygun olarak 3 hafta boyunca rotenon uygulaması zebra balıklarının lokomotor aktivitelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır.

Yapılmış olan pek çok araştırmaya rağmen, PH'nin oluşum mekanizmaları tamamen bilinmemekte, oksidatif stres, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, ubikuitin-proteazom sistemindeki bozukluklar ve nöroinflamasyon muhtemel patojenik mekanizmalar olarak önerilmektedir. Özellikle postmortem beyinlerde ve hücre kültürü çalışmaları PH'nin patogenezinde oksidatif stres ve mitokondrial fonksiyon bozukluğunun önemini desteklemektedir. Oksidatif stres nedeni ile oluşan mitokondrial disfonksiyonu, patolojik proteinlerin mitokondri ile etkileşimi ve nihayetinde dopaminerjik nörodejenerasyon ile sonuçlanır. Bu nedenden dolayıdır ki, mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stres hedefli tedavisel yaklaşımlar PH için umut vaadedicidir (Jin ve ark., 2014).

Çalışmamızın sonuçlarına göre 3 haftalık rotenon maruziyeti uygulanan zebra balıklarında kontrol grupları ile kıyaslandığında, mitokondriyel kalsiyum düzeylerinde anlamlı derecede bir azalma belirlenmiştir. Rifampisin uygulanması ise rotenon grubu ile kıyaslandığında mitokondride kalsiyum düzeylerinde artışa neden olmuştur.

Nöronal ve glial hücrelerin sağlığı için kalsiyum sinyali çok önemlidir ve SSS'nde oluşan patolojik durumlar kalsiyum homeostazındaki bozukluklarla yakından ilişkilidir. Kalsiyumun düzensizliği hücresel sinyalleşmeye müdahale etmekte ve hücre ölümüne yol açacak şekilde mitokondriye zarar vermektedir (Nguyen ve ark., 2015). SSS'deki uyarıcı nörotransmitter olan glutamat, spesifik reseptörlerle etkileşime girer ve öğrenme ve hafıza dahil olmak üzere birçok nörolojik fonksiyonda görev yapar. Bununla birlikte, sürekli glutamat salımı, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin kalıcı aktivasyonuna yol açarak nöronal eksitotoksisteye neden olur. NMDA reseptörleri kalsiyumu sodyum ile birlikte taşıdığı için, NMDA reseptörlerinin kalıcı aktivasyonu kalsiyum homeostazının bozulmasına ve nekrotik hücre ölümüne yol açan hücre içi kalsiyum seviyelerini yükseltir (Choi ve ark., 2013). Kalsiyum homeostazının bozulma nedeni, membran potansiyeline bağlı olarak mitokondriyal matrikse kalsiyum alımı sonucu mitokondriyal geçirgenlik porlarının açılımının uyarılmasıdır (Choi ve ark., 2013). Buna göre, eksitotoksisteye ile beraber artan hücre içi kalsiyumu, Alzheimer hastalığı ve PH gibi farklı nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilidir (Choi ve ark., 2013). Öte yandan, mitokondriden kalsiyum akışının PH'de yaygın bir durum olup olmadığı bilinmemekle birlikte, mitokondriyal kalsiyum homeostazının PH patolojisinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (Nguyen ve ark., 2015).

Mitokondriyal kalsiyumun aşırı yüklenmesinin oksidatif strese ve hücre ölümüyle sonuçlanan mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişikliklere yol açabileceği iyi bilinmektedir. Aslında, mitokondriyal dinamiklerdeki (füzyon / fisyon ve taşınım) kusurlar ve kontrol PH patolojisine önemli rol oynar. PH ile ilişkili proteinler α -sinüklein, PINK1, PARK7 (DJ-1) , LRRK2 mitokondriyal fonksiyon, füzyon / fisyon ve oksidatif stresin düzenlenmesinde doğrudan rol oynar. Ek olarak, izole mitokondri veya nöroblastom hücre kültürlerinin MPTP ve rotenon gibi çevresel toksinlere maruz bırakılması, mitokondriyal kalsiyum akışında bir düşüşe ve

sonuçta sitozolik kalsiyumda bir artışa neden olmuştur (Frei ve Richter, 1986; Sousa ve ark., 2003; Wang ve Xu, 2005).

Levi cisimciklerinin en önemli etkeni olan alfa sinükleinin mutasyonları PH genetiği ile yakından ilişkilidir. Alfa sinükleinin yanısıra, lösince zengin tekrarlayan kinaz 2 (*LRRK2*), PTEN kaynaklı indüklenen kinaz 1 (*PINK1*) ve parkinsonizm ilişkili deglikaz (*DJ-1*) (*PARK7*) ile ilgili mutasyonlar da PH gelişimi ile yakından ilişkilidir (Akbayır ve ark, 2017). Çalışmamızda rotenon uygulaması kontrol grubu ile kıyaslandığında Park7 protein düzeylerini azaltmıştır. PARK7, 189 amino asitten oluşan DJ-1 proteini kodlar ve bu protein redoks duyarlı şaperon mekanizmasında ve oksidatif hasara karşı mitokondrial korunmada rol alır. *DJ-1*'nde yaklaşık on adet farklı mutasyon belirlenmiş ve bunlar PH ile ilişkilendirilmiştir. Bununla beraber DJ-1'in oksidatif stres sensörü gibi davranarak nöroprotektif bir rolü olduğu ve oksidatif stres gibi stres durumların da ifadesinin arttığı da bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Hatano ve ark., 2009, Ariga ve ark., 2013).

Çalışmamızda rotenon uygulanan tüm gruplarda *pink1* ekspresyonu artmıştır. Rifampisin uygulaması ile rotenon grubunda *pink1* ekspresyonu artmış, fluvoksamin uygulaması ile ise azalmıştır. PINK1 (*PARK6*) ve Parkin (*PARK2*), ailesel Parkinson hastalığının resesif formlarıyla ilişkili en sık görülen mutasyonlu genler arasındadır. Son çalışmalar, kodladıkları proteinlerin (*PINK1* ve Parkin), disfonksiyonel mitokondrinin otofajik sürecine aracılık etmek için beraber çalıştığını göstermektedir. Mitokondriyal membran potansiyeli mitokondriyal sağlık ve hasarın anahtar bir göstergesidir. Mitokondriyal hasar durumunda, PINK1, ubikuitini fosforile etmek üzere dış mitokondriyal zar üzerinde stabilize olur ve Parkin aktivasyonu için bir sinyal oluşturur. Normalde sağlıklı mitokondride PINK1 hızla degrade olurken PINK1'in mitokondriyal depolarizasyonu algılaması durumunda degradasyon gerçekleşmez yani depolarize mitokondride PINK'in birikimi söz konusudur. PINK1, özellikle hasarlı mitokondri dış membranında birikirerek hasarlı mitokondriyi sağlıklı mitokondriden ayırt ederek yıkımı için işaretler. Mitokondri yüzeyinde birikirken, PINK1'in TOM kompleksine bağlandığı bildirilmiştir (Ding ve ark., 2010; Okatsu ve ark., 2010). PINK1 kaybının, mitokondriyal kalsiyum kullanımında bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumda mitokondriyal matrikste, azalmış akış kapasitesi sonucu Ca^{2+} daha yüksek seviyelerde birikmiştir.

PINK1 bulunmayan hücrelerin mitokondrisinin, uyarılara tepki olarak sitoplazmik Ca^{2+} artışlarını tamponlayabilmekte yetersiz olduğu gösterilmiştir. Bu durum ROS'un artmasına, ATP üretiminin azalmasına ve ölüme neden olabilen mitokondriyal geçirgenliğinin artmasına neden olabilir. PINK1 kaybı, LPS'ye cevap olarak sitokinlerin ekspresyonunun artması ile de ilişkilidir, ancak hücrenin yaşamasını uyaran sitokin ile indüklenen NF- κ B ekspresyonunun ise azalması ile de ilişkilidir. Bu etkilerin mitofaji kaybına bağlı hasarlı mitokondri birikiminden dolayı ortaya çıkması olasıdır. Bununla birlikte, PINK1'in mitokondriyal homeostazı sürdürmek için önemli olan diğer hücresel işlevlere sahip olması da mümkündür (Akundi ve ark., 2011; Gandhi ve ark., 2009).

Çalışmamızda artan rotenon uygulaması ile artan *pink1* ekspresyonu, bu grupta artan inflamasyon belirtçelerinden *tnf- α* ile ve NF- κ B aktivatörü *nkap* ile ilişkili olabilir. PINK mutasyonu ve defektleri PH ilişkili olmakla beraber, inflamasyon ile ilişkili mitokondri hasarı ve bozulan Ca^{2+} homeostazına yanıt olarak *pink1* ekspresyonunun artması da muhtemeldir.

Çalışmamızda rotenon uygulama sonrası gamma sinüklein ekspresyonu seviyeleri anlamlı bir fark yaratmazken, rifampisin uygulaması ile rotenon grubunda gamma sinüklein ekspresyon seviyeleri azalmış, fluvoksamin uygulaması ile ise artmıştır.

Zebra balıklarında α -sinüklein yokluğunu telafi ettiği düşünülen üç sinüklein izoformunu, β , γ 1- ve γ 2- sinükleinleri ifade eder. İnsan α -sinüklein'e işlevsel olarak en yakını, γ 1- sinüklein olarak görünüyor. B veya γ 1-sinükleinlerin knockdown edilmesi, zebra balığı içindeki motor bozulmaları uyarır, her iki sinüklein ekspresyonu durdurulduğunda daha da şiddetli olur (Milanese ve ark., 2012). Her iki sinüklein içermeyen Zebra balığı, dopaminerjik nöronların geciktirilmiş farklılaşması ve düşük dopamin seviyeleri de dahil olmak üzere dopaminerjik sistemin anormal bir gelişimine sahiptir. Zebra balığı içerisinde, γ 1-sinükleinlerin aşırı ekspresyonu, insan α -sinükleinine benzer şekilde nöronal agregatların ve nörotoksisitenin oluşumuna yol açar (Lulla ve ark., 2016). Diğer yandan, γ 1-sinükleinin ekspresyonundaki azalma zebra balığını ziramın toksisitesinden korur. Ziram'a maruz kalma, PH gelişme riskini önemli ölçüde artırır. Bu pestisit, dopaminerjik nöronların kaybına ve zebra

balığı içerisinde yüzme davranışının bozulmasına neden olur (Lulla ve ark., 2016). Apomorfın ile tedavi motor bozukluklarını azaltır. Dahası, kendiliğinden toplanan bir amiloidojenik protein inhibitörü olan CLR01, zebra balığı ziramın neden olduğu nörotoksisiteye karşı korur. Bu veriler, ziramın γ 1-sinüklein toksik oligomerlerinin oluşumu yoluyla dopaminerjik nöronlarda toksisiteyi indükleyebileceğini göstermektedir. Yine de, zebra balığı hücre hatlarından hiçbirisi, insan α -sinüklein'i aşırı eksprese eden zebra balığı kadar şiddetli bir fenotip göstermez. Embriyonik gelişim sırasında, bu hücre hatları 48-72 saat içinde ciddi deformasyonlar ve ölümle sonuçlanan nöronal apoptoz sunar (Prabhudesai ve ark., 2012).

Çalışmamızda rotenon uygulanan tüm gruplarda *vdac* ekspresyonu artmıştır. Bununla beraber hem Rifampisin hem de Fluvoksamin uygulaması ile rotenon grubuna göre *vdac* ekspresyonları azalmıştır.

PINK1 / Parkin etkileşimi sayesinde gerçekleşen otofaji mekanizması ile kusurlu mitokondriyi ortadan kaldırılabilmektedir. VDAC proteinleri Parkin'in mitokondriye bağlanma partnerleri olarak tanımlanmışlardır. VDAC'lerin Parkin'in kusurlu mitokondriye ve daha sonraki mitofajiye etkin bir şekilde alımı için gerekli olduğunu gösterilmiştir. Çeşitli sistemlerdeki son çalışmalarda, PINK1 / Parkin yolunun, otofaji mekanizması ile kusurlu mitokondriyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Sun ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada VDAC'ların bu mekanizmanın bir parçası olduğu, Parkin'in hasarlı mitokondriye girişinde etkili olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 2012). Çalışmamızda da rotenon uygulaması ile hem *vdac* hem de *pink1* ekspresyonlarının artması bu bulguları destekler nitelikte, mitokondride fonksiyon bozukluğu ve hasarı işaret etmektedir.

Çalışmamızda rotenon maruziyeti *Sigma 1* ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırmıştır. Fluvoksamin uyarımı ile *Sigma 1* ekspresyonu rotenon grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Rifampisin grubunda ise, *Sigma 1* ekspresyonunda azalma görülmektedir. Western ile yapmış olduğumuz gruplar arası protein miktar farklılığına ilişkin, rotenon uyarımlı tüm gruplarda aktif *Sigma 1* reseptör seviyelerinin arttığı görülmektedir. Rifampisin maruziyeti sonrası aktif olan *Sigma 1* seviyesinde Fluvoksamin maruziyetine kıyasla anlamlı bir düşüş görülmekteyken, en etkin *Sigma 1* seviyeleri rotenonda görülmektedir.

Sig-1'nin nöroprotektif etkisi, şaperon aktivitesi, Ca^{2+} düzenlemesi (Monnet, 2005; Mori ve ark., 2013; Su ve ark., 2010; Tsai ve ark., 2009). ERAD yolu üzerinden transkripsiyonel düzenleme ve lipid sentezini (Benarroch, 2018) içerir. Sig-1R, ER-mitokondri ilişkili membranda Ca^{2+} seviyesinin düzenlenmesinde ve hücre içi Ca^{2+} homeostazı ve Ca^{2+} 'un mitokondriyal matrikse alımının korunmasında kritik bir rol oynar. Ca^{2+} toksisitesi felç ve Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda hücre ölümüne katılmaktadır, bu nedenle Sig-1 aracılı Ca^{2+} düzenlenmesi beynin korunmasında kesinlikle hayati önem taşır (Ruscher ve Wieloch, 2015).

Çalışmamızda rotenon maruziyeti sonrası Sigma 1 reseptör seviyelerinin artmış olması, beklediğimiz hücre Ca^{2+} seviyelerindeki değişimi işaret etmektedir. Sigma 1 reseptör uyarıcılarından fluvoksamin ile maruziyet sonrasında ise, Sigma 1 reseptör seviyelerindeki anlamlı düşüş, fluvoksaminin bir diğer etkisi olan endoplazmik stres aracılı apoptozu baskılayıcı etkisiyle nöronal korunumu sağlamasını akla getirmektedir.

Çalışmamızda rotenon maruziyeti *nkap* ve *tnf- α* ekspresyonlarını kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Rifampisin uygulanması rotenon grubunda *nkap* ve *tnf- α* ekspresyonlarını azaltmıştır. Rotenon grubunda fluvoksamin uygulanması ise, *nkap* ve *tnf- α* ekspresyonlarında rotenon grubuna göre bir değişikliğe neden olmamıştır.

NKAP, TNF- α ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunda tanımlanmış önemli bir nükleer regülatör proteindir. NF- κ B, enflamatuar yanıtlar ve antiapoptotik etkileriyle çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen, bir transkripsiyon faktörüdür (Chen ve ark., 2003). PH etiyolojisinde, TNF- α , nitrik oksit (NO) ve IL-1 β gibi enflamatuar mediatörlerin üretiminin, nöronal doku yıkımına aracılık ettiği ve bu mediatörleri üreten başlıca SSS hücresinin mikrogliyal hücreler olduğu gösterilmiştir. Mikrogliaı doğrudan aktive eden ajanların hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak DA üreten nöronlarda nörotoksiteyi indüklediği gösterilmiştir. Bu ajanlar arasında LPS, β -amiloid peptidleri, Parkin ve agregre olmuş veya nitratlanmış- α -sinüklein bulunur (Frank-Cannon ve ark., 2008; Reynolds ve ark., 2008). Ayrıca 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) gibi birçok

doğrudan nörotoksin etkili maddeler hücresel içeriğinin salınması yoluyla mikrogliaı aktive ederek nörotoksiteyi uyarır (Flood ve ark., 2011; Hirsch ve ark., 2005). Bir kez aktive edildiğinde, mikroglial hücreler, enflamatuar sitokinler, kemokinler, prostaglandinler ve lökotrienler, NO, reaktif oksijen türleri (ROS) ve glutamat dahil olmak üzere doğal bağışıklık tepkisini desteklemeye yarayan çok çeşitli enflamatuar mediatörler üretir.

Aktive olmuş mikroglial hücrelerden salgılanan enflamatuar sitokinler arasında DA nöronlarının doğrudan öldürülmesine yol açabilen TNF- α , IL-1, ve IL-6 bulunmaktadır (Flood ve ark., 2011). Enflamasyon ve PH'de DA nörodejenerasyonuna katılan enflamatuar mediatörlerin çoğu ortak bir özelliğe sahiptir; bu ortak özellik, mikroglial hücrelerde ekspresyonlarının öncelikle NF- κ B tarafından düzenlenmesidir. TNF ve IL-1 gibi enflamatuar sitokinler, LPS gibi bakteri ürünleri ve hücresel hasarlı ürünler, NF- κ B'nin aktivasyonu ile enflamatuar tepkileri aktive eder. NF κ B daha sonra enflamatuar sitokinleri kodlayan genlerin düzenlenmesi yoluyla enflamatuar yanıtta önemli bir rol oynar (Tsoulfas ve Geller, 2001).

Rotenon ile indüklenen PH modelinin, non-invaziv ve kronik oluşum süreci gibi özellikleri ile dopaminerjik nöron kaybı ve nöroinflamasyon ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Li ve ark., 2013). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda rotenon grubunda artan *tnf- α* ekspresyonu, mikroglial hücre aktivasyonu sonucu artan inflamasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Yine rotenon grubunda artan *nkap* ekspresyonu rotenon maruziyetine bağlı NF- κ B'nin NKAP ile aktivasyonunun artışı ile ilişkilendirilebilir.

Mycobacterium tuberculosis ve diğer mikobakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan makrosiklik bir antibiyotik olan rifampisin son yıllarda nöronlarda koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir. Bi ve ark (2013) rifampisinin, mitokondriyal oksidatif stresi hafifleterek rotenon kaynaklı apoptozu önemli ölçüde bastırdığı, mikroglial enflamasyonu azaltıp nöron sağkalımını arttırdığını bildirmiştir (Bi ve ark., 2013). Çalışmamızda da bu bulgulara uygun olarak rifampisin uygulanmasının rotenon grubunda artan *tnf- α* ve *nkap* ekspresyonlarını azalttığı bulunmuştur.

Çalışmamızda rotenon uygulaması *trl4a* ekspresyonunda azalmaya, *il21* ekspresyonunda ise artışa neden olmuştur.

IL21R mutasyonu olan bazı hastalarda kronik ishal ile birlikte erken başlangıçlı IBD gözlenmiştir. Ayrıca hayvan modellerinde kullanan çoklu çalışmalar IL-21'in IBD patogeneğinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber IL21, IL-10'u indüklemeye kabiliyeti nedeniyle immünoşüpresif olarak da değerlendirilmiştir. IL-10 sinyalinin bağırsaktaki immün homeostazını kritik bir şekilde düzenlediği bilinmektedir ve IL10 mutasyonları olan hastalarda erken başlangıçlı IBD gelişmektedir. Çalışmamızda artan *il21* ekspresyonu rotenonun etkisi ile baskılanmış immün sistemin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (Leonard ve Wan, 2016). Rifampisin uygulaması ise rotenon verilen grupta artan *il21* ekspresyonunu anlamlı derecede azaltmıştır. Fluvoksamin ise etkili olmamıştır. Rotenon verilen gruplarda hem rifampisin hem de fluvoksamin *trl4a* ekspresyonların anlamlı derecede arttırmıştır. Bu gruplarda artan *trl4a* ekspresyonları hem rifampisin hem de fluvoksaminin organizmanın verdiği enflamatuvar yanıtın uyarılmasının bir sonucu olabilir.

Sonuç olarak rifampisin ve fluvoksaminin zebra balıklarında rotenon ile indüklenen deneysel PH modelinde mitokondriyel kalsiyum, PH ile ilişki genler, proteinler ve lokomotor aktiviteleri inceleyen bu çalışmamız nörotoksik ajan olan rotenon ile oluşturulan bu modelin zebra balıklarında PH oluşturmak için uygun olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmamızda kalsiyum odaklı mitokondri fonksiyon bozukluğu ile PH gelişiminde etkili genler ve proteinler arasındaki ilişkiye dair önemli veriler elde edilmiştir. Çalışmamız literatürde ilk defa nörodejeneratif mekanizmalarda inflamatuvar mekanizmaları TRL4a, NF-κB, NKAP, TNFα ve IL21 açısından ilişkilendirmiştir.

Birçok çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızın da sınırlayıcı faktörleri bulunmaktadır. Temel sınırlayıcı faktör, çalışma bütçesinin sınırlı olmasıdır. Ekspresyon seviyelerine bakılan her gen için, protein seviyelerine bakılamamıştır. Aynı zamanda, nöroprotektif ajanların zebra balıklarına etkisi olup olmadığını deneyebileceğimiz iki kontrol grubu, analiz sayısını ve dolayısı ile bütçeyi etkileyeceğinden eklenememiştir. Rifampisin ve fluvoksamin kimyasallarının

miktarları ancak karın içi enjeksiyon kullanımı için yeterli miktarda olduğundan, uygulama sonrası grup içi ölüm miktarları artmış olup uygulanan süre 3 haftayla sınırlandırılmak zorunda kalmıştır. RT-PCR ve western-blot analizlerinde her gruptan 3-5 dokunun tek tek analizi yerine, grup içi örneklerden havuz oluşturulup, 3 tekrarlı analiz yapılmıştır.



8. KAYNAKLAR

Aarsland D, Kvaloy JT, Andersen K, Larsen JP, Tang MX, Lolk A, et al. The effect of age of onset of PD on risk of dementia. *J Neurol*. 2007;254 (1): 38-45.

Aarsland D, Marsh L, Schrag A. Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009;24 (15): 2175-2186.

Acocella G. Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clinical pharmacokinetics*. 1978;3 (2): 108-127.

Ajmo CT, Jr., Vernon DO, Collier L, Pennypacker KR, Cuevas J. Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Current neurovascular research*. 2006;3 (2): 89-98.

Akundi RS, Huang Z, Eason J, Pandya JD, Zhi L, Cass WA, et al. Increased mitochondrial calcium sensitivity and abnormal expression of innate immunity genes precede dopaminergic defects in Pink1-deficient mice. *PLoS One*. 2011;6 (1): e16038.

Arranz AM, Delbroek L, Van Kolen K, Guimaraes MR, Mandemakers W, Daneels G, et al. LRRK2 functions in synaptic vesicle endocytosis through a kinase-dependent mechanism. *J Cell Sci*. 2015;128 (3): 541-552.

Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*. 1998;152 (4): 879-884.

Bagheri H, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, Cismondo S, O'Connell D, Senard JM, et al. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 1999;22 (4): 213-215.

Bang Y, Kim KS, Seol W, Choi HJ. LRRK2 interferes with aggresome formation for autophagic clearance. *Mol Cell Neurosci*. 2016;75: 71-80.

Barrett PJ, Timothy Greenamyre J. Post-translational modification of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Brain Res*. 2015;1628 (Pt B): 247-253.

Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011;477 (7362): 107-110.

Bayulkem K, Lopez G. Clinical approach to nonmotor sensory fluctuations in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2011;310 (1-2): 82-85.

Beccano-Kelly DA, Kuhlmann N, Tatarnikov I, Volta M, Munsie LN, Chou P, et al. Synaptic function is modulated by LRRK2 and glutamate release is increased in cortical neurons of G2019S LRRK2 knock-in mice. *Front Cell Neurosci*. 2014;8: 301.

Benarroch EE. Sigma-1 receptor and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2018;91 (16): 743-747.

Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical Pharmacology*. 2002;64 (5-6): 883-888.

Bi W, Zhu L, Jing X, Liang Y, Tao E. Rifampicin and Parkinson's disease. *Neurol Sci*. 2013;34 (2): 137-141.

Bi W, Zhu L, Jing X, Zeng Z, Liang Y, Xu A, et al. Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated cocultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Molecular medicine reports*. 2014;10 (4): 1793-1799.

Bi W, Zhu L, Wang C, Liang Y, Liu J, Shi Q, et al. Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Brain Res.* 2011;1395: 12-20.

Bindoff LA, Birch-Machin MA, Cartlidge NE, Parker WD, Jr., Turnbull DM. Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1991;104 (2): 203-208.

Blanca Ramirez M, Madero-Perez J, Rivero-Rios P, Martinez-Salvador M, Lara Ordonez AJ, Fernandez B, et al. LRRK2 and Parkinson's Disease: From Lack of Structure to Gain of Function. *Curr Protein Pept Sci.* 2017;18 (7): 677-686.

Boddu R, Hull TD, Bolisetty S, Hu X, Moehle MS, Daher JP, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 deficiency is protective in rhabdomyolysis-induced kidney injury. *Hum Mol Genet.* 2015;24 (14): 4078-4093.

Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005;2 (3): 484-494.

Bretaud S, Lee S, Guo S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol.* 2004;26 (6): 857-864.

Brodsky MA, Godbold J, Roth T, Olanow CW. Sleepiness in Parkinson's disease: a controlled study. *Mov Disord.* 2003;18 (6): 668-672.

Broen MP, Braaksma MM, Patijn J, Weber WE. Prevalence of pain in Parkinson's disease: a systematic review using the modified QUADAS tool. *Mov Disord.* 2012;27 (4): 480-484.

Burre J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunker AT, Sudhof TC. Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature.* 2013;498 (7453): E4-6; discussion E6-7.

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*. 2001;104 (6): 901-912.

Carrion MDP, Marsicano S, Daniele F, Marte A, Pischedda F, Di Cairano E, et al. The LRRK2 G2385R variant is a partial loss-of-function mutation that affects synaptic vesicle trafficking through altered protein interactions. *Sci Rep*. 2017;7 (1): 5377.

Ceravolo R, Frosini D, Rossi C, Bonuccelli U. Spectrum of addictions in Parkinson's disease: from dopamine dysregulation syndrome to impulse control disorders. *J Neurol*. 2010;257 (Suppl 2): S276-283.

Cersosimo MG, Tumilasci OR, Raina GB, Benarroch EE, Cardoso EM, Micheli F, et al. Hyposialorrhea as an early manifestation of Parkinson disease. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2009;150 (1-2): 150-151.

Chan D, Citro A, Cordy JM, Shen GC, Wolozin B. Rac1 protein rescues neurite retraction caused by G2019S leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2). *J Biol Chem*. 2011;286 (18): 16140-16149.

Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*. 1996;16 (3): 276-284.

Chastan N, Westby GW, Yelnik J, Bardinet E, Do MC, Agid Y, et al. Effects of nigral stimulation on locomotion and postural stability in patients with Parkinson's disease. *Brain*. 2009;132 (Pt 1): 172-184.

Chen D, Li Z, Yang Q, Zhang J, Zhai Z, Shu HB. Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310 (3): 720-724.

Chen JJ, Marsh L. Depression in Parkinson's disease: identification and management. *Pharmacotherapy*. 2013;33 (9): 972-983.

Choi I-Y, Lim J-H, Kim C, Song HY, Ju C, Kim W-K. 4-hydroxy-2(E)-Nonenal facilitates NMDA-Induced Neurotoxicity via Triggering Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening and Mitochondrial Calcium Overload. *Experimental neurobiology*. 2013;22 (3): 200-207.

Civiero L, Cirnaru MD, Beilina A, Rodella U, Russo I, Belluzzi E, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 interacts with p21-activated kinase 6 to control neurite complexity in mammalian brain. *J Neurochem*. 2015;135 (6): 1242-1256.

Coleman BS, Block BA. Fluvoxamine maleate, a serotonergic antidepressant; a comparison with chlorimipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1982;6 (4-6): 475-478.

Cummings JL. Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 2004;351 (1): 56-67.

Dachsel JC, Behrouz B, Yue M, Beevers JE, Melrose HL, Farrer MJ. A comparative study of Lrrk2 function in primary neuronal cultures. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010;16 (10): 650-655.

Dalle E, Daniels WMU, Mabandla MV. Anti-parkinsonian effects of fluvoxamine maleate in maternally separated rats. *Int J Dev Neurosci*. 2016;53: 26-34.

Dalle E, Daniels WMU, Mabandla MV. Fluvoxamine maleate effects on dopamine signaling in the prefrontal cortex of stressed Parkinsonian rats: Implications for learning and memory. *Brain Res Bull*. 2017;132: 75-81.

Dalle E, Mabandla MV. Early Life Stress, Depression And Parkinson's Disease: A New Approach. *Mol Brain*. 2018;11 (1): 18.

Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J Neurochem.* 2009;111 (1): 192-203.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39 (6): 889-909.

Delamarre A, Meissner WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse medicale (Paris, France : 1983).* 2017;46 (2 Pt 1): 175-181.

Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.* 2008;283 (14): 9089-9100.

Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, et al. alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2016;8 (342): 342ra378.

Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, et al. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem.* 2010;285 (36): 27879-27890.

Ding X, Goldberg MS. Regulation of LRRK2 stability by the E3 ubiquitin ligase CHIP. *PLoS One.* 2009;4 (6): e5949.

Doty RL, Deems DA, Stellar S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology.* 1988;38 (8): 1237-1244.

Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2009;66 (4): 494-504.

Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Jr., Browne G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *Journal of molecular biology*. 2001;307 (4): 1061-1073.

Emamzadeh FN. Role of Apolipoproteins and alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci*. 2017;62 (3-4): 344-355.

Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, et al. Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci*. 1997;17 (20): 7736-7745.

Evans AH, Lees AJ. Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2004;17 (4): 393-398.

Fenelon G, Alves G. Epidemiology of psychosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2010;289 (1-2): 12-17.

Fenelon G, Thobois S, Bonnet AM, Broussolle E, Tison F. Tactile hallucinations in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2002;249 (12): 1699-1703.

Ferreira M, Massano J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurol Scand*. 2017;135 (3): 273-284.

Fischer M, Gemende I, Marsch WC, Fischer PA. Skin function and skin disorders in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2001;108 (2): 205-213.

Flood PM, Qian L, Peterson LJ, Zhang F, Shi JS, Gao HM, et al. Transcriptional Factor NF-kappaB as a Target for Therapy in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2011;2011: 216298.

Ford B. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010;25 Suppl 1: S98-103.

Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci MA. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain.* 2014;137 (Pt 7): 1998-2014.

Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact.* 2010;188 (2): 289-300.

Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hong J, Marvin M, et al. Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *J Neurosci.* 2008;28 (43): 10825-10834.

Frei B, Richter C. N-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) together with 6-hydroxydopamine or dopamine stimulates Ca²⁺ release from mitochondria. *FEBS Lett.* 1986;198 (1): 99-102.

Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 2002;4 (2): 160-164.

Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, et al. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell.* 2009;33 (5): 627-638.

Gantchev N, Viallet F, Aurenty R, Massion J. Impairment of posturo-kinetic coordination during initiation of forward oriented stepping movements in parkinsonian

patients. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1996;101 (2): 110-120.

Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, et al. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104 (47): 18754-18759.

Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51 (6): 745-752.
Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, et al. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*. 2005;365 (9457): 415-416.

Gromek KA, Suchy FP, Meddaugh HR, Wrobel RL, LaPointe LM, Chu UB, et al. The oligomeric states of the purified sigma-1 receptor are stabilized by ligands. *J Biol Chem*. 2014;289 (29): 20333-20344.

Hall AA, Herrera Y, Ajmo CT, Jr., Cuevas J, Pennypacker KR. Sigma receptors suppress multiple aspects of microglial activation. *Glia*. 2009;57 (7): 744-754.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000;5 (5): 897-904.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256 (5054): 184-185.

Hashimoto K, Fujita Y, Iyo M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32 (3): 514-521.

Hayashi T, Su TP. Cholesterol at the endoplasmic reticulum: roles of the sigma-1 receptor chaperone and implications thereof in human diseases. *Subcell Biochem.* 2010;51: 381-398.

Hayashi T, Su TP. The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. *Life Sci.* 2005;77 (14): 1612-1624.

Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell.* 2007;131 (3): 596-610.

Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101 (41): 14949-14954.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132 (3): 344-362.

Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine.* 2019;132 (7): 802-807.

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1999;10 (11): 3787-3799.

Hazell AS. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int.* 2007;50 (7-8): 941-953.

Heo HY, Kim KS, Seol W. Coordinate Regulation of Neurite Outgrowth by LRRK2 and Its Interactor, Rab5. *Experimental neurobiology.* 2010;19 (2): 97-105.

Hirayama M. Sweating dysfunctions in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2006;253 Suppl 7: Vii42-47.

Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005;11 Suppl 1: S9-S15.

Hisahara S, Shimohama S. Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease. *Parkinson's disease*. 2010;2011: 951709-951709.

Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology*. 2001;57 (10 Suppl 3): S11-26.

Holroyd S, Currie L, Wooten GF. Prospective study of hallucinations and delusions in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70 (6): 734-738.

Ichimaru Y, Egawa T, Sawa A. 5-HT_{1A}-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Japanese journal of pharmacology*. 1995;68 (1): 65-70.

Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem*. 2000;275 (46): 35661-35664.

Inoshita T, Arano T, Hosaka Y, Meng H, Umezaki Y, Kosugi S, et al. Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*. 2017;26 (15): 2933-2948.

Inzelberg R, Kipervasser S, Korczyn AD. Auditory hallucinations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64 (4): 533-535.

Iodice V, Low DA, Vichayanrat E, Mathias CJ. Cardiovascular autonomic dysfunction in MSA and Parkinson's disease: similarities and differences. *J Neurol Sci.* 2011;310 (1-2): 133-138.

Irwin DJ, White MT, Toledo JB, Xie SX, Robinson JL, Van Deerlin V, et al. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol.* 2012;72 (4): 587-598.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79 (4): 368-376.

Jankovic J, Tintner R. Dystonia and parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2001;8 (2): 109-121.

Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842 (8): 1282-1294.

Jost WH. Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol.* 2003;250 Suppl 1: I28-30.

Jost WH. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's Disease. *J Neurol Sci.* 2010;289 (1-2): 69-73.

Jost WH, Augustis S. Severity of orthostatic hypotension in the course of Parkinson's disease: no correlation with the duration of the disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015;21 (3): 314-316.

Jost WH, Eckardt VF. Constipation in idiopathic Parkinson's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2003;38 (7): 681-686.

Kalf JG, Borm GF, de Swart BJ, Bloem BR, Zwarts MJ, Munneke M. Reproducibility and validity of patient-rated assessment of speech, swallowing, and saliva control in Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil.* 2011;92 (7): 1152-1158.

Kalf JG, de Swart BJ, Bloem BR, Munneke M. Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18 (4): 311-315.

Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry.* 2015;77 (1): 43-51.

Karpinar DP, Baliya MB, Kugler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N, et al. Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *Embo j.* 2009;28 (20): 3256-3268.

Katnik C, Guerrero WR, Pennypacker KR, Herrera Y, Cuevas J. Sigma-1 receptor activation prevents intracellular calcium dysregulation in cortical neurons during in vitro ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319 (3): 1355-1365.

Kilic U, Kilic E, Lingor P, Yulug B, Bahr M. Rifampicin inhibits neurodegeneration in the optic nerve transection model in vivo and after 1-methyl-4-phenylpyridinium intoxication in vitro. *Acta Neuropathol.* 2004;108 (1): 65-68.

Kim CE, Perez A, Perkins G, Ellisman MH, Dauer WT. A molecular mechanism underlying the neural-specific defect in torsinA mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107 (21): 9861-9866.

Kim SK, Kim YM, Yeum CE, Jin S-H, Chae GT, Lee S-B. Rifampicin Inhibits the LPS-induced Expression of Toll-like Receptor 2 via the Suppression of NF-kappaB DNA-binding Activity in RAW 264.7 Cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009;13 (6): 475-482.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392 (6676): 605-608.

Klette KL, DeCoster MA, Moreton JE, Tortella FC. Role of calcium in sigma-mediated neuroprotection in rat primary cortical neurons. *Brain Res*. 1995;704 (1): 31-41.

Knier B, Mitra MT, Logishetty K, Chaudhuri KR. Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease. *CNS drugs*. 2011;25 (3): 203-212.

Koike Y, Takahashi A. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 1997;38 Suppl 2: 8-12.

Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH. Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol*. 1992;32 (6): 782-788.

Lahrman H, Cortelli P, Hilz M, Mathias CJ, Struhal W, Tassinari M. EFNS guidelines on the diagnosis and management of orthostatic hypotension. *Eur J Neurol*. 2006;13 (9): 930-936.

Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 1999;46 (4): 598-605.

Larsen JP, Tandberg E. Sleep disorders in patients with Parkinson's disease: epidemiology and management. *CNS drugs*. 2001;15 (4): 267-275.

Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010;460 (2): 525-542.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003;23 (21): 7448-7459.

Leonard WJ, Wan CK. IL-21 Signaling in Immunity. *F1000Res.* 2016;5.

Lewitt PA. Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *The New England journal of medicine.* 2008;359 (23): 2468-2476.

Li DH, Havell EA, Brown CL, Cullen JM. Woodchuck lymphotoxin-alpha, -beta and tumor necrosis factor genes: structure, characterization and biological activity. *Gene.* 2000;242 (1-2): 295-305.

Li J, Zhu M, Rajamani S, Uversky VN, Fink AL. Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol.* 2004;11 (11): 1513-1521.

Li JQ, Tan L, Yu JT. The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. *Mol Neurodegener.* 2014;9: 47.

Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and cellular probes.* 2016;30 (6): 386-396.

Lin D, Jing X, Chen Y, Liang Y, Lei M, Peng S, et al. Rifampicin pre-treatment inhibits the toxicity of rotenone-induced PC12 cells by enhancing sumoylation modification of alpha-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485 (1): 23-29.

Lin MK, Farrer MJ. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome medicine.* 2014;6 (6): 48.

Liu Z, Lee J, Krummey S, Lu W, Cai H, Lenardo MJ. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nature immunology*. 2011;12 (11): 1063-1070.

Liu Z, Lenardo MJ. The role of LRRK2 in inflammatory bowel disease. *Cell research*. 2012;22 (7): 1092-1094.

Lotharius J, O'Malley KL. The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J Biol Chem*. 2000;275 (49): 38581-38588.

Low PA, Robertson D, Gilman S, Kaufmann H, Singer W, Biaggioni I, et al. Efficacy and safety of rifampicin for multiple system atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*. 2014;13 (3): 268-275.

Ludtmann MHR, Abramov AY. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2018;663: 86-90.

Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*. 2012;338 (6109): 949-953.

Lulla A, Barnhill L, Bitan G, Ivanova MI, Nguyen B, O'Donnell K, et al. Neurotoxicity of the Parkinson Disease-Associated Pesticide Ziram Is Synuclein-Dependent in Zebrafish Embryos. *Environmental health perspectives*. 2016;124 (11): 1766-1775.

Luth ES, Stavrovskaya IG, Bartels T, Kristal BS, Selkoe DJ. Soluble, prefibrillar alpha-synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem*. 2014;289 (31): 21490-21507.

Lytton J, Li XF, Dong H, Kraev A. K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;976: 382-393.

Maas JW, Yang J, Edwards RH. Endogenous Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Slows Synaptic Vesicle Recycling in Striatal Neurons. *Frontiers in synaptic neuroscience.* 2017;9: 5.

MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T, Inoue K, Abeliovich A. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron.* 2006;52 (4): 587-593.

Manzoni C, Lewis PA. LRRK2 and Autophagy. *Adv Neurobiol.* 2017;14: 89-105.

Marrazzo A, Caraci F, Salinaro ET, Su TP, Copani A, Ronsisvalle G. Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport.* 2005;16 (11): 1223-1226.

Mathers SE, Kempster PA, Law PJ, Frankel JP, Bartram CI, Lees AJ, et al. Anal sphincter dysfunction in Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 1989;46 (10): 1061-1064.

Matta S, Van Kolen K, da Cunha R, van den Bogaart G, Mandemakers W, Miskiewicz K, et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron.* 2012;75 (6): 1008-1021.

Maurice T, Gogvadze N. Sigma-1 (sigma1) Receptor in Memory and Neurodegenerative Diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;244: 81-108.

Maurice T, Su TP. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacology & therapeutics.* 2009;124 (2): 195-206.

Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, Ruoho AE. The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse

motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience*. 2010;167 (2): 247-255.

Mavlyutov TA, Epstein ML, Verbny YI, Huerta MS, Zaitoun I, Ziskind-Conhaim L, et al. Lack of sigma-1 receptor exacerbates ALS progression in mice. *Neuroscience*. 2013;240: 129-134.

Mavlyutov TA, Yang H, Epstein ML, Ruoho AE, Yang J, Guo L-W. APEX2-enhanced electron microscopy distinguishes sigma-1 receptor localization in the nucleoplasmic reticulum. *Oncotarget*. 2017;8 (31): 51317-51330.

McAuley JH, Gregory S. Prevalence and clinical course of olfactory hallucinations in idiopathic Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2012;2 (3): 199-205.

McGeer PL, McGeer EG. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol*. 2013;126 (4): 479-497.

Mehta SH, Morgan JC, Sethi KD. Sleep disorders associated with Parkinson's disease: role of dopamine, epidemiology, and clinical scales of assessment. *CNS Spectr*. 2008;13 (3 Suppl 4): 6-11.

Milanese C, Sager JJ, Bai Q, Farrell TC, Cannon JR, Greenamyre JT, et al. Hypokinesia and reduced dopamine levels in zebrafish lacking beta- and gamma1-synucleins. *J Biol Chem*. 2012;287 (5): 2971-2983.

Mindermann T, Landolt H, Zimmerli W, Rajacic Z, Gratzl O. Penetration of rifampicin into the brain tissue and cerebral extracellular space of rats. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1993;31 (5): 731-737.

Mishra AK, Mavlyutov T, Singh DR, Biener G, Yang J, Oliver JA, et al. The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *Biochem J*. 2015;466 (2): 263-271.

Mizuno Y, Hattori N, Matsumine H. Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1998;71 (3): 893-902.

Moehle MS, Webber PJ, Tse T, Sukar N, Standaert DG, DeSilva TM, et al. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *J Neurosci*. 2012;32 (5): 1602-1611.

Monderer R, Thorpy M. Sleep disorders and daytime sleepiness in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2009;9 (2): 173-180.

Monnet FP. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca²⁺: clinical and therapeutic relevance. *Biol Cell*. 2005;97 (12): 873-883.

Moon HE, Paek SH. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Experimental neurobiology*. 2015;24 (2): 103-116.

Mori T, Hayashi T, Hayashi E, Su TP. Sigma-1 Receptor Chaperone at the ER-Mitochondrion Interface Mediates the Mitochondrion-ER-Nucleus Signaling for Cellular Survival. *Plos One*. 2013;8 (10).

Murakami T, Shoji M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, et al. Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2004;55 (3): 439-442.

Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest*. 1993;91 (5): 2194-2206.

Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee S, Kaushal N, Matsumoto RR. Sigma-1 Receptors and Neurodegenerative Diseases: Towards a Hypothesis of Sigma-1 Receptors as Amplifiers of Neurodegeneration and Neuroprotection. *Adv Exp Med Biol.* 2017;964: 133-152.

Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, Cavendish JZ, Robson MJ, Scandinaro AL, et al. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci.* 2015;127 (1): 17-29.

Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985;36 (26): 2503-2508.

Niitsu T, Fujisaki M, Shiina A, Yoshida T, Hasegawa T, Kanahara N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fluvoxamine in patients with schizophrenia: a preliminary study. *Journal of clinical psychopharmacology.* 2012;32 (5): 593-601.

O'Sullivan SS, Evans AH, Lees AJ. Dopamine dysregulation syndrome: an overview of its epidemiology, mechanisms and management. *CNS drugs.* 2009;23 (2): 157-170.

O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Mov Disord.* 2008;23 (1): 101-106.

Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou YS, et al. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells.* 2010;15 (8): 887-900.

Omura T, Kaneko M, Okuma Y, Matsubara K, Nomura Y. Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013: 239854.

Onofrj M, Thomas A, Bonanni L. New approaches to understanding hallucinations in Parkinson's disease: phenomenology and possible origins. *Expert Rev Neurother*. 2007;7 (12): 1731-1750.

Ortega-Roldan JL, Ossa F, Amin NT, Schnell JR. Solution NMR studies reveal the location of the second transmembrane domain of the human sigma-1 receptor. *FEBS letters*. 2015;589 (5): 659-665.

Pagonabarraga J, Martinez-Horta S, Fernandez de Bobadilla R, Perez J, Ribosa-Nogue R, Marin J, et al. Minor hallucinations occur in drug-naïve Parkinson's disease patients, even from the premotor phase. *Mov Disord*. 2016;31 (1): 45-52.

Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004;44 (4): 595-600.

Pal A, Fontanilla D, Gopalakrishnan A, Chae YK, Markley JL, Ruoho AE. The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur J Pharmacol*. 2012;682 (1-3): 12-20.

Papapetropoulos S, Katzen H, Schrag A, Singer C, Scanlon BK, Nation D, et al. A questionnaire-based (UM-PD HQ) study of hallucinations in Parkinson's disease. *BMC neurology*. 2008;8: 21.

Park JH, Kang YJ, Horak FB. What Is Wrong with Balance in Parkinson's Disease? *J Mov Disord*. 2015;8 (3): 109-114.

Paus M, Kohl Z, Ben Abdallah NM, Galter D, Gillardon F, Winkler J. Enhanced dendritogenesis and axogenesis in hippocampal neuroblasts of LRRK2 knockout mice. *Brain Res.* 2013;1497: 85-100.

Penke B, Fulop L, Szucs M, Frecska E. The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology.* 2018;16 (1): 97-116.

Perez-Lloret S, Rey MV, Fabre N, Ory F, Spampinato U, Senard JM, et al. Factors related to orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18 (5): 501-505.

Peviani M, Salvaneschi E, Bontempi L, Petese A, Manzo A, Rossi D, et al. Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiol Dis.* 2014;62: 218-232.

Philipson O, Lord A, Gumucio A, O'Callaghan P, Lannfelt L, Nilsson LN. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *Febs j.* 2010;277 (6): 1389-1409.

Piao YS, Mori F, Hayashi S, Tanji K, Yoshimoto M, Kakita A, et al. Alpha-synuclein pathology affecting Bergmann glia of the cerebellum in patients with alpha-synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 2003;105 (4): 403-409.

Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron.* 2015;85 (2): 257-273.

Pigott K, Rick J, Xie SX, Hurtig H, Chen-Plotkin A, Duda JE, et al. Longitudinal study of normal cognition in Parkinson disease. *Neurology.* 2015;85 (15): 1276-1282.

Plowey ED, Cherra SJ, 3rd, Liu YJ, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 2008;105 (3): 1048-1056.

Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, Seppi K, Compta Y, Katzenschlager R, et al. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov Disord.* 2015;30 (2): 229-237.

Porter B, Macfarlane R, Walker R. The frequency and nature of sleep disorders in a community-based population of patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2008;15 (1): 50-54.

Prabhudesai S, Sinha S, Attar A, Kotagiri A, Fitzmaurice AG, Lakshmanan R, et al. A novel "molecular tweezer" inhibitor of alpha-synuclein neurotoxicity in vitro and in vivo. *Neurotherapeutics.* 2012;9 (2): 464-476.

Rassu M, Del Giudice MG, Sanna S, Taymans JM, Morari M, Brugnoli A, et al. Role of LRRK2 in the regulation of dopamine receptor trafficking. *PLoS One.* 2017;12 (6): e0179082.

Reijnders JS, Ehrt U, Weber WE, Aarsland D, Leentjens AF. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008;23 (2): 183-189; quiz 313.

Reynolds AD, Glanzer JG, Kadiu I, Ricardo-Dukelow M, Chaudhuri A, Ciborowski P, et al. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2008;104 (6): 1504-1525.

Ricaurte GA, Irwin I, Forno LS, DeLanney LE, Langston E, Langston JW. Aging and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Brain Res.* 1987;403 (1): 43-51.

Riedel O, Klotsche J, Spottke A, Deuschl G, Forstl H, Henn F, et al. Cognitive impairment in 873 patients with idiopathic Parkinson's disease. Results from the German Study on Epidemiology of Parkinson's Disease with Dementia (GEPAD). *J Neurol*. 2008;255 (2): 255-264.

Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, et al. Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787 (11): 1342-1351.

Rousseaux CG, Greene SF. Sigma receptors [σ Rs]: biology in normal and diseased states. *J Recept Signal Transduct Res*. 2016;36 (4): 327-388.

Ruscher K, Wieloch T. The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *J Pharmacol Sci*. 2015;127 (1): 30-35.

Saez-Atienzar S, Bonet-Ponce L, da Casa C, Perez-Dolz L, Blesa JR, Nava E, et al. Bcl-xL-mediated antioxidant function abrogates the disruption of mitochondrial dynamics induced by LRRK2 inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862 (1): 20-31.

Sakakibara R, Kishi M, Ogawa E, Tateno F, Uchiyama T, Yamamoto T, et al. Bladder, bowel, and sexual dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2011;2011: 924605.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990;54 (3): 823-827.

Schmidt HR, Zheng S, Gulpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC. Crystal structure of the human sigma1 receptor. *Nature*. 2016;532 (7600): 527-530.

Schrag A, Horsfall L, Walters K, Noyce A, Petersen I. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2015;14 (1): 57-64.

Schrag A, Jahanshahi M, Quinn NP. What contributes to depression in Parkinson's disease? *Psychological medicine.* 2001;31 (1): 65-73.

Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research.* 2005;569 (1-2): 29-63.

Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* 2004;6 (11): 1054-1061.

Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 2004;28 (1-2): 79-92.

Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* 2010;31 (3): 227-285.

Sousa SC, Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Lett.* 2003;543 (1-3): 179-183.

Stolze H, Klebe S, Zechlin C, Baecker C, Friege L, Deuschl G. Falls in frequent neurological diseases--prevalence, risk factors and aetiology. *J Neurol.* 2004;251 (1): 79-84.

Su TP, Hayashi T. Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction. *Curr Med Chem.* 2003;10 (20): 2073-2080.

Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31 (12): 557-566.

Sun Y, Vashisht AA, Tchieu J, Wohlschlegel JA, Dreier L. Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *J Biol Chem.* 2012;287 (48): 40652-40660.

Surmeier DJ, Halliday GM, Simuni T. Calcium, mitochondrial dysfunction and slowing the progression of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2017;298 (Pt B): 202-209.

Surmeier DJ, Schumacker PT. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 2013;288 (15): 10736-10741.

Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;139 Suppl 1: 318-324.

Takebayashi M, Hayashi T, Su TP. A perspective on the new mechanism of antidepressants: neuritogenesis through sigma-1 receptors. *Pharmacopsychiatry.* 2004;37 Suppl 3: S208-213.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives.* 2011;119 (6): 866-872.

Teng W, Wang L, Xue W, Guan C. Activation of TLR4-mediated NFkappaB signaling in hemorrhagic brain in rats. *Mediators Inflamm.* 2009;2009: 473276.

Thanvi BR, Lo TCN, Harsh DP. Psychosis in Parkinson's disease. *Postgrad Med J.* 2005;81 (960): 644-646.

Tolosa E, Compta Y. Dystonia in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2006;253 Suppl 7: Vii7-13.

Tomiyama T, Shoji A, Kataoka K, Suwa Y, Asano S, Kaneko H, et al. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J Biol Chem*. 1996;271 (12): 6839-6844.

Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, Boyle S, Kopan R, Kelleher RJ, 3rd, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107 (21): 9879-9884.

Tsai S-Y, Hayashi T, Mori T, Su T-P. Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*. 2009;9 (3): 184-189.

Tsoufas G, Geller DA. NF-kappaB in transplantation: friend or foe? *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2001;3 (4): 212-219.

Ubhi K, Rockenstein E, Mante M, Patrick C, Adame A, Thukral M, et al. Rifampicin reduces alpha-synuclein in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Neuroreport*. 2008;19 (13): 1271-1276.

Unal I, Emekli-Alturfan E. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. *J Clin Neurosci*. 2019;62: 1-6.

Urani A, Romieu P, Roman FJ, Maurice T. Enhanced antidepressant effect of sigma(1) (sigma(1)) receptor agonists in beta(25-35)-amyloid peptide-treated mice. *Behav Brain Res*. 2002;134 (1-2): 239-247.

Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, et al. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism,

PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 2001;68 ((4)): 895-900.

van der Merwe C, Jalali Sefid Dashti Z, Christoffels A, Loos B, Bardien S. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur J Neurosci*. 2015;41 (9): 1113-1125.

Wang XJ, Xu JX. Possible involvement of Ca²⁺ signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2005;376 (2): 127-132.

Wang Y, Liu W, Yang J, Wang F, Sima Y, Zhong ZM, et al. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *Neurotoxicology*. 2017;58: 103-109.

Waseem S, Gwinn-Hardy K. Pain in Parkinson's disease. Common yet seldom recognized symptom is treatable. *Postgraduate medicine*. 2001;110 (6): 33-34, 39-40, 46.

Wegleiter K, Hermann M, Posod A, Wechselberger K, Stanika RI, Obermair GJ, et al. The sigma-1 receptor agonist 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) protects against newborn excitotoxic brain injury by stabilizing the mitochondrial membrane potential in vitro and inhibiting microglial activation in vivo. *Exp Neurol*. 2014;261: 501-509.

White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, Ladu MJ. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis*. 2005;18 (3): 459-465.

Wilke HJ, Neef P, Caimi M, Hoogland T, Claes LE. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24 (8): 755-762.

Williams-Gray CH, Evans JR, Goris A, Foltynie T, Ban M, Robbins TW, et al. The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort. *Brain*. 2009;132 (Pt 11): 2958-2969.

Williams-Gray CH, Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW, Barker RA. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain*. 2007;130 (Pt 7): 1787-1798.

Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJ, Barker RA. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS drugs*. 2006;20 (6): 477-505.

Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 (10): 4194-4199.

Wood BH, Bilclough JA, Bowron A, Walker RW. Incidence and prediction of falls in Parkinson's disease: a prospective multidisciplinary study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72 (6): 721-725.

Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189 (4): 605-609.

Xiong N, Long X, Xiong J, Jia M, Chen C, Huang J, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Critical reviews in toxicology*. 2012;42 (7): 613-632.

Yan R, Liu Z. LRRK2 enhances Nod1/2-mediated inflammatory cytokine production by promoting Rip2 phosphorylation. *Protein & cell*. 2017;8 (1): 55-66.

Yang S, Bhardwaj A, Cheng J, Alkayed NJ, Hurn PD, Kirsch JR. Sigma receptor agonists provide neuroprotection in vitro by preserving bcl-2. *Anesthesia and analgesia*. 2007;104 (5): 1179-1184.

Yano H, Bonifazi A, Xu M, Guthrie DA, Schneck SN, Abramyan AM, et al. Pharmacological profiling of sigma 1 receptor ligands by novel receptor homomer assays. *Neuropharmacology*. 2018;133: 264-275.

Yeo L, Singh R, Gundeti M, Barua JM, Masood J. Urinary tract dysfunction in Parkinson's disease: a review. *International urology and nephrology*. 2012;44 (2): 415-424.

Yong MH, Fook-Chong S, Pavanni R, Lim LL, Tan EK. Case control polysomnographic studies of sleep disorders in Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6 (7): e22511.

York GK. The history of James Parkinson and his disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;381: 35.

Yuan JS, Wang D, Stewart CN, Jr. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J*. 2008;3 (1): 112-123.

Yulug B, Hanoglu L, Kilic E, Schabitz WR. RIFAMPICIN: an antibiotic with brain protective function. *Brain Res Bull*. 2014;107: 37-42.

Zakharov SD, Hulleman JD, Dutseva EA, Antonenko YN, Rochet JC, Cramer WA. Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels. *Biochemistry-US*. 2007;46 (50): 14369-14379.

Zeng X, Couture LA. Pluripotent stem cells for Parkinson's disease: progress and challenges. *Stem cell research and therapy*. 2013;4 (2): 25.

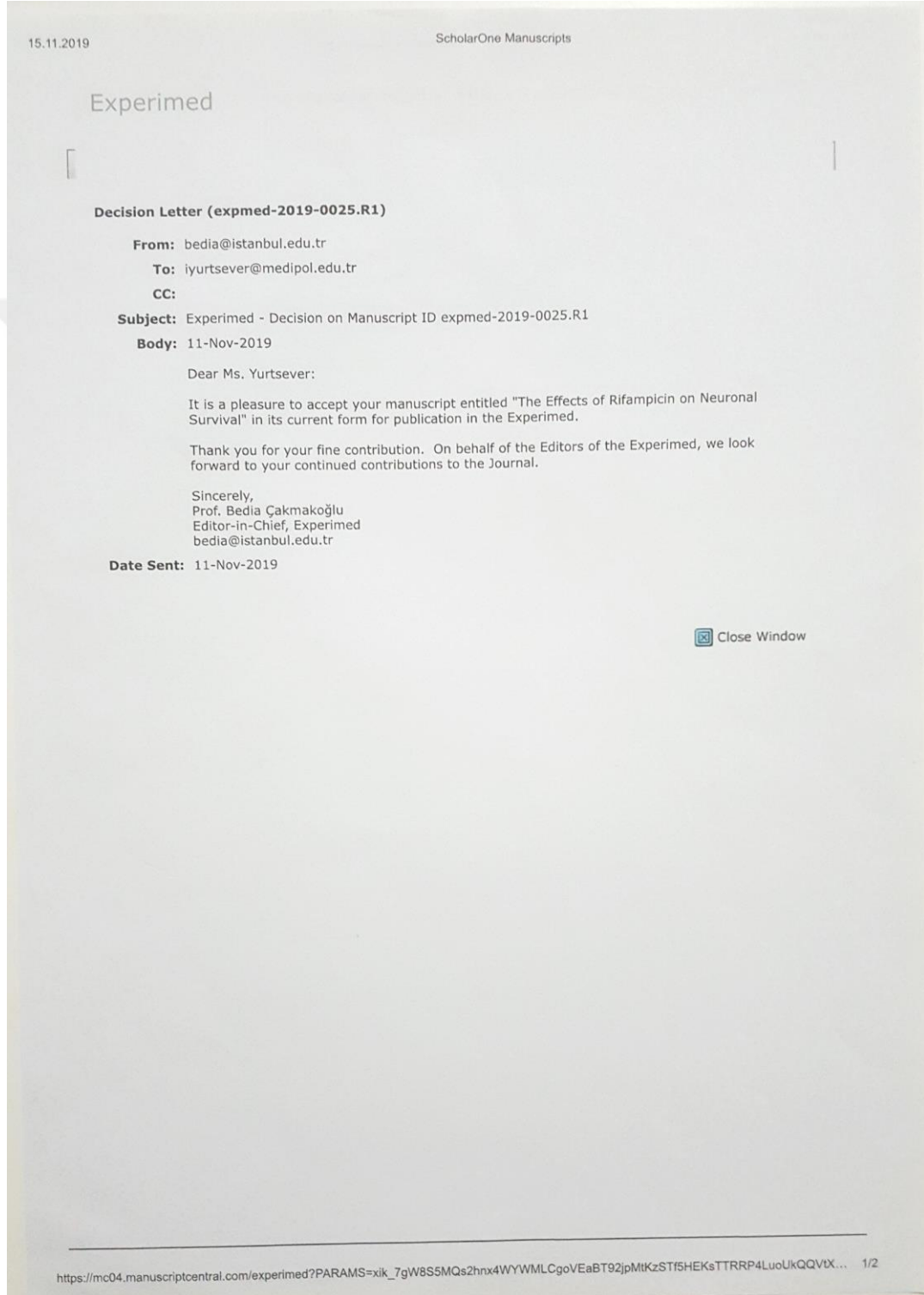
Zhang XJ, Liu LL, Jiang SX, Zhong YM, Yang XL. Activation of the zeta receptor 1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells. *Neuroscience*. 2011;177: 12-22.

Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44 (4): 601-607.



9. EKLER

EK-1. Yayın Kabul Yazısı



EK-2. Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	22.2018.mar	ÇALIŞMA: TEZ		
	PROJE ADI	Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Deneysel Parkinson Modelinde Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizmalar ile Çeşitli Nöroprotektif Ajanların Etkilerinin İncelenmesi			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Ebru Işık ALTURFAN			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 05.02.2018 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Gökse ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	İlknur	Soyadı	Yurtsever
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	05.07.1982
Uyruğu	T.C.	Tel	0553 221 0217
E-mail	yurtseverilknur@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2010
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2005
Lise	Kazım Karabekir Lisesi	2000

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Öğr. Gör.	İstanbul Medipol Üniversitesi	2013-....

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #									
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	YÖKDİL
									81,25

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Adobe Photoshop Cs6	Zayıf

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.