

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



PESTİSİT FLUOPYRAM' İN PARKİNSON HASTALIĞI İLE BAĞLANTISININ ARAŞTIRILMASI

Hanan Waleed Muhamad Al SAMMARRAIE
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-7350 proje numarası ile
desteklenmiştir**

ISPARTA – 2021

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:16.02.2021 -11:00

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK
SDÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE: Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
SDÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE: Dr. Öğr. Üyesi İlkay ARMAĞAN
SDÜ, Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD

ÜYE: Prof. Dr. Ayşegül MUTLU GÜLMEMİŞ
MAKÜ. Fen Edebiyat Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü Moleküler Hücre Biyoloji ABD

ÜYE: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ
MAKÜ. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji ABD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından, yapımına ve yazımına kadar geçen tüm aşamalarda herhangi bir etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar dahilinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı ve son olarak tezin yapılması ve yazımı sırasında patent ve telif hakları ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

“Pestisit Fluopyram’ın Parkinson Hastalığı ile Bağlantısının Araştırılması” adlı doktora tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez önerisi ve yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Hanan Waleed Muhamad Al SAMMARRAIE

İmza

Danışman

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

İmza

ÖZET

PESTİSİT FLUOPYRAM' İN PARKİNSON HASTALIĞI İLE BAĞLANTISININ ARAŞTIRILMASI

Parkinson hastalığı (PH) titrek felç adı altında tanımlanmış olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Klinik olarak istirahat tremoru, dişli çark rijiditesi, bradikinezi ve postural reflekslerde bozulma ile karakterizedir. Patolojik olarak beynin Substansiya nigra pars kompakta (SNpc) bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve α -sinüklein (α -Syn) proteinlerinin birikmesiyle oluşan Lewy cisimcikleri (LB) ile karakterizedir. PH'nın en büyük risk faktörü Pestisitlerdir. Pestisit Rotenone (ROT) mitokondrial kompleks I inhibe ederek ve oksidatif strese yol açarak in vivo ve in vitro koşullarda PH'ya neden olduğu tespit edilmiştir. Pestisit Fluopyram (Flu) ise mitokondriyal kompleks II'yi inhibe ederek PH'ya yol açtığı tahmin edilmektedir. Bu bağlamda ROT ile farelerde Parkinson modeli oluşturduk ve elde edilen sonuçları Flu ile karşılaştırarak PH açısından değerlendirdik.

Çalışmamızda erkek ve dişi Swiss albino fareler kullanılarak ROT 2 mg/kg/gün, DMSO ve Flu (0.5, 1 ve 2 mg/kg/gün) dozlar farelere günlük subkutan (SC) olarak uygulanmış ve deney 21 günün sonunda sonlandırılmıştır. Değerlendirmelerde Motor Fonksiyon Testi, Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar, Comet Metodu ve QRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlarımızda bütün gruplarda hayvan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Motor fonksiyon testinde ROT grubunda anlamlı olarak azalma görülürken, yüksek dozda uygulanan Flu değerinde de anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir. ROT ve Flu grubuna ait beyin dokuları incelendiğinde SN'de LB'leri gibi önemli yapısal değişiklikler görülmüştür. α - β Syn ile işaretlemeye ROT ve Flu grubuna ait beyin dokuları incelendiğinde daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlenirken TH ile işaretlemeye ise daha az miktarda pozitif işaretlenme gözlenmiştir. uygulanan ROT kan ve beyin dokusunda DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Flu dozuna bağlı olarak kan dokusunda DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir. Beyin doku sonuçlarına göre Flu uygulanan gruplarda DNA hasarı gözlemlenmemiştir ROT uygulandığında SNCA mRNA ekspresyon seviyelerini artırırken, TH ve DJ-1 mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir. Flu ve ROT sonuçları karşılaştırıldığında, SNCA mRNA ekspresyon seviyeleri artmıştır fakat anlamlı bulunmamıştır. TH ve DJ-1 mRNA ekspresyon seviyelerinin azalmış olduğu tespit edildi ve ROT sonuçlarımızda farklar gözlemlendi. Sonuçlarımızda farelerde Flu dozuna bağlı olarak PH fenotipinin indüklendiği görüldü. Flu ile özellikle yüksek dozlarda ve farklı yöntemler ile daha fazla araştırılma yapılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Parkinson hastalığı (PH), ROT, Flu

ABSTRACT

Investigation of The Relationship between The Pesticide Fluopyram and Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease defined as shaky stroke. It is clinically characterized by; resting tremor, cogwheel rigidity, bradykinesia, and postural reflex impairment. It is also pathologically characterized by Lewy bodies (LB) and formed by the loss of dopaminergic neurons in the Substantia nigra pars compact (SNpc) region of the brain and the accumulation of α -synuclein (α - Syn) proteins. Pesticides are the hugest risk factor of PD. They cause the formation of PD. by using different mechanisms. They also permanently disrupt the function of the electron transport complex (ETC) located in the mitochondria. Researches show that the pesticide Rotenone (ROT) causes PD in vivo and in vitro conditions by inhibiting mitochondrial complex I and causing oxidative stress. Fluopyram (Flu) is a frequently used pesticide that causes mitochondrial toxicity like ROT. When literature searched, it makes one think about a connection with PD. it seems that there is no available study on Flu and PD. Flu is one of the fungicides utilized in Isparta city at a high rate for all planting types. The Flu is a mitochondrial complex II inhibitor. The inhibition of mitochondrial complexes is the main pathway in the PD mechanism, therefore complex II inhibitor pesticide may lead to the same result. In this context, we created a Parkinson model in mice with ROT and compare the result of Flu with this Rot to be sure whether that lead to Parkinson or not. Swiss albino male and female mice were the testing animals of our study. Positive control (ROT Parkinson model, 2 mg/kg/day), negative control (Solvent only, DMSO), and Flu (0.5, 1 and 2 mg/kg/day) were administered to mice daily doses subcutaneously (SC). The experiment got completed after 21 days. Motor Function Test, Histochemical and Immunohistochemical Studies, Comet Method, and QRT-PCR were utilized in the study as well.

In our results, no statistically significant changes were observable in animal weights in all groups. In the motor function test, a significant decrease in the ROT group was observable. On the other hand, a significant decrease was detected specifically in the Flu value which was applied at high doses. When the brain tissues that belong to the ROT and Flu tested groups got examined, all-important structural changes such as LBs got observed in the SN. When brain tissues belonging to ROT and Flu groups were examined in α - β Syn labeling, more positive markings were observable. When the brain tissues belonging to the ROT and Flu groups were examined in TH labeling, less positive markings were observed. ROT have been found to cause DNA damage in blood and brain tissues. It has been determined that groups with Flu applied in the brain not have DNA damage. ROT was observed to increase SNCA mRNA expression levels while decreasing TH and DJ-1 mRNA expression levels. Comparing the Flu and ROT results, SNCA mRNA expression levels increased but were not significant. With the detection of decreased TH and DJ-1 mRNA expression levels, the difference were shown in our ROT results. The study results have proved that in mice Flu's induce of PD phenotype depends on Flu doses. It is recommended to do more research with Flu especially in high doses and with different methods.

Keywords: Parkinson's disease (PD), ROT, Flu

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilminden ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı her konuda daha iyi sonuçlar almam için desteğini her zaman hissettiğim değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Eğitimim boyunca her konuda büyük katkısı olan, gerek sevgisiyle gerek yardımı ile desteğini esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Tıbbi Biyoloji bölümüne başladığım günden bugüne kadar bilgisini, desteğini ve yardımını her zaman hissettiren değerli hocam Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a

Doktora eğitimim boyunca her zaman ve her konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ'e,

Bu tezin önemli bir kısmını oluşturan, deney hayvanları laboratuvar çalışmasında büyük emeği geçen değerli hocam Öğ.Gör. İbrahim ONARAN'a,

Tez jürimde ve izleme komitemde yer alarak bana destek olan sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İlkay ARMAĞAN'a ve Prof.Dr.Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'a,

Birlikte başladığımız bu yolda geçen uzun zaman içerisinde hep yanımda olan, zorlukları da başarıları da birlikte karşıladığım, bu uzun süreçte emek veren arkadaşım; Arş. Gör. Vehbi Atahan TOGAY'a,

Tezimin planlanması ve çalışılması sürecinde her türlü desteği veren arkadaşlarım Arş. Gör.Dr. Gülçin YAVUZ TÜREL'e ve Arş. Gör.Dr. Dilek AŞCI ÇELİK'e

Tezimde Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalara yardım eden, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e,

Birlikte okumaya başladığım, aynı odayı paylaştığım, her zorlukta yanımda olan, iş yükümü azaltmak için ellerinden gelen çabayı gösteren arkadaşım Arş. Gör. Yasemin ÇİÇEK'e,

Doktora eğitimime başladığım zaman yardımını esirgemeyen ve neşesiyle enerji veren arkadaşım Elif İŞILDAR SÖNMEZ'e,

Güzel günler paylaştığım arkadaşlarım Demet KAÇAROĞLU'a ve Didem ÖZKAHRAMAN'a,

Hayatımın hediyesi küçük kız kardeşim Esmâ SELÇUK'a,

Her zaman sevgi ve desteklerini esirgemeyen, tüm öğrenim hayatım boyunca her türlü fedakârlıkta bulunan, beni bugünlere getiren, emeklerinden dolayı minnettar olduğum; annem, babam ve kardeşlerime (Mohamed ve Mustafa), yengemlere (Nibras'a ve Afrah'a),

Çiçeklerim yeğenlerim'e,

Misafirperverliği için Türkiye Cumhuriyeti ve Türkiye'de doktora eğitimi imkânı verdiği için Irak Devletime,

Bu çalışmayı TDK-2019-7350 BAP proje numarası ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	ii
BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Parkinson hastalığı (PH).....	4
2.1.1. Tanım.....	4
2.1.2. PH' nın Sınıflaması.....	5
2.1.3. PH'nın Oluşma Nedeni.....	6
2.1.4. PH'nın Anatomi ve Patofizyoloji.....	6
2.2. PH Etiyolojisi.....	11
2.2.1.Genetik Faktörler.....	11
2.2.2.Yaşlanma.....	16
2.2.3.Çevresel Faktörler.....	17
2.3. Pestisit Maruziyeti ve PH.....	17
2.4. Pestisitlerin, Mitokondrial Disfonksiyon ile PH Oluşumundaki Rolü.....	19
2.5. PH'nın Oksidatif Stres Patogenezi.....	20
2.6. FLU Nedir.....	22
2.6.1 FLU Metabolizması.....	24
2.6.2. FLU Toksisitesi.....	25
2.6.3. Akut Toksisite.....	26

2.6.4. Kronik Toksisite.....	26
2.6.5. Nörotoksisite.....	26
2.6.6. Üreme ve Gelişim Toksisitesi.....	27
2.6.7. Genotoksisite.....	27
2.6.8.Kanserojenite.....	27
2.7. FLU'nun Çevresel Kaderi.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1 Hayvan Modeli.....	29
3.2 Parkinson Modeli ve Deney Dizaynı.....	29
3.3 Tez projesi kapsamında aşağıda gerçekleştirilen çalışmalar.....	30
3.3.1 Motor Fonksiyon testi (Silindir Prosedürde Spontan Aktivitesi).....	30
3.3.2 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Numune Hazırlıkları ve Değerlendirmeleri	31
3.3.3 Comet Metodu.....	37
3.3.4 QRT-PCR	42
3.3.4.1 RNA İzolasyonu.....	44
3.3.4.2 cDNA Sentezi.....	45
3.3.4.3 QRT-PCR Analizi.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Vücut Ağırlıklı Bulgular.....	47
4.2. Motor Fonksiyon testinin Bulguları.....	47
4.3. Histokimyasal Bulgular.....	48
4.4. İmmünoistokimyasal Bulgular.....	53
4.5. DNA Hasarı.....	60
4.6. QRT-PCR Sonuçları.....	64
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	77
EKLER.....	95
EK A.Etik kurul Onay	
ÖZGEÇMİŞ.....	96

KISALTMALAR

AADC: Aromatik amino asit dekarboksilaz

AE C656948-7- hidroksi: Flu-7-hidroksi

AE C656948-7-OH-GA: [3-kloro-5- (triflorometil) piridin-2-il] -2- {[2 (triflorometil) -benzoil] amino} etil beta-D glucopyranosiduronic asit

AE C656948-8-hidrtoksi: Flu-8-hidroksi

AE C656948-8-OH-GA: [3-kloro-5- (triflorometil) piridin-2-il] -1 - {[2- (triflorometil) -benzoil] amino} etil beta-D glucopyranosiduronic asit

AE C656948-benzamid-SA sülfürik asit: AE C656948-benzamid-SA

AE C656948-dihidroksi glukuronik asit: AE C656948-di-OH-GA

AE C656948-fenol-glukuronik asit: AE C656948-fenol-GA

AE C656948-hidroksietil- glukuronik asit: AE C656948-hidroksietil-GA

AGEs : Glikasyon son ürünleri

BG: Bazal gangliyonlar

cDNA: komplementer DNA

C / EBPβ :CCAAT güçlendirici bağlayıcı proteinler

CaMKII: Ca²⁺ + / kalmodulin bağımlı protein kinaz II

Çizgili cisim: Corpus striatum

DA: Dopamin

DAT: Dopamin Transporter

DMSO: Dimetilsülfiksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP : Deoksi nükleotid tri fosfat

EBPH: Erken başlangıçlı Parkinson hastalığı:

ETC: Elektron transport kompleksi

FADH₂: Flavın Adenin Dinükleoitit hidrojen

Flu: Fluopyram

GABA: Gama amino bütirik asit

GBPH: Otozomal dominant geç başlangıçlı PH

GPe: Globus pallidus eksternus

GPi: Globus pallidus internus

HPSS: Hank's balanced salt solution

H₂O₂: hidrojen peroksit

İP: intraperitoneal

İPH: İdiyopatik Parkinson Hastalığı

kb : Kilobaz

KCl: Potasyum klorür

kDa: Kilodalton

KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat

L: Litre

LB: Lewy cisimcikleri

LMA: Düşük erime noktaları agaroz

Maneb: Ethylene-1,2- bisdithiocarbamate

mg: Miligram

mL: Mililitre

mM: Milimolar

µg: Mikrogram

µM: Mikromolar

miRNA: Mikro RNA

miR-133b: MicroRNA133b

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

mRNA: Haberci RNA

mTOR: Rpmisinin memeli hedefi:

ng: Nanogram

nm: Nanometre

nmol: Nanomol

Na₂HPO₄: Disodyum Hidrojen Fosfat

NAC: Amiloid olmayan bileşen

NaCl: Sodyum klorür

NAD: Nikotinamid dinükleotit

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen

NaOH: Sodyum hidroksit

NMA: Normal erime noktalı agaroz

ODPH: Parkinson hastalığı otozomal dominant

ORPH: Parkinson hastalığı otozomal resesif

Parakuat: N₂-dimetil-4,4'-bipiridinium

PBS: Fosfat tampon tabletleri

PCB: Poliklorlu bifenil

PH: Parkinson hastalığı

QRT-PCR: Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNS: Nitrojen türleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

ROT: Rotenone

SC: Subkutan

SH-SY5Y: insan nöroblastom hücre hattı

SN: Substansiya nigradaki

SNARE: Çözünür NSF ataşman Proteini

SNpc: Substansiya nigra pars kompakta

SNr: Substansiya nigra pars retikülata

Synaptobrevin-2 /VAMP2: Veziküler bağı membran proteini 2

S6K1: ribozomal p70 S6 kinaz

TH: Tirozin hidroksilaz

UPS: Ubikütün-Proteozom Sistem

VMAT2: Veziküler MonoaminTaşıyıcı 2

α -Syn: Alfa-sinüklein

α - β Syn: Alfa- Beta Syn

4E-BP1: Ökaryotik başlama faktörü 4E (eIF4E) bağlayıcı protein 1

8-OHdG:8-hidroksi-2-deoksiguanozin

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. İdiyopatik Parkinson Hastalığı (İPH) Tanı Kriterleri.....	4
Tablo 2.2. PH 'nın Sınıflaması.....	5
Tablo 2.3. PH'yla ilişkili olduğu düşünülen lokuslar.....	16
Tablo 2.4. Flu'nun özellikleri.....	23
Tablo 2.5. Flu İle Yapılan Ekotoksikolojik Testler.....	25
Tablo 3.1 Ana Çalışmanın Deney Grupları.....	29
Tablo 3.2. Comet metodunda kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar.....	37
Tablo 3.3 Comet metodunda kullanılan cihazlar.....	37
Tablo 3.4 Stok fosfat tamponunun hazırlanışı.....	37
Tablo 3.5 HPSS tamponunun hazırlanışı.....	38
Tablo 3.6 Stok lizis çözeltisinin hazırlanışı.....	38
Tablo 3.7 Alkali elektroforez tamponunun hazırlanışı.....	38
Tablo 3.8 Primer Dizilimleri.....	43
Tablo 3.9 Çalışmada kullanılan QRT- PCR programı.....	46
Tablo 4.1. Ortalama Hayvan Ağırlıkları.....	47
Tablo 4.2. Histolojik yapısal değişimlerin gruplara göre derecelendirilmesi.....	49
Tablo 4.3. α -Syn ve TH İşaretlenme Dereceleri	53
Tablo 4.4. Kan doku ortalama DNA hasarı.....	61
Tablo 4.5. Beyin doku ortalama DNA hasarı.....	61
Tablo 4.6. DMSO grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri.....	64
Tablo 4.7. ROT 1mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri.....	64
Tablo 4.8. Flu 0.5 mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri.....	64
Tablo 4.9. Flu 1 mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri.....	65
Tablo 4.10. Flu 2 mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kontrol Normal SN ve PH’de SN’de pigmentasyon kaybı olduğunu göstermektedir.....	4
Şekil 2.2. LB.....	6
Şekil 2.3. BG’lerin yerleşimi.....	7
Şekil 2.4: a) BG’lerin normal işleyiş mekanizmaları, b) SNc’deki dopaminerjik çıkışların kesintiye uğraması, c) Striatal GABAerjik nöronların hasarı.....	8
Şekil 2.5. α -Syn’in konformasyonel dengesinin bozulması.....	9
Şekil 2.6. A ve B: DA metabolizmasında α -Syn’in fizyolojik rolü.....	9
Şekil 2.7. (a) SNCA gen yapısı, α - Syn (b) mRNA ve (c) protein.....	11
Şekil 2.8. α - Syn proteinin yapısı	12
Şekil 2.9. TH mekanizması.....	12
Şekil 2.10. LRRK2 proteinin yapısı ve PH ile ilişkili patojenik mutasyonları.....	13
Şekil 2.11. UPS çalışma mekanizması	14
Şekil 2.12. PH’nin oksidatif stres patogenezi.....	21
Şekil 2.13. Fluopyram’nın Kimyasal Yapısı.....	23
Şekil 2.14. Radyo-işaretli Fenil halkası ve piridil halkası Flu.....	24
Şekil 2.15. Hayvanlarda Flu’ın Metabolik Yolu.....	24
Şekil.3.1 Comet Metodu basamakları.....	39
Şekil 3.2 Open Comet Programı ile Değerlendirilmiş Cometler.....	41
Şekil 3.3 Programdan elde edilebilen parametreler.....	42
Şekil 3.4 SYBR-Green boya prensibi.....	42
Şekil 4.1. Motor Fonksiyon Grafiği. Kontrol ve DMSO grubuna göre anlamlılık işaretleri (* ve **).	48

Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait beyin doku kesiti. Normal histolojik yapılar gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra hemorajik alanlar ve nöropil vakuolizasyonu kısmen de olsa bazı alanlarda mevcuttur (H-E, x400).....	50
Şekil1 4.3. DMSO grubuna ait beyin doku kesiti. Normal histolojik yapılar gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra hemorajik alanlar ve nöropil vakuolizasyonu kısmen de olsa bazı alanlarda mevcuttur (H-E, x400).....	50
Şekil1 4.4. ROT verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarla kıyaslandığında fazla oranda histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı oklar; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; LB'lerini; turuncu oklar; hemorajik alanları ve mavi ok; mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir (H-E, x400).....	51
Şekil1 4.5. Flu (0.5) verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarına kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Bulgular; ROT Verilen gruba göre azalmıştır. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, kırmızı oklar; LB'lerini; turuncu ok; hemorajik alanları ve mavi ok; mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir (H-E, x400).....	51
Şekil1 4.6. Flu (1) verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarına kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Bulgular; ROT Verilen gruba göre azalmış, Flu 0.5 grubuna göre artmıştır. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı oklar; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; LB'lerini ve turuncu oklar; hemorajik alanları göstermektedir (H-E, x400).....	52
Şekil1 4.7. Flu (2) verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarına kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Bulgular; ROT grubu ile kıyaslandığında eşit oranda iken, Flu 0.5 ve Flu 1 grubuna göre ise artmış durumdadır. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı ok; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; LB'lerini ve turuncu oklar; hemorajik alanları göstermektedir (H-E, x400).....	52
Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.....	54
Şekil 4.9. DMSO grubuna ait doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400....	54
Şekil 4.10. ROT grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.....	55
Şekil 4.11. Flu 0.5 grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.....	55
Şekil 4.12. Flu 1 grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.....	56
Şekil 4.13. Flu 2 grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.....	56

Şekil 4.14.	Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması.....	57
Şekil 4.15.	DMSO grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması.....	57
Şekil 4.16.	ROT grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması.....	58
Şekil 4.17.	Flu 0.5 grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması.....	58
Şekil 4.18.	Flu 1 grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması.....	59
Şekil 4.19.	Flu 2 grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması.....	59
Şekil 4.20.	Araştırmada yer alan kan gruplarından örnek comet fotoğrafları.....	60
Şekil 4.21.	Araştırmada yer alan Beyin doku gruplarından örnek comet fotoğrafları.....	60
Şekil 4.22.	Kan Gruplarına ait ortalama kuyruk DNA Yüzdesi parametresi.....	62
Şekil 4.23.	Beyin Gruplarına ait ortalama kuyruk DNA Yüzdesi parametresi.....	62
Şekil 4.24.	Kan dokuda kuyruk DNA Yüzdesi parametresinin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.25.	Beyin dokuda kuyruk DNA Yüzdesi parametresinin karşılaştırılması...	63
Şekil 4.26.	SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin kat değişim grafiği.....	66

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya nüfusu, çok hızlı ve kontrolsüz bir şekilde artmaktadır. Buna rağmen bu artışı karşılayacak oranda ürün sağlanamamakta ve gıda ihtiyacı giderek artmaktadır. Bu sorunun giderilmesi, birim alanda verimi ve kalitesi yüksek, maliyeti oldukça düşük ürünler elde etmek; en önemlisi de çevre kirliliğine neden olmayacak önlemlerin alınması ile mümkündür. Bugün yurdumuzda ve dünyada ürün artışını sağlayabilmek için çeşitli zararlılarla mücadelede "pestisit" adı verilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanılmasıyla gerçekten de ürün miktarında artışlar gözlenmektedir. Ancak bu tarım ilaçları suda, toprakta, meyve ve sebzeler üzerinde uzun süre bozulmadan kalarak çevre kirliliğine neden olmakta ve dolayısıyla besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşarak çeşitli zararlar oluşturmaktadır (1,2,3).

Pestisitler genellikle aktif etkene göre sınıflandırılır. İnsektisitler (böcek öldürücüler), akarisitler (akar öldürücüler), fungusitler (mantar öldürücüler), herbisitler, rodentisitler, pisisitler, mollusitler, nemasitler ve avisitler bunlara örnek verilebilir. Türkiye’de tarım ilaçları kullanımına, pestisit gruplarına göre bakıldığında; en önemli grubun %47 ile insektisit olduğu, bunu %24 ile herbisitlerin izlediği, fungusitlerin ise %16 payı olduğu gözlemlenmektedir (4).Elma ve kiraz üretiminde önemli bir yere sahip Isparta ilinde de yoğun tarım ilacı kullanımı söz konusudur. Özellikle elma üretiminde en çok kullanılan pestisit grubunun %74,32 ile fungusitler olduğu, bunu %23,43 ile insektisitlerin, %2,25 akarisitler izlediği bildirilmiştir (5).

Genel olarak pestisitlerin sağlık üzerinde akut ve kronik etkileri bulunmaktadır. Akut etkiler ağız, solunum ve deri yoluyla vücuda girerek kendini hemen göstermekte iken; kronik etkiler, kanser, doğum anormallikleri, sinir sistemi zararları (nörotoksisite ve nörodavranışsal bozukluklar) ve uzun dönemde oluşan benzer diğer yan etkilere neden olmaktadır (6). Bu hastalıklardan biri de nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığı (PH)’dır (7). PH ve pestisit bağlantısı yoğun olarak çalışılmaktadır. Ancak pestisit sayısının çokluğu göz önüne alındığında halen çalışmalar yetersizdir.

PH, Alzheimer hastalığından sonra görülen en yaygın nörodejeneratif bir hastalıktır (8). 60 yaş üstü popülasyonun yaklaşık %1 lik kısmını etkilemektedir (9). Hastalık, beynin Substansiya nigra pars kompakta (SNpc) bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve α -sinüklein (α -Syn) proteinlerinin birikmesiyle oluşan Lewy cisimcikleri (LB) ile karakterizedir (10). Dopaminerjik nöronların yaklaşık %60-65' inin kaybı sonucu dopamin (DA) seviyesinde meydana gelen %80-85'lik azalma motor fonksiyonlarda bozukluklara yol açarak istirahat tremoru, bradikinezi, kaslarda sertlik (rijidite) ve duruş bozukluğu gibi semptomların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (11).

PH'nın temel bir klinik tanımlaması yapılamamıştır. Genetik, yaşlanma, çevresel faktörler (pestisitler) gibi hastalığın oluşmasında rolü olduğu düşünülmektedir (12).PH'nın yaklaşık %85'i sporadik, %10-15'i ise ailesel formdadır ve hastalığın ancak %5'lik kesimi tek gene bağlı (Mendel tipi kalıtım) bozukluklardan kaynaklanmaktadır (13). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu PH oluşumuna neden olduğu öne sürülen birçok gen belirlenmiştir. SNCA (14), TH (15), LRRK2 (16), Parkin (17), DJ-1 (18) gibi birçok gende mutasyonlar bulunmuş ve PH ile ilişkili oldukları belirlenmiştir.

PH'nın en büyük risk faktörü olan pestisitler farklı mekanizmalar kullanarak hastalığın oluşumuna sebebiyet vermektedir. Pestisitler, mitokondrial fonksiyonda yer alan elektron transport kompleksi'ni (ETC) kalıcı olarak bozmaktadır (19). İnsektisit (MPTP) (20, 21), İnsektisit Rotenon (ROT) (22), Herbisit (Parakuat) (23) ve İnsektisit (Dieldrin) (24), Fungisit (Maneb) gibi maddelerin mitokondrial kompleks I veya III'ü inhibe etmesiyle PH'ya neden olduğu tespit edilmiştir. Bozulmuş mitokondrial fonksiyon oksidatif strese yol açarak hücre içi bileşenlerin hasar görmesine ve hücre ölümüne sebebiyet veren bir takım hücresel yollara etki etmektedir. Oksidatif stres, PH'da nigral dopaminerjik hücre ölümünün patojenik mekanizmalarından birisidir (25). Bu gözleme dayanarak kimyasal yapısı yukardaki pestisitlere benzeyen bazı maddelerin çevrede ya da bazı gıdalarda bulunabileceği ve hastalıktan sorumlu olabileceği görüşü doğmuştur. Konuyla ilgili yoğun araştırmaların sürdürülmesine karşın, bugün için kanıtlanmış kesin bir görüş yoktur. Bu doğrultuda planlanan tez çalışmasında özellikle Isparta bölgesinde çok fazla yetiştirilen elmanın ve diğer tarım ürünlerinin üretiminde yoğun olarak kullanılan

Fluopyram (Flu) pestisitine maruziyetin PH ile bağlantısının araştırılması planlanmıştır. Flu, (396.72 g/mol, C₁₆H₁₁ClF₆N₂O, CAS Numarası: 658066-35-4) geniş spektrumlu bir fungusittir. Birçok bahçivanlık ve tarla bitkilerinde Ascomycete ve Deuteromycete grubuna mensup mantarların oluşturduğu hastalıklara karşı koruma sağlamak için geliştirilmiştir. Flu, mantar mitokondriyal solunum zincirindeki süksinat dehidrojenaz (kompleks II) inhibisyonu ile elektron taşınmasını bloke eder (26,27,28). Dieldrin, MPTP, ROT gibi mitokondriyal toksisiteye yol açan maddelerin PH'ye sebep olduğu göz önüne alındığında (29) oldukça sık kullanılan bir pestisit olan Flu'ın bu hastalıkla bir bağlantısı olup olmayacağı akla gelmektedir.

Tarım ve Orman Bakanlığı Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığının (2019) verilerine göre Flu, 3 farklı formülasyonda, onlarca farklı zararlıya karşı elma, armut, ayva, kiraz, fındık, şeftali, kaysı, bağ, domates, biber, kabak, kavun ve karpuz üretiminde kullanılmak üzere ruhsatlıdır (30). Literatür taraması yapıldığında Flu ve PH ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısı ile yapılacak çalışmanın literatür için bir ilk olma özelliği taşıyacağına ve bu alanda önemli bir boşluğu dolduracağına inanmaktayız. Isparta'da yüksek oranda kullanılan fungusitlerden biri de Flu'dur ve her tür bitki için kullanılmaktadır. Flu'un, mitokondriyal kompleks II inhibitörü olması ve mitokondriyal komplekslerin inhibisyonunun PH mekanizmasında başlıca yolak olması kompleks II inhibitörü bir pestisit de aynı sonuca yol açıp açmayacağını akla getirmektedir. Bu bağlamda;

1: ROT ile farelerde Parkinson modeli oluşturduk elde edilen sonuçlar Flu ile karşılaştırdık ve PH açısından değerlendirdik.

2: Flu'un farklı dozlarda farelerde PH'ye ve seçici nöron kaybına neden olup olmadığını immünohistokimyasal olarak belirledik ve Parkinson açısından değerlendirdik.

3: SN'deki dopaminerjik nöronların ve kan hücrelerinin DNA hasarını tespit ederek karşılaştırdık. SN'da dopaminerjik nöron kaybına sebep olabilecek bir DNA hasarının olup olmadığını ortaya koyduk.

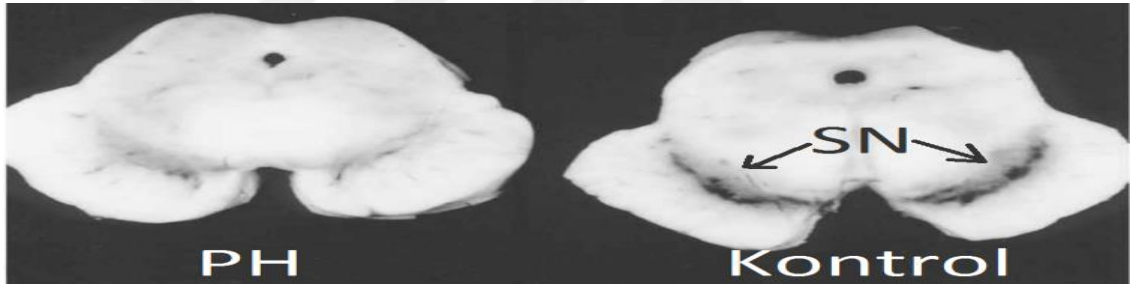
4: SN'de PH ile ilişkili olduğu belirlenmiş SNCA, TH, LRRK2, Parkin ve DJ-1, 5 genin ekspresyon seviyelerinde değişiklik olup olmadığını QRT-PCR ile araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson hastalığı (PH)

2.1.1. Tanım

PH ilk olarak 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından shaking palsy (titrek felç) adı altında tanımlanmış olan nörodejeneratif bir hastalıktır (31). Klinik olarak istirahat tremoru, dişli çark rijiditesi, bradikinezi ve postural reflekslerde bozulma ile karakterizedir. Patolojik olarak beyin SNpc bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve α -Syn proteinlerinin birikmesiyle oluşan LB ile karakterizedir (10). Tanı kardinal belirti ve bulguların oluşturduğu klinik tabloya göre konur (şekil 1) (Tablo 1) (32).



Şekil 2.1. Kontrol Normal SN ve PH'de SN'de pigmentasyon kaybı olduğunu göstermektedir (33).

Tablo 2.1. İdiyopatik Parkinson Hastalığı (İPH) Tanı Kriterleri ⁽³⁴⁾

1. adım: İPH tanısı	2. adım: Dışlama kriterleri	3.adım: İPH için destekleyici kriterler
• Bradikinezi Aşağıdakilerden en az biri: • Rijidite • 4-6 Hz. Dinlenme tremoru • Postüral dengesizlik (Vizüel, vestibüler,serebellar, proprioseptif disfonksiyona bağlı olmayan)	İnme öyküsü ile Parkinsonizme yol açabilecek inme, kafa travması, ensefalit, nöroleptik ilaç kullanımı, hidrosefali veya beyin tümörü gibi belli bir neden saptanması • Supranükleer bakış paralizileri • Serebellar bulgular • Erken şiddetli otonomik yetmezlik • Erken şiddetli demans • Yüksek doz levodopaya kötü yanıt	Aşağıdakilerden en az üçünün bulunması • Unilateral başlangıç • Hastalığın başladığı tarafta bulguların asimetric olarak daha belirgin devam etmesi • Levodopaya çok iyi (%70-100) yanıt olması • Levodopaya bağlı diskinezilerin ağır olması • Klinik seyrin 10 yıl ya da daha fazla devam etmesi

2.1.2. PH' nın Sınıflaması

PH en sık rastlanan parkinsonizm tipidir (31). PH bazal gangliyonlar (BG) da özellikle de SN hücre dejenerasyonuna bağlı, motor ve motor olmayan bulguların ortaya çıktığı bir klinik sendromdur. Parkinsonizm ise ekstrapiramidal sistem hasarıyla oluşan birçok klinik belirtiyi içeren daha karmaşık bir bozukluktur (35).

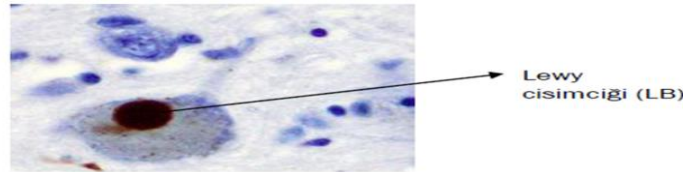
Parkinsonizm etyolojik açıdan dejeneratif ve semptomatik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 2). Dejeneratif kökenli Parkinsonizmin temel nedeni, BG'lerde oluşan hücre kaybı olup başka etyolojik etken bulunamamaktadır. Semptomatik Parkinsonizmde ise neden doğrudan ya da ikincil olaylarla BG'lerde lezyonların meydana gelmesidir ve Parkinsonizm bulguları başka patolojilerin sonucunda ortaya çıkmaktadır (36).

Tablo 2.2. PH 'nın Sınıflaması

DEJENERATİF	SEMPTOMATİK
• İPH (PH) (37). • Parkinson artı sendromları - Multisistem atrofisi - Progresif supranükleer felç - Kortikobazal dejenerasyon - Lewy cisimcikli demans • Parkinsonizmin eşlik edebildiği diğer hastalıklar • Spinoserebellar ataksi • Huntington hastalığı • Bilateral striapallidodentat kalsinozis (Fahr hastalığı) • Hemiparkinson-hemiatrofi sendromu • Frontotemporal demansparkinsonizm kompleksi • Dentatorubropallidoluysian atrofi • Pallidal dejenerasyonlar • Striatal nekrozla giden mitokondrial hastalıklar • Pantotenat kinaza eşlik eden dejenerasyon • Nöroakantositoz	• Vasküler • Normal basınçlı hidrocefali • Yer kaplayıcı lezyonlar • İlaça bağlı • İntoksikasyonlar • Enfeksiyonlar • Metabolik nedenler • Kafa travması, dementia pugilistica • Demyelinizan hastalıklar • Psikojenik Parkinsonizm (36)

2.1.3. PH'nın Oluşma Nedeni

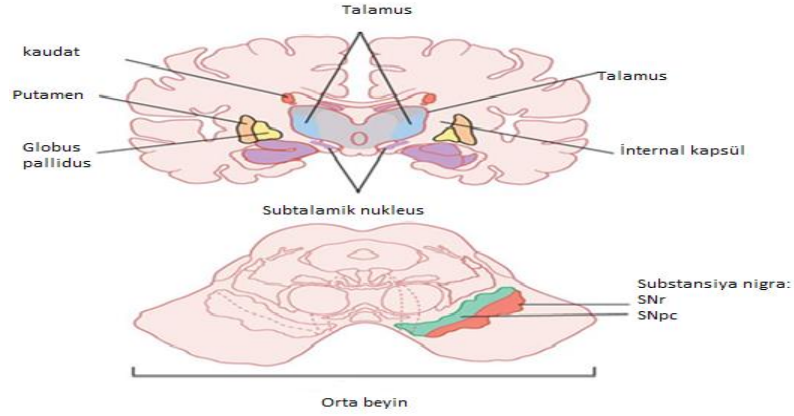
PH yavaş ilerleyici nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. Beyinde SN (siyah madde veya kara çekirdek) adı verilen özel sinir hücrelerinin oluşturduğu çekirdeğin işlevini tam olarak yerine getirememesinden kaynaklanır (31). SN, SNpc ve pars retikülata (SNr) olarak adlandırılan iki çekirdekten oluşur. SNpc DA salgılar ve depolar. Bu hücreler “corpus striatum”un (çizgili cisim) sinir hücreleriyle bağlantılıdır. SNpc tarafından salgılanan DA, sinir lifleri aracılığıyla corpus striatuma taşınır ve oradaki hücreler arasında kimyasal iletim görevi yapar. SN ile vücut hareketlerini kontrol eden diğer beyin bölgeleri arasındaki mesajları iletir. SNpc hücrelerinin hasara uğradığı durumlarda DA salgılanması ve depolanması kesintiye uğrar. Bunun sonucu olarak da parkinsonizm belirtileri gözlenir (38,39). İkinci patolojik durumları LB oluşturmaktadır. LB ilk defa 1912 yılında nörolog Friedrich Lewy tarafından PH ile bağlantılı olarak tanımlanmıştır (40). LB asıl olarak yanlış katlanmış α -Syn proteininin birikmesi sonucu oluşan cisimcikler ile karakterizedir (32). Yeni çalışmalarda LB'lerin yapısında α -Syn parkin, Ubikülin gibi çeşitli proteinler ve nörofilamentler bulunmaktadır (41). LB ilgili sinir hücrelerini ve sinir hücresi bağlantılarını yok eder. Bu bağlantının bozulması hareket ve dikkat kontrolünde zayıflamaya sebep olur DA nöronlarının dejenerasyonuna neden olabilmektedir (şekil 2) (42).



Şekil 2.2. LB (41).

2.1.4. PH'nın Anatomi ve Patofizyolojisi

Ekstrapiramidal sistemin önemli parçası olan BG ön beyinde, talamusun lateralinde ve her iki hemisferde yer alan subkortikal çekirdektir (43,44). BG'lerin ana bölümlerini kaudat nukleus, putamen ve globus pallidus (eksternus ve internus) oluşturur. Diğer iki subkortikal çekirdek, subtalamik nukleus ve SN. BG'lerin spesifik kısımlarından olmadıkları halde, bu sistemle fonksiyonel olarak ilgilidirler (şekil.3) (45).



Şekil 2.3. BG'lerin yerleşimi (46).

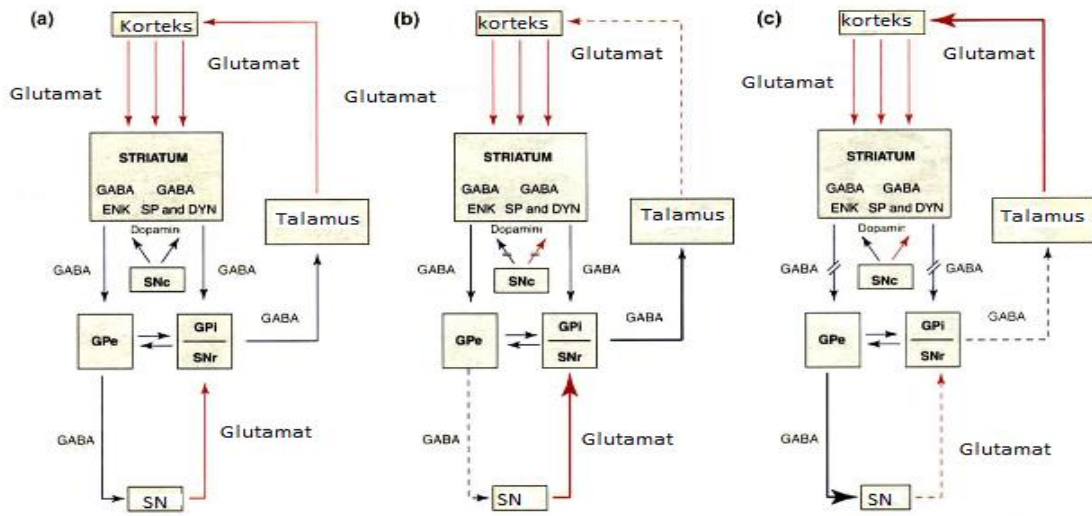
BG'lerin aktivitesi duyuşal korteks, talamus ve beyin sapından alınan bilgilerle başlatılır. Çıktıları ise globus pallidus aracılığıyla, serebral korteksin motor alanlarının ve beyin sapındaki diğer motor merkezlerinin aktivitelerini etkiler. Böylece BG'ler serebral korteksi etkileyerek kas hareketlerini düzenler (47,48). BG'lerin afferent girdilerinin önemli bir kısmı frontal korteksten (motor korteks, premotor alan, suplamenter motor alan, singulat korteks, dorso-lateral ve orbitolateral frontal korteks), bir kısmı da parietal korteksten gelir. Bu afferent sinyallerin BG'lere giriş yaptığı tek kapı, striatum (putamen, nukleus kaudatus ve ventral striatum)'dur. BG'lerde işlem gören bilgilerin çıkış yeri de Globus pallidus internus (GPI) ve SNr'dir. BG'lerin efferent sinyallerinin çok büyük bir kısmı talamusa, küçük bir kısmı ise beyin sapındaki pedinkülopontin nukleusa gider.

Serebral korteks ve BG'ler arasında biri direkt diğeri de indirekt olmak üzere iki yol vardır. Direkt olanı korteksin aktivitesini arttırırken, indirekt olanı inhibe eder. Direkt yolda korteksten putamene giren sinyaller, BG içindeki diğer yollara uğramadan doğrudan çıkış kapısına, yani Gpi ve SNr'ye yönelirler ve talamus üzerinden kortekse geri dönerler. İndirekt yolda ise korteksten putamene giren sinyaller Globus pallidus eksternus (GPe), subtalamik nukleus (STN) ara istasyonlarından geçtikten sonra çıkış kapısına, yani Gpi/SNr'ye yönelirler ve talamus üzerinden kortekse geri dönerler. Striatuma gelen ve gama amino bütirik asit (GABA) içeren inhibe edici bilgi, direkt yol üzerinden SNr/Gpi kompleksini inhibe eder. Böylece talamusun inhibe edici sistemi

inhibe edildiği için talamokortikal yol harekete geçer. Bu, motor hareketin oluşabilmesi için gerekli olan yoldur. Korteks inhibitesi ile indirekt yol üzerinden işlev gören striatal nöronlar GABA ile önce GPe'yi inhibe eder. GPe normalde GABA içerir ama striatum tarafından inhibe edildiği için GABA'yı subtalamik nükleusa iletemez. Serbest kalan STN glutamat ile Gpi ve SNr'yi uyarır.

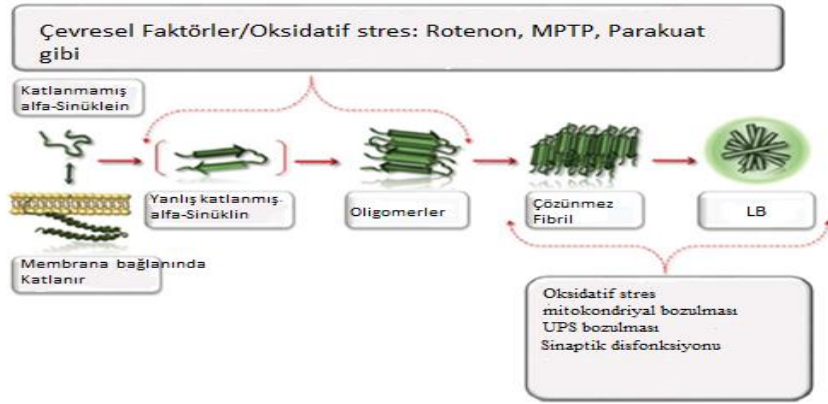
GABA içeren Gpi/SNr uyarılarak, GABA'yı talamusa iletir ve talamus inhibe olur. Dolayısıyla glutamat içeren talamokortikal yol harekete geçemez ve korteks uyarılamaz. Böylece hareketin oluşması engellenmiş olur. Amaca yönelik bir hareket direkt ve indirekt yolların denge içinde çalışmasıyla sağlanır. SNpc'dan striatuma gelen DA, normalde direkt yolun aktivitesini D1 reseptörleri üzerinden artırırken, indirekt yolun aktivitesini D2 reseptörleri üzerinden azaltır.

İlk patolojik durumda, Nigrostriatal yol dejenerasyonuna bağlı olarak striatuma DA azalması striatal internöronlar arasında kolinerjik aktivitede artışa neden olur. DA eksikliği ile direkt/indirekt yol arasındaki denge, indirekt yolda aktivite artışını lehine çevirir. Böylece talamokortikal yolun inhibisyonu artar ve kortekse uyarıcı bilgi gitmesi engellenir. Bu da korteksten kortikospinal projeksiyonların uyarılmasını engeller ki PH'nın temel bulgularından hareket ve tonus bozukluklarının ortaya çıkmasına neden olur (38,39). (Şekil 4 a,b,c).



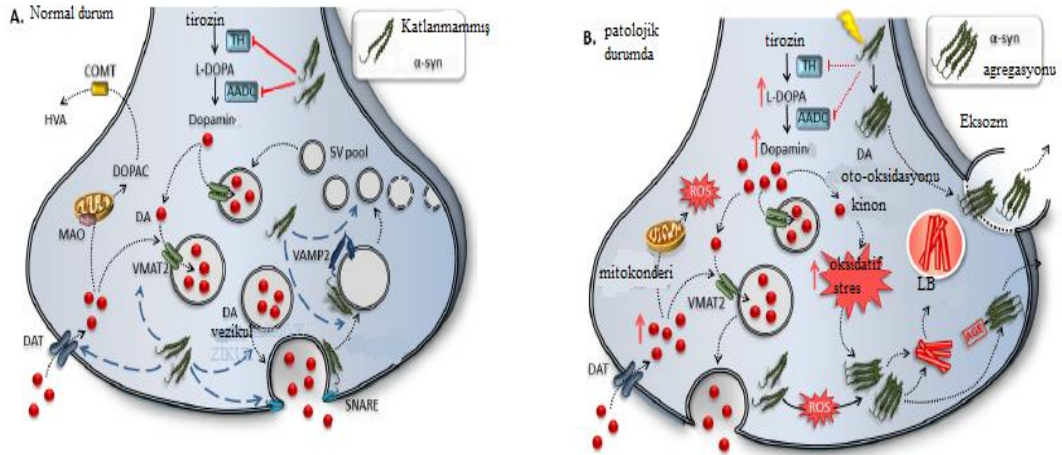
Şekil 2.4:a) BG'lerin normal işleyiş mekanizmaları,b) SNc'deki dopaminerjik çıkışların kesintiye uğraması, c) Striatal GABAerjik nöronların hasarı (49).

İkinci patolojik durumda ise α -Syn proteininin önemli rol oynadığı LB oluşumu gerçekleşmektedir. α -Syn doğal olarak katlanmamış bir monomerdur. Lipid membranlara bağlandığında α -heliks sekonder yapısını kazanır. Fizyolojik bir durumda, bu iki uyum arasında dinamik bir denge vardır. Çeşitli çevresel faktörler (ROT, MPTP ve Parakuat) ve oksidatif stres gibi etkenler α -Syn'nin yanlış katlanmasına neden olur (Oligomerler, çözünmez fibril şeklinde agregalar) ve LB oluşur. Bu anormal konformasyonal durum α -Syn 'de genelleşmiş bir hücre bozulmasına neden olarak sinaptik disfonksiyona, oksidatif strese, mitokondriyal bozulmaya, Ubikülin-Proteozom Sistem (UPS) bozulmasına (50) ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Şekil 5)(51).



Şekil 2.5. α -Syn'in konformasyonel dengesinin bozulması (51).

α -Syn'in fizyolojik fonksiyonu tam bilinmemekle beraber DA oluşumunda ve salınımında önemli rolü büyüktür (Şekil.6.ave b) (52).



Şekil 2.6. A ve B: DA metabolizmasında α -Syn'in fizyolojik rolü (53).

Nigrostriyatal nöronlar üzerinde inhibisyon etkisi yapan DA çok önemli bir nörotransmitter maddedir. Presinaptik membranda üretilir ve daha sonra veziküller halinde postsinaptik membrana aktarılır. α -Syn'in DA oluşumunda rolü büyüktür. Bu olayda öncelikle tirozin hidroksilaz (TH) enzimi aktive olur. Aktiflesen TH, tirozini L-DOPA'ya dönüştürür. L-DOPA de aromatik amino asit dekarboksilaz (AADC) enzimi ile DA'ya çevrilir ve veziküllere depolanır (54). Normal şartlar altında α -Syn, TH ve AADC' in aktivitesini inhibe ederken ve Dopamin Transporter (DAT) ve Veziküler Monoamin Taşıyıcı 2 (VMAT2)'nin aktivitesini artırır. DAT, DA'nın sinaptik aralıktan geri alınımını sağlarken VMAT2 de nöron içerisinde DA'nın veziküllere alımını sağlar (53). TH'a bağlanan α -Syn aktivasyonu inhibe ederek DA sentezini yavaşlatır. Bu olay sonucunda DA sentezi dengede kalır ve depolanır (54). α -Syn'nin N-terminal ucu hücre zarındaki fosfolipidlere bağlanır. C-terminali ise (VAMP2) proteinini bağlayarak (SNARE) kompleksini oluşturur. Böylece DA salınımını kontrol eder .(Sekil.6.A)(89).

α -Syn, mutasyonlar veya çevresel faktörlerin etkisiyle yanlış katlanıp fonksiyonunu kaybeder. Agregasyon sonucunda DA sentezi kontrol edilemez (Sekil 6. b). Yine α -Syn agregasyonu ile istenmeyen sitozolik DA artar ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Bu agregatlar ya LB oluşturur ve sinir hücresinde kalır veya α -Syn şekerle birleştiğinde oluşan zararlı bileşikler ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşmasını neden olur veya eksozomlar olarak hücreler arasında iletebilir ve DA nöronlarının dejenerasyonuna neden olabilmektedir.

ROT (55), MPTP ve metamfetamin gibi toksik maddeler α -Syn'in aşırı ekspresyonuna neden olarak hücre patolojisine, hücre ölümüne ve nörolojik bozulmaya yol açmaktadır. Buna paralel olarak, α -Syn'in aşırı ekspresyonu nöroprotektif özelliklere sahipken DA tarafından üretilen oksidatif hasara karşı koruma sağlamaktadır (53). Ayrıca α -Syn'in aşırı ekspresyonu, Spinal Musküler Atrofi'nin (SMA) Smn2B^{-/-} fare modelinde fenotip ve nöromusküler eklemi patolojisini iyileştirmektedir (55).

2.2. PH Etiyolojisi

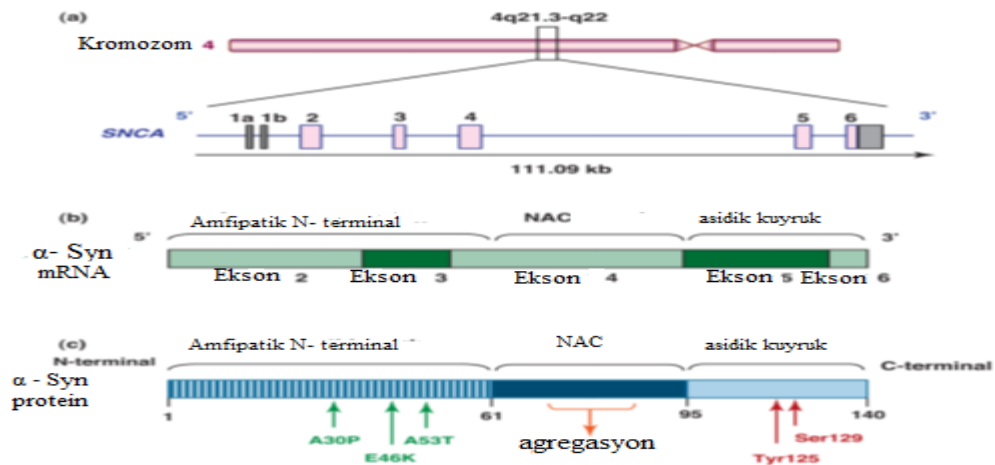
2.2.1. Genetik Faktörler

PH, otozomal dominant (ODPH) ve otozomal resesif (ORPH) olmak üzere iki gruba ayrılır. Otozomal dominant geç başlangıçlı PH (GBPH) olup ortalama 52 yaşlarında ortaya çıkarken, Otozomal resesif PH'da başlangıç yaşı 45'ten düşüktür. Bu gruba dahil edilen juvenil PH'nin başlangıç yaşı ise 21'in altındadır (56). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu PH oluşumuna neden olduğu öne sürülen birçok gen belirlenmiştir ve bu genlerde farklı gen mutasyonu saptanmıştır (Tablo 5) (31).

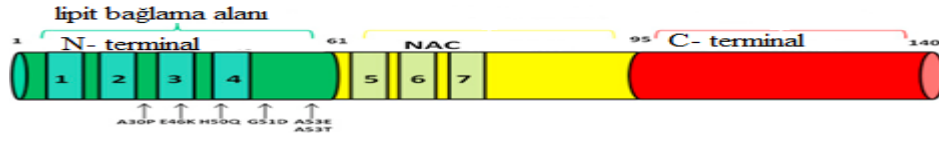
SNCA geni (PARK 1 ve 4)

SNCA geni kromozom 4q21.3-q22 yer alır. 111 kb'lık bir bölgeyi kapsar ve yedi ekzondan oluşur. α -Syn proteinlerini kodlar (57). Sinüklein ailesinin bir üyesi olan alfa, beta ve gama sinüklein içeren 140 aminoasitlik küçük bir proteindir (58). α -Syn presinaptik terminallerde lokalizedir ve nöronal sitozolde toplam proteinlerin % 1'ini temsil etmektedir (59).

α -Syn üç alandan oluşur: Amfipatik N- terminal, protein agregasyonu sağlayan amiloid olmayan bileşen (NAC) ve asidik kuyruğu kalsiyuma bağlanarak protein agregasyonunu engelleyen C - terminal (şekil.7) (60).



Şekil 2.7. (a) SNCA gen yapısı, α - Syn (b) mRNA ve (c) protein (60).

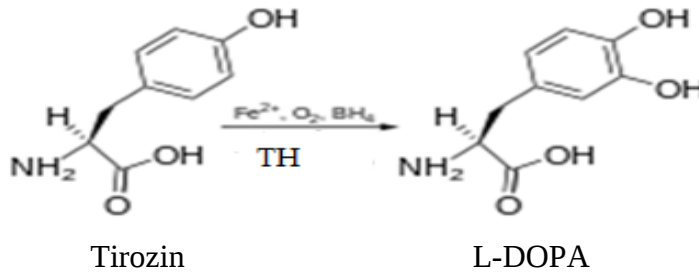


Şekil 2.8. α - Syn proteinin yapısı (61).

Proteinin lipit bağlama alanı, amfipatik N- terminal ve NAC bölgesini içermektedir. Yedi 11 mer tekrarına ayrılır, KTKGEV konsensüs dizisine sahiptir (Şekil.8) (50). α -Syn, PH'nın hem sporadik hem de ailesel formlarında yer almaktadır (14). SNCA geninde duplikasyonlar, triplikasyonlar (62) ve N- terminal'da A53E, A53T, A30P, E46K, H50Q ve G51D, yanlış anlamli mutasyonları ODPH 'ına neden olmaktadır (64, 65, 66 ve 67). A53T mutasyonu, ilk tanımlanan ve en sık görülen SNCA mutasyonudur. Bu mutasyonu taşıyan bireylerde genellikle erken başlangıçlı PH(EBPH) görülmektedir (68). A18T, A30P, A29S mutasyonlarının (GBPH) formuyla ilişkili olduğu; E46K, G50Q, G51D, A53T mutasyonlarının ise daha ağır, hızlı ilerleyen parkinsonizme neden olduğu bildirilmiştir (69). C-terminal bölgesindeki fosforilasyon serin 129'da (70) ve tirozin 125'deki (71) LB'lerde tespit edilmiştir (69).

TH geni

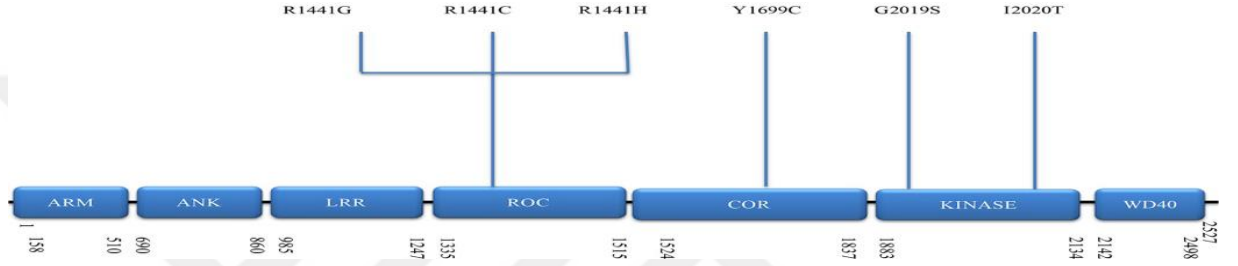
TH geni insan kromozom 11p15.5' te yer alır (72) ve TH enzimi üretir. Bu enzim oksijen atomlarından biri kullanarak tirozin molekülünü hidrosillenerek L-DOPA elde edilir. L-DOPA ise AADC enzimi ile DA'e çevrilir ve vesiküllerde depolanır (54). Metirozin gibi bazı ilaçlar TH'yi inhibe eder. Bu engelleme nedeniyle ön-madde eksikliği beyinde DA tükenmesine neden olabilir (73). TH enzimi DA sentezinde ve metabolizmasında dolayısı ile Parkinson mekanizmasında görev almaktadır (Şekil.9) (80).



Şekil 2.9. TH mekanizması (74).

LRRK2 (PARK8)

LRRK2 geni ilk olarak Funuyama ve arkadaşları tarafından Japon bir ailede tanımlanmıştır. Otozomal dominant 19 parkinsonizm ile alakalı olan bu gen 12p11.2-q13.1 bölgesinde haritalanmıştır (56). LRRK2 Lösin zengin tekrarlayan kinaz 2 üretmektedir (Şekil.10) (112).



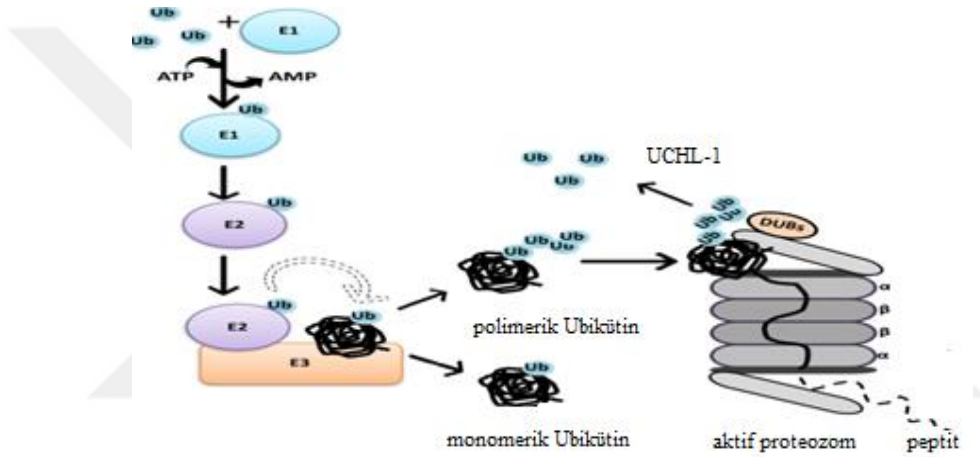
Şekil 2.10. LRRK2 proteinin yapısı ve PH ile ilişkili patojenik mutasyonları (10).

ROCO süper ailesinin bir üyesi olan LRRK2, büyük bir proteindir (2527 amino asit). ARM, Armadillo; ANK, Ankyrin tekrar; LRR, lösin bakımından zengin tekrar; ROC, Ras kompleks protein: GTPase, COR, ROC'nin C-terminali, kinaz, WD-40 alanlarından oluşur (10). LRRK2'nin fizyolojik fonksiyonları iki ayrı enzimatik alandan oluşur: fosforilasyonu katalize eden kinaz alanı ve GTP-GDP hidrolizinde rol oynayan ROC-GTPase alanıdır (114).

LRRK2'nin fizyolojik işlevi büyük oranda bilinmemekle birlikte LRRK2 ile ilgili son çalışmalar nörit büyümesi, hücre iskeleti bakımı, vezikül kaçakçılığı otofajik protein yıkımı ve bağışıklık sistemi gibi hücresel fonksiyonlarda rol oynadığını göstermektedir (115). LRRK2, α -Syn ve tau bozukluğu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, sinaptik fonksiyon bozukluğu ve otofaji-lizozomal sistem arasında bağlantı kurarak PH patojeni içinde yer almaktadır (28,90). Bugüne kadar, bu genin 20 mutasyonundan sadece altı tanesinin patojenik olduğu gösterilmiştir ve LRRK2 geninin en yaygın mutasyonu G2019S'dir ailesel PH'nin % 5-6'sı ve sporadik vakaların % 1-2'sini oluşturur (56).

Parkin ve DJ-1

Parkin (17) ve DJ-1 (18) genleri PH oluşumunda tespit edilmiştir. Bu genlerin proteinleri UPS'de önemli rol oynamaktadır (111,126,130,137,140,145). Bu gen proteinleri birleşerek hatalı katlanmış, bozulmuş proteinlerin UPS tarafından yıkımını artıran bir protein kompleksi oluştururlar. Dolayısıyla PH oluşumu ile ilişkili olan Parkin ve DJ-1'in mutantları aynı zamanda UPS'nin fonksiyonunun yitirilmesine neden olmaktadır (17, 94).



Şekil 2.11. UPS çalışma mekanizması (122).

UPS, en önemli protein degradasyon yollarından biridir. Normal şartlarda hücrel kontrol mekanizmaları sayesinde sağlıklı nöronlarda protein agregatları oluşmaz. Hücre içinde bozulmuş ve hatalı katlanmış proteinlerin agregasyonu iki farklı şekilde olmaktadır: Mutasyona uğramış, anormal ve okside olmuş proteinlerin degrades edilemeyecek kadar fazla olması, proteozomal sistem fonksiyonunun azalması ya da bozulmasıdır. Hücreleri bu iki şekilde oluşabilen hatalı proteinlerden temel olarak kurtaran en önemli mekanizma; UPS'dir (şekil.11) (123). UPS'de protein degradasyonunun ilk aşaması; yanlış katlanmış proteinlerin ubiquitin adı verilen 76 aa.lik bir proteinle işaretlenmesidir. Bu işaretleme için görevli olan 3 enzim grubu vardır. E1 enzimi, ubiquitin aktive edici enzimdir, ubiquitin, E1 ile kompleks oluşturarak aktif forma geçer. ubiquitin E1 kompleksi üzerinden ubiquitin, E2 enzimi olarak bilinen ubiquitin konjuge edici enzime aktarılır. ubiquitin ligaz enzimi olarak bilinen E3 enzimi ise E2

enzimini yıkarak hedef proteinin ubikütince işaretlenmesini sağlar. Ubikütinlenmiş olan hedef protein proteozomal kompleks tarafından parçalanarak degrade edilir. Ubikütinasyon işlemi sadece protein degradasyonunda önemli değildir. Ayrıca endositoz, protein-protein etkileşimleri, hücreler arası iletişim, inflamatuvar sinyalleri, otofaji ve DNA tamiri gibi pek çok non-proteolitik fonksiyonlarda görevlidir (43). Daha önemli gelişme ise PH patogenezinde yer alan UPS fonksiyonunun bozulmasının genetik bulgularla açıklanmasıdır.

Parkin geni (Park2), 6q25-27 bölgesinde haritalanmıştır (124). Parkin geni yaklaşık 500 kilobazlık (kb) bir bölgeyi kaplayan ve 12 kodlayıcı ekzonu bulunan bir gendir (56). Parkin geni E3 ubikütin ligaz üretir. α -Syn yıkılmasını düzenleyerek birikmesini önler (54, 56) (Sekil11). Şimdiye kadar bu gende 39 nokta mutasyonu ve 29 farklı ekzon içi değişiklik (delesyonlar, duplikasyonlar ve triplikasyonlar) tanımlanmıştır (56). Juvenil PH vakalarının % 49'unda ve 45 yaş altı sporadik vakaların %18'inde Parkin mutasyonu tespit edilmiştir (17). Mutant parkin, doğru şekilde α -Syn ile etkileşimde olamadığı için α -Syn'in ubikütinle işaretlenip degradasyonu yapılamaz ve LB'lerinde α -Syn birikimine neden olur. Ayrıca mutant parkinin nöronları sitotoksik etkilere karşı savunmasız hale getirdiği tespit edilmiştir (107).

DJ-1 (PARK7), kromozom 1p36 yer alır (132). (Protein / nükleik asit deglikaz) (DJ-1) üretir ve farklı fonksiyona sahiptir. Glikasyon önleyici olarak görev yapar. Proteinlerin veya nükleotidlerin amino grupları ile glikoksallerin reaktif karbonil grupları arasındaki deglikasyonu katalize ederek AGEs oluşmasını engeller (133). Nükleotid onarım sisteminde yer almaktadır (134). Antioksidan işlevleri olduğu tespit edilmiştir. DJ-1'in aşırı ekspresyonu VMAT2 ekspresyonunu artırır ve oksidatif stresi azaltır (135). SNpc dopaminerjik nöronlarındaki mitokondriyal ayrışma proteinleri SLC25A14 ve SLC25A27'nin ekspresyonunu veya stabilitesini düzenlemede rol oynar (136). DJ-1 kaybı, ROS üretimini artırır, mitokondriyal geçirgenliği yükseltir ve transmembran potansiyelini azaltır (135). UPS sisteminde, nöroprotektif işlevleri olduğu tespit edilmiştir (137). Tümör nekroz faktörü-reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF) promotörü DJ-1 ve α -Syn ubikütinlenmesini sağlar. DJ-1 ve α -Syn etkileşimi

öz lmeyen poliubikitinlenmiş mutant DJ-1 agregatlarının oluşumuna neden olabilmektedir (138).

DJ-1 mutasyonu nedeniyle oluşan PH oldukça nadir (116). Mutasyona uğramış DJ-1 proteini sıklıkla doğru bir şekilde katlanamaz ve hemen proteozom yoluyla degrade edilir. Bu yüzden protein yokluğunda dopaminerjik nöronların n roprotektivitesi ve antioksidan aktivitesi düşer ve PH meydana gelir (137). Ayrıca DJ-1'deki mutasyonlar ROT, Parakut ve hidrojen peroksit duyarlılığını arttırır ve bu pestisitler PH oluşumuna yol açılır (135).

Tablo 2.3. PH'yla ilişkili olduğu düşünülen lokuslar.

Sembol	Gen	Gen lokusu	protein	Kalıtım
PARK 1 ve 4	SNCA	4q21.3-q22	α -sinüklein	OD
?	TH	11p15.5	Tirozin hidroksilaz	?
PARK2	Parkin	6q25-27	E3 ubik�tin ligaz	OR
PARK7	DJ-1	1p36	Protein / nükleik asit deglikaz DJ-1	OR
PARK8	LRRK2	12p11.2-q13.1	Lösin zengin tekrarlayan kinaz 2	OD

2.2.2.Yaşlanma

Yaşlanma, PH dahil bütün nörodejeneratif hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Ortalama başlangıç yaşı 60 olan PH çeşitli araştırmalarca yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir (146, 147). PH 60 yaşın üzerinde toplumun %1'ini etkilerken, 85 yaşın üzerine çıkıldığında bu oran %5'e yükselmektedir (148). PH, yaşlılık hastalığı gibi düşünülse de hastaların %5 gibi küçük bir kısmı 60 yaşından önce çeşitli belirtiler göstermekte ve bu vakaların büyük çoğunun belirtileri protein mekanizmasını etkileyen ve gün geçtikçe artan bir gen listesine ait mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (149). PH patogenezinde rol oynayan SNdeki dopaminerjik nöronlar yaşlanmayla birlikte her on yılda %4.7-%9.8 oranında azalmaktadır (36). Yaş ilerledikçe DA metabolizması, demir birikimi (119 ,120,121), mtDNA gibi SN nöronlarının işleyişi için gerekli birçok süreç azalmaktadır (şekil 1). Birbiri üzerinde rol oynayan bu süreçler sonucunda hücre kaybı

belirli bir düzeye ulaşınca ilk motor bozukluk bulguları ortaya çıkmaya başlamaktadır (149).

2.2.3.Çevresel Faktörler

PH'nın çevresel faktörlerine dair yapılan çalışmalar ilk olarak tarım ilaçlarının (pestisitler) zararlı etkilerine yönelik bulgular ortaya koymaktadır. Özellikle kırsal kesimlerde ve tarım alanlarının çok olduğu yerlerde yaşayan bireylerde tarım ilaçlarından parakuat ve maneb türevlerine maruz kalan kişilerde genç yaşta PH'nın görülme riskinin arttığı bulunmuştur (37).

PH'nın görülme riskini artıran bir diğer çevresel etken ise demir, kurşun ve manganez gibi ağır metallerdir. Bu tarz ağır metaller özellikle SA'da birikerek oksidatif strese yol açmakta ve böylelikle hastalığın oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Özellikle, kurşunun DA salımını önemli oranda azalttığı ve DA D1 reseptörlerinin hassasiyetinde de azalma olduğu görülmüştür (150).

2.3. Pestisit Maruziyeti ve PH.

Birçok çalışmada pestisit maruziyetine bağlı gelişen kronik sinir sistemi hasarının en sık görülen şeklinin Parkinson olduğu söylenmektedir. Yeni kuşak nikotinoidler ve fiproniller gibi, yeni kullanıma giren pek çok pestisit merkezi sinir sistemi etkileri olduğu bilinmektedir (111).

Fransa'da yaşlı nüfus üzerinde yapılan bir araştırma sonucunda mesleki pestisit maruziyetinin, maruziyetin yaşanmadığı durumlara göre, "düşük bilişsel performans" riskini artırdığı bulunmuştur. Aynı araştırmanın sonuçlarına göre; PH ve Alzheimer hastalıklarının gelişme riski mesleki pestisit maruziyeti olanlarda olmayanlara göre yüksek bulunmuştur (127).

İnsektisitler insanların sinir sistemlerini etkilemektedir. Bu kimyasal grup; organofosfatları, karbamatları, piretroitleri ve organoklorinleri içerir. İnsektisitler nörotransmisyonu veya iyon kanallarından akımı engelleyerek nörotoksik etkilerini gösterir. Bu etkiler PH gibi nörodejeneratif hastalıkların sebebi olabilir (131).

Amerikan Kanser Kurumu'nun beslenme alışkanlıklarının tespitini amaçlayan çalışmasının sonuçlarına göre, süt ve süt ürünlerinin tüketim sıklığıyla PH'nın gelişimi arasında bir ilişkinin var olduğu tespit edilmiştir. Araştırmanın sonuç bölümünde PH sıklığını artıran asıl etkenin sütlere bulaşan organofosfat ve diğer pestisit türleri olabileceği üzerinde durulmuş, süt ürünlerinin böyle bir bulaşmaya maruz kalma durumunun araştırılması gerektiği bildirilmiştir (151).

Poliklorlu bifenil (PCB)'in memelilerin sinir sisteminde gelişimsel defektlere neden olduğu düşünülmektedir. Ratlarda ve primatlarda prenatal ve perinatal PCB maruziyeti ile öğrenme, hafıza bozukluğu ve sinir hücrelerinde morfolojik değişiklikler arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Prenatal dönemde PCB'lere maruz kalan çocuklarda baş ağrılarına ve bilişsel fonksiyon bozukluklarında artış ve psikomotor gelişimde gecikme tespit edilmiştir (152).

Bir çalışmada erkek balıklara 30 gün süreyle uygulanan A1254 (Poliklorlu bifenil bileşiği), DA ve serotonin düzeylerini anlamlı şekilde azaltmıştır. Ancak, prenatal dönemde A1254 uygulanan ratların genç yavrularında noradrenalin değerlerinde azalma meydana gelirken, DA düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Aynı çalışmada test edilen düşük klor içeriğine sahip A1016'nın (Poliklorlu bifenil karışımı) ise katekolamin miktarlarını etkilemediği bildirilmiştir. PCB maruziyeti sonucu beyin katekolaminerjik nörotransmitter düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin PH gibi nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlayabileceği öne sürülmüştür (153).

İskoçya, Malta, İtalya, İsveç, Romanya'yı kapsayan çok merkezli planlanmış bir vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. 767 vaka ve 1989 kontrolü kapsayan çalışmada pestisit maruziyeti ile PH ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda pestisit maruziyetinin PH sıklığını arttırdığı değerlendirilmiştir (154).

Kaliforniya'da, 1974'den 1999'a kadar Fungisit (Ziram ve maneb) ve parakuat gibi pestisitlere kombine şekilde maruz kalmanın PH riskini üç kat arttırdığı bildirilmiştir (105).

İlk olarak α -Syn transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, parakuata ve manebe maruz kalan farelerde, hastalığın seyrinde ve şiddetinde artış olduğu görülmüştür. Daha sonra insanlar ile yapılan çalışmalarda ise SNCA geni mutasyonu ile tarım ilaçlarına maruz kalma arasında hastalığın başlangıç yaşını etkileyen bir ilişki olduğu bulunmuştur (37).

PH, pestisitlerin metabolizmasında rol oynayan spesifik enzimlerin polimorfizmlerinden de kaynaklanabilir. Bunlar sitokrom P 450 (CYP), CYP2D6 ve glutasyon transferaz gibi enzimlerdir. Bu enzimlerin geninde her hangi bir mutasyon varsa ve pestisitlere maruz kalınırsa uzaklaştırılamayan pestisitler PH'ye neden olabilir (156).

2.4. Pestisitlerin, Mitokondrial Disfonksiyon ile PH Oluşumundaki Rolü

PH'nın en büyük risk faktörü pestisitler farklı mekanizmalar kullanarak hastalığın oluşumuna sebebiyet vermektedir. Pestisitler, Mitokondrial fonksiyonda yer alan ETC'yi kalıcı olarak bozmaktadır (19).

MPTP (20, 21), ROT (22), Parakuat (23) ve Dieldrin (24), Maneb (67) gibi bazı maddelerin mitokondrial kompleks I veya III'ü inhibe etmesiyle PH'ye neden olduğu tespit edilmiştir. Bozulmuş mitokondriyal fonksiyon oksidatif strese yol açar ve hücre içi bileşenlerin hasar görmesine ve hücre ölümüne sebebiyet veren bir takım hücresel yollara etki eder. Oksidatif stres, PH'da nigral dopaminerjik hücre ölümünün patojenik mekanizmalarından birisidir (25).

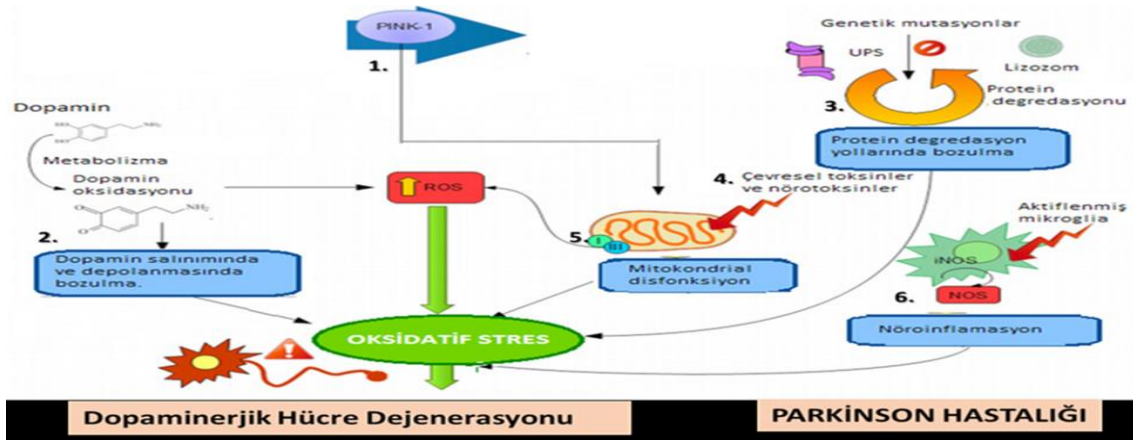
ROT, tropikal bitkilerin özütlerinden elde edilen doğal sitotoksik bileşiklerden olan rotenoid ailesine üye, haşerarla mücadelede kullanılan toksik bir maddedir. Oldukça lipofilik olduğundan dolaşım ile organlara kolaylıkla ulaşabilmektedir (22).

ROT mitokondrial kompleks I'ı inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozar (158). ROT, NADH'nin nikotinamid dinükleotit (NAD)'e okside olup indirgenmesini engelleyerek NAD'ın glutamat, α -ketoglutarat ve pirüvat gibi maddelerin oksidasyonunu engellenerek mitokondrial elektron taşınmasını ve buna bağlı olarak da mitokondrial solunumu engellenmiş olur. Böylece NADH'in kullanılabilir hücresel enerjiye, yani

ATP'ye dönüştürülmesi önlenmiş olur. Kompleks I'in inhibisyonu ile nitrosatif stres artması görülmektedir. Nitrojen türlerinin (RNS) üretiminin artması ile proteostaz, (hücre içinde proteinlerin üretimi, katlanma, taşınma ve yıkım aşamalarını düzenleyen tüm biyolojik yollar) bozulur α -Syn ve poliübikülin agregasyonu ile parkinsonozom uyarılmış olur (159). Mitokondrial disfonksiyon konusunda diğer bir önemli konu mitofajidir (160). PH'daki mitofaji ile ilgili yapılan bir çalışmada Fbox7 proteininin Parkin ile doğrudan etkileşime girerek mitofajiyi indüklediği ve bunun da PH patogenezinde mitofajinin önemini ortaya koyduğu gösterilmiştir (161).

2.5. PH'nin Oksidatif Stres Patogenezi

Oksidatif stres PH'nın SN'de gözlenen bir patolojik süreci, artmış oksidatif streştir (162). PH'nin patolojisinin aydınlatılması amacıyla beyin dokuları incelenmiş ve PH olgularına ait beyin dokularında oksidatif değişiklikler gözlemlenmiştir (163). Bütün biyolojik sistemlerin olağan aktivitelerine devam edebilmesi için serbest radikallerin oluşumu ve atılımı arasındaki dengesinin sağlanması gerekir (164). Nörodejenerasyona yol açabilecek serbest radikallerin oluşumu ve atılımı arasındaki dengenin serbest radikallerin oluşumu lehine bozulmasıyla ortaya çıkan patolojik süreç ise oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif strese maruz kalan hücreler DNA'yı ve lipidleri doğrudan hasara uğratar ve böylece hücreler işlevselliklerini kaybeder (165). Serbest radikaller; ROS ve RNS olarak ikiye ayrılır (164) ve mitokondri dahil bütün hücrelerde oksidatif fosforilasyonla üretilirler (166). Oksidatif strese atfedilen çeşitli hücresel mekanizmalar vardır ve dopaminerjik nöronların seçici dejenerasyonunda rol oynar. Dopaminerjik nöronların dejenerasyonu sonucunda da PH meydana gelir (Şekil 13).



Şekil 2.12. PH'nin oksidatif stres patogenezi (167).

1. PH ile ilişkili gendeki PINK-1 genetik mutasyon kaynaklı işlevsel bozukluklar, artmış oksidatif strese yol açar. İlgili proteinlerin mutasyonları veya azalmış ekspresyonu, mitokondriyal bozulma, oksidatif stres ve yanlış katlanmış protein agregasyonu ile sonuçlanır
2. Ayrıca, oksidasyon ile oluşan reaktif DA kinonları, ROS seviyesinin yükselmesine neden olarak oksidatif strese yol açar .
3. Artmış oksidatif stres UPS'nin yanlış modifiye edilen veya hasar gören proteinlerinin homeostasisini bozarak hücre sağkalımını etkiler (167)
4. Çevresel toksinler; mitokondriyal disfonksiyona ve serbest radikal oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olur.
5. Kompleks 1 ve 3 inhibisyonu ile meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif streste artışa ve ATP üretiminde düşüğe neden olur ve hücre içi bileşenlerin zarar görmesine yol açarak hücre ölümüyle sonuçlanır.
6. Ayrıca PH'nın en belirgin bileşenlerinden biri, mikrogliya adı verilen hücrelerden kaynaklanan nöroinflamasyondur. Mikrogliaların en önemli görevleri, zarar görmüş hücrelerin ve yabancı maddelerin fagositozunu gerçekleştirmektir. Mikrogliaların aşırı aktivasyonu sonucunda fagositik olayın arttığı, mikrobial ölçüde ölümler gerçekleştiği, antijen sunumunun olduğu ve inflamasyona neden olan faktörlerin üretiminde artış olduğu görülmüştür. Nitrik oksit (NO) gibi açığa çıkarak, doku bozulmasına ve merkezi sinir sistemindeki komşu glia hücrelerinde ve nöronlarda inflamasyon cevabının

oluşmasına neden olmaktadır (168). Nöroinflamatuvar mekanizmalar, oksidatif strese yol açan sonuçların basamaklanmasına katkıda bulunur (167).

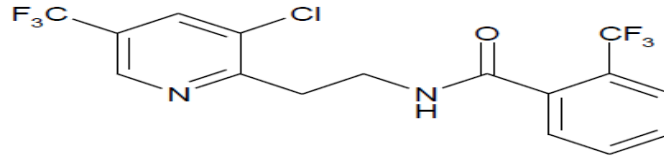
Beyin, kandaki oksijenin%20'sini kullandığı için (109) beyin hücreleri ROS üretimine karşı çok duyarlıdır (82). ROS/RNS'ler antioksidanlar yardımıyla vücuttan uzaklaştırılır ve organizma oksidatif stresten korunur (164). SN'deki dopaminerjik nöronlar, monoaminoksidaz (MAO) enzimi aracılığıyla DA'nın oksidatif deaminasyonunu ve otooksidasyonunu sağlar. DA'nın otooksidasyonu sonucu oluşan ürün melanindir. Melanin varlığı dopaminerjik nöronlardaki oksidasyon seviyesi hakkında bilgi verir ve vücutta 2 önemli etkisi vardır (113). İlk etkisi nöron koruyucu özelliğidir. Toksik metabolitlerin birikimini engeller, ROS ve reaktif metallerin nöronlardan atılımını sağlar. İkinci etkisi ise; ölmekte olan nöronların nöromelanin pigmenti salarak kronik inflamasyona neden olmasıdır. Hidrojen peroksit, süperoksit anyonları ve hidroksiradikaller gibi ROS'lar bu kronik inflamasyon sonucunda oluşabilir. Oluşan bu ROS'lar zar lipidleri ile etkileşime girer ve toksik lipid peroksidasyonu oluşturur. Post mortem PH'nın beyin kesitleri incelenmiş, beynin SN bölgesinde lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir.

Oksidatif stres'in nöronlarda bulunan proteinlerin işleme bozukluğu ile de ilişkili olabildiği düşünülmektedir. Normal koşullarda açığa çıkan ROS'lar GSH redüktaz ile detoksifiye edilir. Ancak PH gibi patolojik bir durumda SN'de detoksifiye edilemeyen ROS, serbest demir iyonları ile hidroksil radikalleri oluşturur ve dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna neden olur. Ayrıca oksidatif stres varlığının görüldüğü PH olgularında son ürün olan melaninin bölgesel olarak birikip nöronlardaki serbest halde bulunan metallere bağlanarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (113).

2.6. FLU Nedir

Flu, geniş spektrumlu bir fungusittir. Birçok bahçıvanlık ve tarla bitkilerinde Ascomycete ve Deuteromycete grubuna mensup mantarların hastalıklarına karşı koruma sağlamak için geliştirilmiştir.

Flu etki mekanizması, mantar ETS'deki kompleks II inhibisyonu ile elektron taşınmasını bloke ederek spor spreyi çimlenmesini, mikrop tüp uzamasını, miselyum büyümesini ve sporu inhibe etmektedir (26).



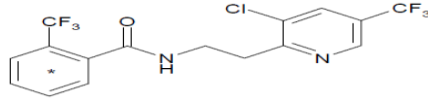
Şekil 2.13. Fluopyram'nın Kimyasal Yapısı

Tablo 2.4. Flu'nun özellikleri

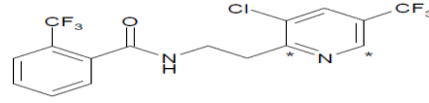
ISO yaygın adı	Fluopyram
Kod numarası	AE C656948
IUPAC adı	N- {2- [3-kloro-5- (triflorometil) -2-piridil] etil} - α , α , α -trifloro-o-toluamid
Kimyasal Özetler adı	N- [2- [3-kloro-5- (triflorometil) -2-piridinil] etil] -2-(triflorometil) benzamit
CAS numarası	658066-35-4
CIPAC numarası	Tahsis edilmemiş
Moleküler ağırlık	396.72 g/mol
Moleküler formül	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O (26)
Renk:	Beyaz renksiz
Koku:	Karakteristik koku yok
Fiziksel durum	Pudra
Erime noktası:	117.5 °C
Nispi yoğunluk (20 ° C):	1.53 g/cm ³
Buhar basıncı (20 ° C):	1.2 x 10 ⁻⁶ Pa
Yanabilirlik :	Kolay tutuşmaz, 400 ° C'ye kadar kendi kendine tutuşmaz
Patlayıcı özellikler:	Patlayıcı değil
oksitleyici özellikler:	Oksitleyici ajan değil
Tehlikeli maddeler sınıflandırması	ADG Koduna göre tehlikeli madde değil (88)

2.6.1. FLU Metabolizması

Ratlar, keçiler, tavuklar, bitkiler, toprak ve rotasyonel ürünleri üzerinde yapılan birçok flu metabolizması çalışmaları, Radyo-işaretli Fenil halkası ve piridil halkasının Flu kullanılarak (Şekil.15) Ana metabolitlerini tanımlamıştır (Şekil.16).

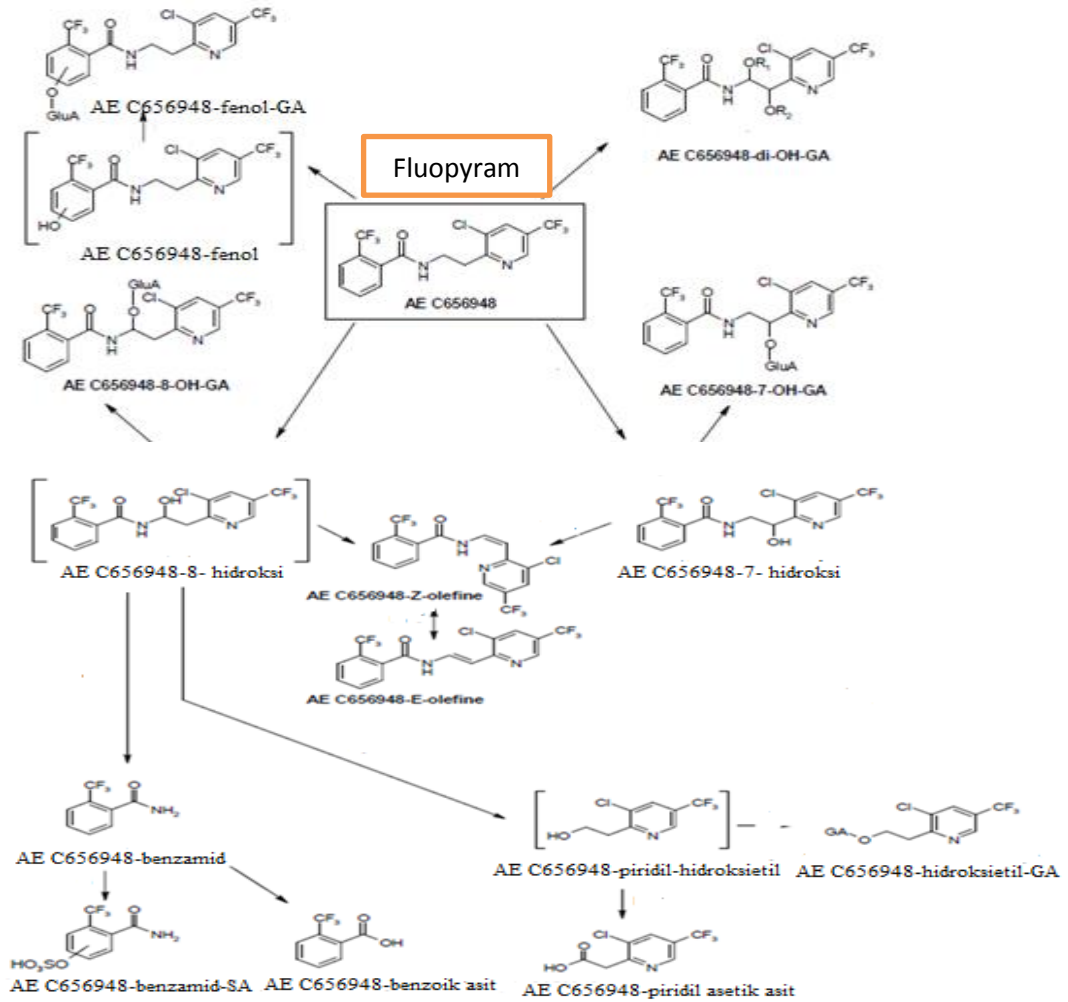


[Fenil-UL ^{14}C] -fluopyram



[Piridil-2,6- ^{14}C] -fluopyram

Şekil 2.14. Radyo-işaretli Fenil halkası ve piridil halkası Flu (26).



Şekil 2.15. Hayvanlarda Flu'n Metabolik Yolu (26).

1. Hayvanlarda Flu'un metabolizması temel olarak etilen köprüsünün hidroksilasyonu ile AE C656948-7- hidroksi ve AE C656948-8-hidrtoksi oluşturmaktadır.
2. Hidroksillenmiş metabolitlere bağlanan glukuronik asit sonucunda AE C656948-8-OH-GA, AE C656948-fenol, AE C656948-fenol-GA, AE C656948-di-OH-GA, AE C656948-7-OH-GA fenol metabolitleri oluşmaktadır.
- 3-Etilen köprüsünde hidroksile edilmiş bileşiklerden suyun eliminasyonu ile AE C656948-Z-olefine ve AE C656948-E-olefine oluşmaktadır.
- 4- AE C656948-benzamid ve AE C656948-piridil-hidroksietil oluşturulmak üzere alifatik zincir bölünür.
- 5- Hidroksillenmiş bileşikler esas olarak glukronik asit ve sülfürik asit ile konjuge edilerek AE C656948-hidroksietil-GA, AE C656948-benzamid-SA oluştururken glukronik asit ve sülfürik asit ile bağlanması gerçekleşmezse AE C656948-benzoik asit, AE C656948-piridil asetik asiti meydana gelmektedir. Erkek ve dişi ratların gastrointestinal yolundan flu Emilimi hızla gerçekleşirken uygulanan dozun % 90'ı dışkı ile (% 47-64), idrar ile ise (%35-45) ile 168 saat içinde atılmaktadır. Karaciğer ve böbrek en yüksek Flu kalıntı konsantrasyonları içeren organları oluştururken periferik dokular, adrenal ve tiroid bezi gibi yapılardaki Flu konsantrasyonlarının kandaki konsantrasyondan çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (88).

2.6.2. FLU Toksisitesi

Tablo 2.5. Flu İle Yapılan Ekotoksikolojik Testler ^(88,129)

Hayvan	Test	Sonuç
Rat	Akut Oral	LD50 > 2,000 mg/kg bw NOEL = 2,000 mg/kg bw
Rat	Akut dermal yol (88)	LD50> 2000 mg / kg bw
Rat	Akut inhalasyon yolla (88)	(4-saat LC50> 5.1 mg / L
Rat	90 günlük diyet toksisitesi	LOEC: 1000 ppm food, NOEC: 800 ppm food LOEL: 61 mg/kg bw, NOEL 13 mg/kg bw
Rat	2 nesil kronik / üreme besleme çalışması	LOEC: 150 ppm food NOEC: 30 ppm food LOEL: 6.0 mg/kg bw NOEL 1.2 mg/kg bw

LD50: Öldürücü doz₅₀, NOEC: Olumsuz Etki Gözlemlenmeyen Konsantrasyon, LOEC: Olumsuz Etki Gözlemlenen En Düşük Konsantrasyon ,NOEL: Gözlemlenen Etki Seviyesi Yok ve LOEL: Gözlenen En Düşük Etki Seviyesi

2.6.3. Akut Toksisite:

Flu ve formüle edilmiş ürünler (Propulse, Luna Tranquility, Luna Sensation ve Luna Experience) laboratuvar hayvanlarında akut oral, dermal veya inhalasyona maruz kalma çalışmalarında düşük akut toksisiteye sahiptir. Tavşanlarda ve gine domuzlarında cilt ve göz tahriş edici bir etki sahip değildir (129).

2.6.4. Kronik Toksisite:

Flu'nun, kısa süreli ve subkronik oral çalışmalarda, ratlar, fareler ve köpeklerde karaciğerin ana hedef organ olduğu tespit edilmiştir. Hepatotoksisite ise doza bağlı olarak artmaktadır (88). Flu'nun farklı dozlarda birçok farklı etkiye sahip olduğu araştırmalar sonucunda elde edilmiştir. Flu 6 mg/ kg / gün, erkek ratların karaciğerinde hipertrofiye, böbreklerde nefropatiye, tiroid bezinde foliküler hücre hipertrofisine ve gözlerde retina fundus anormal renk, küçük retinal damarlar, korneal ve nükleer donukluk, kornea ödeme neden olmaktadır. Flu 8.6 mg / kg / gün ise ratların dişilerinde tiroid ve retinal etkiler gözlemlenmiştir. Flu, 20.9 mg / kg / gün erkek farelerde ve 26.8 mg / kg / gün erkek ve dişi farelerde sırasıyla karaciğerde neoplastik olmayan histopatolojik lezyonları artırdığı, tiroid bezinde foliküler hücre hiperplazisine neden olduğu tespit edilmiştir. Flu 29 ve 89 mg / kg / gün (test edilen en yüksek dozlar), erkek ve dişilerde sırasıyla karaciğer, böbrek, tiroid bezi ve gözler üzerindeki etkilerin şiddetinde artış olduğu gözlemlenirken dişilerde düşük hemoglobin konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir (129).

2.6.5. Nörotoksisite

Literatüre baktığımızda çok az sayıda nörotoksisite çalışmasının yer aldığı gözlemlenmiştir, Flu 100 mg / kg oral yoluyla akut olarak ratlara verilmiştir, ratlarda motor ve lokomotor aktivitesinde azalma görülmüştür (88). Ancak Parkinson ile bağlantısını doğrudan araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.6.6. Üreme ve Gelişim Toksisitesi

Eşit ve daha büyük dozlardaki Flu maternal toksisiteye neden olmaktadır. Hamile ratlar ve yavru tavşanlarda bazı gelişimsel toksisiteye neden olmuştur. Flu, 450 mg / kg / gün dozunda, Ratların fetüs vücut ağırlığının azalmasına ve yavrualarda visseral varyasyonları (kalan timik doku, dilate üreter) ve iskelet varyasyonları (torasik merkez kıkırdakta) artmasına neden oldu. Ratlarda birçok nesil üreme çalışmasında, Flu, 83 mg / kg / gün ve 96 mg / kg / gün dozunda, vücut ağırlığı, dalak ve timus ağırlıkları azalmış ve sırasıyla erkekler ve dişilerde yavrualarda preputial ayrılmayı geciktirmiştir (129).

2.6.7. Genotoksisite

Etken madde olarak fluopyram içeren Luna Experience SC-400, ile yapılan bir çalışmada Rat kemik iliği, kan ve karaciğer hücreleri mikronükleus ve comet testleri ile genotoksik açıdan değerlendirilmiştir. Buna göre mikronükleus sayısında artış, toplam eritrosit oranında azalış ve genotoksik etkide artış tespit edilmiştir (85,86).

2.6.8. Kanserojenite

Flu, kronik beslenme / onkogenite çalışmalarında, hem ratlarda hem de farelerde onkojenik bir potansiyel göstermiştir. Bu aktif bileşenin diyet uygulaması dişi ratlarda karaciğer tümörlerini ve erkek farelerde tiroid foliküler hücre tümörlerini anlamlı olarak indüklemiştir (129). 2 yıllık bir Rat diyet çalışmasında, Flu en yüksek dozunda, 89 mg / kg / gün dişi ratlara verilmiş ve karaciğer tümörlerinin oluşumu sağlanmıştır. Flu kaynaklı karaciğer tümörlerinde muhtemelen aril hidrokarbon reseptörü (AhR) veya CAR / PXR nükleer reseptörlerinin aktivasyonu aracılık etmektedir (88) (148).

Erkek Farelerde ise 28 günlük bir fare diyet çalışması uygulanmış, Flu en yüksek dozunda 105 mg / kg / gün verilmiş, tiroid tümörlerinde CAR / PXR nükleer reseptörlerinin aktivasyonuna aracılık ettiği gözlemlenmiştir (56). Flu, dişi ratlarda karaciğer adenom ve karsinom tümör oranlarına bağlı olarak 1.55×10^{-2} (mg / kg / gün) - 1 kanser potansiyeli eğim faktörü ABD EPA tarafından hesaplanmış ve insanlarda kanserojen değildir (129).

2.7. FLU'nun Çevresel Kaderi

Flu, hem toprakta hem de suda fotoliz ile parçalanabilir, ancak parçalanma çok sınırlı ve yavaştır. Fotoliz önemli bir kader süreci olarak kabul edilmez. Suda hidrolize karşı stabildir. Birincil bozulma aracı, çok yavaş olan aerobik toprak metabolizmasıdır. Aerobik bozulma çalışmalarında Flu'nun yarı ömürleri Alman topraklarında 162 ile 464 gün iken ABD topraklarında 561 ile 746 gün arasında değişmektedir. Böylece elde edilen sonuç Flu'nun anaerobik toprak koşulları altında bozulmadığını göstermektedir (129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (SDÜ-HADYEK) Başkanlığı'nın 28.02.2019 tarihli 03 sayılı toplantısı ve 4 sayılı kararı ile etik kurul izni alınarak gerçekleştirilmiştir (EK A). Çalışmalar SDÜ-HADYEK ve Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1 Hayvan Modeli

Ön çalışma ve ana çalışma için 58 adet (30-37 g), 12 - 20 haftalık, erkek ve dişi Swiss albino fareler kullanıldı. Normal fare yemi ve musluk suyu ile beslendi. Günlük doz uygulamaları, saat 14:00-15:00 arasında yapıldı. Deney süresince hayvanların genel durumları gözlemlenerek kayıt altına alındı.

3.2 Parkinson Modeli ve Deney Dizayını

PH'nın deney hayvanlarında modellenmesi için kullanılan çeşitli kimyasallar bulunmaktadır. Bunlardan biri de Mitokondriyal kompleks 1 inhibitörü gibi işlev gören geniş spektrumlu bir pestisit olan ROT'tur (394.423 g/mol, C₂₃H₂₂O₆, CAS Numarası: 83-79-4) Sistemik maruziyette daha önce tarif edilen çevresel etkenler – PH ilişkisi yolakları ile dopaminerjik nöron kaybını, nigral nöronlarda LB'lerini ve düşük motor fonksiyonları indüklemeye özelliğine sahiptir (6).

Pozitif kontrol (ROT Parkinson modeli, 2 mg/kg/gün), negatif kontrol (Yalnızca çözücü madde, DMSO) ve Flu (0.1, 1 ve 2 mg/kg/gün) aşamalarından oluşan ön çalışmamızda dozlar farelere günlük subkutan (SC) olarak uygulanmıştır. Deney, intraperitoneal (İP) olarak uygulanan %10'luk ketamin (100 mg/kg) ve %2'lik ksilazin (10 mg/kg) verilerek 21 günün sonunda anestezi altında sonlandırılmıştır.

Ön çalışmada, Motor Fonksiyon testi, İmmünohistokimyasal araştırmalar ve Comet Metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ana çalışmanın dozları belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Ana Çalışmanın Deney Grupları

Deney Grupları	Hayvan Sayısı	Ortalama Ağırlık (gr)
Kontrol Grubu	8	33,05
Çözücü (DMSO) Kontrol Grubu	8	31,03
Flu (2 mg/kg/gün)	8	34,91
Flu (1 mg/kg/gün)	8	33,33
Flu (0.5 mg/kg/gün)	8	30,20
Pozitif Kontrol (ROT 1mg/kg/gün, Parkinson Modeli)	10	35,13
Toplam	50	

3.3 Tez projesi kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar

- **Motor Fonksiyon Testi**
- **Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar**
- **Comet Metodu**
- **Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR)**

3.3.1 Motor Fonksiyon testi (Silindir Prosedürde Spontan Aktivitesi)

1- Bir masanın üzerine 2 tane temiz fare kafesi ters çevrilir ve ~ 18 cm aralıklarla yan yana konumlandırılır. İki kafesin arasına gelecek şekilde bir adet ayna yerleştirilir.

2-İki kafes destekleyecek şekilde aralarına cam yerleştirilir.

3-Camın üst kısmına silindir alt kısmına ise ayna silindirin tam çapını görecektir şekilde yerleştirilir.

4-Video kamera aynanın önüne yerleştirilir ve silindirin tabanının tüm çapını görecektir konumda ayarlanır.

5-Kronometre 3 dakikaya ayarlanır. Deney bilgileri etiketlenir. (tarih, fare numarası, vb.)

6-Fare silindirin içerisine bırakılır ve gözlemlenir. Farenin yalnızca arka ayakları üzerinde durması için her iki ön ayağını yerden kaldırılması dikey bir hareket olarak tanımlanır.

7-3 dakika sonunda fare silindirden çıkartılır ve kafesine geri yerleştirilir.

8-Silindir ve cam koku kalmayacak şekilde temizlenir. Silindire sonraki fare yerleştirilmeden önce düzeneğin kuruması beklenir.

6-Farenin silindirin içindeyken yaptığı geri sayısı. Arka kısım, farenin yalnızca arka ayakları üzerinde durması için her iki ön ayağı yerden kaldırılmış dikey bir hareket olarak tanımlanır.

7-3 dakika sonunda fare çıkartılır ve kafesine geri konur.

8-Silindir ve cam hayvan bakımı veya veteriner personeli tarafından sağlanan bir dezenfektanla temizlenir. Silindire sonraki fareyi yerleştirmeden önce temizleme solüsyonunun kurumasını beklenir (7).

3.3.2 Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Numune Hazırlıkları ve Değerlendirmeleri

Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar

Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi

En az 48 saat %10 nötral formalin solüsyonu içerisinde fiksasyonu sağlanan doku örnekleri, bir gece akan suda yıkama işlemine tâbi tutulduktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

a) Suyun dokulardan uzaklaştırılması (Dehidratasyon)

Dokular dereceli alkollerde sırasıyla belirtilen sürelerde bekletildi.

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%50	1 saat bekletildi.
%70	1 saat bekletildi.
%80	1 saat bekletildi.
%90	1 saat bekletildi.
%96	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.

b) Şeffaflandırma

Ksilolde 3-10 dk (Her 3 dk da bir kontrol edilerek işlem sonlandırıldı).

c) Parafin Emdirme

Sıvı parafin (60 °C etüvde) 30 dk bekletildi.

Katı parafin (oda sıcaklığında) 1 gece bekletildi.

d) Gömme

Sert parafin, içerisine gömülen dokularla bloklar halinde hazırlandı.

e) Kesit alma

Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotom kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması (H-E)

Histokimyasal değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı. Uygulanan boyama protokolü aşağıda belirtilmiştir.

Yapılan işlem

Süre

1. Deparafinizasyon

- | | |
|--------------|-------------------|
| A) 60°C etüv | 45 dk bekletildi. |
| B) Ksilol I | 20 dk bekletildi. |
| C) Ksilol II | 20 dk bekletildi. |

2. Alkol serisi

- | | |
|--------|-------------------|
| A) %96 | 10 dk bekletildi. |
| B) %90 | 10 dk bekletildi. |
| C) %80 | 10 dk bekletildi. |
| D) %70 | 10 dk bekletildi. |

3. Distile Su

5 dk bekletildi.

4. Hematoksilen

2 dk bekletildi.

5. Çeşme suyu

5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.

6. Asit alkol

3-4 sn

7. Çeşme suyu

5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.

8. Eozin

2 dk bekletildi.

9. Çeşme suyu

5 dk sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.

10. %70- %80- %90 alkol serisinden sırasıyla batır çıkar yaparak geçirildi.

11. Ksilol

1 gece bekletildi.

12. Kapatma (Entellan)

Doku Örneklerinde İmmunohistokimyasal Çalışmalar

Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi

Fiksasyonu sağlanan dokulara yukarıda sayılan doku takip işlemleri sırasıyla uygulanarak dokular parafine gömüldü. Kızaklı mikrotom ile lizinli lama 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

Primer (Çoğul Klonlu-Poliklonal) Antikor:

-Alfa Sinuklein (Anti-rabbit poliklonal Anti- Alfa Sinuklein antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı.

- Tirozin Hidroksilaz (Anti-rabbit poliklonal Anti- Tirozin Hidroksilaz antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:200 oranında sulandırıldı.

Sekonder antikor:

SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody, hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solution 25X):

Seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı. 1500 ml distile suya 500 ml PBS karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Sodyum Sitrat Solüsyonu (Citrate Buffer 10X):

450 ml distile suya 50 ml Citrate Buffer solüsyonu karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%3):

Hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

DAB (3, 3 diaminobenzidin) Kromojen:

Bu madde ikincil antikor olarak kullanılan Horseradish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı. Üretici firmanın (Scytek) önerisine göre 125 ml substrat için 7,5 ml kromojen içerecek şekilde karıştırıldı. Her karışım kullanımından yaklaşık 20 dk önce taze olarak hazırlandı.

Zıt Boyama:

Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır. Zıt boyama için Hematoksilen kullanıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 2-3 µm kalınlığında elde edilen parafin kesitler etüvde 60°C etüvde 1 saat bekletildi.
2. Deparafinizasyon işlemi için Ksilol-1'de 10 dk, Ksilol-2'de 10 dk bekletildi.
3. Dehidratasyon işlemi için sırasıyla,
 - a. %100'lük alkolde 5 dk bekletildi.
 - b. %96'lık alkolde 5 dk bekletildi.
 - c. %90'lık alkolde 5 dk bekletildi.
 - d. %80'lik alkolde 5 dk bekletildi.
 - e. %70'lik alkolde 5 dk bekletildi.
4. İki ayrı PBS solüsyonunda 5'er dk bekletildi.
5. Antijen retrieval uygulaması için sitrat buffer tamponu içinde mikrodalga fırında 600W'da 2 dk ısıtıldı ve 20 dk +4°C'de soğumaya bırakıldı.
6. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
7. PAP Pen kalem ile polilizinli lamaların üzerindeki doku kesitlerinin etrafı çizildi. Bu işlem ileriki safhalarda da gerektiğinde tekrarlandı.
8. Dokuların üzerini kaplayacak şekilde ve diğer dokularla karışmamasına dikkat edilerek nemli ortamda %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

9. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
10. Dokunun üzerini kapatacak şekilde Super Block damlatılarak 5 dk bekletildi.
11. Lamlardaki 1. kesitlere Tirozin Hidroksilaz primer, 2. kesitlere Alfa- Beta Sinuklein primer antikor, 3. kesitlere kontrol amacıyla sekonder antikor damlatıldı. Lamlar nemli kabin içerisinde +4°C'de bir gece bekletildi.
12. Ertesi gün kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
13. Sekonder antikor (SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody), dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 20dk bekletildi.
14. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
15. Dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde Streptavidin Horseradish Peroksidaz (SensiTek HRP) damlatıldı ve 20 dk bekletildi.
16. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
17. DAB Kromojen solüsyonu, dokuların üzerine damlatıldı ve reaksiyon vermesi için 10 dk bekletildi.
18. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
19. Hematoksilen dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 30 sn bekletildi.
20. Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
21. Sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden batır çıkar yapılarak geçirildi.
22. Kesitler şeffaflaşana kadar ksilolde bekletildi.
23. Entellan kullanılarak kapama yapıldı.

Boyanan örnekler binoküler mikroskopta incelenip değerlendirildi ve görüntüleme donanımı ile fotoğraflar elde edildi.

Beyin dokusu kesitlerinde, kontrol ve deney gruplarında histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak beyin dokusundaki hasarlanma-

iyileşme değerleri; kamera destekli binoküler ışık mikroskobu (ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan) ile karşılaştırıldı.

Histokimyasal Değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarına ait doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (0-3) arası skorlanarak değerlendirildi.

- 0: Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,
- 1: Hafif derecede,
- 2: Orta derecede,
- 3: Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarına ait doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (-, +++) arası skorlanarak değerlendirildi.

- : Boyanmanın olmamasını,
- +/-: Çok hafif derecede boyanma olmasını,
- +: Az derecede boyanma olmasını,
- ++: Orta derecede boyanma olmasını,
- +++ : Ciddi derecede boyanma olmasını ifade etmektedir.

3.3.3 Comet Metodu

Tablo 3.2. Comet metodunda kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar

Na2EDTA	Dimetilsülfoksit (DMSO)
Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Etidyum bromür
Düşük erime noktalı agaroz (LMA)	Normal erime noktalı agaroz (NMA)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Tirzma Base
Hank's balanced salt solution (HPSS)	Saf etanol
Tirton X-100	Distile su
Sodyum klorür (NaCl)	Ultra saf deiyonize su
Potasyum klorür (KCl)	Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)
Disodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Tris HCL
Asetik asit	Pipet Uçları
Pastör Pipeti	Flu etken maddeli pestisit
Cam Malzemeler	ROT etken maddeli pestisit
Lam	Ependroflar
Histopak®-1083 (100 ml)(sigma)	

Comet metodunda kullanılan cihazlar

Tablo 3.3. Comet metodunda kullanılan cihazlar

Kameralı Floresan Mikroskop	Dijital Hassas Terazı
Güç kaynağı	Otomatik Pipetler
Soğutmalı Santrifüj	PH metre
Vorteks karıştırıcı	Derin Dondurucu
Manyetik karıştırıcı	İnkübatör
Su Banyosu	Otoklav
Buzdolabı	Elektroforez Tankı
Bulaşık makinesi	

Comet metodunda kullanılan çözeltilerin hazırlanması

PBS

Fosfat tamponu, hazır olarak satılan tablet PBS'lerin distile su içerisinde çözülmesi veya tablo 3'de verilen kimyasalların 1 litre distile su içerisinde karıştırılması ile stok çözelti olarak hazırlanmış ve on kat dilüe edilerek kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Stok fosfat tamponunun hazırlanışı

Kimyasal Malzeme	Miktarı (1 litre için)
NaCl	80 gr
KCl	2 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr
Na ₂ HPO ₄ veya Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	11.5 gr veya 29 gr
TrisHCl	32 gr

HPSS tamponu

HPSS tamponu dokudan hücre izolasyonunda PBS yerine kullanılabilir. Ayrıca tablo 3’de verilen kimyasalların 1 litre distile su içerisinde karıştırılması ile de hazırlanabilir. 20 μ M EDTA ve 10% DMSO ile çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

Tablo 3.5. HPSS tamponunun hazırlanışı

Kimyasal Malzeme	Miktarı (1 litre için)
NaCl	8 gr
KCl	0.4 gr
KH ₂ PO ₄	0.06 gr
NaHCO ₃	0.35 gr
Na ₂ HPO ₄	0.48

Lizis çözeltisi

Tablo 3’de belirtilen kimyasalların 500 ml distile su içerisinde karıştırılması ile stok olarak hazırlanır ve +4 ° C’de saklanır. Çalışma solüsyonu Triton X-100’den 1 ml, DMSO’dan 10 ml ve stok lizis solüsyonundan 89 ml alınarak çalışma öncesinde taze hazırlanır. Stok lizis çözeltisi hazırlanırken önce EDTA’nın daha sonra diğer kimyasalların çözülmesi çözeltinin daha hızlı hazırlanması açısından önemlidir. Çalışma solüsyonu pH =10 olmalıdır. Buz soğukluğunda uygulanır.

Tablo 3.6. Stok lizis çözeltisinin hazırlanışı

Kimyasal Malzeme	Miktarı (500 ml için)
2.5 M NaCl	73.5 gr
100 μ M Na ₂ EDTA	18.6 gr
10 μ M Trizma Base	0.6 gr

Alkali elektroforez tamponu

Tablo 3’de belirtilen kimyasalların 500 ml distile su içerisinde çalışma öncesinde taze olarak çözülmesi ile hazırlanır. pH > 13 ve buz soğukluğunda uygulanır.

Tablo 3.7. Alkali elektroforez tamponunun hazırlanışı

Kimyasal Malzeme	Miktarı (500 ml için)
300 μ M NaOH	6 gr NaOH
1 μ M EDTA	0.18 gr Na ₂ EDTA

Nötralizasyon tamponu

97 gr Tris’in distile suyla 1 L’ye tamamlanması ile hazırlanır. pH’sı 7.5’a getirildik

Boya

50 ml distile su içerisinde 5 mg etidyum bromürün çözülmesi ile stok olarak hazırlanır. 1/10 oranında seyreltilerek 1 lam için ortalama 30 µl kullanılır. Az veya çok seyreltilmesi mikroskop altındaki görüntü kalitesini etkilemektedir.

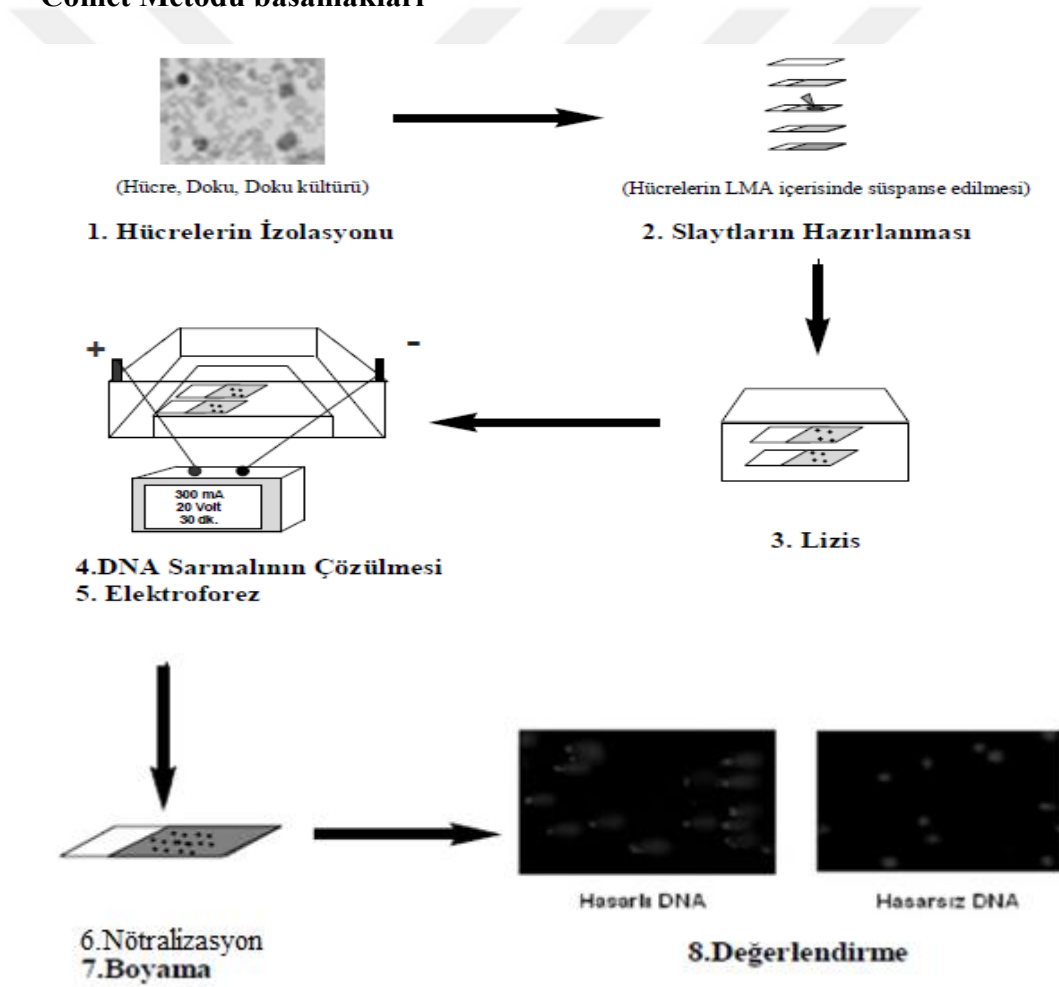
LMA

LMA, % 0.6-0.8 oranında PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Kullanılana kadar 37° C’de tutulur.

NMA

NMA, % 1-1.2 oranında PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (10).

Comet Metodu basamakları



Şekil.3.1. Comet Metodu basamakları (42).

Hücrelerin İzolasyonu

Comet metodunda kullanılacak hücresel materyalin canlı olması önemlidir. Doku veya kan alındıktan sonra en geç 2 saat içerisinde prosedür uygulanmalıdır.

Dokuların dondurularak saklanması için çeşitli prosedürler de bulunmaktadır. Dondurularak saklanan dokulardan izole edilen hücrelerin DNA hasar seviyesinin artmadığı fakat çalışma süresi ve maliyette artış olduğu gözlemlenmiştir.

Farelerden, anestezi altında ötenazi yapılarak kan ve beyin dokusu alındı. Hazırlanan endorf tüplere histopaklar (kan ile 1/1 oranında) eklenir. (0.4 ml kan -0.4 ml histopak ilave edildi) 2000 rpm’de 20 dk. santrifüjlenir. Santrifüjden sonra endorf tüplerde, lökositler kan ile histopak arasında bulutsu bir görünüm vermelidir. Bu kısım alınarak temiz endroflara aktarılır. PBS endroflara 1/1 şeklinde konularak hazırlanır. 2500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ayrı bir endorfda 20 µl hücre ve 100 µl LMA karıştırılır.

Beyin dokusu ise PBS içerisinde yıkanmış ve ardından küçük parçalar şeklinde kesilmiştir. Bir süre bekledikten sonra daha küçük parçalar haline getirilir, kalan solüsyon endorfa alınır ve 2500 rpm’de 15 dk. santrifüj yapılır. Dipte kalan hücre yoğunluğuna bağlı olarak 25-50 ml PBS ile sulandırma işlemi yapılır. Ayrı bir endorfda 20 µl hücre ve 100 µl LMA karıştırılır. Bu aşamada LMA’nın hücrelere zarar vermemesi için vücut sıcaklığında olmasına dikkat edilir.

Slaytların hazırlanması

Çalışmadan bir gün önce lamalar hazırlanır. Hazırlanan NMA’dan 120-130 µl kadarı lam yüzeyine yayılır ve buzdolabında kurumaya bırakılır. İzole edilerek LMA ile karıştırılan hücreler, NMA ile ön kaplama yapılmış lamlara yayılır, lamel kapatılır ve lamalar numaralandırılır. Donması için buzdolabına bırakılır. 5 dk bekledikten sonra sonra lameller çıkarılarak lizis aşamasına geçilir (42).

Lizis

Lizis solüsyonu, hücre ve çekirdek zarını eriterek DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, yaklaşık 90 dk süre ile yüksek konsantrasyonda soğuk lizis solüsyonunda bekletilir.

DNA sarmalının çözülmesi ve Elektroforez

Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için lamalar alkali elektroforez tamponunda 30 dk bekletilir. Süre sonunda 1.02 V/cm²’de 25 dk elektroforez işlemine tabi tutulur.

Nötralizasyon

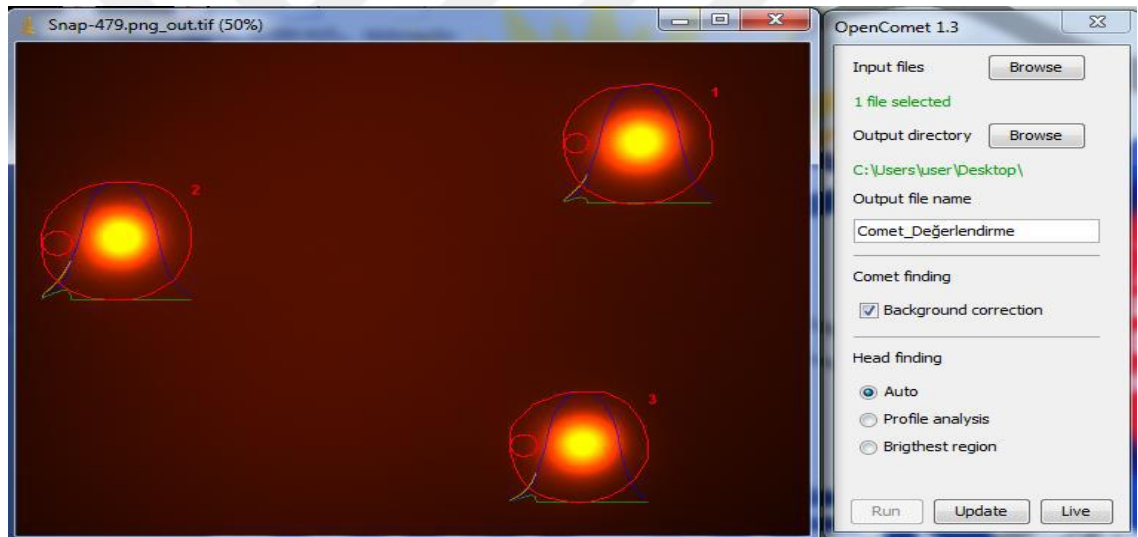
Alkali tampon çözeltisini lamlardan uzaklaştırmak için slaytlar 3 kez 5 ml/slayt nötralizasyon tamponu ile yıkanır (76).

Boyama

Ethidium bromür (5µg/ml) kullanılarak DNA'nın boyanması sağlanır ve değerlendirilme yapılır. Sonuçlar hemen değerlendirilmeyecek ise lamalar absolut alkolde bekletilerek fiksle edilebilir ve saklanabilir. Ancak çalışma süresince bütün örnekler en geç 24 saat içerisinde değerlendirilmiş ve fiksasyona tabi tutulmuş olmalıdır.

Değerlendirme ve İstatistiksel analiz

Lamlar karanlık odada Nikon Eclipse marka floresan mikroskop altında Nikon DS-Rİ2 kamera ile çekilmiştir. Fotoğrafları çekilen örnekler Open Comet açık kaynak kodlu görsel değerlendirme programında otomatik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.)(79). Kuyruk DNA yüzdesi (TDNAP) ve kuyruk Uzunluğu (TL) parametreleri DNA hasar miktarını yansıtmaları açısından seçilmiştir. Sonuçlar SPSS V20 paket programı (IBM,2012) aracılığıyla “ One-way Anova (Tukey)” istatistik testi ile değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir (şekil 3.3.) (25).



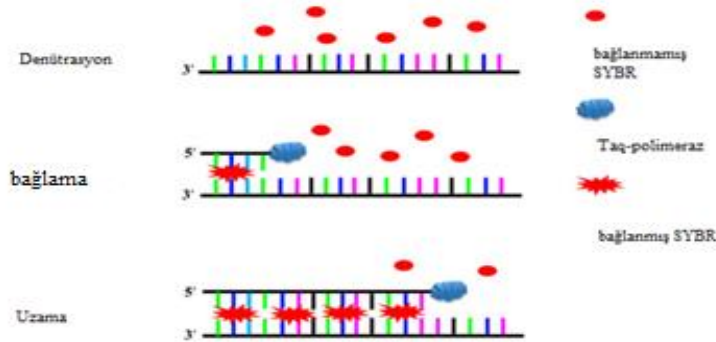
Şekil 3.2. Open Comet Programı ile Değerlendirilmiş Cometler (79).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
	File			Comet	Comet	Comet	Comet	Head	Head	Head	Head	Head		Tail	Tail		Tail		
1	Name	Num	Flag	Area	Intensity	Length	DNA	Area	Intensity	Length	DNA	Percent	Tail Area	Intensity	Length	Tail DNA	Percent	Moment	Olive
2	263.bmp	1	normal	6603	56.07739	129	370279	448	69.69866	24	31225	8.43283	6155	55.08595	105	339054	91.56717	96.14553	54.9403
3	263.bmp	2	normal	5158	94.95405	93	489773	538	106.6803	26	57394	11.71849	4620	93.58853	67	432379	88.28151	59.14861	33.54697
4	263.bmp	3	normal	6450	119.9746	114	773836	912	140.8706	34	128474	16.60223	5538	116.5334	80	645362	83.39777	66.71822	35.86104
5	263.bmp	4	normal	4918	32.91501	111	161876	661	38.51891	30	25461	15.72871	4257	32.04487	81	136415	84.27129	68.25975	45.5065
6	263.bmp	5	normal	7063	68.15447	130	481375	613	78.30832	28	48003	9.972059	6450	67.18946	102	433372	90.02794	91.8285	52.21621
7	263.bmp	6	normal	7431	60.80716	142	451858	797	51.91468	32	41376	9.156859	6634	61.87549	110	410482	90.84314	99.92746	56.32275
8	263.bmp	7	normal	6486	37.21986	128	241408	439	47.1344	24	20692	8.571381	6047	36.50008	104	220716	91.42862	95.08576	55.77146
9	263.bmp	8	normal	6539	56.44839	118	369116	383	65.1201	22	24941	6.756954	6156	55.90887	96	344175	93.24305	89.51332	52.21611
10	263.bmp	9	outlier	14265	41.77638	126	595940	12694	42.87916	127	544308	91.33604	1571	32.86569	0	51632	8.663959	0	0.173279
11	263.bmp	10	normal	6287	120.7857	109	759380	912	129.4901	34	118095	15.5515	5375	119.3088	75	641285	84.4485	63.33637	37.15734
12	263.bmp	11	outlier	11603	44.07705	160	511426	1563	39.21241	46	61289	11.98394	10040	44.83436	114	450137	88.01606	100.3383	60.73108
13	263.bmp	12	outlier	6768	39.34161	137	266264	602	42.59468	28	25642	9.630292	6166	39.024	109	240622	90.36971	98.50298	59.64401
14	263.bmp	13	normal	9715	85.75903	153	833149	540	84.54444	26	45654	5.479692	9175	85.83052	127	787495	94.52031	120.0408	65.21901
15	263.bmp	14	normal	5891	43.4826	114	256156	316	56.98418	20	18007	7.029701	5575	42.71731	94	238149	92.9703	87.39208	50.20396

Şekil 3.3. Programdan elde edilebilen parametreler (25).

3.3.4 QRT-PCR

Prensip: Kalıp olarak kullanılan mRNA'nın ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmesi ve takibinde de bu DNA üzerinden hedef gendeki spesifik dizilimlerin çoğaltılması sağlanır. Daha sonra bu cDNA'lar kullanılarak SYBR-Green floresan boya ile QRT-PCR analizi yapılır. SYBR-Green Sadece çift iplikli DNA bağlanarak izlenmekte ve eşzamanlı olarak ölçülebilmektedir (Şekil 3.4.)(27).



Şekil 3.4. SYBR-Green boya prensibi (27).

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar:

- Trizol Reaktifi, Bio Rad (USA).
- İzopropanol ve absolüt etanol Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edildi.
- iScript cDNA sentezi kiti, Bio Rad (USA).

Tablo 3.8. Primer Dizilimleri

PARK 1 ve 4 (SNCA) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' GCAAGGGTGAGGAGGGGTA 3'
Antisense	5' AGGCTTCAGGCTCATAGTCTTG 3'
PARK 2 (Parkin) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' TCTTCCAGTGTAACCACCGTC 3'
Antisense	5' ATCAGGGAGTTGGGACAGC 3'
PARK 7 (DJ1) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' AGGTCCTACGGCTCTGTTGG 3'
Antisense	5' GTCCTTAGCCAGTGGGTGTG 3'
PARK 8 (LRRK2) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5'CAATGCCTGCCTTACCTTCT 3'
Antisense	5'AGTTCAGAGACTTCCAATGTGC 3'
TH (Tirozin hidroksilaz) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' GTCTCAGAGCAGGATACCAAGC 3'
Antisense	5' CGAATACCACAGCCTCCAAT 3'
GUSB (HouseKeeping) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' GGCTGGTGACCTACTGGATTT 3'
Antisense	5' AAGTTGACCCTGGTTCCCTG 3'
TFRC (HouseKeeping) İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' CCGCTCGTGGAGACTACTTC 3'
Antisense	5' GAGATACATAGGGCGACAGGA 3'

SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, TH , ve housekeeping genleri β -glukuronidaz (GUSB) ve Transferrin receptör (TFRC) spesifik primer diziliminin dizaynı tarafımızdan yapılmıştır. SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, TH, GUSB ve TFRC için spesifik primer diziliminin dizayn edilmesi için, önce <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> sitesinden yukarıdaki bahsedilen genlerin spesifik mRNA dizilimleri saptandı. Daha sonra genel primer dizayn kuralları göz önüne alınarak olası primerler seçildi. Seçilen primer dizilimlerinin, herhangi bir dimer oluşturup oluşturmadığı veya diğer genlere ait dizilimler ile çakışıp çakışmadığını kontrol etmek için ise <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> sitesinden yararlanıldı.

Primerlerin Çözülmesi: Dizaynını belirlediğimiz SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, TH, GUSB ve TFRC genlerinin reaksiyon primerlerinin dizilimleri (oligomer biyoteknoloji Ankara) firmasına sentezletirildi. Liyofilize şekilde gelen stok primerler DNaz/RNase'dan yoksun suda çözülerek 100 μ M olacak şekilde ana stok çözeltisi hazırlandı. 100 μ M'lık ana stok primer çözeltisinden de SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, TH, GUSB ve TFRC primerleri için 10 μ M'lık ara stok çözeltisi hazırlandı.

3.3.4.1 RNA İzolasyonu

Prosedür:

- -80'deki izolasyon yapılacak dokular önce -20'ye bırakıldı ve 100 mg dokuya 1 ml PureZOL (Trizol) eklendi, Sonikatörde en düşük ayarda homojenize edildikten sonra ve 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı
- 12000 x g'de, +4 $^{\circ}$ C'de, 10 dakika santrifüj edildi.
- En altta DNA, ortada protein ve en üstte RNA olmak üzere 3 faza ayrılan süspansiyonun, en üst renksiz fazı temiz bir tüpe aktararak üzerine 0.2 ml kloroform eklendi ardından 15 saniye süreyle kuvvetlice çalkalandı. 12000 x g'de, +4 $^{\circ}$ C'de, 15 dakika santrifüj işlemini takiben elde edilen Santrifüjlemenin ardından karışım 3 faza ayrılacaktır: üstte yer alan, renksiz sulu (aqueous) faz (RNA fazı), beyaz ara faz ve alt kırmızı organik faz. Sulu faz yeni bir RNase free tüpe aktarıldı. 0,5 ml izopropil alkol eklendi İyice karıştırılıp ve ardından oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildiği.

- 12.000 x g'de 10 dakika +4 derecede santrifüj edildi. RNA, tüpün yanında ve altında beyaz bir topak olarak görüldü ve Süpernatantı dikkatlice atıldı
- 1 ml % 75 etanol eklendi, 5 dakika havada kurumaya bırakıldı, RNaz içermeyen su ile resüspanse edildi ve çözünmesi için 55-60 °C'de, 10 dakika inkübe edildi.
- Mikroplate okuyuculu spektrofotometrede önce 260 nm'de RNA miktarı, daha sonra da 260nm/280nm'de RNA'nın saflığı tayin edildi. 260nm/280nm oranı, 1,7- 2 olan RNA numuneleri QRT-PCR analizinde kullanıldı.

3.3.4.2 cDNA Sentezi

Prosedür:

cDNA sentez kiti (Biorad RNA örneklerinden cDNA sentezi iScript™

cDNA Synthesis Kit) kullanılarak gerçekleştirildi

Kit protokolüne göre, 1µg RNA örnekleri, 4 µL iScriptRT supermix (10X RT buffer, 25X dNTP karışımı, 10X RT random primer, RNaz inhibitörü, DNaz/RNaz'dan yoksun su ve RT enzim)den oluşan toplam hacmi 20 µl olan karışım içerisinde reaksiyona tabi tutuldu.

cDNA sentezi için termal döngü cihazında aşağıdaki program kullanıldı.

- 25°C'de 5 dakika
- 46°C'de 20 dakika
- 95°C'de 1 dakika

Elde edilen cDNA sentez ürünleri, -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildiği. hedeflenen genler olan SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, TH, GUSB ve TFRC 7 genin genlerinin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

3.3.4.3 QRT-PCR Analizi

Prosedür:

- QRT-PCR deneyi, iScript cDNA sentezi kiti, Bio Rad (USA) ile gerçekleştirildi.
- Kit protokolüne göre, her bir örnek için elde edilen cDNA; final konsantrasyonu 1X olan PCR tamponu, 1 µL cDNA solüsyonu, 10 µL ITaq Universal SYBR® Green Supermix, 0,2 µM olan dNTP karışımı, 1,5 µM olan MgCl₂, 2'şer 2µL olan sense ve antisense primer karışımı içerisinde DNaz/RNAz'dan yoksun suyun kullanılmasıyla toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyona hazırlandı.
- SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, TH, GUSB ve TFRC gen amplifikasyonu için aşağıdaki PCR programı kullanıldı.

Tablo 3.9. Çalışmada kullanılan QRT- PCR programı

QRT-PCR System	Setting / Mode	Polymerase Activation & DNA Denaturation at 95 °C	Döngü			Melt-Curve Analysis
			Dénaturation at 95 °C	Annealing /Extension + Plate Read at 60 - 65 °C	Cycles	
QIAGEN Rotor-Gene	Fast	30 saniye	5 saniye	30 saniye (60 - 63 °C arasında değişen primer Tm değerleri var)	40 döngü	65 °C - 95 °C 0.5°C increment 2-5 sec/step (or use instrument default setting)

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıklı Bulgular

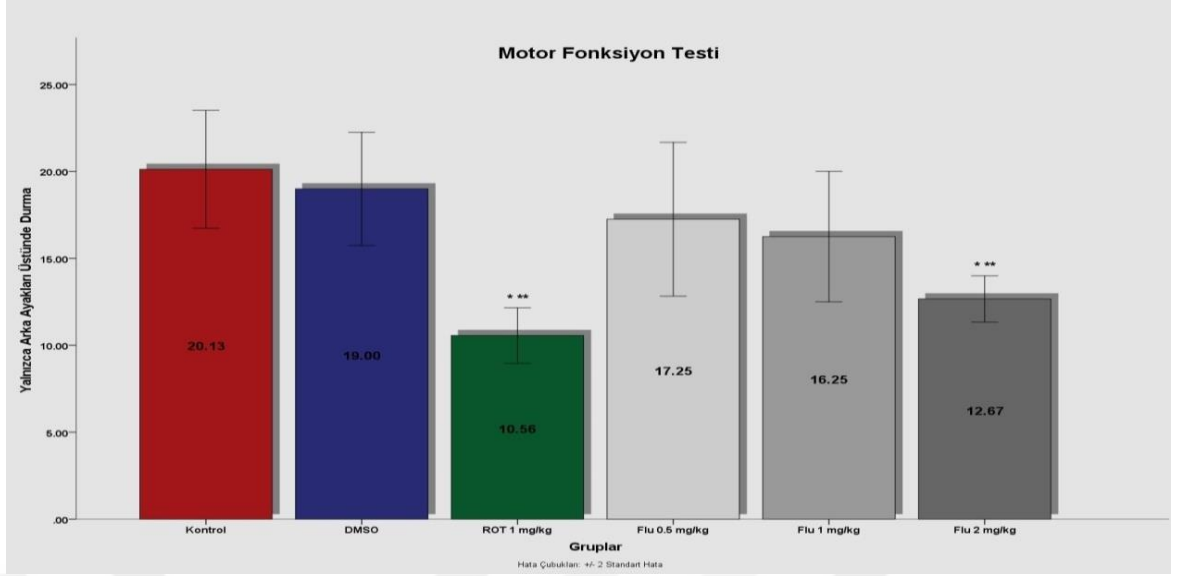
Hayvan Ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.1. Ortalama Hayvan Ağırlıkları

Ortalama Hayvan Ağırlıkları (gr)		
Gruplar	Deney Öncesi	Deney Sonrası
Kontrol grubu	33,02	34,41
DMSO grubu	31,03	32,09
Flu 0.5 mg/kg grubu	29,20	31,13
Flu 1 mg/kg grubu	33,37	34,52
Flu 2 mg/kg grubu	34,90	34,46
ROT1 mg/kg grubu	34,10	34,11

4.2. Motor Fonksiyon testinin Bulguları

Motor Fonksiyon bozukluklarını tespit etmek için Silindir testi uygulandı. Hayvanların sadece arka ayakları üzerinde doğrularak silindire yaslandıkları anlar sayıldı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Grafik üzerinde grupların değerleri ve anlamlılık ifadeleri belirlendi. Grafikte 10.56 değerinde görülen ROT kontrol ve DMSO gruplarına göre karşılaştırıldığında Motor Fonksiyonunun anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. 0.5, 1 ve 2 mg Flu dozlarının kontrol ve DMSO gruplarına göre karşılaştırıldığında Motor Fonksiyonunun azaldığı gözlemlendi. Anlamlı azalış 2 mg Flu uygulanan grupta tespit edildi. (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Motor Fonksiyon grafiğinde Kontrol ve DMSO grubuna göre anlamlılık işaretleri (* ve **).

4.3. Histokimyasal Bulgular

Kontrol grubu ile deney gruplarına ait beyin doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Refaiy ve arkadaşlarının yapmış oldukları derecelendirmeye göre değerlendirildi (63).

Grup I (Kontrol grubu) ve grup II (DMSO)'ya ait beyin doku kesitlerinde normal histolojik yapılar gözlemlenirken kısmen de olsa bazı kesitlerde hemorajik alanlar ve nötropil vakuolizasyonu şeklinde bulgular mevcuttu, (Tablo 4.2., Şekil 4.2. Şekil 4.3., H-E x400).

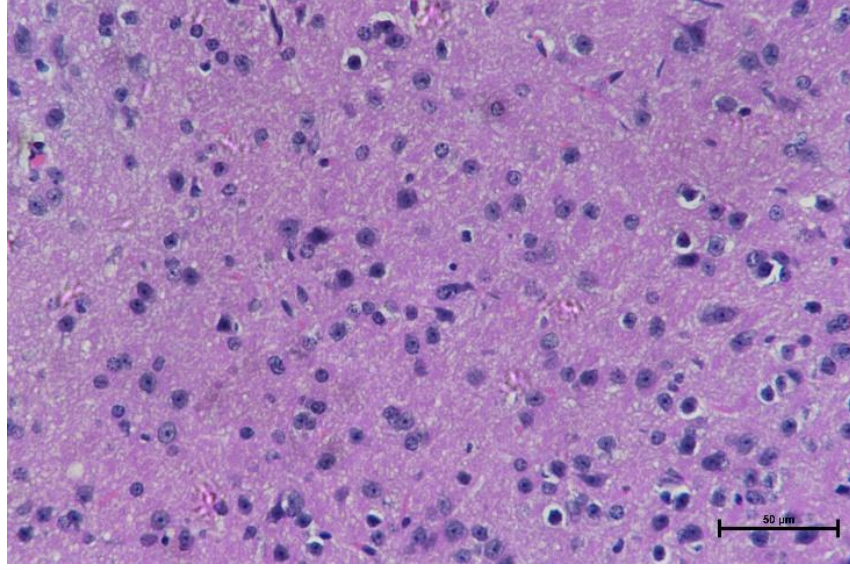
Grup III (ROT) ve grup IV'e (0.5 – 1 - 2 Flu verilen gruba) ait beyin dokuları incelendiğinde grup I ve grup II'ye (Kontrol ve DMSO gruplarına) göre önemli yapısal değişiklikler görüldü. Bu değişiklikler; nöron dejenerasyonu, nöron sayısında azalma, hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonu, nöropil vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nükleus ve beyin dokusunun substantia nigra kısmındaki LB'leri şeklinde gözlemlendi (Tablo 4.2., Şekil 4.4. - Şekil 4.5. - Şekil 4.6. - Şekil 4.7., H-E, x400). Grup III (ROT) ve grup IV kıyaslandığında en fazla hasarlanma sırasıyla; eşit oranda grup IV Flu 2'si ile grup III'te (Tablo 4.2., Şekil 4.4. - Şekil 4.7., H-E,

x400), daha sonra grup IV Flu 1’de ve en az grup IV Flu 0.5’te gözlemlendi (Tablo 4.2., Şekil 4.6.- Şekil 4.5.,H-E, x400).

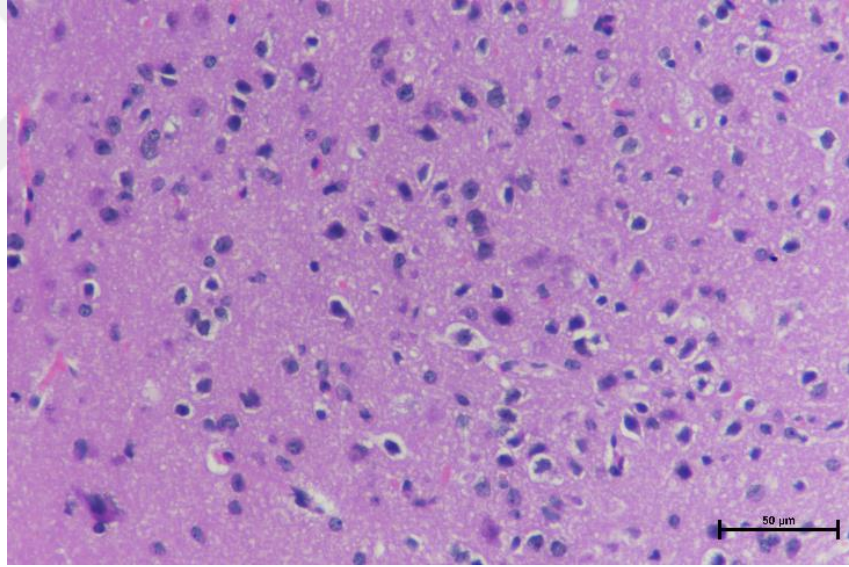
Ayrıca grupların hiçbirinde dişi ile erkek beyinleri arasında anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 4.2. Histolojik yapısal değişimlerin gruplara göre derecelendirilmesi

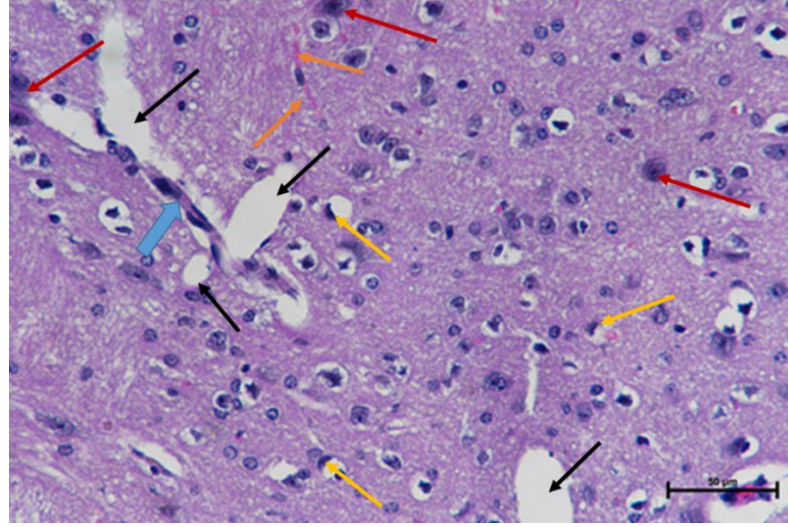
	LB’leri	Nöron Dejenerasyonu	Nöran Sayısında Azalma	Hemorajik Alanlar	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	Nöropil Vakuolizasyonu	Nöronlarda Piknotik Nukleus
Kontrol	-	-	-	-/+	-	-/+	-
DMSO Grubu	-	-	-	-/+	-	-/+	-
ROT Grubu	++/+++	++/+++	+++	+++	+++	+++	++/+++
0.5 Flu Grubu	+	+	+	+	+	+	+
1 Flu Grubu	+/+++	+/+++	++	++	++	+/+++	+/+++
2 Flu Grubu	++/+++	+++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++



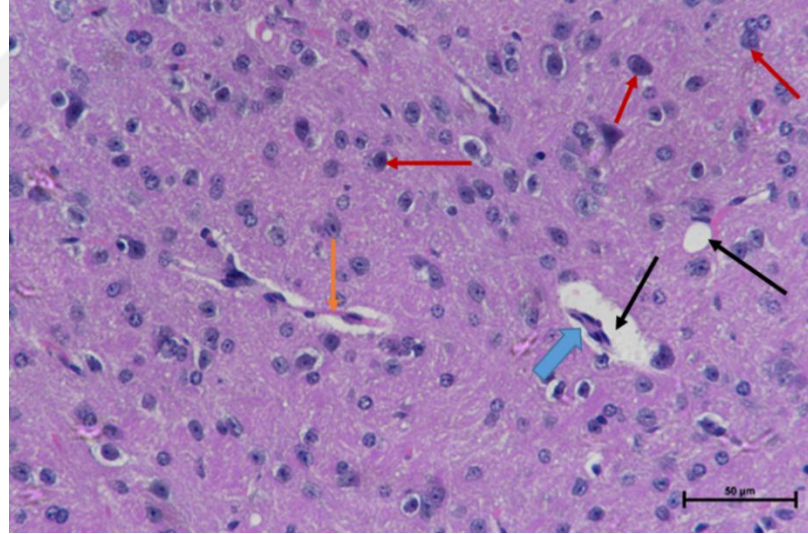
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait beyin doku kesiti. Normal histolojik yapılar gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra hemorajik alanlar ve nöropil vakuolizasyonu kısmen de olsa bazı alanlarda mevcuttur (H-E, x400).



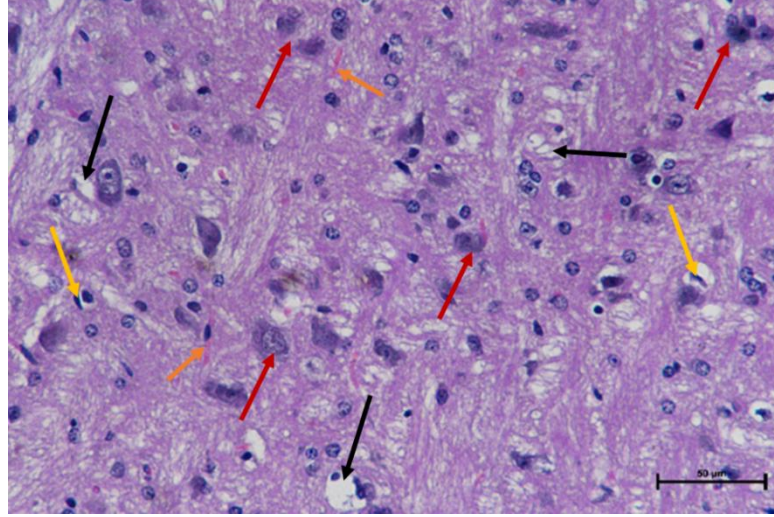
Şekil 4.3. DMSO grubuna ait beyin doku kesiti. Normal histolojik yapılar gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra hemorajik alanlar ve nöropil vakuolizasyonu kısmen de olsa bazı alanlarda mevcuttur (H-E, x400).



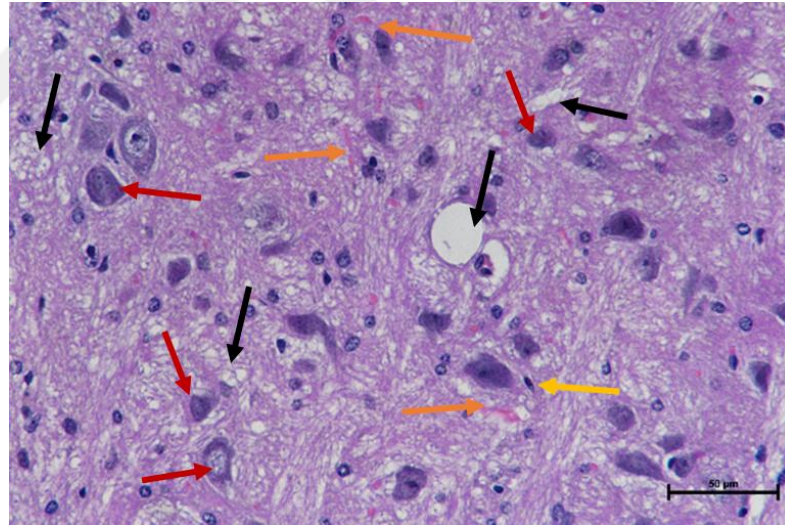
Şekil 4.4. ROT verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarla kıyaslandığında fazla oranda histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı oklar; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; LB'lerini; turuncu oklar; hemorajik alanları ve mavi ok; mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir (H-E, x400).



Şekil 4.5. Flu (0.5) verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarına kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Bulgular; ROT Verilen gruba göre azalmıştır. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, kırmızı oklar; LB'lerini; turuncu ok; hemorajik alanları ve mavi ok; mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir (H-E, x400).



Şekil1 4.6. Flu (1) verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarına kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Bulgular; ROT Verilen gruba göre azalmış, Flu 0.5 grubuna göre artmıştır. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı oklar; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; LB'lerini ve turuncu oklar; hemorajik alanları göstermektedir (H-E, x400).



Şekil1 4.7. Flu (2) verilen gruba ait beyin doku kesiti. Kontrol ve DMSO verilen gruplarına kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Bulgular; ROT grubu ile kıyaslandığında eşit oranda iken, Flu 0.5 ve Flu 1 grubuna göre ise artmış durumdadır. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı ok; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; LB'lerini ve turuncu oklar; hemorajik alanları göstermektedir (H-E, x400).

4.4. İmmünoistokimyasal Bulgular

Beyin doku kesitlerinin α -Syn ve TH immünohistokimyasal boyamalarında gruplar arasında anlamlı fark bulundu.

α -Syn ve TH ile işaretlemeye Grup I ile Grup II arasında anlamlı bir fark bulunmadı, (Tablo 4.3. - Şekil 4.8. - Şekil 4.9. - Şekil 4.14 - Şekil 4.15. x400).

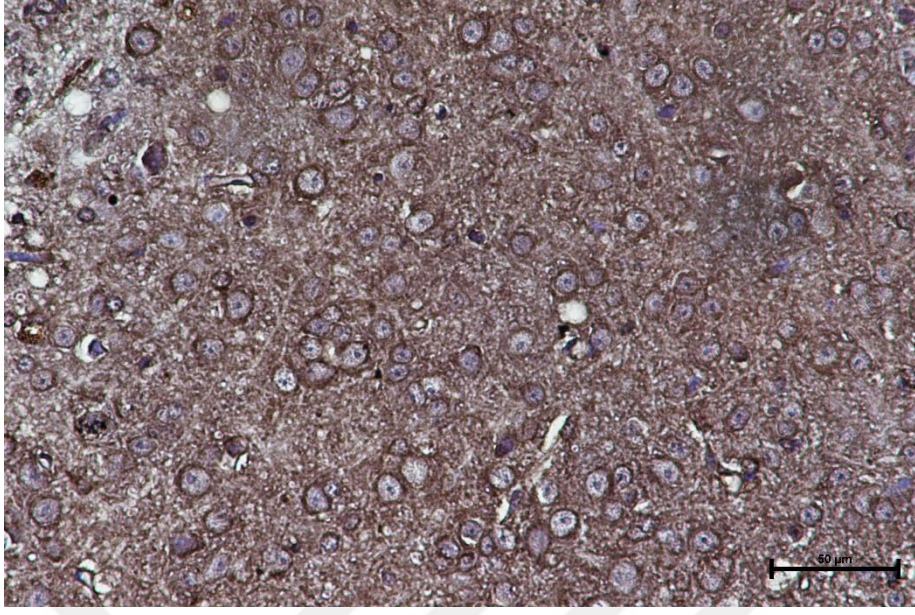
α -Syn ile isaretlemede grup III (ROT) ve grup IV (0.5 - 1 - 2 Flu)' e ait kesitlerde grup I (Kontrol) ve grup II (DMSO)' ye ait kesitlere kıyasla daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlemlendi (Tablo 4.3. - Şekil 4.10. - Şekil 4.11. - Şekil 4.12 - Şekil 4.13. x400). Grup III (ROT) ve grup IV kıyaslandığında en fazla pozitif boyanma sırasıyla; eşit oranda grup IV Flu 2' si ile grup III'te (Tablo 4.3. Şekil 4.10. - Şekil 4.13. x400), daha sonra grup IV Flu 1' de (Tablo 4.3. - Şekil 4.12. x400) ve en az boyanma ise grup IV Flu 0.5'te gözlemlendi (Tablo 4.3. -Şekil 4.11. x400).

TH ile işaretlemeye grup I ve grup II' de diğer gruplara kıyasla daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlemlendi (Tablo 4.3. - Şekil 4.14- Şekil 4.15, x400). Grup III (ROT) ve grup IV kıyaslandığında en az pozitif boyanma sırasıyla; eşit oranda grup IV Flu 2'si ile grup III'te (Tablo 4.3. - Şekil 4.16.- Şekil 4.19., x400) daha sonra grup IV Flu 1' de (Tablo 4.3. - Şekil 4.18. x400) ve en fazla pozitif boyanma ise grup IV Flu 0.5'te gözlemlendi (Tablo 4.3. - 4.17. x400).

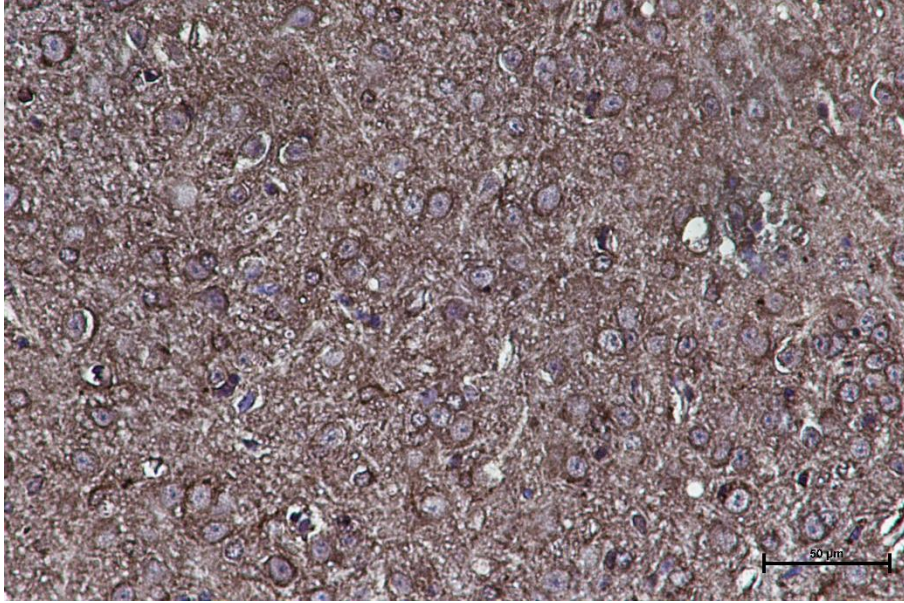
Ayrıca grupların hiçbirinde dişi ile erkek beyinleri arasında anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 4.3. α -Syn ve TH İşaretlenme Dereceleri

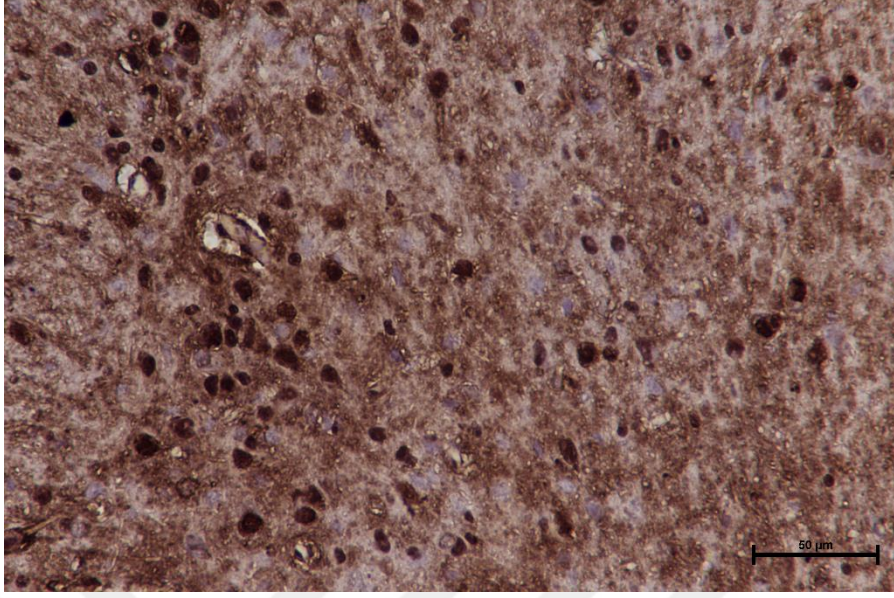
	KONTROL GRUBU	DMSO GRUBU	ROT GRUBU	0.5 Flu Grubu	1 Flu Grubu	2 Flu Grubu
α-Syn	-/+	-/+	++	+	++/+	++
TH	+++	+++	+	++	++/+	+



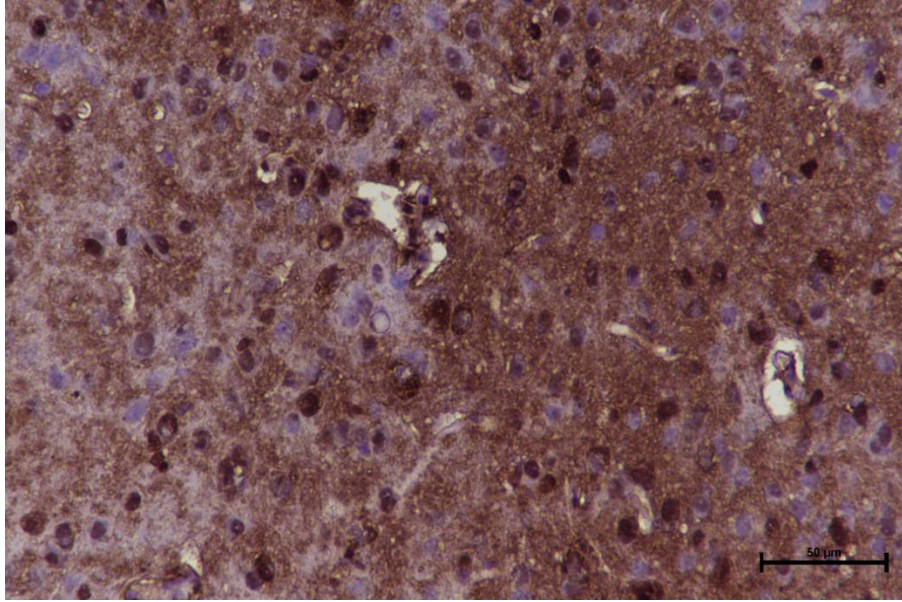
Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.



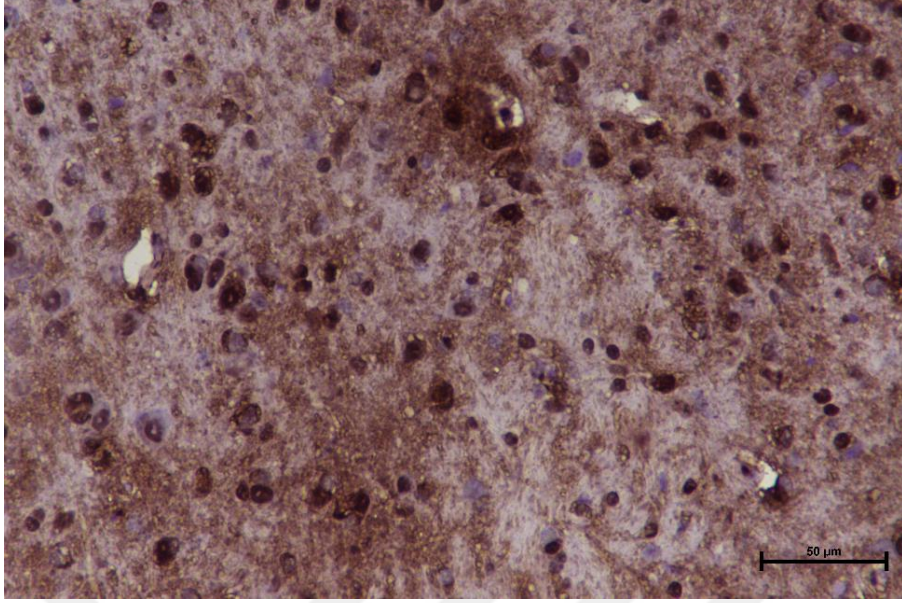
Şekil 4.9. DMSO grubuna ait doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.



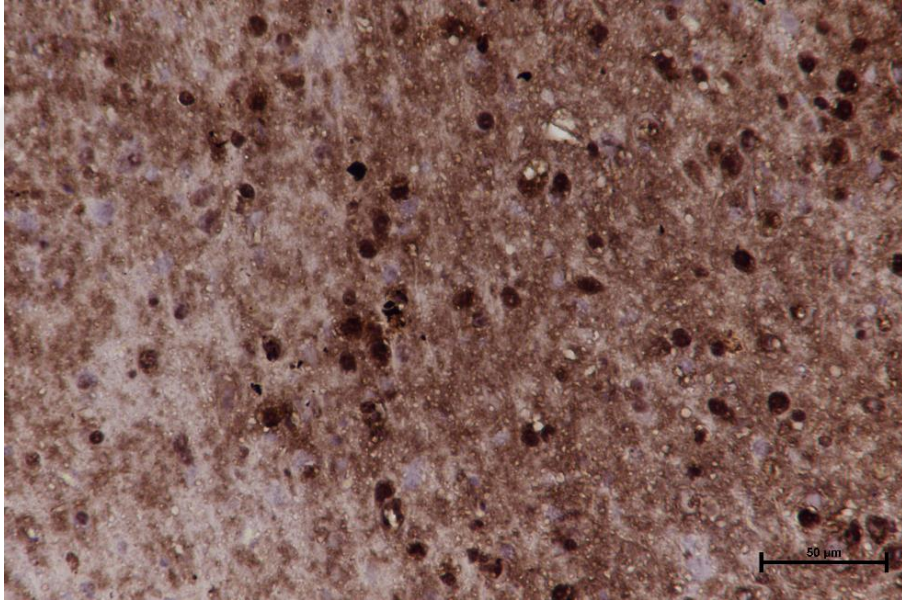
Şekil 4.10. ROT grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.



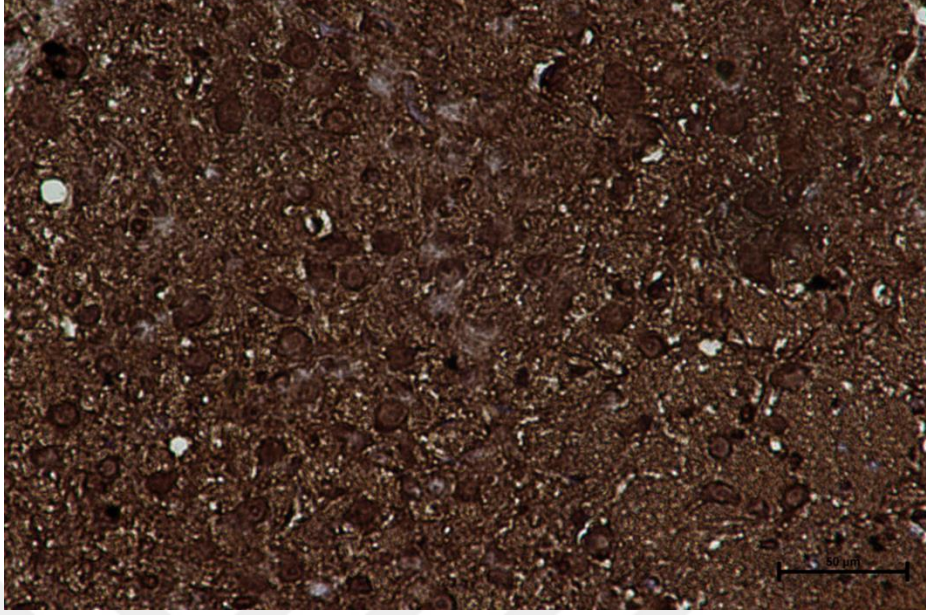
Şekil 4.11. Flu 0.5 grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.



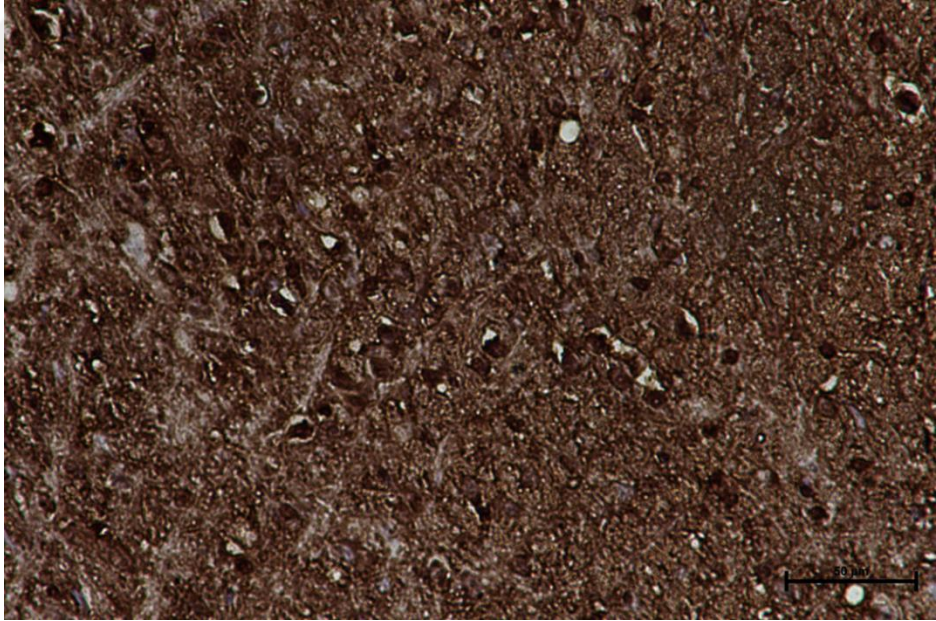
Şekil 4.12. Flu 1 grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.



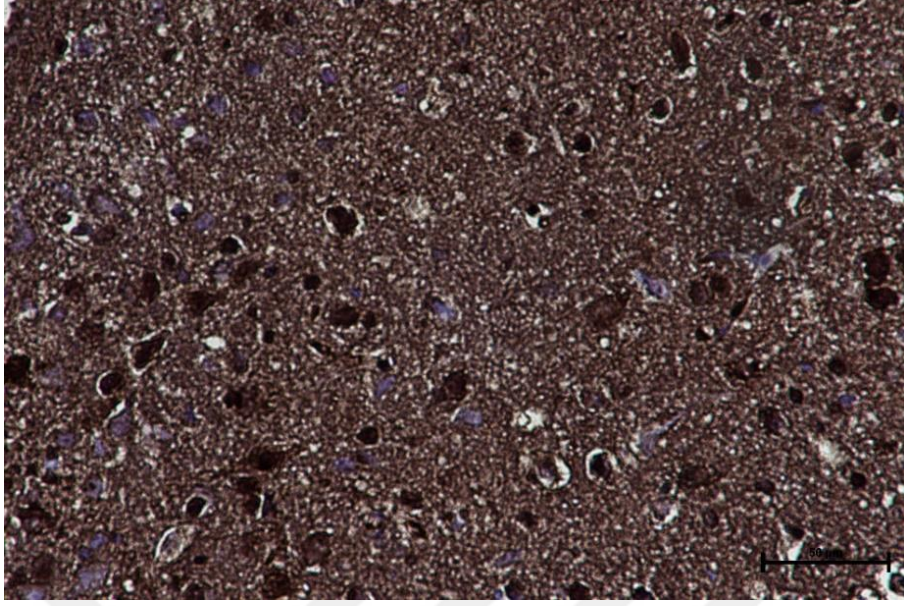
Şekil 4.13. Flu 2 grubuna ait ait beyin doku kesitinin α -Syn ile immün boyanması, x400.



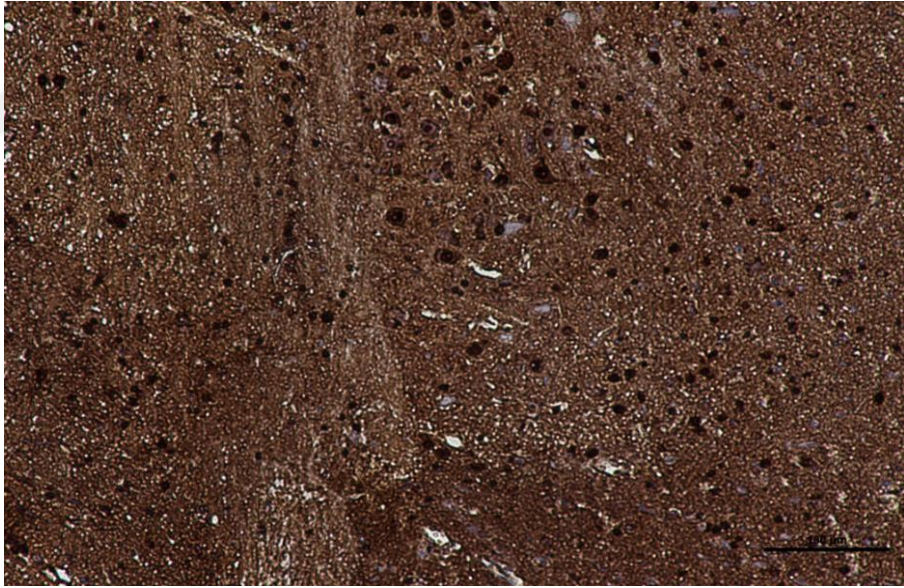
Şekil 4.14. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması, x400.



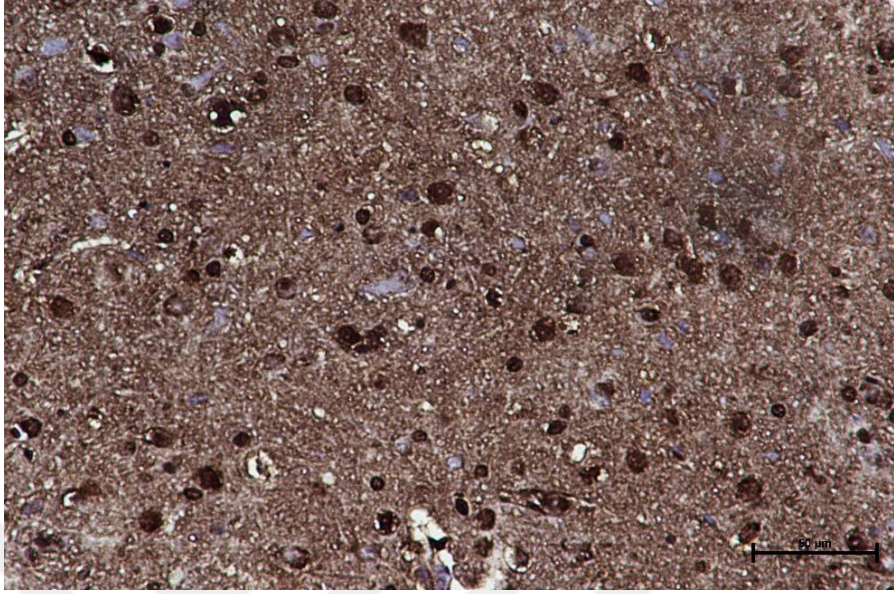
Şekil 4.15. DMSO grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması, x400.



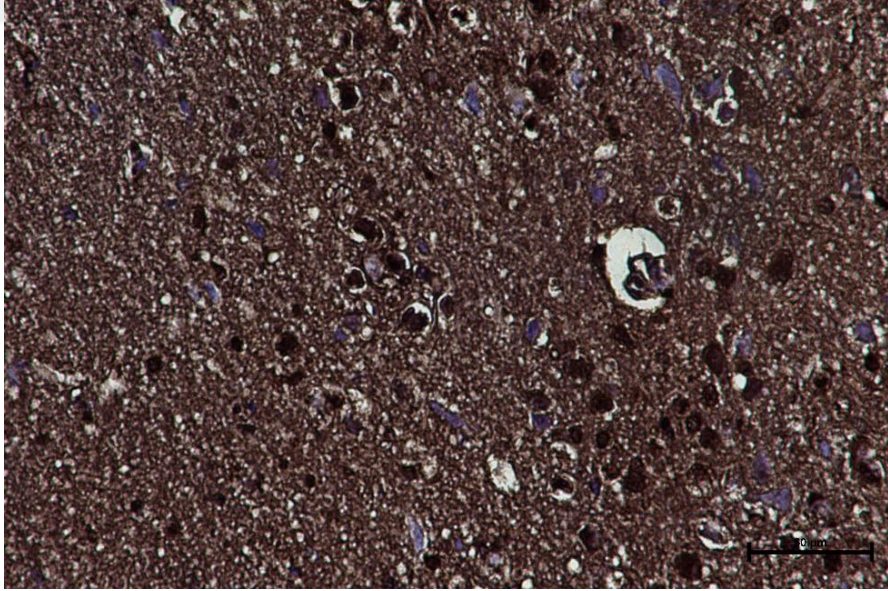
Şekil 4.16. ROT grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması, x400.



Şekil 4.17. Flu 0.5 grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması, x400.



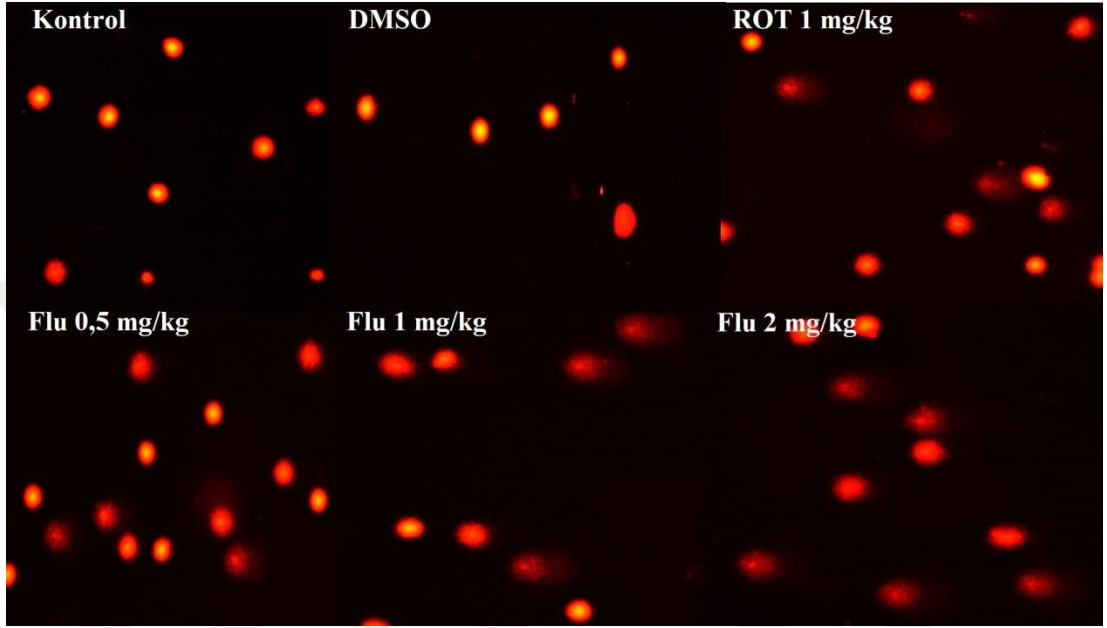
Şekil 4.18. Flu 1 grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması, x400.



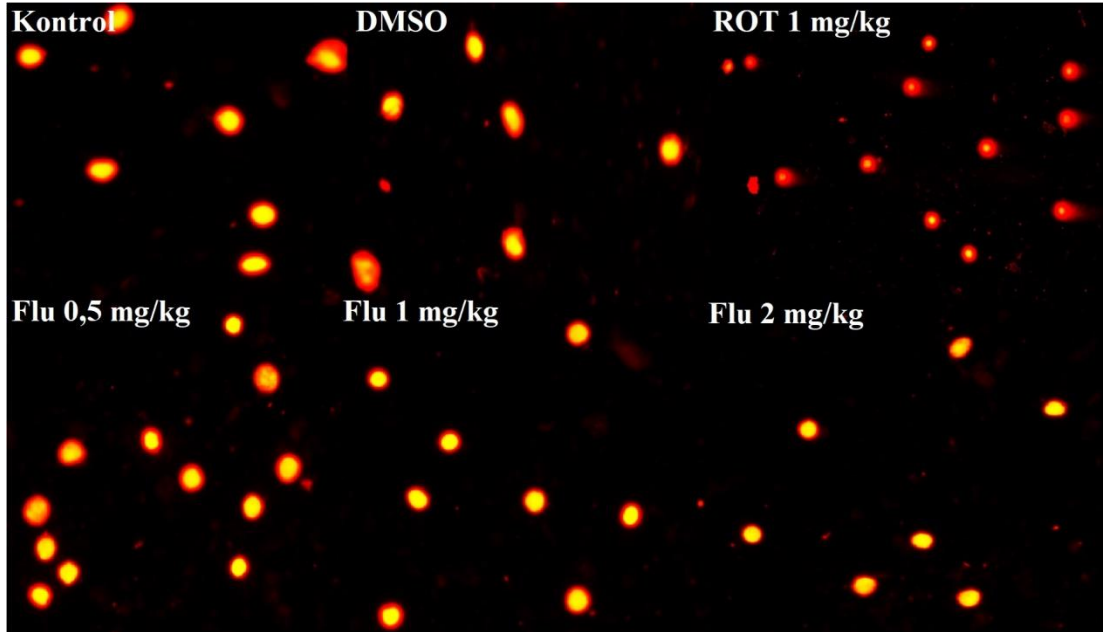
Şekil 4.19. Flu 2 grubuna ait beyin doku kesitinin TH ile immün boyanması, x400.

4.5. DNA Hasarı

Tüm fotoğraflar OpenComet poragramı aracılığı ile otomatik olarak değerlendirilmiş ancak değerlendirme esnasında programın yanlış algılayabileceği comet olmayan artefaktlar kontrol edilerek değerlendirilmeden çıkarılmıştır (Şekil 4.20)(Şekil 4.21)



Şekil 4.20. Araştırmada yer alan kan gruplarından örnek comet fotoğrafları



Şekil 4.21. Araştırmada yer alan Beyin doku gruplarından örnek comet fotoğrafları

Grupların karşılaştırılmaları Tek Yönlü Anova (Tukey) parametrik testi ile yapılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Kan ve beyin Sonuçları (Tablo 4.4 ve 4.5) ‘Ort±Standart Hata’ cinsinden ifade edilmiştir.(Şekil 4.22 ve 4.23). (Şekil 4.24. ve 4.25)

Tablo 4.4. Kan doku ortalama DNA hasarı

Gruplar	Ortalama Kuyruk DNA Yüzdesi Değerleri
Kontrol	4,36±0,24
DMSO	4,43±0,21
ROT	8,40±0,38 * **
Flu 0.5 mg/kg	8,09±0,29 * **
Flu 1 mg/kg	8,31±0,32 * **
Flu 2 mg/kg	8,58±0,35 * **

Ort±Std. Hata; *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.001) **: Çözücü kontrol DMSO grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.001) bulunmuştur

Tablo 4.5. Beyin doku ortalama DNA hasarı

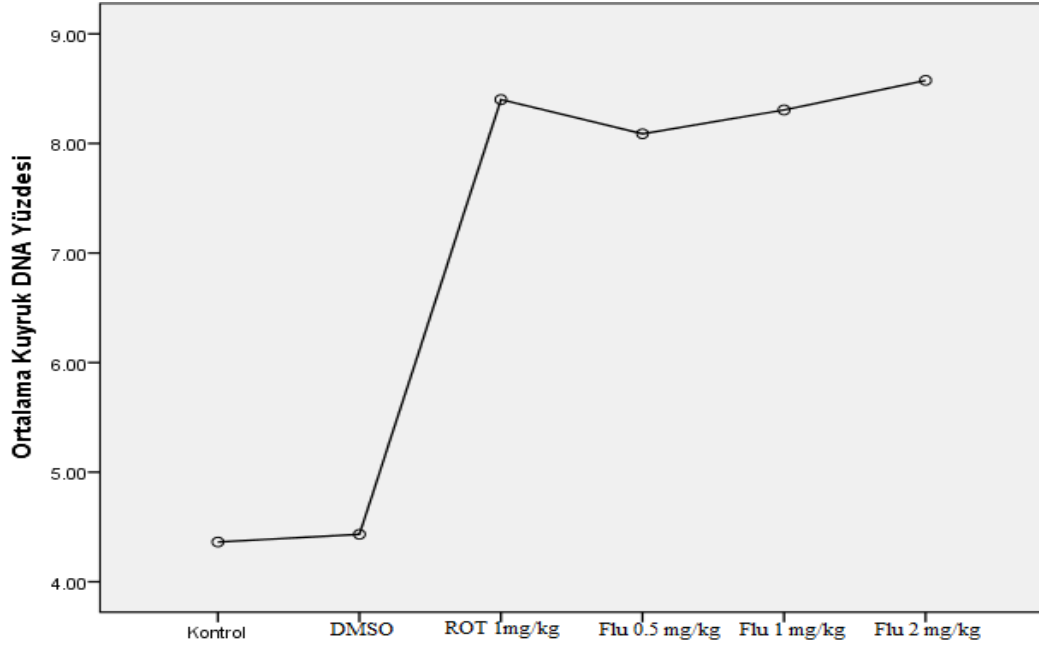
Gruplar	Ortalama Kuyruk DNA Yüzdesi Değerleri
Kontrol	5,76±0,27
DMSO	5,80±0,29
ROT	6,94±0,30 * **
Flu 0.5 mg/kg	5,58±0,25
Flu 1 mg/kg	5,71±0,26
Flu 2 mg/kg	5,91±0,31

Ort±Std. Hata; *:ROT grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) **:Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) bulunmuştur.

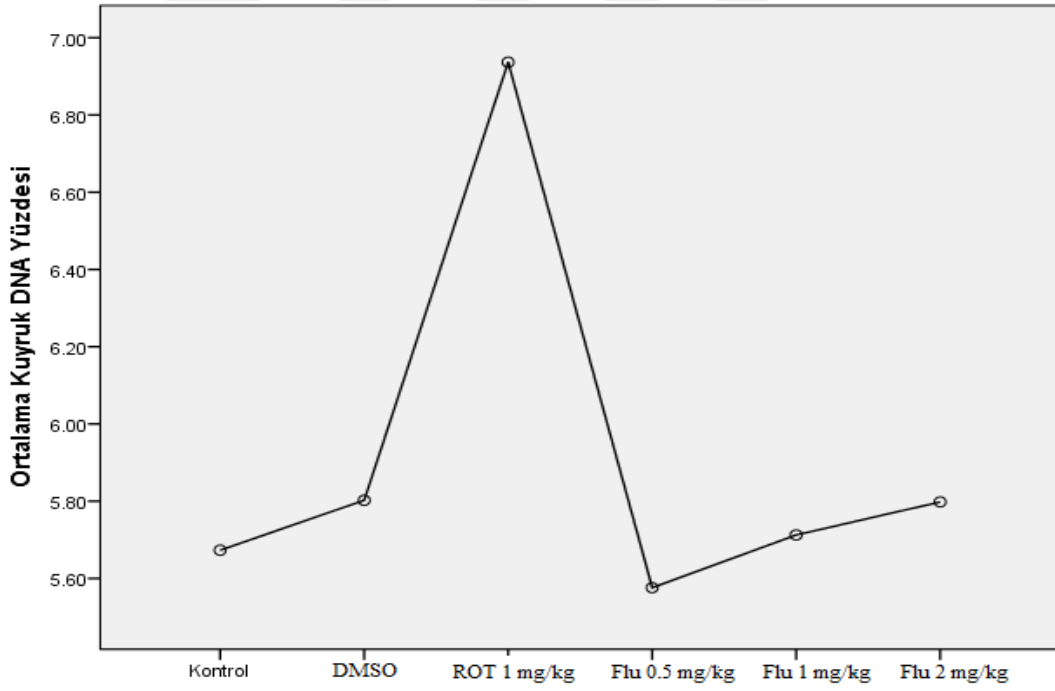
Kan ve Beyin doku sonuçlarına baktığımızda ROT uygulanan grupların Kuyruk DNA Yüzdesi parametresi Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha fazla DNA hasarına sahip olduğu tespit edilmiştir (p<0.001) (p<0.05).

Yine Kan doku sonuçlarına göre Flu uygulanan grupların Kuyruk DNA Yüzdesi parametresi Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha fazla DNA hasarına sahip olduğu tespit edilmiştir (p<0.001) (p<0.05).

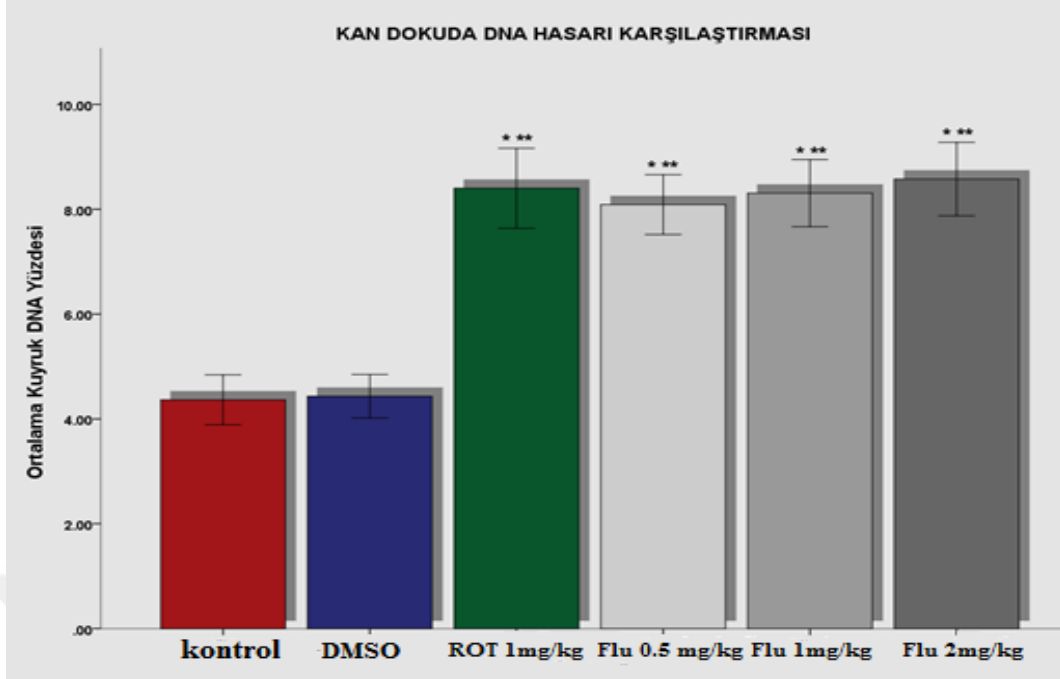
Beyin doku sonuçlarına göre Flu uygulanan gruplarda DNA hasarı gözlemlenmemiştir.



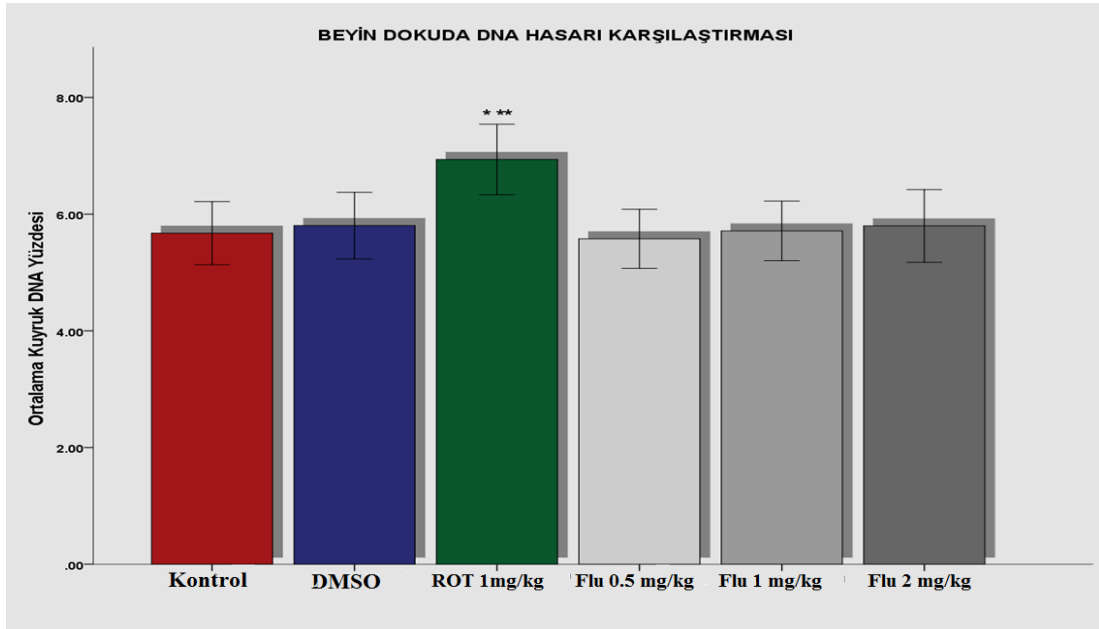
Şekil 4.22. Kan Gruplarına ait ortalama kuyruk DNA Yüzdesi parametresi.



Şekil 4.23. Beyin Gruplarına ait ortalama kuyruk DNA Yüzdesi parametresi.



Şekil 4.24. Kan dokuda kuyruk DNA Yüzdesi parametresinin karşılaştırılması; ROT ve Flu grupları Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) **: Çözücü kontrol DMSO grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bulunmuştur.



Şekil 4.25. Beyin dokuda kuyruk DNA Yüzdesi parametresinin karşılaştırılması; ROT grupları Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) **:Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

4.6. QRT-PCR Sonuçları

Tablo 4.6. DMSO grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

Genler	mRNA Ekspresyon Seviyesi	Std. Hatta	P değeri
SNCA	1.41	0.26 - 6.47	0.34
Parkin	1.32	0.69 - 2.53	0.10
DJ-1	0.94	0.53 - 1.69	0.71
LRRK2	1.33	0.35 - 5.52	0.43
TH	0.78	0.41 - 1.46	0.11

($p < 0.05$) anlamlı, ($p > 0.05$) anlamlı değil

SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH örneklem grubu kontrol grubundan farklı değildir.

Tablo 4.7. ROT 1mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

Genler	mRNA Ekspresyon Seviyesi	Std. Hatta	P değeri	Sonuç
SNCA	2.20	0.40 - 11.14	0.02	Artırmıştır
Parkin	1.06	0.48 - 2.19	0.77	
DJ-1	0.35	0.15 - 0.80	0.00	Azaltmıştır
LRRK2	1.81	0.36 - 8.97	0.10	
TH	0.35	0.05 - 1.66	0.00	Azaltmıştır

($p < 0.05$) anlamlı, ($p > 0.05$) anlamlı değil

SNCA mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır.

LRRK2 ve Parkin örneklem grubu kontrol grubundan farklı değildir.

TH ve DJ-1 mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır.

Tablo 4.8. Flu 0.5 mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

Genler	mRNA Ekspresyon Seviyesi	Std. Hatta	P değeri	Sonuç
SNCA	1.25	0.20 - 8.05	0.61	
Parkin	0.38	0.10 - 1.54	0.00	Azaltmıştır
DJ-1	0.50	0.15 - 1.63	0.02	Azaltmıştır
LRRK2	0.59	0.11 - 3.19	0.22	
TH	0.27	0.09 - 0.62	0.00	Azaltmıştır

($p < 0.05$) anlamlı, ($p > 0.05$) anlamlı değil

SNCA ve LRRK2 örneklem grubu kontrol grubundan farklı değildir.

Parkin, DJ-1 ve TH mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır.

Tablo 4.9. Flu 1 mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

Genler	mRNA Ekspresyon Seviyesi	Std. Hata	P değeri	Sonuç
SNCA	1.28	0.11 - 13.84	0.66	
Parkin	0.18	0.05 - 0.57	0.00	Azaltmıştır
DJ-1	0.32	0.02 - 1.66	0.04	Azaltmıştır
LRRK2	0.33	0.01 - 3.69	0.10	
TH	0.41	0.06 - 1.82	0.02	Azaltmıştır

($p < 0.05$) anlamlı, ($p > 0.05$) anlamlı değil

SNCA ve LRRK2 örneklem grubu kontrol grubundan farklı değildir.

Parkin, DJ-1 ve TH mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır.

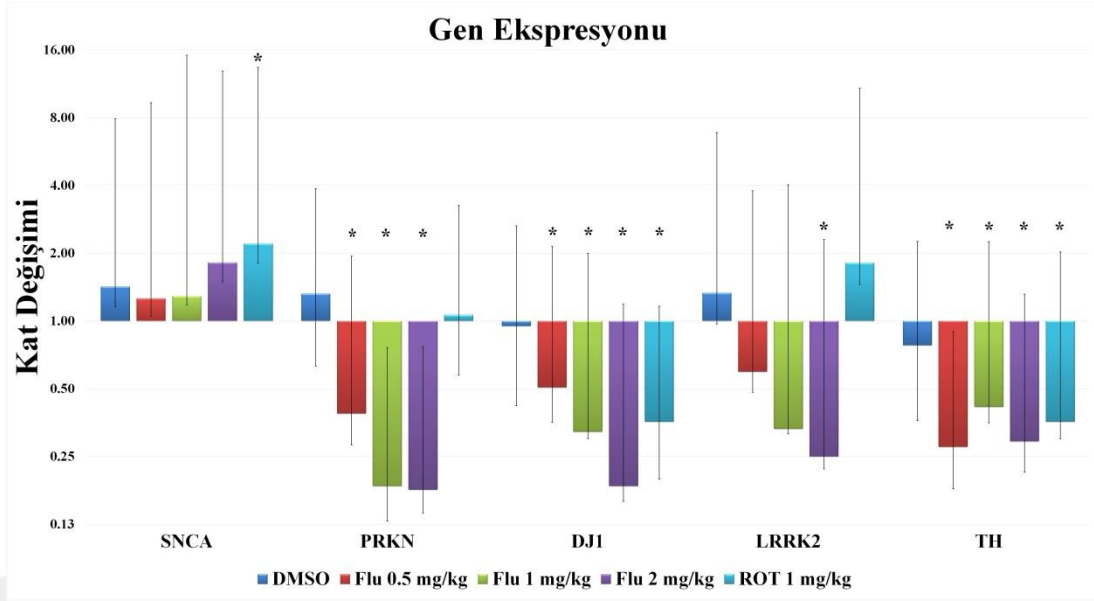
Tablo 4.10. Flu 2 mg/kg grubundaki SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

Genler	mRNA Ekspresyon Seviyesi	Std. Hata	P değeri	Sonuç
SNCA	1.81	0.32 - 11.06	0.15	
Parkin	0.17	0.03 - 0.59	0.00	Azaltmıştır
DJ-1	0.18	0.02 - 1.00	0.00	Azaltmıştır
LRRK2	0.25	0.03 - 2.04	0.01	Azaltmıştır
TH	0.29	0.07 - 1.02	0.00	Azaltmıştır

($p < 0.05$) anlamlı, ($p > 0.05$) anlamlı değil

SNCA örneklem grubu kontrol grubundan farklı değildir.

Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH mRNA ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır.



Şekil 4.26. SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve TH genlerinin kat değişim grafiği.

Şekil 4.26.de görüldüğü gibi SNCA mRNA ekspresyon seviyesi tüm gruplarda artmıştır ancak SNCA yalnız ROT grubunda anlamlı artış göstermiştir.

Parkin mRNA ekspresyon seviyesi DMSO, ROT grubunda artmıştır fakat anlamlı değildir. Parkin mRNA ekspresyon seviyesi anlamlı olarak Flu dozuna bağlı olarak azalmıştır.

DJ-1 mRNA ekspresyon seviyesi DMSO hariç tüm gruplarda anlamlı olarak azalmıştır. DJ-1 mRNA ekspresyon seviyesi anlamlı olarak Flu dozuna bağlı olarak azalmıştır.

LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi DMSO, ROT grubunda artmıştır ancak anlamlı değildir. LRRK2 mRNA ekspresyon seviyesi Flu dozuna bağlı olarak azalmıştır. Anlamlı azalış 2 mg Flu uygulanan grupta tespit edilmiştir.

TH mRNA ekspresyon seviyesi DMSO hariç tüm gruplarda anlamlı olarak azalmıştır.

5. TARTIŞMA

PH, beynin SNpc bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve α -Syn proteinlerinin birikmesiyle oluşan LB ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (10). Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Dünyada en sık görülen hareket bozukluğu olması ve etiyolojisinin gösterdiği karmaşıklık nedeniyle, nörodejenerasyon alanındaki araştırmaların odak noktası olmuştur (1). PH'nın temel bir klinik tanımlaması yapılamamasına rağmen genetik, yaşlanma, çevresel faktörler (pestisitler) gibi etkilenin hastalığın oluşmasında rolü olduğu düşünülmektedir (12).

PH'nın en önemli risk faktörlerinden biri pestisitlerdir. Pestisitler farklı mekanizmalar kullanarak PH'nın oluşumuna sebebiyet vermektedir. Pestisitler, mitokondride yer alan elektron transport kompleksi'nin (ETC) fonksiyonunu kalıcı olarak bozmaktadır. Bozulmuş mitokondriyal fonksiyon oksidatif strese yol açarak hücre içi bileşenlerin hasar görmesine neden olmakta hücre ölümüne sebebiyet veren bir takım hücresel yolakları aktive etmektedir. Oksidatif stres, PH'da nigral dopaminerjik hücre ölümünün ana patojenik mekanizmasıdır (19).

Pestisit olan ROT'un mitokondriyal kompleks I'ı inhibe etmesiyle oluşan oksidatif stresin (25) in vivo ve in vitro koşullarda PH'ya neden olduğu tespit edilmiştir (10).

Bu durum ROT gibi mitokondriyal toksisiteye yol açan ve oldukça sık kullanılan bir pestisit olan Flu'nın da PH ile bir bağlantısı olup olmadığı tartışılmaktadır. Literatür taraması yapıldığında Flu ve PH ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Isparta'da yüksek oranda kullanılan fungusitlerden biri de Flu'dur ve her tür bitki için kullanılmaktadır. Flu'un, mitokondriyal kompleks II inhibitörü olması ve mitokondriyal komplekslerin inhibisyonunun PH mekanizmasında başlıca yolak olması kompleks II inhibitörü bir pestisit de aynı sonuca yol açıp açmayacağını akla getirmektedir. Bu bağlamda ROT ile farelerde Parkinson modeli oluşturduk. Elde edilen sonuçları Flu ile karşılaştırarak PH açısından değerlendirdik.

ROT ile yapılan birçok çalışmada vücut ağırlığı üzerine farklı etkileri gözlemlenmiştir. 11 aylık Lewis ratlara 1 mg / kg / gün 6 hafta boyunca Alzet mini

pompalar aracılığıyla uygulanan ROT sonucunda ratların vücut ağırlığının yaklaşık % 10 azaldığı gösterilmiştir (83). 2 mg / kg / gün 5 hafta boyunca SC olarak erkek wistar ratlara uygulanan ROT sonucunda ratların vücut ağırlıklarında bir değişiklik gözlemlenmemiştir (87).

Çalışmamızda bütün gruplarda hayvan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir

Nörotoksisite oluşmasının ilk işareti motor fonksiyon bozukluklarının oluşmasıdır (18,54).

Parkinsonizm modelinde, ROT kaynaklı oluşan oksidatif stres TH enzimini azaltarak (38) motor fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (15).TH enzimi DA sentezinde ve metabolizmasında görev almaktadır. Bu enzim oksijen atomlarından birini kullanarak tirozin molekülünü hidroksilleyerek L-DOPA oluşturur. L-DOPA ise AADC enzimi ile DA'ye çevrilir ve veziküllere depolanır (54). TH enzimi azaldığında DA üretimi de azalacağı için PH'nın temel bulgularından motor fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (38,39).

1.5 mg / kg / 28 gün boyunca SC olarak ratlara uygulanan ROT sonucunda ROS ve NO düzeylerinin artışına yol açtı, TH + hücre sayılarını azaltarak TH enziminde önemli bir düşüşe neden oldu ve ratlarda uzun süreli hareketsizlik dönemleri görüldü (13)(87). Parkhe ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ROT 2 mg/ kg /gün İP olarak 21 gün boyunca ratlara uygulanmıştır. Nitrit oluşumu, lipid peroksidasyonu gibi oksidatif stres belirtilerini arttırmasıyla SNpc'ta TH-ekspresyonunu azaltarak ratlarda motor fonksiyon bozukluklarına neden olduğu gözlenmiştir (91). Zhang ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada ROT 2.5 mg / kg / gün i.p 14 gün boyunca ratlara uygulanmıştır. SN'da TH + hücre sayılarını azaltarak motor fonksiyon bozuklukları tetiklemiştir. 42 gün boyunca uygulanan ROT ise nöronal apoptoz meydana getirmiş ve daha ağır motor fonksiyon bozuklukları gözlemlenmiştir (59). Bu sonuç ROT tarafından oluşturulan apoptoz motor fonksiyon bozukluklarıyla bir bağlantısı olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda ROT in vivo ve in vitro apoptozu teşvik etmiştir.

ROT 2.5 mg / kg / gün i.p. 42 gün boyunca ratlara uygulanmış. PH ratlarının SN'sinde nöronal apoptozu değerlendirmek için Tunel boyama yöntemini kullanmışlardır. Apoptotik nöronların sayısı ışık mikroskobu ve transmisyon elektron

mikroskopisi altında sayılarak, kaspaz-3 seviyesi Western Blot ile değerlendirilmiştir. SN'deki nöronlar bariz apoptotik özelliklerle ortaya çıktığı tespit edilmiştir (59).

SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri 100 nM ROT ile 24 saat muamele edilmiş. ROT'un önemli ölçüde ROS'u arttırmasıyla pro-apoptotik Bax, BAD, kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-8, kaspaz-9 ekspresyonunu artırdığı ve anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2, Bcl-xL'i azalttığı gösterilmiştir (32). Parkinsonizm modelinde ROT, dopaminerjik nöronların apoptoz yoluyla ölümüne neden olarak motor fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (93).

Çalışmamızda ROT grubunda Motor Fonksiyonunun anlamlı olarak azaldığı gözlemlenirken, Flu grubunda da doza bağlı olarak Motor Fonksiyonunun azaldığı belirlenmiştir.

PH fenotipik modelinin oluşumu histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler ile tespit edilebilmektedir. SNpc'da TH ekspresyonunun azalması (35) ve α -Syn ekspresyonunun artmasıyla gelişen LB, PH modelinin oluşumunu işaret etmektedir (77).

İmmünohistokimyasal boyama ile α -Syn hücre sayısı ve ekspresyonu arttığından dolayı daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlenirken, TH hücre sayısı ve ekspresyonu azaldığı için daha az miktarda pozitif işaretlenme gözlenmiştir.

Alzahrani ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ROT 1 mg / kg / 48 saat / 9 kez SC olarak erkek İsviçre albino farelerine uygulanmış ve parkinson benzeri bir fenotipi indüklemiştir. ROT, 8-OHdG'yi artırmakta ve motor işlev bozukluklarına neden olmaktadır. ROT grubundan SN karışık normal ve dejenere nöronlar gösterdiği belirlenmiştir. Histopatolojik incelemede çok fazla sayıda piknotik nukleus gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyamada TH'de daha az miktarda pozitif işaretlenme gözlenmiştir (52)(98).

Bir başka çalışmada, ROT 1.5, 2 veya 2.5 mg / kg 5 hafta boyunca SC olarak erkek Wistar farelerine uygulanmış ve SN'da α -Syn daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlenirken, TH'de daha az miktarda pozitif işaretlenme gözlenmiştir (87). ROT 1.5 mg / kg, iki günde bir SC olarak erkek Wistar farelerine iki hafta boyunca verildiğinde lipid peroksidasyonu ve NO seviyelerinin arttığı, TH de ise

daha az miktarda pozitif işaretlenme olduğu tespit edilmiştir (99). NO, dopamin tükenmesini teşvik ederek PH'nın altında yatan nörotoksik süreçlerle ilişkilidir (66).

MA ve ark. tarafından ratlarda yapılan çalışmada ise ROT 1 mg / kg/ 28 gün boyunca SC olarak erkek ratlara uygulanmış ve parkinson benzeri bir fenotipi indüklediği görülmüştür. SN'de α -Syn'nin daha fazla miktarda pozitif işaretleme gösterdiği, TH'nin ise daha az miktarda pozitif işaretlenme gösterdiği bildirilmiştir (103).

Zeng ve ark. tarafından erkek ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ROT 1 mg / kg / gün 5 hafta süresince uygulanmış, SN'da DA nöronlarında önemli bir kayıp elde edilmiştir. TH de ise daha az miktarda pozitif işaretlenme, α -Syn de daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlenmiştir. Ayrıca α -Syn birikiminde artış gerçekleşmiş ve LB oluşumuna neden olmuştur (70) (81).

Almeida ve ark. on aylık yaşlı Lewis ratlara 2 mg / kg / gün dört hafta boyunca SC olarak ROT uygulamış, İmmünohistokimyasal boyama ve western blot analiziyle α -Syn seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (116).

Yukarıda belirtilen literatür bilgileri çalışmamızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda, ROT ve Flu dozuna bağlı olarak beyin dokuları incelendiğinde önemli yapısal değişiklikler görüldü. Bu değişiklikler daha çok beyin dokusunun SN kısmında; LB'leri, nöron dejenerasyonu, nöran sayısında azalma, hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonu, nöropil vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nukleus şeklinde gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda α -Syn ekspresyonu seviyelerine bakılmıştır. α -Syn ile işaretlemede ROT ve Flu dozuna bağlı olarak beyin dokuları incelendiğinde daha fazla miktarda pozitif işaretlenme gözlenirken TH ile işaretlemede ise ROT ve Flu dozuna bağlı olarak beyin dokuları incelendiğinde daha az miktarda pozitif işaretlenme gözlemlenmiştir.

ROT, ROS oluşumuna neden olarak DNA, RNA ve proteinlerle etkileşime girerek hücre ölümüne yol açabilmektedir (117) bu durum in vivo ve in vitro olarak tespit edilmiştir.

Verma ve ark. Tarafından yapılan çalışmada ratlara 12mg/7gün ROT bilateral intraserebroventriküler olarak uygulamıştır. ROT'un, nitrit ve lipit peroksidasyonunu

arttırmasıyla tüm ratların beyin bölgelerinde önemli DNA hasarına neden olduğu comet metodu ile tespit edilmiştir. Kaspaz3 seviyesini arttırarak apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (118).

SH-SY5Y hücreleri 200 nM ROT ile 24 saat muamele edildiğinde % 51.24 oranında hücre ölümünü indüklemiştir. Aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna da yol açmıştır. Comet metodu ile ROT kaynaklı oksidatif stresin DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir ve Cyt c, kaspazlar-3, -6, -8, 9 Bax'ı önemli ölçüde arttırırken Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (125).

Estrella-Parra ve ark. Pachyrhizuserosus'tan izole edilen ROT K562 insan lösemi hücrelerinde sitotoksiste ve genotoksiste gösterdiğini ve ROT'un yine Comet metodu ile DNA hasarına neden olduğunu, Kaspaz3 seviyesini arttırarak apoptoz indüklediği belirlenmiştir (126).

Swarnkar ve ark. Ratglioma hücresinden türetilen hücre hattı C6 hücrelerini, 0.1, 1 ve 10 Mm ROT ile 24 saat muamele etmişler ve ROT'un hücre canlılığını azaltarak, ROS indüklemesiyle DNA hasarına neden olduğunu, apoptozun da görüldüğünü tespit edilmişlerdir (128) .

İnsan kan lenfositleri 1.0, 1.5 ve 2.0 µg / mL ROT ile 1-6 saat muamele edildi Comet metodu ile ROT'un kan lenfositlerinde DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Endoruplikasyon ve poliploidi indüklediği, tek ve çift zincirli DNA kopmalarını neden olduğu tespit edilmiştir. DNA hasarı izole lenfositlerden tam kan hücrelerine göre daha yüksekti. ROT kandaki tüm miyeloid hücrelerle etkileştiği için genel aktivitesini azaltmıştır (117).

MN9D dopaminerjik nöronal hücreleri 0.5 ve 1 µM ROT ile 30 saat muamele edildi. Daha sonra DNA çift iplikteki kırılmalar bir H2AX ile değerlendirildi ve serin 139 fosfora ederek DNA'daki çift kırılmalar gösterildi. DNA 'da çift kırılmaların ROT dozuna bağlı olarak artış gösterdiği tespit edildi. DNA hasarı comet metodu ile değerlendirildi. ROT 8-OHdG üretimini mitokondride önemli ölçüde arttırdığı tespit edildi (130).8-OHdG seviyeleri PH SN'lerinde (139) ve PH postmortem örneklerinde önemli ölçüde artmış olduğu gözlemlendi (140).

Astroglial hücrelere benzer fare nöroblastom(Nöro-2a) hücrelerinde 0.1, 1 ve 10 µM ROT 4 saat boyunca muamele edildi. ROS'un arttırarak Kaspaz-3 ve CaMKIIa artırılmasıyla hücre içi Ca²⁺'nin artmasına neden olduğu görüldü. Ayrıca

DNA kırılmasına ve kromozom yoğunlaşmasının bozulmasına sebep olarak nöronal hücre ölümü meydana getirdiği belirlenmiştir (141).

Etken madde olarak Flu içeren LunaExperience SC-400, ile yapılan bir çalışmada Rat kemik iliği, kan ve karaciğer hücreleri mikronükleus ve comet testleri ile genotoksik açıdan değerlendirilmiştir. Buna göre mikronükleus sayısında artış, toplam eritrosit oranında azalış ve genotoksik etkide artış tespit edilmiştir (85,86).

Çalışmamızda ROT dozuna bağlı olarak kan ve beyin dokusunda DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir. Flu dozuna bağlı olarak kan dokusunda DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir.

Beyin doku sonuçlarına göre Flu uygulanan gruplarda DNA hasarı gözlemlenmemiştir. Bu konuda benzer bir çalışmaya rastlanmadı fakat beyindeki bariyer dokusunun beynin toksik maddelerden korunmasına katkı sağladığı ve daha az DNA hasarı görülmesinin nedenini oluşturduğu düşünülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda PH oluşumuna neden olduğu öne sürülen birçok gen belirlenmiştir. SNCA (14), TH (15), LRRK2 (16), Parkin (17), DJ-1 (18) gibi birçok gende mutasyonlar bulunmuş ve PH ile ilişkilendirilmişlerdir. SNCA ve TH geni ile yapılan bir çalışmada, erkek Wistar Ratlara 1.5 mg / kg /48 saat 11 doz ROT uygulandığında PH'nın temel özelliklerinin gelişmesine yol açtığını ve SNCA mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin arttığı, TH mRNA ekspresyon seviyelerinin ise azaldığı bildirilmiştir (142).

İnsan nöroblastomu SH-SY5Y hücrelerine 100 ve 200 nM ROT 24 saat boyunca muamele edildi. C / EBPβ, α-Syn için yaşa bağlı bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördü. ROT'un C / EBPβ'yı indüklemesiyle SNCA mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlemlendi. ROT, C / EBPβ'nın ekspresyonu artırarak PH'yi hızlandırdı tespit edilmiştir (143,145).

MN9D dopaminerjik hücreleri 1μmol/L ROT ile muamele edildi. ROT'un SNCA mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini artırdığı belirtildi. miR-133b, ise SNCA ekspresyonunu inhibe ederek ROT'un neden olduğu nöron hasarını azalttı (157). miR-133b miktarı PH'da orta beyin dokusunda (169) ve serumda azaldığı tespit edilmiştir(170).

ATP'ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanalı hem plazma hem de mitokondriyal zarlarda bulunur. ROS artırmasıyla K_{ATP} kanalının açılmasına TH ekspresyon

seviyelerinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Feokromositoma (PC12) hücreleri 0.2-1 µg / mL ROT 15 dakika ile muamele edildiğinde ROS üretimi önemli ölçüde artmasıyla K_{ATP} kanalının açılmasına neden olduğu tespit edilmiştir. 2-64 ng / mL ROT 24 saat muamele edildikten sonra PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak TH ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (171).

Yukarıda belirtilen literatür bilgileri çalışmamızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda, ROT SNCA mRNA ekspresyon seviyelerini artırırken, TH mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlemlendi. Flu ROT sonuçlara karşılaştırıldığında, TH mRNA ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak azalmış olduğu tespit edildi. SNCA mRNA ekspresyon seviyeleri ise Flu dozuna bağlı olarak arttığı fakat anlamlı değildir. Uygulanan dozlardan daha fazla doz verilmiş olsaydı SNCA ekspresyonu anlamlı olarak tespit edilebilirdi.

ROT uygulandığında SNCA mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı olarak artırırken, TH mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Flu ROT sonuçlara karşılaştırıldığında SNCA mRNA ekspresyon seviyeleri artmıştır fakat anlamlı değil TH ve DJ-1 mRNA ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak azalmış olduğu tespit edilmiştir.

Dopaminerjik nöronlarda, LRRK2, DJ-1 ve Parkin içeren PH proteinleri, normal mitokondriyal işlevini sürdürerek, oksidatif strese karşı korumada ve hücre ölümünü önlemede önemli roller oynadığı gösterilmiştir (172).

LRRK2 PH'larda en yaygın görülen mutasyondur. PH'da LRRK2'nin ekspresyon seviyelerinin artırılması ile dopaminerjik nöron kaybı ve α-Syn birikmesi artmaktadır. α-Syn, şaperon aracılı otofajiye (CMA) bağlanarak otofaji yoluyla parçalanır. LRRK2 aktivitesinin artırılmasıyla CMA yapısı bozulur ve α-Syn bağlanmasını engelleyerek α-Syn birikmesine yol açar (173). Sinir benzeri hücrelerde ROT tarafından indüklenen oksidatif stress ve DNA hasarı LRRK2 aktivitesinin inhibisyonu ile hafifletildiği tespit edilmiştir (174).

DJ-1 ise erken başlangıçlı PH vakalarının yalnızca % 1-2'sinde görülmektedir (175). DJ-1, oksidatif strese karşı mitokondri korumasında yer alır (176). Bu nedenle DJ-1 ekspresyonundaki bir azalma, dopaminerjik nöronları ROT kaynaklı oksidatif strese karşı daha savunmasız bir hale getirebilir (177).

Parkin, erken başlangıçlı PH'ya neden olduğu bilinen tek gendir. Parkin geni E3 ubiquitin ligaz üretir, α -Syn yıkılmasını düzenleyerek birikmesini önler (54, 56) Berger ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda, Mikroglial BV2 hücreleri 20 Mm ROT 12 saat muamele edildikten sonra Parkin mRNA ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (178).

Wang ve ark. Tarafından yapılan çalışmalarda ROT 2 mg / L/ 4 hafta boyunca 5-7 aylık erkek zebra balığına suda damlatılmıştır. ROT bozulmuş motor fonksiyonu, anksiyete ve depresyon benzeri davranışsal bozukluklara neden olmuştur. Beyindeki LRRK2 ve Parkin mRNA ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde artırırken, DJ-1 mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (179).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları özetleyecek olursak;

- 1- Bütün gruplarda hayvan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir
- 2- ROT grubunda Motor Fonksiyonunun anlamlı olarak azaldığı gözlemlenirken, Flu grubunda doza bağlı olarak Motor Fonksiyonunun azaldığı belirlendi ancak yüksek dozda uygulanan Flu'nun Motor Fonksiyonlarını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.
- 3- ROT ve Flu dozuna bağlı olarak beyin dokuları incelendiğinde önemli yapısal değişiklikler görüldü. Bu değişiklikler daha çok beyin dokusunun SN kısmında; LB'leri, nöron dejenerasyonu, nöron sayısında azalma, hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonu, nöropil vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nükleus şeklinde gözlemlendi.
- 4- α -Syn ile işaretlemede ROT ve Flu dozuna bağlı olarak beyin dokuları incelendiğinde daha fazla miktarda pozitif işaretleme gözlenirken TH ile işaretlemede ise ROT ve Flu dozuna bağlı olarak beyin dokuları incelendiğinde daha az miktarda pozitif işaretleme gözlemlenmiştir.
- 5- ROT dozuna bağlı olarak kan ve beyin dokusunda DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir.
- 6- Flu dozuna bağlı olarak kan dokusunda DNA hasarının arttığı tespit edilmiştir. Beyin doku sonuçlarına göre Flu uygulanan gruplarda DNA hasarı gözlemlenmemiştir
- 7- ROT, SNCA mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı olarak artırırken, TH ve DJ-1 mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi. Flu ve ROT'un ise SNCA mRNA ekspresyon seviyelerini artırdığı fakat anlamlı olmadığı tespit edildi. TH ve DJ-1 mRNA ekspresyon seviyelerinin ise anlamlı olarak azalmış olduğu tespit edildi
- 8- ROT grubunda LRRK2 ve Parkin mRNA ekspresyon seviyesi arttı ancak anlamlı bulunmadı. Flu grubunda LRRK2 ve Parkin mRNA ekspresyon seviyesi ROT grubundan farklılık göstermedi.
- 9- LRRK2 ve Parkin mRNA ekspresyon seviyesi en yüksek Flu dozuna bağlı olarak azaldı
- 10- Çalışmalarımızın sonucunda ve ROT karşılaştırılmalarında farelerde Flu dozuna bağlı olarak PH fenotipinin indüklendiği görüldü.

Pestisitler ciddi bir halk sağlığı ve evre sorunu olduğu için pestisit seçiminde daha duyarlı olunmalı, mevcut pestisitlerin kullanımı konusunda da doğru dozda ve gerekli önlemler alınarak uygulanmalıdır. Tarım dernekleri çiftçilere pestisitlerle ilgili bilgilendirme için kurslar düzenlemelidir. Flu ile özelikle yüksek dozlarda ve farklı yöntemler ile daha fazla araştırılma yapılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Vural N. Toksikoloji. Ankara, A.Ü. Basımevi.1984.
2. MacMahon B. Pesticide residues and breast cancer. J Natl Cancer Inst.1994; 86(572-573).
3. Toros S, Maden S. Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları. Ankara: A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları.1985.
4. Delen N, Durmusoglu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C, Burçak A. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalısı Sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6.Teknik Kongresi. 2005.
5. Demircan V, Yılmaz H. Isparta ili elma üretiminde tarımsal ilaç kullanımının çevresel duyarlılık ve ekonomik açıdan analizi, Ekoloji. 2005;14(57):15- 25.
6. Güler Ç, Çobanoğlu Z. Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. 1. Basım. No: 52 Ankara. ISBN 975 - 8088 - 69 - 6. 1997.
7. Ferris CF, Marella M, Smerkers B, Barchet TM, Gershman B, Matsuno-Yagi A, et al. A phenotypic model recapitulating the neuropathology of Parkinson's disease. Brain and behavior.2013;3(4):351-66.
8. Wood-Kaczmar A, Gandhi S. Wood N.W Understanding the molecular causes of Parkinson’s disease. TRENDS in Molecular Medicine. 2006;12:11.
9. Rodriguez M, Rodriguez-Sabate C, Morales I, Sabate M. Parkinson’s disease as a result of aging. Aging Cell. 2015;14 (3): 293-308.
10. Li Jie-Qiong, Tan Lan, Yu Jin-Tai. The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. Li et al. Molecular Neurodegeneration. 2014; 9:47.
11. Ozansoy M, Nazlı Başak A. Parkinson Hastalığının Genetigi ve Nörodejenerasyonun Moleküler Biyolojisi Parkinson Hast. Hareket Boz. Der.2004;7(2): 109-120.
12. Calne D. A definition of Parkinson’s disease. Parkinsonism and Related Disorders .2005: 39–40.
13. Sun Congcong, WangYun, MoMingshu, Song Chengyuan, Wang Xingbang, Chen Si, Liu Yiming. Minocycline Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity Correlating with Upregulation of Nurr1 in a

Parkinson's Disease Rat Model. *BioMed Research International*. 2019;7: 6843265.

14. D. Hoffman-Zacharska, D Kozirowski, OA Ross, M Milewski, J Poznański, M Jurek, ZK Wszolek, A Soto-Ortolaza, J Sławek, P Janik, Z Jamrozik, A Potulska-Chromik, B Jasińska-Myga, G Opala, AKrygowska-Wajs, K Czyżewski, DW Dickson, J Bal, A Friedman. Novel A18T and pA29S substitutions in α -synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disorders*. 2013; 19(11):1057-1060.
15. Swarnkar S, Singh S, Mathur R, Patro IK, Nath C. A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. *Toxicology*. 2010; 272 (1–3):17–22.
16. Bardien S, Lesage S, Brice A, Carr J. Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011; 17:501–508.
17. Emmrich JV, Hornik TC, Neher JJ, Brown GC. Rotenone induces neuronal death by microglial phagocytosis of neurons. *FEBS J*. 2013;280: 5030–5038.
18. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Don-gen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003; 299: 256-259.
19. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO Journal*. 2012; 31(14): 3038-3062.
20. Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ. Studies on the neurotoxicity of MPTP; inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, MPP+. *J Neurochem*. 1986;46:1501-1507.
21. Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson HS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM.

- High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.*2006; 38 (5): 515-517.
22. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience.*2000;3(12):1301-6.
 23. Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA, Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Exp Neurol.* 2010; 223(2): 657-61.
 24. Sava V, Velasquez A, Song S, Sanchez-Ramos J. Dieldrin Elicits a Widespread DNA Repair and Anti-Oxidative Response in Mouse Brain Submitted to *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 2007.
 25. Moon HE, Paek SH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology.*2015;24(2):103-116.
 26. David Lunn. Fluopyram. JMPR, New Zealand Food Safety Authority, Wellington, New Zealand. 2011.
 27. Dellarco VL, McGregor D, Berry SC, Cohen SM, Boobis AR. Thiazopyr and thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance Framework for analysis of a cancer mode of action. *Crit. Rev. Toxicol.* 2006;36:793–801.
 28. Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF. Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundam. Appl. Toxicol.*1989;12: 629–697.
 29. Sanchez-Ramos Juan. Brain's DNA Repair Response to Neurotoxicants. University of South Florida Tampa, Florida.2007.
 30. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells" *Exp. Cell Res.* 1988: 175;184-191.
 31. Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55:259-272.
 32. Öztürk Oya. idyoatik Parkinson hastalığında depresyon ankiyete ve kognitif durum. (Uzmanlık Tezi) İstanbul-2006.

33. Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*.2003;991:1–14.
34. Mackenzie Ian RA. The pathology of Parkinson's disease.*BCM J*.2001;43(3):142-147.
35. Emre M, Hanağası H, Şahin H, Yazıcı J, Hareket bozuklukları, In: Emre Ö, Baykan B, editors. *Nöroloji. İkinci baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri*. 2011; 513-38.
36. Apaydın H. Alfa-Sinüklein hastalıkları. *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları dergisi*.1999;2(1):23-30.
37. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*.2003; 39(6): 889-909.
38. Smith Y, Bevan MD, Shink E, et al. Microcircuitry of the direct and indirekt pathwas of the basal ganglia, *Neuroscience*. 1998;86:353-387.
39. Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(3):183-91.
40. Victor M, Ropper A. *Adams and Victor's principles of neurology*. New York: McGraw-Hill. 2001.
41. Zaitone SA, Ahmed E, Elsherbiny NM, Mehanna ET, El-Kherbetawy MK, E Sayed M H, ... & Moustafa YM. Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. *Pharmacological Reports* 71. 2019:32–41.
42. Herrero M-T, Barcia C, Navarro J. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst*. 2002;18:386-404.
43. Bolam J, Hanley J, Booth P, Bevan M. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*. 2000;196: 527-42.
44. Koeppen Bruce M, Stanton Bruce A. *berne and levy physiology*. 6th edition. 2008.
45. Delwaide PJ, Gonce M. Pathophysiology Parkinson's Signs. In: *Parkinson's disease and Movement Disorders* edt by Jankovic J, Tolosa E. Williams and Wilkins, Maryland.1998;159-175.

46. Wooten GF. Neurochemistry and neuropharmacology of Parkinson's disease. In: Watts RL, Koller WC. Eds. Movement Disorders Neurologic principles and practice. McGraw-Hill Companies. New York. 1997;11:1153.
47. Waters CH. Parkinson Hastalığının Tanı ve Tedavisi. Çev: Büyükkal B, Turgut Yayıncılık ve Tic. A.Ş. İstanbul. 2000.
48. Alam M, and Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats, Behav. Brain Res. 136 (1) .2002: 317–324, [https:// doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00180-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00180-8).
49. banez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Agid Y., ... & French. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. Lancet. 2004;364 (9440):1169–1171.
50. Ibanez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Deste A, Bonnet AM, Brefel-Courbon C, Heath S, Zelenika D, Agid Y, Dürr A, Brice A. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. Arch Neurol. 2009;66:102-108.
51. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho W H, Castillo P E, ... & Hynes M. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. Neuron. 2000;25(1):239–252.
52. Prof. Dr. Ayşe Başaran Parkinson Ve A-Sinüklein Tıbbi Biyoloji Kongresi.
53. Burré J, Sharma M, Sudhof TC. Systematic mutagenesis of asynuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. J. Neurosci. 2012; 32(43): 15227-15242.
54. Ryskalin Larisa, Busceti Carla L, Limanaqi Fiona, Biagioni Francesca, Gambardella Stefano, Fornai Francesco. A Focus on the Beneficial Effects of Alpha Synuclein and a Re-Appraisal of Synucleinopathies Current Protein and Peptide Science. 2018; 19: 598-611.
55. Rouquié D, Tinwell H, Blanck O, Schorsch F, Geter D, Wason S, R Bars. Thyroid tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of hepatic CAR/PXR nuclear receptors. Rue Jean-Marie Leclair. 2014;673–680.

56. Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 1998;21(6):249–254.
57. Stefanis L. Alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2 (2): a009399.
58. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, ... & Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90(23):11282–11286.
59. Venda Lara Lourenço, Wade-Martins Richard. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of parkinsons disease. *Neurosciences.* 2010;33(12):559-568.
60. Butler Brittan, Sambo Danielle, Khoshbouei Habibeh. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 2017;83–84 , 41–49.
61. Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988;51:745-752.
62. Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P., ... & Revesz T. Alpha-synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol.* 2013;125(5):753–769.
63. Refaiy A, Muhammad E, ElGanainy EO. Semiquantitative smoothelin expression in detection of muscle invasion in transurethral resection and cystectomy specimens in cases of urinary bladder carcinoma. *African J Urol,* 2011: 17(1);6-10.
64. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, ... & Llorens, V. The new mutation: e46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 2004;55(2):164–173.

65. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, ... & Aasly JO. Alpha-synuclein p.H50Q: a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2013;28(6): 811–813.
66. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* 1998;4 (11): 1318–1320.
67. KR Kumar, A Djarmati-Westenberger, A Grünewald. Genetics of Parkinson's Disease, *Seminars in Neurology.* 2011;31(5):433-440.
68. H Deng H, LYuan. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease, *Ageing Research Reviews.* 2014;15:161-176.
69. Hara S, Arawaka S, Sato H, Machiya Y, Cui C, Sasaki A, ... & Kato T. Serine 129 phosphorylation of membrane-associated alphasynuclein modulates dopamine transporter function in a G protein-coupled receptor kinase-dependent manner. *Mol. Biol. Cell.* 2013;24 (11):1649-60,1-3.
70. Lu Y, Prudent M, Fauvet B, Lashuel H A, & Girault H H. Phosphorylation of alpha-Synuclein at Y125 and S129 alters its metal binding properties: implications for understanding the role of alpha-Synuclein in the pathogenesis of Parkinson's Disease and related disorders. *ACS Chem. Neurosci.* 2011;2(11):667–675.
71. GRCh38: Ensembl release 89: ENSG00000180176 - Ensembl, May 2017.
72. Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nature Med.* 2004;10: 58-62.
73. Brannock C, Cadet JL. Invited review Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry.* 1998;32(2):117-131.
74. Keifer MC, Firestone J. Neurotoxicity of pesticides. *J Agromed.* 2007; 12:17-25.
75. Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, Wang X. Dysregulation of Ubiquitin- Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2016.
76. Ostling O, and Johanson KJ. "Microelectrophoretic Study Of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells"

Biochemical And Biophysical Research Communications, 1984;123; 291–298.

77. H Sato, T Kato, S Arawaka. The role of Ser129 phosphorylation of α -synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models, Rev. Neurosci. 24 .2013: 115–123.
78. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan P,Husu D,Clement MV.Open Comet:An automated tool for comet assay image analysis.Redox biology.2014;2:457-465.
79. Toğay VA.iyonize radyasyona maruz kalan radyoloji çalışanlarında oluşan DNA hasarlarının Alkali comet metodu ile belirlenmesi (yüksek lisans tezi),2015.süleyman Demiral üniversitesi. Isparta.
80. Roy Jyoti and Mallick Bibekanand. Small RNA proteome as disease biomarker: An incognito treasure of clinical utility.AGO-Driven Non-Coding RNAs.2019:101-136.
81. Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Deana OM, Giorlando F. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation oxidative stress and neurotrophic factors. Neurosci Biobehav Rev.2011;3:804-817.
82. Obeso JA, Olanow C warren, Nutt John G. basal ganglia parkinson'disease and levodopa therapy. Neurosciences. 2000; 23:10.
83. Almeida MF, Silva CM, Chaves RS, Lima NC, Almeida RS, Melo KP, ... & Cardoso SM. Effects of mild running on substantia nigra during early neurodegeneration. Journal of sports sciences.2018: 36(12); 1363–1370. <https://doi.org/10.1080/02640414.2017.1378494>.
84. Trinh J, Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease. Nat Rev Neurol. 2013; 9: 445-454.Aktaş C, Çelik A, Yalın S, Güler G. The Genotoxicity and cytotoxicity of fungicide Luna Experience EC 400 (Fluopyram ve Tebuconazole) combination single gell cell electrophoresis comet assay and micronucleus assay in rat bone marrow. The turkish journal of occupational/ environmental medicine and safety.2017;2(1), 2149-4711.

85. Alzahrani S, Ezzat W, Elshaer RE, Abd El-Lateef AS, Mohammad HMF, Elkazaz A Y, ... & ZAITONE11 S. A Standardized Tribulus Terrestris Extract Protects against Rotenone induced Oxidative damage and nigral dopamine neuronal loss in mice. *journal of physiology and pharmacology*. 2018; 69(6):979-994.
86. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. on the Evaluation of the New Active Fluopyram in the Product Luna Privilege Fungicide. 2015.
87. Zhang ZN, Zhang JS, Xiang J, Yu ZH, Zhang W, Cai M, ... & Cai D F. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Research*. 2017;1655:104–113.
88. Tarım ve Orman Bakanlığı Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığının. 2019.
89. George Sonia, Mok Su San, Nurjono Milawaty, Ayton Scott, Finkelstein David I, Masters Colin L, Li Qiao-Xin, Culvenor Janetta G. α -Synuclein transgenic mice reveal compensatory increases in Parkinson's disease-associated proteins DJ-1 and parkin and have enhanced α -synuclein and PINK1 levels after rotenone treatment. *MN*. 2010;42(2):243-54.
90. Apaydın Hülya, Özekmekci Sibel, Oğuz Semra, Zileli İsmail. Parkinson Hastalığı Hasta ve Yakınları için El Kitabı, 5. Baskı. ISBN - 978-605-88789-3-8. 2013.
91. Parkhe A, Parekh P, Nalla LV, Sharma N, Sharma M, Gadepalli A, ... & Khairnar A. Protective effect of alpha mangostin on rotenone induced toxicity in rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.134652>.
92. Ramkumar M, Rajasankar S, Gobi VV, Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, ... & Chidambaram R. Neuroprotective effect of Demethoxycurcumin, a natural derivative of Curcumin on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY 5Y Neuroblastoma cells *BMC Complementary and Alternative Medicine* .2017;17:217. DOI 10.1186/s12906-017-1720-5

93. Von Wrange C, Schwabe K, John N, Krauss JK & Alam, M. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings. *Behav Brain Res.* 2015; 279: 52–61 (2015).
94. Zhang Xue, Du Lida, Zhang Wen, Yang Yulin, Zhou Qimeng Du Guanhua. Therapeutic effects of baicalein on rotenone-induced Parkinson's disease through protecting mitochondrial function and biogenesis. *Scientific Reports.* 2017; 7: 9968 DOI:10.1038/s41598-017-07442-y.
95. T Nagatsu, Change of tyrosine hydroxylase in the parkinsonian brain and in the brain of MPTP-treated mice as revealed by homospecific activity, *Neurochem. Res.* 1990: 425–429.
96. Ma SY, Roytt M, Collan Y, Rinne JO. Unbiased morphometrical measurements show loss of pigmented nigral neurones with ageing. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 1999; 25: 394-399.
97. Gatto NM, Rhodes SL, Manthipragada AD, Bronstein J, Cockburn M, Farrer M, Ritz B. α -synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's Disease. *Neuroepidemiol.* 2010;35:191-195.
98. Cannon Jason R, Tapias Victor, Na Hye Mee, Honick Anthony S, Drolet Robert E, Timothy Greenamyre J. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 34. 2009: 279–290.
99. Ebadi M and Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(3):319–335
100. Organization WH. Neurological disorders: public health challenges: World Health Organization; 2006.
101. TC Sağlık Bakanlığı. Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması. Ankara. 2013: 223-3.
102. Ma J, Wang Y, Wang SJ, Yuan L, Li YN & Yu BL. Effect of electroacupuncture of "Fengfu" (GV16) and "Taichong" (LR3) on EIF2 α -ATF4-GRP78/Bip signaling in substantia nigra of rats with Parkinson's disease. *Acupuncture Research.* 2019: 44(12);873-877.

103. Zeng R, Zhou Q, Zhang W, Fu X, Wu Q, Lu Y, ... & Zhou S. Icaritin-mediated activation of autophagy confers protective effect on rotenone induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology Reports* 6. 2019: 637–644.
104. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends neurosc.* 1989;12: 366-375.
105. Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J, Ritz B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011;26:547–555.
106. Fleming SM, Ekhtator OR, Ghisays V. Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. *J. Vis. Exp.* 76. 2013.e50303, doi:10.3791/50303.
107. Chernausk S EC. Pheochromocytoma and multiple endocrine neoplasia syndrome. In: M. S, editor. *Pediatric Endocrinology* 4ed. USA: Saunders Elsevier: USA: Saunders Elsevier. 2009:512-29.
108. Vingill S, Connor-Robson N, Wade-Martins R. Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should. *Behavioural Brain Research.* 2018: 352;133-141.
109. Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology.* 1998;16(3): 285–309.
110. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells" *Exp. Cell Res.* 1988: 175;184-191.
111. Nguyen An, Phu Tran, Moore Darren J. Understanding the GTPase Activity of LRRK2: Regulation, Function, and Neurotoxicity. *Adv Neurobiol.* 2017;14:71–88.
112. Youdim MB, Riederer P. Understanding Parkinson's disease. *Sci Am.* 1997; 276(1):38-45.
113. Skibinski G, Nakamura K, Cookson MR, Finkbeiner S: Mutant LRRK2 toxicity in neurons depends on LRRK2 levels and synuclein but not kinase activity or inclusion bodies. *J Neurosci.* 2014;34:418–433.

114. Rideout HJ, Stefanis L. The Neurobiology of LRRK2 and its Role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2014;39:576–592.
115. Almeida MF, Silva CM, D'Unhao AM, & Ferrari MF. Aged Lewis rats exposed to low and moderate doses of rotenone are a good model for studying the process of protein aggregation and its effects upon central nervous system cell physiology. *Arq Neuropsiquiatr* 2016;74(9):737-744.
116. de Lima PDL, Yamada ES, da Costa ET, Pessoa CDO, Rabenhorst SH, Bahia MDO., ... & Burbano RR. Genotoxic effects of rotenone on cultured Lymphocytes. *Genetics and Molecular Research.* 2005;4 (4): 822-831.
117. Verma DK, Singh DK, Gupta S, Gupta P, Singh A, Biswas J, Singh, S. Minocycline diminishes the rotenone induced neurotoxicity and glial activation via suppression of apoptosis, nitrite levels and oxidative Stress. *NeuroToxicology* 65. 2018: 9–21.
118. KorteKaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, Hendrikse NH. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* 2005;57:176-179.
119. Mastroberardino PG, Hoffman EK, Horowitz MP, Betarbet R, Taylor G, Cheng D, Na HM, Gutekunst CA, Gearing M, Trojanowski JQ, Anderson M, Chu CT, Peng J, Greenamyre JT. A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009;34: 417-431.
120. Borie C, Gasparini F, Verpillat P, Bonnet AM, Agid Y, Hetet G, Brice A, Dürr A, Grandchamp B. Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J Neurol.* 2002; 249: 801-804.
121. Kocaturk Nur Mehpare, Gozuacik Devrim. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System *Front. Cell Dev. Biol.* 2018.
122. Nakamura T, Lipton SA. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis.* 2009;4(14): 455-468.
123. Van Duijn CM, Dekker MCJ, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ et al. PARK7, a novel locus for autosomal

- recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet.* 2001;69:629–634.
124. Nataraj J, Manivasagam T, Justin Thenmozhi A., & Essa MM. Neuroprotective effect of asiatic acid on rotenone-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress-mediated apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells. *Nutritional Neuroscience.* 2017; 20; 6.
 125. Edgar A Estrella-Parra 1, Juan C Gomez-Verjan, Ignacio González-Sánchez, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez, Edgar Vergara-Castañeda, Marco A Cerbón, Dagoberto Alavez-Solano, Ricardo Reyes-Chilpa. Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells. *Nat Prod Res* . 2014;28(20):1780-5. doi: 10.1080/14786419.2014.939081. Epub 2014 Jul 23.
 126. Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am J Epidemiol.* 2003;157:409-14.
 127. Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, & Nath C. Astrocyte Activation: A Key Step in Rotenone Induced Cytotoxicity and DNA Damage. *Neurochem Res.* 2012;37: 2178–2189.
 128. Villegas Christine. Registration of the New Active Ingredient Fluopyram as Contained in Four New Pesticide Products. Research Triangle Park, North Carolina 27709. The New York State Department of Environmental Conservation. 2017.
 129. Pilger A and Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxy guanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational environmental exposures, *Int Arch Occup Environ Health.* 80(1)(2006)1–15.
 130. Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Bioscience.* 2008;1:1240-9.
 131. Mitumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res.* 2001;35:885–893.
 132. Richarme G, Mihoub M, Dairou J, Bui LC, Leger T, Lamouri A. Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase

- that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine and lysine residues. *J. Biol. Chem.* 2015; 290:1885-1897.
133. Richarme G, Liu C, Mihoub M, Abdallah J, Leger T, Joly N, Liebart JC, Jurkunas UV, Nadal M, Boulloc P, Dairou J, Lamouri A. Guanine glycation repair by DJ-1/Park7 and its bacterial homologs. *Science*. 2017;357:208-211.
 134. Goldman Jill S, Fahn Stanley. Genetics of Parkinson disease and related diseases.in Rosenbergs molecular and genetic basis of neurological and psychiatric diseases (fifth edition).2015.
 135. Junn E, Jang WH, Zhao X, Jeong BS, Mouradian MMZ .Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J. Neurosci. Res.*2009; 87:123-129.
 136. Malgeri G, Eliezer D. Structural effects of Parkinson's Disease linked DJ-1 mutations.*Protein Sci.* 2008;17:855-868.
 137. Zucchelli S, Codrich M, Marcuzzi F, Pinto M, Vilotti S, Biagioli M, Ferrer I, Gustincich S. TRAF6 promotes a typical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha- synuclein an dislocalized to Lewy bodies in sporadic Parkinson'sdisease brains. *Hum Mol Genet.*2010;19:3759-3770.
 138. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ,Graham DG, Montine TJ.Parkinson's Disease Is Associated with Oxidative Damage to Cy- Toplasmic DNA and RNA in Substantia Nigra Neurons,*TheAmericanJournalof Pathology*. 1999;154(5):1423–1429.
 139. Alam ZI, jenner A, Daniel SE, et al. Oxidative DNA damage in the Parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.*1997;69: 1196-1203.
 140. Swarnkar Supriya, Goswami Poonam, Kamat Pradeep Kumar, Gupta Sonam, Patro Ishan K, Singh Sarika, Nath Chandishwar. Rotenone-induced apoptosis and role of calcium: a study on Neuro-2a cells. *Arch Toxicol* .2012; 86:1387–1397.
 141. Kandil EA, Sayed RH, Ahmed LA, Abd El Fattah MA, & El-Sayeh BM. Hypoxia-inducible factor 1 alpha and nuclear-related receptor 1 as targets

- for neuroprotection by albendazole in a rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology*.2019. DOI: 10.1111/1440-1681.13162.
142. Sala Gessica, Arosio Alessandro, Stefanoni Giovanni, Melchionda Laura, Riva Chiara, Marinig Daniele, Brighina Laura, Ferrarese Carlo. Rotenone Upregulates Alpha-Synuclein and Myocyte Enhancer Factor 2D Independently from Lysosomal Degradation Inhibition. *BioMed Research International*. 2013: ID 846725;10.
 143. Board PG, Coggan M, Baker RT, Vuust J, Webb GC. Localization of the human UBC poly- ubiquitin gene to chromosome band 12q24.3. *Genomics*. 1992;12:639-642.
 144. Wu Zhouhui, Xia Yiyuan, Wang Zhihao, Su Kang Seong, Lei Kecheng, Liu Xia, Jin Lingjing, Wang Xiaochuan, Cheng Liming, Ye Keqiang. C/EBP β / δ -secretase signaling mediates Parkinson's disease pathogenesis via regulating transcription and proteolytic cleavage of α -synuclein and MAOB. *Molecular Psychiatry*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0687-7>.
 145. Hipkiss AR. Aging risk factors and Parkinson's disease: Contrasting roles of common dietary constituents. *Neurobiol Aging*. 2014;35(6):1469-1472.
 146. Glaab E, Schneider R. Comparative pathway and network analysis of brain transcriptome changes during adult aging and in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*.2014;74(2015):1-13.
 147. Tinwell H, Rouquié D, Schorsch F, Geter D, Wason S, Bars R. Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. *Rue Jean-Marie Leclair*. 2014;70:648–658.
 148. Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev*. 2014;14:19-30.
 149. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson disease. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:1-22.
 150. Dick FD. Parkinson's disease and pesticide exposures. *Brit Med Bull*. 2006;79-80,2-13.

151. Schantz SL, Moshtaghian J, Ness DK. Spatial learning deficits in adult rats exposed to ortho-substituted PCB congeners during gestation and lactation. *Fund Appl Toxicol.*1995;26:117–26.
152. Aydın M, Canpolat S, Seyran AD, Bulmuş Ö, Yılmaz B. Poliklorlu bifenillerin sıçan korteks, hipokampus, striatum ve hipotalamus dokusunda katekolaminerjik nörotransmitter düzeylerine etkileri *Fırat Tıp Derg.* 2007;12:88-92.
153. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Env Med.* 2007;64:666-72.
154. Varcin M, Bentea E, Michotte Y, Sarre S. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxid Med Cel Longev*, doi: 10.1/2012/624925., Jul 8, 2012.
155. MSVerónica, Maria Vieira, Ozonoff David M. Pesticides and Parkinson's Disease.2002.
156. Zhang LM, Wang MH, Yang HC, Tian T, Sun G, F Ji, YF., ... & Lu H. Dopaminergic neuron injury in Parkinson's disease is mitigated by interfering lncRNA SNHG14 expression to regulate the miR-133b/ α -synuclein pathway. *AGING.* 2019;11: 21.
157. Sherer TB, Richardson JR, Testa CM, Seo BB, Panov AV, Yagi T, et al. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem.*2007;100(6):1469–1479.
158. Gupta Ramesh C, Mukherjee Ida R. Miller, Malik Jitendra K, Doss Robin B, Dettbarn Wolf-D, Milatovic Dejan . in *Biomarkers in Toxicology (Second Edition)*. 2019; 455-475.
159. Wang B, Abraham N, Gao G, Yang Q. Dysregulation of autophagy and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.*2016;5(1):19.
160. Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, Pogson J H, Randle SJ, Wray S, Lewis PA, Houlden H. The

Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci.* 2013;16(9):1257-1265.

161. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):461-491.
162. Haytural H, Tüzün E. Parkinson hastalığı'nın hayvan modelinde PI3K/Akt yolağı ile mitokondriyal, oksidatif ve apoptotik parametrelerin ilişkisi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 2013;3(7):28-37.
163. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology.* 1993;43:1173-1180.
164. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press. Oxford, UK; 4th ed. 2007:440-613.
165. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and The Formation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;12:639-645.
166. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiriga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* doi: 10.3389/fnana.2015.00091, Jul 8, 2015.
167. Qian L, Flood PM. Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunol Res.* 2008;41:155-164.
168. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science.* 2007; 317:1220-24. <https://doi.org/10.1126/science.1140481> PMID:17761882
169. Zhao N, Jin L, Fei G, Zheng Z, Zhong C. Serum microRNA-133b is associated with low ceruloplasmin levels in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014; 20:1177-80. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.08.016> PMID:25218846.
170. Bai Q, He J, Qiu J, Wang Y, Wang S, Xiu Y, & Yu C. Rotenone induces KATP channel opening in PC12 cells in association with the expression of tyrosine hydroxylase. *Oncology reports.* 2012; 28:1376-1384.

171. Fernandez-Moriano C, Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. Mitochondria-targeted protective compounds in parkinson's and Alzheimer's diseases. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2015; 1.
172. Ho Philip Wing-Lok, Chi-Ting Leung, Huifang Liu, Shirley Yin-Yu Pang, Colin Siu-Chi Lam, Jiawen Xian, Lingfei Li, Michelle Hiu-Wai Kung, David Boyer Ramsden & Shu-Leong Ho. Age-dependent accumulation of oligomeric SNCA/ α -synuclein from impaired degradation in mutant LRRK2 knockin mouse model of Parkinson disease: role for therapeutic activation of chaperone-mediated autophagy (CMA), *Autophagy* .2020;16(2):347-370. DOI:10.1080/15548627.2019.1603545.
173. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. 2016. Neuroprotective effect of the LRRK2 kinase inhibitor PF- 06447475 in human nerve-like differentiated cells exposed to oxidative stress stimuli: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 41:2675–2692
174. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299(5604):256–9.
175. Hatano T, Kubo S, Sato S, Hattori N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2009; 111:1075–1093.
176. Volpicelli-Daley LA, Abdelmotilib H, Liu Z, Stoyka L, Daher JP, Milnerwood AJ, Unni VK, Hirst WD, Yue Z, Zhao HT, Fraser K, Kennedy RE, West AB. G2019S-LRRK2 expression augments alpha-synuclein sequestration into inclusions in neurons. *J. Neurosci*. 2016; 36: 7415–7427.
177. Berger AK et al. Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*.2009;18 (22): 4317–4328.
178. Wanga Yali, Liub Wenwen, Yang Jing, Wang Fen, Sima Yizhen, Zhong Zhao-min, Wang Han, Hub Li-Fang, Liu Chun-Feng. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *NeuroToxicology*. 58. 2017: 103–109.

EKLER

EK A.Etik Kurul Onayı





T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
28.02.2019	03	4

SDÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 28.02.2019 tarihinde saat-09:00'da toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;

4- Karar 25.02.2019 tarihli başvuru.

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr.Nurten ÖZÇELİK(SDÜ Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji AD) Yürütücülüğünde,
Yardımcı Araştırmacılar:Hanan Waleed Muhamad Alsammaraie, Arş.Gör. Dilek Aşçı ÇELİK, Arş.Gör. Gülçin Yavuz TÜREL, Öğr.Gör. İbrahim ONARAN, Doç.Dr. Pınar Aslan KOŞAR, Arş.Gör V. Atahan TOĞAY ve Arş.Gör.Meltem ÖZGÖÇMEN'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı **"Pestisit Fluopyram'in Parkinson Hastalığı ile Bağlantısının Araştırılması"** başlıklı çalışma oybirliği ile **UYGUNLUĞUNA** karar verilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Çağrı SAVAŞ Başkan	Doç. Dr. İbrahim Metin ÇİRİŞ Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Münire ÇAKIR ÜYE
Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE	Doç. Dr. Üyesi Ömer ÇELİK ÜYE	Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE
Doç. Dr. Kanat GULLE ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Müge ÇINA AKSOY ÜYE	Öğ. Gör. İbrahim ONARAN (HÜDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE
Vet. Hekim Ramazan ÇELİK SİVİL ÜYE	Orman Müh. Serkan GONENÇ SİVİL ÜYE	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hanan	Soyadı	Waleed Muhamad Al SAMMARRAIE
------------	-------	---------------	---------------------------------

Eğitim düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	SDÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.	2021
Yüksek lisans	Irak -Tikrit Üniversitesi- Fen Fak /Biyoloji Bölümü	2011
Lisans	Irak -Tikrit Üniversitesi - Eğitim Fak /Samarra Biyoloji Bölümü	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl)
Araştırma Görevlisi	Irak -Tikrit Üniversitesi Eğitim Fak /Samarra Biyoloji Bölümü	2005-2011
Yardımcı Doçent	Irak- Samarra Üniversitesi Uygulamalı Bilimler Fak/Patolojik Analizler Bölümü	2011-2021

Ana Dilleri	Arpça	
Yabancı Dilleri	Türkçe (B1)	İngilizce (very good)

Yüksek lisans tezinin adı

The Study of Genotoxicity of Metheprim Drug in male of White mice *Mus musculus*. Muhamad H W, Shehab AF, Sadeq SW. 2011.IRAQ.

YAYINLAR

- 1- Nijris, Osama Nadhom and Muhamad H W.Study the Inhibitory effect of some plant extracts on bacteria contaminated some hospital in Salah Al-din. Samarra. Tikrit Journal for Agricultural Sciences.2009;9(1).
- 2- Mohammed S H W,Shehab AF, Sadeq SW. Evaluation of the genotoxic effects of methoprim on whit mice. ALmamoon university college Journal.2012;E(19):26-38, ISSN:19924453.
- 3- Muhammad H W. The use of polymerase chain reaction in real time to diagnose the tuberculosis (TB) for patient from Erbil. Tikrit Journal of pure science. 2016;21(6): 16-22, ISSN:1813-1662(print).E. ISSN:2415-1726(on line).
- 4- Muhammad H W and Yusuf Muhammad. Evaluation The using Real Time PCR technique in Diagnosis Patients with Hepatitis B Virus male and female in Erbil Government. Tikrit Journal of pure science.2014.
- 5- AL-sammarraie H W M, Toğay VA, Özçelik N.Effects of Ochratoxin-A on biological processes.2nd international health sciences and life Congress 24-27 April 2019,Burdur/Turkey,801-809.
- 6- AL-sammarraie H W M, Selçuk E, Özçelik N.The role of glyal fibres acidic protein gene in Alexander's disease. 3rd international health sciences and life Congress 4-6 June 2020,Burdur/Turkey,238-247.

KONFERANSLAR

1-2nd Conferance Scientific United state Company For The drug Industrial And The medical Material/Samarra In Cooperation With Samarra college. 5 April 2008,Samarra/İraq.

2-12th Scientific conference ALmamoon university college, 20TH April 2011, Baghdad/İraq.

3-2nd international health sciences and life Congress 24-27 April 2019,Burdur/Turkey.

4-3rd international health sciences and life Congress 4-6 june 2020,Burdur/Turkey.

KURSLAR

- 1- Bilgisayar yeterlilik kullanılm kursu.27.07.2008- 10.08.2008. Bilgisayar ve Bilgi Merkezi Tikrit Üniversitesi, Irak.
- 2- Polymerase Chain Reaction (PCR) kursu.16-18 Nisan 2012.Merkezi laboratuvar. Tikrit Üniversitesi, Irak.
- 3- Bilimsel Promosyonlar için Bilgisayar kursu.17.06.2012 -08.07.2012 Samarra Üniversitesi, Irak.(Birincilik).
- 4- Öğretim Yöntemlerinin kursu. 11.11.2012-05.12.2012.Samarra Üniversitesi, Irak.(Üçüncülük).
- 5- Deney Hayvanları kullanım Sertifikası. 18-25 Şubat 2019.Süleyman Demiral Üniversitesi HADYEK, Isparta.
- 6- Uygulamalı Mikroskopi Çalıştayı katılım belgesi. 13-15 Mart 2019.Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Eczacılık Fakültesi. Süleyman Demiral Üniversitesi, Isparta.

ÖDÜLLER

Tikrit üniversitesin'nde 2004-2005 öğretim yılında elde etmiş olduğum üçüncülük derecesi neticesinde, Irak Cumhurbaşkanı, Başbakanı ve Yükseköğretim ve bilimsel Araştırma Bakanı tarafından ödül verilmiştir.