

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**NARİNGENİN VE VAZOİNTESİNAL PEPTİD
KOMBİNASYONUNUN PARKİNSON MODELİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Ayşe Nur YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20015 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, engin tecrübeleri ile yol göstericim olan, tez çalışmamı birlikte planlayıp yürütebilme imkanını bulduğum saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ'ye teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Eğitim sürecimde kendilerinden edindiğim bilgi birikimi ve aldığım dersler ile tez hazırlık dönemime çok kıymetli katkıları olan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Rauf Onur EK'e ve birçok soruma cevap bulduğum güleryüzlü ve samimi yaklaşımı ile çalışmalarımnda destekleyen Prof. Dr. Gökhan CESUR'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez araştırmalarına başlarken kendisiyle yaptığımız toplantılar sayesinde daha iyi bir çalışma ortaya çıkardığıma inandığım, azmiyle ve kararlı duruşuyla özellikle akademik bilgisiyle kendime örnek aldığım Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e, çalışmamın deney aşamasında yanımda olan ve değerli bilgilerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Erkan GÜMÜŞ'e, yüksek lisans eğitim hayatımın başından sonuna kadar yol gösterici yaklaşımı, nezaketli tavırları ile beni hep ayakta tutan ve başarıyı yakalamamda önderlik eden Araş. Gör. Dr. Ferhat ŞİRİNYILDIZ'a, deney çalışmamda katkısı bulunan Vet. Dr. Serdar AKTAŞ'a, kendisinden referans aldığım bilgilerle tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Dr. Öğr. Üyesi Eda Duygu İPEK'e ve yanımda olduğu zamanlarda birlikte bir ekip olarak ilerlediğimiz ve hiçbir zaman manevi desteğini esirgemeyen yüksek lisans eğitimimizi birlikte tamamladığımız kıymetli dostum Ayşe Seda ERARSLAN'a ve çalışmalarına başlarken ve ilerlerken yardımı dokunan arkadaşım Derya İŞLER'e, teknik işlerde yardımını esirgemeyen BAP sorumlusu Ferda IRIZ'a ve deney çalışmalarımnda destek aldığım Rıfat AYDIN'a içten teşekkürlerimi sunarım. .Elbetteki en büyük teşekkürü ve saygıyı hayatım boyunca beni umutlandıran verdiğim kararlarda ısılt ısılt gözlerle beni destekleyen, bugüne kadar bütün başarılarımın mimarı olan, sonsuz maddi manevi desteğini üzerimde hep hissettiğim sevgili annem ve babam Sezer-Sabahattin KILIÇ'a, yol göstericim ve tüm heyecanlarıma ortak olan canım abim Dr.Recep Kamil KILIÇ'a,manevi destekçim YILDIRIM ailesine teşekkür ederim.

Son olarak; ders çalışırken, sınava hazırlanırken, deney yaparken ve sabahlara kadar tez yazarken size saygı duyan ve sabırla sizi bekleyen birinin olması paha biçilemez. Fedakarlık gerektiren bu süreci tamamlarken hissettirdikleri için değerli eşim Uğur YILDIRIM'a, biricik kızım Zeynep Berra ve tatlı oğlum Ahmet Fatih'e varlıklarından dolayı minnettarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Parkinson Tanımı.....	3
2.1.1. Parkinson Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Parkinson Etiyolojisi	4
2.1.3. Parkinson Nörodejenerasyonu.....	5
2.1.4. Parkinson ve Dopamin İlişkisi.....	6
2.1.5. Parkinson Motor Semptomları	7
2.1.5.1. Bradikinezi	8
2.1.5.2. Tremor	8
2.1.5.3. Rijidite	9
2.1.5.4. Postural Bozukluk	9
2.1.6. Parkinson Tedavi Yöntemleri.....	10
2.2. DeneySEL Parkinson Modelleri	10

2.2.1. 6-OHDA	11
2.2.2. MPTP.....	12
2.2.3. Paraquat ve Maneb	13
2.2.4. Rotenone.....	13
2.3. Rotenone ile İndüklenen Parkinson Modeli	14
2.3.1. Rotenone Etki Ettiği Mekanizmalar	15
2.3.1.1. Mitokondriyal Disfonksiyon	16
2.3.1.2. Oksidatif Stres Parametresi	17
2.3.1.3. α -Synuclein Proteini	18
2.3.1.4. GSK-3 β	22
2.4. Motor Aktivite Testleri.....	24
2.4.1. Hole and Board Testi.....	27
2.4.2. Merdiven Testi.....	27
2.4.3. Adımlama Testi	28
2.4.4. Açık Alan Testi.....	28
2.4.5. Silindir Testi	29
2.4. Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)	30
2.5. Naringenin (NGN).....	32
3.1. Gereç.....	33
3.1.1. Etik Kurul Kararı	33
3.1.2. Deney Hayvanları	33
3.1.3. Rotenone Hazırlanışı	34
3.1.4. Kullanılan Cihazlar.....	34
3.1.5. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Deney Tasarım.....	34

3.2.1.1. Deneysel Parkinson Modeli Oluşturma ve VIP ve Naringenin Uygulaması.....	34
3.2.2. Deney grupları	34
3.2.2.1.1. Kontrol Grubu	38
3.2.2.1.2. Rotenone Grubu.....	39
3.2.2.1.3. RT+VIP Grubu	39
3.2.2.1.4. RT+NG Grubu.....	39
3.2.3. Motor Testler	40
3.2.1.1. Hole and Board Testi.....	40
3.2.4. Analiz Yöntemleri	41
3.2.4.1. Ağırlık Ölçümü.....	41
3.2.4.2. Makroskobik görünüm inceleme	42
3.2.4.3.Biyokimyasal Analiz	42
3.2.4.3.1. Protein Analizi	42
3.2.4.3.2. MDA Analizi	44
3.2.4.3.3. SOD Analizi	45
3.2.4.3.4. GSH Analizi	47
3.2.4.3.5. Striatumdan ELISA yöntemi ile Dopamin Tayini	48
3.2.4.3.6. Rat Alpha-Synuclein ELISA Kit	49
3.2.4.3.7. Rat Glycogen synthase kinase-3 beta ELISA Kit.....	52
3.2.4.3.8. Rat ELISA Kit	53
3.2.4.4. Histopatolojik Analiz.....	53
2.4.1.1. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1. Ağırlık Ölçümleri	57
4.2. Makroskobik Bulgular	57
4.3. Biyokimyasal Bulgular	58

4.3.1. ELISA yöntemi ile striatumdan doku tayini.....	60
4.3.1.1. alfa-sync ELISA Kiti ile doku tayini bulgusu	60
4.3.1.2. GSK-3 beta ELISA kiti ile doku tayini bulgusu.....	61
4.3.1.3. 8-OHdG ELISA kiti ile doku tayini bulgusu.....	62
4.3.1.4. Dopamin ELISA kiti ile doku tayini bulgusu	63
4.3.2. Doku örneklerinde tayin yöntemleri bulguları	64
4.3.2.1. MDA tayini.....	64
4.3.2.2. SOD tayini	65
4.3.2.3. GSH tayini	66
4.3.2.4. Protein tayini	67
4.4. Motor Test Bulgular	67
4.4.1. Hole and Board Test Bulgular	67
4.4.1.1. Kafa Daldırma Hareketi Analiz.....	67
4.4.1.2. Delik Sayısı Analiz.....	67
4.4.1.3. Merkeze Ziyaret Analizi.....	67
4.4.1.4. Şahlanma Analiz.....	70
4.4.1.5. Süslenme Analiz	71
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR.....	80
EKLER	91
Ek 1 (ADÜ-HADYЕК)	91
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

6-OHDA	: 6-Hidroksidopamin
AT	: Area Tegmentalis
CAT	: Katalaz
CM	: Sentromedyan Nükleus
DS	: Delik Sayısı
GPe	: Globus pallidus external segment
GPI	: Globus pallidus internal segment
GPM	: Globus Pallidus Medialis
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSK-3β	: Glycogen synthase kinase-3
HB	: Hole and Board
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KD	: Kafa Daldırma Hareketi
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MZ	: Merkeze Ziyaret
NGN	: Naringenin
PD	: Parkinson Disease
PPN	: Pedinkülopontin Nükleus
RNS	: Reaktif Azot Türevleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
S	: Substantia

S	: Süslenme
SN	: Substantia Nigra
SNc	: Substantia Nigra Pars Compact
SNr	: Substantia Nigra Pars Retikula
SOD	: Superoksit Dismutaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikaleri
STN	: Subtalamik Nukleus
SYN	: α -synuclein
	: ahlanma
VA/VL	: Ventral enteriyor, ventral lateral nükleus
VIP	: Vazoaktif İntestinal Peptid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bazal gangliyonların normal işleyiş mekanizmaları ve PD değişimleri	6
Şekil 2. Beyindeki dopaminerjik yollar	7
Şekil 3. PD modeli oluşturmada kullanılan nörotoksinlerin işleyiş mekanizmaları	11
Şekil 4. MPTP metabolizmasının şematik gösterimi	12
Şekil 5. MPTP ve MPP+nin kimyasal yapısı	13
Şekil 6. Rotenone kimyasal yapısı	14
Şekil 7. Deneysel Parkinson modelinde nörotoksinlerin dopamin hücrelerine etkisi.....	16
Şekil 8. Naringenin kimyasal yapısı.....	32
Şekil 9. Rotenone ürün bilgisi	35
Şekil 10. ELISA analizinde standart solüsyonların dilüsyonu.	49
Şekil 11. Gruplar arası a-sync düzeylerinin karşılaştırılması.....	60
Şekil 12. Gruplar arası GSK-3 beta düzeylerinin karşılaştırılması	61
Şekil 13. Gruplar arası 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılması	62
Şekil 14. Gruplar arası dopamin düzeylerinin karşılaştırılması	63
Şekil 15. MDA grafiği.....	64
Şekil 16. SOD grafiği	65
Şekil 17. GSH grafiği	66
Şekil 18. Protein grafiği	67
Şekil 19. KDH istatistiksel grafiği	68
Şekil 20. DS istatistiksel grafiği.....	69
Şekil 21. MZ istatistiksel grafiği	70
Şekil 22. Ş istatistiksel grafiği.....	70
Şekil 23. S istatistiksel grafiği.....	71

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Hole and Board Tesi	27
Resim 2. Merdiven Testi.....	27
Resim 3. Adımlama Testi.....	28
Resim 4. Açık Alan Testi	29
Resim 5. Silindir Testi	29
Resim 6. Hole and board Test düzeneği.....	40
Resim 7. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi (alfa-sync)	50
Resim 8. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi (GSK-3 beta).....	52
Resim 9. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi (8-OHdG).....	54
Resim 10. Makroskobik Sakrifiye günü görüntüleri.....	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Davranış Testleri	25
Tablo 2. Protein Analiz için Çalışma Tablosu	44
Tablo 3. MDA Analiz için Çalışma Tablosu	45
Tablo 4. SOD Analiz için Çalışma Tablosu	47
Tablo 5. GSH Analiz için Çalışma Tablosu	48
Tablo 6. Parkinson modeli oluşturulan tüm grupların kontrol grubuyla kıyaslanarak hesaplanan ağırlık değişim yüzdeleri	57
Tablo 7. Biyokimyasal analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerler	59
Tablo 8. Alfa-sync analizi ELISA tayini grafiği	60
Tablo 9. GSK-3 beta analizi ELISA tayini grafiği	61
Tablo 10. 8-OHdG analizi ELISA tayini grafiği	62
Tablo 11. Dopamin analizi ELISA tayini grafiği	63
Tablo 12. MDA spektrofotometrik grafiği	64
Tablo 13. SOD spektrofotometrik grafiği	65
Tablo 14. GSH spektrofotometrik grafiği	66
Tablo 15. Protein spektrofotometrik grafiği	67

ÖZET

NARİNGENİN VE VAZOİNTESİNAL PEPTİD KOMBİNASYONUNUN PARKİNSON MODELİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yıldırım AN. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji (Tıp) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Bu çalışma, Rotenone ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Naringenin ve Vazointestinal Peptid Kombinasyonunun ve kullanılan bu etken maddelerin SNc'deki nörodejeneratif süreçteki rolünü araştırmak, parkinson motor aktivite testlerini uygulayarak sonuçlarını değerlendirmek amacı ile planlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız; ağırlıkları ortalama 300 gram olan, 12 haftalık, 48 adet Wistar albino erkek sıçanlardan oluşturulan Kontrol Grubu, Rotenone Grubu, 1.25 mL/kg i.p. olarak, Rotenone+VIP Grubu 25 ng/kg i.p. olarak , Rotenone+NG Grubu 10 mg/kg i.p. olarak verilerek gruplar içinde her gruba 12'şer rat koyularak toplamda 4 grup oluşturuldu. Değerlerin yorumlanması ve grup değerlerinin çoklu karşılaştırılması, Biyokimya da Dunnett's multiple comparisons testiyle; Lokomotor aktivitede ise Video Kaydı Sistemi ve istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde GraphPad Prism (versiyon 7.04, GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) kullanıldı.

Bulgular: Kontrol grubunda, ELISA kit tayini bulgularının değerlendirilmesi sonucu; RT grubuna göre anlamlı farklılık görüldü ($p<0.05$) (8-OHdG ve Dopamin ELISA kit analizi). RT+VIP ve RT+NG gruplarında anlamlı farklılık bulunamadı. Doku analizi yapılan Bradford Yöntemi ve Spektrofotometrik analiz sonucunda saptanan değerlerde MDA analizinde PD'li grupta anlamlı bir fark bulunurken, SOD, GSH ve Protein tayininde anlamlı bir fark elde edilmedi. RT+VIP grubu, RT+NG grubuna göre biyokimyasal analiz sonuçlarına göre beklenen sonuçlara ulaşamazken, lokomotor aktivite test sonucuna göre elde edilen bulgularda; KD hareketinin RT grubunda düşük olduğu, RT+VIP grubunda beklenen değerde bir yükselme görüldü, MZ, Ş, S, DS parametrelerinde de anlamlı bir fark elde edildi

Sonuç olarak; Deneysel Parkinson Modeli oluşturulan ratlarda Naringenin ve Vazointestinal Peptid kombinasyonu kullanımının özellikle motor aktivitelerde önemli iyileşmeler sağladığı

ve Alfa-sync geninin kodlamış olduğu alfa-sync protein katlanmasını indüklediği, GSK-3 betanın selektif inhibitörlerinin kullanımının arttığı ve parkinson hastalığında tedavi edici özellikte olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca çalışmamızın Parkinson Hastalığı'nın etyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve buradan yola çıkılarak, hastalığa karşı yeni tedavi stratejileri geliştirilebilmesi için aracılık edeceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Alfa-sync, GSK3-beta, Motor Aktivite Testi, Naringenin, Parkinson Hastalığı, Rotenone, Vazointestinal Peptid.



ABSTRACT

THE EFFECT OF NARINGENIN AND VASOINTESTINAL PEPTIDE COMBINATION ON THE PARKINSON MODEL

Yıldırım AN. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute of Physiology (Medical) Program, Master Thesis, Aydın, 2021.

Objective: This study was planned to investigate the role of Naringenin and Vasointestinal Peptide Combination and these active substances used in the neurodegenerative process in SNc in the Parkinson's Model Created with Rotenone, and to evaluate the results by applying parkinsonian motor activity tests.

Materials and Methods: Control Group consisting of 48 Wistar albino male rats, 12 weeks old, weighing an average of 300 grams, Rotenone Group, 1.25 mL/kg i.p. as Rotenone+VIP Group 25 ng/kg i.p. as Rotenone+NG Group 10 mg/kg i.p. A total of 4 groups were formed by placing 12 rats in each group. Interpretation of values and multiple comparison of group values, with Dunnett's multiple comparisons test in Biochemistry; Video Recording System was used for locomotor activity and GraphPad Prism (version 7.04, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) was used for statistical analysis.

Results: In the control group, as a result of the evaluation of the ELISA kit determination findings; There was a significant difference compared to the RT group ($p<0.05$) (8-OHdG and Dopamine ELISA scarce analysis). No significant difference was found in the RT+VIP and RT+NG groups. While there was a significant difference in the MDA analysis in the PD group in the values determined as a result of the Bradford Method and Spectrophotometric analysis, in which tissue analysis was performed, no significant difference was found in the SOD, GSH and Protein determinations. According to the biochemical analysis results of the RT+VIP group and the RT+NG group, the expected results could not be achieved, while the findings obtained according to the locomotor activity test results; KD movement was low in the RT group, an increase in the expected value was observed in the RT+VIP group, a significant difference was also obtained in the MZ, S, S, DS parameters.

As a result; We can say that the use of the combination of Naringenin and Vasointestinal

Peptide in rats with experimental Parkinson's Model provides significant improvements especially in motor activities and induces the folding of the alpha-sync protein encoded by the Alpha-sync gene, the use of selective inhibitors of GSK-3 beta increases and it has therapeutic properties in Parkinson's disease. In addition, we think that our study will mediate to better understand the etiopathogenesis of Parkinson's Disease and to develop new treatment strategies against the disease based on this.

Key words: Alpha-sync, GSK3-beta, Motor Activity Test, Naringenin, Parkinson's Disease, Rotenone, Vasointestinal Peptide,



1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı substantia nigra pars compacta'da(SNc) bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve dopaminerjik yolların denervasyonu nedeniyle, klinik olarak premotor ve motor semptomlarla karakterize, santral sinir sisteminde etkilenen nöronlarda intrastoplazmik inklüzyonların görüldüğü multisistem progresif bir hastalıktır (Palma ve Kaufmann, 2018; Prashanth ve Roy, 2018; Yang et al, 2019). Genellikle motor semptomların görülmesi, premotor semptomlarla karakterize uzun bir dönem 'preklinik dönem' olarak adlandırılmaktadır (Berg ve ark, 2015; Getz ve Levin, 2017). Hastalık teşhis edildiğinde diğer bir deyişle klinik olarak motor semptomlar gözlemlendiğinde, substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların %50-70'i dejenerasyona uğradığı tespit edilmiştir. Nedeninin ise; Nörodejenerasyonu yavaşlatarak veya etki gösterebilecek nöroprotektif uygulamalar için geç kalınmış olabileceği bildirilmiştir (Akbayır ve ark, 2018; Giguere ve ark, 2018; Sung ve ark, 2018; Takahashi ve ark, 2018; Rynman ve Poston, 2019). Dopamin depleksiyonunun giderilmesi üzerine kurulu, dopamin öncü moleküllerinin ve dopamin agonistlerinin kullanıldığı semptomatik tedavi protokolleri de yalnızca hipokinetik motor semptomların hafiflemesini sağlamaktadır. 5 yıl ve daha uzun süren farmakolojik tedavilerin yan etkisi sonucunda kaçınılmaz olarak diskinezi (hiperkinetik hareket bozukluklar) görüldüğü bilinmektedir (Xu ve Pu, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018). Farmakolojik tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda, motor işlevlerde rol alan subkortikal çekirdeklerin cerrahi yollarla elektriksel stimülasyonu gerçekleştirilir ancak bu uygulama semptomların iyileşmesine en çok on yıl süre ile katkı sağlayabilir (Rizek ve ark, 2016). Terapötik protokollerin hiç biri nörodejenerasyonu durdurmaya yönelik değildir. Aynı zamanda dopamin ve dopamin agonistlerinin kullanıldığı tedavi yöntemleri dopaminerjik sistemle yakından ilişkili pek çok nörotransmitter sistemi göz ardı etmektedir. Terapötik protokollerdeki bu açmaz nedeniyle son zamanlarda yapılan çalışmalar Parkinson hastalığının patogenezinin aydınlatılmasına, nörodejenerasyonu durdurmaya veya yavaşlatmaya yönelik uygulamaların geliştirilmesine odaklanmıştır (Rodriguez-Violante ve ark, 2017; Wang ve ark, 2018; Murueta-Goyena ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020).

Bu çalışma; rotenon uygulaması ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde indüklenen ratlarda, Subtalamik area içindeki dopamin seviyesinin düzenlenmesinde, lokal

ve sistemik sinirsel ve motor yanıtların modülasyonu ve SNe'nin fonksiyonunun stabilizasyonunda faydalı etkileri bulunan VIP ve NGN etkenlerin intraperitoneal yolla kullanımının nöroprotektif etkilerini araştırmak amacı ile yapıldı. Ayrıca santral sinir sistemi oksidatif stres parametreleri ve protein katlanmasının, MDA, GSH, SOD üzerine olan etkilerinin ve motor fonksiyonlarının, davranış test sonuçlarına göre literatürler ışığında değerlendirilmesi planlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Tanımı

Parkinson hastalığı (PD) ilk defa İngiliz bilim adamı James Parkinson'un 1817 yılında The London Medical and Physical Journal adlı dergide yayımlanan "Essay on the Shaking Palsy" başlıklı çalışmasında geçmektedir. Parkinson hastalığı (PD) yaygın bir nörodejeneratif bozukluk olup oranları gittikçe artan bir şekilde sürmektedir (Pringsheimetal.,2014). PD'nin başlıca özellikleri arasında titreme, rijidite ve postural bozukluk bulunur. Depresyon gibi motor-olmayan bozukluklar da olsa bunun yanında uyku bozuklukları giderek daha fazla fark edilmektedir (RodriguezOrozetal.,2009). Parkinson hastalığı substantia nigra pars compacta'da (SNpc) bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve dopaminerjik yolların dejenerasyonu nedeniyle gelişen, klinik olarak premotor ve motor semptomlarla tanımlanan, santral sinir sisteminden etkilenen nöronlarda intrastoplazmik inklüzyonların görüldüğü multisistem progresif bir hastalıktır (Palma ve Kaufmann, 2018; Prashanth ve Roy, 2018; Yang et al, 2019).

Hastalık teşhis edildiğinde klinik olarak motor semptomlar gözleendiğinde, substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların %50-70'i dejenerasyona uğramış, nörodejenerasyonu yavaşlatarak etki gösterebilecek nöroprotektif uygulamalar bulunmaktadır (Akbayır ve ark, 2018; Giguere ve ark, 2018; Sung ve ark, 2018; Takahashi ve ark, 2018; Rynman ve Poston, 2019). Dopamin deplesyonunun giderilmesi üzerine kurulu, dopamin öncü moleküllerinin ve dopamin agonistlerinin kullanıldığı semptomatik tedavi protokolleri de yalnızca hipokinetik motor semptomların hafiflemesini sağlamakta, 5 yıl ve daha uzun süren farmakolojik tedavilerin yan etkisi sonucunda kaçınılmaz olarak diskinezi adı verilen hiperkinetik hareket bozuklukları görülmektedir (Xu ve Pu, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018).

James Parkinson'un modern tanımlamasından yaklaşık 60 yıl sonra, Fransız nörolog Jean Martin Charcot, PD'deki titremeyi, multipl skleroz hastalarında yalnızca aktivite esnasında görülen kinetik titremeden ayırıp bu hastalığı "Parkinson" hastalığı olarak

isimlendirmiştir (Lewis, 2012). Eduoard Brissaud, substantia nigra pars kompakta (SNpc)'nin PH'den etkilenen bölge olabileceğini 1899 yılında öne sürmüş, 20 yıl sonra, Tretiakof, SNpc'de nöromelanin pigmenti barındıran nöronlarda büyük bir kayıp olduğunu ve sitoplazmada ileride Friedrich Lewy tarafından "Lewy cisimcikleri" olarak adlandırılacak inklüzyon cisimlerinin varlığını gözlemlemiştir (Del Rey ve ark., 2018).

2.1.1. Parkinson Epidemiyolojisi

PD'nin prevalansının genellikle 100.000 kişide 100 ile 200 arasında değiştiği kabul edilmektedir ve yıllık indeksinin 15/100.000 olduğu düşünülmektedir (Tysnes ve Storstein, 2017). PD'nin sıklığı ileri yaşlarda, erkeklerde, düşük sosyoekonomik duruma sahip popülasyonlarda ve Avrupa popülasyonlarında daha fazladır (Van Den Eeden ve ark., 2003; Lix ve ark., 2010). Türkiye'de yapılan çalışmalar, PD oranını 111-149/100.000 arasında tahmin ederken (Torun ve ark., 1995; Bolayır ve ark., 2002; Özbek ve ark., 2009), Durmuş ve ark.'ları tarafından yapılan Türkiye'de PD prevalansını belirlemeye yönelik ilk büyük popülasyon tabanlı çalışmada, PD Avrupa ülkelerinden biraz daha düşük, 202/100.000, bulunmuştur (Durmuş ve ark., 2015).

2.1.2. Parkinson Etiyolojisi

PH bir süreçtir ve bu süreç çoğu zaman yıllar alır. PH'nın neden veya nedenlerinin ne olduğu hala büyük oranda bilinmemekle birlikte kalıtsal veya idiyopatik faktörlere bağlı olarak oluşabilir. Yapılan çalışmalarla PH oluşumuna neden olabilecek genetik faktörler dört farklı gendeki mutasyon/mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir.

Bunlar, α -sinuklein, parkin, ubikutin C-terminal hidrolaz L1 ve DJ-1 genleridir. Ayrıca bu genlerle ilişkili olabileceği düşünülen on kadar gen lokusu da mevcuttur. GSK-3 β vücutta pek çok eksprese edilen ve inhibitör sinyal olmadığı sürece sürekli aktif olan bir serin/treonin kinazdır. Hücre metabolizmasında GSK-3 β 'nin hücre döngüsü, protein yıkımı ve enerji metabolizması gibi pek çok hücresel faaliyetle beraber, kanser, diyabet, inflamasyon ve nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir.

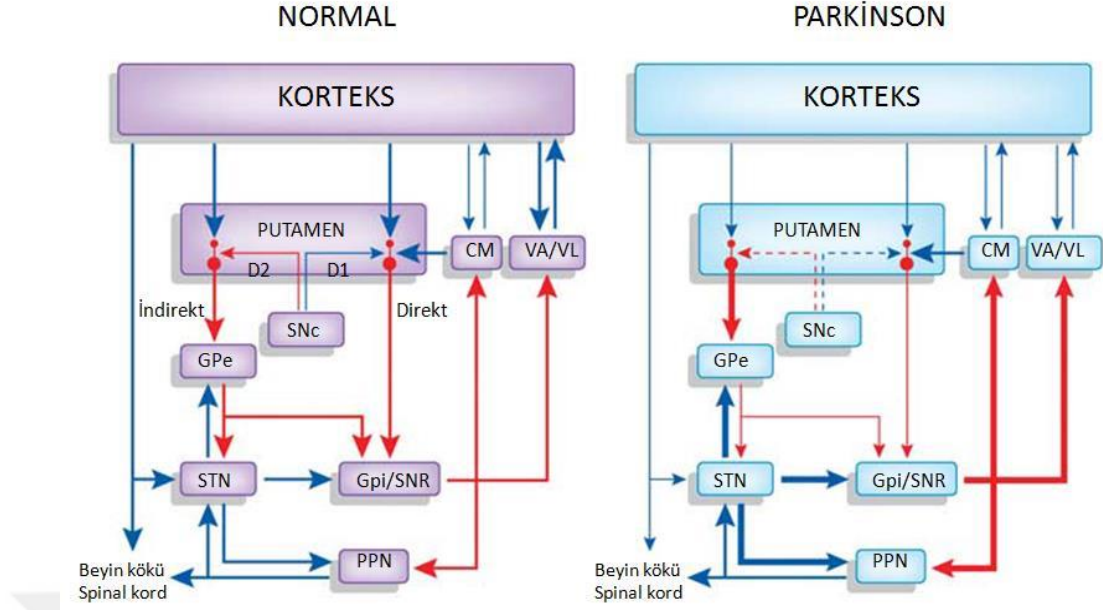
2.1.3. Parkinson Nörodejenerasyonu

PD'nin nörodejenerasyonun patolojisine bakıldığında, programlı hücre ölümü (apoptoz), nekroz ve dopamin delesyonundan söz edilebilir.

Apoptoz, sitoplazma ve kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, apoptotik gövdelerde hücre fragmentasyonu ve takiben lizozom aracılı fagositoz ile karakterize olan bir süreçtir. Hücre ölümünde diğer bir mekanizma ise otofajidir. Özellikle sinir hücrelerindeki protein birikimi nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda önemli etkenlerdendir. Otofajik veziküllerin (otofagozomlar ve otofagolizozomlar) birikimi ile meydana gelen hasarlar PD nörodejenerasyonunda önemli rol oynar

PD'de nörodejenerasyonun kesin mekanizması başta olmak üzere bu süreçte birçok hücresel yolağın devreye girdiği düşünülmektedir. Bunlar genetik faktörler ve protein üretiminde meydana gelen anomalilerdir. Bazal gangliyonlarda meydana gelen değişiklikler PD sürecinin ilerlemesini değiştirmektedir. Bu süreçte oksidatif stres, mitokondriyel disfonksiyon, eksitotoksikite, inflamasyon, immün düzenleme, glial spesifik faktörler, trofik faktörlerin azalması vb. henüz bilinmeyen birçok mekanizmanın daha yer aldığı düşünülmektedir.

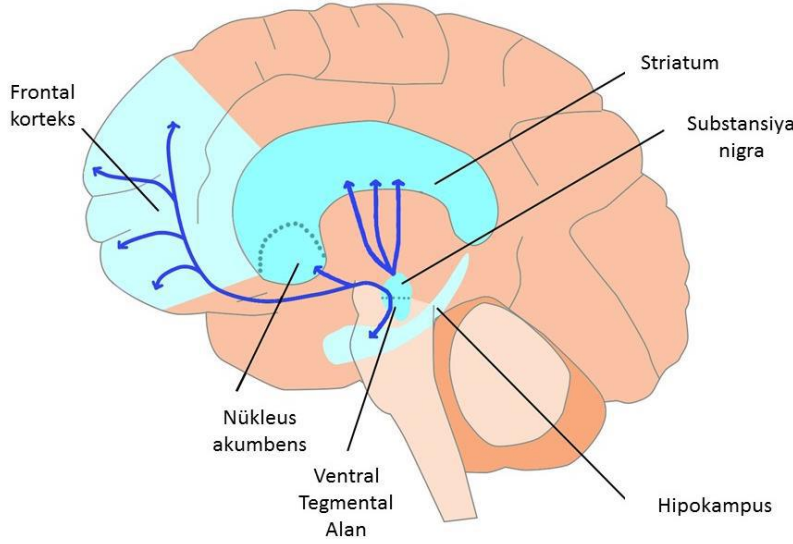
Bir hipoteze göre PD'de nörodejenerasyon, intraselüler veziküler transportta aksama ve mikrotübüllerin bütünlüğünde bozulma ile ortaya çıkar. Bir diğer hipotez ise, nörodejenerasyonda astrositlerin rolünün olabileceği üzerinedir.



Şekil 1. Bazal gangliyonların normal işleyiş mekanizmaları ve PD ile meydana gelen değişimler. CM, Sentromedyan nükleus; GPe, Globus pallidus external segment; Gpi, Globus pallidus internal segment; PPN, Pedinkülopontin nükleus; SNc, Substansiya nigra pars kompakta; STN, Subtalamik nükleus; VA/VL, Ventral enteriyor, ventral lateral nükleus; SNr, Substansiya nigra pars retikülata.

2.1.4. Parkinson ve Dopamin İlişkisi

Dopamin beyinde başlıca substantia nigra (SN), area tegmentalis (AT) ventralis, hypothalamus'tan, periferde bir miktarda adrenal bezde sentezlenen monoamin yapısında (Daubner ve ark, 2011), norepinefrin ve epinefrinin prekürsörü katekolaminerjik, organik bir kimyasaldır (Tank ve Wong, 2015; Ayano, 2016). Bir dopamin molekülü, bir etil zincir aracılığıyla bir amin grubu bağlı bir katekol yapısından (iki hidroksil yan gruba sahip bir benzen halkası) oluşur. Bu amin bağına sahip bir benzen halkasının varlığı, onu çok sayıda psikoaktif ilaç içeren bir aile olan fenetilamin grubuna dahil eder (Vendelboe ve ark, 2016). Dopaminin kimyasal formülü $C_8H_{11}NO_2$, Uluslararası Uygulamalı Kimya Birliği ismi 4-(2-24 aminoethyl) benzene-1,2-diol'dür (WEB_1). Dopamin SSS'de nörotransmitter olarak görev yapar. Hypothalamus'tan sentezlenen dopamin, bir nörohormon olarak adenohipofizden prolaktin sentezini baskılar, prolaktin inhibe edici faktör olarak da bilinmektedir.



Şekil 2. Beyindeki dopaminerjik yollar. 1. Substantia nigra → Dorsal striatum (Nigrostriatal yolak) 2. Ventral tegmental alan → Ventral striatum (Mizolimbik yolak) 3. Ventral tegmental alan → Prefrontal korteks (Mezokortikal yolak). Şekil, Okinawa Bilim ve Teknoloji Enstitüsü web sayfasından alınarak Türkçeleştirilmiştir (<https://www.oist.jp/news-center/photos/dopamine-pathways>, Erişim tarihi: 20 Ağustos 2020).

Şekil.2. de bahsedildiği gibi dopaminerjik yollar; mezolimbik yolak, duygu durumu kontrol eden VTA'ya ve nükleus 18 akumbensin limbik bölgelerine bağlanır. Bu yolaktaki patoloji, PD'de nigrostriatal dejenerasyondan önce ortaya çıkar (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Hastalığın erken evresinde mevcut olan ve dopamin ile modüle edilen frontal-striatal disfonksiyon, çalışma belleğinde, dikkatte, planlamada eksikliğe yol açarken hastalık ilerledikçe kolinerjik kayıp ile ilişkili olan ve demansa yol açan posterior kortikal dejenerasyon meydana gelir (Biundo ve ark., 2016).

2.1.5. Parkinson Motor Semptomları

Parkinsonizm, beynin substantia nigra (SN) bölgesindeki nöronların dejenerasyonu ile oluşan ilerleyici motor fonksiyon kaybından dolayı gerçekleşen bir grup kronik nörolojik bozukluğun genel adı olup, motor semptomları 4 ana başlıkta toplanır;

- ✚ titreme (tremor),
- ✚ kaslarda sertleşme (rijidite),
- ✚ harekete başlamada güçlük (bradikinezi),
- ✚ duruş bozukluğu (postürel instabilite).

Bunların dışında, hastalarda yüz ifadesinin eksikliği (maskeli yüz), yutma veya konuşmada güçlük, denge kaybı, depresyon ve bunama da gerçekleşebilmektedir (Mai and Paxinos, 2011).

2.1.5.1. Bradikinezi

Hareketlerde yavaşlama ve dengeyi tutturamama belirtileri semptomun en belirgin nedenlerindendir. Bradikinezi yaşayan hastalarda hareketlerde yavaşlığın yanında tekrar edilmesi istenilen hareketlerde tekrarlayamama durumu ve yavaşlık söz konusudur. Klinik olarak bakıldığında baş parmağın ve işaret parmağının birbirine vuramaması gibi çeşitli hareketlerin incelenmesi sağlanmaktadır (Bank ve ark, 2017; Gao ve ark, 2018) Parkinson hastalarına ödüllendirme yöntemi uygulandığında hareketlerde hızlilik ve serilik gözlenmiştir. Kısaca şartların etkisine göre bradikinezi oranı değişmektedir.

2.1.5.2. Tremor

Kasların istemsiz ve ritmik olarak kasılması anlamına gelmektedir. En yaygın olarak ellerde başlayan tremor başparmak ve işaret parmağı arasında bir nesnenin yuvarlanışına benzemektedir. Tremor çeşitleri başta istirahat tremoru olmak üzere; kinetik tremor, postural ve statik tremor olmak üzere 4 ana gruba ayrılmaktadır. (Moustafa ve ark, 2016, Gironell ve ark, 2018) PD hastalarında sıklıkla %25 civarında istirahat tremoru görülürken hastalığın ilerlemesi ile bu oran postural tremora çevrilebilmektedir. (Sveinbjornsdottir, 2016; Gironell ve ark, 2018; Heusinkveld ve ark, 2018; Tarakad ve Jankovic, 2018)

2.1.5.3. Rijidite

Kas sertliği olarak da ifade edilen rijidite PD'nin kardinal motor semptomlarından biridir. Parkinson hastalarında özellikle ekstremitelerin pasif mobilizasyonu sırasında hareketin yönü ve hızından bağımsız olarak artan direnç görülür (Shapiro ve ark, 2007; Baradan ve ark, 2013; Xia ve ark, 2017; Zito ve ark, 2018). Rijit bir ekstremitede herhangi bir eklem yavaş veya hızlı, pasif olarak hareket ettirilmeye çalışılırsa ciddi bir dirençle karşılaşılır. Bu durum kurşun boru rijditesi olarak adlandırılmaktadır. Hareket esnasında görülen rijiditedeki dalgalanmalar, pasif mobilizasyon uygulaması sırasında rijiditenin şiddetinin azalarak harekete olanak sağlaması, ardından tekrar artarak hareketi engellemesi ise dişli çark rijiditesi olarak adlandırılmaktadır.

Rijidite Parkinson hastalarında nucleus subthalamicus (STN), cerebellum, nucleus caudatus, thalamus, primer motor, temporal ve oksipital korteks arasında olan fonksiyonel bağlantıların disfonksiyonu ile ilişkilendirilmektedir (Moustafa ve ark, 2016). Rijidite gelişiminde Parkinson hastalarında nucleus subthalamicus ve globus pallidus medialis'te (GPM) artan nöronal aktivite ile talamokortikal projeksiyonların inhibisyonunun gerçekleşmesi dolayısıyla kas aktivasyonunun ve pasif germeye karşı yanıtın azaldığı ileri sürülmektedir.

2.1.5.4. Postural Bozukluk

Parkinson hastalığının geç evreleri arasındada görülmektedir. Hayvan deneylerinde bilateral globus pallidus hasarının akinezi ve şiddetli postürel instabiliteye neden olduğu (Yanagisawa ve ark, 2018), ayrıca postürel instabilitenin şiddetli olduğu Parkinson hastalarında kortikal atrofi tespit edilmiş, korteks ve subkortikal çekirdekler arasındaki bağlantının azaldığı bildirilmiştir (Erdeniz ve ark, 2018)

Parkinson hastalarında postürel instabiliteye bağlı düşme vakaları %62-68 olarak belirtilmektedir (Barbosa ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016). Özellikle Hoehn ve Yahr sınıflandırmasına göre 3. evrede bulunan hastalarda düşme riski yüksektir, hastalık ilerledikçe hastalar oldukça hareketsiz hale geleceklerinden düşme riski azalır (Kim ve ark, 2013; Erdeniz ve ark, 2018). Postürel instabilite genellikle torakal ve lumbal bölgede omurganın

fleksiyonu, baş ve boynun fleksiyonu; antecollis, bazı durumlarda omurganın skolyozu nedeni ile gelişir.

2.1.6. Parkinson Tedavi Yöntemleri

PD, kişiselleştirilmiş terapötik yaklaşım gerektiren geniş bir motor ve motor olmayan bulgular spektrumuna sahip karmaşık bir nörodejeneratif bozukluktur (Jankovic ve Tan, 2020). PD tedavisinde birincil amaç, motor ve motor olmayan bulguları tedavi ederek hastanın yaşam kalitesini artırmaktır (DeMaagd ve Philip, 2015). Dopaminerjik nörotransmisyonun artırılmasına yönelik ilaçlarla sadece palyatif tedavinin mümkün olması, PD’de nöroprotektif etkiye sahip potansiyel ilaç adayları ile ilgili çalışmaları kaçınılmaz kılmaktadır (Blandini, 2005).

Parkinson hastalığının ilerleyen aşamalarında, farmakolojik tedavi motor semptomları kontrol etmede yetersiz kaldığında, cerrahi olarak derin beyin elektriksel stimülasyonu (DBS) gerçekleştirilmektedir (Sveinbjornsdottir, 2016; Xu ve Pu, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018). Bu aşamada GPM’i hedefleyen pallidotomi, STN’u hedefleyen subtalamotomi gibi yüksek frekanslı derin beyin stimülasyonunu içeren cerrahi tedaviler devreye girer. Subtalamik çekirdeğin stimülasyonu unilateral uygulandığında akinezi ve rijiditede daha az etkili iken tremorun sağaltımında daha etkili olduğu bildirilmektedir (Shapiro ve ark, 2007; Moustafa ve ark, 2016).

2.2. DeneySEL Parkinson Modelleri

PD modelleri oluşturulurken birçok toksik veya patolojik ya da genetik hayvan modelleri ile çalışılabilmektedir. Bu modeller;

✚ 6-Hidroksidopamin (6-OHDA)

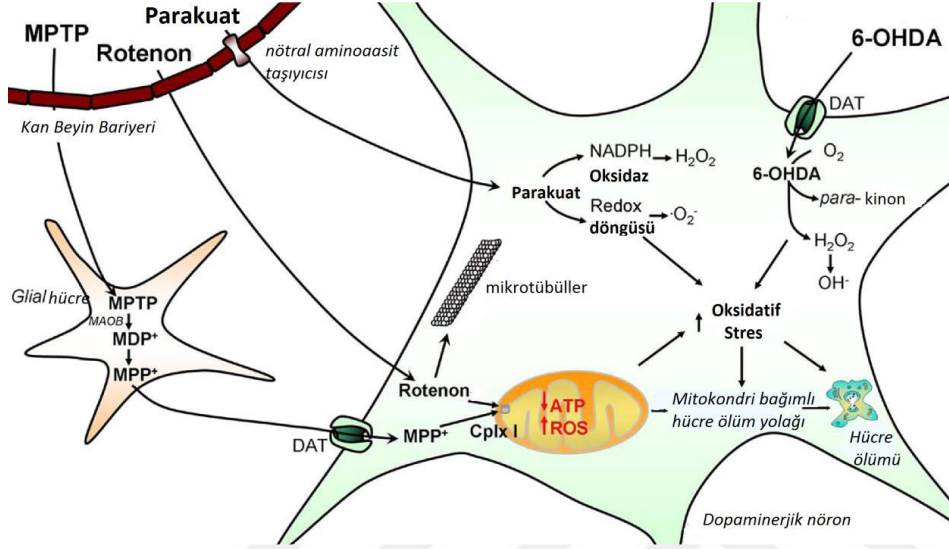
✚ MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)

✚ Parakuat

✚ Maneb

✚ Rotenon gibi nörotoksinler dopaminerjik nörodejenerasyona neden olduklarından PD modeli olarak kullanılmaktadırlar.

Fakat yalnızca MPTP insan parkinsonizmi ile açıkça ilişkilendirildiği için günümüzde en çok kullanılan PH modelidir



Şekil 3. PH modeli oluşturmada kullanılan nörotoksinlerin işleyiş mekanizmaları

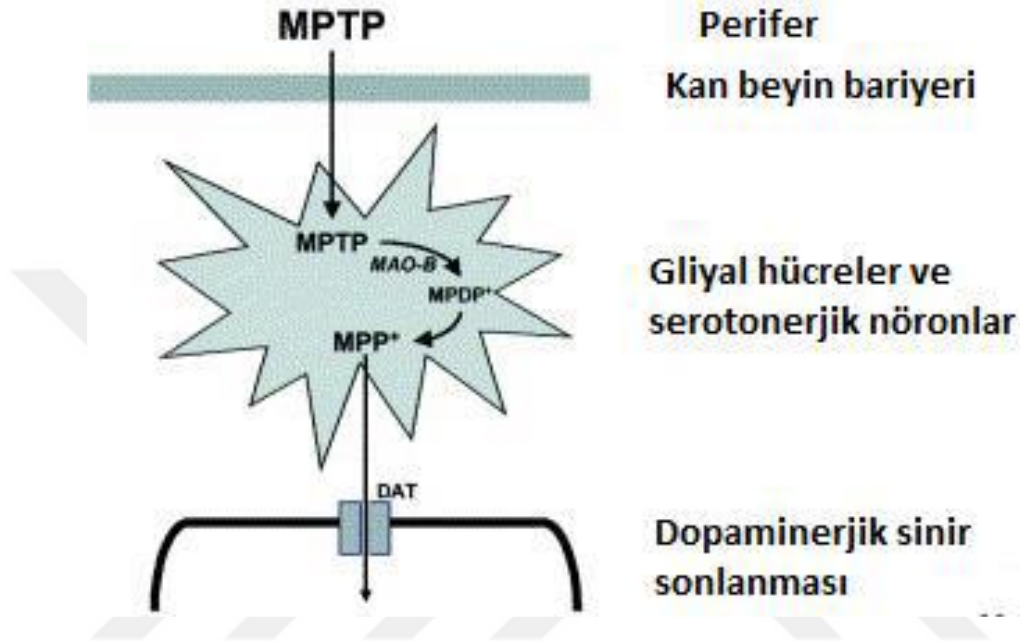
2.2.1. 6-OHDA

40 yıldan daha fazla süredir kullanılan yöntem olan 6-OHDA güçlü bir nörotoksindir. PD oluşturmada modelin özelliği ise; kan-beyin bariyerini geçemediği için doğrudan intraserebral uygulama sonunda merkezi nöronal lezyona neden olur.

6-OHDA'nın kimyasal yapısı katekolaminlere çok benzemektedir. Hücre içine girdikten sonra otooksidasyon ile reaktif oksijen türleri üretimine (ROS) ve oksidatif stres parametrelerinin oluşmasına neden olmaktadır. Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidrosil radikalleri gibi toksik türler oluşturur. (SOD) superoksit dizmutaz, (GPx) Glutasyon superoksidad üretimi 6-OHDA yıkıcı etkilerine karşı koruyucu özellik gösterir.

2.2.2. MPTP

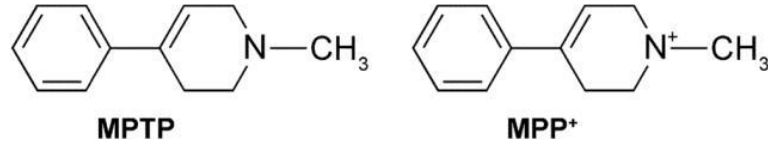
MPTP mitokondriyal kompleks-I inhibitörüdür. Lipofilik bir yapıya sahip olduğu için kan beyin bariyerini geçer.



Şekil 4. MPTP metabolizmasının şematik gösterimi

İnsanlarda ve maymunlarda MPTP, parkinson hastalığının tremor, rijidite, bradikinezi, postural bozulma ve donma gibi geri dönüşümsüz ve şiddetli birçok semptomunun görülmesine neden olur. MPTP'nin en geçerli uygulama yöntemi sistemik uygulamadır ve en sık kullanılan hayvan modelleri fare ve maymundur. Sıçanlar ise MPTP'ye karşı göreceli olarak daha dayanıklıdır.

MPTP nedenli mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve enerji azalışı ile hücrel reaksiyonlar yavaşlayıp durur. Böylece açığa çıkan protein, lipid ve oluşan DNA hasarı dopaminerjik nöronlarda apoptoza neden olarak hücreleri ölüme götürür.



Şekil 5. MPTP ve MPP'nin kimyasal yapısı

2.2.3. Paraquat ve Maneb

Herbisit paraquat (N, N2-dimetil-4-4''-bipiridinium) ve fungusit maneb (manganeze ethylene-1,2- bisdithiocarbamate) toksik PD modeli oluşturmada kullanılmaktadır. Paraquat doğal çevrede bulunabilir ve 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP⁺)'ye yapısal olarak benzemektedir. Paraquatla uygulanan modelde PD yakalanma riskini artırır. Paraquat kan-beyin bariyerini nötral aminoasit taşıyıcıları ile geçer ve nigrostriatal yolağı hedef alır. Mitokondriyel kompleks 1'i inhibe eder ve redoks döngüsü ile süperoksit oluşumuna neden olur.

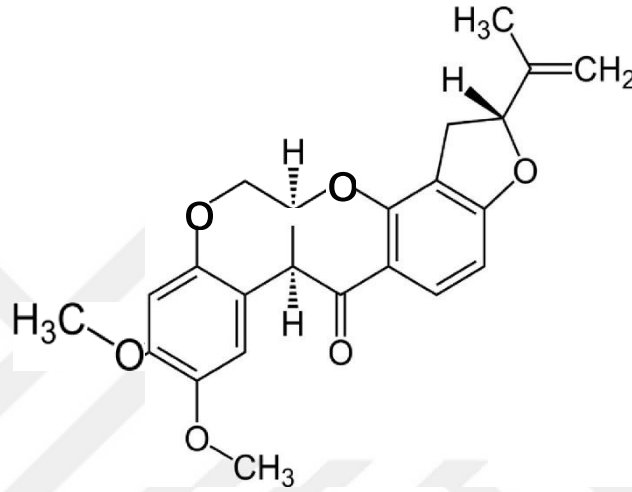
Maneb (MB) manganez içeren etilen bis-dithiokarbonat fungusitidir. PD için çevresel bir risk faktörüdür. Paraquatla birlikte etkisi artar. Paraquat MB birlikteliğinin yarattığı toksisitenin mekanizması henüz tam açıklığa kavuşmamıştır. Çünkü paraquat bir oksidandır ve ROS artışına neden olur. Maneb ise ROS'tan bağımsızdır. Nükleer Faktör Eritroid 2 (Nrf-2)'yi aktive eder, hücresel glutatyon (GSH) düzeyini artırır ve oksidatif stres yaratmadan proteinlerden tiyol kaybına neden olur. Proteinler ardından dimerize olur ve enzimatik aktiviteleri inhibe olur.

2.2.4. Rotenone

Rotenon, tropikal bitkilerin özütlerinden elde edilen doğal sitotoksik bileşiklerden olan rotenoid ailesine üye, haşerarla mücadelede kullanılan toksik bir maddedir. Oldukça lipofiliktir ve dolaşımla organlara kolaylıkla ulaşabilir. Rotenon MPP⁺ ile aynı bölgeye bağlanır ve mitokondriyel kompleks I'ı inhibe eder.

Düşük dozda rotenona intravenöz maruziyet sıçanlarda α -sinüklein pozitif LC benzeri inklüzyonların oluşumuyla nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda seçici dejenerasyona neden olur

Lipofilik olan rotenonun kan beyin bariyerini rahatlıkla geçtiği bildirilmiştir. Mitokondri içerisinde biriken rotenon elektron taşıma zincirinin kompleks-I ünitesini engeller. (Dauer ve Przedborski 2003, Blandini ve Armentero 2012, Özsoy 2012).



Şekil 6. Rotenone kimyasal yapısı

Rotenone uygulaması yapılırken intraperitoneal yöntem kullanıldığında mortalite ve morbiditeye sebep olduğu ortaya çıkmaktadır. Düşük dozda verilen rotenone ise istenen PD luşturma sonucunu vermektedir.

2.3. Rotenone ile İndüklenen Parkinson Modeli

Başka bir çalışmada ise rotenon intraperitoneal enjeksiyonla uygulandığı zaman nigrostriatal dejenerasyona ek olarak, dopamin agonisti apomorfine yanıt veren davranışsal defisitlere neden olduğunu ve bu gözlenen eksikliklerin dopamin kaybına spesifik olduğunu düşündürmektedir (Cannon ve ark. 2009).

Bazı çalışmalar rotenonun intrakraniyal infüzyonunun bu bozucu etkilere neden olmadığını ortaya koymuştur. Ancak protein agregasyonu ve Lewy cisimciği formasyonu gibi

bazı özellikler henüz farelerde tespit edilmemiştir (Sindhu ve ark. 2005, Saravanan ve ark. 2005, Mulcahy ve ark. 2011, Carriere ve ark. 2014).

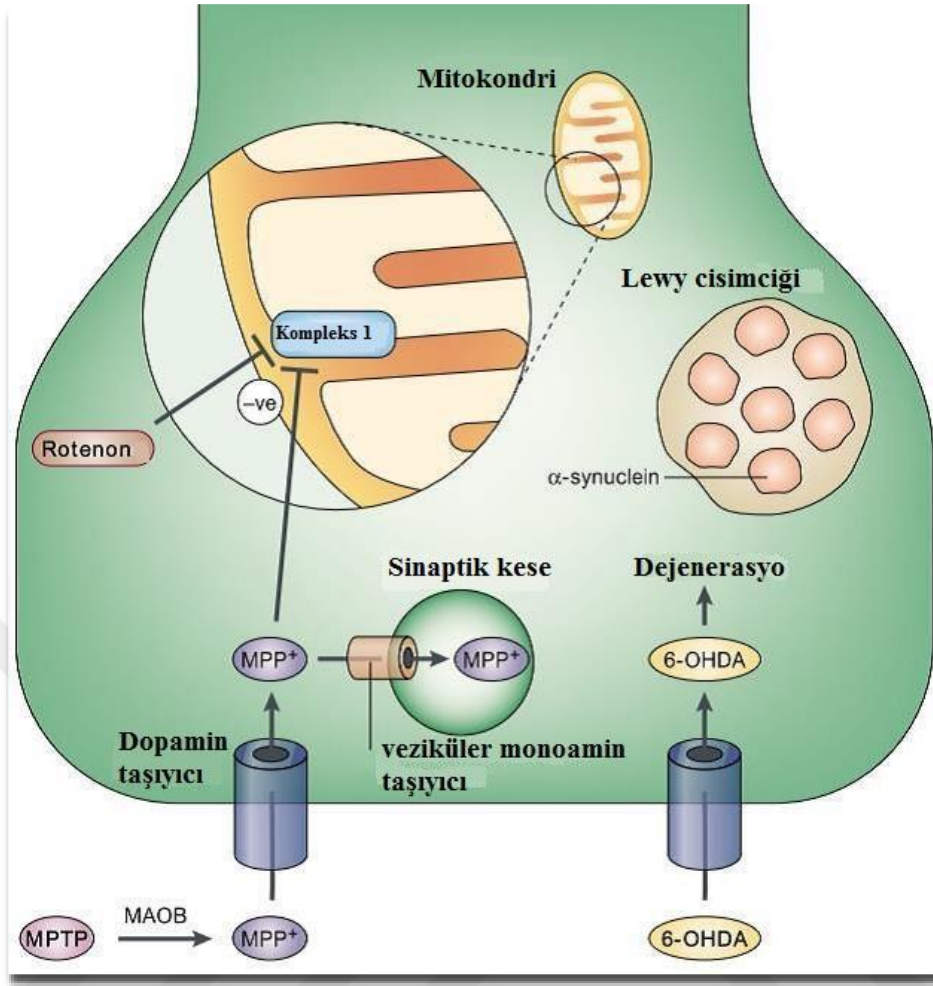
Son zamanlarda, farelerde medial ön beyin demetinin tek taraflı olarak infüzyonu sonucu oluşan lezyonlarda, a-sinüklein ve motor disfonksiyonunun aşırı ekspresyonu ile sonuçlandığını bildirilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar nigrostriatal yol boyunca dopaminerjik dejenerasyona dair bir kanıt sunmamışlar ve motor eksikliklerine yönelik herhangi bir nicel sonuç belirtmemişlerdir (Weetman ve ark. 2013)

2.3.1. Rotenone Etki Ettiği Mekanizmalar

Mitokondri içerisinde biriken rotenon elektron taşıma zincirinin kompleks-I ünitesini bloklar. Parkinson metodu uygulamasında ise rotenon 10 ug/mL, paraquat 25, 50 ve 75 mg/mL dozda 30 gün süre ile intranazal olarak uygulanır (Hatip 2010). Aynı zamanda rotenon 30 mg/kg dozda oral olarak uygulanabilmektedir (Haytural ve Tüzün 2014). Rotenonun subkutan dozu ise 2,5 mg/kg dozda 10 gün (1-4 ve 6, 9, 12, 15, 18, 21 gün) uygulanarak Parkinson modeli oluşturulmaktadır (Samantaray ve ark. 2007).

Parkinson patolojisinde bulunan özelliklerin birçoğu, reaktif oksijen türü üretimi, sistemik mitokondriyal bozulma, mikrogliyal aktivasyon, a-sinüklein fosforilasyonu, agregasyon ve Lewy patolojisi, seçici nigrostriatal dopaminerjik dejenerasyon, ubikuitin-proteazomal disfonksiyon ve L-3,4-dihidroksifenilalanin (levodopa; L-DOPA) yanıt veren motor defisitleri, tirozin hidroksilaz imünoreaktivitesinin tükenmesi, oksidatif hasar gibi bir çok belirti rotenon uygulamasından sonra gözlemlenmektedir (Betarbet ve ark. 2006, Drechsel ve Patel 2008, Cicchetti ve ark. 2009, Norazit ve ark. 2010, Bové ve Perier 2012).

Rotenonun proteazom aktivitesini ve mitokondriyal kompleks I aktivitesini inhibe etme yeteneğinin bir sonucudur (Şekil 3, Blandini ve Armentero 2012). Bu da substantia nigra ve striatum içindeki dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna yol açmaktadır (Alam ve Schmidt 2002, Yang ve ark. 2006). Ayrıca, in vivo çalışmalar, bu nörotoksinin Parkinson modeli olarak kullanım potansiyelini ortaya koymuştur.



Şekil 7. DeneySEL Parkinson modelinde nörotoksinlerin dopamin hücrelerine etkisi (Beal 2001)

2.3.1.1. Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondri kompleks-1 inhibisyonu ile meydana gelen modellerde intrinsik yolun yani mitokondriyal yolun öneminin büyük olduğu bilinmekle beraber ekstrinsik yolunda bu intrinsik yol üzerinde etkin olabileceği bildirilmektedir (Da Costa ve Checler 2011).Bağırsak epitel yapısının bariyer fonksiyon rolü, goblet hücrelerince oluşturulan mukus yapısıyla başlamaktadır (Wallace ve diğerleri, 2014). Mukus tabakası dış ve iç olmak üzere 2 kısma ayrılır, dış mukus gevşek yapısıyla lümeninde doğal olarak yer alan mikroorganizmalara ev sahipliği yaparken, iç mukus yoğun yapısıyla mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturur (Viggiano ve diğerleri, 2015). Dış mukusta bakteri yoğunluğu yüksek, antimikrobik madde ve müsin az iken; iç mukusta ise tam tersi durum söz konusudur (Wallace ve diğerleri, 2014).

Parkinson grubuna göre hem STR’de hemde SN’de istatistiksel anlamda bir azalma tespit edildi. Rotenonun etkisi ile mitokondrial kompleks-1 inhibe edilerek spesifik dopaminerjik nöronların kaybı düşünülecek olursa apoptozisin mitokondriyal yolu olan intrinsik mekanizmanın SN’daki Bcl-2 verileri nöron kaybını desteklemektedir.

2.3.1.2. Oksidatif Stres Parametresi

Günümüzde deneysel Parkinson hastalığı oluşturmak amacı ile kullanılan rotenon, parakuat gibi benzer nörotoksinlerin çoğu da seçici olarak mitokondriyal kompleks I inhibisyonunu sağlayarak etkisini göstermektedir (Hu ve Wang, 2016). Mitokondriyal kompleks I inhibisyonu ve ROS üretimi dopaminerjik nöronların dejenerasyonu için anahtar mekanizmadır. Hücre içi oksidatif stresin artması, hatalı katlanmış protein agregatlarının degradasyonunu sağlayan ubiquitin proteozomal sisteminin de disfonksiyonuna neden olmaktadır (Reeve ve ark, 2014). Sonuç olarak mitokondriyal membran potansiyeli azalır, hücre içi kalsiyum homeostazisi bozulur ve mitokondriler yıkımlanır (mitofaji), nörodejenerasyon görülür (Hu ve Wang, 2016)

Biyolojik sistemlerde elektron alıcı moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar. Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine de oksidanlar denir. Oksidanlar hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle, bu hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Bu oksidanlar canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler formları olan

- süperoksit dismutaz (SOD),
- glutatyon peroksidaz (GPx)
- katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin
- indirgenmiş glutatyon (GSH)
- askorbik asit (vitamin C) ve alfa tokoferol gibi antioksidanlar tarafından yıkılırlar.

Serbest radikallerin hasar verme özelliklerinden dolayı diyabetes mellitus, parkinson, demas, iskemi reperfüzyon hasarı, kanser, yaşlanma, kas hastalıkları gibi birçok hastalıklara yol açtığına dair çalışmalar bulunmaktadır.

PD'de, kronik inflamatuvar sürecin, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi ve oksidatif stres yoluyla nöronal dejenerasyona katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (Ferreira ve Romero-Ramos, 2018).

Hasarlı bölgelerde aktifleşmiş mikroglia birikimi ile tespit edilen inflamasyonun varlığı, PD hastalarının post-mortem beyinlerinde, dopaminerjik dejenerasyonun yoğun olduğu SNpc'de ve ayrıca nöron kaybının yaygın olduğu hipokampus, transentorinal korteks, singulat korteks ve temporal kortekste gösterilmiştir (Long-Smith ve ark., 2009). Ayrıca, PD'de mikroglianın ve yanlış katlanmış α -sinükleinin karşılıklı bir etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir. Nitekim, agregate α -sinüklein mikrogliayı aktif hale getirirken inflamatuvar mediyatörlerin de α -sinüklein agregasyonuna neden olduğu bilinmektedir (George ve ark., 2019). İnflamasyonun PD patogenezindeki kesin rolü henüz belirsiz olsa da klinik çalışmalardan ve hayvan modellerinden elde edilen kanıtlar, PD'deki nörodejeneratif süreçte mikrogliyal aktivasyonun ve inflamatuvar kaskadın önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (Long-Smith ve ark., 2009).

2.3.1.3. α -Synuclein Proteini

İnsanlarda α - sinüklein, üç proteinli bir ailenin bir üyesidir: α - sinüklein, β - sinüklein ve γ - sinüklein. Bir N-terminal alanı (aa 1-65) olmayan bir amiloid-P: alfa-sinüklein üç alan ile 140 amino asit ihtiva eden küçük bir proteindir β plakların bileşen (NAC) etki alanı (aa 66-95) ve bir C -terminal bölge (aa 96-140) Ala53Thr, Ala30Pro, Glu46Lys ve yakın zamanda tarif edilen His50Gln, Gly51Asp ve Ala53Glu gibi α - sinükleinin N-terminal alanındaki nadir nokta mutasyonları, muhtemelen yanlış katlanmaya neden olan otozomal dominant ailevi PD ve PD benzeri sendromlarla sonuçlanır / veya mutant a'nın toplanması-sinüklein proteininin yapısını bozar. Ayrıca, PD'de mikroglianın ve yanlış katlanmış α -sinükleinin karşılıklı bir etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir. Nitekim, agregate α -sinüklein mikrogliayı aktif hale getirirken inflamatuvar mediyatörlerin de α -sinüklein agregasyonuna neden olduğu bilinmektedir (George ve ark., 2019) Hidrofobik NAC alanı (aa 61-95), bir beta-yaprak yapısı içeren fibrillere patolojik α -syn montajı için en önemli ön koşul olarak kabul edilir. α -Syn, CNS'de henüz tam olarak anlaşılamayan birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Tekrarlayan stimülasyondan ve kısmi striatal dopamin tükenmesinden daha hızlı iyileşme gösteren α -syn nakavt fareler kullanılarak striatal dopamin salınımında düzenli bir rol önerilmiştir

(Abeliovich ve ark. 2000). Çoğunlukla presinaptik bölmede gözlenen a-sin'in kendisi, yaşlanma sırasında nöronal sinaptik homeostaziyi sürdürmek için önerilen bir SNARE kompleksi şaperon aktivitesi gösterir. Genel olarak, α -syn merkezi sinir sistemi ile sınırlı değildir, ancak ilginç bir şekilde membran eğriliğinde ve veziküler tomurcuklanmada da önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Burre ve ark. 2010).

Prensipte, α -syn, hem fizyolojik hem de patolojik özelliklerine sıkı bir şekilde bağlı olan alfa-sarmal ama aynı zamanda beta-yaprak yapısını benimseme potansiyeline sahip, doğal olarak katlanmamış bir protein olarak kabul edilir. Son olarak, α -syn fizyolojik olarak sarmal olarak katlanmış bir tetramer olarak ortaya çıkabilir, ancak α -syn'in yukarıda belirtilen konformasyonel esnekliği, çok işlevli özelliklerinin altında yatan neden olabilir (Bartels ve ark. 2010; Dettmer ve ark. 2015). α -syn ağırlıklı olarak ön sinapta ifade edilse de, hücre dışı boşluğa salınarak LB oluşumunu ve nörondan nörona iletimi kolaylaştırır. a-sin'nin transsinaptik iletiminin, basmakalıp bir yayılma modelini izlediğine inanılmaktadır (Braak ve diğerleri, 2003). Sonuç olarak, α -syn BOS'ta bulunabilir (Shi ve ark. 2011). BOS α -syn seviyeleri, PD hastalarında ve risk altındaki popülasyonlarda potansiyel biyobelirteçler olarak araştırılmıştır (Sierks ve ark. 2011). Başka bir klinik çalışmada, α -syn dahil olmak üzere dokuz BOS biyobelirteçlerinden oluşan bir panel, atipik Parkinson sendromlarını PD ve bunama hastalarından ayırt edebildi (Magdalinou ve ark. 2015). Ek olarak, bir BOS biyobelirteç olarak α -syn, sporadik Creutzfeld–Jakob-Hastalığını teşhis etmek için faydalı olabilir (Llorens ve ark. 2018). Bununla birlikte, analitik prosedürlerdeki farklılıklar, daha düşük özgüllük ile heterojen sonuçlar verdi.

Monogenik α -sinopatilerde patolojik SNCA mutasyonlarının nedensel rolü tartışılmaz gibi görünse de, anormal SNCA ve α -sin agregasyonunun sporadik PD veya PD'nin diğer genetik varyantlarının patogeneziindeki rolü (örn., Parkin, PINK1 veya LRRK2 mutasyonları) daha az belirgindir. Parkin mutasyonları otozomal resesif PD'ye neden olur ve heterozigot gen taşıyıcılarının PD geliştirme riski artar. Parkin geninde kodlanan protein , bir ubiquitin ligazdır ve işlev bozukluğu, a-sin agregatlarının azalmış otofajik bozunması ile ilişkili olabilir (Tan ve diğerleri, 2008). PINK1 gen strese bağlı mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoza karşı korumak için inanılır bir kinazı kodlar.

PINK1 (PARK 6) kaynaklı otozomal resesif, erken PD, SN'de nöronal kayıp gösterir, ancak LB patolojisi göstermez (Schneider ve Alcalay 2017). LRRK2 (PARK 8) -en sık görülen geç başlangıçlı PD- SN ve locus coeruleus'ta nöronal kayıp, ancak tutarsız LB patolojisi gösterir (Pont-Sunyer ve ark. 2017). LRRK2 geni aynı zamanda mitokondriyal

fonksiyon ve otofajinin (Gomez-Suaga ve ark. İle ilişkilidir 2012). Bu mutasyonlar ve α -sin birikimi arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar olsa da, nedensel bağlantı henüz net değil. Burada, postensefalitik parkinsonizmde (Jellinger 2009), MPTP ile indüklenen parkinsonizmde (Langston ve ark. 1999) LB için hiçbir kanıt bulunmadığı fikri önemlidir .) ve nigral dejenerasyonu olmayan PD-SWEDD (Ling ve ark. 2016). Ek olarak, alt beyin sapı patolojisi, PD'nin zorunlu bir tetikleyici bölgesi değildir ve PD'nin yaklaşık %7-16'sında, Jellinger tarafından gözden geçirildiği gibi vagusun dorsal çekirdeği korunur (2019). Bütün bunlar, α -sin ile ilişkili LB patolojisinin mutlaka PD için bir ön koşul olmadığını düşündürür.

Dopaminerjik terminal kaybı ve klinik semptomlarla ilişkisi monogenik bozukluğun tipine bağlıdır. Dopamin Transporter SPECT ile indekslenen striatal dopamin nöronlarının kaybı, sporadik PD ve LRRK2 ile ilişkili PD'de benzer iken, hastalık şiddeti ile ilişkili olarak dopaminerjik terminallerin kaybı, Parkin taşıyıcılarında sporadik PD'den çok daha fazladır (Varrone ve ark. 2004). Sierra ve diğerleri 2017; Wile ve diğerleri 2017). Dopaminerjik terminal kaybının asimetrisi, LRRK2 taşıyıcılarında SNCA , PINK1 veya Parkin mutasyonları olan PD hastalarına göre daha fazlaydı (McNeill ve ark. 2013). Birlikte ele alındığında, LRRK2 ile ilişkili PD'deki alta yatan patolojinin klinik sonuçları, sporadik PD'dekilere SNCA , PINK1 veya Parkin ile ilişkili formlardan daha fazla benzemektedir .

Bağlama dopamin taşıyıcısının kayda değer farklılıklar olmasına rağmen, bir kortikal ağ düzeyinde fonksiyonel değişiklikler Parkin PD ve sporadik PH çok farklı değildir -ile bağlantılı (van Eimeren ve ark. 2010), ve klinik öncesi telafi edici değişiklikler de benzer olduğu bulunmuştur PINK1 ve Parkin mutasyon taşıyıcıları (van Nuenen ve diğerleri, 2009). Bu kanıt, kortikal ağ işlevi açısından fonksiyonel endofenotiplerin, monogenik ve sporadik PD formlarında benzer olabileceğini, moleküler sinaptik endofenotipin farklı olabileceğini ima eder.

α -sin ile ilişkili genlerin anormallikleri, sporadik PD'de nadiren tespit edilmiştir. α -sin genlerindeki (SNCA = PARK1 veya PARK4) homozigot anormallikler, tartışıldığı gibi monogenik PD'ye neden olurken, α -sin ile ilişkili genlerdeki heterozigot mutasyonlar, pozitif aile öyküsü olan hastalarda bile sporadik PD'de nadiren bulunur. Farklı seviyelerde α -sin tutulumu veya genetik anormallik, Parkinson sendromlarının farklı klinik alt tiplerini tanımlayabilir, ancak bu hipotezi destekleyen veriler eksiktir. Genel olarak, daha önceki ikiz çalışmaları, PD'deki kalıtım derecesinin orta düzeyde olduğunu göstermiştir (Tanner 2003).

Şu anda SNCA'daki minör (patolojik olmayan) bir anormalliğin PD'ye neden olmak için yeterli olmadığı konusunda fikir birliği vardır . SNCA'daki kusurun nedensel hale gelmesi için ikinci bir anormallik ("ikili vuruş hipotezi") gereklidir . Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), ek risk faktörleri olarak nitelendirilebilecek bir dizi aday gen ortaya çıkarmıştır (Nalls ve ark. 2014). Beyin mikro-RNA'sının hedef genlerinin daha yakın tarihli meta-analizi, dokuz lokusta genetik varyantların önemli bir ilişkisini gösterdi (Schulz ve diğerleri 2019). Translasyon sonrası modifikasyonlar ve diğer epigenetik faktörlerin bu bağlamda önemli bir rol oynaması muhtemeldir (Lardenoije ve ark. 2015). α -syn'in üretimi ve temizlenmesi, gen düzenleme mekanizmalarını güçlendirme, baskılama ve susturma armadasının temelini oluşturur. SNCA geninin A53T SNCA mutasyonu ve hipometilasyonu , hem SNCA mRNA'nın transkripsiyonunun artmasına hem de beyindeki α -sin düzeylerinin artmasına neden olabilir . Bildirilen altı SNCA mutasyonundan biri olan His50 Glu, geniş popülasyon veri tabanlarında tutarlı bir şekilde tanımlandı, ancak kontrollere kıyasla PD vakalarında hiçbir zenginleşme görülmedi, bu nedenle patojenite için yetersiz kanıt gösterdi (Blauwendraat ve diğerleri. 2018). SNCA gen transkripsiyonunun diğer kuralsızlaştırmaları, α -syn üretimi ile klirens arasındaki dengeyi artan üretime doğru kaydırabilir (Miller ve ark. 2004). PD epigenetiği gelişen bir alandır, ancak şimdiye kadar hastalıkla ilgili epigenetik faktörleri açıkça tanımlamak için mücadele etmiştir.

Bu bilgi kazanımına rağmen, α -sin genetiği ve işleviyle ilgili bir takım tartışmalar çözülmeyi beklemektedir. PD ile ilişkili patolojik süreçleri insan beynindeki normal yaşlanmadan açıkça ayırt etmek zor olmuştur. Sonunda PD'nin klinik tezahürüyle sonuçlanan patolojik olayların ilk tetikleyicisini ve dizisini belirlemek zor olmuştur. Örneğin, bağırsak mikrobiyotası ve α -sin disfonksiyonunun etkileşimi, mevcut araştırmaların ana odak noktasıdır (Johnson ve ark. 2019). Zararlı mitokondriyal enerji metabolizmasının, sitozolik homeostazın, lizozomal disfonksiyonun, oksidatif stresin ve α -sin agregasyonu ve PD semptomlarının tezahürü için enflamasyonun rolleri açıklanmayı beklemektedir. PD, DLB veya MSA'da klinik ve patolojik olarak farklı belirtilere yol açan faktörler de bilinmemektedir. Üst üste gelebilecek birden fazla nörodejeneratif süreç vardır ve İnklüzyonlar, nörodejeneratif bir hastalık için spesifik değildir, bu da aşağı akış yollarında patolojik proteinlerin etkileşimlerini düşündürür. Çoğu sürecin etiyolojisi hala bilinmemektedir. (Jellinger 2011).

2.3.1.4. GSK-3 β

GSK-3 β vücutta pek çok eksprese edilen ve inhibitör sinyal olmadığı sürece sürekli aktif olan bir serin/treonin kinazdır. Hücre metabolizmasında GSK-3 β 'nın hücre döngüsü, protein yıkımı ve enerji metabolizması gibi pek çok hücrel faaliyetle beraber, kanser, diyabet, parkinson, demas gibi nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir. GSK-3 β aktivitesinin düzenlenmesi her ne kadar tam olarak anlaşılamamışsa bile fosforilasyon, lokalizasyon ve GSK-3 β bağlayan proteinlerle etkileşim temelli olarak üç ana düzenleyici mekanizmanın varlığı gösterilmiştir. Bu mekanizmalar arasında GSK-3 β 'nın fosforilasyon bağımlı aktivasyon-inaktivasyonu en iyi anlaşılmış olanıdır. GSK-3 β üzerindeki 216. tirozin aminoasidinin fosforilasyonu molekülün aktivasyonuna, 9. serin aminoasidinin fosforilasyonu ise inhibisyonuna neden olmaktadır. GSK-3 β , hücre sağ kalımının düzenlenmesinde, mikrotübül dinamiklerinin modülasyonunda ve glikojen metabolizmasında önemli rol oynayan bir kinazdır.

GSK-3; beyinde hem nöron hem de glialarda olmak üzere her ikisinde de bol miktarda bulunur. (Ferrer, Barrachina et al., 2002)

Memelilerde GSK-3, birbirine yüksek homoloji gösteren GSK3 β ve GSK3 α olmak üzere iki adet forma sahiptir (Leroy and Brion 1999). Her iki kinaz da benzer substrat özelliklere, transkripsiyon faktör regülasyonuna, enzim ve yapısal protein regülasyonuna sahiptir (Frame and Cohen, 2001). Diğer klasik protein kinazların aksine GSK-3 dinlenme koşulları altında esnasındaki inaktivasyonu aracılığıyla regüle edilir.

GSK3 β vücutta pek çok eksprese edilen ve inhibitör sinyal olmadığı sürece sürekli aktif olan bir serin/treonin kinazdır (Harwood, 2001). Hücre metabolizmasında GSK3 β 'nın hücre döngüsü, protein yıkımı ve enerji metabolizması gibi pek çok hücrel faaliyetle beraber (Rayasam et al., 2009), kanser, diyabet, inflamasyon ve nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (Luo et al., 2007). GSK3 β aktivitesinin düzenlenmesi her ne kadar tam olarak anlaşılamamışsa bile fosforilasyon, lokalizasyon ve GSK3 β bağlayan proteinlerle etkileşim temelli olarak üç ana düzenleyici mekanizmanın varlığı gösterilmiştir (Jope and Johnson, 2004). Bu mekanizmalar arasında GSK3 β 'nın fosforilasyon bağımlı aktivasyon-inaktivasyonu en iyi anlaşılmış olanıdır. GSK3 β üzerindeki 216. Tirozin aminoasidinin fosforilasyonu molekülün aktivasyonuna, 9. Serin aminoasidinin fosforilasyonu ise inhibisyonuna neden olmaktadır (Hughes et al., 1993; Stambolic and

Woodgett 1994; Wang et al., 1994).

Parkinson hastalığı, klinik olarak tanımlanmış parkinsonizmin eşlik ettiği, Lewy cisimciği (LB) patolojisi olan substantia nigra pars compacta'da (SNpc) dopaminerjik nöron dejenerasyonu ile karakterizedir (Cooksen 2005). PD'de (Ayton 2010) ortaya çıkan tau'nun potansiyel bir rolü olduğundan, GSK-3'ün PD'deki işlevi de bu şekilde araştırılmıştır. PD hastalarından alınan postmortem dokuların incelenmesi, Ser9'da fosforile edilmiş GSK-3 β 'nın spesifik olarak LB'lerin halesi içinde lokalize olduğunu (Hayashi 2009) ve GSK-3 β aktivitesinin striatumda da yükseldiğini ortaya çıkarmıştır. Bu son bulgu, PD'nin fare modellerinde özetlenmiştir (Hayashi 2009). Artan GSK-3 seviyeleri de periferik kan PD hastalarında (lenfosit bildirilmiştir, GSK-3) ve polimorfizmleri P tau haplotip [katmanlaştırıcı zaman, transkripsiyonu ve yapıştırma etkiler, aynı zamanda PD hastalık riski ile ilişkilidir (Kwok 2005).

Mekanik olarak, temelde PD patogenezinde yer alan 16 kDa'lık doğal olarak yapılandırılmamış bir protein olan α -sinüklein ile GSK arasında bir etkileşimi destekleyen kanıtlar vardır. Toplanmış α -sinüklein türler lb tek nükleotid polimorfizm ve çoğaltılması veya triplication ana bileşeni olan α ailesel Parkinson dejenerasyon [neden sinüklein gen]. GSK-3 β fosforilasyonu için bir substrat olan α -sinüklein ayrıca GSK-3 β (Feng LR et al. 2010) aktivasyonunu modüle edebilir; Tyr216'da (GSK-3 aktivitesini aktive eden) GSK-3 β fosforilasyonu, eksik hücrelerde de ortadan kalkar. α -sinüklein ve α -sinüklein nakavt farelerde (Duka 2009). GSK-3 β 'nın PD'deki potansiyel rolü, PD'nin 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) modelinde açıklanmıştır, burada GSK-3 β 'nın inhibisyonu MPTP'ye karşı korur *in vitro* ve *in vivo* toksisite (Duka 2009) ve α -sinüklein protein ekspresyonunu azaltır (Kozikowski AP, Gaisina IN, Petukhov PA, et al. 2006). Birlikte ele alındığında, bu veriler GSK-3'ü PD patogenezinde güçlü bir şekilde etkiler. GSK-3 inhibisyonunun A β , tau ve α üzerindeki nöroprotektif olanakları-sinüklein patolojisi bu nedenle, en yaygın olarak lityum ile derinlemesine araştırılmıştır. GSK3 β , hücre sağkalımının düzenlenmesinde, mikrotübül dinamiklerinin modülasyonunda ve glikojen metabolizmasında önemli rol oynayan bir kinazdır. (Kaytor and Orr, 2002). Son zamanlarda oksidatif stres, hiperosmotik stres, ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi hücresel streslerin GSK3 β 'nın aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (Meier, Thelen et al. 1998; Kaytor and Orr, 2002; Song, De Sarno et al. 2002). Diğer bir çalışmada ER stresinin GSK3 β 'yı Ser9 üzerinden defosforile ederek aktive edebileceği gösterilmiştir (Song, De Sarno et al. 2002).

2.4. Motor Aktivite Testleri

Öğrenme, hafızanın düzenlenmesi ve motor aktivitede D1 reseptörleri önemli rol oynarlar (Mishra ve ark, 2018). Corpus striatum, area tegmentalis ventralis, globus pallidus lateralis (GPl), glandula hypophysialis, corpus amygdaloideum, hippocampus, serebral korteks ve nucleus accumbens'te %80'i dopamine karşı yüksek aktivite gösteren D2 reseptör tipi bulunmaktadır. Aynı zamanda otoreseptör olan D2 grubu reseptörleri somatodendritik sinapsları aracılığı ile dopamin sentezini, depolanmasını ve salınımını azaltmaktadırlar (Buchta ve Riegel, 2015;Mishra ve ark, 2018). İnsan ve ratlarda D3 ve D4 reseptörleri SSS'de ağırlıklı olarak limbik sistemi oluşturan yapılarda bulunurlar (Ayano, 2016).

PD için kullanılan motor aktivite testleri parkinson modellerinin fiziksel olarak deneysel gözlem aşamalarını belirler. Bizim çalışmamızda motor aktivite testlerinin denge, postur, tremor ve duruş formlarına bakılır.

Çalışmalarda kullanılan PD motor aktivite testleri;

✚ Hole and Board Testi

✚ Merdiven Testi

✚ Açık Alan Testi

✚ Adımlama Testi

✚ Silindir Testi

Tablo 1. Davranış Testleri (Mann ve Chesselet 2015)

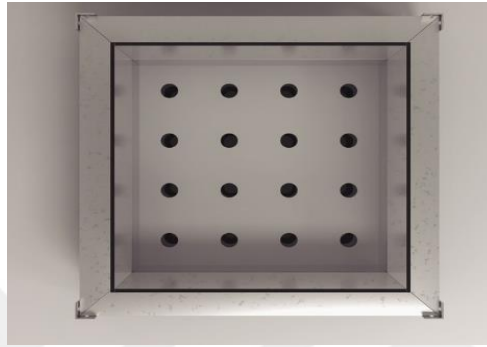
Test	Motor davranışı	Hayvan	Artıları	Eksileri	Ölçümler	Referanslar
Açık alan	Lokomotor aktivite keşif	Fare, sıçan	Otomatik, eğitim gerektirmez	Süre (~15 dk / fare) Odaya alışkanlık Yaşlara veya modellerde ilerlemeye duyarlı olabilir	Yatay, spontan aktivite, tımar	Sedy ve ark. (2008), Lam ve ark. (2011), Popovic ve ark. (2014)
Tekerlekte koşturma	Lokomotor aktivite	Fare, sıçan	Otomatik	Eğitim gerekli Habitue gerekli Oldukça yalıtılmış odalar	Seyahat edilen mesafe Koşu hızı Çalışmaya başlama zamanı	Hickey ve ark. (2005), Liebetanz ve ark. (2007)
Silindir	Kendiliğinden aktivite Ekstremité asimetrisi	Fare, sıçan	Basit, eğitim gerektirmez	Video kaydı ve değerlendirilmesi Odaya alışkanlık	Duvar destekli veya serbest duran arma Ön ayak ve arka ayak adımları Bakım için harcanan zaman	Plowman ve ark. (2011), Schallert ve ark. (2000)
Yüzme	Koordineli ekstremité kullanımı Yüzme yeteneği	Fare, sıçan	Basit kısa (1-5 dk)	Eğitim ve alışkanlık gerekli Öznel Video kaydı ve değerlendirilmesi	Sinking, yüzme veya yüzer Pençe vuruşları Yüzme hızı Platform için süre	Haobam ve ark. (2005), Deumens ve ark. (2002)
Yeme ulaşma	İyi motor yetenekleri Motor koordinasyon Duyusal motor becerileri Ekstremité tercihi	Sıçan	Basit	Gıda kısıtlaması Habitue gerekli Eğitim gerekli Video kaydı ve değerlendirilmesi	Görev tamamlama zamanı Görevi tamamlamak için girişimleri Cevapsız / düşmüş tedavi Kontra- veya ipsi lateral pençenin kullanımı	Karl ve ark. (2005), Schaar ve ark. (2010)

Tablo 1. Davranış Testleri (Mann ve Chesselet 2015) (devamı)

Test	Motor davranışı	Hayvan	Artıları	Eksileri	Ölçümler	Referanslar
Yuva yapma	İyi motor yetenekleri	Fare	Basit, eğitim gerektirmez	Tek konut	Kullanılan pamuk yüzdesi	Fleming ve ark. (2004)
Kavrama gücü	Kas gücü	Fare, sıçan	Kolay, otomatik, eğitim gerektirmez	Dopamindeki striatal değişiklikleri saptamayacak kadar hassas değildir	Ön ayakların gücü Arka ayakların gücü	Lorivel ve ark. (2007), Kuber ve Thaakur (2011), Gupta ve ark.(2014)
Ön pençe adımı	Akinezi	Fare, sıçan	Basit, eğitim gerektirmez	Testten önce hayvanı kullanma	Pençe ayarlamasının sayısı	Meredith ve Kang (2006)
Katalepsi	Kas sertliği akinezi	Fare, sıçan	Hızlı, basit, eğitim gerektirmez	Her zaman etkili değil Testten önce hayvanı kullanma	Arka ayakları veya ön ayakları yere indirmek için gecikme süresi	Richter ve ark. (2007), Haobam ve ark. (2005)

2.4.1. Hole and Board Testi

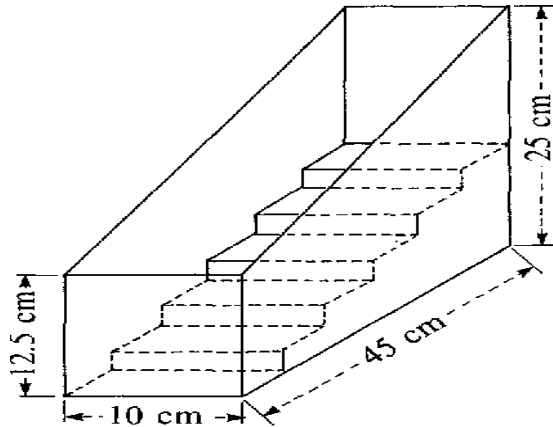
Zemini 2.2 cm çapında,16 delikten oluşan bir düzenektir.Hayvanlar 30 dakika boyunca düzeneğin orta kısmına bırakılarak,bulundukları yeri tanımları sağlanır.Uyum döneminden sonra kutuda kat ettikleri yol,arka ekstremiteleri üzerinde yükselmeleri ve ziyaret ettikleri delik sayısı kaydedilecektir ve açık alan testinde bildirilen temel prensibe göre değerlendirilecektir.



Resim 1. . Hole and Board Testi (<https://conductscience.com/maze/>)

2.4.2. Merdiven Testi

Etrafı duvarlarla çevrili,üstü açık,beş basamaktan oluşan bir merdivende yapılır.Ortama bırakılan deney hayvanının çıktığı basamak sayısı kaydedilecektir.Anksiyolitik,vertikal düzlemde arka ekstremiteleri üzerinde yaptığı hareketlerin sayısını azaltan ilaçlar da sedatif etkili olarak kabul edilmiştir.



Resim 2. Merdiven Testi

2.4.3. Adımlama Testi

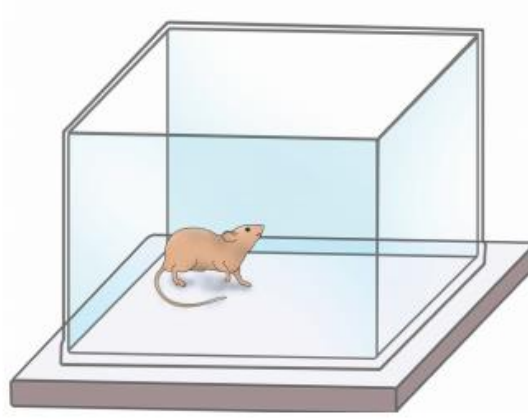
Bu test uzunluğu 1 metre olan tahta bir rampa üzerine deney hayvanı bırakılarak gerçekleştirilecektir. Testten önce 2 gün boyunca deney hayvanları rampadan yürüyerek kendi kafeslerine kendi başlarına girmeleri için eğitileceklerdir. Test günü hayvanların rampanın başından kendi kafeslerine ulaşana kadar geçen süre kayıt edilecektir.



Resim 3. Adımlama Testi

2.4.4. Açık Alan Testi

Deney hayvanının herhangi bir işlem öncesi duygusal durumunu ve işlem sonrasında meydana gelebilecek değişiklikleri saptamak için en çok kullanılan testlerden biridir. Hayvanın türüne göre farklı ebatlarda hazırlanan, tabanı çizgilerle bölmelere ayrılmış, etrafı duvarlarla çevrili, üstü açık pleksiglastan yapılmış bir kutudur. Açık ve geniş ortam kemirgenlerde sıkıntı yaratan bir durumdur. Test sırasında hayvanın açık alanda bırakılma süresi 2-20 dakika arasında değişmekle birlikte genellikle 5 dakikadır. Bu süre içerisinde hayvanın horizontal düzlemdeki hareketleri (bir kareden diğerine geçiş), vertikal düzlemdeki hareketleri (arka ekstremiteleri üzerinde yükselme), kaçınma davranışı ve defekasyon sayısı tespit edilecektir.



Resim 4. Açık Alan Testi

2.4.5. Silindir Testi

Bu test deney hayvanlarının dikilme aktivitelerini ölçmek için uygulanacaktır. Ölçüm için deney hayvanları şeffaf bir silindir içerisine konulacaktır. Tüm hayvanlar 5'er dakika boyunca izlenecektir. Silindir içerisine konulan hayvanlar, araştırma davranışı ile ön ayaklarını silindirin duvarına koymak suretiyle dikilme hareketi yapmaları beklenmektedir. Rotenon modelinde motor davranışlarda bilateral bir etkilenme olduğundan 5 dakika boyunca hayvanların dikilme sayıları kaydedilecektir.



Resim 5. Silindir Testi

2.4. Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)

VİP, 28 aminoasitten meydana gelen, yapısal olarak glukagon, sekretin, gastrik inhibitör peptit (GIP) ve büyüme hormonu-serbestleştiren hormon (GHRH) gibi gastrointestinal sistem peptit hormonları ailesinden olan bir peptittir (Harmar, 2012; Tatamoto & Mutt, 1981). İlk olarak 1970'li yıllarda Said ve Mutt tarafından domuz ince bağırsağından izole edilerek tanımlanmıştır (Said & Mutt, 1970; Said & Mutt, 1972; Tatamoto & Mutt, 1981). VİP, prepro-VİP prekürsör molekülünden sentezlenmektedir (Harmar, 2012). Nörohormon, nörotransmitter ve sitokin olarak birçok özellik göstermekte (Abad, Niewiadomski, Loh & Waschek, 2006; Dogrukol-Ak, Tore & Tunçel, 2004; Fahrenkrug, 1993; Said & Mutt, 1970; Said & Mutt, 1972; Said vd., 1995; Said, 2000) ve KBB'den rahatlıkla geçebilmektedir (Dogrukol-Ak, Banks, Tunçel & Tunçel 2003; Dogrukol-Ak vd., 2004). VİP'in VPAC1 (VİP1), VPAC2 (VİP2) ve PAC 1 olmak üzere üç çeşit reseptörü bulunmaktadır (Abad vd., 2006; Gomariz, Martinez, Abad, Leceta & Delgado, 2001; Harmar, 2012). VİP'in affinitesi VPAC1 ve VPAC2 reseptörüne bağlanma yönünde çok yüksektir. VPAC1 reseptörleri daha çok akciğer, ince bağırsak, timus, kalp, aort, karaciğer, pankreas, böbrekler, böbrek üstü bezleri, uterus ile beyinde serebral korteks, kaudat nükleus, putamen, dentate girus, anteroventral talamik nükleus ve supraoptik nükleusta bulunurken, VPAC2 reseptörleri iskelet kası, kalp, pankreas, plesanta ve beyinde bulunmaktadır (Brenneman & Douglas 2007; Dogrukol-Ak vd., 2004; Gozes, 2012; Harmar, 2012). Her üç tip reseptör de serpentin tipi olup G proteini ile çalışmakta, VPAC1/VPAC2 hücre içinde c-AMP konsantrasyonunu artırırken, PAC1 fosfolipaz C üzerinden hücre içinde IP3 ve DAG yollarını aktive etmektedir (Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd., 2012; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012).

VİP geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olup, dolaşım, solunum, gastrointestinal, endokrin ve immün sistem gibi çok geniş bir yelpazede fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesine katılmaktadır (Abad vd., 2003; Abad vd., 2006; Antonawich & Said, 2002; Brenneman, Phillips, Festoff & Gozes, 1997; Brenneman, 2007; Dogrukol-Ak vd., 2003; Dogrukol-Ak vd., 2004; Gozes & Brenneman, 1989; Harmar, 2012; Kalfin vd., 1994; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd., 2012; Said & Mutt, 1970; Said & Mutt, 1972; Said vd., 1995; Said, 2000; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 18 2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012). Beyinde özellikle serebral korteks,

hipokampus ve hipotalamustaki nöronlarda bulunmaktadır (Dogrukol-Ak vd., 2004; Harmar, 2012). VIP'in insan ve sıçan beyinde yüksek affinite gösterdiği bölgeler frontal korteks, temporal korteks, amigdala, serebellum, kaudat, SN, hipotalamus ve hipokampus olarak rapor edilmiştir (Dogrukol-Ak vd., 2004). VIP'in, nörotransmitter, nöromodülatör, nörotrofik, antienflamatuar, antioksidan ve antiapoptotik özellikleri ile beyindeki ana nöropeptit olduğu (Delgado & Ganea, 2003a; Delgado & Ganea, 2003b; Kalfin vd., 1994; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd., 2012; Offen vd., 2000; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012), SSS'nde astrosit mitozunu ve nöronal büyümeyi stimüle ettiği (Antonawich & Said, 2002; Kouki vd., 2007; Tunçel vd., 2012), nöronal canlılığı sağladığı ve glutamat eksitotoksitesine karşı hücre ölümünü engellediği bildirilmektedir (Dogrukol-Ak vd., 2004; Gressens, 1997; Said vd., 1995; Said., 2000). VIP doku ve hücre koruyucu özelliğe sahip bir moleküldür. Çeşitli çalışmalarla dokuları septik şok (Revhaug, Lygren, Jenssen, Giercksky & Burhol, 1988; Töre vd., 2002; Tunçel & Tore F, 1998; Tunçel vd., 2000), hemorajik şok (Tıkız, Tunçel, Akın & Gurer, 1992), Chron's hastalığı (Abad vd., 2003), iskemi reperfüzyonu (Kalfin vd., 1994; Tunçel vd., 1996a; Tunçel vd., 1996b) ve romatoid artrit (Juaranz, 2003; Juaranz, 2005) istenmeyen hasarlarına karşı koruduğu, nöronal yaşam süresini artırdığı (Tunçel vd., 2005) gösterilmiştir.

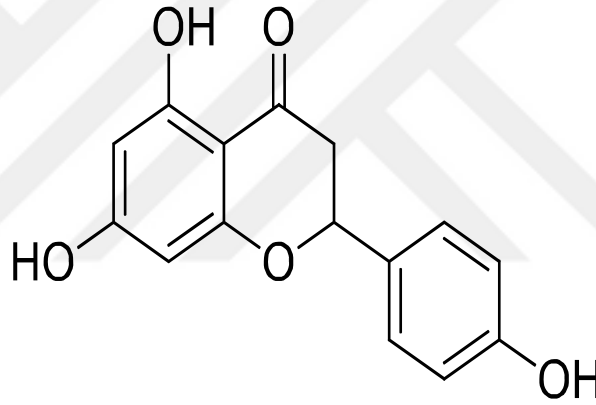
VIP'in beyinde meydana gelen travmatik durumlarda nöronların korunmasında ve gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Bassan vd., 1999; Brenneman vd., 1997; Delgado & Ganea, 2003b). Yapılan bazı çalışmalarda VIP'in, neonatal farelerde eksitotoksin kaynaklı beyaz madde lezyonlarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Brenneman vd., 2007; Gressens vd., 1997; Rangon vd., 2005). VIP astrositlerden, çok güçlü bir nöron koruyucu molekül olan ADNP'nin salıverilmesinde uyarıcı rol oynamaktadır (Bassan vd., 1999; Zamostiano vd. 2001; Zusev & Gozes, 2004).

Bu bulgular neticesinde VIP antienflamatuar, antiapoptotik, nörotrofik ve antioksidan özellikleri sebebiyle Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut verici bir molekül olarak görülmekte ve bu konuda yoğun araştırmalar devam etmektedir (Delgado & Ganea, 2003a; Harmar, 2012; Korkmaz vd., 2010; Korkmaz vd. 2012; Said, 2000; Song vd., 2012; Tunçel vd., 2005; Tunçel vd., 2012).

VIP, KBB'den geçebilen nörotrofik, nörotransmitter, nöromodülatör, antioksidan, antienflamatuar ve antiapoptotik özelliklere sahip bir nöropeptittir.

2.5. Naringenin (NGN)

Naringenin; greyfurtta bulunan bir flavonoid çeşidi olup flavanon sınıfına dahildir. Özellikle turunçgillerde ve domateste bulunan naringenin farklı kanser hücrelerinde antiproliferatif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Kolon kanseri, göğüs kanseri ve rahim kanseri bu kanser çeşitlerinden bazılarıdır. Naringenin, kimyasalların etkilerini önleyici özelliklere sahip olmasının yanı sıra, antitrombik, antiinflamatuvar, antiöstrojenik gibi çok sayıda farmakolojik etkilere sahiptir. Farelerin kullanıldığı in vivo çalışmalarda naringenin skopolamin kaynaklı olarak hafıza kaybını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarla naringenin, Alzheimer hastalığını önleyen yararlı bir kimyasal ajan olabileceği düşünülmektedir KBB’ni geçtiği ve dopamin seviyesini değiştirdiği görülmüştür.



Şekil 8. Naringenin kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1.Etik Kurul Kararı

Bu deneysel çalışma ve içeriğindeki deneysel müdahalelerde, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (ADÜ-HADYEK) 64583101/2019/054 sayılı ve 21.05.2019 tarihli kararı ile etik yönden sakınca bulunmadığı onaylandı (EK1).

3.1.2. Deney Hayvanları

Çalışmada Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında bulunan, ağırlıkları ortalama 300-350 gram olan, 12 haftalık, 48 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar deney boyunca 12 saat karanlık 12 saat aydınlık sirkadiyen ritimde, $22\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %40-60 bağıl nem oranında odalarda ve alt kısmı 425x265x180 mm boyutlarında şeffaf polikarbon malzemeden üretilmiş, üstlükleri ise paslanmaz çelikten olan kafeslerde bırakıldı. Deney süresi boyunca sıçanlar standart pellet yem ile ad libitum beslenmiş olup, içme suyu olarak serbest erişimli şehir şebeke suyu kullanıldı. Hayvanların oral beslenmesi, anal yoldan asetik asit veriminden ve sakrifiyeden 24 saat önce kesilerek, su tüketimlerine müdahalede edilmedi. Deney, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Biyokimya analizleri, Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarında çalışıldı. Biyokimya analizleri için doku homojenizasyonu sağlandı. Histopatolojik incelemeler, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

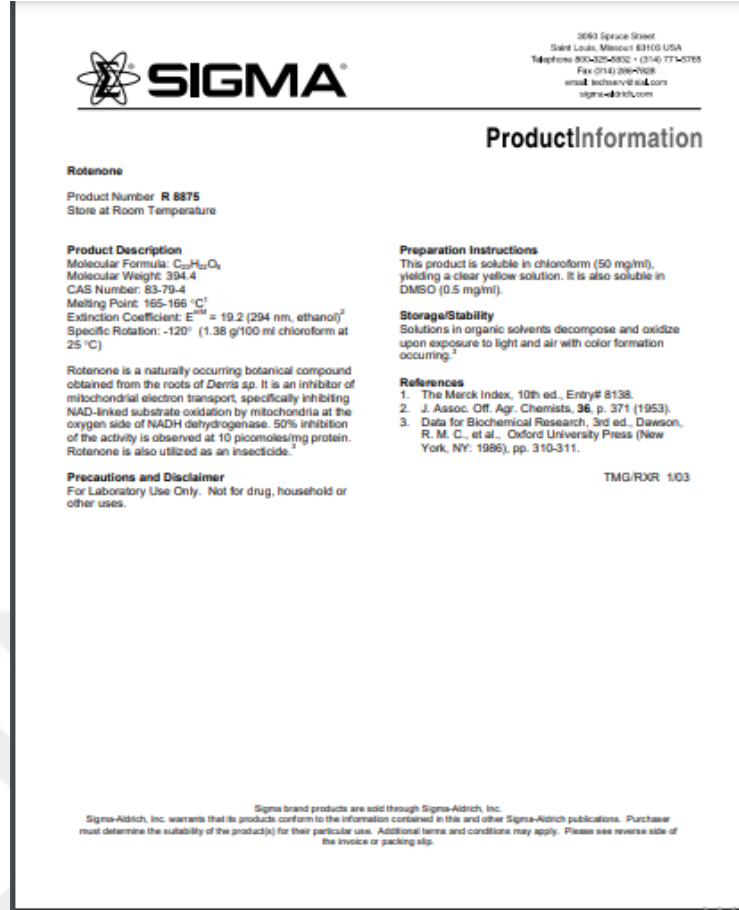
3.1.3. Rotenone Hazırlanışı

DeneySEL Parkinson hastalığını oluşturmak amacı ile 75 gün süresince düşük dozda Rotenone® uygulanan deney hayvanlarından rotenone grubunda bulunanlara i.p. olarak verildi ve süresinin sonunda (75. gün) deney hayvanları anestezi altında sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. DeneySEL prosedürün devam ettiği süre boyunca her hafta aynı gün, enjeksiyon ve i.p. uygulamasının sonlandırıldığı 75. gün ve deneyin sonlandırıldığı 75. gün hayvanlar tartılarak canlı ağırlıkları kaydedildi.

Rotenon çözeltisi ilk önce %100'lük bir 50x stok 8 rat için 500 ml DMSO ile hazırlandı ve dimetilsülfoksit (DMSO) ve orta zincirli trigliserit içinde seyreltildi ve 8 ml DMEM ile dilüe edildi. Totalde 500 ml ölçülerek 16 rata i.p. enjeksiyon yapılmak üzere hazırlandı. (Sasol North America, Inc., Houston, TX, ABD; bir final elde etmek için Warner Graham, Baltimore MD, ABD) tarafından hazırlanmıştır rotenon konsantrasyonu DMSO içinde hazırlandı. Çözeltinin vortekslenmesi, DMSO'nun kararlı bir emülsiyonunu oluşturması için rotenon içerir. Çözelti taze yapılarak taze yapıldı haftada her gün ve kehribar renkli septa flakonlardada saklandı. Her enjeksiyondan önce hafif ve birkaç kez ters çevrildi. Rat başına 1.25 mL/kg olarak insülin enjektörü ile i.p.olarak uygulandı. Uygulamanın ardındaki ilk 30 dk içinde ratların bazılarında seyreden bazı fiziksel değişiklikler gözlemlendi. Ratların duruş bozukluğu ve nefes alış verişindeki azalma sonrasında hareketsiz yatar pozisyonda kalması ile mortalite gerçekleşti. İkinci 45.dk girildiğinde diğer gruplarda da bu ve benzeri durumlarla karşılaşmış olup totalde n=48 ile başlayan ratların sayısı n=36 olarak gerçekleşti.

Enjeksiyon uygulamasına ara vermeden devam edilerek diğer ratların yaşamsal fonksiyonlarında bir değişiklik gözlenmeyene kadar 1.25 ml/kg rotenone uygulamasına i.p. olarak onay verildi. Sonraki 25 gün sonunda mortalite sayısında bariz artmalar görülünce doz değişikliğine gidilerek yeni ölçümler ve ayarlamalar yapıldı.

DMSO (%100'lük 14 stok) hazırlanarak diğer çözelti basamakları aynı kalacak şekilde rat başına enjeksiyonun yarısı verilerek (2 hayvana 1 enjeksiyon) ilaç verme uygulamalarına devam edildi. Deney sürecinin ortalarına gelindiğinde Rotenone grubunda bir değişiklik gözlenmediği için doz değişikliğine girilmeden uygulama sürdürüldü. Sakrifiye gününden 2 hafta önce bakılarak ratların fiziksel ve locomotor değişikliklerinde bariz farklılık olmadığı tespit edilerek ilaç uygulaması motor aktivite testlerinin başlamasının 0. gününde sonlandırıldı.



Şekil 9. Rotenone ürün bilgisi

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında, Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'nda, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan aşağıda sıralanan cihazlar kullanıldı.

- Santrifüj (Hettich Zentrifügen Mikro 200R, San Bio Medikal, İngiltere)
- Santrifüj (Hettich Zentrifügen Rotina 420, Almanya)
- Vorteks (Labnet International Inc. Edison NJ, ABD)
- Ultra saf su cihazı (SS 200 Şimşek Lab. Ankara)
- Hassas terazi (SARTORIUS AG BP 610, Almanya)

- Derin dondurucu (-80°C) (SANYO MDF U5186S, Japonya)
- Mikroplate okuyucu (ELx 800, BioTek Instruments Inc, ABD)
- İnkübasyon cihazı (Microtec. Type Ak120, Infors Ag, İsviçre)
- Homojenizasyon cihazı (Ultra-Turrax T8 IKA-Werke SİGMA, Almanya)
- Otomatik Plate yıkayıcı (Plate Washer DAS)
- pH metre (Hanna H1221)
- Kaynamış su banyosu (Leica)
- Otomatik pipetler (Ependorf)
- Olympus BX20 Mikroskop
- Etüv (Nüve, EN055)
- Mikrotom (Leica RM 2135)
- Buzdolabı (İndesit)
- Doku takip cihazı (Leica)
- Parafin cihazı (Leica)

3.1.5. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Asetik asit
- Eter
- NaCl (sodyum klorür) (Merck, 6400, Almanya)
- DMSO (Sigma, Almanya)
- Fosfat tamponu (PBS phosphate buffer saline; 50 mM pH 7,4)
- Etanol absolute (Sigma, 32221)
- Ksilen (Ksilen (İzomerleri Karışımı) Extra pure, Tekkim, Catolog # TK.090270.01000)
- Parafin (Parafin Boncuk 56-58°C, Tekkim, Catolog # TK.200661.05004)

- Lam-lamel (Isotherm)
- Doku takip kaseti
- Mikrotom Bıçağı
- Formaldehit (Formaldehyde Solution Min. 37% Stabilized With About 10% Methanol, Merck, Catalog # 1.040.022.500)
- Hematoksilen (Haematoxyclin Mayer's, Bio-optica, Catalog # 05-06002/L, İtalya)
- Eozin (Eosin Aqueous, Bio-optica, Catalog # 05-10002/L, İtalya)
- Entellan (Entellan new rapid mounting medium for microscopy, Merck, Catalog # M107961.0500)
- Numune kabı (Fıratpen, Türkiye)
- Kan tüpü
- Eppendorf (Isolab)
- İnsülin enjektörü (Beybi, Türkiye)
- 10 ml yeşil uçlu enjektör (Beybi, Türkiye)
- 1000, 200, 20 mikrolitrelik mikropipet ucu
- Eldiven (Beybi, Türkiye)
- Rotenone (Ceneviz Gıda, India)
- Vasoactive İntestinal Peptide human, porcine, rat 1 MG (Sigma Aldrich Cat P002609, ABD)
- GSK-3 Beta kiti (Rat GSK-3 Beta ELISA kit, FineTest, Catalog #ER1113Ra, China)
- Alfa-SYNC kiti (Rat Alfa-SYNC ELISA kit, Bioassay Technology Laboratory, Catalog #E0111Ra, China)
- Dopamin kiti (Rat DOP ELISA kit, Bioassay Technology Laboratory, Catalog #E0135Ra, China)
- 8-OHdG kiti (Rat 8-OHDG ELISA kit, Fine Test Technology Laboratory, Catalog #E05421Ra, China)
- Sıçan yemi (Bil-Yem Gıda San. ve Tic. Ltd Şti. Standart rat yemi, Ankara)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Tasarımı

3.2.1.1. Deneysel Parkinson Modeli Oluşturma ve VIP ve Naringenin Uygulaması

Parkinson modeli oluşturulacak ratlar için yem, su tüketimi serbest bırakılarak enjektörle, 1.25 ml/kg rotenone olacak şekilde 2 rat'a yarım enjektör verildi. Rotenone uygulaması ile birlikte Parkinson modeli oluşturulduktan 1 saat sonra başlamak üzere SF içerisinde hazırlanmış olan VIP, 25 ng/kg olacak şekilde i.p. olarak uygulandı. VIP tedavisi 14 gün süreyle iki günde bir devam ettirildi. (Yelkenli İbrahim, 2014). Naringenin ise rotenone uygulamasının ardından tekrarlayan gün 10 mg/kg olarak saf halde uygulandı. (Kumar, 2013).

3.2.2. Deney grupları

Deney hayvanları her grupta 12 rat olmak üzere rastgele seçilerek 4 grup oluşturuldu. Gruplar Rotenone grubu (RT), Rotenone+Vasointestinal Peptid Grubu (RT+VIP), Rotenone+Naringenin Grubu (RT+NG) olmak üzere 4'e ayrıldı.

3.2.2.1.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki ratlar, Rotenone grubuyla aynı şartlara maruz bırakıldı ve bir işlem uygulanmadı. Deney süresinin tamamlanmasının son gününden sonraki 24 saat önce aç bırakılan ve 5 mg/kg ksilazin ve 100 mg/kg ketamin anestezisi uygulanan ratlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilip beyin doku örnekleri alındı.

3.2.2.1.2. Rotenone Grubu

Rotenon çözeltisi ilk önce %100'lük bir 50x stok 8 hayvan için 500 ml DMSO ile hazırlandı ve dimetilsülfoksit (DMSO) ve orta zincirli trigliserit içinde seyreltildi ve 8 ml DMEM ile dilüe edildi. Totalde 500 ml ölçülerek 16 hayvana i.p. enjeksiyon yapılmak üzere hazırlandı. (Sasol North America, Inc., Houston, TX, ABD; bir final elde etmek için Warner Graham, Baltimore MD, ABD) tarafından hazırlanmıştır rotenon konsantrasyonu DMSO içinde hazırlandı. Çözeltinin vortekslenmesi, DMSO'nun kararlı bir emülsiyonunu oluşturması için rotenon içeren çözelti taze yapılarak haftada her gün ve kehribar renkli septa flakonlarda saklandı. Her enjeksiyondan önce hafif ve birkaç kez ters çevrildi ve oda sıcaklığına gelene kadar beklenildi. Rat başına 1.25 mL/kg olarak insülin enjektörü ile i.p.olarak uygulandı. DMSO (%100'lük 14 stok) hazırlanarak diğer çözelti basamakları aynı kalacak şekilde rat başına enjeksiyonun yarısı verilerek (2 rata 1 enjeksiyon) i.p. olarak ilaç verme uygulamalarına devam edildi.

3.2.2.1.3. RT+VIP Grubu

Bu grup, Parkinson modeli oluşturulduktan sonra VIP tedavisine alınmış olan gruptur. Parkinson modeli oluşturulduktan 1 saat sonra başlamak üzere SF içerisinde hazırlanmış olan VIP, 25 ng/kg olacak şekilde i.p. olarak uygulanmıştır. VIP tedavisi 14 gün süreyle iki günde bir devam edildi.

3.2.2.1.4. RT+NG Grubu

Bu grup, Parkinson modeli oluşturulduktan sonra Naringenin ise rotenone uygulamasının ardından tekrarlayan gün 10 mg/kg olarak saf halde i.p. olarak verildi. (Kumar, 2013)

3.2.3. Motor Testler

Deney hayvanlarının motor hareketlerinin analizi kafa daldırma süresi ve sıklığı, şahlanma veya yetiştirme hareketi, merkeze ziyaret sayısı veya süresi, süslenme hareketi, delik sayısı hayvanın genel lokomotor aktivitesinden bağımsız olarak neofilin ölçüsü olarak, özellikle düşük sayıda kafa daldırma hareketinin ratlarda yüksek anksiyete durumunu yansıttığı kabul edildi. Kognitif fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacı ile yapılan hole and board testi deneysel Parkinson hastalığının oluşturulmasının tayini ve rotenone etkenliğinin tahlili amaçlı enjeksiyon gününün sonunda bakıldı.

3.2.1.1. Hole and Board Testi

Delikli tahta aparatı, 68 cm x 68 cm ölçülerinde, ahşap, gri bir kutudan oluşan ve etrafı 40 cm yüksekliğinde ön tarafı açık diğer üç taraf kapalı olacak şekilde ve delik çapı (deney hayvanının büyüklüğüne göre değişebiliyor) 9 cm, 16 delikli ve kutu ahşap bir ayak üzerinde yerden 28 cm yükseltildi. Deney hayvanının önce ortama alıştırılması sağlanmak amacıyla 3 kez farklı zamanlarda düzeneğe koyuldu. Alışma süresinin tamamlanması ile deney düzeneğini tam görebilen sabit video kamera ile 5 dk çekim yapıldı (her rat için). Deney hayvanları düzeneğin üzerinde gezinme ve keşif hareketlerini gerçekleştirdi (Resim 1).



Resim 6. Hole and board Test düzeneği

Hole and Board Testinde kullanılan parametreler;

- (i) merkeze ziyaret veya keşif (MZ): hayvan açık alanın bir alanından diğerine hareket eder (dört pençenin tümü yeni bir alanın zeminine yerleştirilmelidir)

- (ii) baş eğme veya kafa daldırma(KD): hayvan, kulakları cihazın zemini ile aynı hizada olacak şekilde minimum derinliğe kadar başını deliklerden birine yerleştirir (hayvan başını kaldırdığında yeni bir baş eğme nöbeti kaydedilmiştir) devam etmeden önce delikten tamamen dışarı çıkarınca tam bir hareket sağlanır.)

- (iii) şahlanma veya arka veya yetiştirme(Ş): hayvan, sırt patileri üzerinde sabittir ve ön patilerini yerden kaldırır, vücudunu dikey olarak uzatır.

- (iv) delik sayısı veya ziyaret(DS):hayvan deliklerden birine kafa daldırma hareketi yapmadan başını uzatır ve çeker.

- (v)süslenme veya hareket(S):elleriyle başını arasına alarak yalama benzeri bir hareket sergiler.

Uygulamanın ilk gününde enjeksiyonun bitiminin 60. gününde deney hayvanları 5 parametre açısından düzenekte tutuldu. Bu parametreler; Kafa Daldırma Hareketi (KDH) , Delik Sayısı (DS) , Merkeze Ziyaret (MZ) , Şahlanma (Ş) , Süslenme (S) olarak belirlendi.

3.2.4. Analiz Yöntemleri

Hazırlanan deney gruplarındaki ratlarda gerçekleştirilecek deneysel modelin ve tedavi edici ve koruyucu ajanın uygulanması sonucunda bulguların elde edilebilmesi için ağırlık ölçümü, makroskobik görünüm inceleme, biyokimyasal analizler, histopatolojik analiz ve motor test analizleri gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Ağırlık Ölçümü

12 haftalık ratların ortalama ağırlıkları 346 gr olarak belirtildi. Sakrifiye günü ratlar tek tek digital tartıda tartılıp ağırlıkları not edildi. Elde edilen sonuçlar Kontrol grubu rat ağırlıklarıyla kıyaslanarak bulgular kısmında, değişim yüzdelere ait veriler Tablo 'de sunuldu.

3.2.4.2. Makroskopik görünüm inceleme

Gruplardaki ratlar sakrifiye edildikten hemen sonra, biyokimyasal ve histolojik inceleme gerçekleştirmek adına beyin dokusu alınıp ayrılmadan önce makroskopik inceleme yapabilmek için fotoğrafları çekildi, fotoğraflara bulgular kısmında yer verildi.

3.2.4.3. Biyokimyasal Analiz

Altmış günlük enjeksiyon uygulamasını takiben oluşturulan patolojinin stabilizasyonunun sağlanması amacıyla 2 hafta süre ile hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. Enjeksiyon uygulamasını takiben ve iki hafta sonrasında gerçekleştirilen motor testler tamamlandıktan sonra deney hayvanları 5 mg/kg ksilazin (Alfazyne®, Ege-Vet, İzmir, Türkiye) ve 100 mg/kg ketamin (Ketalar®, Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında sakrifiye edildiler. Sakrifiye edilen ratların kraniyumu hızlıca açılarak beyin ve beyincik bütün halde çıkarıldı (Resim 2). Keskin bir bistüri ucu kullanılarak koronal planda beyin ve beyincik birbirinden ayrıldı. Fissura longitudinalis cerebri'den sağ ve sol iki hemisfere 82 ayrılan beynin sağ hemisferi ve beyincik % 10'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Sol beyin hemisferinden enzim bağlı immunosorbent deney yöntemi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) ile dopamin, alfa-sync, gsk-3beta ve 8-OHdG tayini için ve Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH) ve malondialdehit (MDA) aktiviteleri süpernatantda spektrofotometrik olarak tayini için striatum izole edildi (Heffner ve ark, 1980; Spijker, 2011). Eppendorf tüplere alınan striatum örnekleri ELISA yöntemi ile belirtilen analizler gerçekleştirilene kadar -22°C'de saklandı.

3.2.4.3.1. Protein Analizi

Prensip: Önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyon oluşturuldu. Daha sonra fosfomolibdik-fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgendi. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılı hale getirildi.

Gerekli Çözeltiler:

□ **A çözeltisi:** Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g, 0.1 N NaOH'teki); 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0.1 N NaOH çözeltisinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye 0.1 N NaOH çözeltisi ile tamamlandı.

□ **Bakır sülfat çözeltisi (% 1 g):** 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

□ **Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (% 2 g):** 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

□ **B çözeltisi:** % 1 g'lık Bakır sülfat çözeltisi ile % 2 g'lık Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanıldı (taze hazırlanır).

□ **C çözeltisi:** 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanıldı (taze hazırlandı).

□ **Folin çözeltisi:** 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat x 2H₂O, 50 ml % 85 g'lık fosforik asit, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılarak soğutuldu. Üzerine 150 g Li₂SO₄ ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatıldı. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katıldı. (Çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve kullanıldı. Koyu renkli şişede (uzun süre dayanması sağlandı) sakladı.

□ **Serum fizyolojik (% 0.9 g NaCl):** 0.9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

□ **Protein stok standart çözeltisi (% 100 mg'lık albumin çözeltisi):** 100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlandı.

□ **Protein çalışma standart çözeltileri:** Stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak % 5, 15, 25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: 5 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenerek çalışıldı.

Tablo 2. Protein Analiz için Çalışma Tablosu

	Numune	St1 %5 mg Albumin	St2 %10 mg Albumin	St3 %15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (%100 mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku süpernatantı / Periton Sıvısı	10 µl	-	-	-	-
Serum Fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0.5 ml
Toplam hacim	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Vortekste karıştırılır.					
Folin Ayırıcı	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vorteksle iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.					
Folin Ayırıcı	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

Çalışma protokolü; Vortekste iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. 30 dk sonunda 500 nm’de köre karşı absorbanslar kaydedildi. Standart grafiği çizildi. Doku için protein miktarı ‘mg Protein/ g nemli doku’ ve periton sıvısı için ‘% mg protein’ cinsinden hesaplandı.

3.2.4.3.2. MDA Analizi

Prensip: LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Gerekli Çözeltiler:

□ **TBA çözeltisi (0.047 M):** 500 mg TBA ile 6 ml 1 M'lık NaOH ile karıştırıldı.

Üzerine 69 ml distile su ilave edildi.

□ **NaOH (1 M):** 4 g NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

□ **Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M, 0.6 M HCl deki):** 20 ml TCA (% 100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g'lık, d=1.19 g/ dl'lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

□ **n-butanol:** Direkt olarak orijinal şişesinden kullanıldı.

Deneyin Yapılışı: 2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlendi ve çalışıldı. (Tablo 3)

Tablo 3. MDA Analizi için Çalışma Tablosu

	Numune	Kör
Doku süpernatantı	0.25 ml	-
Distile su	-	0.25 ml
TCA	1.25 ml	1.25 ml
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0.75 ml	0.75 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-butanol	2 ml	2 ml

Çalışma protokolü; Vortekslendi ve 10 dk 4000 rpm'de santrifüj edildi. Butanol fazı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbanlar kaydedildi. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı (1.56.105 M-1cm-1) kullanılarak doku için "nmol MDA/ mg protein" ve periton sıvısı için "nmol MDA/ ml" cinsinden sonuçlar hesaplandı.

3.2.4.3.3. SOD Analizi

Prensip: SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçüldü. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu

süperoksit radikali, ortamdaki SOD'ın etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüştürüldü. H₂O₂ ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturdu. SOD aktivitesinin oranına göre renkli ürün oluşumu yüksek olarak gerçekleşti. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Gerekli Çözeltiler:

□ **Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7.8):** 0.136 g KH₂PO₄ ve 0.697 g K₂HPO₄ tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözöldü, birleştirildi ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol

edildi, pH 7.8'e ayarlandı) (2°C' de saklandı).

□ **Fosfat tamponu + 0.1 mM'lık Na-EDTA:** 0.0037 g Na-EDTA tartılır biraz 50 mM'lık fosfat tamponunda çözölməsi sağılandı ve hacmi 50 mM'lık fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.

□ **Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7.5):** 0.041 g KH₂PO₄ ve 0.122 g K₂HPO₄ tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözölür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edildi, pH 7.5'a ayarlandı) (2°C' de saklandı).

□ **Riboflavin (0.2 mM):** 7.5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10mM'lık, pH=7.5) çözöldü.

□ **o- dianisin (6 mM):** 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözöldü.

□ **SOD (120 IU/ml) stok standardı (Sigma S-2515-3000 U):** Liyofilize SOD standardı 120 IU/ml olacak şekilde soğıuk distile su ile çözöldü. Daha sonra bu stok standartdan uygun hacimler alınarak deney ortamında 3, 6, 9, 12 ünite SOD olması sağılandı.

Deneyin Yapılışı: Doku süpernatantı veya periton sıvısı alınır, gerekirse serum fizyolojik ile seyreltilir. Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alındı.

Tablo 4. SOD Analizi için Çalışma Tablosu

	Numune	St 3U	St 6U	St 9U	St 12 U	Kör
Fosfat Tamponu	2.6 ml	2.6 ml	2.6 ml	2.6 ml	2.6 ml	2.6 ml
o-dianisidin	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Distile su	-	0.075 ml	0.05 ml	0.025 ml	-	0.1 ml
Stok standart (120 U/ml)	-	0.025 ml	0.05 ml	0.075 ml	0.1 ml	-
Doku süpernatantı	0.1 ml	-	-	-	-	-
Her tüpe 30 sn ara ile 0.2 ml riboflavin konur,karıştırılır.460 nm’de abs okunur.						
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edilir460 nm’de abs okunur.						

Not: Lamba 20 dk önceden açıldı ve ısınması sağlandı. Standart grafiği yardımıyla yapılan seyreltmelerde göz önüne alınarak SOD aktivitesi doku süpernatantı için ‘‘U/mg protein dk’’ ve periton sıvısı için ‘‘U/ml dk’’ cinsinden hesaplandı.

3.2.4.3.4. GSH Analizi

Prensip: Ellman ayırıcı, 5-5’ ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Gerekli Çözeltiler:

- ☐ **Sodyum sitrat çözeltisi (% 1 g):** 1 g sodyum sitrat tartılır, biraz distile suda çözülerek hacmi distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.
- ☐ **Ellman ayırıcı (% 40 mg DTNB):** 40 mg DTNB (5-5’ ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (% 1 g) çözüldü. Hacmi % 1 g’lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml’ye tamamlandı.
- ☐ **Proteinsizleştirme çözeltisi:** 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), 30 g sodyum klorür ayrı ayrı biraz distile suda çözüldü. Hepsi birleştirilir ve hacmi 100 ml’ye distile su ile tamamlandı.
- ☐ **Disodyum fosfat çözeltisi (0.3 M) :** 4.26 g Na₂HPO₄ veya (5.34 g Na₂HPO₄ x 2H₂O) biraz distile suda çözüldü. ve hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlandı

Deneyin Yapılışı: Bir deney tüpüne 0.2 ml doku süpernatantı veya periton sıvısı

konur. Vorteks ile karıştırıldı. Üzerine 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edildi. Vorteksle karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilir. Çökelti atıldı. Süpernatant alındı. İki tane deney tüpü alınır. Numune ve kör olarak işaretlenerek çalışıldı.

Tablo 5. GSH Analizi için Çalışma Tablosu

	Numune	Kör
Distile su	-	0.2 ml
Süpernatant	0.2 ml	-
Na ₂ HPO ₄	0.8 ml	0.8 ml
Ellman ayıracı	0.1 ml	0.1 ml

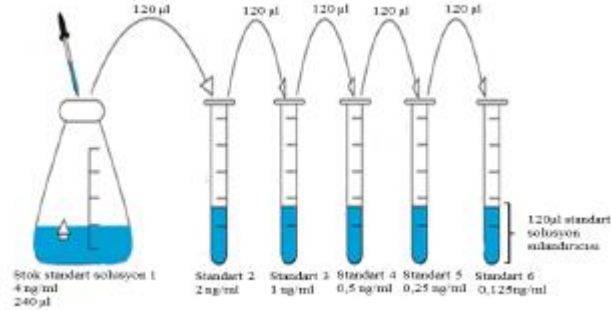
Çalışma protokolü; Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Köre karşı 412 nm’de absorbanlar kaydedildi. Sonuçlar seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm’de ekstinksiyon katsayısı (13600/m-1 cm-1) kullanılarak doku için ‘‘mg GSH/ mg protein’’ ve periton sıvısı için ‘‘% mg GSH’’ cinsinden hesaplanır.

3.2.4.3.5. Striatumdan ELISA yöntemi ile Dopamin Tayini

Deneyin sonlandırılması aşamasında eppendorf tüplere alınmış olan corpus striatum örneklerinin ağırlıkları hassas terazide tartılarak kaydedildi. Her bir tüpe corpus striatum ağırlığına oranla 1/10 oranında olacak şekilde 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, %0,1 GDS ve %1 Triton-X içeren doku tamponu eklendi. Homojenizasyonun etkili şekilde sağlanması amacı ile her bir tüpe 3-5 adet metal bilye eklendi ve örnekler 3 dakika süresince Bullet Blender Homogenizer (Next Advance, New York, ABD) cihazında homojenize edildi. Homojenatlar 1400 g’de santrifüje edilerek alınan supernatantlar ELISA analizi için kullanıldı.

ELISA ile dopamin tayininde kullanılan kit (Rat Dopamine ELISA kit, Katalog no:E111Ra, Bioassay Technology Laboratory, Birmingham, İngiltere) içerisinde yer alan 8 ng/ml derişimindeki standart solüsyonu ve standart solüsyon sulandırıcısı 120’şer µl oranında karıştırılarak 4 ng/ml derişiminde stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonundan alınan 120 µl örnek tekrar 120 µl standart solüsyon sulandırıcısı ile sulandırılarak 2 ng/ml derişiminde,

2 ng/ml’lik solüsyondan alınan 120 µl tekrar 120 µl standart solüsyon sulandırıcısı ile sulandırılarak 1 ng/ml derişiminde standart solüsyon elde edildi. Şekil 12’de görüldüğü gibi bu işleme 0,125 ng/ml derişiminde standart solüsyon elde edilene dek devam edildi.



Şekil 10. ELISA analizinde standart solüsyonların dilüsyonu.

ELISA tabletinde A satırında bulunan 12 adet kuyucuğa düşük derişimden yüksek derişime doğru iki sıra halinde 50 µl standart solüsyonları eklendi. Örnek kuyucuklarına her bir deneğin corpus striatum örneklerinin homojenizasyonu ve santrifüjü ile elde edilen 40 µl supernatant ve ardından 10 µl dopamin antikoru eklendi. Ardından standart ve örnek kuyucuklarının tümüne 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenen ELISA tableti üstü kapatılarak Microtec Shaker Plate (Infors HT, İsviçre) cihazında 37°C’de 60 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda kuyucuklarda yer alan içerik dökülerek 5 kez ELISA yıkama tamponu (ThermoFischer Scientific) ile yıkandı. Her kuyucuğa kit içerisinde yer alan substrat A ve substrat B 50’şer µl eklendikten sonra tablet karanlık ortamda, üstü kapalı halde, 37°C’de 10 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda her kuyucuğa kit içerisinde yer alan stop solüsyonu 50 µl hacimde eklendi ve tablet ELISA Reader (Diagnostic Automation Inc., Model: DAR800, Kaliforniya, ABD) cihazında 450 nanometre dalga boyunda okutuldu.

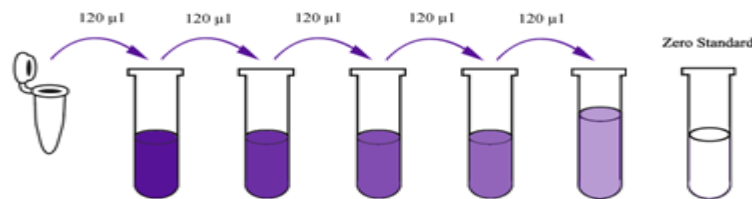
3.2.4.3.6. Rat Alpha-Synuclein ELISA Kit

Serumun oda sıcaklığında 10-20 dakika pıhtılaşmasını sağlandı. 2000-3000 RPM’de 20 dakika santrifüjledik ve tortu olmadan süpernatantı toplandı. Plazma Antikoagülan olarak EDTA veya heparin kullanarak plazmayı toplandı 10-20 dakika karıştırdıktan sonra, numuneleri 2000-3000 RPM’de 20 dakika santrifüjleyip tortu olmadan süpernatantı toplandı.

.Hücre kültürü süpernatantı Steril tüplerle toplandı. Salgı bileşenlerini tespit ederken, 2000-3000 RPM'de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatantları toplandı. Hücredeki bileşenleri tespit ederken, hücre süspansiyonunu seyreltmek için PBS (pH 7.2-7.4) kullanıldı, hücre konsantrasyonu yaklaşık 1 milyon/ml'dir. İçerideki bileşenleri dışarı atmak için tekrarlanan donma-çözülme döngüleri yoluyla hücrelere zarar verebilir. 2000-3000 RPM'de 20 dakika santrifüjleyip tortu olmadan süpernatantı toplandı.

Doku fazla kanını iyice uzaklaştırmak ve homojenizasyondan önce tartmak için dokular buz gibi PBS (pH 7.4) içinde durulandı. Dokuları kıyın ve buz üzerinde bir cam homojenleştirici ile PBS (doku ağırlığı (g): PBS (mL) hacmi=1:9) içinde homojenleştirdik. Hücreleri daha da parçalamak için, süspansiyonu ultrasonik hücre bozucu ile sonikasyona tabi tutabilir veya donma-çözülme döngülerine tabi tuttuk. Homojenatlar daha sonra süpernatantı elde etmek için 5000xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi. Standart 64ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120µl standart (128ng/ml) 120µl standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standardın hafif çalkalama ile 15 dakika beklenildi. 32ng/ml, 16ng/ml, 8ng/ml ve 4ng/ml solüsyonları üretmek için standart stok solüsyonunu (64ng/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek çift standart noktaları hazırlandı. Standart seyreltici sıfır standart (0 ng/ml) görevi görür. Kalan solüsyon -20°C'de dondurulmalı ve bir ay içinde kullanılmalıdır.

64ng/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
32ng/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
16ng/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
8ng/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
4ng/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent



Standard Concentration	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
128ng/ml	64ng/ml	32ng/ml	16ng/ml	8ng/ml	4ng/ml

Resim 7. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi (alfa-sync)

Yıkama Tamponu 500 ml 1x Yıkama Tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25 kat deiyonize veya damıtılmış su ile seyreltilerek, konsantrede kristaller oluşmuşsa, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

1. Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve numuneleri talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. Tahlil oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2. Test için gereken strip sayısını belirlendi. Şeritleri kullanım için çerçevelere yerleştirildi. Kullanılmayan stripler 2-8°C'de saklandı.

3. Standart kuyuya 50µl standart eklendi. Not: Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmedi.

4. Numune kuyularına 40µl numune ekleyin ve ardından numune kuyularına 10µl anti-SNCA antikor ekledi, ardından numune kuyularına ve standart kuyulara 50µl streptavidin-HRP eklendi (Kör kontrol kuyusu değil). İyice karıştırıldı. Plakayı bir kapatıcı ile örttük. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

5. Kapatıcıyı çıkarıp ve plakayı yıkama tamponu ile 5 kez yıkayın. Kuyuları en az 0,35 ml yıkama tamponu ile 30 saniye ila 1 dakika arasında her yıkama için ıslatıldı. Otomatik yıkama için, her kuyuyu aspire edip veya boşaltıp ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkadık. Plakayı kağıt havlu veya diğer emici malzeme üzerine kurulandı.

6. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A ekleyip ve ardından her kuyuya 50µl substrat solüsyonu B ekledik. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plak inkübe edildi.

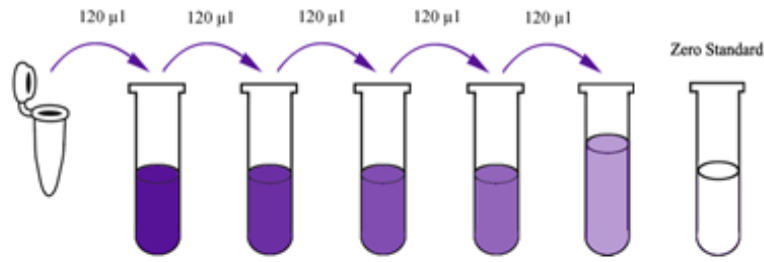
7. Her kuyucuğa 50µl Durdurma Solüsyonu ekleyip, mavi renk hemen sarıya dönmesini bekledi.

8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak hemen her kuyunun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi.

3.2.4.3.7. Rat Glycogen synthase kinase-3 beta ELISA Kit

Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Standart 20ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120µl standardı (40ng/ml) 120µl standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standardın hafif çalkalama ile 15 dakika oturmasına izin verildi. 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml ve 1.25ng/ml çözeltiler üretmek için standart stok solüsyonunu (20ng/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek çift standart noktalar hazırlandı. Standart seyreltici sıfır standart (0 ng/ml) görevi görür.

20ng/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
10ng/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
5ng/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
2.5ng/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
1.25ng/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent



Standard Concentration	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
40ng/ml	20ng/ml	10ng/ml	5ng/ml	2.5ng/ml	1.25ng/ml

Resim 8. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi (GSK-3 beta)

Kalan solüsyon -20°C'de dondurulmalı ve bir ay içinde kullanılmalıdır. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi yukarıdaki gibidir:

500 ml 1x Yıkama Tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25x deiyonize veya damıtılmış su ile seyrelttik. Konsantrede kristaller oluşmuşsa, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

1. Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve numuneleri talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. Tahlil oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2. Test için gereken strip sayısını belirlendi. Şeritleri kullanım için çerçevelere yerleştirildi. Kullanılmayan stripler 2-8°C'de saklandı.

3. Standart kuyuya 50µl standart eklendi. Not: Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmedi.

4. Numune kuyularına 40µl numune ekleyip ve ardından numune kuyularına 10µl anti-Gsk3b antikor ekleyip, ardından numune kuyularına ve standart kuyulara 50µl streptavidin-HRP ekleyip (Kör kontrol kuyusu değil) iyice karıştırıldı. Plakayı bir kapatıcı ile örtüldü. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

5. Kapatıcıyı çıkarıp ve plakayı yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Kuyuları en az 0,35 ml yıkama tamponu ile 30 saniye ila 1 dakika arasında her yıkama için ıslatıldı. Otomatik yıkama için, her kuyuyu aspire edin veya boşaltılıp ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Plakayı kağıt havlu veya diğer emici malzeme üzerine kurulandı.

6. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A ekleyip ve ardından her kuyuya 50µl substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plak inkübe edildi.

7. Her kuyucuğa 50µl Durdurma Solüsyonu eklendi ve mavi renk hemen sarıya döndü.

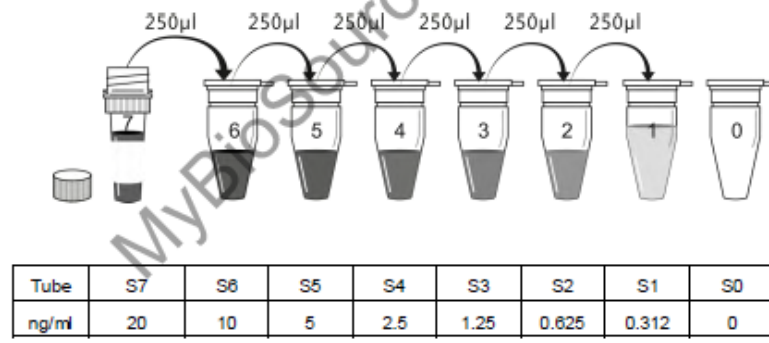
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak hemen her kuyunun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi.

3.2.4.3.8. Rat 8-OHdG ELISA Kit

Doku Homojenatları 100 mg doku, 1X PBS ile durulandı, 1 ml 1X PBS içinde homojenleştirildi ve gece boyunca -20°C'de saklandı. Hücre zarlarını kırmak için iki donma-çözülme döngüsü gerçekleştirildikten sonra homojenatlar 5 dakika boyunca 5000 x g, 2 - 8°C'de santrifüjlendi. Süpernat çıkarıldı ve hemen test edildi. Alternatif olarak, numuneleri -20°C veya -80°C'de bölün ve saklandı. Testten önce çözöldükten sonra numuneyi tekrar santrifüjlendi. Tekrarlanan donma-çözülme döngüleri oluşması engellendi.

Standart şişeyi 6000-10000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Standardı 1.0 ml Sample Diluent Diluent ile sulandırıldı. Diğer seyrelticileri değiştirilmedi. Bu sulandırma, 20

ng/ml'lik bir stok solüsyonu üretildi. Tam sulandırmayı sağlamak için standardı karıştırıp ve seyreltme yapmadan önce standardın hafifçe çalkalayarak minimum 15 dakika beklemesine izin verildi. Her tüpe (S0-S6) 250 µl Sample Diluent pipetleyip, 2 kat seyreltme serisi oluşturmak için stok solüsyonunu kullanıldı. Bir sonraki transferden önce her tüpü iyice karıştırıldı. Seyreltilmemiş Standart, yüksek standart (20 ng/ml) görevi görürken, Sample Diluent, sıfır standart (0 ng/ml) olarak gerçekleştirildi.



Resim 9. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi (8-OHdG)

1. Tüm reaktifleri, çalışma standartlarını ve numuneleri önceki bölümlerde belirtildiği gibi hazırlandı.
2. Kullanılacak kuyu sayısını belirlemek ve kalan kuyuları ve kurutucuyu poşete geri koymak ve ziploc'u kapatmak için Test Düzen Sayfasına bakıp, kullanılmayan kuyuları 4°C'de saklandı.
3. Kuyucuk başına 100µl standart ve numune eklendi. Sağlanan yapışkan şeritle örtüldü. 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Test edilen standartları ve numuneleri kaydetmek için bir plaka düzeni sağlandı.
4. Her kuyucuktan sıvıyı çıkarıldı ancak yıkanmadı.
5. Her bir kuyucuğa 100µl BiotinBiotin-antibody (1x) eklendi. Yeni bir yapışkan şeritle örtüldü. 37°C'de 1 saat inkübe edildi. (BiotinBiotin-antikoru (1x) bulanık görüldü, oda sıcaklığına ısıtıldı ve çözelti homojen görünene kadar hafifçe karıştırıldı.)
6. Her kuyuyu aspire edildi ve yıkandı, toplam üç yıkama için işlemi iki kez tekrarlandı. Bir fışkırtma şişesi, çok kanallı pipet, manifold dağıtıcı veya otomatik yıkayıcı kullanarak her kuyuyu Yıkama Tamponu (200µl) ile doldurarak yıkandı ve 2 dakika bekletildi, iyi performans için her adımda sıvının tamamen çıkarılması sağlandı. Son yıkamadan sonra, kalan yıkama Tamponunu aspire ederek veya boşaltarak çıkarıldı. Plakayı

ters çevirin ve temiz kağıt havlulara bastırıldı.

7. Her kuyucuğa 100µl HRP-avidin (1x) eklendi. Mikrotitre plakasını yeni bir yapışkan şeritle kaplandı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

8. Aspirasyon/yıkama işlemini 6. adımda olduğu gibi beş kez tekrarlandı.

9. Her kuyucuğa 90µl TMB Substrat eklendi. 37°C'de 15-30 dakika inkübe edilip ışıktan korundu.

10. Her kuyucuğa 50µl Durdurma Solüsyonu ekleyip, iyice karışmasını sağlamak için plakaya hafifçe vuruldu.

11. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroparka okuyucu kullanarak her kuyunun optik yoğunluğunu 5 dakika içinde belirlendi. Dalga boyu düzeltmesi mevcutsa, 540 nm veya 570 nm'ye ayarlandı. 450 nm'deki okumalardan 540 nm veya 570 nm'deki okumaları çıkarıldı. Bu çıkarma, plakadaki optik kusurları düzeltildi.

3.2.4.4. Histopatolojik Analiz

%10'luk formalin içeren solüsyon, 6 adet numune kaplarına paylaştırılıp tüm histolojik kolon doku örnekleri gruplanarak formaldehitte fikse edildi. Kolon dokusundaki otolizi önleyen fiksasyon işleminden sonra formalinden alınan kolon dokuları doku takip kasetine gruplar halinde yerleştirildi ve doku takibi öncesinde formalinin uzaklaştırılması için şehir şebekesi akar suyunda 24 saat bekletildi. Sonrasında kapaklı doku kasetleri içerisinde bulunan kolon örnekleri doku takip cihazında %70, %80, %95 ve en son %100'lük olacak şekilde asendan alkol serilerinde dehidre edildi (dokudaki su uzaklaştırıldı) böylelikle dokuların çok ince kesilebilmesi adına sertleşmesi sağlandı fakat bu durum aynı zaman dokunun kırılabilirliğini de arttırdı. Dokudaki alkol, ksilol serilerinden geçirilerek uzaklaştırılması sağlandı ve ksilol aynı zamanda dokunun şeffaflaştırılmasını da gerçekleştirildi. Doku takip cihazındaki son durak olan sıvılaştırılmış parafinle de özellikle lümeni olan dokuların her yerine parafin girişi sağlandı ve dokunun belli bir postür alması kolaylaştırıldı. Dokunun ince kesilmesi adına gerekli sertleşmeyi sağlayan bu işlemlerden sonra asıl dilimlenecek forma girmesine yardımcı olan 68-70°C'de eritilmiş sıvı parafinle kolon dokuları kalıpların içerisine dikine gömüldü (Leica EG 1110). Kalıplardan 1 gün sonra çıkartılan doku parafin blokları, kesimi kolaylaştırmak adına buzlukta bir süre bekletildikten

sonra mikrotomla (Leica RM2135) 5'er mikrometre kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitler 40-42°C'deki su banyosuna konuldu ve buradan lamlara aktarımı gerçekleştirildi. Dokular lamda kuruduktan sonra lamalar etüvde 4 saat kadar bekletilip dokunun lama sabitlenmesi ve lama yapışan parafinlerin erimesi sağlandı. Son olarak mikroskopta gerekli görüntünün sağlanması adına preparatlar Hematoksilen&Eozin ile boyandı ve entellan ile sabitlenip üstüne lamel kapatıldı. Dokulara gerekli fiksasyon işlemi tam gerçekleşmemesi sebebiyle tamamen alınan doku örneklerinden kaynaklanan bir aksilik sebebiyle numunelerin görüntülerinde netlik sağlanamadı ve dokuların dökülmesi gerçekleşti. Histopatolojik bulgular kısmına yer verilemeyecektir.

2.4.1.1. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde GraphPad Prism (versiyon 7.04, GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmede oneway analysis of variance (ANOVA) ile yapıldı. Biyokimyasal değerlerin yorumlanması ve grup değerlerinin çoklu karşılaştırılması, ELISA kıt prosedüründeki grafikten, parametrik testlerden Dunnett's multiple comparisons testi ile gerçekleştirildi. Grupların değerleri, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi ve p değeri 0,05 istatistiksel anlamlılık için sınır kabul edildi. p değeri 0,05 istatistiksel anlamlılık için sınır kabul edildi. Ağırlık değişimi kıyasını gösteren tablonun hazırlanması ve ortalama değerlerin tespit edilmesi için Microsoft Office Excell programı kullanıldı.

Çalışmamızda motor test için kullandığımız düzeneklerden en anlamlı sonuçlar alabilmeyi planladığımız Hole and Board testinin içeriklerine ve sıralanan parametrelere bakılarak aldığımız sonuçları Video Kaydı Sistemi ve İstatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde GraphPad Prism (versiyon 7.04, GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmede oneway analysis of variance (ANOVA) ile yapıldı. Motor aktivite test değerlerin yorumlanması ve grup değerlerinin çoklu karşılaştırılması, parametrik testlerden Dunnett's multiple comparisons testi ile gerçekleştirildi. Grupların değerleri, ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edildi ve p değeri 0,05 istatistiksel anlamlılık için sınır kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Ağırlık Ölçümleri

Çalışmamızda yem ve su kısıtlaması olmadan (ad libitum yem ve çeşme suyu, yeme içmeyi engelleyici veya teşvik edici müdahalelerden kaçınılarak) beslenen sıçanların sakrifikasyon işleminden önce sıçanların ağırlık ölçümleri alındı. Rotenon ve tedavi gruplarından elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ortalama ağırlık (316,257 gr) sonuçlarıyla kıyaslanarak yüzdesel değişim şeklinde sunuldu (Tablo 2).

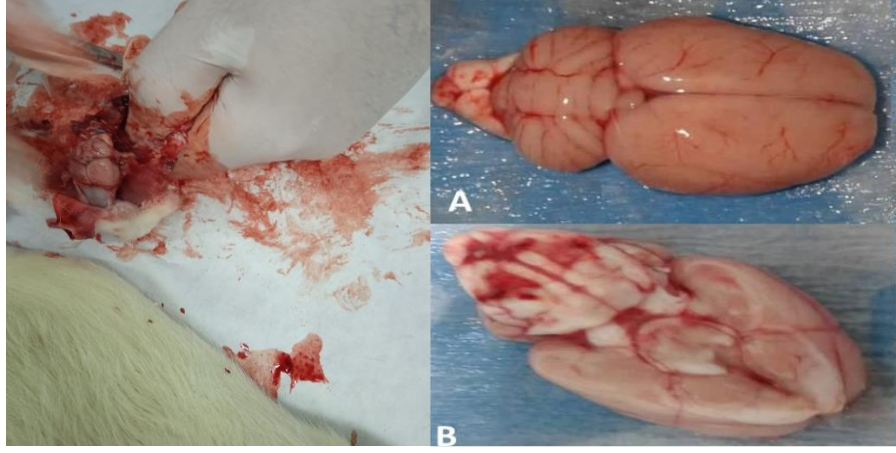
Rotenon uygulamasının 1. gününde 4 mortalite, takip eden 25.gün sonunda da totalde 12 mortalite gerçekleşti.

Tablo 6. Parkinson modeli oluşturulan tüm grupların Kontrol grubuyla kıyaslanarak hesaplanan ağırlık değişim yüzdeleri

	Kontrol	RT	RT+VIP	RT+NG
Sakrifiye günü	355,14 gr	312,23 gr	305,23 gr	303,80 gr
Değişim (%)	+8,21	-8,96	-3,26	-3,06

4.2. Makroskopik Bulgular

Gruplardaki sıçanlar sakrifiye edildikten hemen sonra, biyokimyasal ve histolojik incelemeler için beyin dokusu alınıp ayrılmadan önce ve alındıktan sonraki elde edilen (makroskopik inceleme için) fotoğraflar (Resim 6) (A) total beyin dokusu (B) sol hemisfer.



Resim 10. Makroskopik Sakrifiye günü görüntüleri.

(A) Total Beyin Dokusu (B) Sol Hemisfer

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Bu çalışmada; rotenone ile gerçekleştirilen deneysel parkinson modelinde VIP ve NG uygulamalarıyla; mitokondriyal oksidasyon etkisi biyokimyasal olarak değerlendirildi. Biyokimyasal analiz sonuçları (Şekil 11 , Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18) sunuldu. Tüm biyokimyasal sonuçlara ait değerler ise Tablo 7’de gösterildi. Tablodaki ve grafiklerdeki; alfa-sync, gsk-3 beta, dopamin, 8-OHdG, MDA, GSH, SOD, total protein sayısal değerleri beyin dokusundan alınan striatumdaki analiz sonuçlarına ait veriler değerlendirilerek striatum analiz edildi, onlara ait sonuçlara detaylı sunuldu.

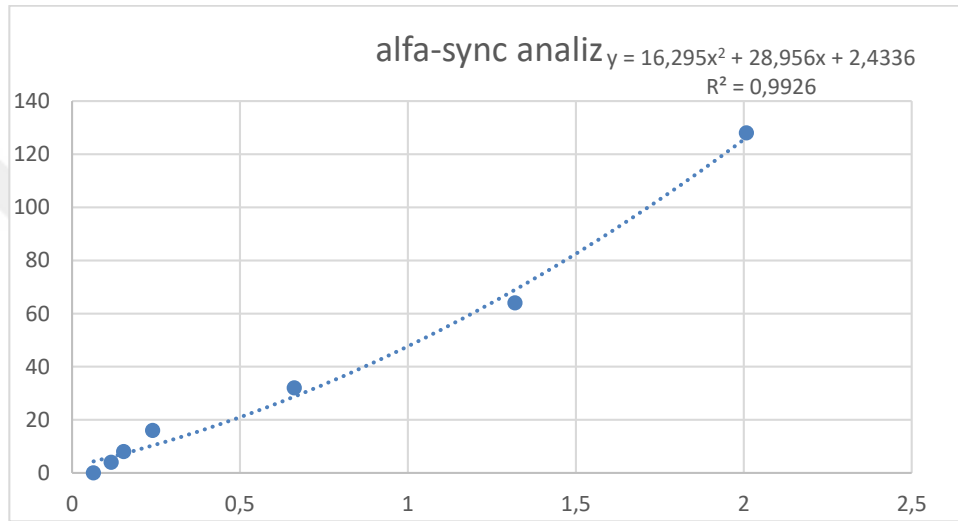
Tablo 7. Biyokimyasal analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerler

	Alfa-sync (pg/gr)	GSK-3beta(pg/gr)	8-OHdG (µg/gr)	DA (µg/gr)	MDA (mU/ml)	SOD (ng/ml)	GSH(ng/ml) (Distal ileum)	Total protein (pg/gr)
Kontrol	1426±149,7***	1343±127,5*	7,14±0,7788***	43,47±4,124*	483,9±81,44**	119,8±11,07***	39,32±1,816	123,9±61,44**
RT	2092	1726	10,42	55,21	780,3	69,99	36,18	70,3
RT+VIP	1978±160	1205±127,5***	8,298±0,7788*	36,19±4,124***	412,4±81,44***	84,41±11,07	39,94±1,816	439,4±81,44***
RT+NG	1571±160*	1449±127,5	8,812±0,7788	45,63±4,124*	502,0±81,44**	100,3±11,07*	30,44±1,816	152,0±61,44**

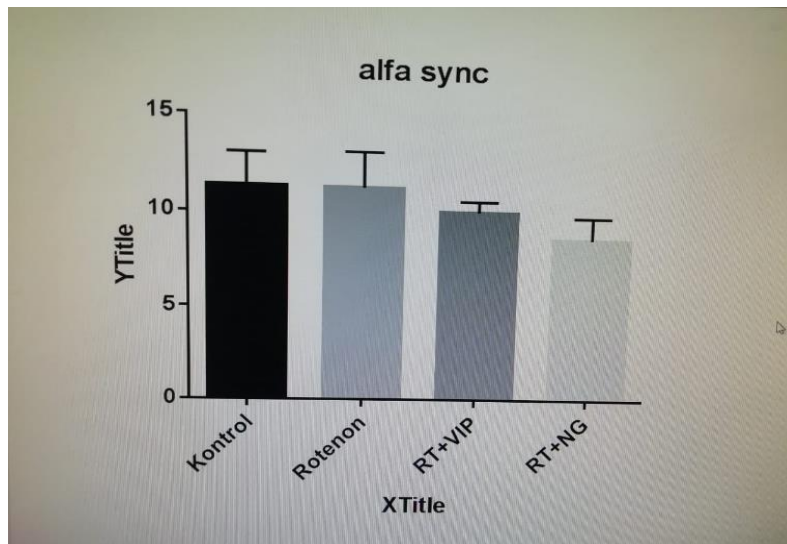
4.3.1. ELISA yöntemi ile striatumdan doku tayini

4.3.1.1. alfa-sync ELISA Kiti ile doku tayini bulgusu

Yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarında, striatum alfa-sync seviyelerinin Kontrol grubunda, RT grubuna göre anlamlı düzeyde düşüklük olduğu belirlendi, ancak RT+VIP grubunda, RT+NG grubuna göre anlamlı azalma olduğu saptandı.



Tablo 8. Alfa-sync analizi ELISA tayini grafiği

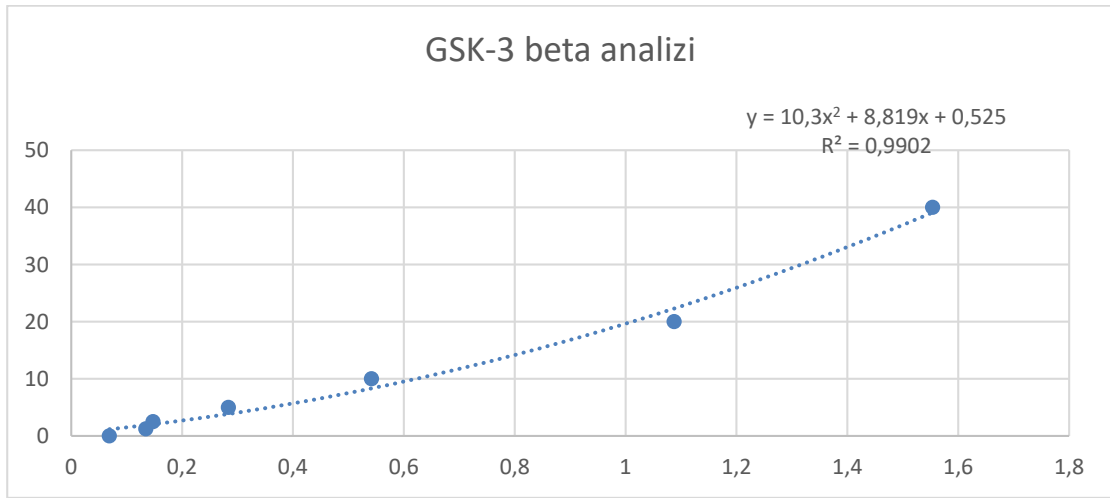


Şekil 11. Gruplar arası α -sync düzeylerinin karşılaştırılması

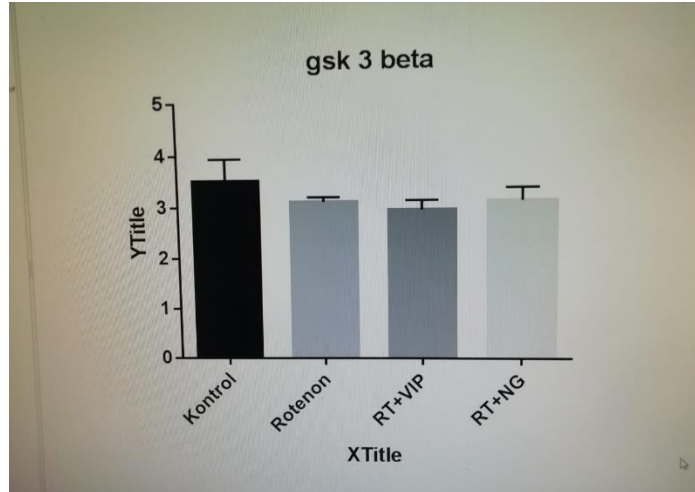
Kontrol grubunda, RT grubuna göre RT+VIP ve RT+NG grupları anlamlı azalma gözlenmiştir. ($p < 0,05$)

4.3.1.2. GSK-3 beta ELISA kiti ile doku tayini bulgusu

Yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarında, striatum GSK-3 beta seviyelerinin Kontrol grubunda ve RT grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde benzerlik olduğu belirlendi, fakat RT+VIP grubunda, RT+NG grubunda ileri düzeyde anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi.



Tablo 9. GSK-3 beta analizi ELISA tayini grafiği

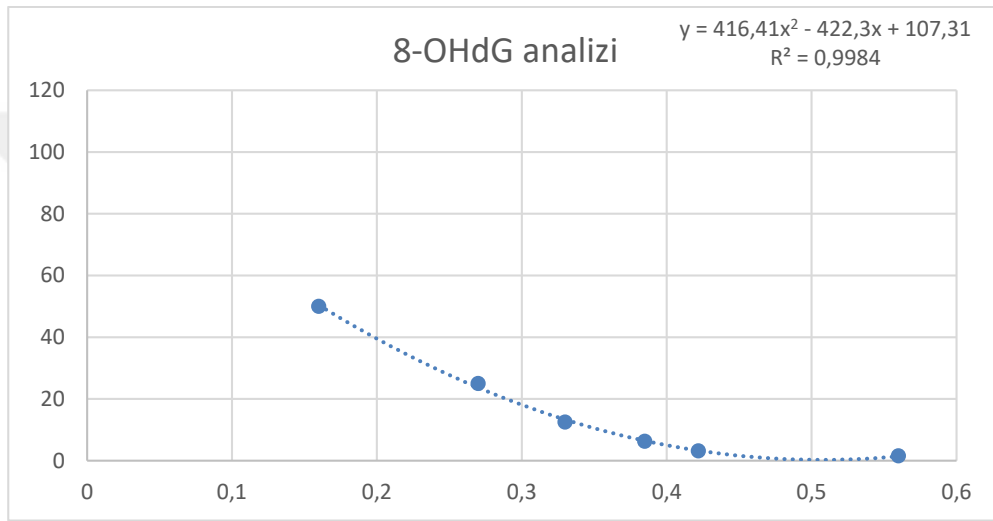


Şekil 12. Gruplar arası GSK-3 beta düzeylerinin karşılaştırılması

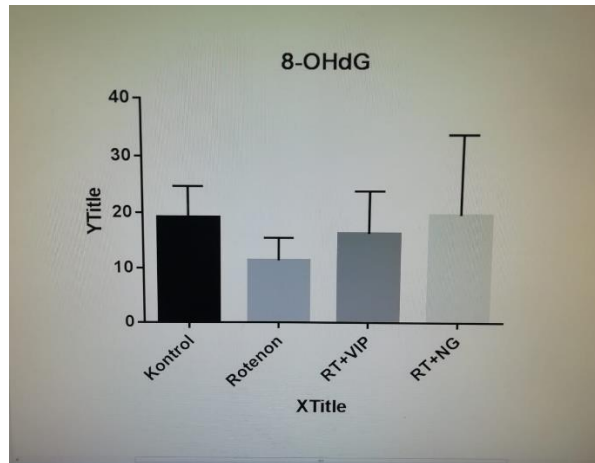
Kontrol grubunda, RT grubuna göre RT+VIP ve RT+NG grupları hiçbir anlamlı değer gözlenmemiştir.

4.3.1.3. 8-OHdG ELISA kiti ile doku tayini bulgusu

Yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarında, striatumdaki 8-OHdG lipid peroksidasyon ürünlerinden birinin seviyelerinin belirlenmesi için yapılan ELISA uygulamasının grafiksel ve istatistiksel sonucu; RT grubunda yüksek bir düşüş gözlenirken, RT+VIP ve RT+NG gruplarında artış gözlenmektedir. Bu durumda RT+VIP grubunun RT+NG grubuna göre az bir farkla anlamlı olarak lipid indüklemesi belirlendi ($p < 0.05$, Grafik 3)



Tablo 10. 8-OHdG analizi ELISA tayini grafiği

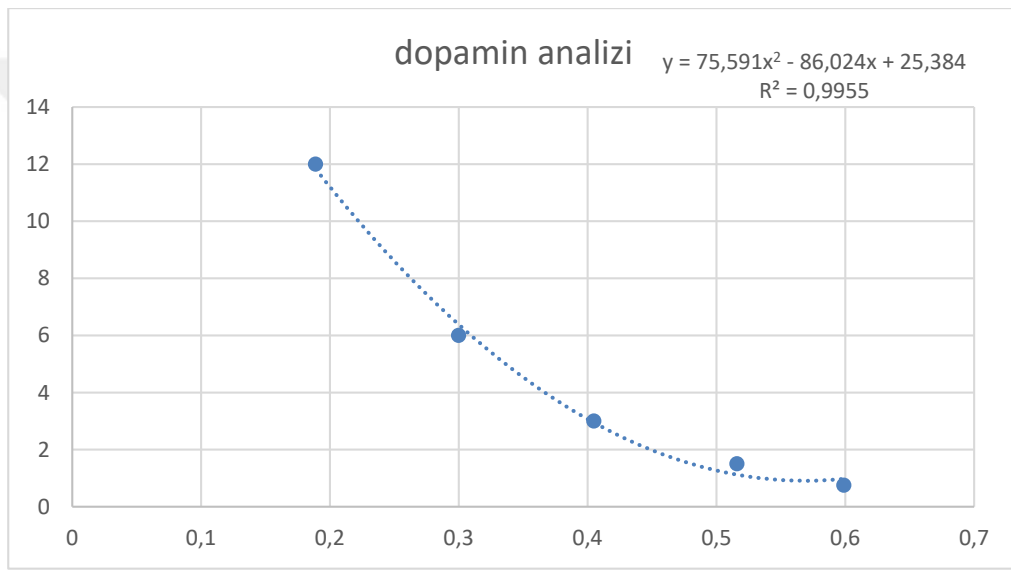


Şekil 13. Gruplar arası 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılması

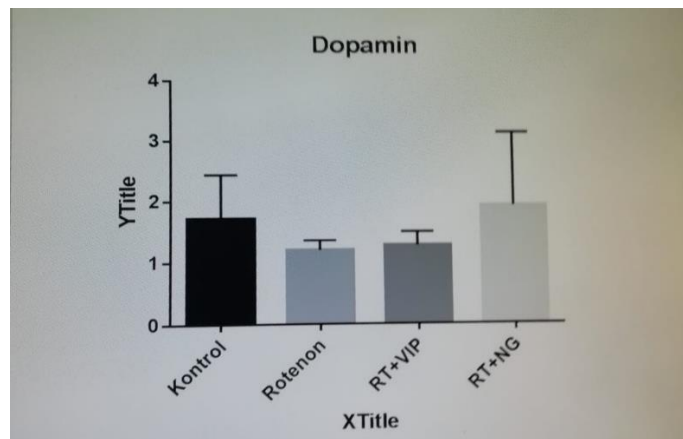
Kontrol grubunda, RT grubuna göre RT+VIP grubu RT+NG grubuna göre anlamlı değer gözlemlendi. ($p < 0,05$)

4.3.1.4. Dopamin ELISA kiti ile doku tayini bulgusu

Analiz sonuçlarımıza göre, striatumdaki dopamin seviyelerinde RT+NG grubunun dopamin seviyesinin hemen hemen kontrol grubuna yaklaştığını bulundu. SPP değerinin (0,599+-0,19) aralıklarında olduğu saptandı. Kontrol grubunda dopamin seviyesi ve RT grubundaki dopamin seviyesi anlamlı bir fark belirlendi. RT+VIP ve RT grupları arasında anlamlı bir fark söz konusu değildi. Nörodejeneratif hasarların ELISA yöntemi tayininde anlamlı fark elde edildi.($p < 0.05$, Grafik 4)



Tablo 11. Dopamin analizi ELISA tayini yöntemi



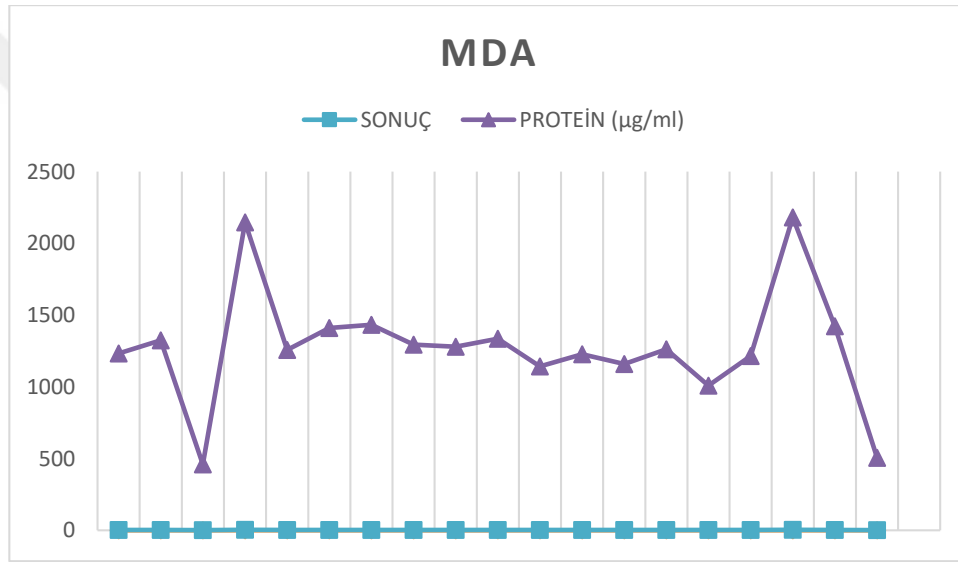
Şekil 14. Gruplar arası dopamin düzeylerinin karşılaştırılması

RT+NG grubunda RT grubuna göre anlamlı değer gözlenmiştir.($p < 0,05$)

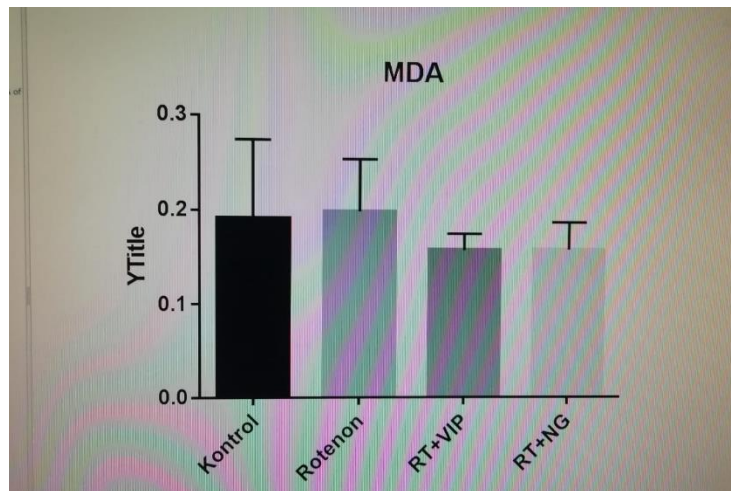
4.3.2. Doku örneklerinde tayin yöntemleri bulguları

4.3.2.1. MDA tayini

Kontrol ve RT gruplarında lipid peroksidasyonunun birikmesi sonucu ortaya çıkan MDA artışı, RT grubunda anlamlı artış göstermektedir. RT+VIP ve RT+NG gruplarının karşılaştırılması sonucu VIP ve NG etken maddelerinin biyokimyasal parametrelerdeki sonuçlarına göre anlamlı bir değişime sebep olmadığı gözlemlendi.



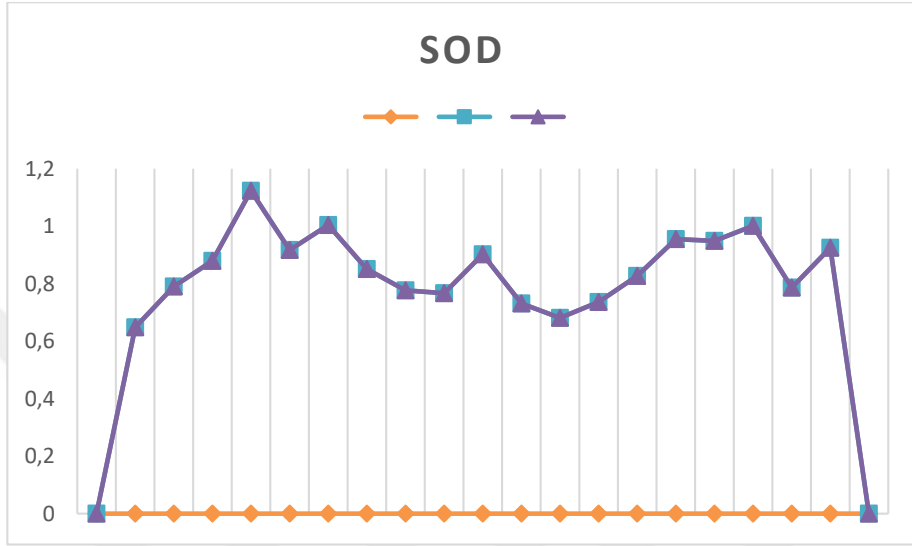
Tablo 12. MDA Spektrofotometrik grafiği



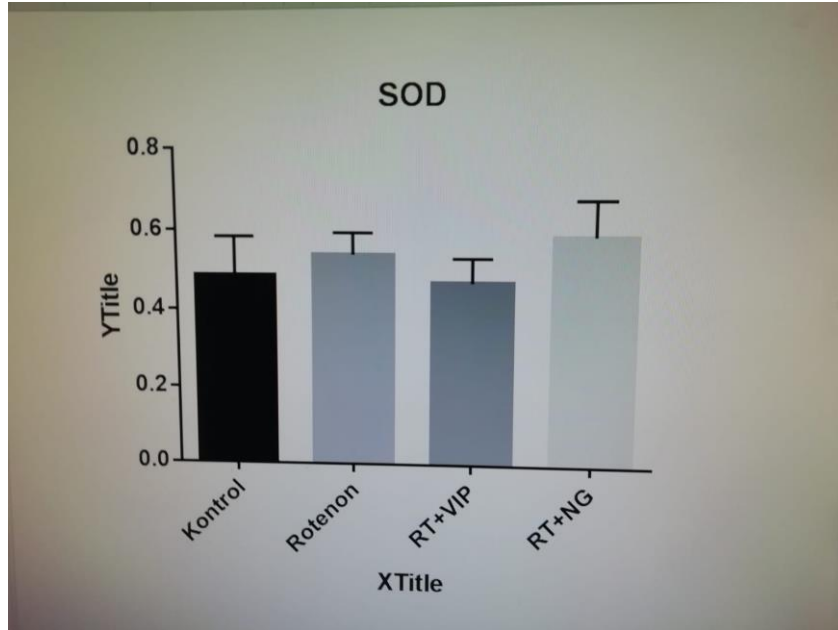
Şekil 15. MDA grafiği

4.3.2.2. SOD tayini

Çalışmamızda beyin dokusundan homojenizasyonu sağlanmış striatum bölgesindeki SOD analizi sonucu bulgularımızda anlamlı bir fark bulunamadı.



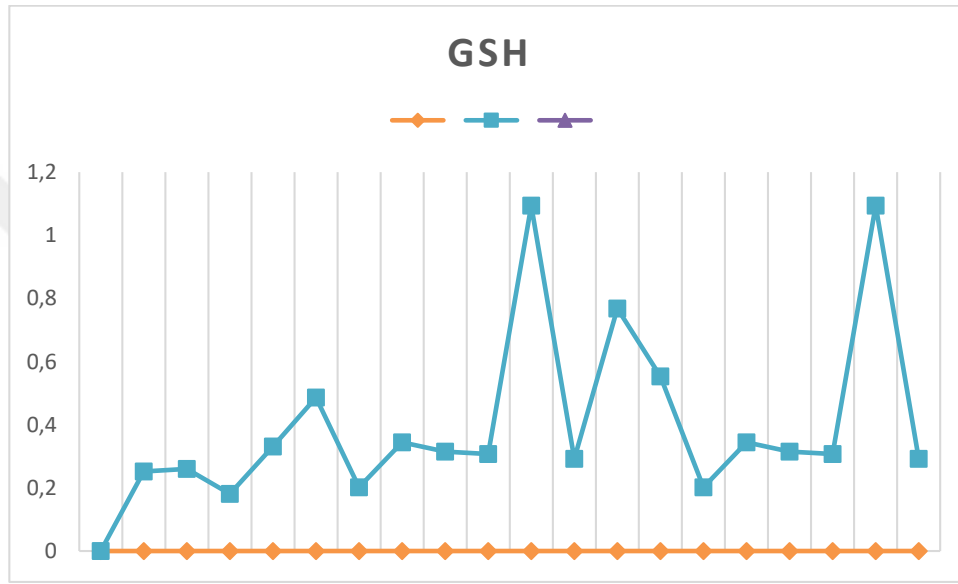
Tablo 13. SOD spektrofotometrik grafiği



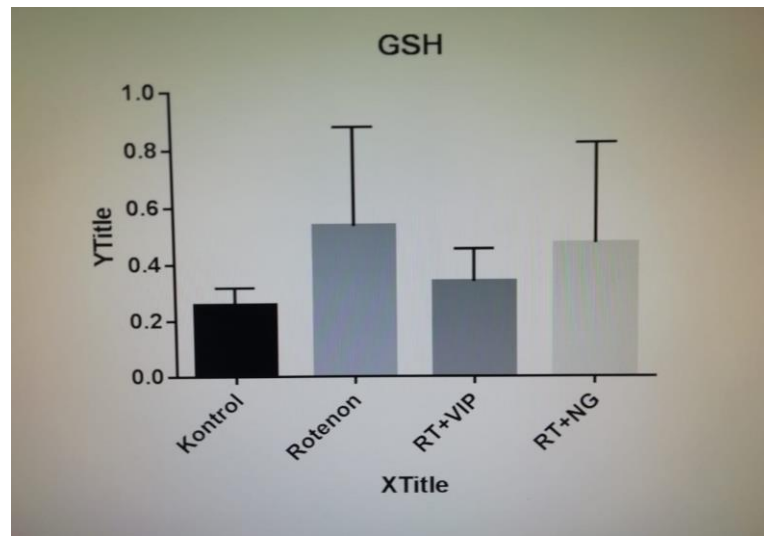
Şekil 16. SOD grafiği

4.3.2.3. GSH tayini

PD grubunda beyin dokusu üzerinde rotenone etkisi incelendiğinde GSH miktarında anlamlı bir artış gözlemlendi. RT+VIP grubunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı ortaya çıkarken RT+NG grubunda ortaya çıkan sonuç oldukça anlamlı bir artışı gösterdi. ($p < 0.05$, Grafik 7)



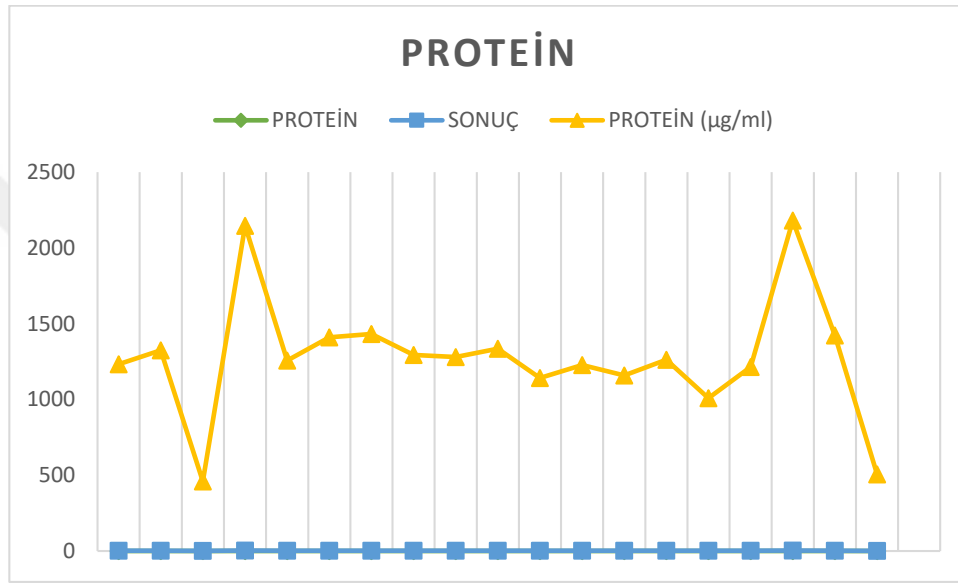
Tablo 14. GSH spektrofotometrik grafiği



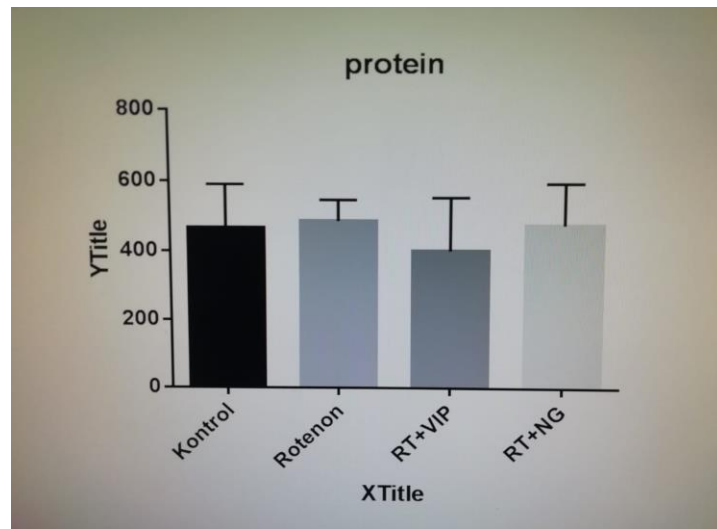
Şekil 17. GSH grafiği

4.3.2.4. Protein tayini

PD grubunda beyin dokusu üzerinde rotenone etkisi incelendiğinde GSH miktarında anlamlı bir artış gözlemlendi. RT+VIP grubunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı ortaya çıkarken RT+NG grubunda ortaya çıkan sonuç oldukça anlamlı bir artışı gösterdi ($p < 0.05$, Grafik 8)



Tablo 15. Protein spektrofotometrik grafiği



Şekil 18. Protein grafiği

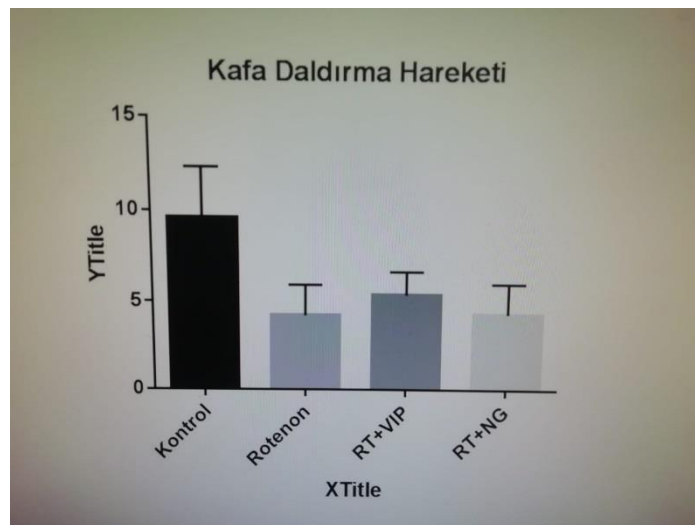
4.4. Motor Test Bulgular

4.4.1. Hole and Board Test Bulgular

Hole and Board (HB) testi uygulanmadan 2 hafta önce deney hayvanlarının öncelikle kilo alımları, yem durumları, su durumları kontrol edilerek; ratların fiziksel olarak farklılık gösteren herhangi bir nöroplastisiteye meyilli olmasına ve aspirasyon durumlarına bakılarak deneye hazırlık aşamasına geçildi. HB test düzeneğine koyulan gruplardaki ratlarda Kontrol Grubu, RT Grubu, RT+VIP ve RT+NG Grubu arasında gözlemlenen parametrelerdeki farklılarda bir değişiklik bulunamadı. Araştırmanın ön hazırlık aşamasında beklenen sonuçlar sadece ratların ortama oryantasyonu için değerlendirildi.

4.4.1.1. Kafa Daldırma Hareketi Analiz

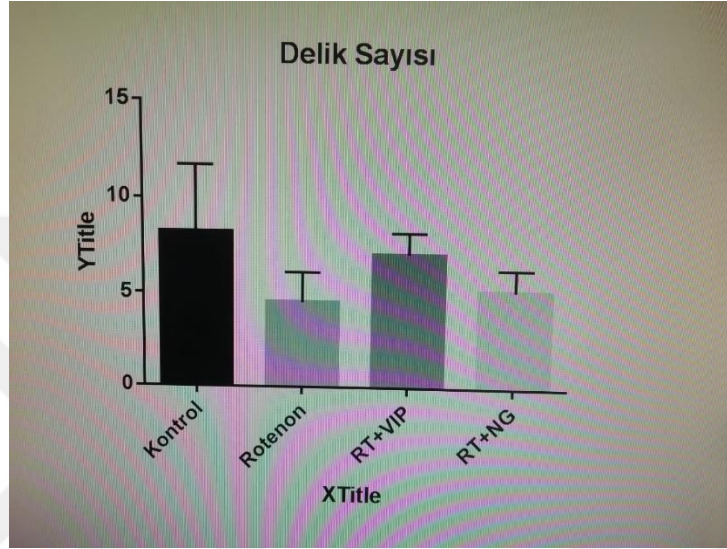
Deney hayvanlarının belirlediğimiz motor aktivite düzeneği olan HB'ye bırakılması ile belirlenen parametrelerden olan KDH gruplar arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıktı. Kontrol grubunda beklenildiği gibi en fazla KDH bulunurken, RT grubunda bu hareket kontrole göre daha az seviyede çıktı. RT+VIP, RT+NG grubuna göre KDH oldukça anlamlı bir farklılık gösterdi. ($p < 0.05$, Şekil 19)



Şekil 19. KDH istatistiksel grafiği

4.4.1.2. Delik Sayısı Analiz

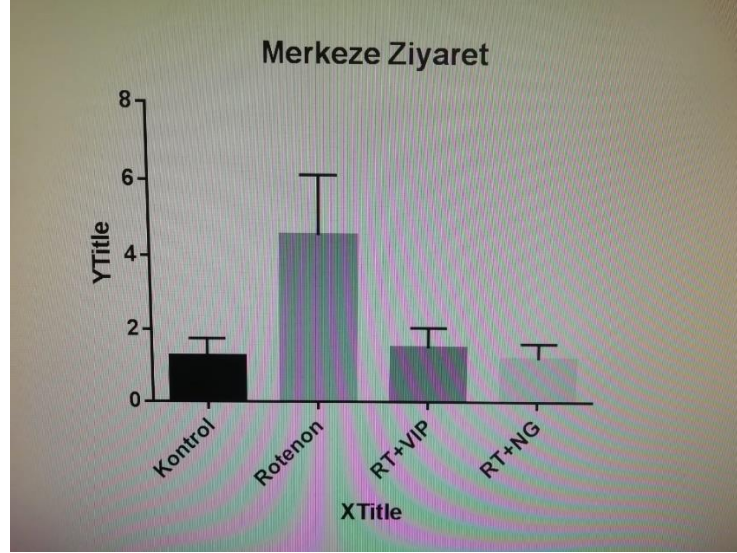
Ziyaret edilen delik sayısına göre kontrol grubunun kendi içinde oldukça fazla sayıda olduğu, gruplar arasında bir karşılaştırmanın ise; RT+VIP grubunun RT+NG grubuna göre daha fazla delik ziyaret ettiği ve aradaki farkın anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$, Şekil 20)



Şekil 20. DS istatistiksel grafiği

4.4.1.3. Merkeze Ziyaret Analizi

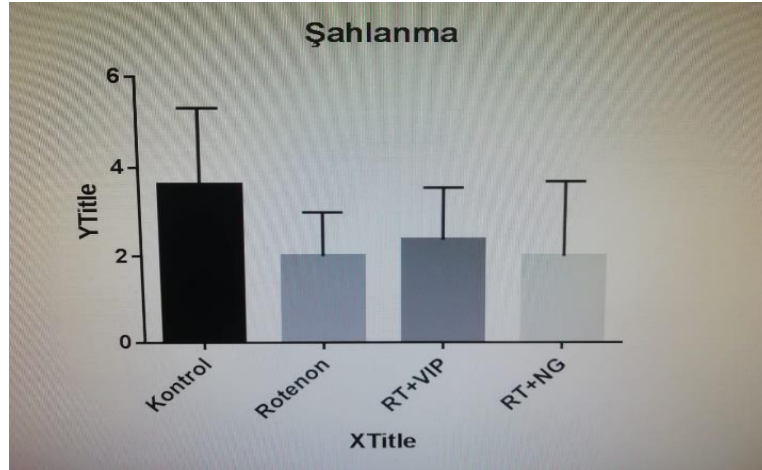
Merkeze ziyaret sıklığında grupların kendi içinde değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Gruplar arasında karşılaştırmada ise; RT grubunda alınan sonuç. RT+VIP ve RT+NG'ye göre daha fazla fazla bulundu. ($p < 0.05$, Şekil 21)



Şekil 21. MZ istatistiksel grafiği

4.4.1.4. Şahlanma Analiz

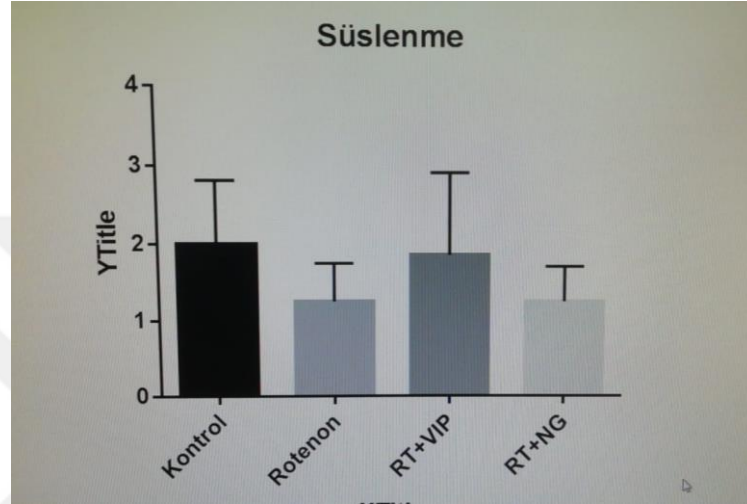
Ş hareketi gruplar arasında farklı ve K gurubunda en yüksek seviyede olduğu belirlendi. RT grubunda K gurubuna göre düşük, RT+VIP grubu RT+NG grubuna göre daha fazla seviyede ve anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$, Grafik 22)



Şekil 22. Ş istatistiksel analiz

4.4.1.5. Süslenme Analiz

Deney hayvanlarının süslenme davranışında K grubunun RT+VIP grubuna göre yakın bir artış gösterdiğini, RT+VIP, RT+NG karşılaştırmasında; RT+VIP grubu farklı bulundu. ($p < 0.05$, Grafik 23)



şekil 23. S istatistiksel grafiğı

5. TARTIŞMA

Bu çalışma; dopaminerjik nöron hasarları ve tauopatilerin neden olduğu bazı nörodejeneratif hastalıklardan olan parkinson modelinde striatum bölgesinin totalizasyonundaki biyokimyasal hasarlar, motor aktivitedeki değişiklik ve farklılıklarının rotenone ile model oluşturulduktan sonra, VIP ve NG ile tedavi ve koruyucu etkilerine bakılarak olası sonuçlarının yorumlanmasına yönelik olarak gerçekleştirildi.

Çalışmamızda 60 gün süresince rotenon uygulaması ile deneysel Parkinson oluşturulan RT grubunda, rotenon uygulamasına ek olarak VIP ve NG verilen gruplarında yer alan 12 haftalık, 48 adet Wistar albino erkek ratlarda vücut ağırlığının azalırken, buna bağlı olarak vücut ağırlığında yüzde değişimleri RT ve VIP gruplarının aksine uygulama süresince artış gösterdi. Rotenon enjeksiyonu uygulamasının sonlandırıldığı 60. gün ile deney başlangıcında (0. gün) kaydedilen canlı ağırlıklar kullanılarak hesaplanan RT, RT+VIP, RT+NG ve K grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Benzer şekilde enjeksiyon uygulamasının sonlandırıldığı 60. günden sonra, iki haftalık bekleme süresinin sonunda (75. gün) kaydedilen canlı ağırlıklar anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Parkinson hastalarında görülen ağırlık kaybına disfaji, gastrointestinal disfonksiyonlar, depresyon, hipozmi gibi gıda alımının azalmasına neden olan premotor semptomların yanında tremor, rijidite gibi enerji harcanmasına neden olan motor semptomların katkıda bulunduğu (Kashihara, 2006), ancak bu durumun yalnızca gıda alımının azalması ve enerji harcanmasının artmasına bağlı olarak açıklanamayacağı (Cumming ve ark, 2017), altta yatan mekanizmanın halen belirsiz olduğu bildirilmektedir. (Cersosimo ve ark, 2018; Ma ve ark, 2018)

Lorefalt ve ark (2004) tarafından yapılmış çalışmada, erken dönem Parkinson hastalarında kalori alımı arttırılmasına rağmen kilo kaybı tespit edilmiştir. Bunun yanında Parkinson hastaları ve aynı yaşta bulunan sağlıklı kontroller üzerinde Baricella ve ark (2003) ve Morales-Briceno ve ark (2012) tarafından gerçekleştirilmiş kesitsel çalışmalarda ise Parkinson hastalarının %60'ından fazlasının aşırı kilolu ya da obez olduğu, hastaların yalnızca %3'ünün düşük beden kitle indeksine sahip olduğu bildirilmiştir. Sırası ile İtalya ve Meksika'da gerçekleştirilmiş olan bu çalışmalarda, populasyonun obezite oranının yüksek olmasının da göz önünde bulundurulması gerektiği ancak aşırı kilolu olmanın Parkinson

hastalığında görülen kilo kaybını telafi etmek için yeterli bir neden olamayacağı belirtilmektedir (Ma ve ark, 2018). Benzer şekilde Miyazaki ve ark (2020) 4 hafta süresince, 2.5 mg/kg dozda, subkutan rotenon uyguladıkları erkek farelerde çalışma süresince ağırlık kaybı tespit etmemişlerdir.

Parkinson hastalığının etiyolojisi henüz tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen *in vitro* deney setlerinde Parkinson modeli oluşturularak, epidemiyolojik çalışmalar ve genetik analizler yapılabilmektedir. Bu çalışmalar Parkinson hastalığının patogenezinin anlaşılmasında önemli bir bakış açısı sağlamaktadır (Dawson and Dawson, 2003). Yaygın olarak primer sıçan orta beyin hücre kültürü, Parkinson hastalığında biyokimyasal çalışmalar için kullanılmaktadır. Bu hücrelerin kökeni insan kaynaklı hücre kültürlerine ait değildir. Dolayısıyla bu hücreler, Parkinson modeli oluşturmak üzere potansiyel farklılaşma nitelikleri sınırlı olan % 6-15 oranında TH-positif nöron hücreleri içerirler (Liu et al., 2008). Parkinson hastalığı 60-65 yaş aralığında bulunan popülasyonun % 2-3'ünde görülen, insidansı özellikle 50 yaşından sonra artış gösteren (Saiki ve ark, 2011; Bollinger ve ark, 2012; Weiser ve ark, 2013; Oung ve ark, 2015; Özmüş ve ark, 2017; Cerri ve ark, 2019), 70 ve üzeri yaş popülasyonunda insidansı %3'e, 80-85 ve üzeri yaş popülasyonunda insidansı %4'e yükselen (Saiki ve ark, 2011; DeMaagd ve Philip, 2015; Ylikotila ve ark, 2015), yaşlanma ve buna bağlı faktörlerle yakından ilişkili bir hastalıktır (Sveinbjornsdottir, 2016; Getz ve Levin, 2017; Poewe ve ark, 2017; Tysnes ve Storstein, 2017; Mishra ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018; Rajsombath ve ark, 2019). Dünya genelinde yaklaşık 10 milyon Parkinson hastasının bulunduğu bildirilmektedir (Nair ve ark, 2018; Perlberg ve ark, 2018; Sui ve ark, 2019). Çeşitli ülkelerde yapılan pek çok kohort çalışmasında, hastalığın insidansı ve prevalansı metodolojik farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterse de, erkeklerde kadınlardan 1.5-2 kat daha fazla görüldüğü saptanmıştır (Wirdefeldt ve ark, 2011; Bollinger ve ark, 2012; Amel ve Heba, 2013; Cerri ve ark, 2019; Lee ve ark, 2019; Park ve ark, 2019). Bölgesel olarak bakıldığında Asya kıtasında insidansı Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerine kıyasla düşüktür (Oung ve ark, 2015; Getz ve Levin, 2017), ancak Asya ülkelerinde PH insidansını ortaya koyan epidemiyolojik araştırmaların da diğer bölgelere oranla daha az sayıda olduğu da bildirilmektedir (Park ve ark, 2019).

PH çalışmaları için erişilebilir bir model oluşturmak oldukça zordur. PD'deki son terapötik ilerleme, flavanoidlerin umut verici rolünü ortaya koymaktadır. Duyarlı nöronları koruyarak bilişsel işlevi iyileştirmek, motorun bakımını yapmak kontrol, motor komplikasyonlarda azalma (Vauzour ve ark., 2008), nigro striatal bakımı bütünlük ve

işlevsellik. Flavanoidlerin bu umut verici özellikleri, örneğin sesamol ve naringenin, PD tedavisi için güçlü nöroprotektif ajanlar olarak kullanılabilir (Datla ve ark.,2001) ve diğer nörolojik bozukluklar (Ahmad ve diğerleri, 2012; Zbarsky ve diğerleri, 2005).Burada ilk kez naringenin kapsamlı ancak bireysel rolünü çalışmaktayız ve mitokondriyal maruziyet üzerine nöroproteksiyonda naringenin (rotenon kaynaklı PD modeli)dir. Rotenon kaynaklı PD benzeri modelinde (Lapointe ve diğerleri, 2004; Sonia Angeline ve diğerleri,2012) önemli nigra ve striatumda nöronal hasara neden olur, motor beceri bozukluğu, davranış değişiklikleri, değişen kas morfolojisi ile birlikte vücut ağırlığı kaybı. Bunlar nöroprotektif flavonoidler, sesamol ve naringenin kullanılarak anormallikler tersine çevrilmiştir ayrı ayrı. PD'deki nörodejenerasyonun birçok faktör tarafından tetiklendiği görülmektedir (Barzilai ve Melamed, 2003); motor test bulgularımıza göre; flavonoidlerin koruyucu rolünü güçlendirdiği nöronal hasarı önlediğini göstermektedir. (Spencer, 2007) Ağırlık, lokomotor aktivite, motor koordinasyon ve farklı oksidatif hasarı hafifletir.Örneğin Huntington hastalığı modelinde sıçan beyninin bölgeleri (Kumar ve ark., 2009),Huntington hastalığında beynin tüm bölgelerinde mitokondriyal enzimlerin biyoyararlanımı göz önüne serilmektedir.Önemli olarak, anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliği nedeniyle naringenin, bilişsel bozulma (Misra ve diğerleri, 2011, Kumar ve diğerleri, 2011), asetil kolinesterazda azalma intra serebroventriküler beyinde aktivite, alfa-sync seviyeleri ve zayıflatılmış oksidatif stres parametreleri artmıştır.(Ahmad ve diğerleri, 2012; Chandrasekaran ve diğerleri, 2009).

Parkinson modeli sıçanları VIP ile tedavisi sonrası biomarker protein sayı ve yoğunluğu bir miktar azalmasına rağmen, tamamiyle kontrol grubu seviyelerine inmediği gözlemlendi. VIP'in nöron koruyucu etkisi tanımlanırken astrosit mitozunu artırdığı ve ADNP gibi astrosit kaynaklı nörotrofik moleküllerin salıverilmesini uyardığı varsayılmaktadır. (Brenneman vd.,1997; Brenneman vd., 2007; Gozes, 2007; Gozes, 2012; Kouki, 2007; Said, 2000).Farelerde VIP antagonistleri vererek yaptıkları in vivo bir çalışmada, neokortekste dramatik bir şekilde astrosit kaybı olduğunu, VIP uygulaması ile neokortikal astrogenezis meydana gelerek bu kaybın geri döndüğünü göstermişlerdir (Zupan, 1998). VIP ile tedavi, hücre dışı GSH düzeylerinde normal düzeylere doğru azalma yaratırken, glutamat ve GABA düzeylerinde artışa neden olmuştur. Laktat düzeylerine ise VIP'in belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. VIP olasılıkla glutamin-glutamat-GABA döngüsünü hızlandırmış ve striatumdaki MSN'lerde ADNP ekspresyonunu artırarak bu nöronları korumuş ve GABAerjik olan bu nöronlardan GABA salıverilmesini artırmış olabilir. VIP'in astositler üzerindeki modulator etkisinin en iyi göstergesi GSH düzeylerine yapmış olduğu etkidir. VIP

ile tedavi GSH düzeylerini kontrol düzeylerine getirmiştir. Astrogliosis çok azaltmadan, GSH salıverilmesini azaltması kendi güçlü antioksidan etkisiyle birlikte glutamat düzeylerini de artırmaya bağlanabilir.

Delgado ve ark. ise farelerde yaptıkları bir çalışmada VIP'in travmaya bağlı olarak gelişen astrogliyozisi azalttığını göstermişlerdir (Delgado & Ganea, 2003b). VIP, ksantin/ksantin oksidazı inhibe ederek süperoksid anyon oluşumunu engeller. Ayrıca OH radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini süpürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır (Said, 2000). Tunçel ve ark. yaptıkları bir çalışmada VIP'in antioksidan etkisini 6-OHDA ile oluşturulmuş Parkinson modelinde göstermişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız Rotenone modelinin de benzer bulguları desteklediği ortaya çıkmıştır. 6-OHDA nörotoksini uygulanması ile sıçan striatumunda oluşan lipid peroksidasyon ve DNA fragmentasyonu VIP tedavisi ile azaltılmıştır (Tunçel, 2012). VIP güçlü modülatör etkiye sahip bir moleküldür. VIP ile tedavisinde koruyucu etkisine bakıldığında motor aktivite testlerinden HB uygulanması sonucunda alınan veriler ışığında özellikle beklenen parametrelerden olan KD hareketinin artış gösterdiği ve Ş hareketinin de bunu desteklediği ortaya çıkmaktadır.

Tartışmalı bir konu olan özellikle çalışmamızda elde edilen alfa-synuclein biyokimyasal analizde elde edilen sonuçlara göre; yanlış katlanmış α -syn türlerinin proteazomal işlevi bozup bozmadığı sorusu değerlendirildi. Yaklaşım (in vitro karşı in vivo), hücrel modeller (nöronal ve nöronal olmayan) ve kullanılan a-syn türlerinin tipine bağlı olarak çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (Lindersson ve diğerleri, 2004; Snyder ve diğerleri. 2003; Petrucelli ve diğerleri. . 2002; Bence vd. 2001; Tanaka ve arkadaşları 2001; Zhang ve ark. 2008; Tofaris vd 2003). Lindersson ve diğerleri, 2004 'te de belirtilen bilgiye paralel olarak bizim çalışmamızın bulgularına göre de; nörodejeneratif hasar meydana gelmesi ile birlikte rotenone uygulaması ile parkinson modelinde kısmen hastalığın belirlediği protein seviyelerini baskıladığı ve ters etki sağladığını söyleyebiliriz. Oksidatif hasar meydana gelmesi ile birlikte rotenone uygulaması ile parkinson modelinde protein beyinde hem nöron hem de glialarda bol miktarda bulunan bir kinazdır. Elde edilen analiz sonucunda kapsamlı bir sonuç elde edilemedi. (Beyoğlu, 2014). α -sinükleinopatiler ve diğer proteinlerin yanlış katlanmasından kaynaklanan hastalıklar, özellikle tauopatiler arasında bir örtüşme vardır. α -syn, τ , A β ve diğer proteinler ile protein agregatlarının indüklenmesi ve yayılması dahil olmak üzere altta yatan patojenik mekanizmalar arasında sinerjistik etkiler vardır (Jellinger, 2011). Parkinson hastalığında her ne kadar alfa sinüklein 9 patolojisi ve otonom sinirlerin denervasyonu yaygın olarak gözlenmiş olsa da, disotonomik semptomların spesifik

mekanizması henüz tanımlanmamıştır (Chen ve ark, 2020). α -Syn aşırı ekspresyonu ve agregasyonu, çoklu mekanizmalar yoluyla endozomal ve lizozomal işlevi bozabilir (Perrett ve ark. 2015). NM granülleri, dopaminerjik nöronların lizozomlarında bulunur (Tribl ve ark. 2006; Plum ve ark. 2016) ve NM birikimi, yaşlanan nöronlarda α -sin birikimi ile ilişkilidir (Xuan ve ark. 2011). Bir hipoteze göre, dopaminerjik nöronlarda NM birikimi, endozomal-lizozomal yoldaki stokastik moleküler kusurlara duyarlılıklarını artırarak α -sin birikimine yol açabilir (Perrett ve ark. 2015). Lizozomal disfonksiyon daha sonra mitofajide eksikliklere ve işlevsiz mitokondri oluşumuna yol açabilir (Gegg ve Schapira 2016). Bu nedenle, NM, α -syn ekspresyonu ve toplanmasının indüklenmesi yoluyla PD'deki nöronal güvenlik açığına aracılık edebilir (Xu ve Chan 2015). Tersine, α -syn ayrıca muhtemelen sitozolik dopamin seviyelerini artırarak NM'nin biyosentezini de kolaylaştırır (Pan ve ark. 2012).

Çalışmamızda da Alfa-sync geninin kodlamış olduğu alfa-sync protein katlanmasını indüklediği GSK-3 betanın selektif inhibitörlerinin kullanımının arttığı ve parkinson hastalığında tedavi edici özellikte olduğu gösterildi ancak düşüş kontrol düzeylerinde gerçekleşmedi.

Öncelikle *in vitro* Parkinson modeli oluşturulan çalışmamızda özellikle hücre metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olan bazı dopaminerjik nöron hasarını tedavi edeceği umulan ilaçların etkisi araştırıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar, GSK-3 beta sinyal yolağının oluşturulan modelde rol oynayabileceğini gösterdi. Sonuçlarımızın Parkinsonun etyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve buradan yola çıkarak, hastalığa karşı yeni tedavi stratejileri geliştirilebilmesi için aracılık edeceğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız motor aktivite test sonuçlarına göre; başı eğme sıklığındaki ilk düşüşün yorumu, kafayı eğmenin korkulu, neofobik bir tepkiyi temsil edebileceğidir. Cihaza ilk maruz kaldığında hayvan aktif olarak bir kaçış yolu bulmaya çalışır (Renner, 1990)Bizim çalışmamızda da test günün başlamasından 2 hafta öncesinde oryantasyon için bırakılan ratlarda benzer davranışlar gözlemlenmiştir. Yetişkin erkek sıçanların, delikli tahta aparatına tek bir maruziyetin ardından dolaşımdaki kortikosteroid seviyelerinde bir artış sergilediği gösterilmiştir (Márquez ve diğerleri, 2005, 2006).), bu da cihazda test yapmanın stresli bir olay olduğunu düşündürür. Bu baş eğme yorumu doğruysa, baş eğme davranışı azaldıkça korkunun ve tremor, rijidite, bradikinezi gibi parkinson belirtilerinin de azalacağını tahmin edebiliriz. Yani kafa eğme davranışı arttıkça PD belirtilerinin çok görülmediğini yorumlayabiliriz. (Belzung 2001) Çalışmamızda KD hareketi analiz sonuçlarına göre; deney hayvanlarının belirlediğimiz motor aktivite düzeneği olan HB'ye bırakılması ile belirlenen

parametrelerden olan KDH gruplar arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıktı. Kontrol grubunda beklenildiği gibi en fazla KDH bulunurken, Belzung 2001'e paralel olarak, RT grubunda bu hareket kontrole göre daha az seviyede çıktı. RT+VIP, RT+NG grubuna göre KDH oldukça anlamlı bir farklılık gösterdi. Bu yorumun lehinde, ilk birkaç testte kafayı eğme sıklığı azalırken, delik tahtasının orta alanına hareket miktarı ve orta alanda harcanan zaman, bu denemelere göre büyük ölçüde arttı. Bu nedenle, korku görünüşte azaldıkça, baş eğme de azaldı. Yeniden bir aygıtı maruz kalındığında yaşanan korkunun normal ya da 'durumsal' kaygıyla eşitlenebileceğini varsayarsak (Belzung ve Griebel, 2001). Bu sonuçlar, kafayı eğme davranışının kaygı benzeri bir yanıt tarafından bastırıldığı varsayımıyla çelişir; bu durumda, kafayı eğmenin kaygı benzeri davranışın tersi yönde değişmesini bekleyebildik. Bu çalışmanın sonuçları, delik tahtası görevinde kafayı yere eğmenin neofilik bir yanıtı temsil ettiği varsayımının mutlaka doğru olmadığını göstermektedir. En azından düzeneğe bırakıldığında, kafayı eğmenin deneğin potansiyel bir kaçış yolu bulma girişiminden kaynaklanması muhtemeldir. Bu konu, bir çevre etrafındaki yüksek hareket seviyelerinin hemen neofili veya yenilik arayışının olumlu bir şekilde ödüllendirilmiş bir yönü olarak yorumlanmaması gerektiği için, keşif davranışının koşulsuz davranış testleriyle ilgili daha genel bir sorunu vurgulamaktadır (Welker, 1957).). Yeni bir çevredeki herhangi bir davranış, hem neofili hem de neofobiden etkilenecektir, öyle ki, tek bir davranış ölçüsünün, neofilik veya neofobik eğilimlerin tamamen göstergesi olması olası değildir. Bir sürekliliğin kutupsal uçlarında olmak yerine, neofili ve neofobi birbirinden bağımsız olarak değişebilen iki ortogonal faktör olarak düşünülmelidir (Greenberg, 2003). Kemirgen keşfiyle ilgilenen araştırmacılar için, kafaya daldırma gibi basit önlemlerin, bu iki faktör arasındaki karmaşık etkileşimi kendi başlarına ortaya çıkarmaları pek olası değildir.

Sonuç olarak; deneysel Parkinson oluşturulan ratlarda Naringenin ve Vazointestinal Peptid kombinasyonu kullanımının özellikle motor aktivitelerde önemli iyileşmeler sağladığı ve Alfa-sync geninin kodlamış olduğu alfa-sync protein katlanmasını indüklediği GSK-3 betanın selektif inhibitörlerinin kullanımının arttığı ve parkinson hastalığında tedavi edici özellikte olduğu söyleyebiliriz. Ayrıca çalışmamızın Parkinsonun etyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve buradan yola çıkarak, hastalığa karşı yeni tedavi stratejileri geliştirilebilmesi için aracılık edeceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Parkinson hastalığı kronik inflamasyonun eşlik ettiği, multisistem progresif bir hastalıktır. Post mortem yapılan pek çok araştırma, Parkinson hastalarında çeşitli beyin bölgelerinde gliyozis ve buna bağlı mikrogliyaların sayısında, morfolojisinde ve ekspresyon paterninde değişiklik saptamıştır. Bunun yanında Parkinson hastalığında santral sinir sistemi tutulumundan önce diğer organ ve sistemlerde de patolojik değişimler saptanmıştır. Dolayısıyla Parkinson hastalığında immun sistem aktivasyonu yalnızca beyin ile sınırlı değildir, sirkülasyona katılarak, santral sinir sisteminde fonksiyon gösteren immun hücrelerden ziyade, hastalığın patogenetik mekanizmalarında rol oynayan organ ve sistemlerde bulunan, lokal inflamatuvar ve anti-inflamatuvar reaksiyonları yöneten periferik immun hücrelerin aktivasyonunu da içermektedir.

Araştırmamız Parkinsonun indüklendiği ratlarda, Rotenone ile oluşturulan modelin VIP nöron koruyucu etkisinin Striatumal lokalizasyonda etkili olduğunu, bunun yanında bazı biyokimyasal veriler ve motor testler ışığında elde edilen verilerin, kısmen anlamlı, kısmen anlamsız olduğunu gösterdi.

Parkinson hastalığının erken dönemlerinde diagnostik kriterlerin yetersiz olması, motor belirtilerin gözlenmesinden sonra ise tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle son yıllarda yapılan araştırmalar, hastalığın patogenezinin aydınlatılmasını ve elde edilen bilgiler doğrultusunda erken teşhis ve tedavi kriterlerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan deneysel hayvan modellerinde öncelikle hastalığın patogenezinin uygun deneysel modellerin seçimi gerekmektedir. Ancak bahsettiğimiz üzere, hastalığın patogenezinin en yakın bulguları oluşturan kronik rotenon uygulamasının da, motor sistem üzerine olan bulgularının çalışmalar arasında oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Hedefe yönelik araştırmaların doğru şekilde gerçekleştirilmesinde, kronik rotenon uygulamasında görülen değişken sonuçların, kullanılan deney hayvanının türü, cinsiyeti, yaşı, rotenonun uygulama yolu ve dozu gibi olası sebeplerinin standardizasyonuna yönelik daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Yanlış katlanmış α -syn türlerinin proteazomal işlevi bozup bozmadığı sorusu tartışmalı bir konu olup cevap aranmaktadır. Yaklaşım (in vitro karşı in vivo), hücre modelere (nöronal ve nöronal olmayan) ve kullanılan α -syn türlerinin tipine bağlı olarak

çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (Lindersson ve diğerleri, 2004; Snyder ve diğerleri, 2003; Petrucelli ve diğerleri, 2002; Bence vd. 2001; Tanaka ve arkadaşları 2001; Zhang ve ark. 2008; Tofaris vd 2003). Hücre tipine ve bağlama özgü özelliklerin bu tutarsızlıklardan sorumlu olduğu ve α -syn'in proteazomal aktiviteler üzerindeki inhibitör etkisinin PD'de dopaminerjik nöronların seçici savunmasızlığına katkıda bulunabileceği görülmektedir (Zondler ve ark. 2017).

Sonuç olarak, α -syn sadece proteazom tarafından bozulmakla kalmaz, patojenik α -syn türleri de açık bir şekilde UPS'i tehlikeye atma eğilimine sahiptir, bu da patolojik olarak ilgili bir karşılıklı etkileşimi gösterir. Literatür bilgileri ışığında; alfa-synuclein geni kit çalışması ve protein katlanmasının totalizasyonunun ters etki yaparak VIP ve NG uygulamasının biyokimyasal kısmında anlamlı bir sonuca ulaşamadığımızı, farklı bir düşüklük sonucunun ortaya çıktığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızın lokomotor test sonuçlarına göre; oksidatif stres uygulanan deney düzeneğindeki 5 parametrenin 5'inden de anlamlı sonuçlar alınamamasına rağmen en çok ifade edilmesi beklenen KD hareketi ve Ş hareketinin sonuçları bizim çalışmamızda kullandığımız VIP etkisinin olumlu yönde sonuçlandığını gösterdi. Bunun yanında DS parametresindeki bulgu da VIP kullanılan PD'li grupta oldukça yüksek sonuç ortaya çıkmıştır. Bu deney prosedüründe VIP uygulaması baş eğme veya kafa daldırma sıklığını önemli ölçüde artırdı. Ratların VIP ile koruyucu etkisindeki uygulamasının anksiyolitikler ve anksiyojeniklerdeki farklılıkları ortaya çıkardığı sonucuna ulaşıldı. Hassas ve güvenilir bir deney düzeneği oluşturulmuş olup ratlarda VIP ile oluşturulan deney grubunun NG ile oluşturulan deney grubuna göre oldukça anlamlı bir sonuç elde etmede rolü ve başarısı olduğu söyleyebiliriz.

Deneylelerimiz sırasında yaşadığımız ortam kaynaklı kısıtlılıklar çalışmamızın bazı parametrelerinde beklediğimiz sonuçları elde edememize neden olduğunu ve konu ile ilgili çalışmaların tayini ve tespitinde kullanılacak deneysel metod yöntemlerinin anlamlı bir şekilde belirlenip tekrarlanmasının daha iyi sonuçlar vereceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, Grandinetti A, Blanchette PL, Popper JS, Ross GW. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001, 57, 456–462.
- Abbott RD, Ross GW, White LR, Tanner CM, Masaki KH, Nelson JS, Curb JD, Petrovitch E. Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology* 2005, 65, 1442–1446.
- Abdel-Salam O, Mohammed N, Youness E, Khadrawy Y, Omara E, Sleem, A. Cerebrolysin protects against rotenone-induced oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of Neurorestoratology* 2014, 2, 47-63.
- Abdel-Salam OME, Sleem AA, Youness ER, Yassen NN, Shaffie N, El-Toumy SA. Capsicum Protects Against Rotenone-Induced Toxicity in Mice Brain Via Reduced Oxidative Stress and 5-Lipoxygenase Activation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology Research* 2018, 2(3), 60-77.
- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtomic sections. *The Anatomical Record* 1946, 94, 239-247.
- Adak, S., et al., Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J Biol Chem*, 2001. 276(2): p. 1244-52.
- Adiguzel E, Duzcan SE, Akdogan I, Tufan AC. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003, 2, 6-8.
- Adler CH. Premotor Symptoms and Early Diagnosis of Parkinson's Disease. *International Journal of Neuroscience* 2011, 121(2), 3–8.
- Ahn J, Lee JY, Kim TW, Yoon EJ, Oh S, Kim YK, Kim JM, Woo SJ, Kim KW, Jeon B. Retinal thinning associates with nigral dopaminergic loss in de novo Parkinson disease. *Neurology* 2018, 91 (11), e1003–e1012.

- Ahn JHJ, Lee JS, Cho JH, Park J, Lee T, Song M, Kim H, Kang SH, Won MH, Lee, C. Age-dependent decrease of Nurr1 protein expression in the gerbil hippocampus. *Biomedical Reports* 2018, 8, 517-522.
- Aho VTE, Pereira PAB, Voutilainen S, Paulin L, Pekkonen E, Auvinen P, Scheperjan F. Gut microbiota in Parkinson's disease: Temporal stability and relations to disease progression. *EBioMedicine* 2019, 44, 691-707.
- Akbayır E, Şen M, Ay U, Şenyer S, Tüzün E, Küçükali Cİ. Parkinson Hastalığının Etiyopatogenezi. *Deneyisel Tıp Dergisi* 2017, 7(15), 1-23.
- Alabi AO, Ajayi AM, Ben-Azu B, Omorobge O, Umukoro S. Methyl jasmonate ameliorates rotenone-induced motor deficits in rats through its neuroprotective activity and increased expression of tyrosine hydroxylase immunopositive cells. *Metabolic Brain Disease* 2019, 2019, 1-14.
- Albin, R.L., A.B. Young, and J.B. Penney, The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 1989. 12(10): p. 366-75.
- Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: an Affective Neuroethological Perspective. *Brain Research Reviews* 2007, 56(2), 283-321.
- Alexander, G.E., Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci*, 2004. 6(3): p. 259-80.
- Aras, S., et al., The role of nitric oxide on visual-evoked potentials in MPTP-induced Parkinsonism in mice. *Neurochem Int*, 2014. 72: p. 48-57.
- Asanuma, M., H. Hirata, and J.L. Cadet, Attenuation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic nigrostriatal lesions in superoxide dismutase transgenic mice. *Neuroscience*, 1998. 85(3): p. 907-17.
- Ashour, R. and J. Jankovic, Joint and skeletal deformities in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Mov Disord*, 2006. 21(11): p. 1856-63.
- Atkin, G. and H. Paulson, Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Front Mol Neurosci*, 2014. 7: p. 63.

- Baraboi, V.A., [The role of lipid peroxidation in the mechanism of stress]. *Fiziol Zh*, 1989. 35(5): p. 85-97.
- Berardelli, A., et al., Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, 2001. 124(Pt 11): p. 2131-46.
- Betarbet, R., et al., Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 2000. 3(12): p. 1301-6.
- Birkmayer, W. and O. Hornykiewicz, [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr*, 1961. 73: p. 787-8.
- Bjorklund, A., Hokfelt, T., Lindvall, O., Dopamine-containing systems in the CNS, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, Part I*, A.H. Bjorklund, T. Editor. (in press): Amsterdam: Elsevier. p. 55-122. 58.
- Bourre, J.M., et al., The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr*, 1989. 119(12): p. 1880-92.
- Bove, J. and C. Perier, Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2012. 211: p. 51-76.
- Bredt, D.S., C.D. Ferris, and S.H. Snyder, Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem*, 1992. 267(16): p. 10976-81.
- Bredt, D.S., et al., Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 1991. 7(4): p. 615-24.
- Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky, Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1822(2): p. 261-85.
- Brodal, P., *The Central Nervous System: Structure and Function*. 2010: Oxford University Press.
- Buse, J., et al., Neuromodulation in Tourette syndrome: dopamine and beyond. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013. 37(6): p. 1069-84.

- Calne, D.B., et al., Bromocriptine in Parkinsonism. *Br Med J*, 1974. 4(5942): p. 442-4.
- Camicioli, R., et al., Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy. *Mov Disord*, 2003. 18(7): p. 784-90. 59
- Carlsson, A., et al., On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 1958. 127(3296): p. 471. 57
- CH, W., *Parkinson Hastalığının Tanısı ve Tedavisi*. 2000, İstanbul: Turgut Yayıncılık ve Tic. A.ş.
- Chase, A., Parkinson disease: Traumatic brain injury increases the risk of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*, 2015. 11(4): p. 184.
- Chinta, S.J. and J.K. Andersen, Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(5): p. 942-6.
- Clancy, R.M., et al., Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(9): p. 3680-4.
- Cohen, G., Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*, 1984. 5(1): p. 77-82.
- Cooper, J.A., et al., Slowed central processing in simple and go/no-go reaction time tasks in Parkinson's disease. *Brain*, 1994. 117 (Pt 3): p. 517-29.
- Cory-Slechta, D.A., et al., Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(9): p. 1263-70.
- Cossette, M., D. Levesque, and A. Parent, Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005. 11(5): p. 277-86.
- Dauer, W. and S. Przedborski, Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003. 39(6): p. 889-909.
- Dawson, V.L. and T.M. Dawson, Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res*, 1998. 118: p. 215-29.
- Day, B.J., et al., A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(22): p. 12760-5.
- de Almagro, M.C. and D. Vucic, The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical

- regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*, 2012. 34(3): p. 200-11. 61
- de Rijk, M.C., et al., Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*, 2000. 54(11 Suppl 5): p. S21-3.
- Drechsel, D.A. and M. Patel, Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 2008. 44(11): p. 1873-86.
- Dzamko, N., C.L. Geczy, and G.M. Halliday, Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2014.
- Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*, 1997. 57(10): p. 1835-40.
- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz, [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, 1960. 38: p. 1236-9.
- Ehringer, W., et al., A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids*, 1990. 54(2): p. 79-88.
- Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(4): p. 495-516.
- Eriksen, J.L., Z. Wszolek, and L. Petrucelli, Molecular pathogenesis of Parkinson disease. *Arch Neurol*, 2005. 62(3): p. 353-7.
- Fahn, S. and D. Sulzer, Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx*, 2004. 1(1): p. 139-54.
- Favaloro, B., et al., Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 2012. 4(5): p. 330-49.
- Feng, J., Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins. *Neuroscientist*, 2006. 12(6): p. 469-76.
- Fix, J.D., Basal Ganglia and the Striatal Motor System". *Neuroanatomy (Board Review Series) (4th ed.)*. Baltimore: Wulters Kluwer & Lippincott Wiliams & Wilkins. . 2008. 274-281.

- Florent, S., et al., Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J Neurochem*, 2006. 96(2): p. 385-95.
- Galvan, A. and T. Wichmann, Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol*, 2008. 119(7): p. 1459-74.
- Gilroy, J., *Basic Neurology*. Third Edition. International Edition ed. 2000.
- Giovanni, A., P.K. Sonsalla, and R.E. Heikkila, Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 270(3): p. 1008-14.
- Giros, B. and M.G. Caron, Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci*, 1993. 14(2): p. 43-9.
- Gutteridge, J.M., Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*, 1994. 91(2-3): p. 133-40.
- Hancock, D.B., et al., Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol*, 2008. 8: p. 6.
- Hantraye, P., et al., Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med*, 1996. 2(9): p. 1017-21.
- Henderson, J.M., et al., Degeneration of the centre median-parafascicular complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2000. 47(3): p. 345-52.
- Hornykiewicz, O., The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*, 2006(70): p. 9-15.
- Huang, Y., et al., Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. 46(1): p. 44-70.
- Hughes, A.J., et al., A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 1993. 50(2): p. 140-8.
- Ichijo, H., et al., Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 1997. 275(5296): p. 90-4.
- Jackson-Lewis, V. and S. Przedborski, Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc*, 2007. 2(1): p. 141-51.

- Jankovic, J., Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008. 79(4): p. 368-76.
- Javoy, F., et al., Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 1976. 102(2): p. 201-15.
- Kachroo, A., M.C. Irizarry, and M.A. Schwarzschild, Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Exp Neurol*, 2010. 223(2): p. 657-61.
- Kebabian, J.W. and D.B. Calne, Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 1979. 277(5692): p. 93-6.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
- Kidd, P.M., Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev*, 2000. 5(6): p. 502-29.
- Kienast, T. and A. Heinz, Dopamine and the diseased brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2006. 5(1): p. 109-31.
- Klein, C. and A. Westenberger, Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(1): p. a008888.
- Komatsu, W., et al., Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2003. 34(8): p. 1006-16.
- Komeima, K., et al., Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem*, 2000. 275(36): p. 28139-43.
- Kuopio, A.M., et al., Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology*, 1999. 52(2): p. 302-8.
- Langston, J.W., et al., Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 1983. 219(4587): p. 979-80.

- Lavrik, I.N. and P.H. Krammer, Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*, 2012. 19(1): p. 36-41.
- Lee, K.W., et al., Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates MPTP toxicity and regulates glial activation. *PLoS One*, 2012. 7(1): p. e29935.
- Levy, G., The relationship of Parkinson disease with aging. *Arch Neurol*, 2007. 64(9): p. 1242-6.
- Liberatore, G.T., et al., Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*, 1999. 5(12): p. 1403-9.
- Liu, X., N. Yamada, and T. Osawa, Amide-type adduct of dopamine - plausible cause of Parkinson diseases. *Subcell Biochem*, 2014. 77: p. 49-60.
- Lozza, C., R.M. Marie, and J.C. Baron, The metabolic substrates of bradykinesia and tremor in uncomplicated Parkinson's disease. *Neuroimage*, 2002. 17(2): p. 688-99.
- Luthman, J., et al., Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res*, 1989. 33(3): p. 267-77.
- Manning-Bog, A.B., et al., The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2002. 277(3): p. 1641-4.
- Maragakis, N.J. and J.D. Rothstein, Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006. 2(12): p. 679-89.
- Mercuri, N.B., et al., Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience*, 1997. 79(2): p. 323-7.
- Mink, J.W., Basal ganglia, *Fundamental Neuroscience*. Vol. Chapter 34. 1999, U.S.A. : Academic press.
- Mladenovic, A., et al., 6-Hydroxydopamine increases the level of TNFalpha and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *Brain Res*, 2004. 996(2): p. 237-45. 60
- Murakami, T., et al., Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2004. 55(3): p. 439-42.

- Pakkenberg, B., et al., The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1991. 54(1): p. 30-3.
- Pan, T., et al., The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*, 2008. 131(Pt 8): p. 1969-78.
- Parkinson, J., An essay on the Shaking Palsy. Whiitnham and Rowland:London., 1817.
- Parr-Brownlie, L.C. and B.I. Hyland, Bradykinesia induced by dopamine D2 receptor blockade is associated with reduced motor cortex activity in the rat. *J Neurosci*, 2005. 25(24): p. 5700-9.
- Perier, C., J. Bove, and M. Vila, Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond. *Antioxid Redox Signal*, 2012. 16(9): p. 883-95.
- Popescu, A., et al., Lewy bodies in the amygdala: increase of alpha-synuclein aggregates in neurodegenerative diseases with tau-based inclusions. *Arch Neurol*, 2004. 61(12): p. 1915-9.
- Przedborski, S. and T.M. Dawson, The role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Methods Mol Med*, 2001. 62: p. 113-36.
- Przedborski, S., Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005. 11 Suppl 1: p. S3-7.
- Rauhala, P., A.M. Lin, and C.C. Chiueh, Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J*, 1998. 12(2): p. 165-73. 56
- Reeve, A., E. Simcox, and D. Turnbull, Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev*, 2014. 14: p. 19-30.
- Riley, D., et al., Frozen shoulder and other shoulder disturbances in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989. 52(1): p. 63-6.
- Roche, H.M., Unsaturated fatty acids. *Proc Nutr Soc*, 1999. 58(2): p. 397-401.
- Roede, J.R. and D.P. Jones, Thiol-reactivity of the fungicide maneb. *Redox Biol*, 2014. 2: p. 651-5.
- Rowland, L., Merritt's Neurology. Vol. 10. Baskl. 2000: LippincottWilliams&Wilkins.

- Rylander, D., et al., A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. *Neurobiol Dis*, 2010. 39(3): p. 352-61.
- Saner, A. and H. Thoenen, Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol*, 1971. 7(2): p. 147-54.
- Savitt, J.M., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1744-54.
- Sawle, G., *Movement Disorders in Clinical Practice*. Lee Smith&PaulWilkinson of InPerspective Ltd. 1999.
- Schapira, A.H., Mitochondria in the etiology of Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol*, 2007. 83: p. 479-91.
- Serge Przedborski, M.V., MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity. *Clinical Neuroscience Research*, 2001. 1: p. 407–418.
- Siow, T.Y., et al., In vivo evidence of increased nNOS activity in acute MPTP neurotoxicity: a functional pharmacological MRI study. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 964034.
- Smith, Y., et al., Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 2012. 37(1): p. 213-46.
- Snow, B.J., et al., Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000. 68(3): p. 313-6.
- Stillwell, W., W. Ehringer, and L.J. Jenski, Docosahexaenoic acid increases permeability of lipid vesicles and tumor cells. *Lipids*, 1993. 28(2): p. 103-8.
- Su, X., et al., Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2008. 29(11): p. 1690-701.
- Talpade, D.J., et al., In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J Neurochem*, 2000. 75(6): p. 2611-21.
- Teravainen, H., et al., The age of onset of Parkinson's disease: etiological implications. *Can J Neurol Sci*, 1986. 13(4): p. 317-9.
- Tieu, K., H. Ischiropoulos, and S. Przedborski, Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 2003. 55(6): p. 329-35.

- Unal Gulsuner, H., et al., Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(51): p. 18285-90.
- Ungerstedt, U., 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 1968. 5(1): p. 107-10.
- Venderova, K. and D.S. Park, Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(8).
- Verstraeten, A., J. Theuns, and C. Van Broeckhoven, Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet*, 2015. 31(3): p. 140-9.
- Vierregge, P. and I. Heberlein, Increased risk of Parkinson's disease in relatives of patients. *Ann Neurol*, 1995. 37(5): p. 685.
- Wakabayashi, K., et al., The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*, 2007. 27(5): p. 494-506.
- Wenning, G.K., et al., Progression of falls in postmortem-confirmed parkinsonian disorders. *Mov Disord*, 1999. 14(6): p. 947-50.
- Weylandt, K.H., et al., Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2012. 97(3-4): p. 73-82.
- Youdim, K.A., A. Martin, and J.A. Joseph, Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci*, 2000. 18(4-5): p. 383-99.
- Yu, S.W., et al., Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 2002. 297(5579): p. 259-63.
- . Liou, H.H., et al., Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology*, 1997. 48(6): p. 1583-8.
76. Williams, D.R., H.C. Watt, and A.J. Lees, Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006. 77(4): p. 468-73.