



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARELERDE ROTENONE İLE OLUŞTURULMUŞ
PARKINSON MODELİNDE, TERAZOSİN'İN ETKİNLİĞİ**

İbrahim ONARAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-8428 proje kodu ile desteklenmiştir**

ISPARTA – 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

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

Tez Savunma Tarihi: 01/08/2023

Danışman : Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D

Üye : Doç. Dr. Kanat GÜLLE
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji A.B.D

Üye : Prof. Dr. Mustafa SOYÖZ
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Üye : Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Hücre Biyolojisi A.B.D.

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

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Farelerde Rotenone İle Oluşturulmuş Parkinson Modelinde, Terazosin’in Etkinliği” adlı Doktora tezi, Suleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın baştan sona kadar kendi projem olduğunu, verileri ve örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı ve yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranış içinde olmadığımı beyan ederim.


Tezi Hazırlayan

İbrahim ONARAN

İmza

Danışman

Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOğLU



Annem Kadriye ONARAN (1942 – 2002) anısına ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Zorlu tez sürecinde teşekkür edebilme noktasında bu satırların yeterli olmadığını farkındayım;

Kendisine ne zaman danışsam kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu süreç içerisinde katkı ve desteğini üzerimden esirgemeyen akademik hayatıma başladığım günden itibaren daima bana ışık tutan saygıdeğer ikinci danışmanım Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Çalışma süresince beni teşvik edip cesaret veren, tüm zorlukları benimle göğüsleyen, geçmiş hayatımın her evresinde bana destek olup mutlu kılan ve gelecekte de hayatımda olmasını dileğim değerli dostum ve can arkadaşım Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a,

Gece gündüz farketmeden kıymetli zamanını bana ayıran ve çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki bilim hayatında çok başarılı olacağına inandığım değerli mesai arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Vehbi Atahan TOĞAY'a,

Çalışmamın başarılı olması için özellikle laboratuvar kısmında gösterdiği emek, özen, sabır ve motivasyonu için kıymetli mesai arkadaşım Dr. Dilek AŞCI ÇELİK'e,

Bilgi birikimini, deneyimini ve emeğini özveriyle benimle paylaşan, tezimin laboratuvar kısmını anlamama ve yönlendirmeme yardımcı olan değerli mesai arkadaşım Dr. Gülçin YAVUZ TÜREL'e,

Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal analizlerde bana yardımcı olan ve zor zamanlarımda yükümü azaltmak için elinden geleni yapan can dostum Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Aydın CANDAN'a,

Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal analizlerde bana yardımcı olan birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Doç. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e,

Tez izleme komitem ve mezuniyet jürimde yer alan ve fikirleri ile destek olan Doç. Dr. Kanat GÜLLE hocama,

Mezuniyet jürimde yer alan, fikirleri ile destek olan ve yıllar önce beraber çalışabilme mutluluğunu yaşadığım Prof. Dr. Mustafa SOYÖZ hocama,

Mezuniyet jürimde yer alan ve fikirleri ile destek olan Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLEMİŞ hocama,

Kıymetli zamanını bana ayıran ve tezimde bana destek olan arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Yusuf TEPEBAŞI hocama,

Hayvan deneyleri süresince bana destek olan ve birlikte çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum SDÜ-HÜDAL personeli arkadaşlarım, Veteriner Sağlık Teknikeri Turgut KURT ve Veteriner Sağlık Teknikeri Alaattin GELENDOS'a,

Kıymetli zamanını bana ayıran ve tezimde bana destek olan İSUBU Ziraat Fakültesi'den arkadaşım ve dostum olan Prof. Dr. Osman GÖKDOĞAN hocama,

Tezimin kritik aşamasında, almanca çeviri konusunda yardımını ve bilgisini esirgemeyen, Özel Alman Lisesi çevirmeni, kuzenim Berrin ELMACI'ya,

Beni türlü fedakârlıklarla yetiştiren, benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük nasibim olan rahmetli anneme, babama,

Bu satırlarda teşekkür edemediğim, üzerimde ve tezimde emeği olan herkese, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hatalar yapılmasa affetmenin güzelliği olmazmış hayatta, şayet zülfüyâre dokunduk isek affımı dilerim.

Tezime, maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje numarası: TDK-2021-8428) teşekkür ederim.

İbrahim ONARAN
ISPARTA, 2023

ÖZET

Farelerde Rotenone İle Oluşturulmuş Parkinson Modelinde, Terazosin'in Etkinliği

Parkinson hastalığı (PH), günümüzde dünya genelinde 10 milyon hastalık yükü oluşturan ve ilerleyici nöron kaybı ile karakterize en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan bir tanesidir. Yapılan çalışmalar, yaşla birlikte insidansı katlanarak artan nörodejeneratif hastalıklarda, bozulmuş enerji metabolizması sonucu ATP seviyelerinde azalma veya mitokondrilerin daha az ATP üreterek daha az verimli hale gelmesi ve toksik ROS üretiminin artışı sonucu, ATP'ye bağlı onarım mekanizmalarının engellediği gerçeğini ortaya koymaktadırlar. Kinazolin çekirdekli heterosiklik bir bileşik olan Terazosin'nin (TZ) fosfoglisero kinaz 1 (Pgk1)'e bağlanıp Pgk1 aktivasyonu yoluyla glikolizi hızlandırarak ATP üretimini arttırdığı, böylelikle PH'nin nörodejenerasyonunu yavaşlatarak veya önleyerek nöronları koruduğu ileri sürülmektedir. TZ'nin nöroprotektif özellikler gösterdiği kanıtlanmış olsa da, alfa-sinüklein agregasyon değişiklikleri ile sonuçlanan bir dizi farklı olası mekanizması halen belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamız, TZ'nin nöroprotektif ve antiagregatif mekanizmaları anlamak için tasarlanmıştır. Çalışmada, 6-8 aylık 30-35 gr ağırlığında ve her grupta 8 ila 12 adet olacak şekilde 7 gruba ayrılmış toplam 68 adet Swiss erkek fare kullanılmıştır. Farelere, 1,2 mg/kg/2gün dozda Rotenone subkutan yolla üç hafta boyunca uygulanarak PH modeli oluşturulmuş, ardından, PH'li farelere 10 µg/kg/2gün TZ intraperitoneal olarak verilmiştir. Silindir spontan aktivite testi ile farelerin motor fonksiyon kayıpları belirlenmiştir. Comet metodu ile striatal bölgedeki DNA hasarı tespit edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu ile alfa-sinüklein (SNCA, PARK1) ve tirozin hidroksilaz (TH) genlerinde meydana gelen ekspresyon değişiklikleri belirlenmiştir. Lewy cisimciği (LC) oluşumu ve nöron hasarı gibi değişimler histopatolojik olarak gösterilmiştir. Ayrıca, Lewy cisimciklerinin içeriğinde bulunması beklenen alfa-sinüklein ile dopaminin sentezinde görev alan tirozin hidroksilaz immünohistokimyasal olarak da araştırılmıştır. Terazosin, rotenone kaynaklı oluşan DNA hasarının tamirinde veya motor fonksiyonların iyileşmesinde etkili olamasa da ($p>0.05$), özellikle SNCA geninin ekspresyonunun azaltılmasında ve alfa-sinüklein agregatlarının çözülmesinde etki göstermiştir ($p<0.05$). TZ'nin fareler üzerinde rotenone ile indüklenen Parkinson modelinde kısmi nöroprotektif ve alfa-sinüklein anti-agregatif etkisi, TZ'nin sistemik olarak PGK1 aracılı ATP seviyelerini artırmasına ve böylece PH'nin enerji metabolizması üzerindeki olumsuz etkisini iyileştirmesine bağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Parkinson Hastalığı, Rotenone, Terazosin, Alfa-Sinüklein, PGK1, ATP

ABSTRACT

Efficacy of Terazosin in Rotenone induced Parkinson's Disease Model in Mice

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases characterized by progressive neuronal loss, accounting for 10 million disease burden worldwide. Studies reveal that, in neurodegenerative diseases, the incidence of which increases exponentially with age, ATP-dependent repair mechanisms are inhibited as a result of decreased ATP levels due to impaired energy metabolism or mitochondria becoming less efficient by producing less ATP and increased production of toxic ROS. Terazosin (TZ), a heterocyclic compound have a quinazoline core, is proposed to bind to phosphoglycerol kinase 1 (Pgk1) and accelerating glycolysis by increase ATP production through Pgk1 activation, thereby protecting neurons by slowing or preventing neurodegeneration of PD. Although TZ has been shown to exhibit neuroprotective properties, a number of different possible mechanisms resulting in altered alpha-synuclein aggregation remain unclear. Our study was designed to understand the neuroprotective and antiaggregative mechanisms of TZ. A total of 68 male Swiss mice aged 6-8 months, weighing 30-35 g and divided into 7 groups of 8 to 12 mice per group were used in the study. Rotenone at a dose of 1.2 mg/kg/2day was administered subcutaneously to mice for three weeks to create PD model, followed by intraperitoneal administration of 10 µg/kg/2 day Terazosin to mice with PD. Cylinder spontaneous activity test was used to determine the loss of motor function in mice. DNA damage in the striatal region was determined by the Comet method. Expression changes in alpha-synuclein (SNCA, PARK1) and tyrosine hydroxylase (TH) genes were determined by quantitative real-time polymer chain reaction (qRT-PCR). Changes such as Lewy body (LB) formation and neuronal damage were shown histopathologically. In addition, alpha-synuclein, which is expected to be present in Lewy bodies, and tyrosine hydroxylase, is involved in the synthesis of dopamine, were investigated immunohistochemically. Although terazosin was not effective in the repair of rotenone-induced DNA damage or recovery of motor functions ($p > 0.05$), it was especially effective on reducing the expression of SNCA gene and dissolving alpha-synuclein aggregates ($p < 0.05$). The partial neuroprotective and alpha-synuclein anti-aggregative effect of TZ in a rotenone-induced parkinsonian model on mice may be attributed to TZ systemically increasing PGK1-mediated ATP levels, thereby ameliorating the adverse effect of PD on energy metabolism.

Keywords: Parkinson's disease, Rotenone, Terazosin, Alpha-Synuclein, PGK1, ATP

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	2
BEYAN	i
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Parkinson Hastalığı Tariçesi, Epidemiyolojisi ve Tanısı	5
2.2. Parkinson Hastalığı ve Alfa-Sinüklein	7
2.3. Parkinson Hastalığı ve Dopamin	15
2.4. Rotenone ve PH Hayvan Modellemesi	18
2.5. Terazosin	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Gereçler	24
3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar	24
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Çalışma Dizaynı	26
3.2.2. Silindir spontan aktivite testi	28
3.2.3. Comet Metodu	28
3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.2.5. Histokimya ve İmmünohistokimya	31
3.2.5.1. Rutin Histolojik Takip Yöntemi	31
3.2.5.2. Fare Beyin Dokusu Kesitlerinde Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama	32
3.2.6. İmmünohistokimyasal Boyama	33
3.2.6.1. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı	33
3.2.7. İstatistik Değerlendirmeler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Motor Fonksiyon Testi	36
4.2. DNA Hasarı	39
4.3. Gen Ekspresyonu	40
4.4. Histopatolojik Bulgular	43

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	49
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	70
EK A. ETİK KURUL KARARI	80
ÖZGEÇMİŞ.....	81



TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar	24
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	25
Tablo 3.3. Çalışmada uygulanan kimyasallar ile ilgili bilgiler	26
Tablo 3.4. Çalışma grupları ve uygulama süreleri ile kullanılan deney hayvanı sayıları.....	27
Tablo 3.5. Comet metodunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı	29
Tablo 3.6. Genler ve genlere spesifik primer dizilimleri.....	31
Tablo 3.7. Gerçek zamanlı qPCR cihazında kullanılan termal döngü	31
Tablo 3.8. Skrolama tablosu.....	33
Tablo 4.1. Farelerin ortalama ağırlıkları (gr).....	36
Tablo 4.2. Farelerin motor fonksiyon kabiliyetlerinin değerlendirilme sonuçları	37
Tablo 4.3. Ortalama DNA hasar miktarları	39
Tablo 4.4. SNCA geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler	41
Tablo 4.5. TH geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler.....	41
Tablo 4.6. Fare Beyin Dokularının Hematoksilen-Eozin Boyamalarının Değerlendirmesi	44
Tablo 4.7. Alfa- Beta Sinuklein ve Tirozin Hidroksilaz İşaretlenme Dereceleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Parkinson hastalığında mekanizmalar	7
Şekil 2.2. PH'de Lewy patolojisi. A: H ve E ile boyanmış melanize SNc nöronunda Lewy cisimcikleri. B: Ubiquitin ile boyanmış melanize SNc nöronundaki sitoplazmik protein birikimleri. C: Ubiquitin (kırmızı) ve alfa-sinüklein (sarı) ile boyanmış SNc nöronunda Lewy cisimciklerinin konfokal mikroskopik görüntüsü. D: Ubiquitin ile boyanmış intranöronal Lewy nöritleri (50).	8
Şekil 2.3. Alfa-sinükleinin yapısal çeşitliliği (58)	10
Şekil 2.4. Alfa-sinüklein monomerlerinin üç boyutlu modelleri (58)	10
Şekil 2.5. Dopamin metabolizması: COMT (katekol O-metil transferaz); MAO (monoaminoksidaz), DAT (dopamin taşıyıcısı) (101).	18
Şekil 2.6. Rotenone'un kimyasal yapısı (119)	19
Şekil 2.7. Rotenone kaynaklı dopaminerjik hücre ölüm yolağı (25, 126)	20
Şekil 2.8. Terazosin'in moleküler yapısı (127)	21
Şekil 2.9. Terazosin'in genel etki mekanizması (141)	22
Şekil 3.1. Spontan silindir aktivite testi düzeneği	28
Şekil 4.1. Motor fonksiyon kabiliyetlerinin karşılaştırılması *: Grup 1, 2, ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$)	38
Şekil 4.2. SNCA ve TH genlerinin ekspresyon seviyeleri. Sonuçlar, referans genlere göre normalize edilmiştir. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$)	42

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. Kontrol grubuna ait beyin dokusunun normal histolojik görüntüsü (H-E, AX10 ve A1X40).....	45
Resim 4.2. Çözücü kontrol (DMSO) grubuna ait fare beyin dokusunun normal histolojik görüntüsü (H-E, BX10 ve B1X40).	45
Resim 4.3. Bir hafta yalnızca terazosin uygulanan grup 7'ye ait fare beyin dokusunun histolojik görüntüsü (H-E, CX10 ve C1X40).	46
Resim 4.4. Üç hafta yalnızca terazosin uygulanan grup 6'ya ait beyin dokusunun histolojik görüntüsü (H-E, DX10 ve D1X40).	46
Resim 4.5. Üç hafta rotenone uygulanan grup 3'ün beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Siyah oklar hemorajik alanları ve mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir (H-E, EX10 ve E1X40).....	47
Resim 4.6. Üç hafta rotenone uygulanan grup 3'ün beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Yeşil oklar nöropil vakualizasyonunu, sarı ok nöron dejenerasyonunu ve kırmızı ok ise lewy cisimciğini göstermektedir (H-E, EX10 ve E1X40).	47
Resim 4.7. Üç hafta rotenone ve bir hafta terazosin uygulanan grup 5'in beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Siyah ok hemorajik alanı, yeşil ok nöropil vakualizasyonunu, sarı ok nöron dejenerasyonunu ve kırmızı ok ise lewy cisimciğini göstermektedir (H-E, FX10 ve F1X40).	48
Resim 4.8. Üç hafta rotenone ile birlikte üç hafta terazosin uygulanan grup 4'ün beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Yeşil oklar nöropil vakualizasyonunu ve kırmızı ok ise lewy cisimciğini göstermektedir (H-E, GX10 ve G1X40).	48
Resim 4.9. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile -/+ derecedeki immün boyaması, x20.....	50
Resim 4.10. DMSO grubuna ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile -/+ derecedeki immün boyaması, x20.....	50
Resim 4.11. Grup 3'e ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile ++ derecedeki immün boyaması, x20.	51
Resim 4.12. Grup 5'e ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile +++ derecedeki immün boyaması, x20.	51
Resim 4.13. Grup 4'e ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile + derecedeki immün boyaması, x20.	52
Resim 4.14. Grup 7'ye ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile +/- derecedeki immün boyaması, x20.	52
Resim 4.15. Grup 6'ya ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile +/- derecedeki immün boyaması, x20.	53
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/+ derecedeki immün boyaması, x20.	53

Resim 4.17. Çözücü kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/++ derecedeki immün boyaması, x20.	54
Resim 4.18. Grup 3'e ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile + immün boyaması, x20.	54
Resim 4.19. Grup 5'e ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile ++/+ immün boyaması, x20.	55
Resim 4.20. Grup 4'e ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile ++ immün boyaması, x20.	55
Resim 4.21. Grup 7'ye ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/++ immün boyaması, x40.	56
Resim 4.22. Grup 6'ya ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/++ immün boyaması, x40.	56



SEMBOLLER ve KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AS	: Alfa-Sinüklein
ATP	: Adenozin trifosfat
BG	: Bazal gangliyonlar
Camp	: Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
DA	: Dopamin
DAT	: Dopamin Taşıyıcı
DLC	: Demans Lewy cismi kaynaklı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DN	: Dopaminerjik nöron
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
DR	: Dopamin reseptörü
G6PD	: Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HCl	: Hidroklorik Asit
İP	: İntraperitoneal
KCl	: Potasyum Klorür
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
Kg	: Kilogram
L	: Litre
LCB	: Lewy cisim bozukluğu
LN	: Lewy nöritleri
LC	: Lewy Cisimcikleri
LMA	: Düşük Erime Noktaları Agaroz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MPTP	: 1-metil, 4-fenil, 1,2,3,6-tetrahidropiridin
mRNA	: Haberci RNA
NG	: Nanogram

NM	: Nanometre
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NMA	: Normal Erime Noktalı Agaroz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PFY	: Pentose Fosfat Yolağı
PH	: Parkinson Hastalığı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
QRT-PCR	: Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SC	: Subkutan
SH-SY5Y	: İnsan Nöroblastom Hücre Hattı
SN	: Substantia Nigra
SNe	: Substantia Nigra Pars Compacta
TH	: Tirozin Hidroksilaz
TZ	: Terazosin
UPS	: Ubikitin-Proteozom Sistem
VMAT	: Veziküler monoamin taşıyıcıları
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µg	: Mikrogram

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), alfa-sinükleinin (AS) yaygın şekilde yanlış katlanması sonucu oluşan bir proteinopatidir. İleri yaşlarda en sık görülen nörodejeneratif hareket bozukluğu ile karakterize PH'da, dopaminerjik nigrostriatal ve diğer nöron sistemlerinin ilerleyici dejenerasyonu nedeniyle ortaya çıkan istirahat tremoru, rijidite, bradikinezi ve beden pozisyonu dengesizlikleri gibi motor ve motor olmayan bilişsel ve limbik/otonom bozukluklar klinik öneme sahiptir. Bu durum, substantia nigra pars combacta (SNc) ve diğer subkortikal çekirdeklerdeki pigmentli nöronların kaybına ve sitoplazmik Lewy cisimcikleri (LC) ile distrofik Lewy nöritlerinin (LN) yaygın olarak bulunmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Dopamin eksikliği ve diğer biyokimyasal ve nöronal yetersizlikler hastalığın klinik tablosunu oluşturmaktadır. Bunun yanında, beyin sapı tipi Lewy cisim bozukluğu (LCB) (1) olarak da adlandırılan PH veya AS tipi parkinsonizmin dışında, parkinsonizmin farklı nedenleri de bulunmaktadır (2).

Özellikle beynin substantia nigra pars combacta ve pontin locus ceruleus bölgelerinde görülen depigmentasyon, nöronal kayıp ve gliosis gibi durumlar neticesinde Parkinson Hastalığı görülür. Ayrıca, vagus dorsal nükleus ve diğer beyin kökü nükleuslarında da nöronal dejenerasyon gözlenir. Sağlıklı kişilerde Substantia Nigra (SN) pigment nöronlarının sayısı 550.000 olarak bilinirken, Parkinson Hastalarında sayı %66 oranında düşmektedir (3). Ayrıca, normalde 260.000 olan pigmentsiz nöronların PH durumunda %24 oranında düştüğü tespit edilmiştir. Parkinson Hastalığının ilk belirtileri görüldüğünde genellikle substantia nigra pars combacta nöronlarının %60'ı kaybedilmiştir ve bu durum hastalığın erken döneminde ciddi bir nöronal kayıp olduğunu gösterir (4). Bununla beraber, Parkinson Hastalarında hipokampus bölgesinde belirgin bir küçülme yani atrofi de görülmektedir (5).

Lewy cisimcikleri, alfa-sinüklein proteininin anormal birikimi neticesinde ortaya çıkan ve sinir hücrelerinin iletişimi etkileyerek düşünce, hareket, davranış ve ruh hali gibi problemlere yol açabilen PH'nın ana belirteçleridir. AS, doğal halinde katlanmayan bir proteindir (6). Ancak *SNCA* geninde meydana gelen mutasyonlar veya oksidatif stres gibi Parkinson Hastalığı mekanizmaları neticesinde, sitoplazmada

yanlış bir şekilde katlanarak agregasyonun başlamasına sebep olur. Alfa-sinüklein, mitokondriyal ve ubiquitin-proteozom sistemi (UPS) gibi mekanizmalara zarar vererek tekrarlar halinde protein birikmesine ve hücre ölümüne yol açan bir kısır döngüye neden olur. Dopaminerjik Nöronlar (DN)'lerdeki, dopamin sentezinin sınırlayıcı enzimi olan Tirozin Hidroksilazın (TH) aktivitesini engelleyerek Dopamin salınmasını inhibe ettiği de ifade edilmiştir. Bunun aksine, hücrelerde alfa-sinükleinin ifade edilmemesi, tirozin hidroksilaz aktivitesini ve dolayısıyla dopamin sentezini indükler (7). DA'nın sinir hücrelerinde birikmesi de toksik etkilere, oksidatif strese ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açabilir (8).

Parkinson Hastalığı'nın temel nedeni henüz bilinmemekle birlikte; AS protein birikiminin, mitokondri işlev bozukluklarının ve oksidatif hasarın hastalığın oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmekte olup ayrıca çevresel faktörler, genetik yatkınlık, yaşlanma ve bazı travmaların da etkin olduğu bilinmektedir (9).

PH vakalarının çok büyük bir kısmında sebebin bilinmemesi, çevresel maruziyetlerin PH'ye sebep olabileceği inancını kuvvetlendirmektedir. Pestisitlerin bu hastalıklar arasında yaygın olarak bilinen etkisi nörotoksisitedir. Kronik pestisit maruziyetinin ALS, Alzheimer ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklarla bağlantısı gösterilmiştir (10).

Çevresel koşulların ve etkenlerin iyi anlaşılması, uzun vadede hem hastalığın önlenmesinde hem de tedavisine giden yolda önemli bir adımdır. PH'yi hayvan modelleri ile çalışmak gen – çevre ilişkisini ve patoloji mekanizmasını anlamayı kolaylaştıracağından oldukça önemlidir (11). İnsanlarda deneysel parkinson modelinin oluşturulması mümkün olmadığı için çalışmalar ağırlıklı deney hayvanlarına yönelmiştir. Parkinson modelleri deney hayvanlarında oluşturularak değişik ilaçların modeller üzerinden test edilmesi yoluna gidilmiştir. Parkinson modeli oluşturmak amacıyla seçici olarak dopaminerjik nöronları tahrip ettiği bilinen nörotoksinler olan rotenone, 6-OHDA, MPTP, parakuat ve maneb kullanılmaktadır (12).

Rotenone, *Lonchocarpus* ve *Derris* cinsi bitkilerin köklerinden elde edilen ve doğal oluşan bir insektisittir. Yüksek lipofilik özelliği sahip bir pestisit olan rotenone, taşıyıcılara ihtiyaç duymaksızın kan-beyin bariyeri dahil bilinen tüm biyolojik zarlara kolayca aşabilmektedir (13). Nörotoksik etki mekanizması tüm yönleriyle açıklığa

kavuşturulamamış olan rotenone'un mitokondriyal kompleks 1'e bağlanarak inhibe ettiği ve bozulan elektron akışı nedeniyle de ATP üretiminin azaldığı bilinmektedir (14, 15).

Deney hayvanlarında, rotenone modeli diğer bazı non-invaziv ve invaziv nörotoksik kimyasal modellere kıyasla klasik PH'nin çoğu özelliğini daha başarılı bir şekilde indüklemeye yeteneği gösterir. Bu model, klinik tablonun; DN kaybını, AS içeren Lewy cisimciklerini, kısmen tremoru ve düşük motor fonksiyonlarını önemli ölçüde taklit edebilir (16-18). Ayrıca rotenone ile indüklenen deneysel PH modelinde, çoğu zaman insanlarda görülen bazı davranışsal ve bilişsel özelliklerin yanında (17) gastrointestinal nöropatilerin oluşması da sağlanabilmiştir (19, 20).

Parkinson hastalarının %95'i gen ve çevre ilişkisi sonucu ortaya çıkan idiyopatik vakalardır (21, 22) ve sebebinin ortaya konmasında yaşanan güçlükler ciddi zaman, para hatta emek kaybına sebep olmaktadır (23). DSÖ tahminleri eğer çözüm bulunmazsa nörodejeneratif hastalıkla yaşayan insan sayısının 2040 yılında 70 milyonu, 2050 yılında da 106 milyonu aşabileceğini ve yapılan sağlık harcamalarının da ciddi oranda artacağını göstermektedir (24). İnsan ömrünün artmasıyla birlikte bu durumun sosyal güvenlik sistemleri açısından da ciddi bir yük oluşturabileceği düşünülebilir. Dolayısı ile hastalığın sebeplerinin bulunarak mekanizmaların daha iyi anlaşılması büyük önem arz etmektedir ve bunun için kaynak ayrılması gerekmektedir (25).

Terazosin (TZ), ilk olarak 1987 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından hipertansiyon tedavisi için onaylandıktan sonra, 1993 yılından bu yana benign prostat hiperplazisi (BPH) semptomatik tedavisi için uzun etkili bir alfa-1 adrenerjik reseptör blokörü olarak da kullanılan bir ilaçtır (26, 27). İlacın yan etkilerinden biri meydana getirdiği enerji artışıdır. TZ'nin fosfogliserat kinaz 1'e (Pgk1) bağlanarak enzimatik aktivitesini desteklediği ve Pgk1 aracılığı ile ATP artışı sağladığı gösterilmiştir (28). ATP, hidrotrop (çözücü) özelliğe sahip olması nedeniyle agregat oluşumunu önleyebilir ve protein agregatlarını çözebilirken daha da önemlisi PH ile bozulan enerji metabolizmasını iyileştirme yoluyla da nöroprotektif etki gösterebilmektedir (29).

Bu tez çalışması ile TZ'nin, ATP seviyelerini yükselttiği düşünüldüğünde, alfa-sinüklein de dahil olmak üzere protein agregatlarının çözünmesini kolaylaştırabileceği

ve PH kaynaklı nörodejenerasyonda iyileşmeye sebep olabileceği hipotize edilmiştir. Kan-beyin bariyerini geçebilen TZ'nin (30), PH'de koruyucu ve tedavi edici etkilerini ortaya koyabilmek amacıyla farelerde rotenone-aracılıklı Parkinson modeli oluşturulmuştur. TZ'nin PH'de nöroprotektif etkisinin gözlenmesinin hedeflendiği bu çalışmada, fare beyin dokusundan moleküler metodlar ile DNA hasarı ve gen ekspresyon çalışmaları ile elde edilen bulguların yanı sıra histopatolojik, immünohistokimyasal ve motor fonksiyon testleri ile elde edilen veriler değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı Tarihçesi, Epidemiyolojisi ve Tanısı

1817 yılında İngiliz doktor James Parkinson tarafından "Titrek Felç" olarak tanımlanan (31) ve Jean Marie Charcot tarafından 1937 yılında ilk bulan kişinin adı ile anılmaya başlayan Parkinson Hastalığı (PH) (32), dünyada Alzheimer'dan sonra en sık rastlanan ve yaşla doğru ilişkili olan nörodejeneratif hastalıktır (16).

Carlsson, 1958 yılında memelilerin beyin dokusunda Dopaminin (DA) varlığını keşfetmiştir (33). Daha sonra Ehringer ve Hornykiewicz, striatal Dopamin (DA) eksikliğinin Parkinson Hastalığı'na yol açtığını ve Parkinson hastalarına düşük dozlarda bir Dopamin prekürsörü olan Levodopa verildiğinde semptomların hafiflediğini göstermişlerdir (34). Substantia nigra pars compacta nöronlarının nigrostriatal dopaminerjik yol oluşturduğu keşfedilmiş ve Parkinson Hastalığı'nın beyinin SNc bölgesindeki dopaminerjik nöronların progresif kaybı ve devamında dopamin reseptörlerinin sayısında meydana gelen azalma sonucunda ortaya çıktığı anlaşılmıştır (35).

Parkinson Hastalığı günümüzde milyonlarca insanı etkileyen ve nörodejeneratif bir hastalık olarak kabul edilen ve hareket bozukluğunun ön planda olduğu bir hastalıktır. Çoğunlukla psikotik, affektif ve kognitif bozukluklarla birlikte seyrettiği için, beyin fonksiyonları üzerindeki etkisi sebebiyle nöropsikiyatrik bir hastalık olarak da tanımlanır (7).

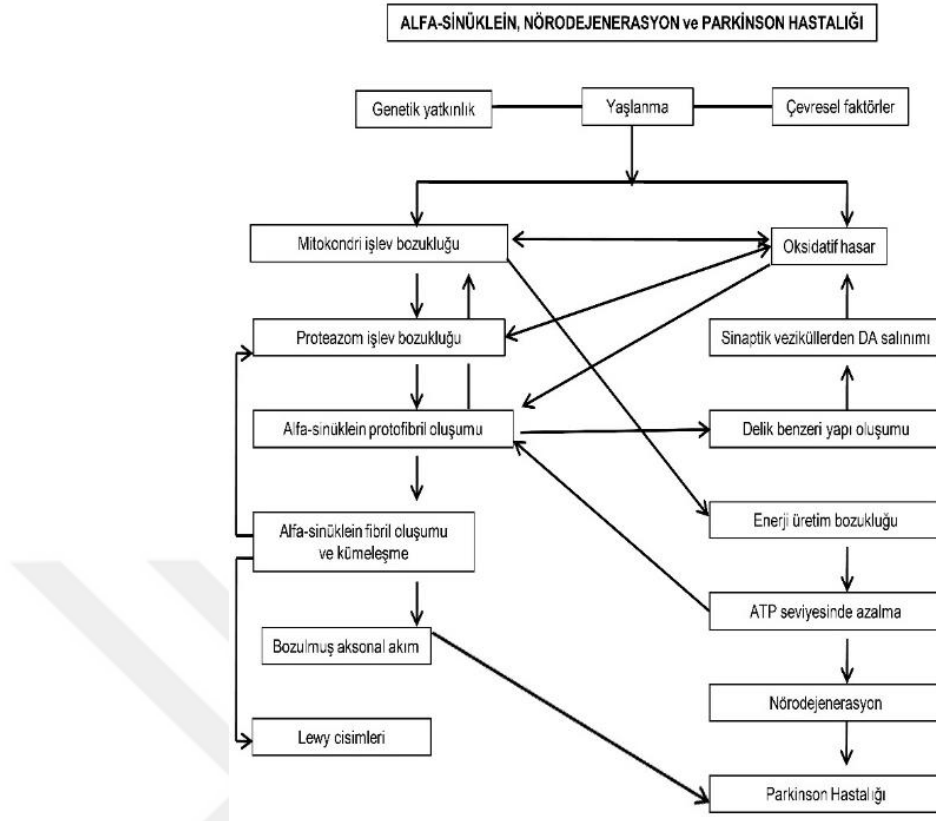
Parkinson hastalarının yaklaşık %90-95'i sporadik olarak, %5'lik bir kısmı da Mendel tipi tek gen kalıtımı sonucu ortaya çıkmaktadır (21, 22). Hastalık riski kadınlarda %1,3 iken erkeklerde %2 civarında seyretmektedir (36). Genel popülasyonun %0,3'ünde hastalık görülmesine rağmen 65 yaş üzerinde bu oran %3'lere kadar çıkmaktadır (37). Türkiye için ise prevalans oranı 100,000 kişide 111 vaka olarak bildirilmiştir (38).

Dorsey ve arkadaşları tarafından küresel hastalık yükü çalışması yapılmıştır. Buna göre, 2015 yılında Parkinson Hastalığı vakalarının yaklaşık 7 milyon olduğu ve 2040 yılında bu sayının yaklaşık 13 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu tahminler, potansiyel bir Parkinson Hastalığı pandemisinin oluşabileceği ihtimalini

göstermektedir (39, 40). Ayrıca eğer kalıcı tedaviler bulunmazsa Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre, nörodejeneratif hastalıklarla yaşayan insan sayısı 2040 yılında 70 milyonu aşabilir ve 2050 yılında 106 milyonu geçebilir. Ayrıca, bu durumun sağlık harcamalarında önemli bir artışa yol açacağı öngörülmektedir (24).

İlk tanımlanmasının üzerinden iki asır geçmesine rağmen PH'nın temel nedeni tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (41). Hastalık riski ile ilişkili demografik faktörler cinsiyet, yaş, beyaz ırka mensubiyet, aile öyküsünün olması, fiziksel ve duygusal stres, kişisel özellikler (çekingen olmak, risk almamak) ile kafa travması şeklinde; çevresel etkenler ise insektisitler ve pestisitler gibi tarım ilacına maruziyet, CO, kuyu suyu içmek, kırsal kesimde yaşam, endüstriyel ajanlar, metaller (mangan, civa, demir), histerektomi ve/veya destekleyici östrojen tedavileri, hayvansal yağ, süt ağırlıklı beslenme ve obezite olarak belirlenmiştir (25).

Nöronal ölümler, hastalığın gelişimindeki en belirgin neden olarak görülmekle birlikte henüz nedeni tam olarak bilinmemektedir. Alfa-sinüklein oligomer ve fibril oluşumu, oksidatif stres, inflamasyon, mikroglia aktivitesi artışı, apoptozis, yüksek miktarda nitrik oksit üretimi, hücre içi Kalsiyum (Ca) ve Demir (Fe) homeostazisinin bozulması, yetersiz nörotrofinler ve glutamat toksisitesi gibi faktörlerin yanı sıra yaşlılık, pestisitler, postensefalitik infeksiyonlar, MPTP, Rotenone ve kronik manganez intoksikasyonu gibi çevresel etkenler ile genetik faktörler bilinen yaygın sebepler arasındadır (42-44) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Parkinson hastalığında mekanizmalar

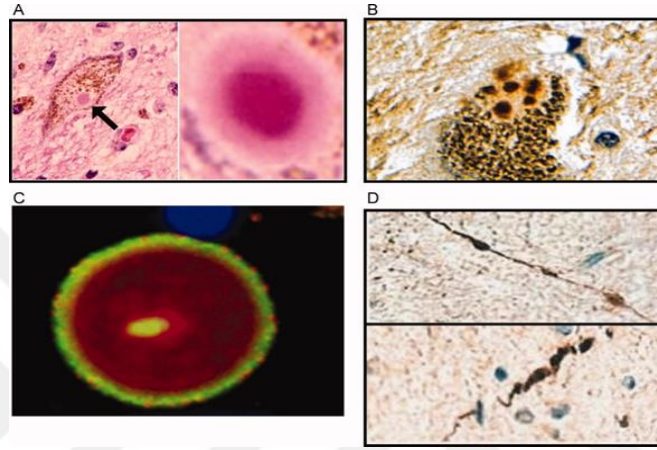
Parkinson Hastalığı'nın klinik özellikleri istirahat tremoru, rijidite, bradikinezi, postural instabilite, öne eğik duruş ve motor bloklar şeklinde ifade edilmiştir. Bu belirtilerden en az iki tanesine sahip kişiler hastalık tanısı almaktadır (41). Hastalıkta, motor fonksiyonun azalmasının yanı sıra, disotonomi veya otonom disfonksiyon, koku kaybı olan hipozmi, depresyon ile demans (bunama) ve uykusuzluk (insomniya) gibi belirtiler de meydana gelebilir (45-47).

2.2. Parkinson Hastalığı ve Alfa-Sinüklein

Protein birikimi, birçok nörodejeneratif hastalıkta görülen ortak bir moleküler olaydır. Nöronlar da birçok farklı hücre tipi gibi anormal protein birikimine yanıt olarak çözünmeyen protein fibrillerinden oluşan protein inklüzyonları oluşturma eğilimindedir.

Bazal gangliyonlar (BG), temel görevleri hareket sistemini kontrol etmek ve hassas ayarlamalar yapmak olan birbirleriyle bağlantılı subkortikal nükleuslardan oluşan yapılardır (48). Substantia nigra pars combacta bölgesi de bu yapının içinde yer

almaktadır (49). Parkinson Hastalığı için temel patolojik özellikler, beyindeki substantia nigra pars compacta bölgesindeki nöromelanin (NM) içeren DN'lerin ölümü ve sağ kalan sinir hücrelerinin gövdelerinde yoğunlaşmış alfa-sinükleinlerin biriktiği Lewy cisimciği (LC) veya Lewy nöritleri (LN) olarak adlandırılan, eozinofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığıdır (Şekil 2.2) (50). Nörodejeneratif hareket bozuklukları alanında en yoğun olarak araştırılan protein inklüzyon patolojisi de, yüz yıl önce keşfedilen Lewy cisimcikleridir.



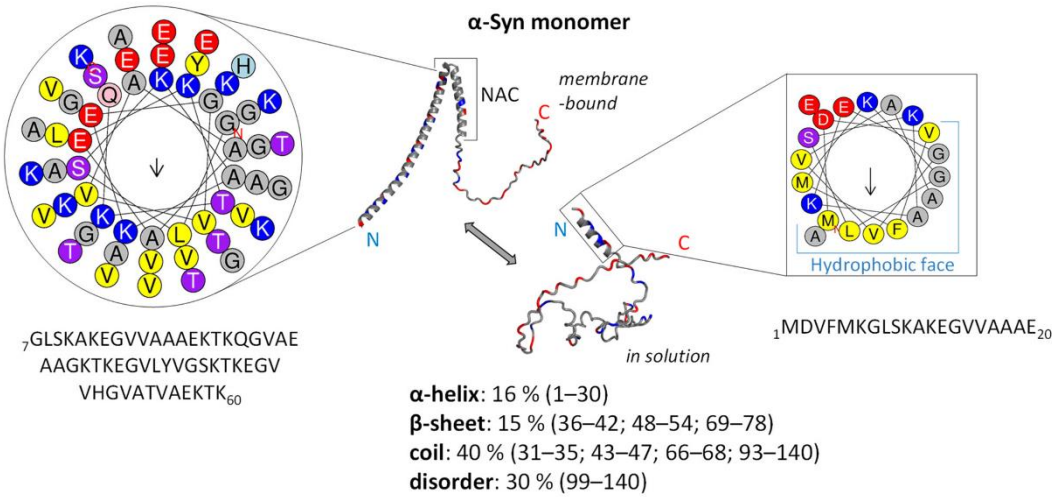
Şekil 2.2. PH'de Lewy patolojisi. A: H ve E ile boyanmış melanize SNc nöronunda Lewy cisimcikleri. B: Ubiquitin ile boyanmış melanize SNc nöronundaki sitoplazmik protein birikimleri. C: Ubiquitin (kırmızı) ve alfa-sinüklein (sarı) ile boyanmış SNc nöronunda Lewy cisimciklerinin konfokal mikroskopik görüntüsü. D: Ubiquitin ile boyanmış intranöronal Lewy nöritleri (50).

Alfa-Sinüklein, agregasyona yatkın ve agregat formlarında iken Parkinson hastalığında görülen nörodejenerasyonun önemli sebeplerinden olan nöronal bir proteindir. İnsan beyninin tümünde ve neokorteks, hipokampus, substantia nigra, talamus ile serebellum gibi bölgelerde yüksek seviyelerde ifade edilen alfa-sinüklein proteini, sitosoldeki protein içeriğinin %'ini oluşturur. Bu protein yoğunlukla nöronlarda daha az olarak da glial hücrelerde ifade edilir. Alfa-sinükleinin ifadesi, nöronal gelişim sırasında gerçekleşir. İnsan modelinde, alfa-sinüklein gebeliğin on beşinci haftasından itibaren fetusda bulunurken; fetal dönem boyunca tüm organlarda yer alır (51).

Dimerik yapılardan başlayıp 100'den fazla monomerinin birleşimine kadar değişen farklı çözünürteki oligomerik yapılar oluşturma yeteneğine sahip bir proteindir. Çoğunlukla aksonların presinaptik terminallerinde ve doğal olarak

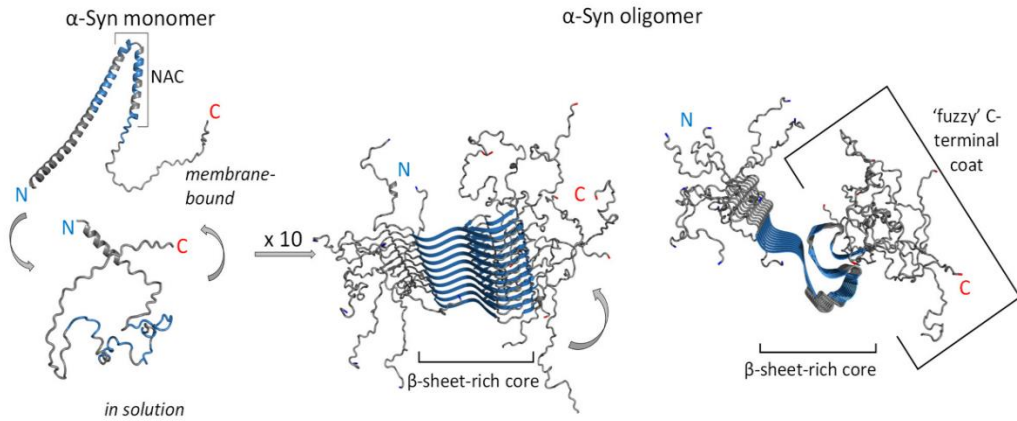
sitosolde katlanmamış, monomerik ve çözümlü küçük bir protein olan normal alfa-sinüklein, sinaptik veziküllerin membranlarına bağlanmaktadır. Belirli koşullar ve bazı ek proteinlerin de katkısıyla membran bağlanmasını kaybeden protein, kendi kendine agregasyona başlayarak küresel ve iplik benzeri Lewy cisimcikleri veya Lewy sinir çekirdekleri oluşturur. PH, alfa-sinükleinopatiler olarak nitelendirilen nörodejeneratif hastalıklar arasında en yaygın olanıdır (52).

4q21'de lokalize *SNCA (PARK1)* geni tarafından kodlanan ve ilk olarak Alzheimer hastalığı (AH) olan hastaların beyinlerindeki β -amiloid plakların amiloid olmayan bileşeni olarak tanımlanan alfa-sinüklein proteininin tam işlevi halen belirsizliğini korusa da; istemli ve istemsiz hareketleri kontrol etmede etkin nörotransmitter olan dopaminin salınımını, vezikül eksositosisini ve homeostazını, sinaptik işlevleri ve plastisiteyi düzenlediği düşünülmektedir (53). Nöronal presinaptik küçük bir protein olan alfa-sinükleinin 140 amino asitlik yaygın bulunan varyantının yanı sıra; sırasıyla ekzon 3 ve ekzon 5'i içermeyen 126 amino asit ve 112 amino asitlik varyantları da bulunur (54). Yapısında sistein ve triptofan aminoasidi bulundurmayan protein, %29 oranında yüklü rezidüleri nedeniyle totalde polar bir yapıya sahiptir. Alfa-sinüklein proteini üç farklı yapısal bölge içerir: 1-60. aminoasitlerin yer aldığı, pozitif yüklü lizin aminoasidince zengin amfipatik N-terminal bölgesi. Bu bölge, lipid membranlar ve veziküllerle etkileşimini sağlayan α -heliks yapısının oluşumunda önemli KTKEGV korunmuş dizisini içeren 11 aminoasitlik tekrar alana sahiptir. Orta hidrofobik bölge, 61-95. aminoasitlerin bulunduğu amiloid olmayan bileşen bölgesidir. Bu bölge içinde bulunan 71-82 arası kalıntılar, beta katlanma yapısı oluşturma eğiliminde olup, yanlış katlanma ve fibrillere agregasyon için temel bir öneme sahiptir. 96-140. aminoasitleri kapsayan, yüksek derecede asidik ve prolinen zengin olan C-terminal bölgesi ise oldukça esnek ve doğal olarak düzensiz bir alandır (Şekil 2.3) (55-57).



Şekil 2.3. Alfa-sinükleinin yapısal çeşitliliği (58)

Monomerik alfa-sinüklein ile oligomerik yapılanma sergileyen protofibril ve fibriler yapıları arasında yapısal farklılıklar vardır. Monomerik ve fibriller formların aksine protofibriller alfa-sinükleinlerin yapıları beta-tabaka açısından zengindir (Şekil 2.4). Protofibriller sentetik veziküllere sıkıca bağlanırlar ve geçici olarak bu vezikülleri geçirgen hale getirirler (59). Volles ve arkadaşları atomik güç mikroskopisi kullanarak protofibriller alfa-sinüklein tarafından vezikül membranlarının yıkımını doğrudan gözlemlemişlerdir. Böylece, alfa-sinüklein oligomer yapılarının nigral nöronlar için fibrillerden daha toksik olabileceğini ileri sürmüşlerdir (60).



Şekil 2.4. Alfa-sinüklein monomerlerinin üç boyutlu modelleri (58)

Alfa-sinüklein proteinini kodlayan *SNCA* geni ile ilgili polimorfizm ve mutasyon çalışmaları, PH arasında nedensel bir bağlantı olduğuna dair çok sayıda kanıt sunmaktadır. PH tüm genom sekans çalışmaları, *SNCA*'daki tek nükleotid değişimlerinin idiyopatik PH için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (61, 62).

Dominant olarak geçen PH'da ilk tanımlanan *SNCA* mutasyonu olan Ala53Thr'nin ardından Glu46Lys, His50Gln, Gly51Asp ve Ala30Pro gibi farklı mutasyonlar da tanımlanmıştır (63, 64). 1998 yılında Conway ve arkadaşları, *SNCA* yanlış anlamli mutasyonlarının alfa-sinüklein fibril oluşumunu in vitro olarak hızlandırdığını göstererek; alfa-sinüklein yanlış katlanma ve agregasyonunun PH patogenezindeki etkinliğini ortaya koymuşlardır. *SNCA* duplikasyonu ve triplokasyonları da PH hastalarında tanımlanmıştır (65). Alfa-sinükleinin net olarak işlevi bilinmemekle birlikte, ifadesinin yalnızca sinaptik gelişimden sonra tespit edilebilmiş olması nedeniyle; olgun presinaptik terminallerde sinaptik vezikül arzının sürdürülmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. İn vitro gen susturma çalışmaları, Alfa-sinükleinin olgun nöronlarda farklı sinaptik vezikül havuzlarının miktarını düzenlediğini göstermiştir. Ayrıca, SNARE komplekslerinin oluşumunda moleküler bir şaperon olarak görev yaparak sinaptik aktiviteyi düzenlediği, bu nedenle de sinaptik sinir uçlarından nörotransmitter salınımı için gerekli olduğu kanaati yaygındır (66-68). Alfa-sinüklein, hem dopamin salınımını düzenleyerek istemli ve istemsiz hareketleri kontrol etmekte hem de *SNCA* geni susturulmuş farelerde gösterildiği gibi hafıza ve bilişsel fonksiyonu etkileyebilmektedir. İşlevi artan sinaptik aktivite ve yaşlanma sürecinde daha da önemli bir hale gelmekte ve nörodejenerasyona katkıda bulunan bir faktör halini almaktadır (69). Doğal olarak sitozolda katlanmamış bir monomer şeklinde bulunurken; lipid membranların varlığında katlanmış bir alfa-helikal ikincil yapıya dönüşerek dimerler ve oligomerler oluşturma eğiliminde olduğu bilinen alfa-sinükleinin, geçirmiş olduğu posttranslasyonel modifikasyonlar olan fosforilasyon, ubiquitinasyon ve nitratlanmanın agregasyon süreci ve Lewy cisimcikleri oluşumu ile nörotoksitesiteyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (70).

Alfa-sinükleinin en yaygın posttranslasyonel modifikasyonu fosforilasyondur ve çoğunlukla S129 ve daha az oranda S87 serin kalıntıları ile Y125, Y133 ve Y135 tirozin kalıntıları üzerinden meydana gelir. Fosforile S129, çözünmez alfa-sinükleinde yaklaşık %90 iken, bu oran çözünür sitozolik alfa-sinükleinlerde sadece %4'tür (70). Bu da fosforile alfa-sinükleinin agregasyon sürecinde önemli rol oynadığını gösterir. PH ve DLC hastalarındaki LC lezyonlarında Ser129 yoğun bir şekilde fosforillenmiştir. Dahası, alfa-sinüklein Ser129 fosforilasyonu invitro olarak fibril oluşumunu tetiklemektedir (71).

İkinci en yaygın posttranslasyonel modifikasyonu ubikitinasyonudur ve ubikitin alfa-sinükleine lizin kalıntılarında bağlanır. Ubikitin proteozom sistemi (UPS) ve otofaji alfa-sinükleinin parçalanmasında rol oynar. Ubikitin proteozom sistem, hem çözünür formunu hem de proteinin agregat formlarını bozarak protein parçalanmasını gerçekleştirir. Lizozomal yolak ise yalnızca proteinin agregat formlarını bozarak parçalanmasını sağlar (14). Alfa-sinüklein 15 adet lizin kalıntısı içermesine rağmen, Lewy cisimciklerinden izole edilen alfa-sinüklein proteininin çoğunlukla K6, K10 ve K12 kalıntılarında ubikitinlendiği görülür. Ubikitinasyonu, alfa-proteinin işlevi ve aktivitesinde değişikliklere neden olarak, yerleşim ve yıkım süreçlerini etkiler (72). Alfa-Sinüklein agregatlaşması ve proteazom işlev bozukluğu arasında karşılıklı bir kısır döngü ilişkisi var gibi görünmektedir. Agregatlaşma proteozomun düzenleyici ünitesi ile etkileşime girerek, proteozom aktivitesini inhibe eder. Synder ve arkadaşları, alfa-sinükleinin proteozom düzenleyici ünite ile ilgili yapısal bir değişikliğe neden olduğunu göstermişlerdir (73). Öte yandan, proteozomun inhibe edilmesi de alfa-sinüklein agregatlarının oluşumunu ve dopaminerjik nöronların ölümünü tetikler. Böylece, alfa-sinüklein birikimi ya da proteazom işlevinin bozulması nigral nöronlar için bir kısır döngü oluşumunu başlatır (74-77).

PH'de proteazom işlevinin anormal olduğunun bildirilmiş olması dikkat çekicidir. Proteazom bir adenzin trifosfat (ATP) bağımlı proteolitik enzim olduğu için ATP'nin temini gereklidir. ATP üretimi temel olarak mitokondriyal solunuma bağımlıdır. PH'de mitokondriyal işlev bozukluğu iyi bilindiğinden, proteazom işlevinin değiştiğine inanmak için iyi bir neden vardır (78, 79). Ancak PH'de proteazom işlevi üzerinde fikir ayrılıkları da bulunur. Tofaris ve arkadaşları PH'de proteazom işlev bozukluğu tespit etmemişlerdir (80).

Diğer yaygın bir posttranslasyonel modifikasyonu ise Y39, Y125, Y133 ve Y136 tirozin kalıntılarının nitratlanmasıdır. Lewy cisimciklerinde yüksek oranda nitratlanmış alfa-sinüklein bulunduğu belirlenmiştir. Lewy cisim oluşumu görülen hastalıklarda önemli bir faktör olarak kabul edilen nitratlanma, yüksek oksidatif stres koşullarında artar. Artan hücresel oksidatif stres, alfa-sinüklein agregasyonunu da artırır. İn vitro çalışmalar, alfa-sinükleinin nitratlanmasının oligomer oluşumunu ve mitokondriyal bozulmayı indüklediğini ve integrin yolak aracılığıyla apoptoza yol açtığını göstermiştir. Bir PH hücre modelinde, alfa-sinükleinin artmış nitrik oksit

üretimi nedeniyle nitratlanmasının, nörotoksik alfa-sinüklein türlerinin seviyesinde artışlara ve hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir (81).

PH'da Lewy cisimcik oluşumundan önce alfa-sinüklein'in fosforilasyonu ve çözünürlüğünde değişiklikler meydana geldiği ve çözünürlüğü azalırken fosforilasyon düzeylerinin büyük ölçüde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, Lewy cisimcik oluşumu alfa-sinüklein'in lipidlerle ilişkisinin artması ile de ilişkilidir (82). PH üzerine yapılmış uzun süreli bir araştırmayla, Lewy cisimcik birikimlerinin limbik beyin bölgelerine yayılması için ortalama 13 yılın, PH vakalarının %50'sinde birikimlerin birleşik kortekslerde ortaya çıkması için ise 18 yılın gerektiği gösterilmiştir (83). Bu çalışmalar, alfa-sinükleinin hücrelerde meydana getirdiği değişikliklerinin yaygın biçimde ortaya çıkabilmesi için önemli bir sürenin gerektiğini ve geri dönüşü olmayan fibrillasyonundan önceki posttranslasyonel modifikasyonlarının önemli bir adım olduğunu göstermektedir.

Normal koşullarda, sitoplazmada katlanmamış bir monomer olan alfa-sinüklein patolojik koşullarda, yapısal değişikliklere uğrar ve monomerler birbirleriyle agregasyon yaparak çözünmez hale gelir. Yapısındaki değişikliklerin proteinin lipid yüzeylere, lipid damlacıklarına, fosfolipit çift tabakalara veya lipid membranlara bağlandığında ve/veya etkileşime girdiğinde başladığını gösteren kanıtlar vardır. İnsan nöronlarından izole edilen alfa-sinüklein monomerleri, sentetik lipid membranlara maruz kaldıklarında hızla membran yüzeyine bağlanarak dimerler ve oligomerler oluşturmaktadır. Bu tür bir etkileşimin, dramatik şekilde alfa-sinükleinin katlanmamış formundan katlanmış alfa-helikal ikincil yapıya değişmesine neden olduğu düşünülmektedir (84). Alfa-sinükleinin N-terminal bölgesinde bulunan 11 aminoasitlik tekrarlar, apolipoproteinler ve diğer lipid bağlayıcı proteinler için yaygın olan amfipatik alfa-helikal motiflere benzerlik gösterir ve lipid membran bağlanma sürecinde önemli bir rol oynar (85). Bu değişikliğin önemi, alfa-helikal formunun hücreler için toksik olduğuna inanılan farklı türde oligomerleri oluşturma eğiliminde olmasıdır.

Membranların lipid bileşimlerinin de, alfa-sinükleinin membrana bağlanmasını, etkileşimini ve sonrasındaki oligomerleşmeyi etkilediği gösterilmiştir (86). Çözünür durum ve membrana bağlanma durumu arasında sürekli bir denge içinde

bulunan alfa-sinükleinin membrana bağlanması, fosfatidilinositol veya fosfatidilserinin varlığına bağlıdır. Tercihen lipidlerle zenginleştirilmiş bölgeler olan lipid sallarına bağlama eğilimindedir. Yüksek kolesterol ve sfingolipid konsantrasyonları ile alfa-sinükleinin bağlanmasını destekleyebilecek değişmiş yüzey yüküne sahip bu lipid salları, proteinin bağlanmasını ve oligomerleşmesini teşvik eden bir platform olarak hizmet etmektedir (87).

In vitro çalışmalar, alfa-sinüklein oligomerik agregatlarının nöroinflamasyon, nörodejenerasyon ve hücre ölümüne yol açan bir dizi ikincil sürece neden olduğunu göstermektedir (88). Agregat oluşumunun nörotoksisitedeki patojenitenin ortaya çıkış noktası olmasının yanı sıra, agregat yapısı oluşurken alfa-sinüklein monomerlerinin fizyolojik konumlarından kaybolması ile bir fonksiyon kaybının yaşandığı ve bunun da nörodejenerasyona katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (89).

Nörotransmitter salınımını değiştirmenin yanı sıra veziküler taşımayla ve vezikül füzyonu ile ilgili de rol oynayan alfa-sinüklein, çözünür N-etylmalimid duyarlı faktör bağlama protein reseptör (SNARE) komplekslerinin montajında moleküler bir şaperon olarak çalışır. Genel olarak, alfa-sinüklein birikimi gerçekleştiğinde ve SNARE proteinleri ile etkileşimi doğru şekilde olmadığında nörotransmisyon ve sinaptik işlev bozukluğu ile nörodejenerasyona neden olarak PH patogenezinde gözlenen bilişsel ve motor semptomlara katkıda bulunmaktadır (66).

İlk oluştuğunda katlanmamış biçimde olan alfa-sinüklein, konsantrasyonuna ve çözeltinin özelliklerine göre alfa-heliks ya da sitotoksik özellikteki beta-katlanma tabakası yapısı oluşturabilir (90). LC'lerde beta-tabaka yapısının kümeleşmiş fibril formunda temel unsur olmasının yanında fibril oluşumu ve sitotoksik alfa-sinüklein için önemli bir yapılanma biçimi olduğu belirlenmiştir (91, 92). Destplast ve arkadaşları tarafından yanlış katlanmış alfa-sinükleinlerin hasta nöronlardan sağlıklı nöronlara geçebildiğini göstermişlerdir (93).

Yanlış katlanıp agregat oluşturduğunda ise mitokondri ve nöronlar için toksik hale gelir. Kültür ortamındaki insan dopaminerjik nöronlarında alfa-sinüklein birikiminin, endojen dopamin üretimine gereksinim duyan ve reaktif oksijen türleri tarafından düzenlenen apoptoz ile sonuçlandığını göstermişlerdir (94). Mitokondri ve nöron lizozomal fonksiyonlarının bozulması neticesinde hücreler ölmektedir.

Alfa-sinükleinin hem doğal formu hem de mutant tipi nigral nöronlarda aşırı üretildiğinde nörotoksik etkiye sahiptir. Kirik ve ekibi, adeno-benzeri virüs vektörünü kullanarak, *SNCA* genini nigral nöronlara lokal enjeksiyonla aktarmışlardır. Alfa-sinüklein aşırı üretildiği nigral nöronlarda pozitif sitoplazmik inklüzyonlar ve şişiklerle distrofik nöritler gözlenmiştir. Gen aktarımından 8 hafta sonra ise striatal dopamin seviyesinin %30-80, tirozin hidroksilaz aktivitesinin de %40-50 oranında azaldığı belirlenmiştir (95).

Alfa-sinüklein agregasyon dinamiklerini modüle eden faktörler arasında beta ve gamma sinükleinden de bahsetmek gerekmektedir. Beta-sinüklein, monomerleri veya erken evre oligomerleri doğrudan bağlayarak daha fazla agregat oluşturmalarını önleyerek alfa-sinükleine karşı ve hatta amiloid- β peptitlerine karşı bir antiagregasyon ajanı olarak hareket edebilmektedir. Gama-sinükleinin de benzer bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (96). Beta-sinüklein 5q35 bölgesinde bulunan *SNCB* geni, gama-sinüklein de 10q23 üzerindeki *SNCG* geni tarafından kodlanır (97, 98).

2.3. Parkinson Hastalığı ve Dopamin

Dopamin (DA, 3,4-dihidroksifeniletamin), endojen neurotransmitter olarak nigral nöronlarda sentezlenen bir hormondur (99). Beyindeki sinir hücreleri arasında sinyalleri ileterek fiziksel hareket ve duygusal davranışın kontrolüne yardımcı olması nedeniyle bir nörotransmitterdir. Sinir sisteminin normal fonksiyonu için gerekli olan tirozin hidroksilaz, DA sentez yolağında tirozinin dopamine dönüşümünden sorumlu olan enzimdir (100).

DA sentezi, belli enzimatik reaksiyonlar sonucunda gerçekleşir. Beyinde, Tirozin amino asidi, oksijen, demir ve tetrahidrobiopterin (BH4) kullanılarak tirozin hidroksilaz (TH) enzimi aracılığıyla L-DOPA'ya katalizlenir. DA metabolizması Şekil 2.5'de gösterilmiştir (101). L-DOPA, aromatik dekarboksilaz enzimi tarafından dekarboksile edilerek Dopamin üretilir. Dopamin, sinaptik veziküllere veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT) tarafından alınır. Sonrasında DA gelen sinir uyarımıyla nöron terminallerinden sinaptik boşluğa ekzositoz yoluyla salınır. Salınan Dopamin, dopamin reseptörü'ne (DR) bağlandığında postsinaptik hücrede bir yanıt meydana gelir. DR'ler, G protein eşleşmeli reseptörlerdir ve beş farklı tipi bulunur. Bu

DR'ler, D1 ve D5'i içeren D1 benzeri reseptörler ve D2, D3 ve D4'ü içeren D2 benzeri reseptörler olmak üzere tekrar iki gruba ayrılırlar. D1 benzeri reseptörler, adenilat siklaz aktivasyonu ile siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimini artırırken, D2 benzeri reseptörler Gi/o proteinleri ile etkileşime girerek adenilat siklazı inhibe eder ve cAMP üretimini engeller (102). D1 reseptörleri uyarıcı bir işlevi yerine getirirken, D2 reseptörleri inhibe edici bir rol oynar. D2 reseptörleri, dopaminerjik sistemin presinaptik bölgesindeki ana reseptörlerdir (103). Dopamin sinaptik veya presinaptik bölgelerde, monoamin oksidaz B (MAOB) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) enzimleri tarafından enzimatik olarak parçalanır. Bununla birlikte, enzimatik bozunma yeterli olmadığında, dopaminin inaktivasyonu için ek mekanizmalar devreye girer. Dopamin taşıyıcı (DAT)'ları, sinaptik aralıkta dopamin nörotransmitter konsantrasyonlarının düzenlenmesinden sorumlu bütünleşik zar proteinleridir (104). Son aşama olarak Dopamin, DAT'lar aracılığıyla sinaptik aralıktan geri alınır ve presinaptik bölgeye taşınır. Presinaptik bölgeye getirilen Dopamin veziküller halinde tekrar depolanır (105).

TH doğrudan Parkinson Hastalığına neden olmaz ancak *TH* genin mutasyonları Parkinson Hastalığı benzeri hastalıklara neden olabilir (106). *Tirozin Hidroksilaz* gen ifadesindeki azalma, DA sentezinde azalmaya neden olur ve bu durum Parkinson Hastalığı tablosunu ortaya çıkarır (107). Alfa-Sinüklein, TH enzimine bağlanarak veya Protein-Fosfataz2A'yı indükleyerek enzimin aktivitesini inhibe eder (107). Sonuç olarak, gen veya protein düzeyinde meydana gelen değişiklikler, dopamin mekanizmasının bozulmasına ve beyinde normal işlevlerin yerine getirilmesinin zorlaşmasına ve motor fonksiyon bozukluklarına neden olabilir (106). Bu nedenle, Parkinson Hastalığını "striatumun Tirozin Hidroksilaz noksanlığı sendromu" olarak da tanımlamak yanlış olmaz (108).

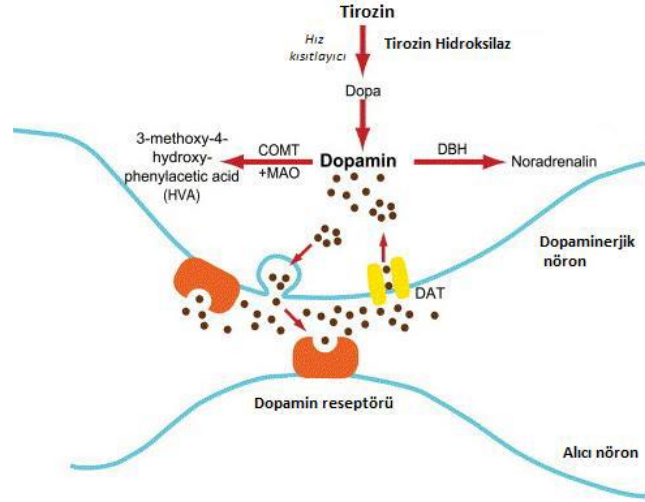
Tirozin Hidroksilaz'ın karmaşık bir etki yolağı vardır. DA, hücrede toksik etkiler meydana getirebilir ve DA'nın yıkımı sonucunda hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri oluşarak oksidatif stres meydana gelebilir (109). Parkinson Hastalığı tablosunda bir antioksidan olan Glutasyon'un eksikliği sıkça görülen bir durumdur ve buna bağlı olarak oksidatif stresin ortadan kaldırılması engellenmiş olur. İlginç durumlardan biri, L-DOPA, Tirozin Hidroksilaz tarafından hem sentezlenir hem de etkili bir şekilde oksitlenir ve böylece reaktif oksijen türleri yani oksidatif stres kaynağı

oluşur. Bu durum, Parkinson Hastalığı tablosunda meydana gelen nörositotoksik etkilere bir yenisinin eklenmesi anlamına gelir (108). Tirozin Hidroksilaz'ın ve DA salınımının alfa-sinüklein ile ilişkisi dikkate alındığında, bu üç molekül arasındaki yolak bozulduğunda geri dönüşü zor bir kısır döngü oluşur.

Normal düzeydeki normal-alfa-sinüklein, çoğunlukla sinaptik fizyolojik işlevlerle ilişkilidir ancak aşırı ifadesi ters etki gösterebilmektedir. Normal-alfa-sinükleinin aşırı ifadesinin, DA sentez enzimi olan TH biyosentezini negatif olarak düzenleyebileceği öne sürülmüştür. Örneğin, normal-alfa-sinüklein aşırı ifade edilen hücrelerde, *TH* promotör aktivitesinde artış ve *TH* geninin promotör bölgesinde bulunan ve bir transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olan Ca²⁺-responsif elemente bağımlı transkripsiyonda net bir şekilde azalma olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, normal-alfa-sinükleinin aşırı ifadesinin *TH* ifadesini ve dolayısıyla DA sentezini bozarak, dopaminerjik nöronal işlev bozukluğuna neden olabileceğini göstermektedir (110).

Dopaminerjik ağ, çoğunlukla miyelinsiz veya az miktarda miyelinli haldeki yaklaşık 450 bin sinir hücresinden oluşur. Bu sinir hücreleri, yüksek enerji gereksinimi olan bir yapıya sahiptir ve diğer sinir hücrelerine kıyasla oksidatif stres etkileri ile yüksek demir ve kalsiyum seviyelerine daha duyarlıdır. Demir birikiminin birçok hareket bozukluğuyla ilişkili olduğu bilinmektedir (25).

Parkinson hastalığında demirin patojenik olup olmadığı tam olarak bilinmemekle birlikte, bazı çalışmalarda Parkinson hastalarının beyinlerinde demir miktarlarının arttığı gösterilmiştir. Demirin, serbest radikal oluşumu aracılığıyla özellikle dopaminerjik nöronlarda hasara neden olduğu düşünülmektedir (111). Dopaminerjik nöronlarda yoğun olarak bulunan nöromelanin, demir için bir depo görevi görerek serbest radikalleri bağlar. Ancak bu kapasite doygunluğa ulaştığında, serbest radikaller hücrelere zarar vermeye başlar (112). Demir aracılığıyla gerçekleşen dopamin oksidasyonu, mitokondriyal fonksiyonları ve özellikle kompleks I ve III'ü olumsuz yönde etkileyerek ATP sentezinde aksamalara ve hatta akut hücre ölümlerine neden olabilmektedir (113).



Şekil 2.5. Dopamin metabolizması: COMT (katekol O-metil transferaz); MAO (monoaminoksidaz), DAT (dopamin taşıyıcısı) (101).

Dopaminin tükenmesi, dopamin reseptörlerinin yoğunluğundaki ve duyarlılığındaki değişiklikleri de tetikler. PH olan hastalarda ve Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuş hayvanlarda dopamin D2-reseptörlerinin ve striatumdaki bağlanma bölgelerinin ifade düzeyinde artış, MSN (striatal medium spiny output neurons) D1-reseptörlerinin seviyesinde ise azalma olduğu belirlenmiştir (114).

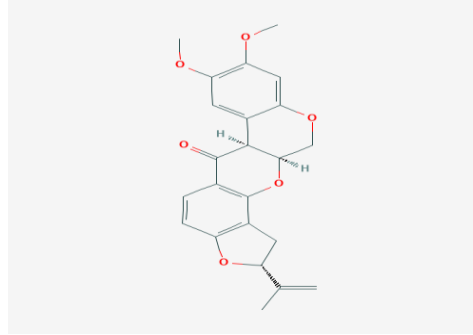
Dopamin, kognitif, motor ve ruhsal birçok fizyolojik ve davranışsal süreçte önemli bir rol oynar. Merkezi sinir sistemi DA homeostazındaki bozulmalar psikiyatrik, nörolojik ve nörodejeneratif durumlara yol açabilir (115). Buna bağlı olarak, hiperaktivite, şizofreni, manik-depresif (bipolar) bozukluklar, beslenme bozuklukları ile madde bağımlılığı gibi durumlar ortaya çıkmaktadır. Tüm bunlara bağlı olarak, genellikle DA ve sistemi tedavi yaklaşımları için temel hedefi oluşturmaktadır (116). PH semptomlarının da; substantia nigra'daki DN'lerin yaklaşık %50 oranında ve striatumdaki DA miktarının %80 oranında kaybının ardından meydana geldiği bilinmektedir (45-47).

2.4. Rotenone ve PH Hayvan Modellemesi

Parkinson hastalığı için birçok deneysel hayvan modeli geliştirilmiştir. Bu modeller, farmakolojik, toksik ve genetik olmak üzere üç farklı gruba ayrılmaktadır (117). Rotenone günümüzde PH modeli oluşturmak için en sık kullanılan kimyasal maddelerden biridir. Rotenone, *Lonchocarpus* ve *Derris* cinsi bitkilerin köklerinden

elde edilen ve doğal oluşan bir insektisittir (Şekil 2.6). Yüksek lipofilik özelliği sahip olan Rotenone, kan-beyin bariyeri dahil bilinen bütün biyolojik zarları kolayca aşabilir (13). Bu toksik ajanın nörotoksik mekanizması tüm yönleriyle açıklığa kavuşturulamamış olmasına rağmen (14), Rotenone Mitokondriyal kompleks 1'e bağlanarak onu inhibe ettiği bilinir. Buna bağlı olarak da, elektron akışının bozulması sonucunda ATP üretimi azalır (15).

Aynı zamanda bir pestisit olan Rotenone biyolojik zarları geçerken taşıyıcılara ihtiyaç duymaz ve aracısız olarak hücre içine girişinden sonra, otooksidasyon süreciyle reaktif oksijen türleri (ROS) üretilerek oksidatif stres oluşur ki; ROS'un aktivitesi tetiklenir ve mitokondriyal apoptotik yollar devreye girer. Bu durum, DNA, proteinler ve lipitlerde oksidatif hasar oluşmasına yol açar ve sonuçta dopaminerjik hücre ölümüne neden olur (Şekil 2.7) (37). Bazı araştırmalar, Rotenone'nin pro-apoptotik etkilerinin Mitokondriyal kompleks I inhibisyonundan bağımsız olduğunu ve ROS kaynaklı oksidatif stresin kaspaz bağımlı apoptotik yolağı tetiklediğini göstermiştir. Bununla birlikte rotenone'nun, kaspaz bağımsız apoptozu da indükleyebildiği ortaya konulmuştur (118).



Şekil 2.6. Rotenone'un kimyasal yapısı (119)

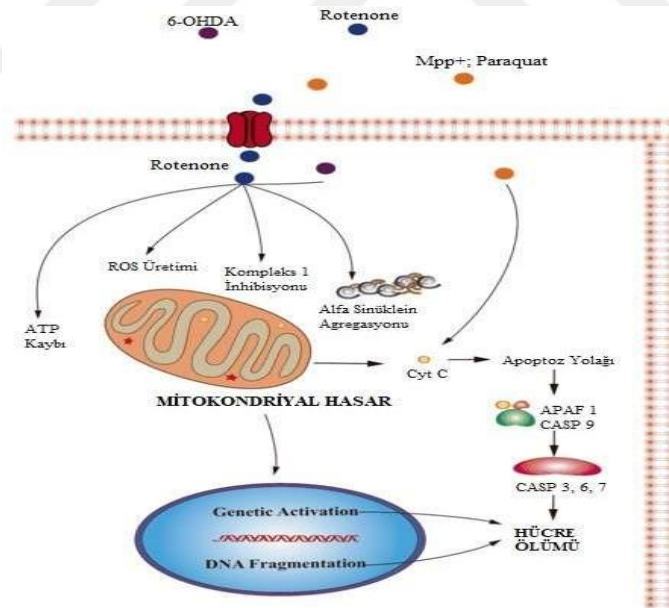
Rotenone kaynaklı nörotoksisite, *SNCA* aşırı ekspresyonu ile agregasyonu indükler (118). Ayrıca Rotenone tarafından DNA hasarı da tetiklenmektedir (120). Rotenone kaynaklı oksidatif hasarın moleküler hedefleri genel olarak çeşitli yolları içerir ve enerji metabolizması ile birlikte Ubikitin-proteazom sistemi de bu hedeflerden biridir (14).

Deney hayvanlarında, Rotenone modeli diğer bazı non-invaziv ve invaziv nörotoksik kimyasal modellere kıyasla klasik PH'nin çoğu özelliğini daha başarılı bir şekilde indüklemeye yeteneği gösterir. Bu model, klinik tablonun; DN kaybını, alfa-

sinüklelin içeren Lewy cisimciklerini, kısmen tremoru ve düşük motor fonksiyonlarını önemli ölçüde taklit edebilir (16-18). Ayrıca Rotenone ile indüklenen deneysel PH modelinde, çoğu zaman insanlarda görülen bazı davranışsal ve bilişsel özelliklerin yanında (17), gastrointestinal nöropatilerin oluşması da sağlanabilmiştir (19, 20).

Rotenone ilk çalışmanın yapıldığı 2000 yılından günümüze deney hayvanı modellerinde 20 yıldır kullanılan bir ajandır (121). Rotenone'un uygulama şekli intravenöz, subkutan (SC) veya intraperitoneal (İP) olsun, benzer sonuçlar elde edilmiştir (37, 122). Hatta intranasal rotenone uygulaması bile Parkinson Hastalığı'nın bazı belirtilerini elde etmede etkili olmuştur (123).

Bazı araştırmalar farelerde Rotenone modeliyle Parkinson Hastalığı'nın tamamını gösterememiş olsa da (16) çoğu çalışma Rotenone kullanarak başarılı bir model oluşturmuştur (124, 125). Bu durumun nedeni büyük olasılıkla Rotenone'ye karşı bireyler ve hayvan ırkları arasında cevap farklılıkları olabileceği ve hayvana verilecek dozu ayarlamamanın zorluğundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, modelin bir diğer önemli eksikliği, %30-35'e kadar çıkabilen ölüm oranlarıdır (15, 121).

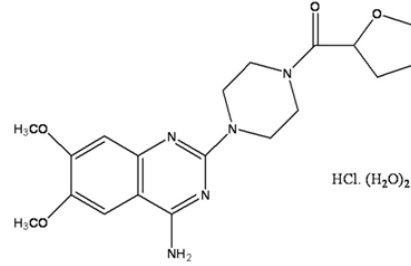


Şekil 2.7. Rotenone kaynaklı dopaminerjik hücre ölüm yolağı (25, 126)

2.5. Terazosin

Terazosin hidroklorür (4-Amino-2-[4-(tetrahydro-2-furoil)piperazin-1-il]-6,7-dimetoksikinazolin), bir kinazolin türevidir (Şekil 2.8). Ortalama yarılanma ömrü 8-

12 saattir. Terazosin (TZ), 1987 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından başlangıçta hipertansiyon tedavisi için onaylandıktan sonra, 1993 yılından bu yana benign prostat hiperplazisi (BPH) semptomatik tedavisi için uzun etkili bir Alfa-1 adrenerjik reseptör blokeri olarak da kullanılan bir ilaçtır (26, 27).



Şekil 2.8. Terazosin'in moleküler yapısı (127)

Alfa-1 adrenerjik reseptörler, G-proteine bağlı reseptör kategorisi üyeleridirler (128). Alfa-1 reseptörleri, düz kas dokusunda yaygın olarak bulunurken, özellikle etkisi vasküler düz kas, sfinkter düz kası ve idrar kesesi düz kası gibi yapılarda ön plana çıkmaktadır. Alfa-1 adrenerjik reseptörler, ayrıca merkezi sinir sistemi, endokrin sistem ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere diğer birçok organ sisteminde de bulunur (129).

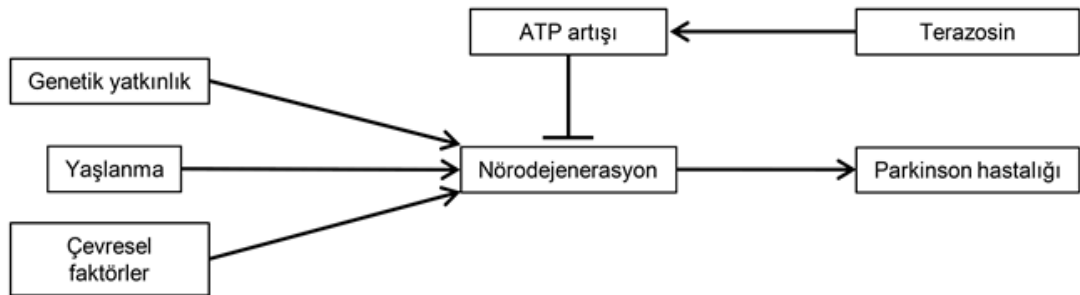
Biyoyararlanımı besinlerle değişmeyen TZ, bağırsaklardan tamamen emilir ve proteinlere yüksek oranda bağlanır. Yaklaşık %10 kadarı idrarla, %20 kadarı dışkı yoluyla değişmeden atılırken kalan kısmı ise metabolize edilir (130, 131).

Terazosin için henüz araştırma aşamasında olan endikasyon dışı kullanım alanları mevcuttur. Yeni yapılan bir çalışmada, kendi sınıfındaki diğer ajanlar arasında terazosin, MET (Medikal Ekspulsif Terapi) idrar asidi taşlarının çözülmesi için endikasyon dışı bir ajan olarak araştırma konusu olmuştur (132, 133). Taşların düşmesini artırmayı, taş düşme süresini kısaltmayı, hastanede kalış ve cerrahi müdahale ihtiyacını azaltmayı, taş ve işlemle ilişkili risk ve komplikasyonları önlemeyi, iş gücü kaybını engellemeyi ve maliyetleri düşürmeyi amaçlayan bir tedavi yöntemidir (134, 135). Ayrıca post-travmatik stres bozukluğu (PTSD) ile ilişkili kabusların hafifletilmesi için de araştırılmaktadır (136). Buna göre Terazosin'in kabusları önleyici bir etkisi olduğu net açıklanamamış olsa da, merkezi sinir sisteminde presinaptik alfa-adrenerjik reseptörlerin varlığını açıklamaya dayanak olabilir (129). Bunların dışında seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI)

kullanımına bağılı hiperhidrozis olan hastalarda antiperspirant etken olarak (137), kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromunda (138), radyasyon tedavisine bağılı üretrit ve idiyopatik oligozospermide araştırma konusu olarak ele alınmaktadır (129).

Terazosin'in yan etkilerinden biri meydana getirdiğı enerji artışıdır. Bozulmuş beyin enerji metabolizması ise Parkinson hastalığının önemli bir özelliğidir. TZ'in Fosfogliserat kinaz 1'e (Pgl1) bağlanarak enzimatik aktivitesini desteklediğı ve Pgl1 aracılığı ile ATP artışı sağladığı gösterilmiştir (28). ATP, hidrotrop (çözücü) özelliğe sahiptir; agregat oluşumunu önleyebilir ve protein agregatlarını çözebilir (29, 139). Parkinson hastaları ile gerçekleştirilen 12 haftalık bir pilot çalışmada, randomize olarak hastalara 5 mg TZ ve plasebo verilmiştir. Çalışma sonunda, TZ grubunda plasebo grubuna kıyasla beyindeki β ATP'nin inorganik fosfata oranında ve kan ATP seviyelerinde önemli bir artışa sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu pilot çalışma, TZ'nin Parkinson hastalarının beyin ve kanındaki ATP düzeylerini değiştirebileceğini düşündürmektedir. TZ'nin hastalığın gidişatını değiştirme potansiyeli olduğu ve daha ileri çalışmalar için ümit vadettiğı gösterilmiştir (Şekil 2.9) (140).

TZ ve PH bağlantısı ile ilgili yakın zamanda yapılmış bir çalışma, TZ kaynaklı artmış glikoliz mekanizmasını ortaya koymuştur. Çalışmada fare, rat, Drosophila ve nöral hücre hattında terazosinin beyin ATP seviyelerinde artış sağladığı gösterilmiştir (141). Ancak PH tablosunun en önemli belirteçlerinden alfa-sinüklein ve tirozin hidroksilaz (TH) proteinlerini kodlayan genler ile ilgili bir bilgi ortaya konmamıştır.



Şekil 2.9. Terazosin'in genel etki mekanizması (141)

Tez çalışmamız ile rotenone uygulanarak PH hayvan modeli oluşturduğumuz farelerde, glikolize bağılı ATP seviyesini arttırmak yolu ile nöroprotektif etkinlik gösterdiği bilinen terazosinin etkisini moleküler, histopatolojik ve motor fonksiyon

davranış testleri ile ortaya koyabilmeyi amaçladık. Nörodejenerasyonu DNA düzeyinde gösterebilmek amacıyla Comet testini, protein düzeyleri ve dopamin seviyesi hakkında bir bilgiye ulaşabilmek amacıyla *alfa-sinüklein (SNCA)* ve *tirozin hidroksilaz (TH)* genlerinin ifade düzeylerini, beyin dokusundaki değişimleri ortaya koyabilmek adına histopatolojik ve immünohistokimyasal verileri ve hayvan gruplarınca sergilenen motor fonksiyon davranışlarını inceledik.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma için Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından 11.08.2021 tarih ve 07-01 sayılı (Ek A) karar ile izin alınmıştır. Çalışma Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ile Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı bünyesindeki laboratuvarlarda yürütülmüştür.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

Tablo 3.1’de deneylerde kullanılan kimyasallar, Tablo 3.2’de ise cihazlar sunulmuştur. Malzemeler yerel araçlar ile temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar

Kullanılan Kimyasal	Firma
Alfa-Sinüklein Antikoru	BS-11787R, Bioss Antibodies, Massachusetts, ABD
Anti-Polivalent Biotinlenmiş Antikor	SensiTek, ScyTek Laboratories, Utah, ABD
Dab Kromojen Set	Thermo-Fisher Scientific Massachusetts, ABD
DAB Sekonder (Peroxidaz, Substrat) Kiti	Vector Laboratories, Kaliforniya, ABD
DMSO	Merck, Darmstadt, Almanya
DNaz/RNaz Free Su	Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific Massachusetts, ABD
Eosin Boyası	Merck, Darmstadt, Almanya
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Hematoksilen Boyası	Merck, Darmstadt, Almanya
Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
FastStart Essential DNA Green Master kit	Roche, Basel, İsviçre
KCl	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Ksilol	Merck, Darmstadt, Almanya
LMA	Thermo-Fisher Scientific Massachusetts, ABD

Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
NaCl	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
NaOH	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
NMA	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Primerler	Oligomer Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye
Trizol	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Rotenone, %95 < saf	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Terazosin	Aurobindo Pharma, Telangana, Hindistan
Tirozin Hidroksilaz Antikoru	BS-0016R, Bioss Antibodies, Massachusetts, ABD
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Missouri, ABD

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
- 80 Derin Dondurucu	New Brunswick Scientific, New Jersey, ABD
Elektroforez Tankı	Thermo-Fisher Scientific Massachusetts, ABD
Fare Beyin Matriksi (0.5 mm – Coronal)	RWD Life Science, Guangdong, Çin
Floresan ve Işık Mikroskobu	Eclipse, Nikon, Tokyo, Japonya
Gerçek Zamanlı qRT-PCR	CFX96, Bio-Rad, Kaliforniya, ABD
Mikroskop Kamerası	DS-Ri2, Nikon, Tokyo, Japonya
Mikrotom	Leica, Wetzlar, Almanya
pH metre	Hanna Instruments, Rhode Island, ABD
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Lab, Tuttlingen, Almanya
Sonikatör	Sonopuls, Bandelin Electronic, Berlin, Almanya
Spektrofotometre	NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Thermal Cycler	MyGene L, LongGene Scientific Instruments, Hangzhou, Çin

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Dizaynı

Bu çalışmada 6-8 aylık 30-35 gr ağırlığında, her grupta 8 ila 12 adet olacak şekilde toplam 68 adet Swiss erkek fare kullanılmıştır. Grupların birey sayıları ölüm oranları hesaba katılarak belirlenmiştir. Bu sebeple rotenone uygulaması olan gruplarda yer alan fare sayısı %50 fazladır. Araştırmada kullanılacak rotenone dozu, enjeksiyon sayısı ve araştırma süresi ana bilim dalımızda daha önce yapılmış çalışmalar (25) baz alınarak belirlenmiş ve 1,2 mg/kg/2gün rotenone dozu subkutan yolla DMSO'da çözülerek üç hafta boyunca uygulanmıştır. Benzer şekilde terazosin dozu da literatür taraması sonucunda tespit edilmiştir. 10 µg/kg terazosin dozu gün aşırı %0.9 salin solüsyonunda çözülerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır (141) (Tablo 3.3). Enjeksiyonlar 2 günde bir yapılmış ve hayvan refahı gözetilmiştir. Farelerin ihtiyaçları ad libitum karşılanmış, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü sağlanmıştır. Gruplar ve ortalama hayvan ağırlıkları Tablo 3.4'de sunulmuştur. Hayvan deneyleri intraperitoneal olarak %10'luk ketamin (100 mg/kg) ve % 2'lik ksilazin (10 mg/kg) uygulanarak anestezi altında sonlandırılmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada uygulanan kimyasallar ile ilgili bilgiler

Kimyasalın Adı	Dozu	Veriliş Yolu	Veriliş Sıklığı	Bilinen Yan Etkileri
Rotenone	1.2 mg/kg	SC	Gün aşırı	Ani ölüm
Terazosin	10 µg/kg	İP	Gün aşırı	Hipotansiyon

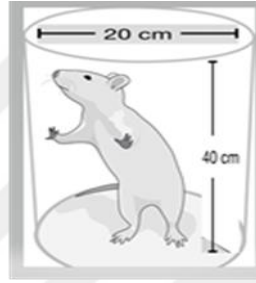
Tablo 3.4. Çalışma grupları ve uygulama süreleri ile kullanılan deney hayvanı sayıları

Grup	Uygulama	Uygulama Süresi	Deney Hayvanı Sayısı
1	Yok (Negatif Kontrol)	3 Hafta	8
2	1 mL DMSO (Çözücü Kontrol)	3 Hafta	8
3	1.2 mg/kg Rotenone (Pozitif Kontrol)	3 Hafta	12
4	1.2 mg/kg Rotenone + 10 µg/kg Terazosin (Aynı zamanda rotenone ve terazosin uygulaması)	3 Hafta	12
5	1.2 mg/kg Rotenone + 10 µg/kg Terazosin (3 haftalık rotenone uygulaması bittikten sonra terazosin uygulaması)	3 Hafta + Ek 1 Hafta	12
6	10 µg/kg Terazosin	3 Hafta	8
7	10 µg/kg Terazosin	1 Hafta	8

Araştırmada rotenone ve TZ'nin etkisinin ortaya konması için çeşitli metotlar kullanılmıştır. Deneyin sonlandırılacağı gün uygulanan motor fonksiyon testi ile nöron ölümü ile oluşabilecek motor fonksiyon kayıpları araştırılmıştır. Comet metodu ile striatal bölgedeki DNA hasarı araştırılmıştır. Gerçek zamanlı qRT-PCR ile alfa-sinüklein (*SNCA*, *PARK1*) ve tirozin hidroksilaz (*TH*) genlerinde meydana gelen ekspresyonel değişiklikler araştırılmıştır. H-E boyama ile Lewy cisimciği oluşumu, nöron hasarı gibi histopatolojik değişimler değerlendirilmiştir. Lewy cisimciklerinin içeriğinde bulunması beklenen alfa-sinüklein ve dopaminin sentezinde görev alan tirozin hidroksilaz immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Beyin dokusu fare beyin matriksi (0.5 mm – Coronal) kullanılarak örneklenmiştir. Kesit alınacak bölgelerin belirlenmesi için çevrimiçi fare beyin kütüphanesi (142, 143), Wang Ip ve arkadaşlarının (2017) çalışması (144) ve Allen enstitüsü interaktif fare beyin atlası (145) kullanılmıştır.

3.2.2. Silindir spontan aktivite testi

Motor fonksiyonun değerlendirilmesi için “Silindir Spontan Aktivite Testi” (146) uygulanmıştır. Ayna ve üst kısmı açık silindir yardımı ile deney düzeneği oluşturulmuş ve farelerin düzenek içerisindeki davranışları kamera yardımı ile 3 dk boyunca kayda alınmıştır. Uygulamalar arasında başka bir fare deneye devam edilmeden önce düzenek dikkatle temizlenmiş ve kuruması sağlanmıştır. Test alanı farelerin dikkatinin dağılmaması ve donup kalmamaları için sessiz tutulmuştur. Kaydedilen videolar daha sonra izlenmiş ve farelerin iki ayağı üzerinde yukarı doğru kalkarak silindire dayanma hareketini kaç kez yaptıkları sayılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Spontan silindir aktivite testi düzeneği

3.2.3. Comet Metodu

Deneyin sonlandırılmasını takiben 2 saat içerisinde comet metodu uygulanmaya başlamıştır. Comet metodunda fosfat tamponu (PBS), lizis, elektroforez, nötralizasyon solüsyonları ile etidyum bromür kullanılmaktadır. Solüsyonlar distile su ile çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmış ve buz soğukluğunda uygulanmıştır. Solüsyonların nasıl hazırlandığı tablo 3.5’de gösterilmiştir. Hücrelerin yayılacağı lamalar normal erime noktalı agaroz (NMA) ile önceden kaplanmış ve hücreler düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile karıştırılarak yayılmıştır.

NMA %1’lik, LMA ise %0,7’lik olarak PBS içerisinde çözülerek taze şekilde hazırlanmıştır. Lamlar çalışmadan 1 gün önce 120 µL NMA ile kaplanarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.5. Comet metodunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

Solüsyon	Kimyasal Malzeme	Miktarı
PBS	Hazır ticari tablet	1 tablet/100 mL
Lizis (Çalışma solüsyonu, pH: 10, son hacim 100 mL), Triton X ve DMSO katı kimyasallar çözüldükten sonra son hacim 100 mL olacak şekilde eklenir	2,5 M NaCl 100 mM Na ₂ EDTA 10 mM Trizma Base Triton-X-100 DMSO	13,08 gr 3,31 gr 0,11 gr 1 mL 10 mL
Elektroforez Tamponu (Çalışma solüsyonu, pH > 13, son hacim 600 mL)	NaOH Sodyum EDTA	7,2 gr 0,22 gr
Nötralizasyon Tamponu (pH: 7,5, son hacim 1 L)	Tris	48,5 gr

Beyin dokusu PBS içerisinde homojenize edilmiş ve tortulardan kurtulmak amacı ile filtreden geçirilmiştir. Elde edilen hücrelere son hacim 1 mL olacak şekilde PBS eklenmiş ve 10 dk 2500 RPM’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve dibe çöken hücreler 25 µL PBS ile tekrar sulandırılmıştır. Hücreler 100 µL %0.7’lik LMA ile karıştırılarak önceden NMA ile kaplanmış lamlara yayılmış ve jel donana kadar beklenmiştir. Ardından buzdolabında 120 dk lizis işlemi uygulanmıştır. Lizisin ardından lamlar elektroforez tankı içine yerleştirilerek buz soğukluğunda elektroforez tamponu eklenmiş, buzdolabında 30 dk beklenmiş ve 1.02 V/cm²’de 25 dakika elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında lamlar nötralizasyon tamponu ile 2 kez yıkanmış, oda ısısında kurumaya bırakılmış ve sonrasında değerlendirme yapılana kadar buzdolabına tutulmuştur. Etidyum bromür ile boyanarak floresan mikroskop altında fotoğrafları çekilen örnekler, OpenComet (147) programında otomatik değerlendirilmiştir. Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) (148), DNA hasarının göstergesi olarak kullanılmıştır.

3.2.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Alınan dokular DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen tüplerde prosedür uygulanıncaya kadar -80 derece derin dondurucuya kaldırılmıştır. -80 dereceden çıkarılan örnekler, 1 ml Trizol eklenerek en düşük seviyede ayarlanan sonikatör ile ısıtmadan homojenize edilmiştir. 12.000 x g ve +4 derecede 10 dk santrifüj uygulanan ve süpernatant DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen yeni bir tüpe aktarılan örneklere 0,2

ml kloroform eklenmiştir. 12.000 x g ve +4 derecede tekrar 15 dk santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj işleminin ardından tüplerde 3 faz oluşmuş ve bu fazlardan üstte kalan, renksiz sulu (aqueous) RNA fazı yeni bir DNaz/RNaz ve pirojen içermeyen tüpe aktarılarak 0,5 ml izopropil eklenmiştir. Yine 12.000 x g ve +4 derecede 10 dk santrifüj uygulaması yapılarak süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve 1 ml %75'lik etanol eklenerek bu kez 12.000 x g ve +4 derecede 5 dk santrifüj uygulanmıştır. Süpernant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında 5 dk kurumaya bırakılmış ve hazır steril su ile tekrar sulandırılmıştır. RNA ölçümü hemen yapılarak örnekler cDNA'ya çevrilmiştir.

RNA miktar ve saflık ölçümü nanodrop cihazı ile yapılmış ve saflığı 1,8 - 2,0 arasında olan örnekler cDNA sentezinde kullanılmıştır. Saflığı 1,8 - 2,0 dışında olan örneklerin RNA'ları yedek ayrılmış dokulardan tekrar izole edilmiştir.

Thermo Applied Biosystems yüksek kapasiteli cDNA ters transkripsiyon kitinin protokolüne göre termal döngü cihazında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde yer alan 25X dNTP karışımı, buffer ve random primerler ile mastermiks hazırlanmış ve bu mastermiksten her örnek için 4,8 µl kullanılmıştır. Yine kit içerisinde yer alan ters transkriptaz enziminden 1 µl ile RNA miktar tayinine göre 1 µg karşılığı RNA konulmuş kullanılmış ve tüpteki reaksiyon hacmi kit içerisinde yer alan hazır steril su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. Termal döngü cihazında aşağıdaki 135 dakikalık protokol uygulanmıştır.

- 25 °C'de 10 dakika
- 37 °C'de 120 dakika
- 85 °C'de 5 dakika

qRT-PCR işleminde kullanılacak primerlerin tasarımları, Tablo 3.6'de görülen genler için NCBI internet siteleri kullanılarak spesifik mRNA dizilimlerinin saptanması ve olası primer dizilimlerinin denenmesi ile yapılmıştır (149, 150).

Tablo 3.6. Genler ve genlere spesifik primer dizilimleri

Gen	Sense - Antisense	Spesifik Primer Dizilimi
<i>PARK 1 (SNCA)</i>	Sense	GCAAGGGTGAGGAGGGGTA
	Antisense	AGGCTTCAGGCTCATAGTCTTG
<i>TH (Tyrosine Hydroxylase)</i>	Sense	GTCTCAGAGCAGGATACCAAGC
	Antisense	CGAATACCACAGCCTCCAAT
<i>GUSB (HouseKeeping)</i>	Sense	GGCTGGTGACCTACTGGATTT
	Antisense	AAGTTGACCCTGGTTCCCTG
<i>TFRC (HouseKeeping)</i>	Sense	CCGCTCGTGGAGACTACTTC
	Antisense	GAGATACATAGGGCGACAGGA

Ticari olarak sentezletirilen primerler qPCR reaksiyonu için son hacimde (20 µL) 500 nM olacak şekilde sulandırılmıştır.

Ekspresyon seviyeleri Bio-Rad CFX96 gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Reaksiyon optimizasyonu referans genlerin ct değerlerine göre yapılmıştır. Son hacim 20 µL olacak şekilde tüplere 500 nM'lık sense ve antisense primerlerden 4'er µL, SYBR green DNA süpermiksinden 10 µL, cDNA'dan 1 µL ve DNaz/RNaz içermeyen sudan 1 µL eklenmiştir. Tablo 3.7'da sunulan kit üreticisinin protokolü ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilmek üzere ölçüm yapılmıştır. Her bir örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 3.7. Gerçek zamanlı qPCR cihazında kullanılan termal döngü

Preİnkübasyon 95 °C	PCR Döngüsü (40 Döngü)			Melt-Curve Analizi
	95 °C	60 °C	72 °C	
600 s	10 s	10 saniye	10 saniye	65 °C - 95 °C 0.5°C artış 2-5 sn / basamak

3.2.5. Histokimya ve İmmünohistokimya

3.2.5.1. Rutin Histolojik Takip Yöntemi

Rutin parafin takibi gerçekleştirilen beyin dokularının parafin bloklarından alınan kesitler ile hematoksilin-eozin (HE) boyama için kullanıldı. Rutin parafin takibi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Farelerden alınan beyin dokuları, tamponlu formaldehit fiksatifinde oda sıcaklığında 24-48 saat boyunca fikse edildi.

2. Fikse olan beyin dokuları, süre sonunda dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100'lük etanolden) geçirildi. Alkol serilerindeki bekletme süreleri %70, %80 ve %90'luk etanollerde birer gün; %100'lük etanolde ise 3-5 saat olarak gerçekleştirildi.

3. Dehidratasyondan sonra, alkol+ksilol karışımında 10 dakika ve sonrasında beyin dokularının şeffaflaştırılmaları için saf ksilolde 10 dakika bekletildi.

4. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi için beyin dokuları, sıvı parafinde 3-5 saat 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra temiz parafin içine uygun oryantasyonda gömülüp, parafin bloklar oluşturuldu.

5. Parafin takibinden sonra 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, HE boyama ile fare beyin dokularının histolojik yapılarının genel olarak değerlendirmesini yapıldı; ayrıca, dokuların immünohistokimyasal boyamalar için uygunluğu da değerlendirildi.

3.2.5.2. Fare Beyin Dokusu Kesitlerinde Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama

Fare beyin dokusu kesitlerinin, HE boyaması aşağıda anlatılan basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi:

1. Parafin bloklardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60°C'lik fırında 1 saat bekletilerek; dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.

2. Daha sonra preparatlar ksilol I ve ksilol II'de 10'ar dakika bekletildi.

3. Suyu indirme (rehidratasyon) için preparatlar, azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) 10'ar dakika tutuldu.

4. Süre sonunda preparatlar, distile suda beş dakika yıkandı.

5. Hematoksilen boyasında 3 dakika bekletildikten sonra preparatlar çeşme suyunda yıkandı ve süre sonunda, eozin boyasında 2 dakika tutulduktan sonra tekrar çeşme suyunda yıkandılar.

6. HE boyamasından sonra, preparatlar %70, %80, %90 ve %100'lük artan etanol serilerine batır-çıkartılarak, dehidratasyonları sağlandı.

7. Son olarak ksilol I ve II'de 10'ar dakika tutulan preparatlar, entellan ile kapatılıp; ışık mikroskopunda (Zeiss) beyin dokularının genel histolojik yapıları ve immünohistokimyasal boyamalar için uygunluğu değerlendirildi.

Beyin dokuda meydana gelen yapısal değişiklikler Refaiy ve arkadaşları (2011)'in yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.8) (151).

Tablo 3.8. Skorumama tablosu.

(-) skor	Negatif skor	Hiçbir yapısal değişikliğin olmasını ifade etmektedir.
(+) skor	1 pozitif skor	Hafif derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.
(++) skor	2 pozitif skor	Orta derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.
(+++)	3 pozitif skor	Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

Ayrıca, Kesitlerde analizler yapıldı ve elde edilen sayısal veriler, parametrik bir test olan tek yönlü ANOVA ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.

3.2.6. İmmünohistokimyasal Boyama

3.2.6.1. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

Primer (Çoğul Klonlu-Poliklonal) Antikor: Alfa- Beta Sinuklein (Anti-mouse monoklonal anti-RUNX2 antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı. Tirozin Hidroksilaz (Anti-rabbit poliklonal Anti-Cathepsin antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:200 oranında sulandırıldı.

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

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solution 25X): Seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı. 1500 ml distile suya 500 ml PBS karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Sodyum Sitrata Solüsyonu (Citrate Buffer 10X): 450 ml distile suya 50 ml Citrate Buffer solüsyonu karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%3): Hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

DAB (3, 3 diaminobenzidin) Kromojen: Bu madde ikincil antikor olarak kullanılan Horseradish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı. Üretici

firmanın (Scytek) önerisine göre 125 ml substrat için 7,5 ml kromojen içerecek şekilde karıştırıldı. Her karışım kullanımından yaklaşık 20 dk önce taze olarak hazırlandı.

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

3.2.6.2 İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

1. 2-3 µm kalınlığında elde edilen parafin kesitler etüvde 60°C etüvde 1 saat bekletildi.
2. Deparafinizasyon işlemi için Ksilol-1'de 10 dk, Ksilol-2'de 10 dk bekletildi.
3. Dehidratasyon işlemi için 5 dk sürelerle sırasıyla %100'lük, %96'lık, %90'lık, %80'lik ve %70'lik alkolde bekletildi.
4. İki ayrı PBS solüsyonunda 5'er dk bekletildi.
5. Antijen retrieval uygulaması için sitrat buffer tamponu içinde mikrodalga fırında 600W'da 2 dk ısıtıldı ve 20 dk +4°C'de soğumaya bırakıldı.
6. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
7. PAP Pen kalem ile polilizinli lamaların üzerindeki doku kesitlerinin etrafı çizildi. Bu işlem ileriki safhalarda da gerektiğçe tekrarlandı.
8. Dokuların üzerini kaplayacak şekilde ve diğer dokularla karışmamasına dikkat edilerek nemli ortamda %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
9. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
10. Dokunun üzerini kapatacak şekilde Super Block damlatılarak 5 dk bekletildi.
11. Lamalardaki 1. kesitlere Tirozin Hidroksilaz primer, 2. kesitlere Alfa- Beta Sinuklein primer antikor, 3. kesitlere kontrol amacıyla sekonder antikor damlatıldı. Lamalar nemli kabin içerisinde +4°C'de bir gece bekletildi.
12. Ertesi gün kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
13. Sekonder antikor (SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody), dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 20dk bekletildi.
14. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
15. Dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde Streptavidin Horseradish Peroksidaz (SensiTek HRP) damlatıldı ve 20 dk bekletildi.
16. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
17. DAB Kromojen solüsyonu, dokuların üzerine damlatıldı ve reaksiyon vermesi için 10 dk bekletildi.

- 18.Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
- 19.Hematoksilen dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 30 sn bekletildi.
- 20.Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
- 21.Sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden batır çıkar yapılarak geçirildi.
- 22.Kesitler şeffaflaşana kadar ksilolde bekletildi.
- 23.Entellan kullanılarak kapama yapıldı.

Boyanan örnekler binoküler mikroskopta incelenip değerlendirildi ve görüntüleme donanımı ile fotoğraflar elde edildi. Beyin dokusu kesitlerinde, kontrol ve deney gruplarında histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak beyin dokusundaki hasarlanma-iyileşme değerleri; kamera destekli binoküler ışık mikroskobu (ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan) ile karşılaştırıldı.

3.2.7. İstatistik Değerlendirmeler

İstatistik değerlendirmeler SPSS V20 (152) kullanılarak yapılmıştır. Tüm analizler için $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Histolojik parametrelerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney testleri kullanılmıştır. Comet metodunda sonuçlar one-way anova (tukey) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Gerçek zamanlı qPCR verileri TFRC ve GUSB referans genlerine göre normalize edilerek ve $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılarak REST2009 programı aracılığı ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Rotenone uygulaması olan gruplar 3, 4 ve 5’de sırası ile 2, 2 ve 4 olmak üzere toplam 8 fare deneyler tamamlanmadan ölmüştür. Bu hayvanlar çalışma dışı bırakılmış ve deneyler toplam 60 hayvan ile tamamlanmıştır. Enjeksiyonlar öncesinde ve sonrasında kaydedilen ortalama ağırlıklar tablo 4.1’de sunulmuştur. Buna göre hayvanların ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmamıştır ($p > 0,05$). Sonrasında hayvan deneyleri, anestezi altında sonlandırılmıştır.

Tablo 4.1. Farelerin ortalama ağırlıkları (gr)

Gruplar	Enjeksiyonlar öncesi ortalama ağırlık	Enjeksiyonlar sonrası ortalama ağırlık	p değeri
1	29,34 ± 1,64	30,14 ± 1,50	0.18
2	34,03 ± 1,63	32,93 ± 2,09	0.14
3	37,57 ± 2,45	36,62 ± 1,37	0.43
4	34,86 ± 2,23	34,43 ± 1,61	0.65
5	37,20 ± 3,08	35,55 ± 1,57	0.34
6	33,19 ± 1,68	31,85 ± 1,61	0.13
7	34,79 ± 3,67	32,24 ± 3,67	0.23

4.1. Motor Fonksiyon Testi

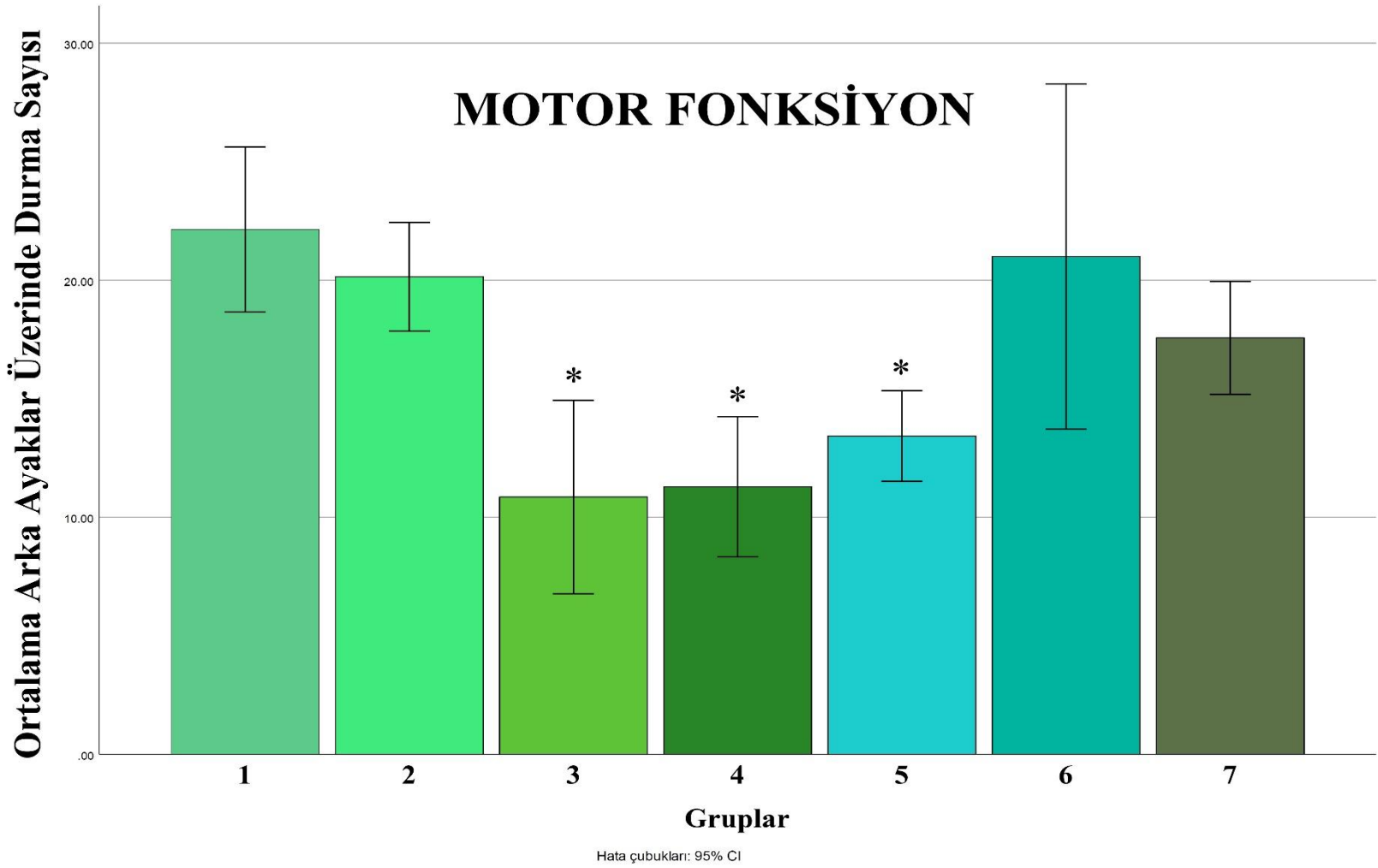
Motor fonksiyon testi ile elde edilen veriler tek yönlü anova (tukey) ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar tablo 4.2’de “Ortalama ± Standart Sapma” olarak sunulmuştur (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Farelerin motor fonksiyon kabiliyetlerinin değerlendirilme sonuçları

Gruplar	Ortalama Arka Ayaklar Üzerinde Durma Sayısı
1	22,14 ± 3,76
2	20,14 ± 2,48
3	10,86 ± 4,41 *
4	11,29 ± 3,20 *
5	13,43 ± 2,07 *
6	21,00 ± 7,87
7	17,57 ± 2,57

Ort±Std. Sapma; *: Grup 1, 2, ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05)

Kontrol ve çözücü kontrol grupları DMSO'nun etkisini görebilmek amacı ile kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir (p > 0,05). Rotenone uygulaması ise beklendiği gibi motor kabiliyetleri anlamlı derecede azaltmıştır (p < 0,05). Rotenone ile birlikte veya rotenone uygulaması sonrasında terazosin uygulanan gruplarda da motor kabiliyetler kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede daha azdır (p < 0.05). Sadece rotenone uygulaması yapılan grup 3 ile kıyaslandığında bu gruplarda motor fonksiyonda az miktarda iyileşme olduğu, ancak bu iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir (p > 0.05). Terazosin uygulamaları, rotenone maruziyetinin yarattığı motor fonksiyon hasarında düzelme sağlayamamıştır. Yalnızca terazosin uygulaması yapılan grup 6 ve 7'de ise motor kabiliyetlerde önemli bir değişiklik tespit edilememiştir (p > 0.05). 1 hafta terazosin uygulaması yapılan grup 7'de kontrol grubuna kıyasla motor kabiliyetlerde bir miktar azalma olduğu görülmektedir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (p > 0.05).



Şekil 4.1. Motor fonksiyon kabiliyetlerinin karşılaştırılması *: Grup 1, 2, ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

4.2. DNA Hasarı

OpenComet programında değerlendirilen fotoğraflardan elde edilen veriler tek yönlü anavo (tukey) ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve bazı gruplar için anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak Tablo 4.3’de sunulmuştur.

Tablo 4.3. Ortalama DNA hasar miktarları

Gruplar	Ortalama Kuyruk DNA Yüzdesi
1	4,63 \pm 5,30
2	4,93 \pm 6,97
3	6,96 \pm 7,85 *
4	6,77 \pm 7,39 *
5	6,82 \pm 7,94 *
6	4,73 \pm 6,51
7	4,93 \pm 6,03

Ort \pm Std. Sapma; *: Grup 1, 2, 6 ve 7 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$)

Kontrol ve DMSO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Hasar benzer seviyededir.

Rotenone ve rotenone+terazosin uygulaması yapılan gruplar 3, 4 ve 5 ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Bu 3 grubun da DNA hasarı benzer seviyededir. Yalnızca terazosin uygulaması yapılan grup 6 ve 7’de ise hasar kontrol grubu ile benzer seviyededir. Hasarda istatistiksel olarak anlamlı artma veya azalma tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Buna göre terazosin DNA hasarında herhangi bir olumsuzluğa sebep olmamış ancak rotenone kaynaklı hasarın engellenmesinde veya tamirinde de faydalı olmamıştır.

4.3. Gen Ekspresyonu

SNCA ve *TH* genlerinin ekspresyon seviyeleri referans genlere göre normalize edilerek kontrol grubuna kıyasla değerlendirilmiş ve sonuçlar kat değişimi olarak Şekil 4.2’de sunulmuştur. Buna göre bazı gruplar için anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. DMSO uygulaması yapılan çözücü kontrol grubunda (grup 2) her iki gen için de ekspresyon seviyeleri kontrol grubu ile benzer seviyededir. Genlerin ekspresyon seviyelerinde sınırlı bir yükseliş görülmüş ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Alfa-sinükleinin sentezinden görevli olan *SNCA* geninin ekspresyon seviyesinde farklı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4.4). Rotenone *SNCA* geninin ekspresyon seviyesinde 1,58 katlık önemli bir yükselişe sebep olmuştur. Ancak bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Rotenone ile birlikte veya rotenone uygulaması sonrasında terazosin uygulanan grup 4 ve 5’de ise ekspresyon seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Bu azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı değildir ($p > 0,05$). Ancak rotenone kaynaklı *SNCA* geninde meydana gelen ekspresyon artışını önemli seviyede azaltmıştır. Bu durum terazosinin rotenone kaynaklı *SNCA* ekspresyon artışını engellemede veya düzeltmede faydalı olabileceğini göstermektedir. İlginç şekilde sadece terazosin uygulaması yapılan grup 6 ve 7’de de *SNCA* gen ekspresyonu azalmıştır. 1 hafta uygulama yapılan grup 7’deki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). 3 hafta terazosin uygulaması yapılan grup 6’da ise ekspresyon seviyesindeki azalma çok daha fazladır ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Buna göre terazosinin *SNCA* geninin ekspresyonunda azalmaya sebep olarak fazladan alfa-sinüklein birikiminin önüne geçebileceği düşünülebilir.

Tablo 4.4. *SNCA* geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler

Gruplar	Kat Değişimi	Standart Hata
2	1,29	0,29 – 5,55
3	1,58	0,61 – 4,35
4	0,75	0,07 – 4,09
5	0,92	0,53 – 1,52
6	0,21 *	0,07 – 0,66
7	0,79	0,37 – 1,75

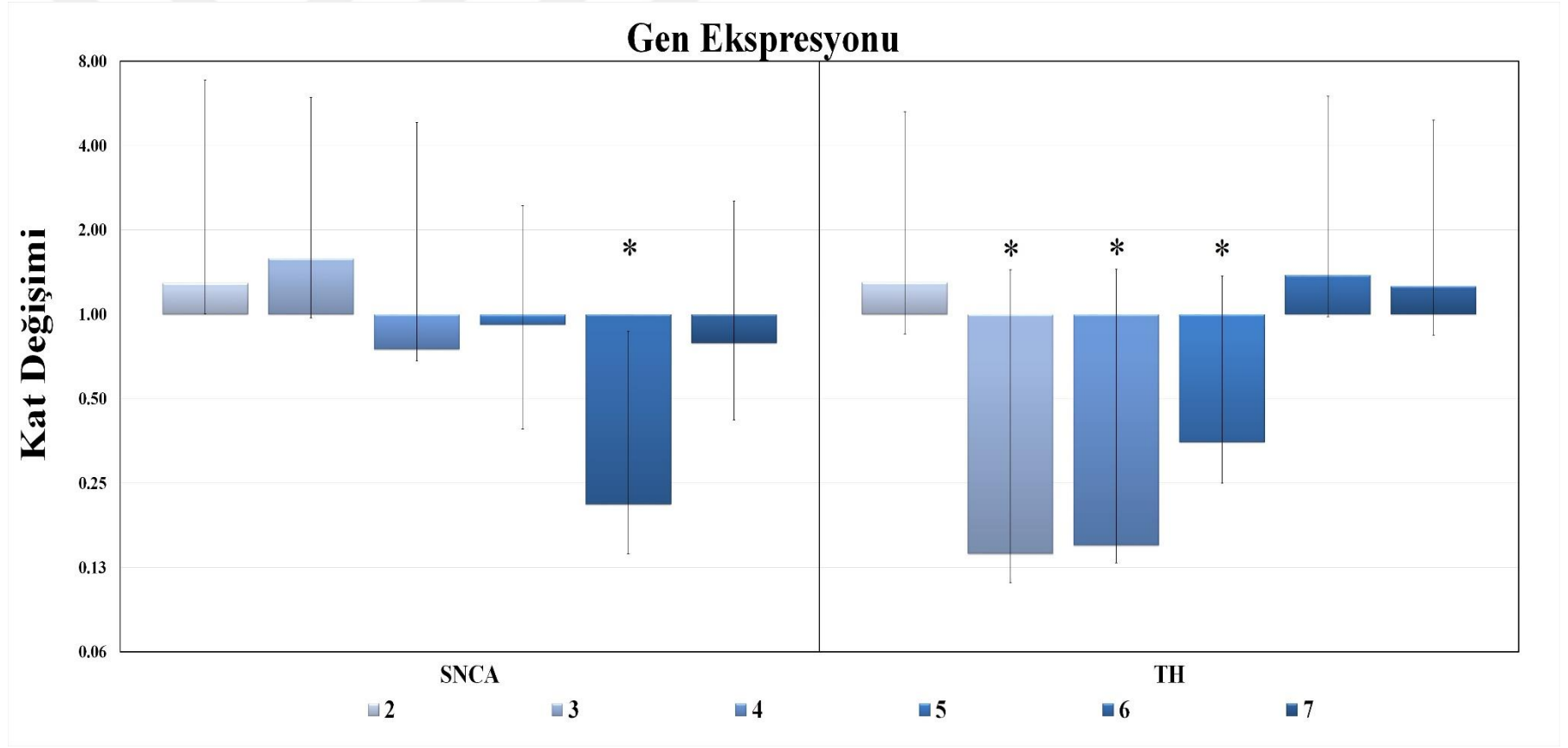
Sonuçlar, referans genlere göre normalize edilmiştir. *: Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$).

TH geninin ekspresyon seviyelerinde de bazı gruplar için anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Rotenone uygulaması *TH* ekspresyonunu önemli seviyede azaltmıştır ($p < 0.001$). Benzer şekilde rotenone ile birlikte veya rotenone uygulaması sonrasında terazosin uygulanan grup 4 ve 5’de de *TH* gen ekspresyonu anlamlı seviyede azalmıştır ($p < 0.001$). Sadece terazosin uygulaması yapılan grup 6 ve 7’de ise *TH* ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir miktar artış tespit edilmiş ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Buna göre terazosin *TH* gen ekspresyonunda tek başına anlamlı bir değişikliğe sebep olmamış, rotenone kaynaklı *TH* ekspresyon azalışında artış da sağlayamamıştır.

Tablo 4.5. *TH* geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler

Gruplar	Kat Değişimi	Standart Hata
2	1,30	0,45 – 3,99
3	0,14 *	0,03 – 0,65
4	0,15 *	0,02 – 1,30
5	0,35 *	0,10 – 1,02
6	1,38	0,40 – 4,61
7	1,26	0,42 – 3,68

Sonuçlar, referans genlere göre normalize edilmiştir. *: Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$)



Şekil 4.2. *SNCA* ve *TH* genlerinin ekspresyon seviyeleri. Sonuçlar, referans genlere göre normalize edilmiştir. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$)

4.4. Histopatolojik Bulgular

Tüm gruplara ait histopatolojik skorlamalar tablo 4.6'da görülmektedir. Kontrol grubuna ait beyin dokularında herhangi bir histopatolojiye rastlanmamıştır. Benzer şekilde DMSO uygulanan 2 numaralı çözücü kontrol grubunda da histopatolojiye rastlanmamıştır (Resim 1 ve 2).

Bir hafta yalnız TZ verilen grup 7'de normal histolojik bulgular gözlenmiştir. Grup 1 ve 2'den gruplarından farklı olarak bazı bölgelerde hemorajik alanlar görülmüştür. Ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Resim 3), ($p>0,05$). Aynı şekilde üç hafta yalnızca TZ uygulanan grup 6'nun beyin dokularının incelenmesi neticesinde grup 7 ile benzer bulgular gözlemlenmiştir (Resim 4).

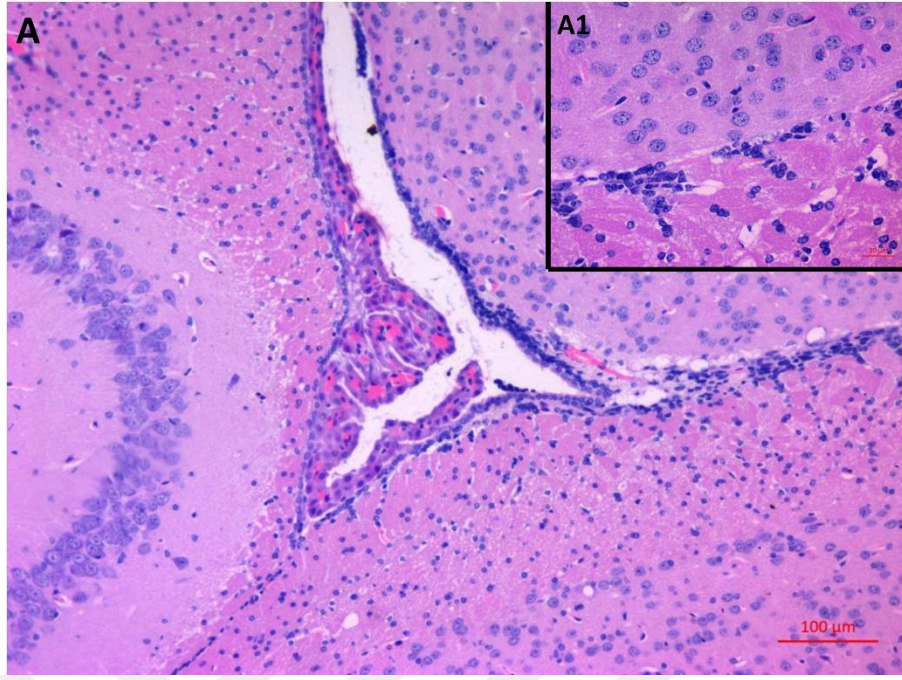
Rotenone uygulaması yapılan grup 3'ün grup 1 ile karşılaştırılarak incelenmesi ile nöropil vakuolizasyonu, nöron dejenerasyonu, nöron sayısında azalma, hemorajik alanlar ve mononükleer hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik bulgular tespit edilmiştir. Substantia nigra Lewy cisimciklerinde artış görülmüştür ($p < 0,05$), (Resim 5 ve 6).

Üç hafta rotenone uygulamasının ardından bir hafta TZ uygulanan grup 5'in preparatları sadece rotenone verilen grubun preparatlarıyla karşılaştırıldığında bazı histopatolojik bulgularda azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Lewy cisimcikleri, nöron dejenerasyonu, hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonu istatistiksel olarak daha azdır ($p<0,05$). Diğer parametrelerde azalmalar olmakla birlikte bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir (Resim 7).

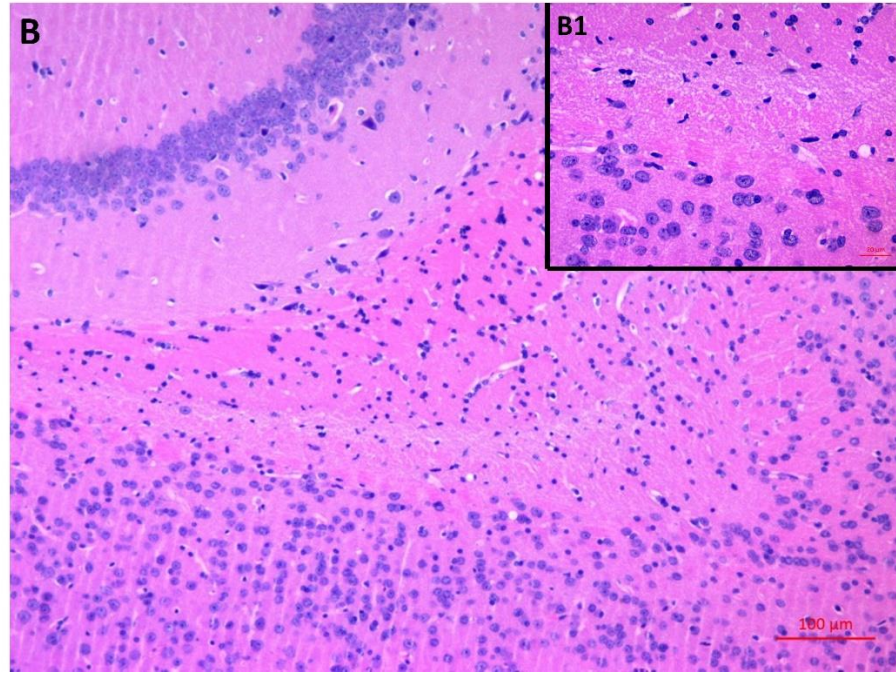
Üç hafta rotenone ve TZ'nin beraber uygulandığı grup 4, rotenone grubu kıyaslandığında bazı anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Resim 8). Buna göre Lewy cisimciği oluşumu ve buna bağlı olarak nöron dejenerasyonu anlamlı derecede daha düşüktür ($p<0,05$). Hemorajik alanlar ve mononükleer hücre infiltrasyonunda da azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Nöron sayısı azalışı da önemli seviyede daha düşüktür ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Fare Beyin Dokularının Hematoksilen-Eozin Boyamalarının Değerlendirmesi

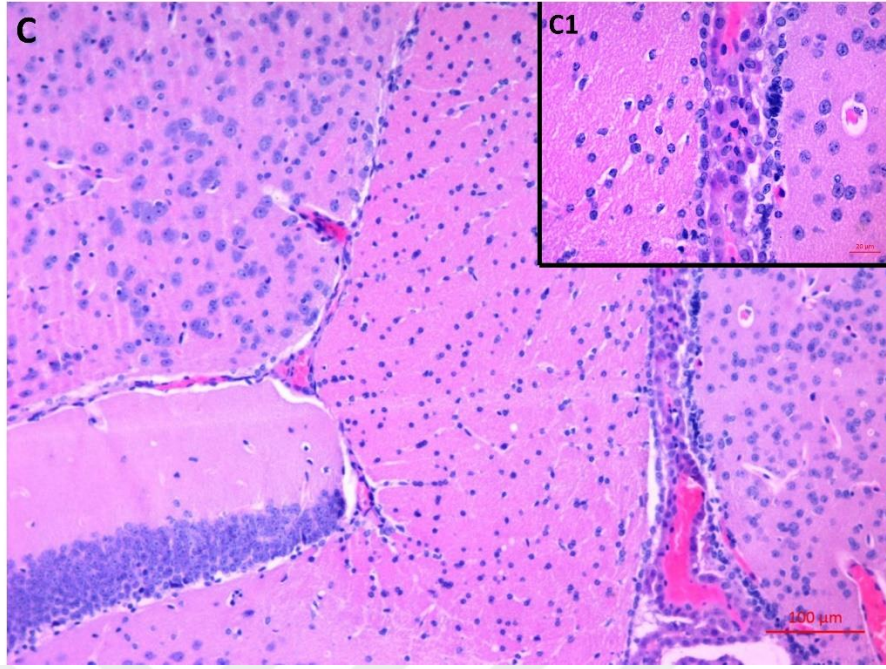
Gruplar/Parametreler	Lewy Cisimcikleri	Nöropil Vakuolizasyonu	Nöron Dejenerasyonu	Nöron Sayısında Azalma	Hemorajik Alanlar	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	++/+++	++/+++	++/+++	+++	++/+++	++/+++
4	+	++/+++	+	++	+/++	+/++
5	+/++	++/+++	+/++	++/+++	+/++	+/++
6	-	-	-	-	-/+	-
7	-	-	-	-	-/+	-



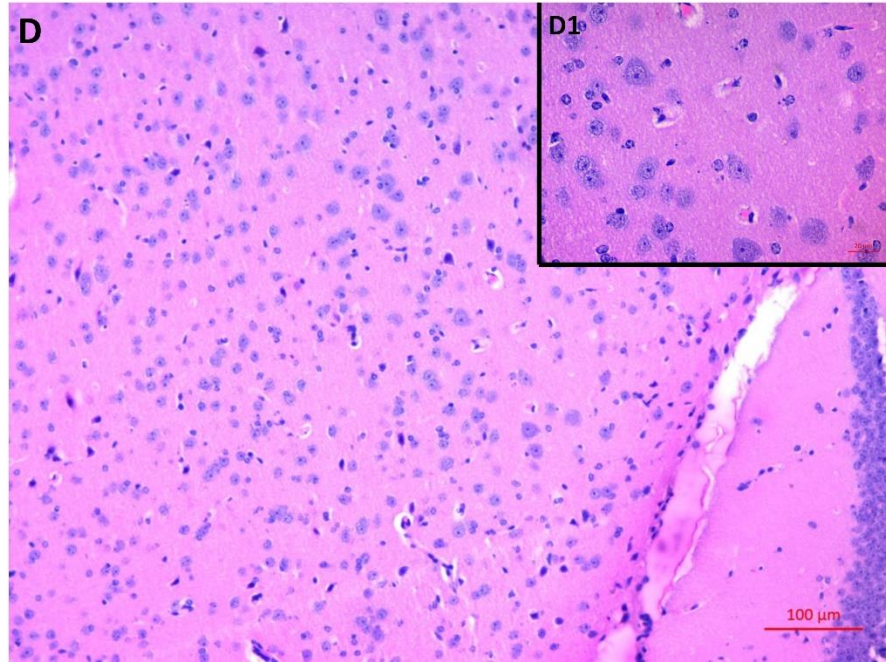
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait beyin dokusunun normal histolojik görüntüsü (H-E, AX10 ve A1X40).



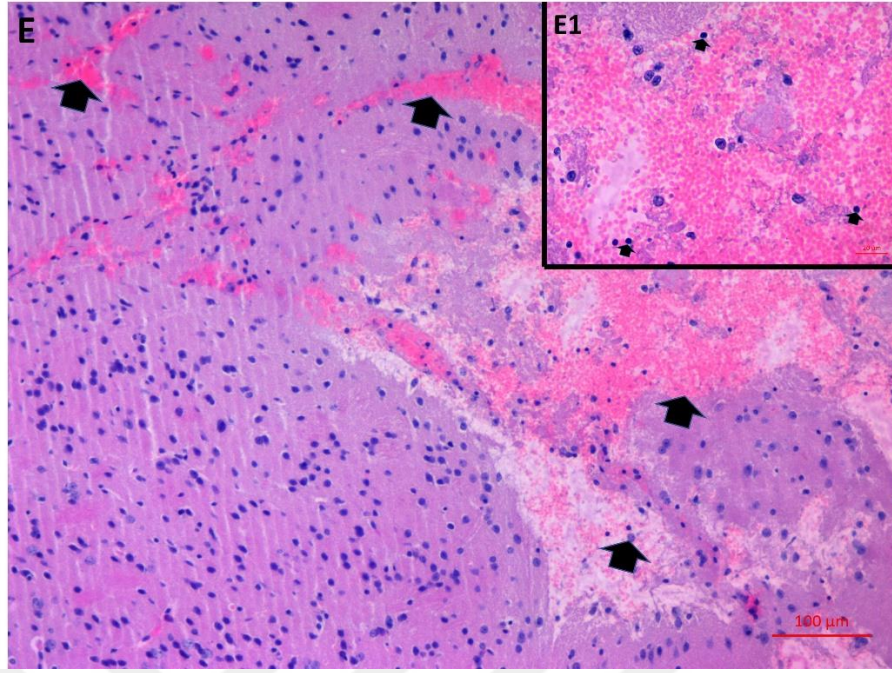
Resim 4.2. Çözücü kontrol (DMSO) grubuna ait fare beyin dokusunun normal histolojik görüntüsü (H-E, BX10 ve B1X40).



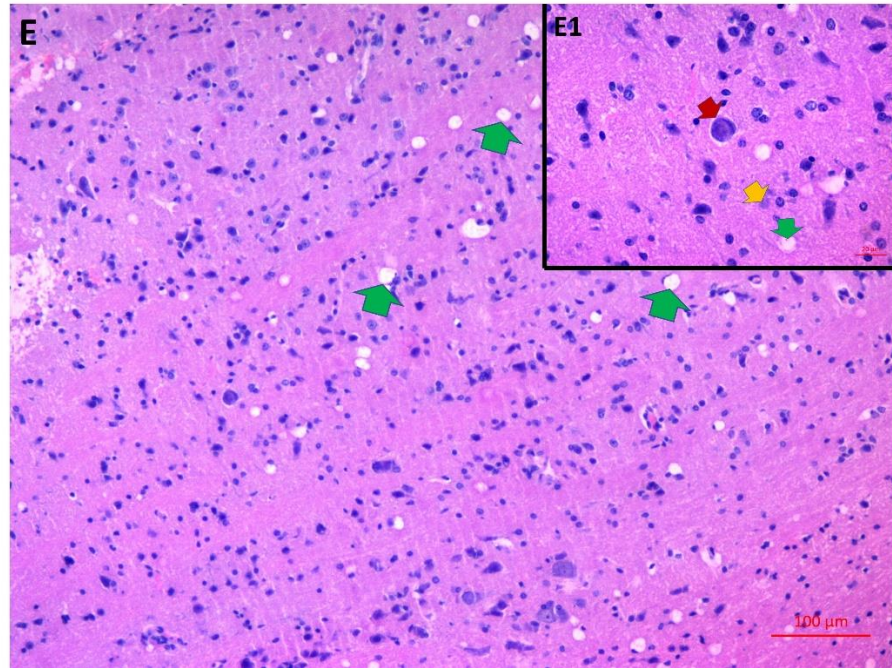
Resim 4.3. Bir hafta yalnızca terazosin uygulanan grup 7'ye ait fare beyin dokusunun histolojik görüntüsü (H-E, CX10 ve C1X40).



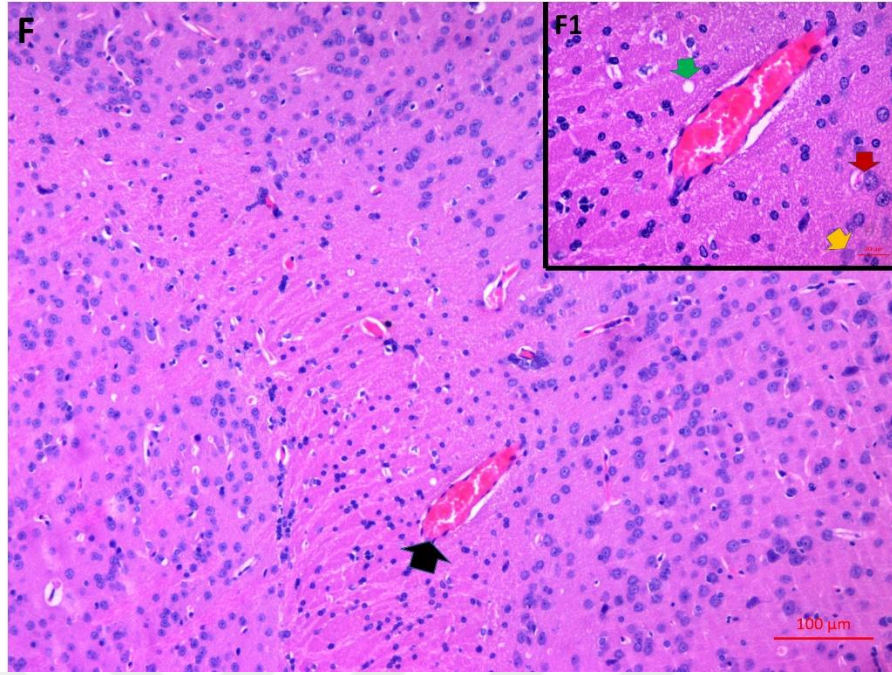
Resim 4.4. Üç hafta yalnızca terazosin uygulanan grup 6'ya ait beyin dokusunun histolojik görüntüsü (H-E, DX10 ve D1X40).



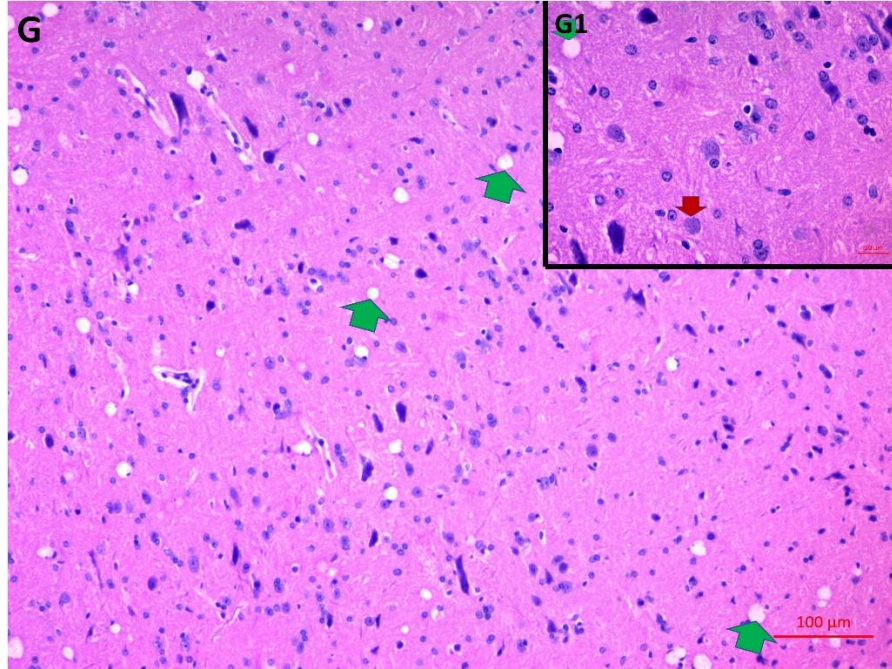
Resim 4.5. Üç hafta rotenone uygulanan grup 3'ün beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Siyah oklar hemorajik alanları ve mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir (H-E, EX10 ve E1X40).



Resim 4.6. Üç hafta rotenone uygulanan grup 3'ün beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Yeşil oklar nöropil vakualizasyonunu, sarı ok nöron dejenerasyonunu ve kırmızı ok ise lewy cisimciğini göstermektedir (H-E, EX10 ve E1X40).



Resim 4.7. Üç hafta rotenone ve bir hafta terazosin uygulanan grup 5'in beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Siyah ok hemorajik alanı, yeşil ok nöropil vakualizasyonunu, sarı ok nöron dejenerasyonunu ve kırmızı ok ise lewy cisimciğini göstermektedir (H-E, FX10 ve F1X40).



Resim 4.8. Üç hafta rotenone ile birlikte üç hafta terazosin uygulanan grup 4'ün beyin dokusunun histolojik görüntüsü. Yeşil oklar nöropil vakualizasyonunu ve kırmızı ok ise lewy cisimciğini göstermektedir (H-E, GX10 ve G1X40).

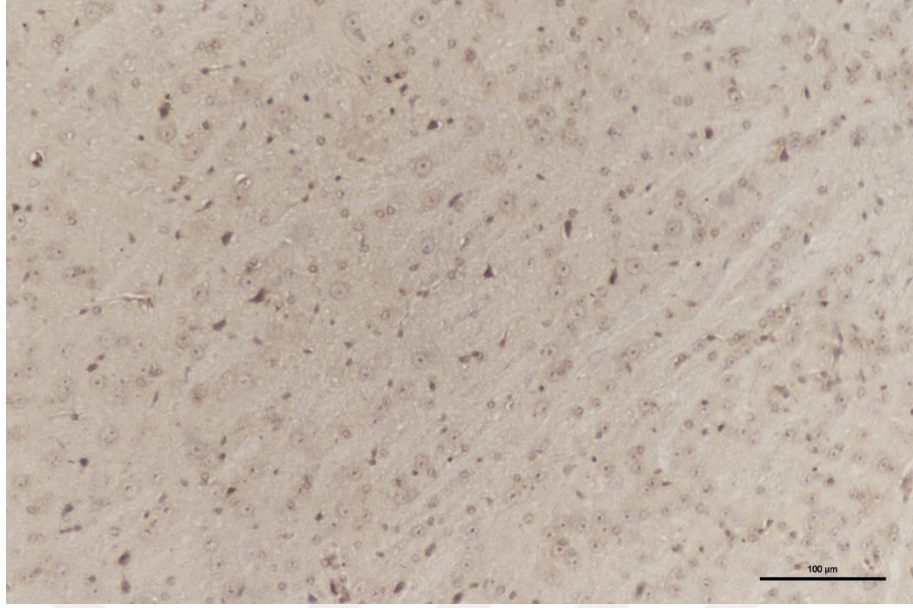
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Beyin doku kesitlerinin Alfa-beta sinuklein ve tirozin hidroksilaz immünohistokimyasal boyamalarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 4.7). Alfa-beta sinuklein ile işaretlemeye grup 1 (kontrol) ve grup 2 (DMSO) olan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Resim 9-10). Ancak Alfa-beta sinuklein ile işaretlemeye grup 3, 4 ve 5'e ait kesitlerde, grup 1 (kontrol), 2, 6 ve 7'nin beyin dokularına kıyasla anlamlı derecede fazla pozitif işaretlenme tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Resim 11-13). En fazla alfa-beta sinuklein işaretlemesi yalnızca rotenone uygulanan grup 3'de tespit edilmiştir ancak grup 4 ve 5 ile karşılaştırıldığında bu yükseliş anlamlı değildir ($p > 0,05$).

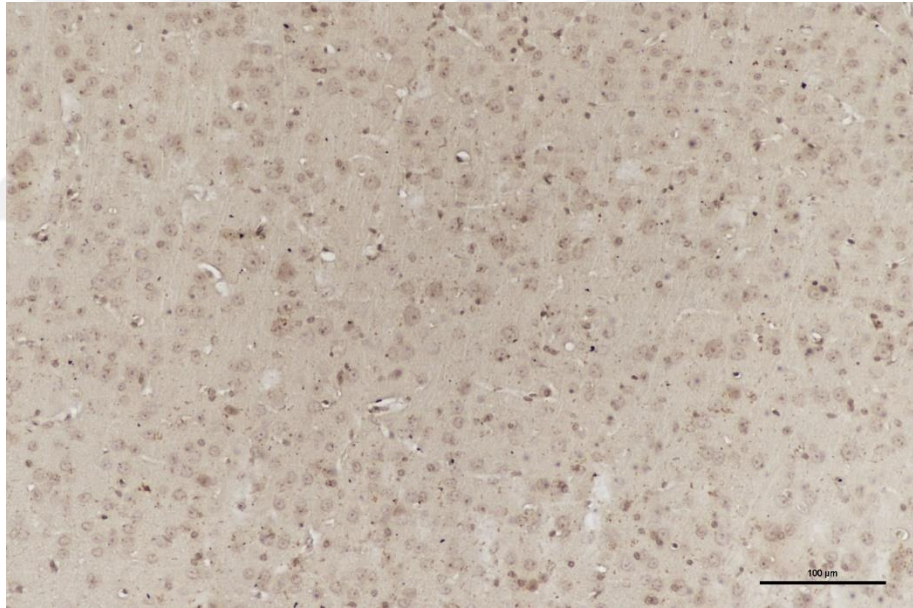
Tirozin hidroksilaz ile işaretlemeye grup 1, 2, 6 ve 7'ye ait kesitlerde, grup 3, 4 ve 5'e kıyasla daha fazla pozitif işaretlenme gözlenmiştir (Resim 16, 17, 21 ve 22). Ancak grup 3 hariç bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Grup 3'deki TH azalması anlamlıdır ($p < 0,05$). En düşük TH miktarı yalnızca rotenone uygulanan grup 3'dedir (Şekil 18-20).

Tablo 4.7. Alfa- Beta Sinuklein ve Tirozin Hidroksilaz İşaretlenme Dereceleri

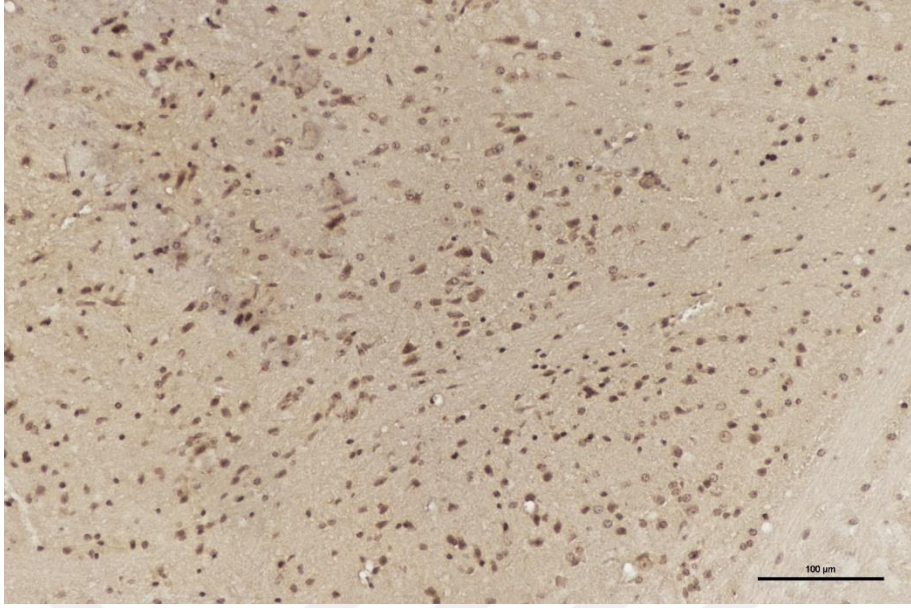
Antikor / Grup	1	2	3	4	5	6	7
Alfa- Beta Sinuklein	-/+	-/+	++	+	+++	-/+	-/+
Tirozin Hidroksilaz	+++	+++	+	++	+++	+++	+++



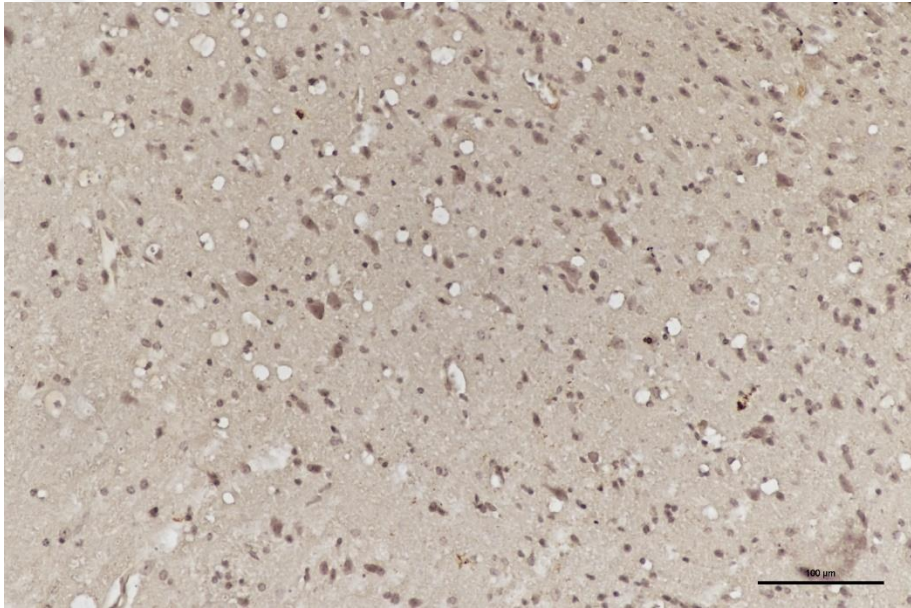
Resim 4.9. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile -/+ derecedeki immün boyaması, x20.



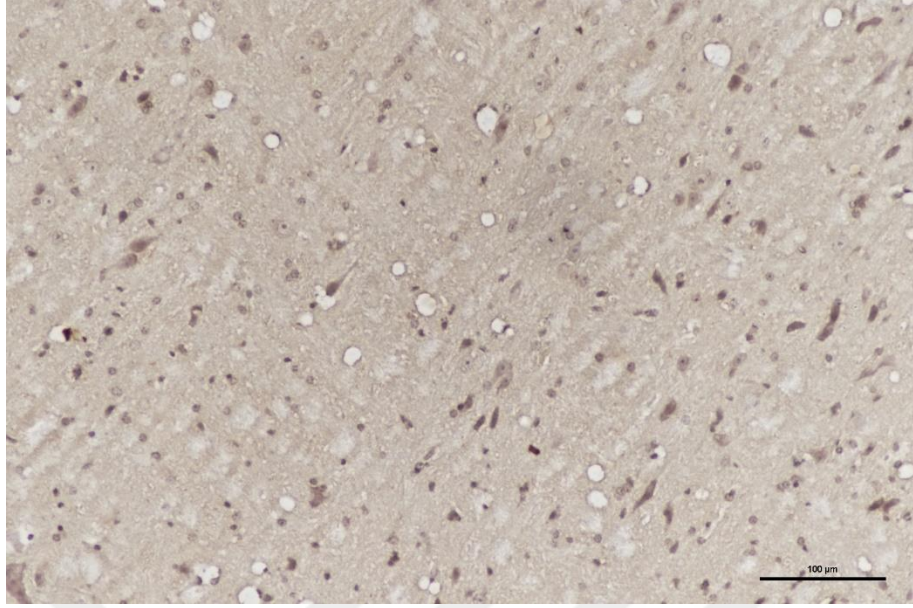
Resim 4.10. DMSO grubuna ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile -/+ derecedeki immün boyaması, x20.



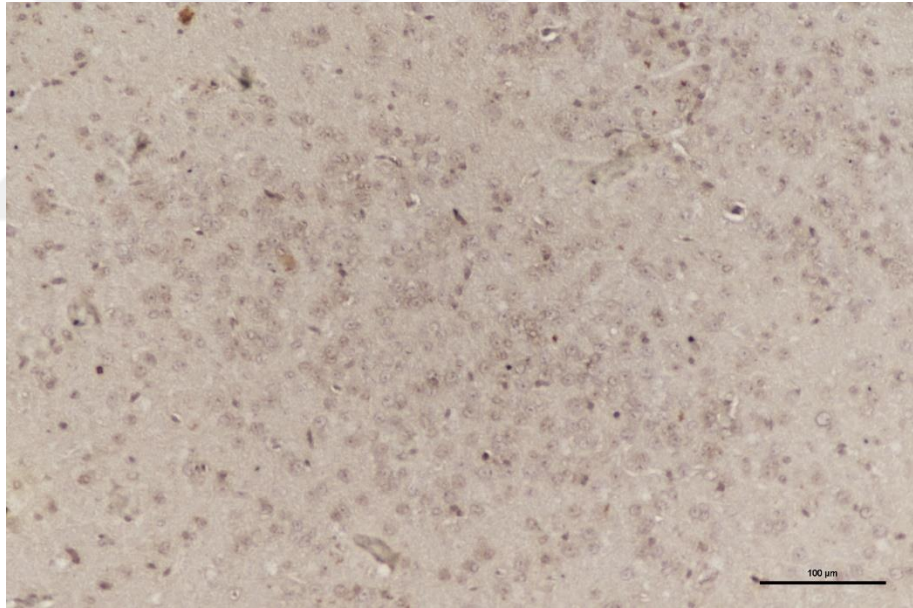
Resim 4.11. Grup 3'e ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile ++ derecedeki immün boyaması, x20.



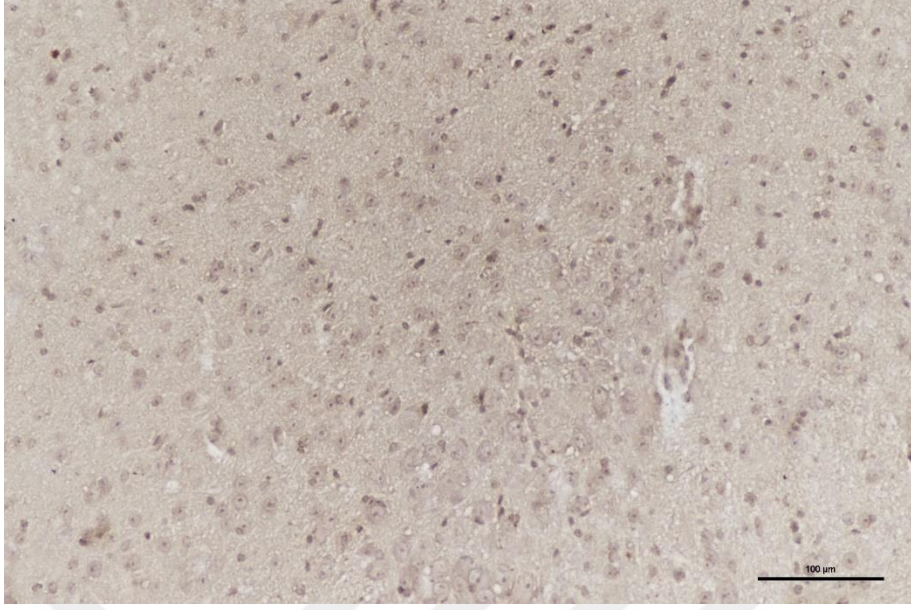
Resim 4.12. Grup 5'e ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile +++ derecedeki immün boyaması, x20.



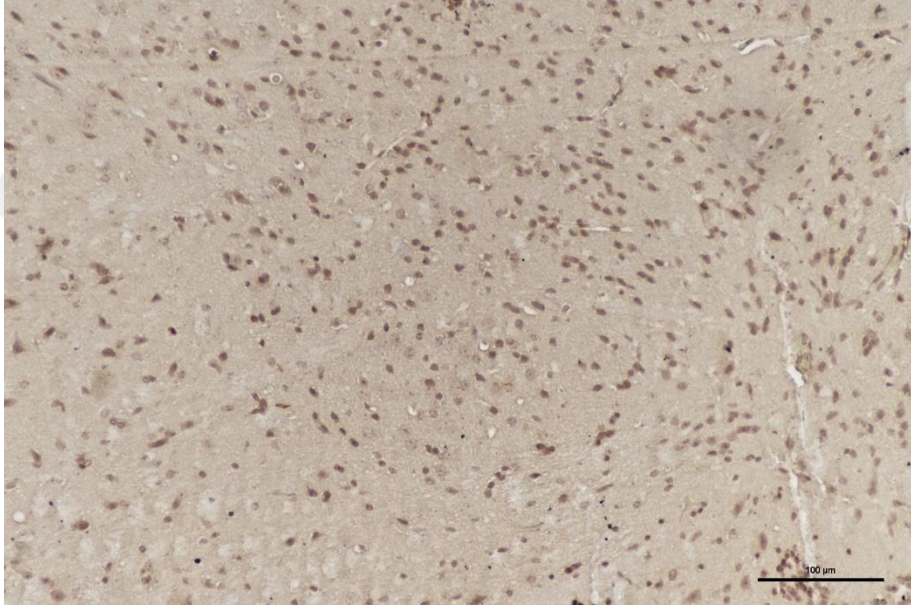
Resim 4.13. Grup 4'e ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile + derecedeki immün boyaması, x20.



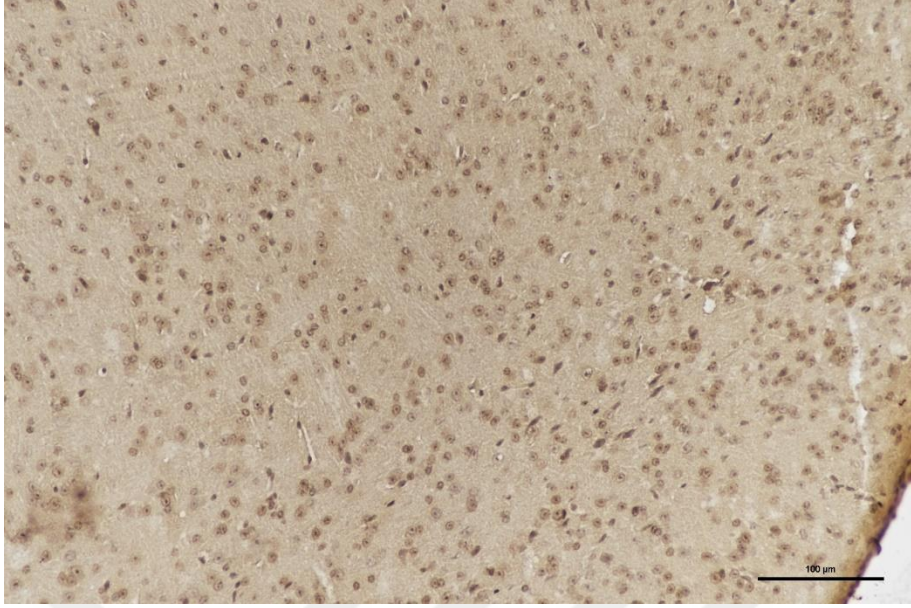
Resim 4.14. Grup 7'ye ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile +/- derecedeki immün boyaması, x20.



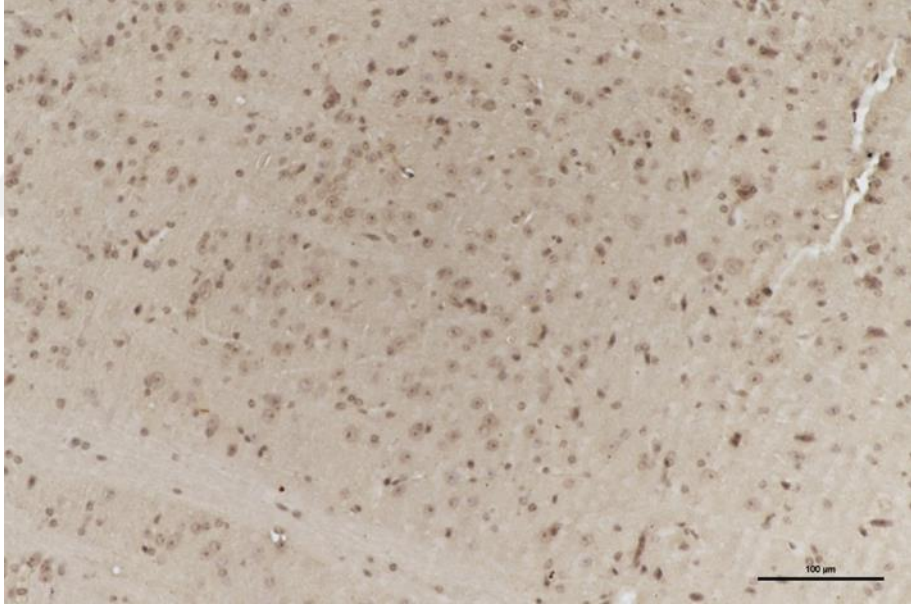
Resim 4.15. Grup 6'ya ait beyin doku kesitinin Alfa Sinuklein ile +/- derecedeki immün boyaması, x20.



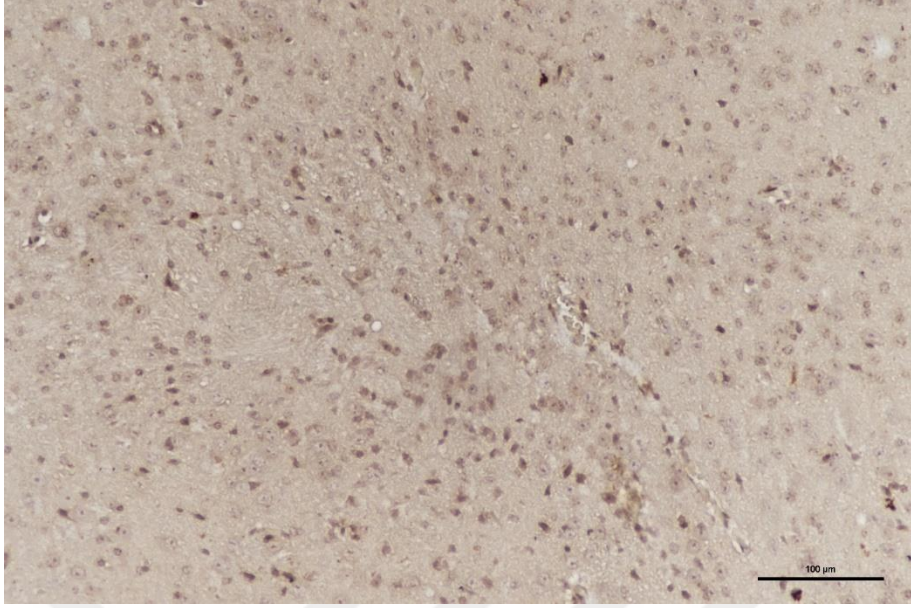
Resim 4.16. Kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/++ derecedeki immün boyaması, x20.



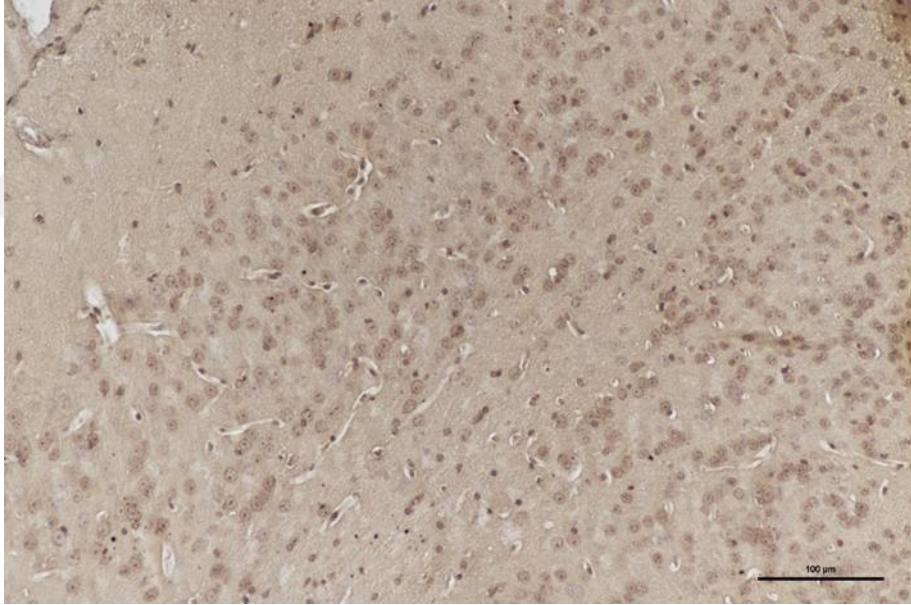
Resim 4.17. Çözücü kontrol grubuna ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/+++ derecedeki immün boyaması, x20.



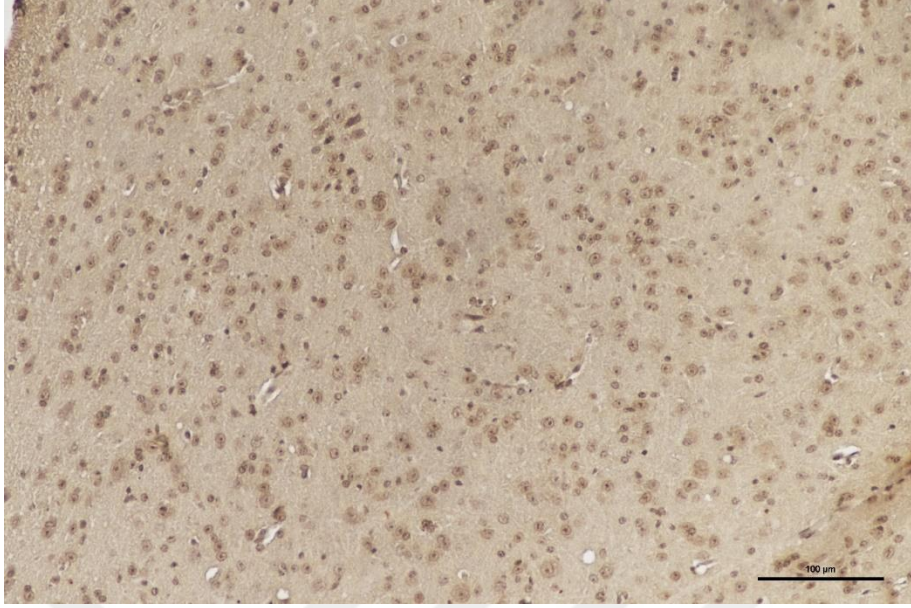
Resim 4.18. Grup 3'e ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile + immün boyaması, x20.



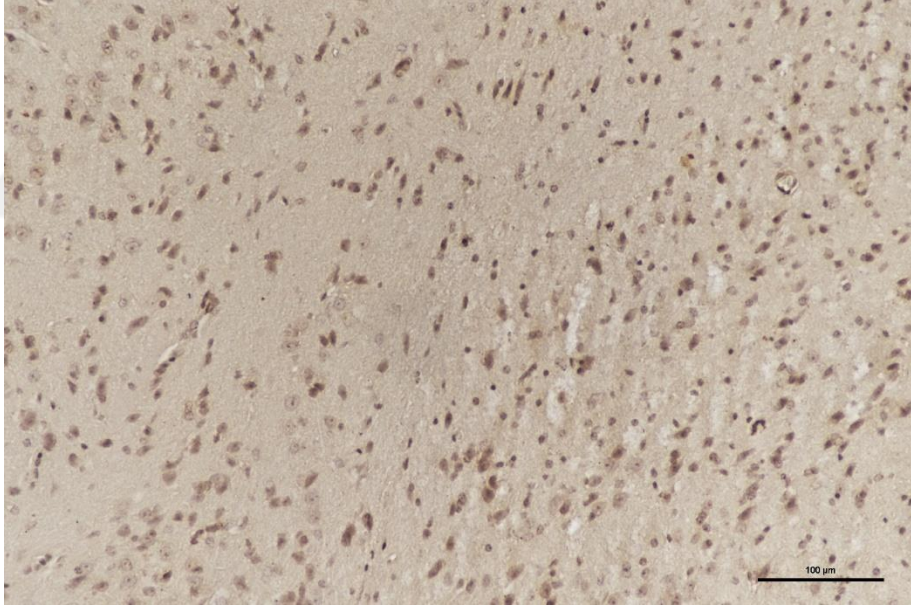
Resim 4.19. Grup 5'e ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++ immün boyaması, x20.



Resim 4.20. Grup 4'e ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile ++ immün boyaması, x20.



Resim 4.21. Grup 7'ye ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/++ immün boyaması, x40.



Resim 4.22. Grup 6'ya ait beyin doku kesitinin Tirozin Hidroksilaz ile +++/++ immün boyaması, x40.

5. TARTIŞMA

Çoğunlukla yaşlıları etkileyen ve ilerleyici nörodejeneratif bir bozukluk olan Parkinson hastalığı dünya genelinde on milyondan fazla insanı etkilerken; artan yaşam süresiyle birlikte bu sayının daha da artması beklenmektedir (153).

Nöronlar yoğun elektriksel aktiviteleri nedeniyle, yüksek enerjiye ihtiyaç duyar. Bu gereklilik onları özellikle mitokondriyal işlev bozukluğuna karşı duyarlı hale getirir. Tüm ökaryotik hücreler gibi, nöronlar da mitokondriyal disfonksiyonun etkisini ve bunun sonucunda ortaya çıkan reaktif oksijen türleri gibi zararlı etkenlerin üretimini azaltmak için içsel mekanizmalara sahiptir. Bu tür nöroprotektif mekanizmalardan en sık başvurulana, işlevsiz mitokondrilerin ortadan kaldırılmasından sorumlu olan mitokondriyal otofaji (mitofaji)'dir. Mitofajinin patolojik inhibisyonu ise yetersiz mitokondriyal aktivite ile birlikte, ATP eksikliğine ve reaktif oksijen türlerinin birikmesine ve ilerleyen süreçlerde apoptotik nöronal ölümün tetiklenmesine neden olmaktadır. Geri dönüşü olmayan bu nöronal kayıplar, nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan merkezi sinir sistemi işlevindeki ilerleyici düşüşün temel nedenidir (154). Bu nedenle nöronal mitokondriyal disfonksiyonun üstesinden gelmek, birçok nörodejeneratif hastalıkta ortak bir sorunu hedefleyen terapötik bir fırsattır. En umut verici terapötik stratejiler, işlevsiz mitokondrilerin değiştirilmesi veya glikoliz gibi sitoplazmik ATP üretim yollarının güçlendirilmesidir (141, 155, 156).

Öte yandan, beyinde etkili farmakolojik müdahalelerin geliştirilmesine yönelik en büyük zorluk ise kan-beyin bariyerinin terapötik moleküllerin çoğuna karşı geçirgenliğinin az olmasıdır (157).

Terazosin adlı ilacın, ATP üreten ilk glikolitik enzim olan fosfogliserat kinaz 1 (PGK1)'e bağlanarak aktive ettiği yakın zamanda keşfedilmiştir. TZ'nin PGK1 üzerindeki etkinliğini α 1-adrenerjik antagonizmadan bağımsız olarak gösterdiği ve 2,4-diamino-6,7-dimetoksiizokinazolin motifinin ADP/ATP bağlanma bölgesine bitişik olarak PGK1'e bağlandığı ortaya konmuştur. Hücre kültürü çalışmaları ile TZ'nin PGK1 aktivitesini artırarak ATP seviyelerini yükselttiği ve apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (28). PH'de enerji metabolizmasının bozulmasına cevaben TZ'nin

PGK1 aktivitesini artırmak yoluyla PH'de apoptotik nörodejenerasyonunun yavaşlatılmasını veya önlenmesini sağlayan *in vivo* glikoliz artışı üzerine etkili olabileceği hipotezine yol açmıştır. Cai ve arkadaşları TZ'nin, farelerde beyin ATP seviyelerini *in vivo* olarak arttırdığını bulmuşlardır. Korteksin yanı sıra SNc ve striatumda glikoliz ürünü olan piruvat ve oksidatif fosforilasyonun artması sonucunda, TZ'nin mitokondriyal aktivitenin bir belirteci olan sitrat sentaz aktivitesini ve ATP seviyesini artırdığı tespit edilmiştir (141). Yapılan başka bir çalışma ile de, TZ'nin kan-beyin bariyerini geçerek beyin hücrelerinde glikoliz ve ATP'yi arttırdığı gösterilmiştir (30).

Çalışmamızda TZ'nin, PH'ye karşı koruyucu ve tedavi edici etkisi ele alınmıştır. Gen ekspresyon seviyeleri başta olmak üzere DNA hasarı, histopatoloji ve motor fonksiyon bulguları değerlendirilerek, TZ'nin farelerde oluşturulan PH üzerine etkinliği farklı bir bakış açısı ile ortaya konmuştur.

TZ'nin DNA hasarında herhangi bir olumsuzluğa sebep olmadığı fakat rotenone kaynaklı hasarın engellenmesinde veya tamirinde de herhangi bir fayda sağlayamadığı belirlenmiştir.

Rotenone *SNCA* geninin ekspresyon seviyesinde 1,58 katlık önemli bir yükselişe sebep olurken ($p > 0,05$); rotenone ile birlikte veya rotenone uygulaması sonrasında TZ verilen gruplarda ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olmasa da ($p > 0,05$), rotenone kaynaklı *SNCA* ekspresyon artışını önemli seviyede azaltmıştır. Bu durum TZ'nin rotenone kaynaklı *SNCA* ekspresyon artışını engellemede veya düzeltmede faydalı olabileceğini göstermektedir. Öte yandan 3 hafta yalnızca TZ uygulaması yapılan grupta ise ekspresyon seviyesindeki azalmanın çok daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.001$) bulunmuştur. TZ'nin *SNCA* geninin ekspresyonunda azalmaya sebep olarak fazladan alfa-sinüklein birikiminin önüne geçebileceği yani bu gen üzerinden ilk kez nöroprotektif etkinliği belirlenmiştir.

Öte yandan TZ *TH* geninin ekspresyonunda tek başına anlamlı bir değişikliğe sebep olmamasının yanında rotenone kaynaklı *TH* ekspresyon azalışında da artış sağlayamamıştır. Bu durum, dopamin enzim seviyesinde de etkin bir farklılık oluşmamış olacağı şeklinde de yorumlanabilir.

Histopatolojik ve immünokimyasal bulgular ile hayvanların sergilediği motor fonksiyon davranışları ise beklendiği gibi gruplar arasında farklılıklar göstermiştir.

Daha önce rotenone ve TZ'nin etkinlikleri farklı nörodejeneratif hastalık modellerinde ortaya konmuş olsa da, alfa-sinüklein ifade düzeyindeki değişiklikleri bu şekilde belirten daha önce yayınlanmış bir makaleye rastlanmamıştır.

Parkinson hastalığının temel nedeni henüz tamamıyla açıklığa kavuşturulamamış olsa da çevresel faktörler, yaşlanma ve genetik yatkınlık gibi etkenlerin hücresel boyutta alfa-sinüklein agregasyonu, mitokondri işlev bozuklukları ve oksidatif hasar oluşturmak yoluyla etiyolojide etkin rol oynadığı düşünülmektedir (9). PH'de çevresel etkilerin başında gelen pestisitlerin önemli bir risk faktörü olduğunu bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur. Kosta Rika'da yapılan bir çalışmada pestisitlere mesleki maruziyet geçmişi olan yaşlıların, demans ve PH için tarama testlerinde önemli ölçüde daha kötü performans gösterdiği bildirilmiştir (158). Han ve arkadaşları insan kan, idrar ve saç örneklerinde dahi tespit edilen bazı pestisitlerin toksik etkiler oluşturduğunu bildirmiştir (159). Amerika'da yapılan bir çalışmada ABD nüfusunun yaklaşık yarısının yakın geçmişte pestisitlere maruz kaldığı gösterilirken; önemli olanın sürekli maruziyet olduğuna ve ortaya çıkması muhtemel subkronik ve kronik etkilere dikkat çekilmiştir (160). Pestisit ile çalışan işçilerin kanlarındaki AS miktarını ölçen ve karşılaştıran bir çalışma, işçilerin %75'inin kanlarındaki AS miktarının pestisit uygulama sezonunun ardından arttığı tespit etmiştir (161). Her ne kadar kandaki alfa-sinüklein miktarı ile beyin dokusunda miktarı arasında bir bağlantı kurmak doğru bir yaklaşım olmasada, pestisite maruziyetin alfa-sinüklein ve PH ile ilişkilendirilmesi önemli bir parametredir (25). PH vakalarının çok büyük kısmının sporadik olduğu düşünüldüğünde, pestisit maruziyeti ile hastalık ilişkisi rahatlıkla söylenebilir. Bu durum, tanı-tedavi çalışmaları için pestisitler ile oluşturulmakta olan PH modellerinin doğruluğunu ortaya koymaktadır.

Parkinson hastalarının beyin dokularında, oluşan oksidatif strese bağlı olarak lipid, protein ve DNA oksidasyonunda artışın yanı sıra demir miktarı ile glutatyon (GSH) ve GSH / glutatyon disülfür (GSSG) oranlarında önemli düşüşler meydana geldiği düşünülmektedir (15, 16, 120). Rotenone maruziyeti sonucunda, yüksek miktarda reaktif oksijen türleri ile oksidatif hasarın olduğu (162) ve beyinde

proteozom aktivitesinin engellendiği bilinmektedir (122). Bu durum akla Parkinson hastalığı ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarını getirmektedir (24). Toksik madde kaynaklı oksidatif stresin, DNA hasarı veya genotoksisite gibi çok çeşitli toksik etkilere aracılık ettiği iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, çevresel toksik maddelerin neden olduğu toksik etkilerin çoğu, hücre ölüm mekanizmasının düzenlenmesi yani indüklenmesi ile olmaktadır. Bu noktada oksidatif stresin apoptozu düzenlediği de gösterilmiştir. Ancak, kesin mekanizmalar halen belirsizdir (118). PH için potansiyel mekanizmalardan biri de oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı ve hücre ölümüdür ki aynı mekanizma pestisitler ile de tetiklenebilmektedir. Bu bilgiler ışığında, TZ'nin PH'ya karşı koruyucu ve önleyici etkilerini ortaya koymayı amaçladığımız çalışmamızda farelerde rotenone ile indüklenmiş PH modeli kullanılmıştır.

İhtimallerin çokluğu ve PH'de ki yolakların karmaşıklığı araştırmaların sonuçlarını yorumlamayı zorlaştırmaktadır. Yaptığımız tez çalışması neticesinde, histopatolojik olarak bakıldığında rotenone'nun beyin dokuya zarar verdiği ve sinir dejenerasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Bu durum azalan nöron sayısı ile orantılı olarak motor fonksiyonlarda da azalmaya yol açmıştır. Ek olarak, DNA hasarında da anlamlı seviyede artış tespit edilmiştir. Terazosin, meydana gelen bu hasarları onarma yönünde çok da başarılı olamamıştır. Sonuçta, PH belirti vermeye başladığında nöronların büyük kısmı ölmüş olmaktadır ve nöronları geri getirmek ne yazık ki mümkün değildir. Ancak terazosin uygulamasının koruyucu yönde, alfa-sinüklenin birikiminin azaltılması ve yeni alfa sinüklein sentezinin engellenmesi noktasında başarılı olduğu söylenebilir. Bu durum, terazosinin hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılması veya engellenmesi yönünde faydalı olabileceğini ve buna yönelik daha ileri araştırmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Lewy cisimcikleri, beyin, omurilik ve visseral otonom sinir sisteminde yaygın olarak dağılmış heterojen bir karışım olan fibril agregatlarından oluşur. LC'ler, alfa-sinüklein gibi konformasyonel ve post-translasyonel olarak modifiye edilmiş birçok maddeyi içerir. Nöron sayısında meydana gelen azalmanın sebebinin tam olarak tespit etmek mümkün olmasa da, muhtemel sebeplerden biri bu LC'lerin içerisinde yer alan alfa-sinüklein proteini'dir. LC'ler nörodejenerasyonun bir göstergesi olmalarına rağmen, hücre ölümünün ana nedeni değildir. Bunun yerine, AS oligomerlerinin ve protofibrillerinin oluşumu hastalık patogenezi için daha kritik etkiye sahiptir (163).

Yani, hastalık prognozu açısından alfa-sinüklein kümelerinin yıkımı ve yeni proteinlerin sentezinin engellenmesi büyük önem arz etmektedir. Araştırmamız kapsamında beyin dokulardaki alfa-sinüklein proteini birikimi hem histopatolojik olarak LC'lerin tespiti ile hem de immünohistokimyasal olarak ortaya konmuştur. Kontrol grubuna kıyasla *TH* ifadesinde ve immünohistokimyasal boyanmalarda azalmalar meydana geldiği görülmüştür. Bu durum, farelerin motor fonksiyonlarında meydana gelen azalma ile ilişkilendirilebilir. Alfa-sinüklenin sentezinin engellenmesi ve birikmiş proteinlerin yıkımının sağlanması bu kısır döngünün çözümü için umut vaat etmektedir. Bu noktada TZ, alfa-sinüklein agregat oluşumunun yavaşlatılması yönündeki işlevi açısından önemini kanıtlamıştır.

LC oluşumunun nigral nöron ölümünün nedeni mi olduğu yoksa nöronların hayatta kalma çabasının bir tür göstergesi mi olduğu uzun zamandır tartışılmaktadır. Mikroskop altında incelendiğinde, PH'de Lewy cisimciklerinin yokluğunda bile birçok nigral nöronun öldüğü ve hatta sağlıklı görünen nöronlarda da LC oluşabildiği belirlenmiştir. Özellikle bu tür nöronlar substantia nigranın lateral bölümüne göre genellikle daha hafif patolojik değişimler gösteren substantia nigranın medial bölümünde görülürler. Bu bulgular nedeniyle, nigral nörodejenerasyonda Lewy cisimciklerinin önemi üzerine nörologlar ve nöropatologlar arasında hararetli tartışmalar yaşanmaktadır. Henüz kanıtlanamayan bir hipotez olsa da; Lewy cisimi oluşumu toksik proteinlerin çözünmeyen bir formda tutulması için nöronlar tarafından yapılan bir hayatta kalma çabası olabilir (90).

Rideout ve arkadaşları bu soruyu deneysel olarak ele almışlardır. Dopaminerjik PC12 hücrelerine proteazom laktasistinin farmakolojik inhibitörü ZIE[O-tBu]-A-lösinal (PSI) uygulamışlardır. Proteazomal inhibisyon, nöronal olarak farklılaşmış PC12 hücrelerinde doza-bağımlı bir ölüm artışına neden olmuştur. Hayatta kalan hücrelerin belirli bir yüzdesinin, sitoplazmik ubiquitinlenmiş inklüzyonlara sahip olduğu belirlenmiştir. Ubikitinlenmiş inklüzyonların sadece hayatta kalan hücrelerde mevcut olduğu ve hücrenin ölümü engellenirse sayısının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, inklüzyon cisimcikleri oluşumunun hücre ölüm nedeni olmadığını, aksine hücrelerin hayatta kalma çabası olduğunu düşündürmektedir (74). Tanaka ve arkadaşları da bu noktayı, 293T hücrelerinde alfa-sinüklein ve sinfilin-1'in birlikte üretilmesi ile agrezomlar oluşturarak ele almışlardır. Bu hücrelerde proteazom

aktivitesinin inhibisyonu agrezomların tipik özelliği olan juksta-nükleer kümelerin oluşumu ile sonuçlanmıştır. Apoptotik hücre ölümü bu hücrelerde agrezomların varlığı ya da yokluğu ile korelasyon göstermiştir. Agrezomlar apoptotik olmayan hücrelerin %60'ında bulunurken, apoptotik hücrelerin sadece %10'unda bulunmuştur (164). Agrezomların, hasar görmüş ve sitotoksik proteinlerin parçalanmasını kolaylaştıran yapılar olarak görev yaptıkları (163) ve nöronu koruyucu bir role sahip oldukları kanısına varılmıştır (164). Bu bağlamda, Lewy cismi oluşumu PH'de nigral nöron ölümünün bir nedeni değil de nöronun hayatta kalma çabası olabilir (90). Ancak, bu durum LC'lerin meydana gelen toksisitenin bir göstergesi olduğu gerçeğini değiştirmemektedir. LC'ler, toksik proteinleri izole etmek ve parçalamak için bir savunma mekanizması olarak işlev görmesine rağmen, hücre bu toksik proteinleri üretmeye devam ettiği sürece LC sayısı artacaktır. Bu durum da protein agregatlarının aşırı birikimine ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açabilmektedir (163).

Alfa-sinükleine bağlı nörotoksisite ile ilişkili çok sayıda çalışma mevcuttur ve deneysel koşullara bağlı olarak alfa-sinükleinin nöronu koruyucu etkisinin de olabileceği yönünde veriler bulunmaktadır. Da Costa ve arkadaşları, alfa-sinükleinin aşırı üretildiği hücre grupları elde etmişler ve bu hücrelere apoptozu tetikleyici çeşitli ajanları uygulamışlardır. Yapay-transfekte hücrelerle karşılaştırıldığında, alfa sinükleini aşırı üreten doğal tip hücrelerde kaspaz aktivasyonunun anlamlı derecede zayıflamış olduğunu göstermişlerdir (165). Seo ve arkadaşları, nanomolar konsantrasyonundaki alfa-sinükleinin nöronları serum yoksunluğuna, oksidatif strese ve PI3/Akt sinyal yolağı yoluyla ekzitotoksisiteye karşı koruduğunu bildirmişlerdir ve koruyucu etkisinin Bcl-2 aşırı ifadesi ile arttığını belirlemişlerdir. Aksine, hücrelerde mikromolar konsantrasyonunda olduğunda ise sitotoksisiteye yani nörotoksik etkiye neden olduğunu belirlemiş, bunu da azalmış Bcl-xL ve artmış Bax ifadesi ile sitokrom C salınımına ve kaspaz aktivasyonuna bağlanmışlardır (166). Alves da Costa ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir çalışma, TSM1 nöronal hücrelerde apoptotik uyarıya karşı AS tepkisini incelemişlerdir. Alfa-sinükleinin, bazal ve staurosporinle uyarılmış kaspaz-3 immünreaktivitesi ve aktivitesini aşırı düzeyde düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Bu duruma DNA fragmantasyonunun azalması ve terminal deoksinükleotid tranferaz ile düzenlenmiş deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentikli-son

etiketlenmesi (TUNEL) pozitif nöronların sayısının azalması eşlik etmiştir. Ayrıca, AS p53 ifadesini ve transkripsiyon aktivitesini de azaltmıştır (167).

Alfa-sinüklein oligomer ve kümeleşme oluşumunun önlenmesi PH'de nigral nöron ölümünü önleyebilir veya nigral nörodejenerasyon hızını düşürebilir. Bu yaklaşımla ilgili çok sayıda olasılık ortaya atılmıştır. İnsanlardaki AS dejenerasyon yolağı iyi bilinmemekle birlikte çok sayıda ilginç veri bildirilmiştir. İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hatlarında ubikitin proteazom yolağı ile yıkılırken (168), HK-293 hücre hatlarında ve feokromositoma hücrelerinde stabildir (169). PC12 hücre hatlarında ise hem proteazom hem de otofaji ile metabolize edilmektedir (170). Tofaris ve arkadaşları ubikitin sisteminden bağımsız bir şekilde proteazom ile de yıkıldığını bildirmişlerdir (80).

AS'in ubikitin ve proteozom yolakları dışında diğer sinüklein birimleri aracılığıyla da nörotoksik etkisinin önlenildiği belirlenmiştir. Hashimoto ve arkadaşları tarafından üretilmiş insan alfa ve beta-sinükleini üreten çift transjenik farelerde, PH için deneysel transjenik modelde beta-sinükleinin alfa-sinüklein toksisitesini önlediği gösterilmiştir. Çift transjenik farelerde beta-sinüklein, AS transjenik farelerde görülen motor kusurları, nörodejeneratif değişimleri ve nöronal alfa-sinüklein birikimini düzeltmiştir. Alfa-sinükleinin aşırı üretildiği PH hayvan modellerinin nigral bölgelerine adeno-ilişkili virüs vektörü kullanılarak insan *beta-sinüklein* geninin yerel olarak enjeksiyonunun etkisinin araştırılması oldukça değerlidir. Eğer bu yaklaşım etkili ve güvenilir sonuçlar ortaya koyarsa, PH hastalarına da uygulanabilirliği üzerine çalışmalar yapılabilir. Beta-sinükleinden elde edilen daha küçük peptidlerin de alfa-sinükleinin kümeleşmesini önlemede etkili olabileceği ileri sürülmektedir (171). Windisch ve arkadaşları kümeleşmeye karşı olan etkileri için beta-sinükleinden elde edilen peptidleri taramışlardır ve bu açıdan N-ucu aminoasitlerinden ilk 15'inin önemli olduğunu bulmuşlardır (172). Gamma-sinükleinin de alfa-sinüklein fibril oluşumunu engellediği bildirilmiştir (173).

İnsanda *PARK2* geni tarafından kodlanan ve ubikitinlenmede büyük role sahip olan Parkin de AS tarafından oluşturulan nörotoksosite için nöronları koruyucu özellik sergilemektedir. Petrucelli ve arkadaşları, katekolaminerjik orta beyin kültüründe AS'yi aşırı düzeyde ürettirmişler ve nöron ölümünü ve parkinin üretiminin AS ile

oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisini gözlemlemişlerdir. Proteazom inhibisyonu ile de benzer nörotoksisite oluşumunu gerçekleştirmişlerdir (174). Parkin aynı zamanda proteazomun inhibe edildiği nöronlarda da nöronu koruyucu olmuştur. Parkin, SH-SY5Y hücre hattında hücre içi alfa-sinükleini keserek toksisiteyi baskılamakta (175) ve nöronun korunmasında etken rol oynamaktadır (176).

Parkinson modeli oluşturmak için kullanılan maddelerden biri olan MPTP, TZ aracılı PGK1 stimülasyonunun sonuçlarını inceleyebilmek için farelere uygulanmış ve TZ'nin MPTP'nin neden olduğu nörodejenerasyonu yavaşlattığı veya önlediği, TH ve dopamin seviyelerini kısmen geri yüklediği ve motor işlevi iyileştirdiği rapor edilmiştir (177). Farklı bir çalışma ile 6-OHDA bileşiği Parkinson hastalığında bir dopamin nöron dejenerasyonu modeli oluşturmak için sıçanların sağ striatumuna enjekte edilmiş ve yedi hafta sonra hayvanların sol ön pençe kullanımının azaldığı gözlemlenmiştir. 5. ve 7. haftalar arasında TZ tedavisi başlanmış sıçanların ise her iki ön pençeyi de eşit şekilde kullandıkları tespit edilmiştir (178). Her iki çalışmada da, nöron hücreleri henüz apoptotik ölüm geçirmemiş olmalarına rağmen neredeyse kesinlikle bozulmuş metabolik fonksiyona sahiptir. TH seviyeleri, TH-pozitif nöron sayısı, striatumdaki TH yoğunluğu ve dopamin miktarı da zamanla azalmaya devam etmiştir. Terazosin uygulamasının ise, nörodejenerasyonun başlamasından sonra bile hücre ölümünü yavaşlattığı ve tedavi grubu hayvanların kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında TH ve dopamin seviyeleri ile motor performanslarının arttığı gösterilmiştir. Sonuçlar TZ'nin, MPTP ve 6-OHDA tarafından bozulmuş ancak henüz dejenere olmamış nöronların işlevini geriye dönüş yönünde geliştirdiğini göstermiştir (141).

Rotenone'un mitokondriyal kompleks I'ı inhibe ederek ATP seviyesini azalttığı bilinmektedir (179). TZ'nin rotenone ile birlikte kullanılmasının ATP'deki azalmayı ve motor performansta bozulmayı en aza indirdiği bildirilmiştir (141). Ayrıca TZ *Drosophila PINK1* mutanı ve *Drosophila LRRK* mutanı PH modellerinde de test edilmiş ve bu modellerde de kısmi iyileşmeler sağladığı belirlenmiştir (141). Yine insan alfa-sinükleini aşırı ifade eden ve ileri yaşta PH belirtileri sergileyen transgenik farelerde de (mThy1-hSNCA) TZ kısmi iyileşmeler sağlamıştır (141). Tüm bu bilgiler çalışmamızın sonuçları ile de kısmen uyumludur ve henüz dejenerasyonun gerçekleşmediği durumlarda ya da dejenerasyonun ilerlemesinin önlenmesinde TZ'nin

faydalı olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Bu mekanizma muhtemelen alfa-sinüklein ifadesi üzerinden etki göstermektedir.

"Hidrotrop" terimi, 1916'da Carls Neuberg tarafından icat edilmiştir ve suda hidrofobik bileşikleri çözen küçük organik moleküller manasına gelmektedir (180, 181). Son zamanlarda, ATP'nin bağırsakta proteinlerin ve safra asitlerinin toplanmasını önlediği ve yağların ve lipitlerin çözünmesine yardımcı olduğuna dair çalışmalar yayınlanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda ATP'nin hidrotrop olarak görev alabileceği ve protein agregasyonlarının çözünmesini sağlayabileceği ileri sürülmüştür (29). Her ne kadar bu mekanizma için karşıt görüşler yer alsada (182) doğru olması durumunda aynı mekanizmanın alfa-sinüklein agregatlarını da çözebileceği ileri sürülebilir. Bu durumda TZ ile meydana gelen ATP artışı, bir başka yolak aracılığı ile de hücrede birikmiş fazla alfa-sinükleinin temizlenmesini sağlıyor olabilir.

Yakın tarihli birkaç hayvan modeli çalışması, glikolitik enzimlerin farmakolojik veya genetik manipülasyonu neticesinde artan glikoz miktarı ve alımının Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve Amyotrofik lateral skleroz dahil olmak üzere birçok önemli nörodejeneratif hastalık için koruyucu olabileceği ortaya koymuştur. Oksidatif fosforilasyon yolu nöronlara gerekli ATP'nin sağlanmasında yetersiz kalırsa, ATP'nin glikolitik üretimindeki bir artış gerçekleşerek, enerji eksikliğini hafifletmeye ve nöronların akut enerji ihtiyacını sürdürmeye yardımcı olur. Bunun yanı sıra ATP hidrotropik etkisi ile de birçok nörodejeneratif hastalıkta yaygın olan protein agregatlarının oluşumunu önleme veya çözmede etkindir (183). Glikoz alımının nöroprotektif etkinliğinin diğer bir yolu, hücredeki temel indirgeyici olan glutatyonun azaltılması için çok önemli olan NADPH üretimini artıracak olan PPP'ye glikozun kanalize edilmesidir (184). PPP'nin hız sınırlayıcı enzimi G6PD, birçok nörodejeneratif durumda yaygın olan oksidatif stresle indüklenebilir (185, 186). PPP'nin metabolik ürünü olan γ -6-fosfoglukonolaktonun, PP2A'yı inhibe etmesi yoluyla AMPK aktivasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir. AMPK aktivitesi, metabolik homeostaz ve mitokondriyal sağlık için kritik bir öneme sahiptir ve geniş ölçüde nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (187-189). ATP bu nedenlerle nöroprotektif bir etkiye sahip olup, hücre sağlığının korunması açısından oldukça önemlidir.

PH, yaşlı erkeklerde kadınlara göre daha yaygın olarak görülen bir hastalıktır ve 60 yaşından sonra insidansı belirgin bir şekilde artar. Terazosin benign prostat hiperplazisi için reçete edilen bir ilaçtır ve bu hastalık da genellikle yaşlı erkekleri etkilemektedir. Bu bilgiler ışığında, bir araştırmada prostat ilacı olarak TZ kullanan Parkinson hastası erkeklerde hastalığın prognozu incelenmiştir. Buna göre TZ kullanan 7 hastanın, kullanmayan 269 hastaya göre motor fonksiyon gerileme hızının daha yavaş olduğu tespit edilmiştir (141). Ancak araştırmada TZ kullanan hasta sayısının çok az olması sebebi ile grubun genişletilmesine ihtiyaç duyulmuş ve TZ'nin PGK1 ile bağlanabilmesinden yola çıkılarak kinazolin motiflerine sahip ilaçların da PGK1 aktivitesini artırabileceği öne sürülmüştür. Bu olasılıkla uyumlu olarak, Doksazosin (DZ) ve Alfuzosin (AZ) araştırılmış ve TZ, DZ veya AZ (TZ/DZ/AZ) kullanan 13 erkek PH'da motor fonksiyon bozukluklarının yavaşladığı rapor edilmiştir. Daha da fazla sayıda PH vakasını değerlendirmek amacıyla, farklı veri tabanlarında TZ/DZ/AZ kullanan 2880 Parkinson hastası belirlenmiş ve karşılaştırma grubu olarak, PGK1 ile bağlanma motifi içermeyen bir ilaç olan Tamsulosin kullanan 15409 PH erkek seçilmiştir. Araştırma neticesinde, TZ/DZ/AZ kullanan hastalarda PH semptomlarında azalma olduğu tespit edilmiştir (141). İki büyük veritabanı olan Danimarka Ulusal Sağlık Kayıtları ve özel ABD sağlık sigortacılarının Truven Kayıtları incelenerek yapılan benzer bir başka çalışmada yine TZ/DZ/AZ kullanan hastalar ile Tamsulosin kullanan hastalar karşılaştırılmış ve TZ-DZ-AZ ilaçlarının PH gelişme riskini azalttığı veriler elde edilmiştir (190).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1987 yılından günümüze hipertansiyon ve BPH tedavisinde güvenle kullanılan TZ'yi PH tedavisinde etkin olarak test etmek ilaç geliştirme safhalarında önemli zaman kazanımına ve maddi açıdan da tasarrufa sebep olacaktır. TZ'nin insanlarda iyi bilinen farmakokinetik ve güvenlik profillerine sahip onaylı bir ilaç olması, potansiyel gelişimini ve yeni bir klinik ilaç olarak yeniden yapılanmasını hızlandırabilir.

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda TZ'nin, MPTP ve 6-OHDA tarafından bozulmuş ancak henüz tamamen dejenere olmamış nöronların işlevini geriye dönüş yönünde geliştirdiği gösterilmiştir. Fare kullanarak rotenone ile PH modeli oluşturduğumuz çalışmamızda biz de benzer sonuçlar elde ettik.

Drosophila melanogaster'de mitokondriyal kompleks I inhibitörü olan rotenone kullanılarak oluşturulan sporadik PH modelinde, tırmanma davranışları test edilmiş ve motor işlevin bozulduğu gösterilmiştir. Sineklerde TZ'nin, ATP içeriğinde ve motor performansta meydana gelen azalmaları en aza indirdiği belirlenmiştir. Biz de rotenone ile indüklediğimiz ve spontan silindir testi uyguladığımız grupların motor fonksiyon davranış testlerinde istatistiksel anlamlılık belirlenememiş olsa da farklılıklar olduğunu gözlemledik. Özellikle TZ verilen gruplarda, yalnızca rotenone uygulanan gruba göre iyileşme olduğu ve hayvanların normale yakın motor fonksiyon gösterdiklerini belirledik.

Genetik, yaşlanma ve çevresel faktörlerin etkin olduğu PH gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta, azalan ATP düzeyi ve enerji metabolizması risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Sitoplazmik glikoliz ise ATP üretimini destekleyen en önemli yollardan olması nedeniyle, PH'de gözlenen klinik tablonun ilerleyişini yavaşlatabilmektedir.

Çalışmamızın anahtar noktasını, TZ aracılığıyla üretimi artan ATP seviyesi oluşturmaktadır. Bir hidrotrop olan ATP, agregat oluşumunu önleyebilme ve önceden oluşmuş protein agregatlarını çözebilme yeteneğine sahiptir. TZ uygulayarak ATP seviyelerini yükselttiğimizi öngördüğümüz gruplarda, alfa-sinüklein agregatlarının çözünmesini kolaylaştırdığını histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgularımızla

ortaya koyarak, PH'deki nörodejenerasyonun TZ tarafından yavaşlatıldığını tahmin ediyoruz.

Çalışmamızda, rotenone uygulanan grupta nigral nöron toksisitesini ve ölümünü vurgulayan molekül olan alfa-sinükleini kodlayan *SNCA* geninin ekspresyon seviyesinde 1,58 katlık önemli bir yükseliş olduğu belirlenmiş ($p > 0,05$); rotenone ile birlikte veya rotenone uygulaması sonrasında TZ verilen gruplarda ise ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum TZ'nin rotenone kaynaklı *SNCA* ekspresyon artışını engellemede veya düzeltmede faydalı olabileceğini göstermektedir. Öte yandan 3 hafta yalnızca TZ uygulaması yapılan grupta ise ekspresyon seviyesindeki azalmanın çok daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.001$) bulunmuştur. Daha önce, rotenone ve TZ'nin etkinlikleri farklı nörodejeneratif hastalık modellerinde gösterilmiş olmasına rağmen, TZ'nin *SNCA* geninin ekspresyonunda azalmaya sebep olarak fazladan alfa-sinüklein birikiminin önüne geçebileceği ilk kez gösterilirken; nöroprotektif etkisi tekrar ortaya konmuştur.

Parkinson hastalığının en önemli klinik belirtilerinden olan istemli ve istemsiz hareketlerin kontrolü ile hafıza ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisi bilinen dopaminin seviyesi tirozin hidroksilaz enzimi tarafından kontrol edilmektedir. Çalışmamızda, TZ'nin TH enzimini kodlayan *TH* geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı ayrıca rotenone tarafından indüklenen *TH* ekspresyon azalışını da artırmadığı belirlenmiştir. Literatür taraması sonucunda, TZ'nin *TH* ekspresyonu üzerine etkinliğini ortaya koyan bir makaleye rastlanmış olması nedeniyle çalışmamız bir ilktir.

Histopatolojik ve immünokimyasal incelemeler, SNc bölgesindeki Lewy cisimciğinin en yüksek görüldüğü grubun rotenone verilen grup olmasının yanı sıra TZ verilen gruplarda görülen bu oranın oldukça azaldığını ortaya koymuştur. Bu veriler de bize yine TZ'nin nöroprotektif etkinliğini göstermiştir.

Mevcut hiçbir model terapötik faydayı veya patogenezi kesin veya doğru bir şekilde öngörememektedir. Bu nedenle, farklı PH hayvan modelleri kullanılarak ve hatta insan faz çalışmaları ile de bu bulgularımızın desteklenmesi önerilir. TZ çalışmaları açısından bir diğer sınırlama, insan veritabanları analizlerinin erkeklerle sınırlı olmasıdır. Çünkü TZ bir hipertansiyon ilacı da olmasına rağmen günümüzde

yaygın olarak erkeklerin iyi huylu prostat hiperplazisi tedavisi için kullanılmakta olan bir etken maddedir. Her ne kadar kadın PH bireylerde de benzer sonuçların alınabileceği tahmin edilse de, TZ'in etkinliğinin cinsiyet üzerinden de araştırılması önerilerimiz arasındadır.

Sonuç olarak, her ne kadar kesin yargılara varmadan önce çok daha kapsamlı araştırmalar ve ilaç faz çalışmaları yapmak gerekiyorsa da, TZ Parkinson hastalığı tedavisi için ümit verici önemli bir etken maddedir. Parkinson hastalığı yanında, enerji dengesi değişmiş diğer nörodejeneratif hastalıklarda nörodejenerasyonu yavaşlatmak veya önlemek için ya da protein agregat oluşumu ile karakterize hastalıklarda agregasyonu çözmek ve engellemek için TZ'nin önemli bir teröpatik potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry E, Dickson DW, Hansen L, et al. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*. 1996;47(5):1113-24.
2. Jellinger KA. Parkinson hastalığının patolojisi – son gelişmeler. In: Galvez-Jimenez N, editor. *Parkinson Hastalığının Tedavisi İçin Bilimsel Temeller*. 2nd ed. Florida, ABD: Taylor-Francis; 2005. p. 53-85.
3. Pakkenberg B, Møller A, Gundersen H, Dam AM, Pakkenberg H. 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. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1991;54(1):30-3.
4. Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2006;70:9.
5. Camicioli R, Moore MM, Kinney A, Corbridge E, Glassberg K, Kaye JA. Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy. *Mov Disord*. 2003;18(7):784-90.
6. Candaş E. LRRK2 geni polimorfizmlerinin Parkinson hastalığı ile ilişkisinin araştırılması. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2017.
7. Kurman Y. Parkinson Hastalığı İle Alfa-Sinüklein Geni Polimorfizmlerinin İlişkisinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2015.
8. MedlinePlus. SNCA gene USA: U.S. National Library of Medicine; 2021 [Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/snca/#conditions>].
9. Makav M. Rotenon ile deneysel olarak oluşturulmuş parkinson modelinde östrojenin etkisi [Doktora Tezi]. Kars: Kars Kafkas Üniversitesi; 2018.
10. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;268(2):157-77.
11. Horowitz M, Greenamyre J. Gene–environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010;88(4):467-74.
12. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
13. Ramalingam M, Huh Y-J, Lee Y-I. The Impairments of α -Synuclein and Mechanistic Target of Rapamycin in Rotenone-Induced SH-SY5Y Cells and Mice Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13(1028).
14. Fitzmaurice AG, Bronstein JM. Pesticides and Parkinson's disease. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World-Effects of Pesticides Exposure*. Croatia: InTech; 2011.
15. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1357-91.
16. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *BioMed Research International*. 2012;2012.
17. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:155.
18. Vingill S, Connor-Robson N, Wade-Martins R. Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should? *Behav Brain Res*. 2018;352:133-41.
19. Drolet RE, Cannon JR, Montero L, Greenamyre JT. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiology of disease*. 2009;36(1):96-102.

20. Johnson ME, Stringer A, Bobrovskaya L. Rotenone induces gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2018;65:174-85.
21. Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2009;1792(7):587-96.
22. Sassi C. Genetics of parkinson disease. *Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease: InTech*; 2011.
23. Maguire-Zeiss KA, Short DW, Federoff HJ. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? *Mol Brain Res*. 2005;134(1):18-23.
24. Aslan SN, Karahalil B. Oksidatif Stres ve Parkinson Hastalığı. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2019;43(1):94-116.
25. Toğay VA. Pestisit Thiachloprid'in Parkinson Hastalığı ile bağlantısının araştırılması [Doktora Tezi]. Isparta, Türkiye: Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2021.
26. Kaplan SA. α -Blocker therapy: current update. *Rev Urol*. 2005;7(Suppl 8):S34.
27. Itskovitz H. Alpha 1-blockade for the treatment of hypertension: a megastudy of terazosin in 2214 clinical practice settings. *Clin Ther*. 1994;16(3):490-504.
28. Chen X, Zhao C, Li X, Wang T, Li Y, Cao C, et al. Terazosin activates Pgk1 and Hsp90 to promote stress resistance. *Nat Chem Biol*. 2015;11(1):19-25.
29. Patel A, Malinowska L, Saha S, Wang J, Alberti S, Krishnan Y, et al. ATP as a biological hydrotrope. *Science*. 2017;356(6339):753-6.
30. Simmering JE, Welsh MJ, Liu L, Narayanan NS, Pottg ard A. Association of glycolysis-enhancing α -1 blockers with risk of developing Parkinson disease. *JAMA neurology*. 2021;78(4):407-13.
31. Henderson JM. Talamus ve Parkinson hastalığı: Klinik, patolojik ve deneysel gözlemler. In: Galvez-Jimenez N, editor. *Parkinson Hastalığının Tedavisi İçin Bilimsel Temeller*. 2nd ed. Florida, ABD: Taylor-Francis; 2005. p. 105-14
32. Apaydın H, Özekmekci S. Parkinson Hastalığı: Hasta ve Yakınları için El Kitabı. *Parkinson Hastalığı Derneği*, İstanbul. 2008.
33. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*. 1958;127(3296):471-.
34. Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr*. 1960;38:1236-9.
35. Birkmayer W, Hornykiewicz O. The L-3, 4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr*. 1961;73:787-8.
36. Aykaç Ö. Parkinson Hastalığında Akatizi [Tıpta Uzmanlık Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2011.
37. Drouin Ouellet J, Cicchetti F. Pesticides and Parkinson's Disease. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides-The impacts of pesticide exposure*. Rijeka, Croatia: In-Tech; 2011.
38. Akbayır E, Şen M, Ay U, Şenyer S, Tüzün E, Küçükali Cİ. Parkinson hastalığının etyopatogenezi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2017;7(13):1-23.
39. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson Pandemic—A Call to Action. *JAMA Neurology*. 2018;75(1):9-10.
40. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *Journal of Parkinson's Disease*. 2018;8:S3-S8.
41. Şahin G, Akbostancı CM. Parakinson Hastalığı - Tanı ve Tedavi Rehberi. İstanbul, Türkiye: Ada Basın Yayın; 2014.

42. Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochemical research*. 2009;34(1):55-65.
43. Yelkenli İH. Deneysel parkinson modelinde vazoaktif intestinal peptit (VIP)'in nöron koruyucu etkisine astrosit hücrelerinin katkısı. 2014.
44. Rappold PM, Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):413-23.
45. Aarsland D, Zaccai J, Brayne C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2005;20(10):1255-63.
46. Petit G, Olsson T, Brundin P. The future of cell therapies and brain repair: Parkinson's disease leads the way. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(1):60-70.
47. Toulouse A, Sullivan AM. Progress in Parkinson's disease—where do we stand? *Progress in neurobiology*. 2008;85(4):376-92.
48. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989;12(10):366-75.
49. Fix J. Basal ganglia and the striatal motor system. *Neuroanatomy (Board Review Series)*. Baltimore: Wolters Kluwer; 2008.
50. Olanow CW, McNaught K. Parkinson's disease, proteins, and prions: milestones. *Mov Disord*. 2011;26(6):1056-71.
51. Meade RM, Fairlie DP, Mason JM. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease—lessons and emerging principles. *Mol Neurodegener*. 2019;14:1-14.
52. Kouli A TK, Kuan WL. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 [Table 1, PARK-designated genes involved in familial Parkinson's disease.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/table/Ch1-t0001/>.
53. Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(9):3214-20.
54. Kingwell K. Zeroing in on neurodegenerative [alpha]-synuclein. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017;16(6):371-4.
55. Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL. Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(10):9595-603.
56. Kim TD, Paik SR, Yang C-H. Structural and functional implications of C-terminal regions of α -synuclein. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;41(46):13782-90.
57. Georgieva ER, Ramlall TF, Borbat PP, Freed JH, Eliezer D. Membrane-bound α -synuclein forms an extended helix: long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles. *J Am Chem Soc*. 2008;130(39):12856-7.
58. Vidović M, Rikalovic MG. Alpha-Synuclein Aggregation Pathway in Parkinson's Disease: Current Status and Novel Therapeutic Approaches. *Cells*. 2022;11(11):1732.
59. Giasson BI, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Mutant and wild type human α -synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(12):7619-22.
60. Volles MJ, Lee S-J, Rochet J-C, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, et al. Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2001;40(26):7812-9.
61. Brás IC, Outeiro TF. Alpha-synuclein: mechanisms of release and pathology progression in synucleinopathies. *Cells*. 2021;10(2):375.

62. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40.
63. Soldner F, Stelzer Y, Shivalila CS, Abraham BJ, Latourelle JC, Barrasa MI, et al. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of α -synuclein modulates target gene expression. *Nature*. 2016;533(7601):95-9.
64. Maraganore DM, De Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, et al. Collaborative analysis of α -synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA*. 2006;296(6):661-70.
65. Singleton A, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *science*. 2003;302(5646):841-.
66. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*. 2010;329(5999):1663-7.
67. Burré J, Sharma M, Südhof TC. α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(40):E4274-E83.
68. DeWitt DC, Rhoades E. α -Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;52(14):2385-7.
69. Alarcón-Arís D, Recasens A, Galofré M, Carballo-Carbajal I, Zacchi N, Ruiz-Bronchal E, et al. Selective α -synuclein knockdown in monoamine neurons by intranasal oligonucleotide delivery: potential therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*. 2018;26(2):550-67.
70. Beyer K. α -Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2006;112(3):237-51.
71. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 2002;4(2):160-4.
72. Rott R, Szargel R, Shani V, Hamza H, Savyon M, Abd Elghani F, et al. SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate α -synuclein degradation and pathological aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(50):13176-81.
73. Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. Aggregated and monomeric α -synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(14):11753-9.
74. Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/ α -synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 2001;78(4):899-908.
75. McNaught KSP, Mytilineou C, JnoBaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jenner P, et al. Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *Journal of neurochemistry*. 2002;81(2):301-6.
76. McNaught KSP, Björklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport*. 2002;13(11):1437-41.
77. Sawada H, Kohno R, Kihara T, Izumi Y, Sakka N, Ibi M, et al. Proteasome mediates dopaminergic neuronal degeneration, and its inhibition causes α -synuclein inclusions. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(11):10710-9.
78. McNaught KSP, Belizaire R, Jenner P, Olanow CW, Isacson O. Selective loss of 20S proteasome α -subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2002;326(3):155-8.
79. McNaught KSP, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2003;179(1):38-46.

80. Tofaris GK, Razaq A, Ghetti B, Lilley KS, Spillantini MG. Ubiquitination of α -synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(45):44405-11.
81. Burai R, Ait-Bouziad N, Chiki A, Lashuel HA. Elucidating the role of site-specific nitration of α -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease via protein semisynthesis and mutagenesis. *J Am Chem Soc*. 2015;137(15):5041-52.
82. Lue LF, Walker DG, Adler CH, Shill H, Tran H, Akiyama H, et al. Biochemical increase in phosphorylated alpha-synuclein precedes histopathology of Lewy-type synucleinopathies. *Brain Pathol*. 2012;22(6):745-56.
83. Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2008;115:409-15.
84. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(16):9443-9.
85. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi Y, Anantharamaiah G. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*. 1992;33(2):141-66.
86. Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, Nussbaum RL. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(8):6344-52.
87. Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S-i, Anthony MD, Edwards RH. Lipid rafts mediate the synaptic localization of α -synuclein. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(30):6715-23.
88. Wolozin B, Behl C. Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 1: protein aggregates. *Arch Neurol*. 2000;57(6):793-6.
89. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(1):38-48.
90. Mizuno Y, Mochizuki H. Alfa-sinüklein, nigral dejenerasyon ve parkinsonizm. In: Galvez-Jimenez N, editor. *Parkinson Hastalığının Tedavisi İçin Bilimsel Temeller*. 2nd ed. Florida, ABD: Taylor-Francis; 2005. p. 87-101.
91. Baba M, Nakajo S, Tu P-H, Tomita T, Nakaya K, Lee V, et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American journal of pathology*. 1998;152(4):879.
92. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(11):6469-73.
93. Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(31):13010-5.
94. Xu J, Kao S-Y, Lee FJ, Song W, Jin L-W, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med*. 2002;8(6):600-6.
95. Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of α -synuclein in the nigrostriatal system. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(7):2780-91.
96. Tsigelny IF, Bar-On P, Sharikov Y, Crews L, Hashimoto M, Miller MA, et al. Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein. *The FEBS journal*. 2007;274(7):1862-77.
97. Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, et al. Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene. *Hum Genet*. 1998;103:106-12.

98. Spillantini MG, Goedert M, Divane A. Assignment of human {alpha}-synuclein (SNCA) and {beta}-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*. 1995;27(2).
99. Liu X, Yamada N, Osawa T. Amide-Type Adduct of Dopamine—Plausible Cause of Parkinson Diseases. *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules*. 2014:49-60.
100. GeneCards. TH Gene Israel: Weizmann Institute of Science; 2021 [The Human Gene Database]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TH>.
101. Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G. Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Rev*. 2004;46(1):44-70.
102. Markstein R. Dopamine receptor profile of co-dergocrine (Hydergine®) and its components. *Eur J Pharmacol*. 1982;86(2):145-55.
103. Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*. 2014;282:13-22.
104. Mueller NPF, Carloni P, Alfonso-Prieto M. Molecular determinants of acrylamide neurotoxicity through covalent docking. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1125871.
105. Giros B, Caron MG. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends in pharmacological sciences*. 1993;14(2):43-9.
106. MedlinePlus. TH Gene USA: U.S. National Library of Medicine; 2021 [Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/th/>].
107. Zhu Y, Zhang J, Zeng Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2012;11(4):350-8.
108. Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Molecular neurobiology*. 1998;16(3):285-309.
109. Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P. Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(10):1965-74.
110. Hansen C, Angot E, Bergström A-L, Steiner JA, Pieri L, Paul G, et al. α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(2):715-25.
111. Abeliovich A, Gitler AD. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature*. 2016;539(7628):207-16.
112. Zhang W, Phillips K, Wielgus AR, Liu J, Albertini A, Zucca FA, et al. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*. 2011;19:63-72.
113. Abeyawardhane DL, Lucas HR. Iron redox chemistry and implications in the Parkinson's disease brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019.
114. Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(7):1459-74.
115. Gross J, Kim D, Zhou Y, Jansen D, Slosky L, Clark N, et al. Discovery of a functionally selective ghrelin receptor (GHSR1a) ligand for modulating brain dopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022;119(10):e2112397119.
116. Kienast T, Heinz A. Dopamine and the diseased brain. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2006;5(1):109-31.
117. Özsoy Ö. Deneysel parkinson modeline glutatyon izopropil esterinin etkisi ve mekanizması. 2012.
118. Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(2):289-300.

119. PubChem. Rotenone U.S.A.: U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information; 2021 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rotenone>].
120. Tebourbi O, Sakly M, Rhouma KB. Molecular mechanisms of pesticide toxicity. In: Stoytcheva DM, editor. Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment: InTech; 2011.
121. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*. 2000;3(12):1301-6.
122. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *The FEBS journal*. 2012;279(7):1156-66.
123. Voronkov D, Kutukova K, Ivanov M, Khudoerkov R. Immunomorphological changes in the olfactory bulbs of rats after intranasal administration of rotenone. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;164(2):203-6.
124. Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T. Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):92-6.
125. Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, et al. Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res*. 2009;87(2):576-85.
126. Cabezas R, Baez-Jurado E, Hidalgo-Lanussa O, Echeverria V, Ashrad GM, Sahebkar A, et al. Growth factors and neuroglobin in astrocyte protection against neurodegeneration and oxidative stress. *Molecular neurobiology*. 2019;56(4):2339-51.
127. Attia AK, Abdel-Moety MM. Thermoanalytical investigation of terazosin hydrochloride. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013;3(1):147.
128. Taylor BN, Cassagnol M. Alpha adrenergic receptors. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing*; 2022.
129. Yang CH, Raja A. Terazosin. *StatPearls. Treasure Island FL ineligible companies. Disclosure: Avais Raja declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023*.
130. Ishizuka O, Nishizawa O, Hirao Y, Ohshima S. Evidence-based meta-analysis of pharmacotherapy for benign prostatic hypertrophy. *Int J Urol*. 2002;9(11):607-12.
131. Lepor H, Baumann M, Shapiro E. The alpha adrenergic binding properties of terazosin in the human prostate adenoma and canine brain. *The Journal of urology*. 1988;140(3):664-7.
132. Sridharan K, Sivaramakrishnan G. Efficacy and safety of alpha blockers in medical expulsive therapy for ureteral stones: a mixed treatment network meta-analysis and trial sequential analysis of randomized controlled clinical trials. *Expert review of clinical pharmacology*. 2018;11(3):291-307.
133. Preminger GM, Tiselius H-G, Assimos DG, Alken P, Buck C, Gallucci M, et al. 2007 guideline for the management of ureteral calculi. *The Journal of urology*. 2007;178(6):2418-34.
134. Sterrett SP, Nakada SY, editors. *Medical expulsive therapy. Semin Nephrol*; 2008: Elsevier.
135. Brede C, Hollingsworth JM, Faerber GJ, Taylor JS, Wolf JS. Medical expulsive therapy for ureteral calculi in the real world: targeted education increases use and improves patient outcome. *The Journal of urology*. 2010;183(2):585-9.
136. Ghaleiha A, Shahidi KM, Afzali S, Matinnia N. Effect of terazosin on sweating in patients with major depressive disorder receiving sertraline: a randomized controlled trial. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*. 2013;17(1):44-7.

137. Detweiler MB, Pagadala B, Candelario J, Boyle JS, Detweiler JG, Lutgens BW. Treatment of post-traumatic stress disorder nightmares at a veterans affairs medical center. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(12):117.
138. Cheah PY, Liong ML, Yuen KH, Teh CL, Khor T, Yang JR, et al. Terazosin therapy for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a randomized, placebo controlled trial. *The Journal of urology*. 2003;169(2):592-6.
139. Hayes MH, Peuchen EH, Dovichi NJ, Weeks DL. Dual roles for ATP in the regulation of phase separated protein aggregates in *Xenopus* oocyte nucleoli. *Elife*. 2018;7:e35224.
140. Schultz JL, Brinker AN, Xu J, Ernst SE, Tayyari F, Rauckhorst AJ, et al. A pilot to assess target engagement of terazosin in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2022;94:79-83.
141. Cai R, Zhang Y, Simmering JE, Schultz JL, Li Y, Fernandez-Carasa I, et al. Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(10):4539-49.
142. Rosen GD, Williams AG, Capra JA, Connolly MT, Cruz B, Lu L, et al., editors. *The mouse brain library @www.mbl.org*. Int Mouse Genome Conference; 2000.
143. Williams RW. Mapping genes that modulate mouse brain development: a quantitative genetic approach. *Mouse brain development*. 2000:21-49.
144. Ip CW, Cheong D, Volkmann J. Stereological estimation of dopaminergic neuron number in the mouse substantia nigra using the optical fractionator and standard microscopy equipment. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2017(127):e56103.
145. Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. 2011. Available from: <http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&plate=100960224&structure=549&x=5280.25390625&y=3744.012887137277&zoom=-3&resolution=11.97&z=5>.
146. Fleming SM, Ekhatior OR, Ghisays V. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2013(76).
147. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan P, Hsu D, Clement M-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox biology*. 2014;2:457-65.
148. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*. 2004;26(3):249-61.
149. Coordinators NR. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D7-D19.
150. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134-
151. Refaiy A, Muhammad E, ElGanainy E. Semiquantitative smoothelin expression in detection of muscle invasion in transurethral resection and cystectomy specimens in cases of urinary bladder carcinoma. *African Journal of Urology*. 2011;17(1).
152. IBM. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. . Armonk, NY:: IBM Corp.; 2012.
153. Foundation Ps. *Parkinson's Statistics: Parkinson's Foundation; 2023* [Available from: <https://www.parkinson.org/understanding-parkinsons/statistics>].
154. Simmons EC, Scholpa NE, Schnellmann RG. Mitochondrial biogenesis as a therapeutic target for traumatic and neurodegenerative CNS diseases. *Experimental neurology*. 2020;329:113309.
155. Grieco M, Giorgi A, Gentile MC, d'Erme M, Morano S, Maras B, et al. Glucagon-like peptide-1: a focus on neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:1112.
156. Zhang X, Alshakhshir N, Zhao L. Glycolytic metabolism, brain resilience, and Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2021;15:476.
157. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13-25.

158. Steenland K, Wesseling C, Román N, Quirós I, Juncos JL. Occupational pesticide exposure and screening tests for neurodegenerative disease among an elderly population in Costa Rica. *Environmental research*. 2013;120:96-101.
159. Han W, Tian Y, Shen X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*. 2018;192:59-65.
160. Ospina M, Wong LY, Baker SE, Serafim AB, Morales-Agudelo P, Calafat AM. Exposure to neonicotinoid insecticides in the US general population: Data from the 2015-2016 national health and nutrition examination survey. *Environmental Research*. 2019;176.
161. Nielsen SS, Checkoway H, Zhang J, Hofmann JN, Keifer MC, Paulsen M, et al. Blood α -synuclein in agricultural pesticide handlers in central Washington State. *Environmental research*. 2015;136:75-81.
162. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(34):10756-64.
163. Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology*. 2007;27(5):494-506.
164. Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM. Aggresomes formed by α -synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(6):4625-31.
165. da Costa CA, Ancolio K, Checler F. Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 \rightarrow Thr mutant α -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(31):24065-9.
166. Seo JH, Rah JC, Choi SH, Shin JK, Min K, Kim HS, et al. α -Synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *The FASEB Journal*. 2002;16(13):1-20.
167. Da Costa CA, Paitel E, Vincent B, Checler F. α -Synuclein Lowers p53-dependent Apoptotic Response of Neuronal Cells: ABOLISHMENT BY 6-HYDROXYDOPAMINE AND IMPLICATION FOR PARKINSON' S DISEASE. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(52):50980-4.
168. Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM. Degradation of α -synuclein by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(48):33855-8.
169. Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, et al. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(1):390-7.
170. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. α -Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(27):25009-13.
171. Hashimoto M, Rockenstein E, Mante M, Mallory M, Masliah E. β -Synuclein inhibits α -synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron*. 2001;32(2):213-23.
172. Windisch M, Hutter-Paier B, Rockenstein E, Hashimoto M, Mallory M, Masliah E. Development of a new treatment for Alzheimer's disease and Parkinson's disease using anti-aggregatory β -synuclein-derived peptides. *J Mol Neurosci*. 2002;19:63-9.
173. Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, et al. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(14):11970-8.
174. Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, et al. Parkin protects against the toxicity associated with mutant α -synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*. 2002;36(6):1007-19.
175. Oluwatosin-Chigbu Y, Robbins A, Scott CW, Arriza JL, Reid JD, Zysk JR. Parkin suppresses wild-type α -synuclein-induced toxicity in SHSY-5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(3):679-84.

176. Kim SJ, Sung JY, Um JW, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, et al. Parkin cleaves intracellular α -synuclein inclusions via the activation of calpain. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(43):41890-9.
177. Heikkilä RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine in mice. *Science*. 1984;224(4656):1451-3.
178. Braak H, Del Tredici K. Potential pathways of abnormal tau and α -synuclein dissemination in sporadic Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016;8(11):a023630.
179. Coulom H, Birman S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(48):10993-8.
180. Kunz W, Holmberg K, Zemb T. Hydrotropes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2016;22:99-107.
181. Booth JJ, Abbott S, Shimizu S. Mechanism of hydrophobic drug solubilization by small molecule hydrotropes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(51):14915-21.
182. Mehringer J, Do T-M, Touraud D, Hohenschutz M, Khoshsim A, Horinek D, et al. Hofmeister versus Neuberg: is ATP really a biological hydrotrope? *Cell Reports Physical Science*. 2021;2(2).
183. Sridharan S, Kurzawa N, Werner T, Günthner I, Helm D, Huber W, et al. Proteome-wide solubility and thermal stability profiling reveals distinct regulatory roles for ATP. *Nature communications*. 2019;10(1):1155.
184. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MM, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*. 2015;90(3):927-63.
185. Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *The FASEB Journal*. 1994;8(2):174-81.
186. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 2002;62(18):5196-203.
187. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(2):121-35.
188. Tang BL. Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway. *J Cell Biochem*. 2019;120(9):14285-95.
189. Gao X, Zhao L, Liu S, Li Y, Xia S, Chen D, et al. γ -6-Phosphogluconolactone, a byproduct of the oxidative pentose phosphate pathway, contributes to AMPK activation through inhibition of PP2A. *Mol Cell*. 2019;76(6):857-71. e9.
190. Witt K. "Prostatamedikamente" reduzieren das Risiko einer Parkinson-Erkrankung? *InFo Neurologie+ Psychiatrie*. 2021;23:22-3.

EK A. ETİK KURUL KARARI



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

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
11.08.2021	07	01

SDÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 11.08.2021 tarihinde saat-10.00'da ZOOM programı üzerinden uzaktan toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;

Karar: 01- Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ABD) Yürütücülüğünde,

Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK, Öğr. Gör. İbrahim ONARAN, Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR, Arş. Gör. Dr. Vehbi Atahan TOĞAY, Arş. Gör. Dr. Dilek AŞCI ÇELİK, Arş. Gör. Dr. Gülçin YAVUZ TÜREL, Arş. Gör. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Aydın CANDAN'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı "**Farelerde Rotenone İle Oluşturulmuş Parkinson Modelinde Terazosin'in Etkinliği**" başlıklı SDÜ Bilimsel Araştırma Projesi etik kurulumuzca oybirliği ile **UYGUNLUĞUNA** karar verilmiştir.

İMZA Doç. Dr. Kanat GÜLLE Başkan	İMZA Prof. Dr. İbrahim Metin ÇİRİŞ Başkan Yardımcısı	İMZA Prof. Dr. Münire ÇAKIR ÜYE
İMZA Doç. Dr. Ömer ÇELİK ÜYE	KATILMADI Prof. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE	PROJEDE Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE
İMZA Doç. Dr. Müge ÇINA ÜYE	İMZA Dr. Öğr. Üyesi Sefa Alperen ÖZTÜRK ÜYE	PROJEDE Öğr. Gör. İbrahim ONARAN (HÜDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE
İMZA Orman Müh. Serkan GÖNENÇ SİVİL ÜYE	İMZA Vet. Hekim Ayşegül AVŞAR SİVİL ÜYE	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İbrahim ONARAN
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Isparta Listesi, Isparta, 1992
Lisans : İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, 1998
Doktora : SDÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD.,
2023

Mesleki Deneyim

SDÜ Tıp Fakültesi : Öğretim Görevlisi, 2005-Halen

Yayınlar

Karahan, N., İşler, M., Koyu, A., Karahan, A. G., Başyığıt Kiliç, G., Cırış, I. M., Sütçü, R., Onaran, I., Cam, H., & Keskin, M. (2012). Effects of probiotics on methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in rats. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 23(2), 110–121. <https://doi.org/10.4318/tjg.2012.0330>

Aslan Koşar, P., Tuncer, H., Cihangir Uğuz, A., Espino Palma, J., Darıcı, H., Onaran, İ., Çiğ, B., Koşar, A., & Rodriguez Moratinos, A. B. (2015). The efficiency of Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) cleavage on detection of apoptosis in an experimental model of testicular torsion. *International journal of experimental pathology*, 96(5), 294–300. <https://doi.org/10.1111/iep.12137>

Aşçı S, Demirci S, Aşçı H, Kumbul Doğuç D, Onaran İ. (2016). Neuroprotective effects of pregabalin on cerebral ischemia and reperfusion. *Balkan medical journal* 33 (2), 221.