



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROTOKSİNLER İLE OLUŞTURULAN PARKİNSON HASTALIĞI
MODELİNDE SODYUM-GLUKOZ KO-TRANSPORTER 2
İNHİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İSMAİL ÜNAL
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. EBRU IŞIK ALTURFAN
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROTOKSİNLER İLE OLUŞTURULAN PARKİNSON HASTALIĞI
MODELİNDE SODYUM-GLUKOZ KO-TRANSPORTER 2
İNHİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İSMAİL ÜNAL
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. EBRU IŞIK ALTURFAN
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

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

İsmail ÜNAL



TEŞEKKÜR

Köyünden göçmüş bir ana ve babanın çocuğunun eğitim almasına olanak sağlayarak, Türk Milleti'nin makus talihini yenmesini sağlayan, Türk toplumu üzerindeki ölü toprağını kaldırmak için hayatını bu uğurda harcayan, “*Muhtaç olduğun kudret, damarlarındaki asil kanda mevcuttur.*” sözünün sahibi ölümsüz ATAM Mustafa Kemal ATATÜRK'e, silah arkadaşlarına ve bu uğurda can veren her Türk Milleti ferdine,

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez çalışmam sırasında verdiği destekle beni daha iyiye sevk eden, her konuda azimli ve özgüvenli olmam için bana yol gösteren ve cesaretlendiren, öğrencisi olmakla gurur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Ebru Işık ALTURFAN'a, doktora ders dönemimde ve bilimsel çalışmalarda bana bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli Temel Bilimler Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Tanju KADİR'e ve kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ayşen YARAT'a, Prof. Dr. Tuğba AKBAY'a, Doç. Dr. Nihal Şehkar OKTAY'a, Dr. Öğr. Üyesi. Esin AK'a, laboratuvarında benimle omuz omuza çalışan, yeri geldiğinde beraber üzüldüğümüz yeri geldiğinde beraber güldüğümüz, çalışmaktan zevk aldığım değerli laboratuvar arkadaşlarım Merih BELER'e, Derya CANSIZ'a, Ünsal Veli ÜSTÜNDAĞ'a, Fümet ÜSTÜNDAĞ'a, Gizem EĞİLMEZER'e, Atakan KARAGÖZ'e, Gözde Ece KARAMAN'a, arkadaşlığını benden esirgemeyen, aynı bölümde koşturduğumuz, bilgi alışverişi yaptığımız sevgili arkadaşlarım Güzin Göksun SİVAS'a, Begüm GÜREL GÖKMEN'e, Ozan ÖZCAN'a Sümeyye YILMAZ'a, Elif TUFAN'a, Hava TASLAK'a, Begüm ÖZEL'e, gençliğimden beri tanıdığım, çok uzun zamandır benimle dostluk eden değerli arkadaşım Serhat EKMEN'e, kısa zamanda iyi arkadaşlık geliştirdiğimiz dostum Tufan GÖKMEN'e, histolojik çalışmamda benden yardımını esirgemeyen Zehra SEZER'e, beni bu zamana kadar büyütüp yetiştiren, varlıkları ile beni onurlandıran, ne yaparsam yapayım beni sevmekten vazgeçmeyen sevgi biricik ailem Sevgi ÜNAL'a, Salim ÜNAL'a, Aykut ÜNAL'a,

YÖK 100/2000 öncelikli alanlar doktora bursu ve 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Bursu ile maddi destek sağlayan sırasıyla Yüksek Öğretim Kurulu'na ve **TÜBİTAK**'a teşekkür ederim.

Bu tez, TÜBİTAK 1002 hızlı destek programı tarafından '**Deneyisel Parkinson Hastalığı Modelinde Glukoz Geri Emilimi İnhibisyonunun Ketojenik Etkilerinin İncelenmesi**' başlıklı ve **121S208** numaralı proje ile, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından '**Nörotoksinler ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Sodyum-Glukoz Ko-Transporter 2 İnhibisyonunun Etkilerinin Araştırılması**' başlıklı ve **TDK-2022-10377** numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Parkinson Hastalığı.....	6
4.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri	7
4.2.1. Bradikinezi.....	9
4.2.2. Tremor	9
4.2.3. Rijidite	9
4.2.4. Postural instabilite	10
4.2.5. Koku alma bozukluğu	10
4.2.6. Kabızlık.....	10
4.3. Parkinson Hastalığının Heiko Braak’a Göre Evreleri	10
4.3.1. Birinci evre	10
4.3.2. İkinci evre	11
4.3.3. Üçüncü evre	11
4.3.4. Dördüncü evre	11
4.3.5. Beşinci evre	11
4.3.6. Altıncı evre	12
4.4. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi.....	12
4.5. Parkinson Hastalığı Gelişmesinde Rol Alan Genler.....	12
4.5.1. Alfa sinüklein.....	14
4.5.2. Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligaz	14
4.5.3. PTEN kaynaklı kinaz 1	15

4.5.4. Parkinsonizm ilişkili deglikaz.....	15
4.5.5. Lösince zengin tekrarlayan kinaz 2	16
4.6. Parkinson Hastalığı ile İlişkili Mekanizmalar	17
4.6.1. Mitokondri fonksiyonun bozulması ve oksidatif stres.....	17
4.6.2. Nöroinflamasyon	18
4.6.3. Otofaji	19
4.6.4. Apoptoz.....	20
4.6.5. Lizozomal fonksiyon bozukluğu	21
4.6.6. Ubikuitin-proteazom sistemi fonksiyon bozukluğu.....	21
4.7. Parkinson Hastalığında Keton Cisimleri Metabolizması.....	22
4.8. Sodyum/Glukoz Kotransporter 2 ve İnhibitörleri.....	24
4.8.1. Empagliflozin	25
4.9. Parkinson Hastalığı Oluşturmada Kullanılan Endotoksin ve Nörotoksinler	26
4.9.1. 1-Metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropridin.....	26
4.9.2. Pestisitler.....	27
4.9.3. Lipopolisakkarit	28
4.10. Bir Model Organizma: Zebra Balığı.....	29
4.10.1. Zebra balığında lokomotor aktivite ve Y-labirenti testi.....	30
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER	32
5.1. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü	32
5.2. Kullanılan Cihazlar.....	33
5.3. Kullanılan Kimyasallar	34
5.4. Kullanılan Kitler	36
5.5. Kullanılan Antikorlar.....	37
5.6. Kimyasal Maruziyet Uygulanması	37
5.7. Grupların Ağırlık Ortalamalarının Bulunması	38
5.8. Grupların Kan Glukoz Ortalamalarının Bulunması.....	38
5.9. Davranış Analizleri: Locomotor Aktivite ve Y-Labirenti Testi.....	38
5.10. Homojenat ve Lizat Hazırlanması	40
5.11. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi.....	41

5.11.1. Total protein tayini	41
5.11.2. Lipit peroksidasyon tayini	42
5.11.3. Toplam nitrik oksit tayini	43
5.11.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini	45
5.11.5. Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayini	46
5.11.6. Toplam sialik asit tayini.....	47
5.11.7. İndirgenmiş glutasyon tayini.....	49
5.11.8. Asetilkolin esteraz aktivitesi tayini.....	50
5.11.9. Alkalen fosfataz aktivitesi tayini	51
5.12. Beyin ve Hepatopankreas Dokusunda Keton Cisimleri Tayini	52
5.13. Beyin Dokusunda Dopamin ve DOPAC Düzeyi Tayini	52
5.14. Beyin Dokusunda Mikroarray Analizi	52
5.15. Beyin Dokusunda Gen Ekspresyon Düzeyi Belirlenmesi (RT-PCR)	53
5.15.1. Delta delta C _t metodu ile veri analizi	53
5.16. Beyin Dokusunda İmmünohistokimyasal Boyama	54
5.16.1. Tirozin hidroksilaz immünohistokimyası	55
5.16.2. Lenfosit sitozolik protein 1 immünohistokimyası	56
5.17. İstatistiksel Analiz	56
6. BULGULAR.....	58
6.1. Grupların Ortalama Ağırlıklarının Sonuçları	58
6.2. Davranış Analizleri Sonuçları	59
6.2.1. Y-labirenti sonuçları	59
6.2.2. Lokomotor aktivite sonuçları.....	60
6.2.2. Grupların lokomotor aktivite değerlerinin karşılaştırması.....	63
6.3. Kan Glukoz Tayini Sonuçları	64
6.4. Biyokimyasal Parametrelerin Sonuçları	65
6.5. Keton Cisimleri Tayini Sonuçları.....	70
6.6. Nörotransmitter Düzeyi Sonuçları.....	70
6.7. Mikroarray Analizi Sonuçları.....	71
6.8. RT-PCR Sonuçları.....	94

6.9. İmmünohistokimya Sonuçları.....	97
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	100
8. KAYNAKLAR.....	116
9. ÖZGEÇMİŞ	138
10. BİLİMSEL FAALİYETLER.....	139
11. EKLER	144



KISALTMALAR LİSTESİ

6-OHDA	:	L-Hidroksifenilalanin
AAR	:	Alternative Arm Return, Alternatif Kol Dönüşü
ABC	:	ATP Bağlayıcı Kaset Proteini
AChE	:	Asetilkolin Esteraz
actb1	:	β -Aktin
AD	:	Alzheimer Hastalığı
ALP	:	Alkalen Fosfataz
ALT	:	Alanin Aminotransferaz
AST	:	Aspartat Aminotransferaz
ATG5	:	Otojaji ile İlişkili Protein 5
ATG8	:	Otofaji ile İlişkili Protein 8
ATP13A2	:	ATPaz Katyon Taşıyan 13A2
Bax	:	BCL2 ilişkili X, Apoptoz düzenleyicisi
BBB	:	Kan-Beyin Bariyeri
Bcl-2	:	B-hücre Lenfoma 2 (Bcl2 Apoptoz Düzenleyicisi)
BHB	:	β -Hidroksibütirat
BSA	:	Sığır Serum Albumini
Ca ²⁺	:	Kalsiyum
CDNB	:	1-Klor-2,4-Dinitro-Benzen
CSC	:	Coeruleus/Subcoeruleus Kompleksi
DA	:	Dopamin
DAT	:	Dopamin Taşıyıcısı
DJ-1	:	Ubikitin Karboksi Terminal Esteraz L1
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNAJC6	:	Dnaj Homolog Alt Aile C Üye 6
DOPAC	:	3,4-Dihidroksifenilasetik Asit
DTNB	:	5-5' Ditiyobis 1-2 nitrobenzoik Asit
EMP	:	Empagliflozin
FOXO	:	ForkHead Kutusu
GABARAP	:	γ -Aminobütirik Asit Reseptörü ile İlişkili Protein
GBA	:	β -Glikoserebrosidaz
GLUT	:	Glukoz Transporter Tip
GLUT-1	:	Glukoz Transporter Tip 1
GSH	:	Glutasyon
GST	:	Glutasyon S-Transferaz
GWAS	:	Genom Çağında İlişkilendirme Çalışmaları
H ₂ O	:	Su
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	:	Sülfürik Asit
HCl	:	Hidroklorik Asit
HMG-KoA	:	3-Hidroksi-3-metilglutaril-Koenzim A
hmgcs1	:	3-Hidroksi-3-metilglutaril-Koenzim A Sentaz 1
HO-1	:	Hemoksijenaz 1

HSP70	:	Isı Şok Proteini 70
IFN- γ	:	İnterferon γ
IHC	:	İmmünohistokimya
IL-1 β	:	İnterlökin 1 β
IL6	:	İnterlökin 6
K ₂ HPO ₄	:	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KH ₂ PO ₄	:	Monopotasyum Fosfat
L-DOPA	:	Levodopa
LAMP1	:	Lizozomal İlişkili Membran Proteini 1
LAMP2A	:	Lizozomla İlişkili Zar Proteini Tip 2A
LBP	:	Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
LC	:	Lewy Cisimciği
LC-MS/MS	:	Sıvı Kromatografi-Tandem Spektrometrisi
LCP1	:	Lenfosit Sitozol Protein 1
LPS	:	Lipopolisakkarit
LRRK2	:	Lösence Zengin Tekrarlayan Kinaz 2
MAP1LC3C	:	Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zincir 3 γ
MCT	:	Monokarboksilat Taşıyıcısı
MCT2	:	Monokarboksilat Taşıyıcısı 2
MDA	:	Malondialdehit
MPDP ⁺	:	1-Metil-4-Fenil-2,3-Dihidrotridinyum
MPP ⁺	:	1-Metil-4-Fenilpiridinyum
MPTP	:	1-Metil-4 fenil-1,2,3,4-tetrahidropridin
mTOR	:	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
Na-EDTA	:	Sodyum Etilendiamin Tetrasedik Asit
Na ₂ HPO ₄	:	Disodyum Hidrojen Fosfat
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	:	Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
NADH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
NEDD	:	N-(1-Naftil)-etilendiamin Dihidroklorür
NF- κ B	:	Nükleer Faktör κ B
NO	:	Nitrik Oksit
Nrf2	:	Nükleer Faktör Eritroid-2 ile İlişkili Faktör 2
O ₂	:	Oksijen
O ₂ ^{*-}	:	Süperoksit Radikali
OH [*]	:	Hidroksil Radikali
OLA1	:	Obg Benzeri ATPase 1
ONOO ⁻	:	Peroksinitrit
PBS	:	Fosfat Tamponu
PFA	:	Paraformaldehit
PH	:	Parkinson Hastalığı
PI3K	:	Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PINK1	:	PTEN Kaynaklı Kinaz 1
PPAR γ	:	Peroksizom Proliferatörü Aktive Edilmiş Reseptör γ

PRKN	:	Parkin RNR E3 Ubikitin Protein Liyaz
ROS	:	Reaktif Oksijen Türeleri
ROT	:	Rotenon
RT	:	Oda Sıcaklığı
SA	:	Sialik Asit
SAP	:	Spontaneous Alteration Performance, Spontan Değişim Performansı
SAR	:	Same Arm Return, Aynı Kol Dönüşü
SCOT	:	Süksinil-Koenzim A:3-Ketoasit Koenzim A Transferaz
SGLT	:	Sodyum/Glukoz Kotrasporter
SGLT1	:	Sodyum/Glukoz Kotrasporter 1
SGLT2	:	Sodyum/Glukoz Kotrasporter 2
SGLT2i	:	Sodyum/Glukoz Kotrasporter 2 İnhibitörü
SIRT1	:	Sirtuin 1
slc16a1b	:	Çözünmüş (Solute) Taşıyıcı Aile 16a 1b (Danio Rerio)
slc5a2	:	Çözünmüş (Solute) Taşıyıcı Aile 5 Üyesi 2 (SGLT2 geni)
SN	:	Substantia Nigra
SNCA	:	α -Sinüklein
SNCB	:	β -Sinüklein
SNCG	:	γ -Sinüklein
sncb	:	β -Sinüklein
sncg1	:	γ 1-Sinüklein
sncg2	:	γ 2-Sinüklein
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
SSS	:	Santral Sinir Sistemi
SULF	:	Sülfanilamid
T-PBS	:	Tween İçeren PBS
T2DM	:	Tip 2 Diyabet
TBA	:	Tiyobarbütirik Asit
TCA	:	Trikloroasetik Asit
TH	:	Tirozin Hidroksilaz
TLR4	:	Toll Benzeri Reseptör 4
TMEM175	:	Transmembran Protein 175
TNAP	:	Dokuya Özgü Olmayan ALP
TNF- α	:	Tümör Nökrez Faktörü α
UCHL1, PARK5	:	Ubikitin Karboksi Terminal Esteraz L1
ULK	:	UN51 Benzeri Ser/Thr Kinaz
UPS	:	Ubikuitin-Proteazom Sistemi
UVRAG	:	UV radyasyon direnci ile ilişkili gen
VCl ₃	:	Vanadyum Klorür
VPS35, PARK17	:	Boşluklu Protein Sıralama Ortoloğu 35
ZnSO ₄	:	Çinko Sülfat

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1: PH'da motor ve motor olmayan belirtiler.....	8
Şekil 2: PH'da klinik belirtilerin ortaya çıkma zaman çizelgesi	9
Şekil 3: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi	32
Şekil 4: Sırasıyla buz ile anestezi, LPS enjeksiyonu için tartım ve LPS enjeksiyonu	37
Şekil 5: Zebra balıklarından insülin iğnesi yardımıyla kan alımı	38
Şekil 6: Sırasıyla Y-maze ve lokomotor aktivite düzenekleri ve video çekimi	39
Şekil 7: Kinovea programında zebra balığının 5 dk. boyunca izlenmesi.....	39
Şekil 8: Toxtrack programında zebra balıklarının lokomotor aktivite analizinin yapılması ...	40
Şekil 9: Y-Maze testinin Microsoft Excel analiz dosyası görüntüleri	40
Şekil 10: Beyin dokularının dondurulması ve kesit alınması işlemi	55
Şekil 11: Grupların vücut ağırlıklarının deney boyunca değişimi	58
Şekil 12: Grupların 4.hafta vücut ağırlıklarının karşılaştırılması	59
Şekil 13: Grupların SAP, SAR ve AAR oranlarının karşılaştırılması	60
Şekil 14: Kontrol grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	61
Şekil 15: ROT grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	61
Şekil 16: LPS grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	61
Şekil 17: ROT+LPS grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	62
Şekil 18: EMP grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	62
Şekil 19: EMP+ROT grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	62
Şekil 20: LPS+EMP grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.	63
Şekil 21: ROT+LPS+EMP grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.....	63
Şekil 22: Grupların lokomotor aktivite değerlerinin karşılaştırılması	64
Şekil 23: Grupların 4. Hafta sonunda açlık kan glukoz düzeylerinin karşılaştırılması	64
Şekil 24: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması.....	66

Şekil 25: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas lipit peroksidasyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	66
Şekil 26: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması.	67
Şekil 27: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	67
Şekil 28: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas glutatyon s-transferaz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	68
Şekil 29: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas sialik asit düzeylerinin karşılaştırılması.	68
Şekil 30: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas alkalen fosfataz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 31: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas asetilkkolin esteraaz aktivitelerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 32: Grupların beyin ve karaciğer toplam keton cisimleri miktarlarının karşılaştırılması	70
Şekil 33: Grupların DOPAC/Dopamin oranlarının karşılaştırılması.	71
Şekil 34: Mikrodizi verilerinin temel bileşen analizi. Verilerin dört ana bileşeni gösterilmektedir. En alttaki sayılar kümülatif katkı oranını gösterir.	71
Şekil 35: ROT+LPS+EMP, ROT+LPS, LPS gruplarının K grubuna karşı oluşturdukları gen ekspresyon değimlerinin Venn şeması ile gösterimi.	91
Şekil 36: ROT+LPS+EMP grubunun ROT+LPS grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri	92
Şekil 37: ROT+LPS+EMP grubunun LPS grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerler.....	92
Şekil 38: ROT+LPS+EMP grubunun K grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri.....	93
Şekil 39: ROT+LPS grubunun LPS grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri	93
Şekil 40: ROT+LPS grubunun K grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri.....	94
Şekil 41: Grupların beyin dokusu tnfa ve il6 mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	94
Şekil 42: Grupların beyin dokusu mTOR, sirt1 ve atg5 mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	95
Şekil 43: Grupların beyin dokusu pink1, lrrk2, park7 ve park2 mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	96

Şekil 44: Grupların karaciğer dokusu slc16a1b, hmgs1 ve slc5a2 mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	96
Şekil 45: Grupların karaciğer dokusu pparag ve pparab mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	97
Şekil 46: TH belirtecine ait immünohistokimyasal analiz.	98
Şekil 47: Lcp1 belirtecine ait immünohistokimyasal analiz.	99



TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1: PH'da etkili olduğu düşünülen bazı önemli genler ve zebra balığı ortologları	13
Tablo 2: Deneylerde Kullanılan Cihazlar	33
Tablo 3: Kullanılan kimyasalların listesi	34
Tablo 4: Kullanılan Kitler	36
Tablo 5: Kullanılan Antikorlar	37
Tablo 6: Toplam protein tayini yöntemi	42
Tablo 7: Lipit peroksidasyon tayin yöntemi	43
Tablo 8: Nitrik oksit tayin yöntemi	44
Tablo 9: Superoksit dismutaz aktivitesi tayin yöntemi	46
Tablo 10: Glutatyon S-transferaz aktivitesi tayin yöntemi	47
Tablo 11: Sialik Asit tayin yöntemi	48
Tablo 12: Glutatyon tayin yöntemi	49
Tablo 13: Asetilkolin esterase tayin yöntemi	50
Tablo 14: Alkalen fosfatase aktivitesi tayin yöntemi	51
Tablo 15: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre azalan genler	72
Tablo 16: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre belirgin genler	73
Tablo 17: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre azalan genler	75
Tablo 18: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre artan genler	77
Tablo 19: LPS grubunda K grubuna göre azalan genler	78
Tablo 20: LPS grubunda K grubuna göre artan genler	79
Tablo 21: ROT+LPS grubunda K grubuna göre azalan genler	83
Tablo 22: ROT+LPS grubunda K grubuna göre artan genler	84
Tablo 23: ROT+LPS grubunda LPS grubuna göre azalan genler	87
Tablo 24: ROT+LPS grubunda LPS grubuna göre artan genler	89

1. ÖZET

Tezin Başlığı: Nörotoksinler ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Sodyum-Glukoz Ko-Transporter 2 İnhibisyonunun Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı: İsmail Ünal

Danışmanın Adı Soyadı: Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan

Programın Adı: Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Programı

Amaç: Çalışmamızdaki amacımız, zebra balıklarında oluşturulan Parkinson hastalığı (PH) modelinde sodyum-glukoz kotransporter 2 inhibitörü olan empagliflozinin olası ketojenik, otofajik ve nöroprotektif etkilerinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Zebra balıkları Kontrol, Rotenon (ROT), Lipopolisakkarit (LPS), Empagliflozin (EMP), ROT+LPS, ROT+EMP, LPS+EMP, ROT+LPS+EMP olmak üzere sekiz gruba ayrılmıştır. Grupların her hafta ağırlıkları tartılmış, kaydedilmiş ve maruziyet süresi bitiminde davranış analizleri yapılmıştır. Ardından grupların kan glukoz düzeyleri ölçülmüş, beyin ve hepatopankreas dokuları alınmıştır. Dokularda biyokimyasal parametreler spektrofotometrik yöntem ile, nörotransmitter ölçümü LC-MS/MS yöntemi ile, keton cisimlerinin düzeyleri kolorimetrik yöntem ile belirlenmiştir. PH ile ilişkili gen ifadeleri RT-PCR yönetimi ile, uygulanan maruziyetlerin gen ekspresyonları üzerindeki etkileri mikroarray yöntemi ile belirlenmiştir. Tirozin hidroksilaz (th) ve lenfosit sitozolik protein 1 (lcp1) ifadelerinin değişimi immunohistokimyasal yöntem ile belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda EMP, dört hafta sonunda vücut ağırlıklarında azalmaya sebep olmuştur. Y-maze analizinde spontan değişim performansı ROT ve LPS verilen gruplarda azalırken, EMP uygulaması ile ROT ve ROT+LPS gruplarında artış gözlenmiştir. EMP uygulaması oksidatif stresin azalmasına yardımcı olmuştur. Beyin ve hepatopankreasta yapılan keton cisimleri analizinde EMP verilen grupta artış gözlenmiştir. EMP etkisi ile DOPAC/DA oranı artmıştır. Mikroarray analizinde, EMP'nin otofajik yollarda etkili olduğu görülmüştür. RT-PCR çalışmasında EMP'nin beyin dokusunda nöroinflamasyonu azaltıcı etkiye sahip olduğu, *sirt1* genin ekspresyonunu arttırdığı ve *pink1* ve *lrrk2* genlerinin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Hepatopankreas dokusunda ise *hmgcs1* geninin ekspresyonu azalmıştır. İmmünohistolojik incelemede EMP'nin th ifadesini arttırırken lcp1 ifadesinin azalmasını sağlayarak nöroinflamasyonu azalttığı bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarına göre zebra balıklarında ROT ve LPS ile oluşturulan PH modelinde EMP'nin olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelime: Parkinson hastalığı, Empagliflozin, Rotenon, LPS, Nöroinflamasyon, Otofaji, Antioksidan

2. SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of the Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibition in a Neurotoxin-Induced Parkinson's Disease Model

Student Name, Surname: İsmail Ünal

Supervisor Name: Prof. Dr. Ebru Alturfan

Program Name: Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, PhD Program

Objective: The aim of our study is to we explore the possible ketogenic, autophagic and neuroprotective effects of empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, in a zebrafish Parkinson's disease (PD) model.

Materials and Methods: Zebrafish were divided into eight groups as Control, Rotenone (ROT), Lipopolysaccharide (LPS), Empagliflozin (EMP), ROT+LPS, ROT+EMP, LPS+EMP, ROT+LPS+EMP. Every week, the weights of the groups were measured and recorded. The behavioral assessments were completed after the exposure period. Then, the blood glucose levels of the groups were measured, and the brain and hepatopancreas tissues were taken. Afterwards, biochemical parameters were determined by spectrophotometric method, neurotransmitter measurement was determined by LC-MS/MS method, and ketone body levels were determined by colorimetric method. PD-related gene expressions were determined by RT-PCR, and the effects of applied exposures on gene expressions were determined by microarray method. Immunohistochemical analysis was used to detect the alterations in tyrosine hydroxylase (th) and lymphocyte cytosolic protein 1 (lcp1) expression.

Results: EMP caused a decrease in body weights at the end of four weeks. In the Y-maze analysis, while the spontaneous change performance decreased in the ROT and LPS groups, the exposure of EMP caused an increase and decreased oxidative stress in these groups. EMP group had higher levels of ketone bodies in the brain and hepatopancreas. The DOPAC/DA ratio increased with the effect of EMP. Microarray analysis showed that EMP acted on autophagic pathways. In the RT-PCR study, it was shown that EMP reduces neuroinflammation in brain tissue, enhances *sirt1* gene expression, and decreases *pink1* and *lrrk2* gene expression. In hepatopancreatic tissue, the *hmgcs1* gene's expression was downregulated. In the immunohistological examination, the expression of th increased in the groups given EMP and decreased neuroinflammation was found through reduced lcp1 expression.

Conclusion: According to the results of our study, it has been observed that EMP has positive effects in the PH model generated with ROT and LPS in zebrafish.

Keywords: Parkinson's disease, Empagliflozin, Rotenone, Lipopolysaccharide, Neuroinflammation, Autophagy, Antioxidant

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH) yaygın bir nörolojik hastalıktır. Kırk yaş altındaki insanlarda nadiren görülür ancak görülme sıklığı yaşla beraber artar. Seksen yaş üstü insanların %3'nü etkilediği düşünülmektedir. PH, motor ve motor olmayan semptomlarla kendini gösteren ilerleyici, dejeneratif bir hastalıktır (Hayes, 2019).

PH'nin klinik tanısı, aslında yavaş ilerleyen asimetric dinlenme tremoru, rijidite ve bradikinezi gibi motor özelliklere dayanır, fakat koku alma bozukluğu, kabızlık, depresyon ve REM uyku davranış bozukluğu gibi motor olmayan bozukluklar motor olan bozukluklara göre yıllar önce gelişebilir. Hastalığın ileri aşamalarında otonomik fonksiyon bozukluğu, ağrı ve kognitif gerileme gibi ek motor olmayan bozukluklar ortaya çıkabilir (Simon ve ark., 2020). PH olan kişi 20 yaşın altında ise, hastalığın nedeni genellikle genetikdir. Şu anda PH, Alzheimer hastalığından sonra ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Çevresel ve kalıtsal faktörler PH'de önemli etkenlerdir (Pang ve ark., 2022). PH'nin patojenezi net olarak bilinmemesine rağmen çeşitli patolojik özellikleri bilinmektedir. Öne çıkan patolojik değişimler substantia nigra (SN) bölgesindeki dopamin üreten nöronların dejeneratif ölümü, striatumdaki dopaminerjik nöronlarda azalma ve anormal proteinler ihtiva eden Lewy cisimlerinin (LC) oluşumudur. Dahası diğer patolojik bulgular arasında mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, anormal protein birikimi ve inflamatuvar yanıtlar bulunur (Pang ve ark., 2022). Anormal protein birikiminin yanı sıra, otofajik ve lizozom disfonksiyonları gibi hatalı olanların bozunma yolları, patoloji ve genetik tarafından kanıtlandığı gibi, PH patojenezine katkıda bulunabilecek erken hastalık özellikleri bilinmektedir (Hou ve ark., 2020).

Zebra balığının ilaç araştırmada kullanımı yirmi birinci yüzyılın başlarında artmıştır. Küçük boyutu ve hızlı üremesi nedeniyle zebra balığı büyük ölçekli *in vivo* deneyler için uygundur. İlaç uygulaması sulu ortam yoluyla kolaylaştırılır ve etkinlik, biyoyararlanım ve toksisite kolayca belirlenebilir. Çok daha önemlisi, zebra balığı, insanlarla anatomik benzerliğinin çok daha düşük olduğu *Drosophila melanaogaster* veya *Caenorhabditis elegans* gibi yaygın olarak kullanılan diğer model organizmaların aksine bir omurgalıdır. Optik şeffaflık, hücresel ve fizyolojik süreçlerin *in vivo* ve gerçek zamanlı olarak doğrudan gözlemlenmesini sağladığı için bu zebra balığının başka bir avantajıdır. Bu ve diğer özellikler, zebra balığını gelişimsel biyolojide araştırma yapmak için ana model haline getirmiştir. Ayrıca, bir hastalık modeli olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır ve son zamanlarda ilaçların taraması için önemli bir araç haline gelmiştir. Zebra balığı insanlarla genomik ve fizyolojik homolojiye sahiptir. Bununla beraber, zebra balığı genomu sekanslanmış ve veritabanı kullanımdadır. Zebra balığı

genomu insan genlerinin %71'i ile ortologları içerir ve kodlanmış proteinlerin birçoğunun fonksiyonel özelliklerini yüksek derecede muhafaza ettiği görülmüştür. Sinir sistemi de dahil olmak üzere organların çoğunda fizyolojik ve anatomik homoloji de kanıtlanmıştır (Vaz ve ark., 2018).

Dopaminerjik sistem, zebra balıklarında hem embriyonik hem de yetişkinlik döneminde iyi karakterize edilmiştir. Zebra balığı beyinlerinin ventral diensefalonunda tirozin hidroksilaz (TH) içeren nöronların, memeli orta beyindeki substantia nigra ve ventral tegmental nöronlara homolog olduğu düşünülmektedir. Zebra balıklarında PH ile ilgili protein homologları (PARKIN, DJ-1, PINK1, LRRK2 vd.) tanımlanmıştır. Sıçanlarda PH'yi indüklemek için kullanılan nörotoksinler, zebra balığı üzerinde kullanılmaktadır ve olumlu sonuçlar almıştır. En çok kullanılan nörotoksinler rotenon, MPTP, 6-OHDA ve parakuattır (Ünal ve Emekli-Alturfan, 2019). PH'nin en yaygın iki inflamatuvar modeli olarak sırasıyla toll-like reseptörler 3 ve 4'ü aktive eden poliinosinik polisitidilik asit ve lipopolisakkarit (LPS) kullanılmaktadır.

Empagliflozin (EMP), oral hipoglisemik ajanların yeni sınıfının bir parçasıdır ve Sodyum/glukoz kotransporter 2 inhibitörüdür (SGLT2i). EMP ile hipoglisemi riski çok azdır çünkü etki mekanizması beta hücre fonksiyonundan ve insülin yolundan bağımsızdır. EMP, normal böbrek fonksiyonu olan hastalarda Tip 2 diyabet tedavisi olarak onaylanmış, oldukça güçlü, seçici, rekabetçi bir SGLT2i'dir (Ndefo ve ark., 2015). SGLT, ince bağırsağın bağırsak mukozasında (enterositler) SGLT1 şeklinde ve nefronun proksimal tübülünde SGLT2 şeklinde bulunan bir glukoz taşıyıcı ailesidir. Glukozun renal geri emilimine katkıda bulunurlar (Yokono ve ark., 2014). SGLT2, renal glukoz geri emiliminin yaklaşık %90'ından sorumludur. %10'luk kesiminden ise SGLT1 sorumludur (Brown ve ark., 2019). SGLT2 inhibisyonunun pro-ketojenik etki ve kalori kısıtlama taklidi yaptığı insan ve hayvan çalışmasında gösterilmiştir (Ferrannini ve ark., 2016). Yüksek yağlı bir diyet uygulanan farelerle yapılan bir çalışmada, SGLT2 tedavisinin beyin üzerindeki olumlu etkisi de bildirilmiştir (Hierro-Bujalance ve ark., 2020).

Son yıllardaki PH çalışmalarında nörodejenerasyonun moleküler mekanizmasına dair büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen halen PH için nöroprotektif bir tedavi kesin olarak başarılamamıştır (Simon ve ark., 2020).

Çalışmamızın hipotezi deneysel PH modelinde SGLT2 inhibitörü EMP'nin ketojenik diyeti taklit edebilecek bir mekanizma ile dopaminerjik nöronları koruyabileceğidir. Bu amaçla çalışmamızda literatürde ilk defa rotenon ve LPS ile oluşturulan Parkinson modelinde bir

SGLT2 inhibitörü olan EMP'in ketojenik ve otofajik yollar üzerinden olası nöroprotektif etkileri zebra balıklarında incelenecektir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Parkinson Hastalığı

PH, James Parkinson tarafından 1817 tarihli “*Essay on the Shaking Palsy*” adlı yayınında tanımlanan karmaşık ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. 200 yılı aşkın bir süredir PH için nöroprotektif tedavi kesin olarak henüz başarılamamıştır. Bununla birlikte, PH’de nörodejenerasyonun moleküler temelini anlaşılmada son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Simon ve ark., 2020).

PH, genellikle yaşlı popülasyonda ortaya çıkan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Simon ve ark., 2020). PH insidansı yılda 5/100000 ile 35/100000 yeni vaka arasında değişmektedir. İnsidans 60 ile 90 yaş arasında 5-10 kat artar. Ölüm, PH teşhisi konulduktan sonraki ilk 10 yılda artış göstermez iken daha sonrasında artış gösterir. Küresel nüfus yaşlandıkça, PH prevalansının dramatik bir şekilde artması ve önümüzdeki yirmi yılda ikiye katlanması beklenmektedir (Simon ve ark., 2020). Buna göre 80 yaş üstü nüfusun %3’ünün etkilenebileceği tahmin edilmektedir (Hayes, 2019).

Çoğu PH vakası muhtemelen çevresel ve genetik faktörlerin birleşik etkilerinden kaynaklanan çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir. Toksik kimyasallara maruz kalma ve kafa travması gibi durumlar PH riskini arttırabiliyorken yaşam tarzı ile bu risk azaltılabilir. Belirli genlerdeki tanımlanabilir mutasyonlar vakaların yaklaşık % 5-10’unda PH’ye sebep olsa da, bu mutasyonlar çoğu PH’de yoktur (Simon ve ark., 2020). Sigara ve kahve içmek koruyucu görünmektedir (Hayes, 2019).

PH’nin klinik tanısı, öncelikle yavaş ilerleyen asimetric dinlenme halindeki tremor, dişli çarkının hareketine benzer katılık ve bradikinezi gibi motor özelliklere dayanır, ancak kabızlık, depresyon, hiposmi, yorgunluk, bunama ve REM uyku davranış bozukluğu gibi motor olmayan özellikler motor özelliklerden yıllar önce ortaya çıkabilir. Hastalığın sonraki aşamalarında, otonomik disfonksiyon, ağrı ve bilişsel gerileme gibi ek motor olmayan özellikler ortaya çıkabilir (Robea ve ark., 2020, Simon ve ark., 2020). Düşme genellikle hastalığın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkar (Hayes, 2019). Anosmi (koku alma duyusunun kaybı) PH’de hastaların %90 kadarında görülür ve semptomlardan yıllar önce ortaya çıkabilir. Disotonomi, neredeyse tüm Parkinson hastalarında mevcuttur ve kabızlığı (aynı zamanda çok erken bir semptom) içerir. Artan sıklık ve aciliyet gibi üriner şikayetler yaygındır. Erken tedavi edilmemiş Parkinson hastalarında yapılan bir çalışma, incelenen hastaların %84’ünde depolama fazında anormal üriner fonksiyon göstermiştir (Hayes, 2019).

PH'nin nöropatolojik ayırt edici özellikleri, SN'deki dopaminerjik nöronların, LC'lerin ve Lewy nöritleri olarak isimlendirilen intranöronal protein kümelerinin dejenerasyonudur. SN dopaminerjik nöronların %50-70'inin, klinik motor semptomların ortaya çıkmasına kadarki zaman diliminde yitirildiği bilinmektedir. Bununla beraber, daha yeni çalışmalarda SN'deki nöronların kaybının aksine, bazal gangliyonlardaki dopaminerjik terminallerinin kaybının motor semptomların ortaya çıkması için çok önemli olduğunu gösterilmektedir. Dahası, PH diğer beyin bölgelerinde daha yaygın patoloji ile karakterizedir ve bu durum dopaminerjik olmayan nöronları da içermektedir. (Simon ve ark., 2020).

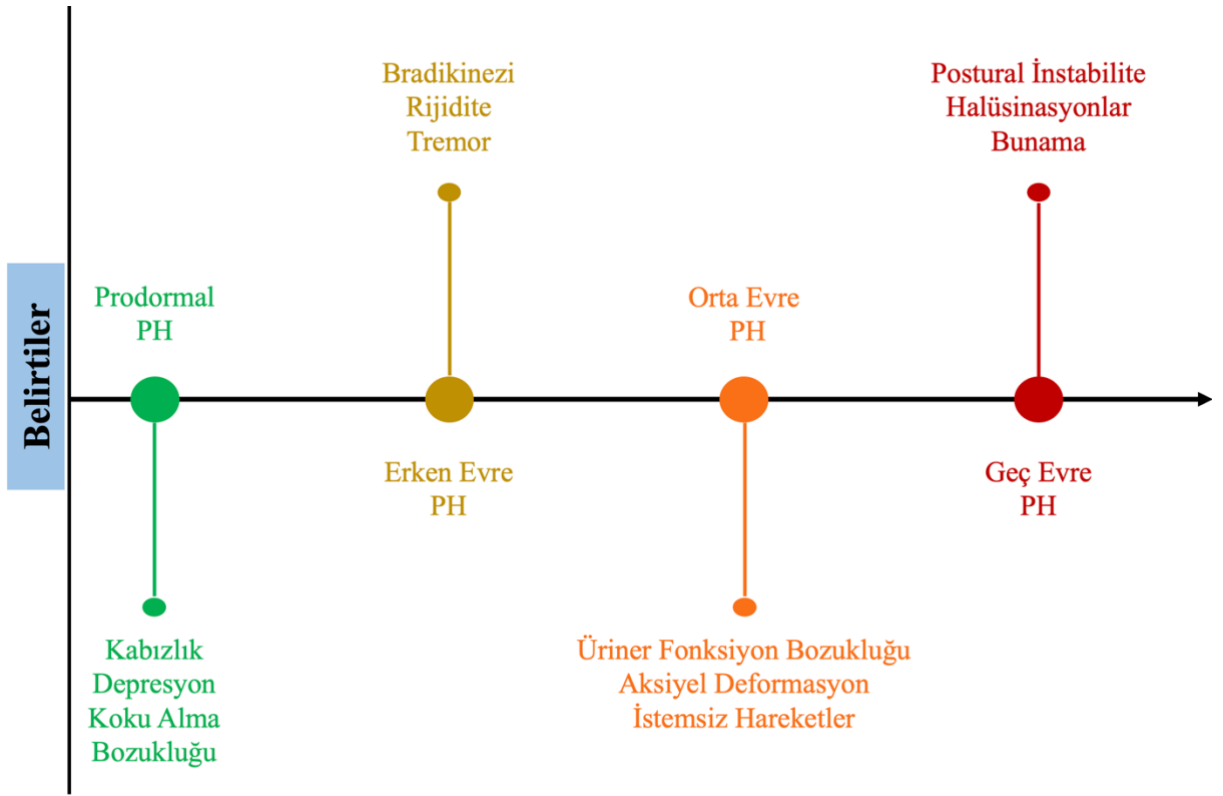
4.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri

PH tanısında ana sorunlardan biri, her hastanın belirti, şiddet ve ilerlemesi kendine özgü olmasıdır (Váradi, 2020). PH'nın klinik belirteçleri duruş ve yürümedeki değişikliklere ek olarak bradikinezi, istirahat tremoru ve rijidite ile karakterize bir motor sendromdur. Motor bozukluklar, günlük yaşam aktivitelerinde bozulmaya ve yaşam kalitesinde azalmasına neden olur. PH bir hareket bozukluğu olarak kabul edilse de, hemen hemen bütün hastalarda hipozmi (koku alma bozukluğu), depresyon, kabızlık, üriner fonksiyon bozukluğu, ortostatik hipotansiyon, hafıza kaybı, ağrı ve uyku bozuklukları gibi çeşitli motor olmayan semptomlar da görülür. PH'nin klasik motor belirtileri nigral dejenerasyon ile ilişkili iken, motor olmayan belirtiler periferik otonom sinir sistemi dahil olmak üzere diğer yapıların nörodejenerasyonu ile ilişkilidir. Motor olmayan belirtiler erken evrelerde sık görülür ve bazı hastalarda yoğun olarak hissedilmesine rağmen çoğunlukla hafif başlar ancak hastalık ilerledikçe şiddeti arttığı gösterilmiştir. Hastalık ilerledikçe motor olmayan belirtiler de ilerlediğinden hastanın yaşam kalitesi düşmekte ve bakımı zorlaşmaktadır. Özellikle hastaneye yatış, hastalığın ileri seviyelerinde görülen bilişsel gerileme ve halüsinasyonlar ile artış göstermektedir (Tolosa ve ark., 2021). Bunun yanı sıra mevcut tedavilerin semptomatik olması ve hastalık tanımlandıktan sonra hastalığın ilerleyişini durdurmak için bir stratejinin bulunmaması diğer bir zorluktur (Váradi, 2020).



Şekil 1: PH’da motor ve motor olmayan belirtiler

Koku kaybı veya kabızlık motor olmayan belirtiler, motor belirtilerin ortaya çıkmasından yıllar önce ortaya çıktığı gösterilmiştir (Şekil 2). Bu belirtilerin ortaya çıktığı dönem, PH’nın prodromal fazı olarak adlandırılmıştır ve nörodejeneratif değişikliklerin alt beyin sapı, olfaktöri pulp ve traktlar ve periferik otonom sinir sistemi gibi ektranigral bölgeleri içerdiği hastalık aşamasına karşılık gelir (Tolosa ve ark., 2021).



Şekil 2: PH'da klinik belirtilerin ortaya çıkma zaman çizelgesi

4.2.1. Bradikinezi

PH'nin en karakteristik birincil motor belirtisidir ve yavaş hareket, azalan genlik ve SN'deki azalmış nöronal yoğunluk nedeniyle problemler motor kontrol ile tanımlanır. Bu belirtiyi gösteren hastalar yürütücü kaslara yeterli enerjiyi sağlayamadıklarından hızlı hareketleri gerçekleştirmekte zorlanırlar (Váradi, 2020).

4.2.2. Tremor

PH'nin en rahat tanınan özelliklerinden biri, esas olarak ekstremitelerde kas kasılması ve gevşemesi olarak gerçekleşen ancak dudaklara ve çeneye yayılabilen istirahat tremorudur. Parkinson hastalarında, yerçekimine karşı uzanmış yatay bir pozisyon olan bir postural titreme de tarif edilmiştir. Postural tremor, istirahat tremorundan daha belirgin bulunmuştur ve PH'nin ilk belirtilerinden biri olabilir. Bu iki tremorda dopaminerjik tedaviye yanıt verir. Erken yaşta esansiyel tremorun, PH gelişiminde potansiyel bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Váradi, 2020).

4.2.3. Rijidite

PH'nin ikinci en yaygın görülen birincil motor belirtisi olmasıyla beraber uzuvların, boyun veya gövdenin bükülmemesi olarak tanımlanır. Rijiditede kas sertliği ve gevşeme kapasitesinin

olmaması sebebiyle hareket etme sınırlı olmaktadır (Váradi, 2020). Artan kas tonusu, eşlik eden bir titreme ile kesintiye uğradığında, dişli çark sertliği adı verilen mandal benzeri bir direnç kalitesi hissedilir (Tolosa ve ark., 2021). Dopaminerjik tedaviye yanıt vermektedir (Váradi, 2020).

4.2.4. Postural instabilite

Postural reflekslerin kaybının ana belirtisidir ve genellikle geç evrede ortaya çıkar. PH hastalarının düşme ve kalça kırıkları oluşmasına sebep olan esas sorumlu belirtidir. Dopaminerjik tedaviye cevap vermez (Váradi, 2020).

4.2.5. Koku alma bozukluğu

PH ile bağlantılı koku alma bozukluğu 1975’de Ansari ve Johnson tarafından tanımlanmıştır. O zamandan bu yana PH için erken bir belirti olarak geniş çapta kabul görmüştür. PH hastalarının %80’den fazlası etkilenir ve bu da hastalığın prodromal belirtici olduğunu düşündürür. Olfaktöri reseptör nöronları, algılanan kokuları, nörodejenerasyona karşı zayıflıkları olan uzun miyelinsiz aksonlar aracılığıyla sinir sistemine bir elektrik sinyali olarak iletir. Braak evrelemesine göre, 1. evrede α -sinüklein inklüzyonu ve buna karşılık gelen LC patolojisi koku pulpunda başlar, bu da koku alma kaybının sadece PH’nin prodromal belirtisi olmadığını, aynı zamanda motor belirtilerden önce oluşan nörodejeneratif hasarın ilk belirtici olabileceği düşünülmüştür. Böylece erken safhada belirlenebilirse nörodejenerasyonu inhibe etmek veya yavaşlatmak için potansiyel tedaviler geliştirilebilir (Váradi, 2020).

4.2.6. Kabızlık

PH hastalarının %60’ından fazlasını etkileyen daha az sıklıkta ve/veya daha zor bağırsak hareketlerinin bir sonucudur. Birçok nedenden kaynaklanabildiği gibi α -sinüklein birikimi ile de ilişkilidir. Üriner disfonksiyon kronik kabızlıktan da kaynaklanabilmekle beraber PH’de genellikle potansiyel bir risk faktörü olarak kabul edilir (Váradi, 2020).

4.3. Parkinson Hastalığının Heiko Braak’a Göre Evreleri

Heiko Braak tarafından PH’da hastalığın ilerleyiş evreleri belirtilmiştir. Altı evreden oluşmaktadır.

4.3.1. Birinci evre

Motor vagus liflerinin sonlandığı bir bölge olan gastrik miyenterik pleksusta anormal α -sinüklein birikmesine dair kanıtlar vardır. Hastalığın erken evresindeki hastaların kolonunda

yanlış katlanmış α -sinüklein birikimleri bulunmuştur. Motor vagus sinirinde, dorsal medulladaki çekirdeğinde, olfaktöri pulpında ve anterior koku alma çekirdeğinde benzer birikimler mevcuttur. PH'de erken evrede görülen enterik sinir sistem patolojisi durumunda premotor fazda belirti olarak kabızlık gözlenir. Hastalığın premotor ve yerleşik fazlarında koku alma bozukluğuna dair kanıtlar vardır (Hawkes ve ark., 2010).

4.3.2. İkinci evre

Burada coeruleus/subcoeruleus kompleksi (CSC), retiküler oluşumun magnoselüler kısımları ve arka raphe çekirdeklerinin tutulumu vardır. Magnoselüler retiküler ve arka raphe çekirdekleri, hafıza ve öğrenmede rollere sahiptir. CSC'nin işlevi çeşitlidir ve gıda alımının kontrolü, uyanıklık, uyku-uyanıklık döngüsü ruh hali ve duyuşsal uyaranlara davranışsal tepkiler önemlidir. CSC'deki işlev bozukluğu obeziteye neden olabilir. PH'nin klinik fazındaki depresyon iyi tanımlanmıştır. Depresyonun resmi teşhisten ortalama 2-10 yıl önceye dayanan bir premotor belirti olduğu doğrulanmıştır. CSC ve retiküler çekirdeklerdeki patoloji düzensiz uyku alışkanlığının temelini oluşturabilmektedir. (Hawkes ve ark., 2010).

4.3.3. Üçüncü evre

Bu evrede, 1.evrede tanımlandığı gibi hastalığın tipik özellikleri olan bradikinezi, rijidite ve tremor ortaya çıkar. Lewy patolojisi artık SN, pedunkulopontin tegmental çekirdeğin kompakt kısmı ve amigdalanın merkezi subnükleusunu içermektedir. Substantia nigra'da en az %50 nöronal kayıp olduğunda, tipik motor belirtilerin ve PH belirtilerinin başladığı ileri sürülmektedir. Meynert çekirdeğinin lezyonları, yaygın kolinergik kortikal dağılımı göz önüne alındığında, düzensiz davranışsal hafıza, bunama veya ilaca bağlı halüsinasyonlarla sonuçlanabilir (Hawkes ve ark., 2010).

4.3.4. Dördüncü evre

Lewy patolojisi birden fazla ek bölgede gelişir. Bu evreye kadar patoloji çok yayılmıştır ve klinik koralasyonları tahmin etmek zordur. Talamik intralaminar çekirdeklerdeki hasar, PH'nin bilişsel, duyuşsal ve otonomik semptomlarına katkıda bulunabilir. Amigdala ve medial temporal lobdaki hastalık hafıza, duygu ve koku alma bozukluğuna katkıda bulunabilir (Hawkes ve ark., 2010).

4.3.5. Beşinci evre

Lewy patolojisi 1-4. evrelerde zaten hastalıklı olan bölgelerde daha yoğun hale gelmiştir. Kalp atış hızını, kan basıncını, solunumu ve gastrointestinal motiliteyi düzenleyen alanlar da Lewy

patolojisinden etkilenmiştir. Bu evrede sık düşme ve denge bozuklukları görülür. Tat alma bozukluğu görülmektedir (Hawkes ve ark., 2010).

4.3.6. Altıncı evre

Son patolojik bölümde Lewy patolojisi birinci dereceden duyuşal bağlantı alanlarında, neokorteksin premotor alanlarında ve birincil motor ve duyuşal alanlarda bulunur. Otonomik, limbik ve somatomotor sistemlerde önceden var olan hasar artık üst limbik sistem merkezlerini bozulmasıyla birleşir. Hastanın nöropatoloji ciddileşir ve artık ciddi şekilde demanslı ve hareketsiz olabilir, günün çoğunu sandalyede ya da yatağına bağılı şekilde geçirir (Hawkes ve ark., 2010).

4.4. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi

PH'nin nöropatolojik bir özelliğı, LC olarak adlandırılan nöronal protein kümeleridir. LC'leri, ana bileşen olarak α -sinüklein (SNCA) içeren protein agregatları ile birlikte veziküler membran yapılarından ve dismorfik organellerden oluşur (Koeglsperger ve ark., 2023). PH, SNCA'nın anormal birikimi ve ardından LC oluşumuna yol açan hücre içi agregasyon nedeniyle bir sinükleiopati olarak tanımlanır (Váradı, 2020). Ölüm sonrası çalışmalar, LC'lerin kademeli olarak ortaya çıkmasının PH'nin ilerlemesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. PH öncelikle koku alma pulpunda ve otonom enterik sinir sisteminde başlar, LC'ler zamanla yayılarak dopaminerjik nöronların ölümünün başladığı SN'ye ulaşır. Bu sebeple, LC'ler hastalığın ilerlemesi için bir belirteç olarak kabul görürken, nöronal kayıp, klinik PH belirtilerinin iyi tanımlanmış bir nöropatolojik bağıntısıdır (Koeglsperger ve ark., 2023). Mitokondrinin kodlama bölgesindeki mutasyonların, bozulmuş α -ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinde, kompleks 1 kusurlarında, artan mitokondriyal işlev bozukluğunda ve oksidatif strese eksprese olduğu bulunmuştur. Değıştirilmiş proteoliz, ubiquitin-proteazom ve lizozom fonksiyon bozukluğuna bağılı olarak nörodejenerasyona sebep olan potansiyel bir moleküler özellik olarak tanımlanır. Azalmış ısı şok proteini 70 ve lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A ekspresyonu PH'de bulunur, bu da değışmiş proteosomal ve lizozomal aktiviteyi düşündürmektedir (Váradı, 2020)

4.5. Parkinson Hastalığı Gelişmesinde Rol Alan Genler

PH'nın tam nedeni bilinmemektedir. İlk ikiz çalışmalarında, çift yumurta ikizlere kıyasla tek yumurta ikizlerde PH açısından hafif bir değışim gösterdi ve PH'nin sadece edinilen bir durum olduğu sonucuna götürmüştür. Bununla birlikte, tek bir gen mutasyonuna bağılı ailesel bir PH formunun keşfi ve daha sonra yapılan ikiz çalışmalarla hem genetik hem de çevresel katkıları

olan karmaşık bir hastalık olarak mevcut PH paradigmasına yol açmıştır. Ailede PH öyküsü varlığı, PH riskini 3-4 kat artışa sebep olur, bu da paylaşılan genetik ve çevresel faktörlerin sporadik PH riskine önemli bir etkisi olduğunu gösterir (Day ve Mullin, 2021).

PH vakalarının yaklaşık % 5-10'unda, otozomal dominant (SNCA, lösine zengin tekrarlayan kinaz 2 (LRRK2) ve boşluklu protein sıralama ortoloğu 35 (VPS35)) ve resesif (PRKN, PTEN kaynaklı kinaz 1 (PINK1), Daisuke Junko 1 (DJ-1)) formlar dahil olmak üzere monojenik kalıtım formlarına sahip olduğu görülmektedir (Gialluisi ve ark., 2021).

Diğer yandan, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), bireysel olarak PH gelişme riskine küçük de olsa katkıda bulunan çok sayıda ortak genetik varyant tanımlamıştır (Day ve Mullin, 2021). Bir dizi lokus ve gen, Mendel tarzında PH fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir ve orijinal olarak kronolojik keşif sırasını temsil eden sayı ile bir “PARK” lokusu olarak adlandırılmıştır. Numaralandırılmış lokuslar yerine gen isimleri kullanılmaktadır ancak bir önceki terminolojinin farkında olmak önemlidir. Yüksek penetrasyona sahip varyantlar çok nadirken, değişken penetrasyona sahip varyantlar dünya çapında özellikle belirli popülasyonlarda daha yaygındır (Day ve Mullin, 2021). PH ile ilgili bazı önemli genler hakkındaki bilgiler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 1: PH'da etkili olduğu düşünülen bazı önemli genler ve zebra balığı ortologları (Day ve Mullin, 2021), (<https://zfin.org/search?category=Gene+%2F+Transcript&q=> Erişim Tarihi: 17 Haziran 2023)

Sembol	Genin Adı	PARK Kodu	Zebra Balığı Ortoloğu	Kalıtım
SNCA	α -sinüklein	PARK1/PARK4	Yok	OD
PRKN	Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligaz	PARK2	<i>prkn</i>	OR
UCHL1	Ubiquitin karboksi terminal esteraz L1	PARK5	<i>uchl1</i>	OD
PINK1	Pten kaynaklı kinaz 1	PARK6	<i>pink1</i>	OR
DJ-1	Parkinsonizm ilişkili degligaz	PARK7	<i>dj-1</i>	OR
LRRK2	Lösine zengin tekrarlayan kinaz 2	PARK8	<i>lrrk2</i>	OD
ATP13A2	ATPaz katyon taşıyan 13A2	PARK9	<i>atp13a2</i>	OR
VPS35	Boşluklu protein sıralama ortoloğu 35	PARK17	<i>vps35</i>	OD
DNAJC6	Dnaj homolog alt aile C üye 6	PARK19	<i>dnajc6</i>	OR

4.5.1. Alfa sinüklein

K      bir protein olan SNCA 140 amino asitten oluşur. SNCA, vezik  l trafiği, vezik  l hazırlanma ve ba lanması, vezik  l füzyonu ve nörotransmitter salınımı ve aksona ta ınımında görev alır ancak normal beyinde işlevi hala tam olarak aydınlatılmış değildir. SNCA mutasyonları, PH'nın nadir bir nedeni olmasına rağmen, SNCA'nın PH patojenezindeki önemli rolü artık açıkça kabul edilmektedir. Proteinin toksisitesi, aşırı miktarda vahşi tip, patojenik mutasyonlar ve dopamin tarafından modifikasyonu ile gösterilmiştir. Daha  nemlisi, SNCA, PH'nın patolojik belirtileri olan LC'lerin ve Lewy n ritlerinin ana bileşenidir (Jankovic ve Tan, 2020). SNCA beyinde yüksek oranda eksprese edilir ve ağırlıklı olarak nöronların presinaptik terminallerinde lokalizedir. Agregatları, özellikle toksik olan fibril formu ile merkezi sinir sistemi içine yayılabilir (Day ve Mullin, 2021).

SNCA genindeki ilk yanlış anlamlı mutasyon (ekson 4'te A53T), 1997'de PH'nin otozomal dominant kalıtımını gösteren bir İtalyan ailede tanımlandı. Farklı PH klinik çalışmalarında SNCA geninde A30P, E46K, G51D, H50Q ve A53E gibi yanlış anlamlı mutasyonlar bildirildi. Bu tür mutasyonlar, erken başlangıçlı PH ile ilişkili olup tipik motor semptomlar gözlenirken Levodopa (L-DOPA) tedavisine iyi yanıt gözlenmiştir (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023).

SNCA'nın iki paralogu daha vardır. Bunlar  -sinüklein (SNCB) ve  -sinüklein (SNCG)'dir. Zebra balıkları SNCA geninin ekspresyonundan yoksundur. Ancak zebra balıklarında diğer sin kleinlerin gen ekspresyonları bulunmaktadır. Bunlar  -sinüklein,  1-sinüklein (*sncg1*) ve  2-sinüklein (*sncg2*)'dir. Son yapılan çalışmalarda *sncg1* geninin insanda bulunan SNCA ile benzer fonksiyonlara sahip olduğu bildirilmiştir (Razali ve ark., 2021).

4.5.2. Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligaz

PRKN, mitokondriyal yapının ve DNA bütünlüğünün korunmasında rol alır (Day ve Mullin, 2021). Parkin (PRKN), SNCA ve diğer substratların yıkımında görev alan bir E3 tipi ubiquitin ligazdır. PRKN'deki mutasyonlar, E3 aktivitesini bozarak, SNCA'nın birikmesine ve SN'deki nöronların seçici ölümüne yol açar. PRKN genindeki iki allelinden sadece birindeki mutasyon sonucu oluşan fonksiyon kaybının PH yatkınlı ını arttırmak için yeterli oluşu ve ayrıca otozomal dominant kalıtımına yol açabileceği gözlenmiştir. Gözlemlenen mutasyonlar, PRKN'nin 12 eksonun her birinde bulunmuştur ve nokta mutasyonları, delesyonlar ve dublikasyonları içermektedir (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023). PRKN, en yaygın otozomal resesif PH ile ilişkili gendir. PRKN için bileşik heterozigotlar, erken başlangıçlı Parkinson hastalarının yaklaşık %50'sini oluşturur (Jankovic ve Tan, 2020). PRKN mutasyonları olan

hastalar, tipik PH motor semptomları gösterir ve L-DOPA'ya sürekli bir yanıt verir. Hastalık genellikle yavaş ilerler (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023).

4.5.3. PTEN kaynaklı kinaz 1

PRKN'den sonra otozomal resesif PH için görülen en sık ikinci gen PTEN kaynaklı kinaz 1 (PINK1)'dir. PINK1 2004 yılında İtalya Sicilya'daki ailelerin genetik analizlerinde keşfedilen bir PH genidir. Sonraki çalışmalar PH ile ilişkili birçok varyantını ortaya çıkarmıştır. PINK1 ve PRKN iş birliği yaptığı ve mitokondriyal kalite kontrolünde görev aldığı bilinmektedir (Funayama ve ark., 2023). Gen boyunca nokta mutasyonları, çerçeve kayması mutasyonları ve kesik mutasyonlar rapor edilmiş ve bunların reaktif oksijen türlerine (ROS) ve diğer stres türlerine karşı duyarlılığı artırabilecekleri ve böylece PH'ye yol açabilecekleri varsayılmaktadır (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023).

PINK1 anti-inflamatuar bir role sahip olabilecek mitokondri ile ilişkili bir kinazdır. PRKN, PINK1 ve DJ1 ubiquitin-proteazom sistemi içinde etkileşime girdiğini ve mitokondriyal yapının korunmasında rol aldığı gösterilmiştir (Day ve Mullin, 2021). PINK1, seçici otofajik yoluyla işlevsiz veya gereksiz mitokondrilerin spesifik olarak ortadan kaldırılmasını düzenleyerek mitokondriyal ağı ayarlayarak ve enerji metabolizmasını koruyarak mitokondriyal işlev bozukluğuna ve apoptoza karşı nöroprotektif bir görev üstlenir (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023). PINK1, hasar ya da fonksiyon bozukluğunun neden olduğu mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmaya yanıt olarak mitokondri dış membranında birikir. Buna karşılık, bu, PRKN'i sitozolden mitokondri dış membranına hareket ettirir. E3 aktivitesi mitokondriyal proteinlerin her yerde bulunması sebebiyle mitokondriyal bozulmaya yol açarak mitofajiyi destekler. Hasarlı mitofaji ve PINK1/PRKN sinyali, Alzheimer hastalığı (AD), PH ve glokom dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda mevcuttur (Quinn ve ark., 2020).

4.5.4. Parkinsonism ilişkili deglikaz

Parkinsonism ilişkili deglikaz diğer isimlendirmesi ile Daisuke Junko 1 (DJ-1), fizyolojik koşullar altında her yerde eksprese edilen ve dimerik olan, 189 amino asitlik küçük, yüksek oranda korunmuş bir proteindir. İlk kez 2003 yılında PH'nın erken başlangıçlı, ailesel formlarıyla bağlantılı olan PARK7 geni tarafından kodlanır (Repici ve Giorgini, 2019). DJ-1 için bildirilen mutasyonlar, homozigot veya bileşik heterozigot durumda bulunan yanlış anlamlı mutasyonlar, tam ekson silinmesi, çerçeve kayması mutasyonları ve bir ek yer mutasyonudur (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023)

DJ-1, iki mitokondri ayırma proteinin (UCP4 ve UCP5) ekspresyonunu artırarak mitokondriyi oksidatif strese koruyan, böylece mitokondriyal membran potansiyelini azaltan ve ayrıca ROS üretimini baskılanmasını sağlayan bir transkripsiyon düzenleyicisidir. Bu sayede bir takım mitokondriyal işlevi optimize eder ve nöronal hücre sağ kalımını destekler. DJ-1 oksitlendikten sonra, SNCA için bir şaperon görevi görerek fibrilasyonu ve birikimi önler (Paccosi ve Proietti-De-Santis, 2023). DJ-1 esas olarak mikroglia, astrositler ve nöronlar tarafından eksprese edilir. Ağırlık olarak sitozolde bulunsa da, çekirdek ve mitokondri ile de ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda pestisitlerin bazılarını DJ-1 inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Bu durum ROS birikmesine ve PH gelişmesine katkıda bulunur. DJ-1 mutasyona uğradığında metal bağlama özelliğini de yitirebilir ve bu durum ağır metallerin toksisitesine karşı nöronları hücreleri savunmasız bırakabilir (Lind-Holm Mogensen ve ark., 2023).

Klinik olarak, DJ-1 mutasyonları olan Parkinson hastalarında erken başlangıçlı diskinezi, rijidite ve titreme görülür, bunu daha sonra psikiyatrik belirtiler izler ve genellikle L-DOPA tedavisine iyi yanıt verir (Repici ve Giorgini, 2019).

4.5.5. Lösince zengin tekrarlayan kinaz 2

Lösince Zengin Tekrarlayan Kinaz 2 (LRRK2) bir ROC (Kompleks Ras) GTPaz, bir COR (ROC'un C terminali) ve bir kinaz alanının bulunması ile karakterize edilen, ROCO protein ailesine ait büyük bir proteindir (Rivero-Ríos ve ark., 2020). Dardarin olarak da adlandırılan büyük bir protein (2527 amino asitten oluşur.) olan LRRK2, veziküler trafiği, otofajik, protein sentezi ve hücre iskeleti işlevinde rol alır, ayrıca mitokondriyal proteinler ile etkileşir ve bağışıklık sisteminde de yer alabilir. LRRK2, striatuma yüksek oranda eksprese edilir, ayrıca makrofaj ve mikroglia, inflamatuvar yolları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Jankovic ve Tan, 2020). LRRK2 ilgili çalışmalarda Rab proteinleri ile ilişkisi tanımlanmıştır. Rab GTPaz'lar tüm hücre içi veziküler trafik için kilit oyuncular (Rivero-Ríos ve ark., 2020).

LRRK2 en yaygın otozomal dominant PH ile ilişkili genlerdir ve yaşa bağlı penetrasyon ile hem ailesel hem de sporadik PH'de yaygın bir mutasyon (G1019S) tanımlanmıştır. G2019S mutasyonu, çoğu Kafkas popülasyonunda sporadik PH'nin %1-3'ünü ve %3-4'ünü ailesel PH'dan ve Kuzey Afrika Berberileri, İber ve Aşkenaz Yahudileri popülasyonlarında %40'a kadarından sorumludur (Jankovic ve Tan, 2020).

LRRK2'li PH'nin klinik fenotipi L-DOPA'ya iyi yanıt verir. GWAS'ta sporatik PH ve LRRK2 lokuslarının ~%1'inde LRRK2 yanlış anlamlı varyantlarının tanımlanması LRRK2'nin idiyopatik PH'da önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Day ve Mullin, 2021). Patoloji

oldukça heterojendir. LC'leri içerebilir veya içermeyebilir ve sinükleinopati ve tauopatilerle örtüşebilir (Jankovic ve Tan, 2020).

4.6. Parkinson Hastalığı ile İlişkili Mekanizmalar

PH'nin belirtilerinin başlangıcında, putamen dopamin ~%80 oranında tükenir ve SN'de dopaminerjik nöronların ~%60'ı zaten kaybedilmiş olur. Genel olarak PH'nin nöropatolojisinin yalnızca dopaminerjik nöron kaybı ve dopamin tükenmesi ile karakterize edildiği düşünülmektedir, ancak nörodejenerasyon dopaminerjik nöronların çok ötesine uzanır. Epidemiyoloji, genetik, ölüm sonrası analiz, *in vitro* ve *in vivo* modelleme çalışmaları, PH altında yatan mekanizmaları önemli ölçüde ortaya çıkarır. Protein homeostatik bozuklukları ve mitokondriyal işlev bozuklukları SN'da nöronal kaybın altında yatan birincil nedenlerdir. Ek olarak, patojenik genetik mutasyonlar, dopamin düzensizliği, nöroinflamasyon, oksidatif stres ve otofaji bozuklukları PH gelişimine katkıda bulunurlar (Raza ve Anjum, 2019, Zeng ve ark., 2018b).

4.6.1. Mitokondri fonksiyonun bozulması ve oksidatif stres

Mitokondriyal bozukluklar, PH dahil olmak üzere hemen hemen bütün nörodejeneratif hastalıklarda ilişkilendirilmiştir (Zeng ve ark., 2018b). Ölüm sonrası insan beyninin histolojisi mitokondriyal işlev bozukluğunun belirtilerini ortaya koymaktadır (Raza ve Anjum, 2019). PH ile ilişkili mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal biyogenezin bozulması, artan ROS üretimi, kusurlu mitofaji, hasarlı çalışan trafik, elektron transport zinciri fonksiyon bozukluğu, mitokondriyal dinamiklerdeki varyasyonlar ve kalsiyum (Ca^{2+}) dengesizliği gibi nedenden kaynaklanabilir. Hücre bu durumlarla baş edemez ise hücre bozulmaya ve nihayetinde hücrenin ölümüne yol açacaktır (Prasuhn ve ark., 2021).

PH modellerinde mitokondriyal kompleks 1 aktivitesinin kaybıyla indüklenen dopaminerjik nöronların dejenerasyonu klinik öncesi araştırmalarda gösterilmiştir. Kompleks 1 inhibitörleri (1-Metil-4 fenil-1,2,3,4-tetrahidropridin (MPTP), rotenon gibi), hayvan modellerinde PH özelliklerini gözlenir ve dolayısıyla PH sebeplerini ortaya çıkarmak için bir fırsat yaratırlar. Dopaminerjik nöronlar, mitokondriyal ROS'a karşı hassastır. Memelilerde ROS üretiminin ana merkezi mitokondridir ve üretimi esas olarak kompleks 1'deki elektron sızıntısı ile başlar. Moleküler oksijenin (O_2) tek bir elektron almasıyla süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) kısmi indirgenmesi ve sonrasında demir katalizli Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşumuna ya da peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna yol açar. Süperoksit radikali, süperoksit

dismutaz 2 tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Sonrasında H_2O_2 homeostazını korumak adına katalaz enzimi yardımıyla H_2O ve O_2 'e parçalanır (Raza ve Anjum, 2019).

İdiyopatik PH hastalarının SN'sında mitokondriyal DNA transkripsiyon faktörlerinin (TFAM ve TFB2M) ifadesi azalmıştır. Bir lipid peroksidasyon ürünü olan 4-hidroksinonenal, hücre içi birikimi, toksik SNCA içeren veziküllerin hücre dışına çıkışı ve komşu nöronun hücre içine alımını teşvik eder ve PH'de nörodejenerasyon gelişimiyle sonuçlanır (Zeng ve ark., 2018b).

4.6.2. Nöroinflamasyon

İnflamasyon, konakçıyı hasara neden olan ajanlardan korumayı ve doku onarımını desteklemeyi amaçlayan, patojenik uyarılara ya da doku yaralanmasına karşı üst düzeyde düzenlenmiş bir mekanizmadır (Pajares ve ark., 2020). Beyindeki yerleşik makrofajlar olarak mikroglialar, hücre dışı matriksindeki değişiklikler de dahil olmak üzere fonksiyonu bozulmuş nöronlar tarafından üretilen hücre hasar sinyallerine son derece duyarlıdır. Bu sinyaller mikrogliaların aktive olmasını sağlayacak ve birikintileri temizlemek için fagositik özelliğini aktive edecektir (Rocha ve ark., 2018). Fizyolojik koşullar altında, mikrogliya ve astrogliya, nörotrafik faktörleri serbest bırakarak, sinaptik glutamati uzaklaştırarak ve sinapsları yeniden şekillendirerek merkezi sinir sisteminin homeostazını korumak gibi görevler ile beyin parankimini sürekli olarak denetler. Bu glial hücreler kalıcı nöroinflamasyona yol açan, hasarlı nöronlardan ya da protein agregatlarından salgılanan faktörler gibi patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'lar) ve hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMP'lar) tarafından aktive edilebilirler. PH'nın her vakasında başlatıcı bir faktör olmasa da kronik inflamasyon hastalığının ilerlemesi için bir kofaktör gibi görünmektedir (Pajares ve ark., 2020).

Bazı proinflamatuvar sitokinlerin, PH hastalarının hem beyin omurilik sıvısında hem de ölüm sonrası beyinde upregüle olduğu belirtilmiştir. Çalışmalarda mikrogliaların MPTP ve rotenon gibi nörotoksinlerin etkisi ile aktive olduğu bildirilmiştir. Aşırı SNCA eksprese eden bir fare modelinde tümör nekroz faktörü α (TNF- α), interleokin 1β (IL- 1β) ve interferon γ (IFN- γ)'nin upregüle olduğu ve buna mikrogliya aktivasyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir. PINK1 eksikliği, nöronlarda doğuştan gelen bağışıklığın erken bir modülatörü olarak hizmet eder, çünkü PINK1/PRKN mitokondriyal antijen sunumunu inhibe ederek bağışıklığın cevabı tetikleyen inflamatuvar yolunu baskılayabilir (Zeng ve ark., 2018b).

Gliosiz, birçok nörodejeneratif hastalığın tipik bir patolojik özelliğidir ve ortaya çıkan kanıtlar mikrogliya ve astrositlerin sürekli aktivasyonunun PH'de dopaminerjik nöron dejenerasyonunun merkezinde olduğunu göstermektedir. Hayvan modellerindeki sonuçlar, PH'de ölüm sonrası

beyinlerde görülen mikrogliya aktivasyonu ve sitokinler gibi proinflatuar aracının upregüle olduğunu doğruladı (MacMahon Copas ve ark., 2021).

4.6.3. Otofaji

Otofaji yolağı, toksisiteyi ve hücre ölümünü önlemek için ökaryotik hücrelerde uzun ömürlü proteinlerin ve fonksiyonu bozulan organellerin zamanında ortadan kaldırılması için gereklidir. SNCA ve tau proteinlerinin birikmesi otofajik-lizozomal bozulmanın bir sonucudur. Dopaminerjik nöronlar, yüksek mitokondriyal enerji talebi ile metabolik olarak çok aktiftir ve bu nedenle, hasarlı mitokondrilerin yetersiz temizlenmesine karşı özellikle savunmasızdır. Hasarlı mitokondri birikimi, etraftaki sağlıklı mitokondriler için zararlı olan ROS düzeyini arttırdığından hastalığın ilerlemesine ve hızlanmasına sebep olabilirler. Memeli hücrelerinde üç farklı otofajik sınıfı mevcuttur; makrotofaji, şaperon aracılı otofajik, mikrotofaji. Ana otofaji makrotofajidir ve seçici olmayan ve seçici olan otofajik olarak ikiye ayrılır (Hou ve ark., 2020).

Makrotofaji, enzimatik yıkım için lizozomlara gönderilmeden evvel organellerin ve sitozolik bileşenlerin zarlarla sarıldığı yüksek düzeyde korunmuş hücre içi süreçtir. Uyaranların alınması ve sonraki kaskat sinyalleri, süreci başlatmak için entegre olur. Otofaji, fagofor toplanma alanına alınan iki ana kompleks olan UN51 benzeri Ser/Thr kinazlar (ULK) kompleksi ve sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) tarafından başlatılır (Guo ve ark., 2018). Daha sonra fagofor hedef taşınacakların etrafına uzanarak onları sarar ve otofagozom oluşur. Yıkımı yapılacak organellerle yüklü olan otofagozom lizozom ile bütünleşir. Enzimatik hidrolizin ardından bozulan ürünler salınır ve bazı otofajik proteinleri geri dönüşümü sağlanır. Şaperon aracılı otofajik esas olarak nöronal olmayan hücre tiplerinde incelenirken, bu tip otofajideki fonksiyon bozukluğu, yaşlanma ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalık ile ilişkilidir. ATG8 homologlarına bağımlı olmayan ve vezikül oluşumunu içermeyen bir lizozomal proteoliz yoludur. Bunun yerine, katlanmamış proteinler, ısı şok proteini 70 aile üyeleri gibi moleküler şaperondan tarafından doğrudan lizozomlara yönlendirilirler. Şaperon aracılı otofajide iki önemli bileşen vardır biri lizozomla ilişkili zar proteini tip 2A (LAMP2A) ve KFERQ ya da KFERQ benzeri motiftir (Lizama ve Chu, 2021).

PH patolojisinde otofajik genellikle kusurlu ya da inhibe edilmiştir. PH gelişiminde nedensel bir mekanizma olarak gösterilmiştir. Otofajinin inhibisyonu, SNCA'nın salınımını ve hücre dışı veziküller ile hücreden hücreye aktarımını artırır. SNCA üzerindeki A53T ve A30P gibi patojenik mutasyonların lizozomal membran üzerindeki reseptörlere bağlanabileceğini ve şaperon aracılı otofajiyi inhibe ederek LC'lereinde anormal SNCA birikmesi ve ardından

parkinsonizme yol açabileceği gösterilmiştir. Böylece şaperon aracılı otofajik inhibisyonu, SN'de ilerleyici dopaminerjik nöron kaybına, striatumda dopamin seviyelerinde ciddi düşüş ve motor eksikliklere neden olur (Zeng ve ark., 2018b).

Kanonik otofajik genlerinin hiçbiri ailesel PH ile ilişkili olmasa da, hem genetik kanıtlar hem de ölüm sonrası çalışmalar PH'yi anormal otofajik özellikle makrotofaji, şaperon aracılı otofajik ve mitofaji ile ilişkilendirmiştir. Parkinson hastalarında SN'de şaperon proteini 70 ve reseptörü LAMP2A'nın tükendiği gözlenmiştir ve bu da şaperon aracılı otofajinin azaldığını göstermektedir (Themistokleous ve ark., 2023).

Lizozom inhibe edildiğinde SNCA seviyesi artmıştır, bu da SNCA yıkımı ile otofaji arasında yakın bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir. PINK1 ve PRKN mitokondriyi otofajik ile seçici olarak parçalamak için mitofajiyi koordine eder. Hasarlı mitokondri, çift zarlı otofagozom içinde iletilir ve hapsedilir, sonunda lizozom tarafından temizlenir (Guo ve ark., 2018).

4.6.4. Apoptoz

Apoptoz, bir tür programlanmış hücre ölümüdür. Bir apoptotik hücrenin sitomorfolojik özellikleri büzülme, kromozom yoğunlaşmasını ve DNA parçalanmasını içerir. Hemen hemen her LC pozitif nöronun aynı zamanda proapoptotik BAX boyası için de pozitif olduğu bulunmuştur, bu da fazla protein birikimi yüküne sahip nöronların apoptoz geçirdiğini düşündürmüştür (Chi ve ark., 2018).

Dopaminerjik nöron apoptozu, PH'nın patolojik ilerlemesindeki ana faktörlerden biridir. Son yıllarda, apoptozda rol oynayan yeni mekanizmalar bulunmuştur ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, sporadik ve ailesel PH patogenezinin çekirdeği olarak kabul edilmektedir. PINK1 susturulması ile yapılan model çalışmada, anormal mitokondriyal morfoloji, membran potansiyelinde azalma ve ROS üretiminde artış dahil olmak üzere çok çeşitli mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açarak dopaminerjik nöronların apoptoza duyarlı olmasına neden olabilir. Kronik oksidatif stres dopaminerjik nöron apoptozunda kritik bir faktördür ve SNCA birikimini indükeleyebilir ve dopaminerjik nöronların bozulmasına sebep olabilir. Böylece SNCA birikimi hücreler mikrogliaları aktifleyerek aşırı miktarda oksidatif ve proinflamatuvar molekül üretimi ile güçlü bir reaktif durum yaratabilir. Bu inflamatuvar durum, daha fazla dopaminerjik nöron apoptozunu beraberinde getirir (Zheng ve ark., 2022).

4.6.5. Lizozomal fonksiyon bozukluğu

Lizozomlar, asit hidrolazlar içeren hücre içi asidik keseciklerdir. Ana görevi, sitozolde yeni hücrel bileşenler oluşturmak amacıyla geri dönüştürme yoluyla hücre içi ve hücre dışı makromoleküllerin parçalanmasıdır. Hücre, hücrel homeostazı korumak için proteinleri, lipitleri, polisakkaritleri, karbonhidratları ve diğer molekül türlerini uygun şekilde ortadan kaldırmak ve geri dönüştürmek için lizozomları kullanır. Lizozomal fonksiyon, nöral homeostazın devam ettirilmesinde önemli bir role sahiptir ve buna bağlı olarak lizozomal fonksiyon bozukluğu, nörodejenerasyon ve özellikle PH ile ilişkilendirilmiştir. Lizozomal fonksiyon kapasitesi yaşlanmayla birlikte giderek azalır. Beta-glikoserebrosidaz (GBA), ATP13A2, lizozomal ilişkili membran proteini 1 (LAMP1) ve transmembran protein 175 (TMEM175) lizozomal genlerinde nadir varyantların varlığı ile PH ilişkisi bildirilmiştir. Oluşturulan modeller ile lizozomal genlerdeki yaygın ve nadir varyantların PH gelişimini etkileyen lizozomal fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir. PH hastalarının ölüm sonrası çalışmalarında bu fonksiyon bozukluğuna işaret eden analizler yapılmıştır. SN'de lizozomal tükenme ve LAMP2A, LAMP1 ve HSP70 dahil olmak üzere farklı lizozomal ilişkili proteinlerin seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir (Navarro-Romero ve ark., 2020).

SNCA oligomerik ara ürünleri lizozomlar tarafından parçalanır. GBA mutasyonları taşıyan indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden türetilen nöronlarda lizozomda SNCA birikimi ile birlikte azalmış GBA aktivitesi ve bozulmuş otofajik akış bulunmuştur. TMEM175 eksikliği stabil olmayan lizozomal pH'a, azalmış GBA aktivitesine ve mitokondriyal solunuma, bozulmuş otofagozom klirensi ve artmış fosforile olmuş SNCA agregatları ile sonuçlanmıştır. ATP13A2'nin eksikliği veya fonksiyon kaybı mutasyonları, bozulmuş lizozomal asitleşmesine ve yıkım kapasitesine neden olarak SNCA birikimine yol açar (Wang ve ark., 2018).

4.6.6. Ubikuitin-proteazom sistemi fonksiyon bozukluğu

Ubikuitin, ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) tarafından parçalanmak üzere hedef protein bileşenlerine kovalent ve ardışık olarak bağlanan, evrimsel olarak korunmuş bir 76 amino asitten oluşan bir proteindir ve ökaryotlarda yaklaşık %80 hücre içi proteinin parçalanmasından sorumludur. Protein ubikuitinasyonu, bir ubikuitin aktive edici enzim (E1 ligaz), konjuge enzim (E2 ligaz) ve E3 ligaz olmak üzere birkaç enzimin koordineli aktivitesi yoluyla gerçekleşir. Ubikuitinasyon sadece protein yıkımı için önemli değildir, aynı zamanda endositoz, protein-protein etkileşimi, hücre içi trafik, inflamatuvar sinyal, otofajik ve DNA onarımı gibi proteolitik olmayan fonksiyonlarda da görev alır. UPS, protein kalite kontrolünde ve yanlış katlanmış, kümelenmiş proteinlerin ortadan kaldırılmasında yer alır ve UPS'deki fonksiyon bozukluğu

nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Genetik kanıtlar göstermektedir ki ubikuitin E3 ligaz parkin (PARK2) ve deubikuitinasyon enzimi (UCHL1) kodlayan genlerde ailesel PH ile ilgili genetik varyasyonlar tanımlanmıştır. Ek olarak PRKN, katlanmamış protein bozunmasını düzenlemek için DJ-1 ve PINK1 ile bir E3 ligaz kompleksi oluşturabilir. Bu yüzden komplekteki her bir bileşendeki PH mutasyonu, E3 ligaz aktivitesini bozar (Zheng ve ark., 2016).

Bir çalışmada farelere sistemik olarak proteazom inhibitörü uygulaması yapılmış ve bunun motor bozukluklara ve PH'ye özgü patolojilere yol açtığı gözlemlenmiştir (McNaught ve ark., 2004). *In vivo* çalışmalarda, rotenon ve MPTP uygulamasından sonra azalmış proteazom aktivitesi bildirilmiştir (Lehtonen ve ark., 2019).

4.7. Parkinson Hastalığında Keton Cisimleri Metabolizması

İnsan beyni, normal beyin fonksiyonu için önemli miktarda enerjiye ihtiyaç duyar ve beyin toplam vücut ağırlığının yalnızca %2'sini oluşturmaya rağmen, dinlenme sırasında vücudun toplam enerji tüketiminin yaklaşık %20'sini kendisi kullanır. Beyin hücresel işlevlerini sürdürmek için yeterli ve sürekli bir enerji kaynağına ihtiyaç duyar. Beynin enerji tüketiminin çoğu glukoz oksidasyonu ile elde edilir ve ağırlıklı olarak iyon gradyanlarının korunması da dahil olmak üzere sinaptik iletimi desteklemek için kullanılır. Nöbetler, hareket bozuklukları ve kognitif bozukluklar gibi klinik belirtilerin glukoz transporter tip 1 (GLUT-1) eksikliğinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Beyin öncelik olarak ana kaynağı olarak glukozu tercih eder ancak özellikle açlık ve düşük karbonhidratlı diyetler sırasında glukoz arzı kısıtlandığında ya da yetersiz olduğunda, diğer substratlar metabolizmaya katkıda bulunabilirler. Laktat ile birlikte keton cisimleri, beyin için alternatif yakıtlardır ve her ikisi de endotel hücreleri ve astrogladaki monokarboksilat taşıyıcılar (MCT'ler) yoluyla kan-beyin bariyerini geçebilirler. Uzun süreli açlık (5-6 hafta) sırasında, keton cisimleri seviyesi önemli ölçüde yükselir ve beyin enerji ihtiyacının neredeyse %60'ına katkıda bulunabilir, böylece ana yakıt olarak glukozun yerini alır (Jensen ve ark., 2020).

Hepatositler, ketonların sentezi için ana bölgedir, ancak bu süreç küçük bir ölçüde olsa da astrosit ve böbreklerde de sentez gerçekleşebilir. Yüksek seviye asetil KoA ketogenez için gereklidir. Esas olarak, yüksek miktar yağ asitleri yüksek seviye asetil KoA elde edilebilir. Bu nedenle, keton cisimleri esas olarak beta oksidasyon yoluyla yağ asitlerinden üretilir, bununla birlikte amino asitler (özellikle lösin) emilim sonrası toplam keton cisimleri üretiminin %4'üne katkıda bulunabilir. Ketogenez için en az üç enzim etkilidir. Bunlar; mitokondriyal asetoasetil KoA tiyolaz, mitokondriyal 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA (HMG-KoA) sentaz, HMG-KoA

liyazdır. Ketogenezin ilk basamağı, tiyolaz enzimi tarafından iki asetil KoA'dan türetilen asetoasetil-KoA'nın oluşumudur. Yeni üretilen asetoasetil-KoA daha sonra HMG-KoA sentaz yardımıyla başka bir asetil KoA ile birleşir ve bu basamak ketogenezin hız sınırlayıcı basamağıdır. HMG-KoA liyaz enzimi daha sonra bir asetil KoA'yı ayırarak keton cisimciği olan asetoasetatı üretir. Asetoasetat ya asetona kendiliğinden dönüşür ya da β -hidroksibütirat dehidrojenaz ile kan dolaşım sisteminde en çok bulunan keton cisim olan β -hidroksibütirata (BHB) dönüşür. Beyin boyunca dağılmış bilinen yegane taşıyıcı MCT'ler ile taşınır. Nöronlar BHB için yüksek bir afiniteye sahip olan MCT2 izoformunu eksprese eder. BHB ve asetoasetat beyne taşındıktan sonra ATP üretimi için trikarboksilik asit döngüsüne giren asetil-KoA'ya dönüştürülürler. Dönüşüm mitokondri içinde gerçekleşir. Asetoasetat, süksinil-KoA:3-ketoasit KoA transferaz (SCOT) tarafından asetoasetil KoA'ya katabolize edilir. SCOT, karaciğer dokusunda eksprese edilmez ve bu yüzden keton cisimleri kullanılmaz. Asetoasetil KoA tiyolazın tersine çevirebilir etkisiyle iki asetil KoA'ya dönüştürülür. Glukozun aksine, BHB ve asetoasetatın oksitlenebilir bir forma dönüştürülmesi ATP gerektirmez. Nörodejeneratif hastalıklar, enerji krizi tarafından indüklenebilen veya tetiklenebilen, protein agregasyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve dahası gibi çeşitli patolojiler gösterir. Nörodejeneratif hastalıklarda ortak özellik kendine has nöron kayıplarıdır. Bu seçici nöronlar yüksek enerji gereksinimi duyan nöronlardır ve bu durum onları metabolik bozukluklara karşı hassas hale getirmektedir (Jensen ve ark., 2020).

Parkinson hastalarının %50-80'ine bozulmuş karbonhidrat metabolizması teşhisi konulduğu tahmin edilmektedir. Periferik doku insülin direnci genellikle PH'nin ilk belirtilerindendir ve beyindeki anormal enerji metabolizması ile ilişkilidir. Parkinson hastalarının glukozdan enerji üretiminde yer alan solunum zinciri kompleks 1'in fonksiyonunda kusurlar vardır. Keton cisimlerinin esas olarak solunum zinciri kompleks 2'yi kullanır, bu nedenle beyinde uygun mitokondriyal fonksiyon ve enerji üretimi sağlayarak glukozdan daha verimli bir enerji substratı olarak hizmet edebilir. Bundan dolayı keton cisimlerinin PH için faydalı bir seçenek olabileceği öne sürülmüştür (Grochowska ve Przeliorz, 2022).

BHB, beyine birim O₂ başına glukozdan daha fazla enerji sağlar. Keton cisimleri mitokondriyal solunumu arttırarak ATP üretimini arttırır. Ketojenik diyetin antioksidan etkisi glutatyon ve glutatyon peroksidaz aktivitesindeki artıştan ileri gelir. Sıçanlarda yapılan araştırmada hipokampusta antioksidan aktivite artışına glutatyon peroksidaz artışının eşlik ettiği gözlemlenmiştir. Bu enzimin yüksek aktivitesi nörodejeneratif değişikliklerden nöronların korunmasında katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Włodarek, 2019).

Bir PH çalışmasında, Parkinson hastaları düşük yağlı ve yüksek karbonhidratlı bir diyetle karşı sekiz haftalık bir ketojenik diyetle beslenecek şekilde iki gruba ayrılmıştır. Her iki diyet grubunda motor ve motor olmayan belirtiler önemli ölçüde düzelmiştir ancak ketojenik grupta bilişsel fonksiyon dahil olmak üzere motor olmayan belirtilerde daha iyi gelişmeler gösterdiği belirtilmiştir (Phillips ve ark., 2018). Sıçanlardaki PH modelinde yapılan bir çalışmada, ketojenik diyetin etkileri incelenmiştir. Glukoz arzının sınırlandırmanın SN'deki nöronların yıkıma karşı direncini arttırdığı ve PH belirtilerinin ilerlemesini engellediği gözlemlenmiştir (Shaafi ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada, mitokondriyal kompleks 1 'de hasara neden olan MPTP uygulanan farelerde, β -hidroksilaktat uygulamasının hücresel solunumu ve ATP üretimini iyileştirerek birleşimin nörotoksitesini azalttığı sonucuna varılmıştır. Farelerde, mezensefalonda artan bir dopamin hacmi ile birlikte gelişmiş motor beceriler de görülmüştür (Tieu ve ark., 2003). Yine bir çalışmada, MPTP tarafından indüklenen fare PH modelinde oktanoik asidin olası koruyucu etkisi incelenmiş ve MPTP uygulamasından sonra ortaya çıkan nörodejeneratif bulgular, oktanoik asit verildikten sonra inhibe olduğu gözlenmiştir. Nöroprotektif etkisinin olası mekanizması striatal mitokondride metabolik aktivitedeki artışla ilişkili olduğunu öne sürülmüştür (Joniec-Maciejak ve ark., 2018).

4.8. Sodyum/Glukoz Kotransporter 2 ve İnhibitörleri

Glukoz, hücresel metabolizma için temel bir yakıt kaynağıdır. Glukoz molekülü oldukça polardır ve tüm canlı hücrelerin plazma membranını oluşturan lipit çift katmanını geçemez. Bu nedenle, ekstraselüler ortamdan hücre içi boşluğa glukoz taşınmasını kolaylaştıran membran proteinleri, hücre membranları boyunca glukoz hareketi için çok önemlidir. İnsan vücudunda iki farklı glukoz taşıyıcı sınıfı bulunur. Bunlar GLUT'lar ve SGLT'lardır. Hem GLUT hem de SGLT büyük membran proteinleridir. SGLT1 ve SGLT2 olmak üzere iki farklı SGLT tanımlanmıştır. Lümeninden epitel hücresinin apikal membranı boyunca glukoz taşınması, bir konsantrasyon gradyanına karşı gerçekleşir ve bu nedenle aktif taşıma işlemi gerektirir. Proksimal tübülün ilk kıvrımlı segmenti filtrelenmiş renal glukozun %90'ını yeniden absorbe eder. Bu absorpsiyon yüksek kapasiteli, düşük afiniteli SGLT2 tarafından gerçekleştirilir. Geri kalan %10'u proksimal tübülün distal düze segmentindeki yüksek afiniteli, düşük kapasiteli SGLT1 tarafından absorbe edilir. Hem SGLT1 hem de SGLT2, glukoz taşınmasını sodyum gradyanına bağlar ve aktif sodyum taşınması ile üretilen sodyum elektrokimyasal gradyan, glukoz taşınması için gereken enerjiyi sağlar (Abdul-Ghani ve ark., 2011). SGLT'ler konsantrasyon gradyanlarına karşı glukoz, galaktoz ve sodyum iyonlarının taşınmasından sorumludur. SGLT1, bir D-glukoz molekülü ile iki sodyum iyonu taşır ve SGLT2, bir D-glukoz ile bir sodyum iyonu taşır (Pawlos ve ark., 2021).

Sodyum-glukoz kotransporter 2 inhibitörleri (SGLT2i'leri), proksimal renal tübülde glukozun geri alımını bloke ederek etki gösteren, böylece glikoüriyi indükleyen ve glisemik kontrolü iyileştiren kanagliflozin, dapagliflozin, ertugliflozin, ipragliflozin, luseogliflozin, togogliflozin ve empagliflozin (EMP) dahil olmak üzere bir antidiyabetik ilaç sınıfıdır (Noel ve ark., 2022, Tharmaraja ve ark., 2022). SGLT2 reseptörleri, merkezi sinir sistemi boyunca bol oluşu ve sodyum taşınmasının modülasyonu yoluyla nöron membran potansiyeli üzerindeki etkileri göz önüne alınca nörolojik bozuklukların yönetimi için uygun bir hedeftir. Ayrıca, bu reseptörler spesifik olarak kan-beyin bariyerinde eksprese edilir. SGLT2i tarafından indüklenen glukozüri ve plazma glukozundaki azalma, substrat kullanımında karbonhidrattan yağ asidi kullanımına bir kaymaya yol açar ve sonuç olarak ketogenezi başlatır. Ketojenezin Alzheimer hastalarında bilişsel işlevlerde ve PH'deki motor ve motor olmayan belirtilerde iyileşmeye neden olabileceği öne sürülmektedir (Tharmaraja ve ark., 2022).

SGLT2i, inflamasyonu azaltmasının yanı sıra, mTOR yolu gibi enerji metabolizması yollarındaki rolleri aracılığıyla bilişsel bozuklukları azaltabilir. SGLT2i ile glikojenoliz ve glikoneogenezdeki artış mTOR sinyalleşmesini azaltır (Noel ve ark., 2022). SGLT2i'nin epilepsi, demans ve PH gibi yaygın nörolojik bozukluklar üzerindeki etkisini inceleyen literatür sınırlıdır (Tharmaraja ve ark., 2022).

4.8.1. Empagliflozin

Şu anda kullanılan SGLT2i'leri arasında EMP, SGLT2'ye spesifikliği en yüksek olanlardandır (Xu ve ark., 2022). EMP, mikrogliada ERK1/2-MAP-kinaz yolunu inhibe ederek LPS ile aktive olan inflamasyonu azaltabilir. Ek olarak, SGLT2i bilişsel gerilemeyi önler ve hipokampusta sinaptik plastisiteyi korur (Piątkowska-Chmiel ve ark., 2023).

SGLT2i'lerinin nöroprotektif bir potansiyele sahip olduğuna dair artan kanıtlar vardır (Pawlos ve ark., 2021). EMP'nin nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini önlemede ve hatta azaltmada çok önemli olabilen mTOR sinyalinin yenilenmesinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (Piątkowska-Chmiel ve ark., 2023).

Tip 2 Diyabetli hastalarda dört aylık EMP tedavisinden sonra glutatyon s-redüktaz ve katalaz dahil olmak üzere antioksidan enzimlerin lökositlerde önemli ölçüde arttığı ve miyeloperoksidazı azaldığı gösterilmiştir (Iannantuoni ve ark., 2019). Bir çalışmada EMP, LPS ile aktive olan mikrogliada pro ve anti inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu azaltmıştır (Heimke ve ark., 2022). Farede yapılan başka bir çalışmada, EMP'nin diyabet ve Alzheimer hastalığı modelinde korteks ve hipokampüste senil plak yoğunluğunu, çözünür ve çözünmez

amiloid β seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Hierro-Bujalance ve ark., 2020). Yapılan bir sıçan çalışmasında, rotenon SNCA'nın yanı sıra oksidatif stres ve proinflamatuvar belirteçleri önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak dopamin, antioksidan, tirozin hidroksilaz ve PRKN önemli ölçüde azalmıştır. EMP ve rotenon beraber verilen grupta oksidatif stres ve inflamatuvar belirteçlerin yükselmesi, SNCA ve PRKN seviyelerini, yüksek tirozin hidroksilaz aktivitesini ve dopamin seviyesinin korunduğu gözlenmiştir. Hem düşük hem yüksek doz EMP PH sıçan modeline karşı nöroprotektif bir etki ortaya çıkarmış ve yüksek dozda daha belirgin bir etki çıkmış olduğu belirtilmiştir (Ahmed ve ark., 2022). Başka bir çalışmada ise EMP, endoplasmik retikulum stres yolağını düzenlemiş, oksidatif stresi onarmış, astrosit/mikroglial aktivasyonu ve nöroinflamsayonu azaltmış ve otofajiyi arttırmak suretiyle PH modelinde nöroterapötik etki göstermiştir (Motawi ve ark., 2022).

4.9. Parkinson Hastalığı Oluşturmada Kullanılan Endotoksin ve Nörotoksinler

Nörotoksin modelleri en klasik ve en sık kullanılan PH hayvan modelleri olup uygulaması nispeten daha kolaydır (Kin ve ark., 2019). Dopaminerjik nöron lezyonunun, MPTP ve 6-OHDA gibi dopaminin yapısal analoglarının uygulaması yoluyla indüklenebileceği bilinmektedir. Tarımsal kimyasallara kronik maruz kalmanın nöronlara zararlı etkisi olduğu ve PH riskini artırdığı bildirilmiştir (Chia ve ark., 2020). Diğer nörotoksinler ise organofosfat pestisitler (klorpirifos ve malathion gibi), endüstriyel çözücüler (trikloroetilen) ve ağır metaller (kurşun ve manganez gibi) şeklindedir (El-Gamal ve ark., 2021).

4.9.1. 1-Metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropridin

PH modeli oluşturmak için en yaygın kullanılan nörotoksindir (Kin ve ark., 2019). Lipofilik bir toksin olan MPTP, insan ve diğer primatların SN'si için oldukça seçicidir ve kan beyin bariyerini geçtikten sonra PH'yi indükler. MPTP, monoamin oksidaz B (MAO-B) tarafında ara madde 1-Metil-4-fenil-2,3-dihidropridin (MPDP⁺) ve son olarak da astrositlerde MPP⁺'ye oksidasyon ile dönüşür. MPP⁺, ROS oluşumunu indükler ve dopamin taşıyıcısı (DAT) yoluyla bazal ganglionların dopaminerjik nöronlarına girer ve toksisiteye neden olur (Raza ve Anjum, 2019). MPP⁺, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks 1'ini bozarak oksidatif strese ve ATP üretiminde azalmaya neden olur (Kin ve ark., 2019). Ancak MPTP modelinde, PH'nın en önemli nöropatolojik özelliği olan LC'lerin birikimi gözlenmez (Chia ve ark., 2020).

Farklı deney hayvanları türlerinde MPTP kaynaklı PH modelleri kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Genel olarak, PH benzeri belirtileri ve striatal dopaminde önemli bir azalmayı,

maymun modeli fare modeline göre daha tatmin edici bir sonuç göstermiştir (Wen ve ark., 2020). Yapılan bir çalışmada, intraperitoneal olarak MPTP verilen farelerde, bağırsakta noradrenalin ve serotonin seviyelerinin etkilenmediği, ancak bağırsakta artan SNCA seviyeleri ile ilişkili dopaminerjik nöronlarda önemli kayıp gözlenmiştir (Natale ve ark., 2010). MPTP'nin zebra balığında düzensiz yüzmeye, hareketsiz kalmasında artışa ve hareket etme eğilimde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Düşük doz MPTP'nin intraperitoneal enjeksiyonunun zebra balığı beynindeki katekolaminleri azaltmış olduğu gösterilmiştir (Ünal ve Emekli-Alturfan, 2019).

4.9.2. Pestisitler

Pek çok çalışma, PH ile pestisit maruziyeti arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Tarımda yaygın olarak kullanılan üç pestisit parakuat, rotenon ve manebtir. Maneb bir mantar zehri, parakuat yabancı ot zehridir (Ünal ve Emekli-Alturfan, 2019).

Parakuatın yapısı MPP⁺'ya benzemektedir ve bu yüzden araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Parakuat, kan-beyin bariyerinden geçebilir ve SNCA artışına, birikmesine ve migroglial aktivasyona sebep olabilir. Parakuat, SN'de mitokondriyal kompleks 1 aktivitesini azaltır ve ROS oluşumunu tetikler (Ünal ve Emekli-Alturfan, 2019). Farelerde ve sıçanlarda tekrarlanan düşük doz intraperitoneal ya da subkutan parakuat uygulaması, PH patolojisini, özellikle SN'deki dopaminerjik nöron kaybını ve ilişkili motor kayıpları çoğaltır. MPP⁺ gibi dopaminerjik nöronlara DAT yoluyla girer (Raza ve Anjum, 2019). Çalışmalarda, parakuat uygulaması ile lipid peroksidasyon artışı, glutasyon gibi antioksidanların seviyeleri düştüğü, mitokondriyal fonksiyon bozulduğu, mitokondriyal apoptoz indüklendiği, SNCA ekspresyonu ve birikimi arttığı, protein yıkımı zarar gördüğü ve nöroinflamasyona sebebiyet verdiği gösterilmiştir (El-Gamal ve ark., 2021).

Rotenon, bitki kökenli bir toksindir ve mitokondriyal elektron taşıyıcı zinciri kompleks 1 ile yüksek afiniteye sahiptir ve tekrarlanan oral, subkutan, intravenöz ya da intraperitoneal uygulamalardan sonra aktivitesini inhibe eder. Rotenon ile indüklenen PH modellerinde, bradikinezi ve postüral anormallikler, SN'de dopaminerjik nöron ölümü ve SNCA birikimi gözlenir (Raza ve Anjum, 2019). MPTP gibi, rotenon da oldukça lipofildir ve kan-beyin bariyerinden kolayca geçer. Mitokondriyal kompleks 1 inhibe ederek ATP üretimini azalmasına ve ROS üretiminin artmasına sebep olur. Rotenon, proteazom aktivitesini de inhibe eder. Proteazomun fonksiyon bozukluğu, hem idiyopatik hem genetik PH formlarının patogeneğinde yaygın olarak görülür. Ayrıca rotenon mikrotübüllerin destabilizasyonunu ve fosforlanmış tau birikimlerinin somatodentritik dağılımını indükler (El-Gamal ve ark., 2021).

En etkili rotenon uygulamasının en az otuz gün boyunca tekrarlayan düşük dozlar halinde intraperitoneal olarak uygulanması olduğu öne sürülmüştür (Airavaara ve ark., 2020).

Rotenon maruziyeti ile PH'de beyin-bağırsak ekseninin ilişkisi incelendiğinde rotenon maruziyetinin zebra balığının hem bağırsaklarında hem de beyinde oksidan-antioksidan dengesi bozduğu, beyin ve bağırsaklardaki inflamatuvar belirteçlerin birbirine paralel değiştiği, ketojenik diyetin önemli bileşeni olan orta uzunlukta yağ asidi kaprilik asit tedavisi ile inflamatuvar belirteçlerin normale döndüğü gösterilmiştir (Ünal ve ark., 2019; Ünal ve ark., 2023; Üstündağ ve ark., 2022; Cansız ve ark., 2021). Ayrıca yine zebra balıklarında rotenon ile oluşturulan PH modelinde PPAR δ ligandı erusik asit uygulamasının beyin-bağırsak ekseninde artan inflamatuvar yanıt üzerinde olumlu etkileri gözlenmiştir (Ünal ve ark., 2023)

Rotenonun etkilerini zebra balığı larvalarında incelediğinde ise, 10 μ g/L rotenon maruziyetinin 72-96 hpf'de lokomotor aktiviteyi bozduğu, oksidatif stresi ve inflamatuvar parametreleri uyardığı, PH ile ilgili gen ifadelerini etkilediği bulunmuştur (Üstündağ ve ark., 2022).

Maneb, mitokondriyal elektron taşıyıcı zinciri kompleks 3'ün bir inhibitörüdür. Maneb ve paraquat beraber uygulandığında önemli nöral kayıplar göstermiştir (Kin ve ark., 2019).

A53T transgenik fareler ile yapılan bir çalışmada, maneb doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır ve PH benzeri motor bozuklukları indüklemiştir. Aynı çalışmada manebin, fenilalanin ve triptofan metabolizma yolları, dopaminerjik nöron sinapsları, sinaptik vezikül döngüsü, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres dahil olmak üzere PH ile ilişkili yolların bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2022).

4.9.3. Lipopolisakkarit

LPS, gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan bir endotoksindir ve hem periferik bağışıklık hücrelerinin hem de merkezi sinir sistemi glialarının güçlü bir uyarıcısıdır. Bu hücrelerin çeşitli immün düzenleyici, proinflamatuvar sitokinler ve serbest radikalleri salmasına yol açar. Farklı bakteri türlerinden türetilen LPS molekülleri, kovalent olarak bağlı üç bölümden oluşan ortak bir morfolojiyi paylaşır; bir yüzey karbonhidrat polimeri, bir iç ve dış bölgeye sahip bir çekirdek oligosakkarit ve bir açillenmiş glikolipit (lipit A). Lipit A doğuştan gelen bağışıklık uyarıcı bileşeni olarak hizmet eder. Sıçanların striatumuna LPS'nin mikroenjeksiyonları, sadece korpus striatumda dopamin içeriğinin tükenmesine değil, aynı zamanda sitoplazmik SNCA birikimine ve SN'de dopaminerjik nöronların ilerleyici dejenerasyonuna yol açmıştır (El-Gamal ve ark., 2021).

Parkinson hastalarında artmış bağırsak geçirgenliği ve azalmış serum lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP) tespit edilmiştir. Artan bağırsak geçirgenliği, LPS gibi toksik ürünlerin kan dolaşımına girmesine izin verebilir. LPS, kan dolaşımında LBP ile etkileşime girerek dolaşımdaki bağışıklık hücreleri tarafından tanınmasını kolaylaştırır. Bu nedenle, Parkinson hastalarına azalmış serum LBP'si, gram negatif bakterilerin kronik invazyonu ile ilişkilendirilmiştir (Deng ve Bobrovskaya, 2022).

Bir çalışmada, LPS'nin tek intraperitoneal uygulamasının, Wistar sıçanlarının SN'sinde doza bağımlı bir dopaminerjik dejenerasyon ve enjeksiyondan bir hafta sonra mikrogial aktivasyonu indüklediğini bildirmiştir (Bozadas ve ark., 2019). LPS'nin intraperitoneal enjeksiyonunun, beynin başka bir bölgesi olan hipokampusta nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona neden olduğu ve bunun da bilişsel bozulmaya yol açtığı belirtilmektedir (El-Gamal ve ark., 2021). Yapılan bir çalışmada, bir fare bağırsak patojeni olan gram negatif bir bakteri türü PINK1^{-/-} farelere oral sondayla verilmiş ve bu uygulama striatumda dopaminerjik nöron terminal kaybına ve motor bozukluğa neden olmuştur (Matheoud ve ark., 2019). Farelerde tek bir LPS enjeksiyonu, ilerleyici dopaminerjik nörodejenerasyonu indüklemeye başarılı olmuştur ancak SN dejenerasyonu, artan SNCA protein ekspresyonu ve motor bozukluğun gelişmesi için uzun süreli ve yüksek dozda LPS gereklidir. Bazı çalışmalarda, motor korteks ve hipokampusta dejenerasyon gibi ektranigral patolojilerin yanı sıra bağırsak geçirgenliğinde bir artış ve enterik sinir sisteminde SNCA'nın bir bölgesinde fosforillenme rapor edilmiştir. Tekrarlanan sistemik LPS modelleri, tedaviden 1-6 hafta sonra SN'de dopaminerjik nöronların daha erken dejenerasyonunu ve bunların striatumdaki nöronal liflerini indüklemiştir (Deng ve Bobrovskaya, 2022).

4.10. Bir Model Organizma: Zebra Balığı

Nörodejeneratif hastalıklar, insan sağlığı için büyük bir tehdittir. Yaşlı nüfusunun artmasıyla birlikte yaşa bağlı bu hastalıklar giderek yaygınlaşmaktadır. Bu tür hastalıklar aileleri kötü duruma düşürmekte ve toplum için zorluk oluşturmaktadır. Bunun için hastalıkları iyileştirmek için yeni ve etkili stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir. Hayvan modellerinin, nörodejeneratif hastalıkların karmaşık mekanizmasını araştırmak için yararlı bir araç olduğu gösterilmiştir. Son birkaç on yılda, fareler, sıçanlar, maymunlar, köpekler, domuzlar, meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*) ve balıklar hayvan modelleri, nörodejeneratif hastalıkların arkasındaki hücresel ve moleküler mekanizmaların genetik temellerini anlamamıza büyük katkıda bulunmuşlardır. Zebra balığı (*Danio rerio*), insan nörodejeneratif hastalık çalışmaları ve ilaç keşfi için model organizmalar olarak çeşitli avantajlar sunar. Nispeten küçük boyutlar ve kısa ömürleri nedeniyle fare gibi diğer omurgalı model organizmalara kıyasla daha az yer gerektirir ve

laboratuvar bakımı için daha az maliyet gerektirir. Çok yüksek doğurganlığa sahiptirler ve embriyo gelişim sırasında şeffaftır, bu da gelişiminin rahat bir şekilde görselleştirmesini kolaylaştırmaktadır (Ünal ve Emekli-Alturfan, 2019). Zebra balığı ve insan homologları arasındaki nükleotit ya da amino asit dizilerinin özdeşliği yaklaşık %71'dir. Bu oran *Caenorhabditis elegans*'da %30-60 ve meyve sineğinde %40'dır. Zebra balığı, omurgalı bir sinirsel yapı organizasyonuna sahiptir ve tüm ana yapılar, memeli beynine benzer. Ayrıca zebra balığında insanlara benzer şekilde fonksiyonel bir kan-beyin bariyerine sahiptir. Zebra balığı dünyada en çok kullanılan balık modelidir (Wang ve Cao, 2021).

Yetişkin zebra balığının dopaminerjik nöronları, insanlardaki SN'ye homolog olan posterior tuberkulumdur ve iyi karakterize edilmiştir (Zeng ve ark., 2018a). Zebra balığı embriyosunda dopaminerjik nöronların en erken döllenmeden sonra ondokuzuncu saatte posterior tuberkulumda tespit edilmiştir (Razali ve ark., 2021).

Yetişkin zebra balığında MPTP'ye yanıt olarak azalan lokomotor aktivite dahil olmak üzere davranışsal değişiklikler sergilerken, larva zebra balığı MPTP, rotenon ve parakuat'a karşı gelişimsel, davranışsal ve dopaminerjik duyarlılık sergiler (Cansız ve ark., 2022; Üstündağ ve ark., 2022; (Zeng ve ark., 2018a). Zebra balıklarına intraperitonel olarak MPTP verildiğinde yüzme mesafesinde ve geçişlerde azalma ve donma nöbetleri sayısında ve süresinde artış görülmüştür (Sarath Babu ve ark., 2016).

4.10.1. Zebra balığında lokomotor aktivite ve Y-labirenti testi

Nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik bozukluklar yaygındır ve erken yaşta hastalık artan sosyal ve kişisel zorluğa neden olmaktadır. Alzheimer hastalığı, PH, depresyon ve otizm gibi birçok nörolojik ve nöropsikiyatrik bozuklukta bellek ve bilişsel ya da davranışsal esneklikteki bozukluklar yaygın olarak rapor edilmektedir. Çalışma belleğindeki ve bilişsel esneklikteki bozuklukların araştırılması için hayvan modellerinde uygulanan davranış deneyleri kaçınılmaz hale gelmiştir (Cleal ve ark., 2021).

Yüzme, yürüme, emekleme ve uçuş gibi lokomotor davranışların tümü, omurgalılarda omurilikte ve omurgasızlarda ventral sinir kordonunda bulunan merkezi model üreteçleri olarak bilinen nöron ağları tarafından üretilir (Berg ve ark., 2018). Locomotor davranışları, zebra balığının yaşamı boyunca beslenme, sosyal ve savunma faaliyetlerinde bütünüleyici rol oynar. Embriyojenez boyunca lokomotor aktivitenin normal gelişimini tanımlamıştır. Döllenmeden 18 saat sonra embriyoda kendiliğinden kas kasılmaları başlar ve yirmidördüncü saatte mekanik uyarım embriyonun seğirmesine neden olur. Kırk sekizinci saatte embriyo, kuyruğun ucuna

dokunulduğunda kuyruk çevirme tepkisi ve kafasına dokunulduğunda hızlı bir kaçış tepkisi gerçekleştirebilir (Colwill ve Creton, 2011).

Davranışsal öğrenme ve hafıza testleri, zebra balığının larva aşamasında bile kullanılabilir. Bu şekilde, zebra balığı davranışını içeren birçok araştırma yapılmıştır ve halen devam etmektedir (Barreiros ve ark., 2021). Yetişkin zebra balığı da dahil olmak üzere hayvan modellerinde değerlendirilen üç ana davranışsal alan türü, duygusal davranış (örneğin, kaygı veya korku), bilişsel davranış (örneğin, uzamsal bellek, nesne tanıma veya öğrenme) ve sosyal etkileşim (örneğin, saldırganlık, sosyal tercih ve kur yapma)'dir. Lokomotor davranışının analizi farklı türlerde ve çeşitli deneysel paradigmlarla araştırılabilir ve genel olarak cihazlar ile hayvanın ortamdaki hareketi (toplam uzunluk, hız, ivme ve yörüngeler gibi önemli veriler üretir) değerlendirilir (Franco-Restrepo ve ark., 2019).

Nispeten daha yeni bir alan olan yetişkin zebra balığı davranışsal sinirbilimi, geleneksel kemirgen paradigmlarını (açık alan, açık-karanlık kutu, irkilme ve yırtıcı maruz kalma testleri gibi) suda yaşayan türlerde kullanıma uyarlamaktadır (Cachat ve ark., 2011). En popülerleri arasında labirentler olmak üzere, hayvan bilişsel sistemini değerlendirmek için kullanılan çok çeşitli deneyler vardır. Y-labirent en basit yöntemlerden biridir ve hem kemirgen hem de zebra balığı modelleri için öğrenme ve hafıza paradigmlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Cleal ve ark., 2021).

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

5.1. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü

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



Şekil 3: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi

5.2. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Deneylerde Kullanılan Cihazlar

ALETLER	MARKA ve KOD
Vorteks	BIOSAN V-1 PLUS
Santrifüj	SIGMA 1-16K
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-120- 02
DNA-RNA izolasyon cihazı	QIAGEN QiaCube
Homojenizatör	QIAGEN Tissuelyser LT
Etüv	NUVE EN 400
Distile su cihazı	ELGA Option-Q Ultra saf su sistemi
Sterio Discovery V8 mikroskop	ZEISS
RT-PCR Cihazı	QIAGEN Rotor Gene-Q
Buzdolabı	INDESIT TAA 12 V
Akvaryum	ZEBTEC Mini Sistem
pH metre	HANNA HI 2211
Magnetik karıştırıcı	WITEG WISD Hotplate Stirrer MSH
Hassas terazi	SHIMADZU ATX224
Otomatik pipetler	RAININ
LC MS/MS	AGILENT TECHNOLOGIES
Su Banyosu	MEMMERT
Nanodrop	NANODROP 2000c
Hibridizasyon Fırını	AGILENT TECHNOLOGIES
Mikroarray Tarayıcısı	AGILENT TECHNOLOGIES
Hibridizasyon Haznesi	AGILENT TECHNOLOGIES
Hibridizasyon Conta Slaydı	AGILENT TECHNOLOGIES
Hibridizasyon Fırını Rotoru	AGILENT TECHNOLOGIES
Zamanlayıcı	
Kriyostat	LEICA
Işık Mikroskobu	OLYMPUS BX61

Fotoğraf Cihazı	OLYMPUS DP72
Kamera	Sony
Termostat	EHEIM Thermocontrol
2 mL Santrifüj Tüpü	İSOLAB
1,5 mL Santrifüj Tüpü	İSOLAB
0,1ml 4-Strip Rotor-Gene	STARLAB I1402-0400
0,2 mL PCR Tüpleri	STARLAB I1402-8100

5.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar Tablo 3’de belirtilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup ve dünya üzerinde bilinen büyük firmalardan tedarik edilmiştir.

Tablo 3: Kullanılan kimyasalların listesi

KİMYASALLAR	MARKA ve KOD
Sodyum karbonat	MERCK 1.06392.1000
Sodyum hidroksit	MERCK 1.06482.1000
Bakır (II) sülfat	FISHER CHEMICAL C/8600/50
Sodyum potasyum tartarat	MERCK 1.08087.1000
Folin çözeltisi	SIGMA F9252
Sodyum klorür	SIGMA S9888
Albumin	SIGMA A3912
Triklorasetik asit (TCA)	ACROS 421451000
Tiyobarbürük asit (TBA)	SIGMA T5500-25G
%37 Hidroklorik asit	MERCK 1.00317.2500
n-Bütanol	FISHER BIOREAGENTS B/4800/17
Çinko sülfat heptahidrat	MERCK 1.08883.1000
Vanadyum (III) Klorür	ACROS 197000250
Sülfanilamid (SULF)	SIGMA S9251
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	MERCK 1.06237.0025
Dipotasyum hidrojen fosfat	
Dipotasyum hidrojen fosfat	SIGMA P2222-100G

Potasyum dihidrojen fosfat	SIGMA P5655-100G
Sodyum etilen diamin tetra asetik asit (Na-EDTA)	SIGMA E4884-100G
Riboflavin	FISHER BIOREAGENTS BP167-50
o-Dianisin	ACROS 407890050
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat	SIGMA 255793-10G
L-Glutasyon (GSH)	SIGMA G4251-5G
Etanol	MERCK 1009862500
1-Kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB)	ACROS 160511000
Sülfürik Asit	MERCK 1.00713.2500
Sodyum metaperiyodat	MERCK 1.06597.0050
Fosforik asit	MERCK 1.00573.2500
Sodyum sülfat	FISHER BP327-500G
Sodyum meta arsenit	SIGMA S7400-100G
Sikloheksanon	CARLO ERBA 437052
Sodyum sitrat	FISHER BP327-500
5-5' ditiyobis-2-nitrobenzoik asit	SIGMA D8130-5G
Metafosforik asit	MERCK 1.00546.0100
Disodyum hidrojen fosfat	SIGMA 255793-10G
Dietanolamin	SIGMA D8885-25G
Bis(4-nitrofenil) fosfat	SIGMA 123943-1G
Fosfat tampon tuzu tablet (PBS)	SIGMA P4417-100TAB
Potasyum klorür	SIGMA P9541
Kalsiyum klorür dihidrat	SIGMA 223506
Magnezyum sülfat	SIGMA 208094
%4'lük Para-formaldehit	CHEMCRUZ SC-281692
D-Sükroz	FISHER BP220-1
Triton X-100	SIGMA T8787-100ML
Sığır Serum Albumini	SIGMA A3912
Bayır turbu Peroksidaz Çözeltisi	ScyTek: SHP125
Hematoksilen	Bio-Optica 05-06002/L
Entallen	SIGMA 1.07960

Metanol	
Dimetilsülfoksit	SIGMA 472301
DAP kromojeni	ABCAM
AEC kromojeni	ScyTek
4-(2-hidroksietil)-1-piperazineethansulfonik asit (HEPES)	SIGMA H3375
Etil 3- aminobenzoat metansulfonat (Tricaine)	SIGMA A5040
Rotenon	SIGMA 45656-250MG
Lipopolisakkarit	SIGMA L2630-25MG
Empagliflozin	SANTA CRUZ sc-482194

5.4. Kullanılan Kitler

Çalışmamıza ve cihazlarımıza uygun olacak şekilde Tablo 4'te verilen kitler temin edilmiştir ve kullanılmıştır.

Tablo 4: Kullanılan Kitler

KİTLER	MARKA
Zebrafish (V3) Gene Expression Microarray, 4X44K	AGILENT TECHNOLOGIES
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
RNA Spike-In Kit, One Color	AGILENT TECHNOLOGIES
Low Input Quick Amp Labeling Kit, One Color	AGILENT TECHNOLOGIES
Gene Expression Hybridization Kit	AGILENT TECHNOLOGIES
Gene Expression Wash Buffer Kit	AGILENT TECHNOLOGIES
BlasTaq 2X qPCR MasterMix, 500 rxn (4 x 1.25 ml)	ABMGOOD Biological Materials Inc.
OneScript Plus cDNA Synthesis Kit, 100 rxn	ABMGOOD Biological Materials Inc.
Ketone Body Assay, 200T	SIGMA MAK134-1KT

5.5. Kullanılan Antikorlar

Çalışmamızı immünolojik açıdan değerlendirmek için Tablo 5'te belirtilen antikorlar kullanılmıştır.

Tablo 5: Kullanılan Antikorlar

ANTİKORLAR	MARKA ve KOD
Lenfosit Sitozolik Protein 1	GENETEX #GTX124420
Tirozin Hidroksilaz	IMMUNOSTAR #22941

5.6. Kimyasal Maruziyet Uygulanması

Çalışmamızda her grupta 25 adet zebra balığı olacak şekilde toplam 200 adet yetişkin AB-susu zebra balığı kullanılmıştır. Grupların hepsi aynı zamanda günde iki defa olacak şekilde 300 mg Tetramin pul yemi ile beslenmiştir. Grupların yaşadıkları ortam sıcaklığı 28°C'dir ve 14 saat gündüz 10 saat gece olacak şekilde aydınlatma ayarlanmıştır. Dört hafta boyunca gruplar kimyasallara maruz bırakılmıştır. Çalışmamızdaki gruplar; kontrol (K), rotenon (ROT), lipopolisakkarit (LPS), rotenon ile beraber lipopolisakkarit (ROT+LPS), empagliflozin (EMP), rotenon ile birlikte empagliflozin (ROT+EMP), lipopolisakkarit ile birlikte empagliflozin (LPS+EMP) ve rotenon, lipopolisakkarit ile birlikte empagliflozin (ROT+LPS+EMP) olarak sekiz gruptur. Maruziyetlerde ROT (5 µg/L) ve EMP (2,25 mg/L) güneşirri olacak şekilde zebra balıklarının yaşadıkları ortama eklenmiş, LPS (5 µg/mL) ise haftada bir gün olacak şekilde intraperitonel olarak enjekte edilmiştir (Şekil 4). ROT ve EMP'nin çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. LPS ise PBS ile çözünmüştür. ROT Sigma R8875, LPS Sigma L2630 ve EMP Santa Cruz SC-482194 kullanılmıştır.



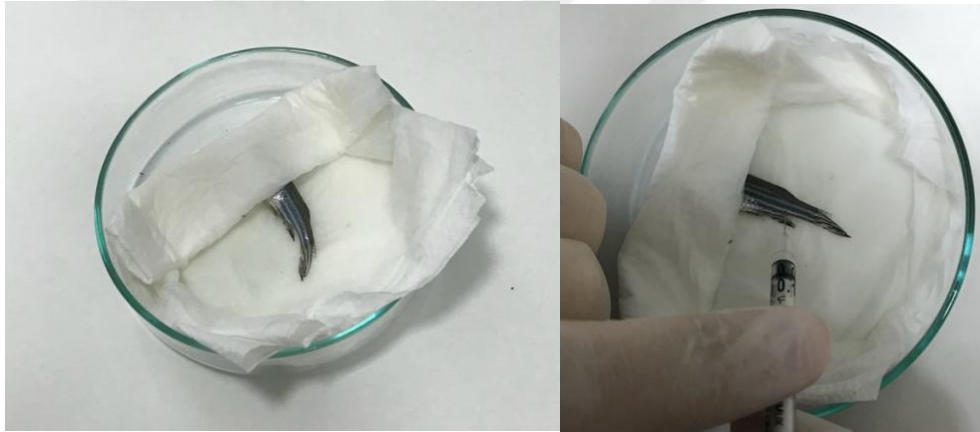
Şekil 4: Sırasıyla buz ile anestezi, LPS enjeksiyonu için tartım ve LPS enjeksiyonu

5.7. Grupların Ağırlık Ortalamalarının Bulunması

Her grupta bulunan bütün zebra balıklar her hafta aynı gün olacak şekilde tartılmıştır ve kayıt altına alınmıştır. Soğuk su yardımıyla zebra balıkları uyuşturulmuş ve tartım gerçekleştirildikten sonra ayrı bir tanka konmuştur. Ağırlıkları tartılacak gün tartım bitene kadar besleme yapılmamıştır.

5.8. Grupların Kan Glukoz Ortalamalarının Bulunması

Kontrol ve maruziyet grupları deney sonunda ve aç olacak şekilde kanları alınmış ve glukometre ile ölçümleri yapılmıştır. Soğuk su yardımıyla bayıltılan zebra balıkları Şekil 5’de görüldüğü gibi bir cam petri içerisine yatırılmış ve dorsal aort bölgesinden insülin iğnesi yardımıyla alınmıştır (Şekil 5). İnsülin iğnesi işlemiden hemen önce açılmış ve içerisine sodyum sitratlı çözelti çekilip boşaltılarak, kanın enjektör içinde pıhtılaşmasının önüne geçilmeye çalışılmıştır. Daha sonrasında bu değerler kayıt altına alınmıştır.



Şekil 5: Zebra balıklarından insülin iğnesi yardımıyla kan alımı

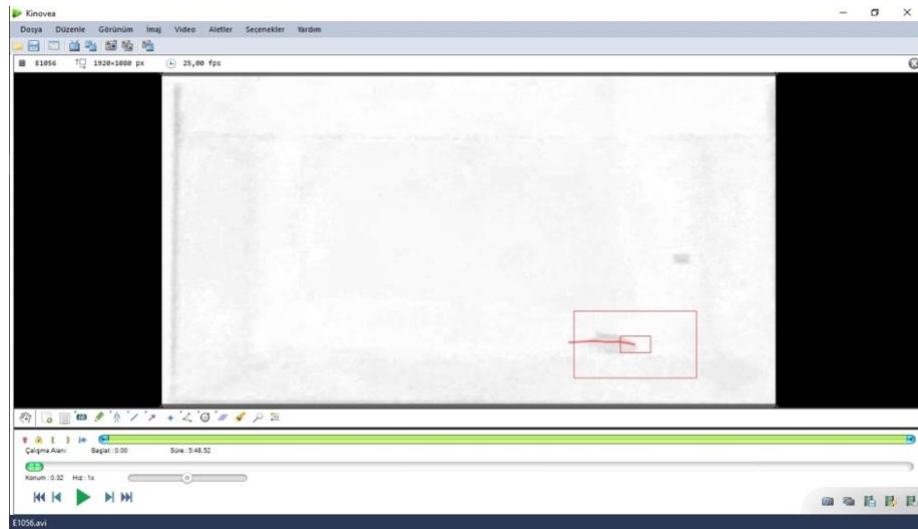
5.9. Davranış Analizleri: Lokomotor Aktivite ve Y-Labirenti Testi

Maruziyetin sonuna gelindiğinde LPS enjeksiyonundan bir gün sonra her gruptan on zebra balığı ile Y-maze ve on zebra balığı ile lokomotor aktivite analizi için video kaydı alınmıştır (Şekil 6). Her iki davranış testi için bir zebra balığının video kayıt süresi 5 dakikanın biraz üzerindedir. Ancak analiz süresi 5 dakikadır. Lokomotor aktivite için kullanılan aparatın boyutları 21cm x 9cm x 11 cm’dir. 1,5 litre akvaryum suyu içinde video çekimi gerçekleşmiştir (Şekil 6). Y-maze için kullanılan aparatın boyutları 5cm x 2cm x 14cm’dir ve kolların arasındaki açı 120°’dir. 4,5 litre akvaryum suyu içinde bu aparat yerleştirilerek video çekimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 6).

Y-labirenti testinde zebra balıkları Y şeklindeki aparatın içine konulmuş ve bir süre ortama alışması beklenmiştir. Daha sonra kamera kaydı başlatılmış beş dakikadan biraz fazla olacak şekilde video kaydedilmiştir. Zebra balıklarının Y şeklindeki aparat içinde keşif yolları incelenmiştir. Y şeklindeki aparatın her bir koluna A, B ve C şeklinde üç harf verilmiştir. Zebra balığı merkez alana geldiğinde kayıt başlatılmış ve her girdiği kol kaydedilmiştir. Beş dakika sonrasında oluşan dizi kaydedilmiştir. Örneğin oluşan dizi; ABCBACBBACBABCABC.... gibi oluşabilir. Bu şekilde incelenecek bütün zebra balıklarının keşif dizileri elde edilmiştir. Daha sonrasında inceleme aşamasına geçilmiştir. Bu inceleme için Microsoft Excel programı kullanılmıştır (Şekil 9). Grupların lokomotor aktivite analizleri Kinovea ve Toxtrac programları (sırasıyla Şekil 7 ve Şekil 8) ile yapılmaktadır.



Şekil 6: Sırasıyla Y-maze ve lokomotor aktivite düzenekleri ve video çekimi



Şekil 7: Kinovea programında zebra balığının 5 dk. boyunca izlenmesi

5.11. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

5.11.1. Total protein tayini

Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik - fosfotungstik asit reaktifi (Folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır (Lowry ve ark., 1951)

Gerekli çözeltiler

0,1 N NaOH çözeltisi: 0,4 g NaOH biraz suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

Sodyum karbonat çözeltisi (A çözeltisi): 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100 mL'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi: 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

B çözeltisi: % 1 g lık Bakır sülfat çözeltisi ile % 2 g lık Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır.

C çözeltisi: 50 mL A çözeltisi ve 1 mL B çözeltisi karıştırılarak kullanılır.

Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat $\times 2H_2O$, 50 mL % 85 g lık fosforik asid, 100 mL derişik HCl ve 700 mL distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li_2SO_4 ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk. daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katılır. (çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik: 0,9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi: 100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

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

Deneyin yapılışı

5 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 6: Toplam protein tayini yöntemi

	<i>Numune</i> (N)	<i>St1</i> % 5 mg Albumin	<i>St2</i> % 10 mg Albumin	<i>St3</i> % 15 mg Albumin	<i>Kör</i> (K)
<i>Albumin (% 100mg)</i>	-	25 µL	50 µL	75 µL	-
<i>Doku Homojenatı</i> (veya süpernatant)	10 µL	-	-	-	-
<i>Serum Fizyolojik</i>	490 µL	475 µL	450 µL	425 µL	500 µL
<i>Toplam Hacim</i>	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
<i>Vortekste karıştırılır.</i>					
<i>C Çözeltisi</i>	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
<i>Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.</i>					
<i>Folin Ayıracı</i>	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk. bekletilir. 30 dk. sonunda **500 nm** de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. Standart grafiği çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

5.11.2. Lipit peroksidasyon tayini

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Ledwozyw ve ark., 1986).

Gerekli çözeltiler

1 M NaOH Çözeltisi: 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

TBA çözeltisi: 500 mg TBA ile 6 mL 1 M lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 mL distile su ilave edilir.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi: 20 mL TCA (% 100 g TCA) ile 5 mL HCl (% 37 g lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

n-Butanol : Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin yapılışı

2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 7: Lipit peroksidasyon tayin yöntemi

	<i>Numune</i>	<i>Kör</i>
<i>Doku homojenati</i>	0,25 mL	-
<i>Distile su</i>	-	-
<i>TCA</i>	1,25 mL	-
<i>Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.</i>		
<i>TBA</i>	0,75 mL	-
<i>Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.</i>		
<i>n-Butanol</i>	2 mL	1 mL

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm'de santrifüj edilir. 1ml bütanol fazı alınarak **532 nm'de** cam küvette köre karşı absorbanlar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplanır.

5.11.3. Toplam nitrik oksit tayini

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülür (Miranda ve ark., 2001).

Gerekli çözeltiler

0,3 M NaOH çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.

% 10'luk ZnSO₄: 5 g ZnSO₄ yada 8,9 g ZnSO₄.7 H₂O tartılır bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 mL 'ye tamamlanır.

1 M HCl: 4,20 mL HCl çekilir ve üzeri distile su ile 50 mL 'ye tamamlanır.

VCl₃ çözeltisi: 0,4 g VCl₃ bir miktar 1 M HCl de çözülür ve üzerine aynı çözelti ile 50 mL 'ye tamamlanır.

% 5'lik HCl: 2,86 mL % 37'lik HCl çekilir ve üzeri distile su ile 25 mL 'ye tamamlanır.

% 2'lik SULF(Sülfanilamit): 0,5 g Sülfanilamit tartılır, 25 mL % 5' lik HCl içerisinde çözülür.

% 0,1'lik NEDD (N-(1-Naftil)-etilen diamin dihidro klorür): 0,025 g NEDD tartılır. Bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 25 mL 'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı

Doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. 0,3 mL süpernatant alınır, üzerine 0,3 mL 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dk beklenir. 0,3 mL % 10'luk ZnSO₄ ilave edilir. Vortekslenir. 4°C 'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Üst faz alınır ve 4°C'de 14000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir. İki adet deney tüpü anılır, kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 8: Nitrik oksit tayin yöntemi

	<i>Numune</i>	<i>Kör</i>
<i>Deprotenize Sıvı</i>	0,3 mL	-
<i>Distile Su</i>	-	0,6 mL
<i>VCl₃</i>	0,3 mL	0,3 mL
<i>SULF</i>	0,15 mL	-
<i>NEDD</i>	0,15 mL	-
<i>30 dk 37 °C'de etüvde inkübe edilir.</i>		

Köre karşı 540 nm'de absorbans kaydedilir. Sonuçlar 53000 M⁻¹/cm⁻¹ ekstinsiyon katsayısı ile µmol/ L cinsinden hesaplanır.

5.11.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin foto-oksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Mylroie ve ark., 1986).

Gerekli çözeltiler

Fosfat tamponu (pH 7,8): 0.136 g KH_2PO_4 ve 0.697 g K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (hacim 100 mL'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,8'e ayarlanır).

Fosfat tamponu + 0.1 mM lık Na-EDTA: 0,0037 g Na-EDTA tartılır biraz 50mM'lık fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 50 mM'lık fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.

Potasyum fosfat tamponu (pH 7,5): 0,041 g KH_2PO_4 ve 0,122 g K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (Hacim 100 mL'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,5'a ayarlanır).

Riboflavin çözeltisi: 7,5 mg riboflavin 100 mL potasyum fosfat tamponunda (pH: 7,5) çözülür.

o- Dianisin çözeltisi: 19 mg o-dianisin 10 mL distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı

% 10'luk doku homojentı 10 dk. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır tam veya 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır.

Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alınır.

Tablo 9: Superoksit dismutaz aktivitesi tayin yöntemi

	<i>Numune</i>	<i>Kör</i>
<i>Fosfat tamponu (pH: 7,8)</i>	2,6 mL	2,6 mL
<i>o-Dianisidin</i>	0,1 mL	0,1 mL
<i>Distile Su</i>	--	0,1 mL
--	--	--
<i>Seyreltilmiş Süpernatant</i>	0,1 mL	--
<i>Her tüpe 30 sn ara ile 0,2 ml riboflavin konur, vorteksle karıştırılır. Plastik makro küvette 460 nm 'de abs okunur</i>		
<i>Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edilir.</i>		

Not: Lamba 20' önceden açılır ve ısınması sağlanır.

Köre karşı plastik küvetlerde 460 nm'de absorbans kaydedilir.

5.11.5. Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayini

Glutasyon S-Transferaz (GST) aktivitesi tayini, Glutasyon ve 1-Kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır (Habig ve Jakoby, 1981).

Gerekli çözeltiler

Sodyum fosfat tamponu (pH:6,5): 0,534 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2,3 g KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözülür ve birbirine karıştırılır ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (Hacim 100 mL'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, 1M NaOH ile pH 6,5 e ayarlanır).

Glutasyon çözeltisi (60 mM): 1,84 g glutasyon biraz distile suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

1-Klor-2,4-dinitro-benzen çözeltisi (CDNB): Absolü etanolde taze hazırlanır. 1,22 g CDNB tartılır ve biraz etanolde çözülür. Sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı

%10'luk doku homojenti 10 dak. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve 1/40 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş iki tüp alınır ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 10: Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayin yöntemi

	<i>Numune</i>	<i>Kör</i>
<i>Dilue süpernatant</i>	0,5 mL	--
<i>Serum Fizyolojik</i>	--	0,5 mL
<i>Fosfat Tamponu</i>	1,5 mL	1,5 mL
<i>GSH Çözeltisi</i>	0,05 mL	0,05 mL
<i>CDNB Çözeltisi</i>	0,05 mL	0,05 mL
<i>Distile su</i>	0,90 mL	0,90 mL

Karıştırılır. 3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm'de (25°C) absorbansları izlenir ve kaydedilir. Absorbans artışı hesaplanır. Glutasyon ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstrinksiyon katsayısı $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplanır. Enzimsel konjugasyon sonucundan, enzimsel olmayan konjugasyon değerleri çıkarılır.

5.11.6. Toplam sialik asit tayini

Sialik asit, periyodik asid ile okside olarak beta-formilpürivik asit oluşur. Bu bileşik tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak, 549 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir bileşiğe dönüştürülür. Bu ürün stabil değildir, bu nedenle sikloheksanon fazına çekilir. Oluşan rengin şiddeti 549 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. 549 nm' deki rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Warren, 1959).

Gerekli çözeltiler

0,1 N H₂SO₄ çözeltisi: 1 litrelik balon jojeye bir miktar distile su ilave ettikten sonra üzerine 2,71 mL derişik sülfirik asit konur ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

0,2 M Sodyum metaperiyodat: 250 mL'lik balon jojeye belli bir miktar distile su ilave edilir. Suyun üzerine 151,7 mL fosforik asid ilave edilip karıştırılır. Bu karışımın üzerine 10.695 g Sodyum-meta periyodat ilave edilir, karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlanır.

0,5 M sodyum sülfat çözeltisi: 500 mL'lik bir balon jojeye 35,5 g sodyum sülfat bir miktar 0,1 N sülfirik asit içinde çözüldükten sonra hacim 500 mL'ye 0,1 N sülfirik asit ile tamamlanır.

%10 g sodyum arsenit çözeltisi: 10 g Sodyum meta arsenit tartılır, bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözülür, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 mL'ye tamamlanır.

%0,6 g TBA çözeltisi: 0,6 g TBA tartılır, bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözülür, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 mL'ye tamamlanır.

Sikloheksanon: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin yapılışı

%10'luk doku homojenatı 10 dk 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant ayrılır. 360 µL 0,1 N H₂SO₄ ile 40 µL süpernatant karıştırılır, tüplerin ağzı kapatılarak 1 saat 80°C'de etüvde hidroliz edilir. Elde edilen hidrolizat numune olarak işaretlenmiş deney tüpüne konur.

Tablo 11: Sialik Asit tayin yöntemi

	<i>Numune</i>
Hidrolizat	0,2 mL
0.2 M sodyum metaperiyodat	0,1 mL
	20 dakika oda sıcaklığında beklenir.
%10 sodyum arsenit	1 mL
	Meydana gelen sarı renk kayboluncaya kadar çalkalanır.
%0.6 g TBA	3 mL
	100°C lik su banyosunda 15 dakika bekletilir. Bu süre sonunda tüpler su banyosundan alınarak buzlu su içinde oda ısısına soğutulur.
Sikloheksanon	4,3 mL
	İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edilir. Kör olarak 1ml sigloheksanon kullanılır. Organik fazın renk şiddeti 549 nm de okunur.

Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak mg sialik asit / g protein cinsinden hesaplanır.

5.11.7. İndirgenmiş glutatyon tayini

Elmann ayıracı, 5-5'ditiyobis -2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Beutler, 1975).

Gerekli çözeltiler

Sodyum sitrat çözeltisi: 1 g sodyum sitrat tartılır, biraz distile suda çözülerek hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Ellman ayıracı: 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (% 1 g) çözülür. Hacmi %1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanır.

Proteinsizleştirme çözeltisi: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), 30 g sodyum klorür ayrı ayrı biraz distile suda çözülür. Hepsi birleştirilir ve hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

Disodyum fosfat çözeltisi: 4,26 g Na_2HPO_4 veya (5,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) biraz distile suda çözülür ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı

Bir deney tüpüne 0,2 mL doku homojenatı konur. Vorteks ile karıştırılır. Üzerine 0.3 mL proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilir. Vorteksle karıştırılır. 5 dk. oda sıcaklığında bekletilir. 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Çökelti atılır. Süpernatant alınır. İki tane deney tübü alınır. Numune ve kör olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 12: Glutatyon tayin yöntemi

	<i>Numune</i>	<i>Kör</i>
<i>Distile su</i>	-	0,2 mL
<i>Süpernatant</i>	0,2 mL	-
<i>Na_2HPO_4</i>	0,8 mL	0,8 mL
<i>Elmann ayıracı</i>	0,1 mL	0,1 mL

Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk. bekletilir. Köre karşı 412 nm’de absorbanlar kaydedilir. Sonuçlar seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm’de ekstinksiyon katsayısı ($13600/\text{m}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanır.

5.11.8. Asetilkolin esteraz aktivitesi tayini

Asetilkolinesterazın asetiltiyokolini hidrolize etmesi ile açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak bilinen DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2- nitrobenzoik asit) ile reaksiyona girerek sarı renkli kromofor TNB (5-tiyo-2- nitrobenzoik asit) oluşumuna neden olur. 405 nm’de açığa çıkan bu sarı rengin şiddeti TNB oluşumu dolayısı ile AChE aktivitesi ile doğru orantılıdır (Ellman ve ark., 1961).

Gerekli çözeltiler

Fosfat tamponu (pH:7,5): 1070 mg Na_2HPO_4 , 295 mg NaH_2PO_4 80 mL distile suda çözülür, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlanır.

Asetiltiyokolin iyodür çözeltisi: 41,25 mg asetiltiyokolin iyodür, 1 mL pH 7,5 olan 100 mM Fosfat tamponunda çözülür.

DTNB (10mM): 39,6 mg DTNB 10 mL Fosfat tamponunda (pH 7,5) çözülür.

Tablo 13: Asetilkolin esteraz tayin yöntemi

	<i>Numune</i>
Fosfat Tamponu	0,65 mL
DTNB	0,025 mL
Örnek	0,1 mL
<i>Absorbanstaki artışın sabitlenmesi için 10 dk. beklenir.</i>	
Asetiltiyokolin iyodür (substrat)	0,005 mL

412 nm’de dakika başına 3 dakika boyunca absorban alınır.

Hesaplama: $5.74 \cdot (10^{-4}) \cdot \Delta A / \text{Co}$

Co: Dokunun ilk konsantrasyonu(mg/ml)

ΔA : Ortalama absorbans farkı

5.11.9. Alkalen fosfataz aktivitesi tayini

ALP enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenil fosfatı ortamın pH'ına bağlı olarak p-nitrofenol'a hidroliz etmektedir. Meydana gelen ürünün 405 nm'de verdiği absorbans spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Walter ve Schült, 1974).

Gerekli çözeltiler

0,1 N HCl çözeltisi: d=1,19 g/ml %37'lik HCl çözeltisinde 0,828 ml alarak biraz distile su üzerine konur. Sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Tampon çözelti (pH 9,8): 1,052 g dietanolamin, 8 mL 0,1 N HCl, 46,4 mg 4- nitrofenilfosfat 85 mL distile suda çözünür. 0,1 N HCl ile pH'sı 9,8'e ayarlanır. Sonra hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

0,05 N NaOH çözeltisi: 0,2 g NaOH biraz distile suda çözülür. Hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı:

Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 deney tüpü alınır.

Tablo 14: Alkalen fosfataz aktivitesi tayin yöntemi

	<i>Numune</i>	<i>Kör</i>
<i>Tampon çözeltisi</i>	2 mL	2 mL
<i>Distile su</i>	--	0,05 mL
<i>Doku homojenatı</i>	0,05 mL	--
<i>Vortexde karıştırılır ve oda temperaturede 30 dk inkübe edilir.</i>		
<i>NaOH çözeltisi</i>	10 mL	10 mL
<i>Vortexde karıştırılır ve 405 nm'de absorbans okunarak kaydedilir.</i>		

Hesaplama

Doku homojenatında ALP aktivitesi $Abs \times 434(U/L)$ formülü kullanılarak U/g protein cinsinden hesaplanır.

5.12. Beyin ve Hepatopankreas Dokusunda Keton Cisimleri Tayini

Çalışma için alınmış olan hepatopankreas ve beyin dokuları homojenize edildikten sonra -80°C’de saklanmıştır. Homojenizasyon sırasında santrifüj tüplerinin yerleştirileceği kısım uzun süre buzdolabı buzlukunda bekletilmiştir. Bu sayede homojenizasyon sırasında ısınma asgari düzeye indirilmiştir. Homojenizasyon için fosfat tamponu kullanılmıştır. Çalışılacak dokular –80°C’den çıkarılarak bir gün boyunca -20°C’de bekletilmiştir. Çalışma için Sigma-MAK134 kiti kullanılmıştır. Bu kitle beta hidroksitbütirat ve asetoasetat keton cisimlerinin kolorimetrik olarak 340 nm’de ölçülmesi sağlanmıştır. Kit içindeki prosedür ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

5.13. Beyin Dokusunda Dopamin ve DOPAC Düzeyi Tayini

LC-MS/MS, sıvı kromatografisi esasına dayanan bir yöntem ve cihazdır. Bu cihazı HPLC cihazının bir alt türü gibi tanımlanabilir ama kütle dedektörünün gelişmiş özellikleri ile farklı bir cihaz olarak değerlendirilir. Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek ölçme yöntemine göre çalışan cihazlardır. Kütle dedektörü iyon kaynağı, kütle analizörü ve iyon dedektörü olarak 3 kısımdan oluşur (Eser ve Dinçel, 2018).

Nörotransmitter analiz için alınan beyin dokuları serum fizyolojik ile homojenize hale getirilmiş ve -80°C’de saklanmıştır. Çalışma günü hazırlanan bu homojenatlar 13000g’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra LC/MSMS metodu ile ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümler dopamin ve DOPAC moleküllerini kapsamaktadır. Bu aşama SEM Laboratuvarlarında hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

5.14. Beyin Dokusunda Mikroarray Analizi

Mikroarray için hazırlanan maruziyet grupları lizatları -20°C’den çıkarılmış ve önce deney gruplarının tüm RNA’ları elde edilmiştir. Gruplardan elde edilen RNA’ların RIN değerlerine ve A_{260}/A_{280} oranına bakılmıştır. Değerler işleme devam etmek için yeterli olduğu görülmüştür. RNA’ları hazırlanan grupların konsantrasyonuna göre spike karışımları hazırlanmış ve örnekler ile birleştirilmiştir. Ardından etiketleme aşamasına geçilmiştir. Etiketleme boyunca T7 primerleri eklenmiştir, cDNA ve ardından cRNA oluşturulmuştur. Cyanine 3-CTP (cy3) boyası ile etiketlenmiş cRNA’lar amplifiye edilir, ardından saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma işlemi sonrası kalite kontrol adımıyla örneklerin konsantrasyonları, cy3 konsantrasyonu (pmol/ μ L) A_{260}/A_{280} değeri ölçülmüştür. Değerler işleme devam etmek için yeterli olduğu görülmüştür. Daha sonra hidridizasyon işlemine geçilmiştir. Hibridizasyon için hazırlanan örnekler

Mikroarray slide'ına yüklenmiş, hibridizasyon fırınında 17 saat inkübe edilmiştir. Bunun ardından slide'ın yıkanma işlemi ve daha sonrasında taranması gerçekleştirilmiştir. Slide tarandıktan sonra tiff imajı elde edilmiş, bu tiff imajı Feature Extraction yazılımıyla incelenmiştir, kalite raporları ve ham datalar (txt) çıkarılmıştır. Veri analizi için GeneSpring yazılımı kullanılmıştır.

5.15. Beyin Dokusunda Gen Ekspresyon Düzeyi Belirlenmesi (RT-PCR)

Maruziyet sonrası gen ifadeleri analizi için hazırlanan beyin ve hepatopankreas dokuları lizatları -20°C'den çıkarıldı. Daha sonra lizata etanol eklenerek RNA'nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli koşullar sağlanmış ve örnekler RNeasy spin kolonuna aktarılmıştır. Total RNA membrana bağlandığında kontaminantların da yıkanması ile RNA elüsyonu RNase-bulunmayan su içinde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma, yıkanma ve elüsyon işlemleri Qiacube (Qiagen) izalosyon cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu aşamada RNeasy Mini Kit kullanılmıştır. cDNA sentezi için ABM OneScript Plus cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Qiagen Rotor Gene-Q cihazı yardımıyla RT-PCR gerçekleştirilmiştir. RT-PCR için ABM Blastaq 2X qPCR MasterMix Kit kullanılmıştır. İncelenen primerler; ekspresyonu değişmeyen temel gen olarak *beta aktin 1 (actb1)* kullanılmıştır ve diğer araştırılan genler *prkn*, *pink1*, *lrrk2*, *dj1*, *mtor*, *atg5*, *sirt1*, *hmgcs1*, *slc16a16*, *slc5a2*, *pparg*, *pparb*, *tnfa* ve *il6*'dir. Örnekler tekrarlı çalışılmıştır.

5.15.1. Delta delta C_t metodu ile veri analizi

Verilerin analizi ekspresyonu değişmeyen temel gen *actb1* ile normalizasyona dayalı delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metodu kullanılarak yapılmıştır.

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

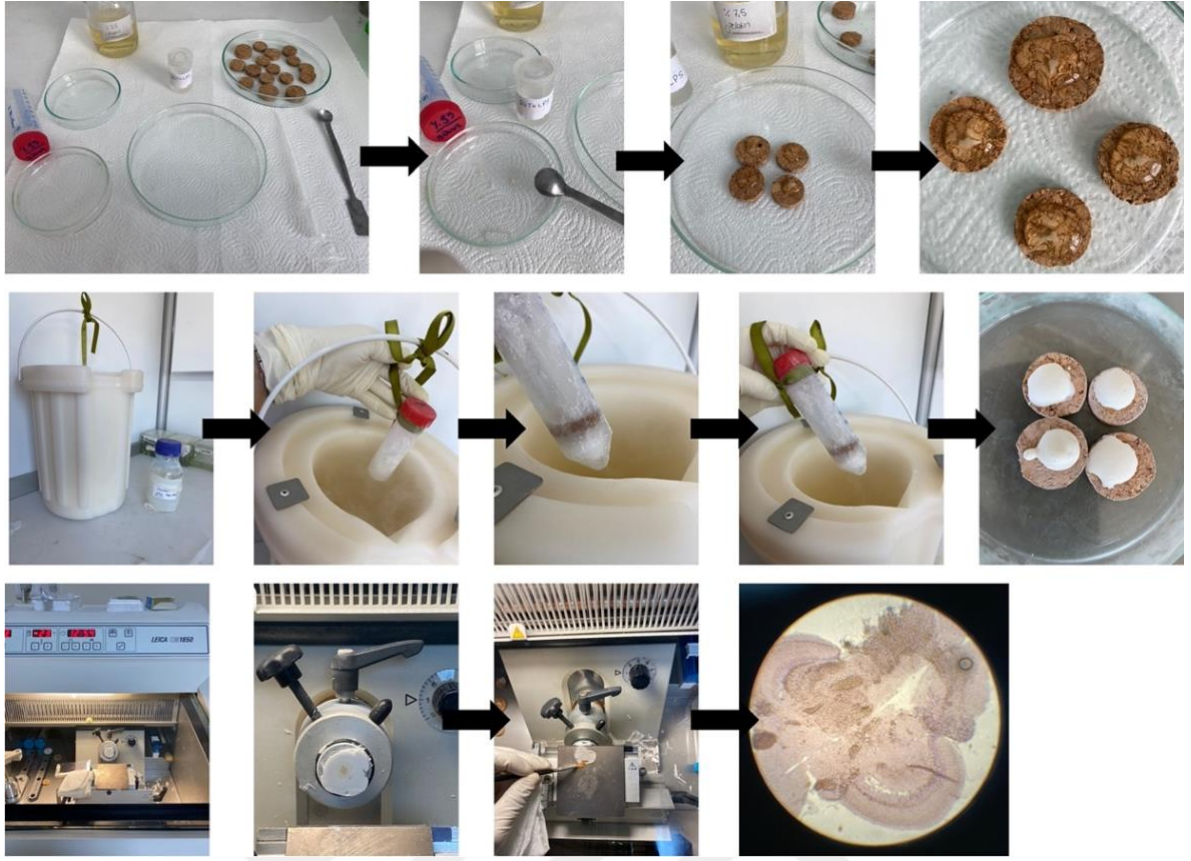
$$[\Delta\Delta C_t] = [\Delta C_t]_{\text{örnek}} - [\Delta C_t]_{\text{referans}}$$

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

5.16. Beyin Dokusunda İmmünohistokimyasal Boyama

Histolojik analizler için toplam 32 zebra balığı kullanılmıştır; 1) Kontrol, 2) ROT, 3) LPS, 4) ROT+LPS, 5) EMP, 6) ROT+EMP, 7) LPS+EMP, 8) ROT+LPS+EMP. Zebra balıklarından alınan beyin dokularında tirozin hidroksilaz (TH) ve lenfosit sitozolik protein 1 (Lcp1) seviyelerinin analizleri için immünohistokimya (IHC) yöntemi kullanılmıştır.

Histolojik analizler için alınan beyin dokuları, 0,1 M fosfat tampon (PBS) (pH 7,4) ile hazırlanan % 4'lik paraformaldehit (PFA) içinde 4°C'de 24 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrası PBS ile yıkanan dokular; kriyoprotektan ajan olarak, önce %25 sükröz solüsyonunda (0,1 M fosfat tampon) 2,5 saat, daha sonra %35 sükröz solüsyonunda 12 saat inkübe edildi (4°C). Ardından beyin dokusu, gömme ortamı olarak kullanılan sükröz (20% w/v) – jelatin (7.5% w/v, Sigma) karışımına horizontal olarak gömüldü (Li ve ark., 2014). Mantar üzerine gömülen dokular, gömme ortamının kıvamlı hale gelmesi için oda sıcaklığında (RT'de) bekletildi, sonra izopentan ve sıvı azot kullanılarak yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu (Şekil 10). Dondurulan dokular, kriyostat (Şekil 10) ile kesit alma işlemine kadar -80°C'de saklandı. Her bir beyin dokusundan, seri kesit ile yaklaşık 200-250 kesit (5 µm) alındı. Doku kesitleri, IHC analizine kadar -20°C'de saklandı. IHC analizi için, tüm gruplarda aynı seviyeden (62.-71.) kesitler kullanıldı. Böylece, tüm gruplar için beyin örnekleri aynı seviyeden analiz edildi. Her gruptan 4 doku kesitine IHC analizi yapıldı.



Şekil 10: Beyin dokularının dondurulması ve kesit alınması işlemi. Dokuların horizontal olarak mantar üzerinde gömme ortamına yerleştirilmesi ardından izopentan ve sıvı azot kullanılarak yapılan yavaş dondurma yöntemi gösterilmiştir. Dondurulan dokulardan kriyos ile 5 µm kalınlığında alınan kesitlerden bir kısmı boyandı ve ışık mikroskopik olarak lokalizasyonu belirlendi.

5.16.1. Tirozin hidroksilaz immünohistokimyası

Beyin dokusunda, dopaminerjik nöron belirteci olan tirozin hidroksilaz (TH)'ın ekspresyon seviyesinin incelenmesi için IHC yöntemi kullanılmıştır. Doku kesitleri, RT'de 10 dakika (dk), 37°C'de PBS içerisinde 15 dk bekletildikten sonra, gömme ortamının uzaklaştırılması sağlandı. Soğuk %4'lik PFA (0,1 M fosfat tampon) ile fiksasyon sonrası PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra, %0,3 Triton X-100 (0,1 M fosfat tampon) solüsyonunda bekletilerek doku kesitlerinin geçirgenliği artırıldı. %2 BSA (sığır serum albumini) (T-PBS; % 0,1 Tween içeren PBS) ile bloklama sonrası mouse monoklonal TH antikor (1:4000, #22941; Immunostar, Hudson, USA) ile 4°C'de 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası RT'ye getirilen dokular yıkandı. Doku kesitlerine sırasıyla biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonu ve bayır turbu peroksidaz solüsyonu (ScyTek: SHP125) uygulandı. TH immün boyaması için kromojen olarak DAB kullanıldı. Yıkama işleminden sonra 1 dk Mayer hematoksileni uygulanarak zıt boyama yapıldı ve ardından dehidrasyon sonrasında entellan ile kapatıldı.

Beyin doku kesitlerinde TH için immün işaretleme yapılarak dopaminerjik nöron seviyesi değerlendirildi. Tüm kesitler Olympus BX61 ışık mikroskopunda incelenip aynı ayarlarda (exposure: 20,45 ms) fotoğraflandı (CellSens yazılımı; DP72; Olympus, Tokyo, Japan). Beyin dokusunun diensefalon bölgesinden çekilen 40X görüntülerde Fiji yazılımı kullanılarak skorlama yapıldı (Crowe ve Yue, 2019, Kaslin ve Panula, 2001). Fiji yazılımında DAB renk kanalına ait mikrografa uygulanan '*eşik değeri (threshold)*' komutu sonrasında pozitif hücreler belirlendi ve skorlandı.

5.16.2. Lenfosit sitozolik protein 1 immünohistokimyası

Beyin dokusunda, monosit/makrofaj hücre soyuna ait belirteç olan lenfosit sitozolik protein 1 (L-plastin, lcp1) protein ekspresyon seviyesinin incelenmesi için immün işaretleme yapıldı (Lelieveld ve ark., 2022). IHC analizi için doku kesitleri, RT'de 10 dk, 37°C'de PBS içerisinde 15 dk bekletildikten sonra gömme ortamının uzaklaştırılması sağlandı. Doku kesitleri soğuk metanolde (-20°C) 10 dk bekletilip T-PBS ile yıkandı. Ardından RT'de doku kesitlerine, %2 BSA ve %1 DMSO solüsyonu ile 1 saat bloklama yapıldı. Kesitler bloklama sonrası, tavşan poliklonal lcp1 antikor (1:500, #GTX124420; GeneTex, Kaliforniya, USA) ile 4°C'de 16-18 saat inkübe edildi (Lelieveld ve ark., 2022). Yıkama sonrası doku kesitlerine biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonu ve bayır turbu peroksidaz solüsyonu (ScyTek: SHP125) uygulandı. Lcp1 immün boyaması için kromojen olarak AEC kullanıldı. Kesitler yıkandıktan sonra 1 dk Mayer hematoksileni uygulanarak zıt boyama yapıldı. Yıkama sonrası doku kesitleri, su bazlı kapatma medyumunu ile kapatıldı.

Beyin doku kesitlerinde lcp1 için işaretleme yapılarak mikrogliya belirtecinin miktarı immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Tüm kesitler Olympus BX61 ışık mikroskopunda incelendi ve aynı ayarlarda (exposure: 21,75 ms) fotoğraflandı (CellSens yazılımı; DP72; Olympus, Tokyo, Japan). Beyin dokusunda, 3. ventrikül ve lateral ventriküllerin çevresindeki bölgelerden 40X büyütme ile çekilen alanlar Fiji yazılımı kullanılarak skorlandı (Crowe ve Yue, 2019, Lelieveld ve ark., 2022). Fiji yazılımında AEC renk kanalına ait mikrografa uygulanan '*eşik değeri (threshold)*' komutu sonrasında pozitif hücreler belirlendi, lcp1 immün işaretleme boyanmanın şiddeti ve yoğunluğuna göre skorlandı (Gence ve ark., 2022).

5.17. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Graph Pad Prism 9 istatistik programı kullanıldı ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) değerleri ile ifade edildi. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Saphiro-Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma sahip, ikiden

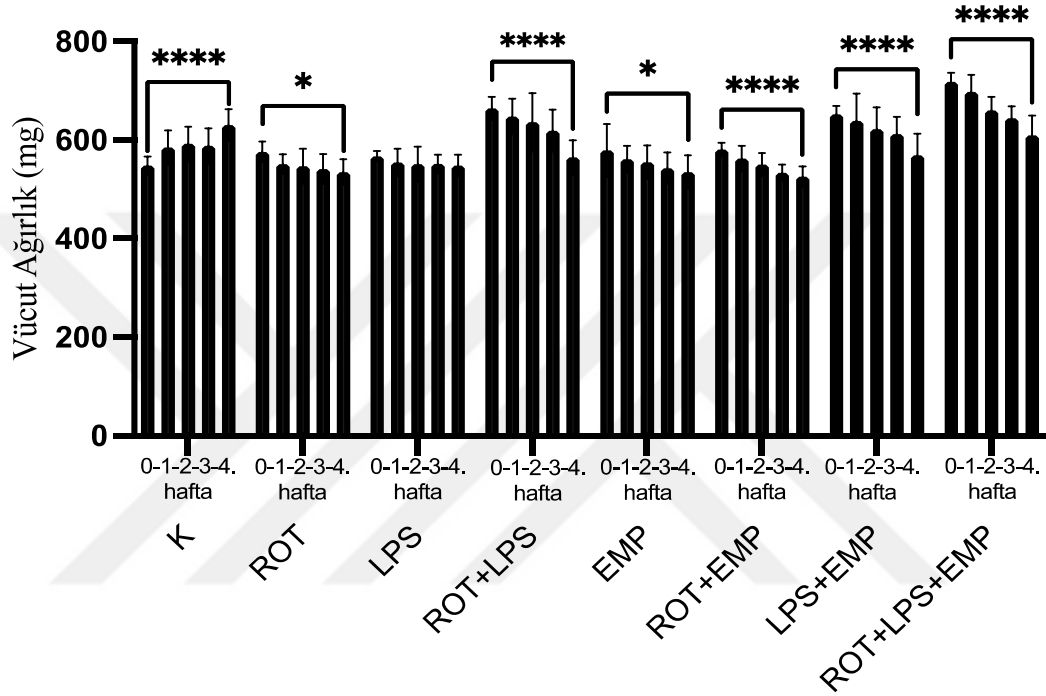
fazla grup ortalamasının karşılaştırılması; parametrik Tek Yönlü Varyans (Tek Yönlü ANOVA) analizi ile yapıldı. Anlamlı fark durumunda, gruplar arasındaki anlamlılık post-hoc Tukey HSD testi kullanılarak analiz edildi. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.



6. BULGULAR

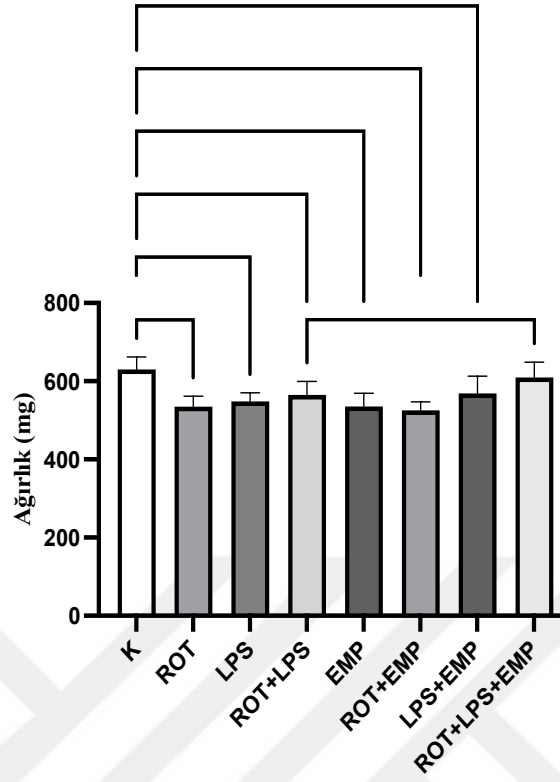
6.1. Grupların Ortalama Ağırlıklarının Sonuçları

Balıkların başlangıçta ve 4 hafta boyunca belirlenen vücut ağırlıkları Şekil 11’de verilmiştir. Kontrol grubunda 4 hafta sonunda vücut ağırlıklarında artış, LPS dışındaki diğer gruplarda ise başlangıca göre 4. hafta sonunda azalma görülmüştür. Grupların 4.hafta vücut ağırlıklarının karşılaştırılması Şekil 11’te verilmiştir.



Şekil 11: Grupların vücut ağırlıklarının deney boyunca değişimi **** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05

4.hafta Vücut Ağırlığı



Şekil 12: Grupların 4.hafta vücut ağırlıklarının karşılaştırılması **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

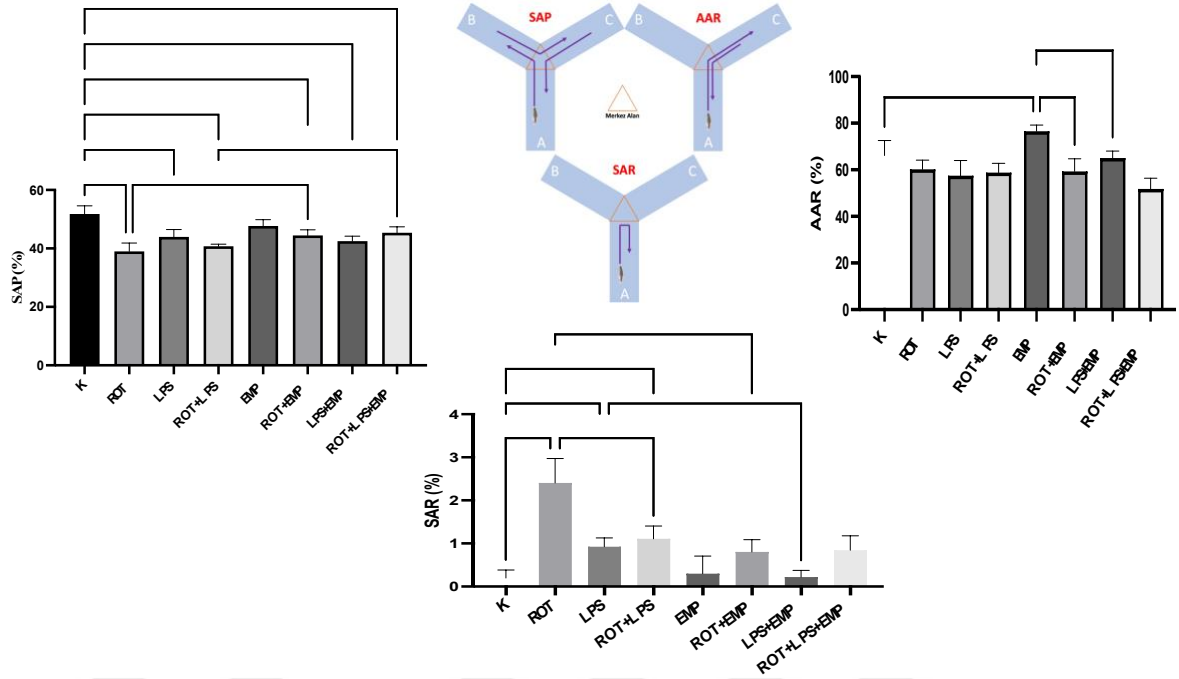
Çalışmamızda ROT, LPS, ROT ile beraber LPS (ROT+LPS) ve EMP uygulanan gruplarda vücut ağırlıkları 4.hafta sonunda kontrol grubuna kıyasla azalmıştır (Şekil 12). Bu azalma ROT+LPS+EMP grubu dışında tüm istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca başlangıç ile kıyaslandığında ROT, ROT+LPS, EMP, ROT+EMP, LPS+EMP ve ROT+LPS+EMP gruplarında 4.hafta sonunda vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 12).

6.2. Davranış Analizleri Sonuçları

Davranış analizlerinin ToxTrac programından alınan sonuçları aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

6.2.1. Y-labirenti sonuçları

Tüm gruplarda maruziyet sonrası zebra balıkları beş dakika boyunca Y-labirenti testine tabi tutulmuştur. Daha sonra Kinovea programında zebra balıkları izlenmiş ve hareketleri kaydedilmiştir. Hareketlerin analizi için Microsoft Excell programı kullanılarak Şekil 13'deki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 13: Grupların SAP, SAR ve AAR oranlarının karşılaştırılması **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. SAR: Same Arm Return, Aynı Kol Dönüşü, SAP: Spontaneous Alteration Performance, Spontan Değişim Performansı; AAR: Alternative Arm Return, Alternatif Kol Dönüşü

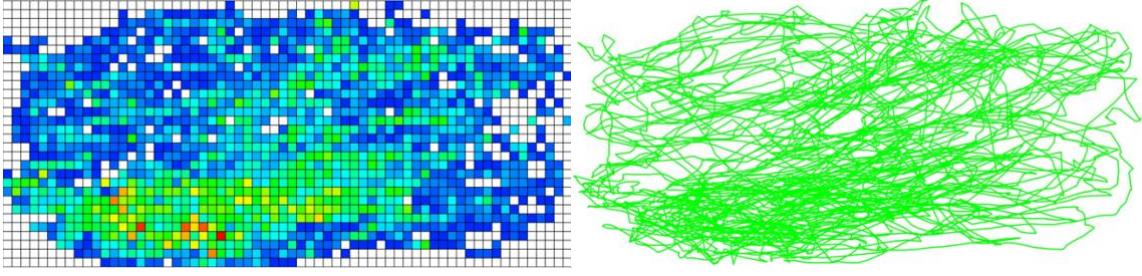
Y-maze Testi çalışmamızda ROT ve LPS gruplarında SAP değerleri kontrol grubuna göre azalırken, ROT ve ROT+LPS gruplarında EMP uygulaması SAP değerlerini arttırmıştır. Çalışmamızda AAR şeklinde ölçülen alternatif kol dönüşleri, ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında değişmezken EMP grubunda artmıştır. Çalışmamızda SAR değeri ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında kontrol grubuna göre artmıştır. ROT ve LPS gruplarında EMP uygulaması SAR değerini azaltmıştır (Şekil 13).

6.2.2. Lokomotor aktivite sonuçları

Tüm gruplarda maruziyet sonrası zebra balıkları tank içinde beş dakika boyunca yüzme hareketleri video kayıt altına alınmıştır. Kinovea programında zebra balıkları izlendikten sonra ToxTrac programı yardımıyla sonuçlar ve görseller elde edilmiştir.

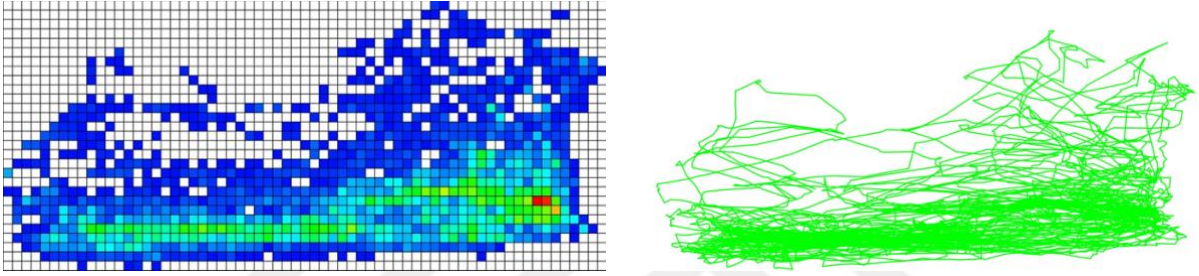
6.2.2.1. Keşfedilen alan

Kontrol grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 14'te gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



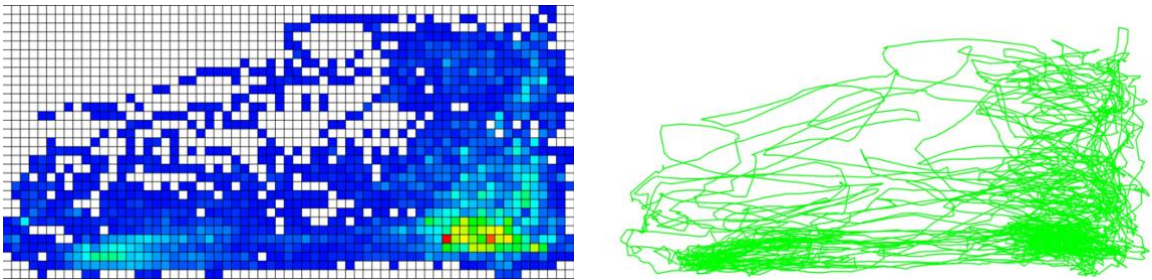
Şekil 14: Kontrol grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

ROT grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 15’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



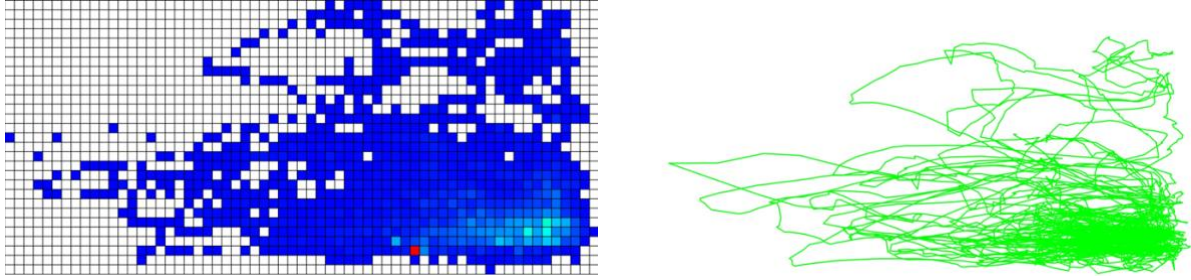
Şekil 15: ROT grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

LPS grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 16’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



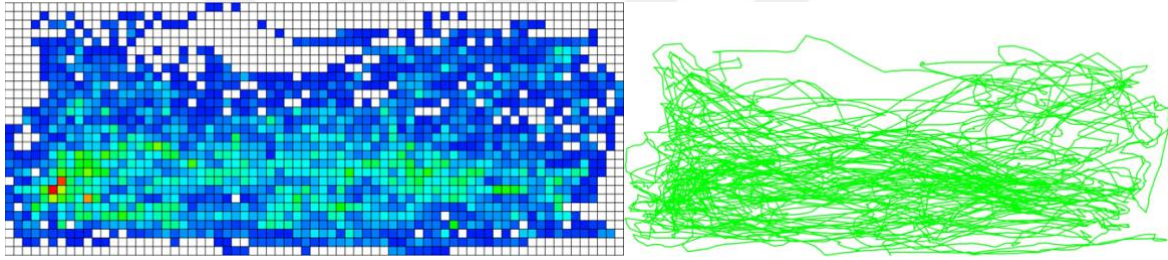
Şekil 16: LPS grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

ROT+LPS grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 17’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



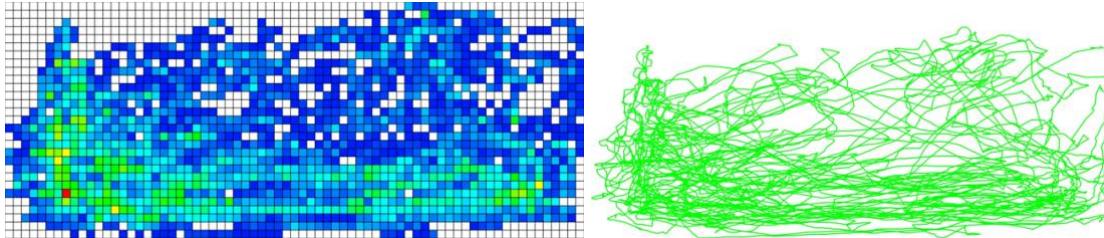
Şekil 17: ROT+LPS grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

EMP grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 18’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



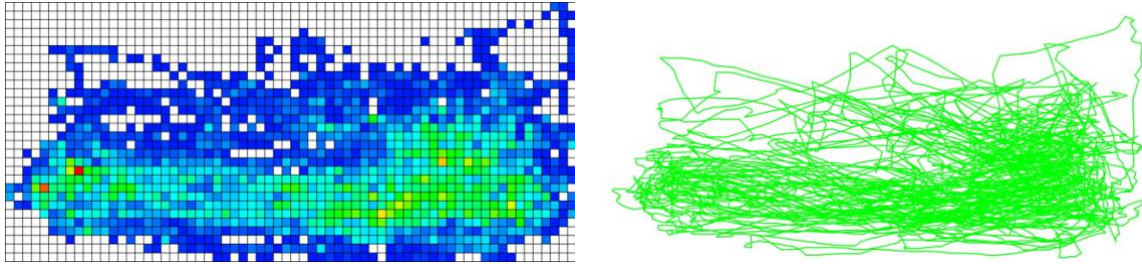
Şekil 18: EMP grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

ROT+EMP grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 19’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



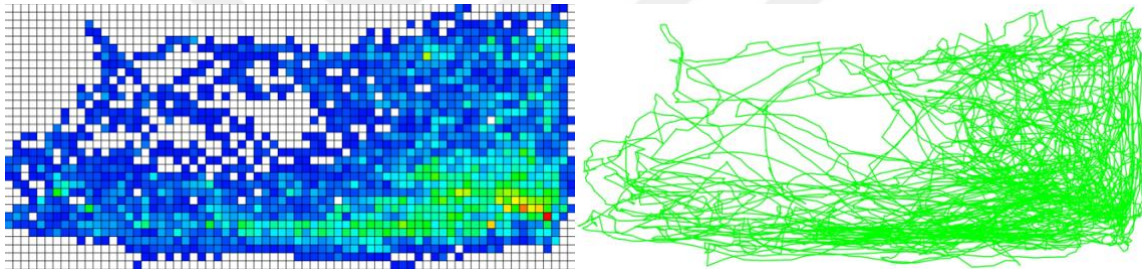
Şekil 19: EMP+ROT grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

LPS+ EMP grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 20’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.



Şekil 20: LPS+EMP grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

ROT+LPS+EMP grubundaki balıkların tank içerisinde keşfettikleri alan piksel ve çizgi formatında Şekil 21’de gösterilmiştir. Zebra balıklarının yoğun olarak bulunduğu alanlar yeşil ve kırmızı, daha az bulundukları alanlar ise mavi ve açık mavi renktedir.

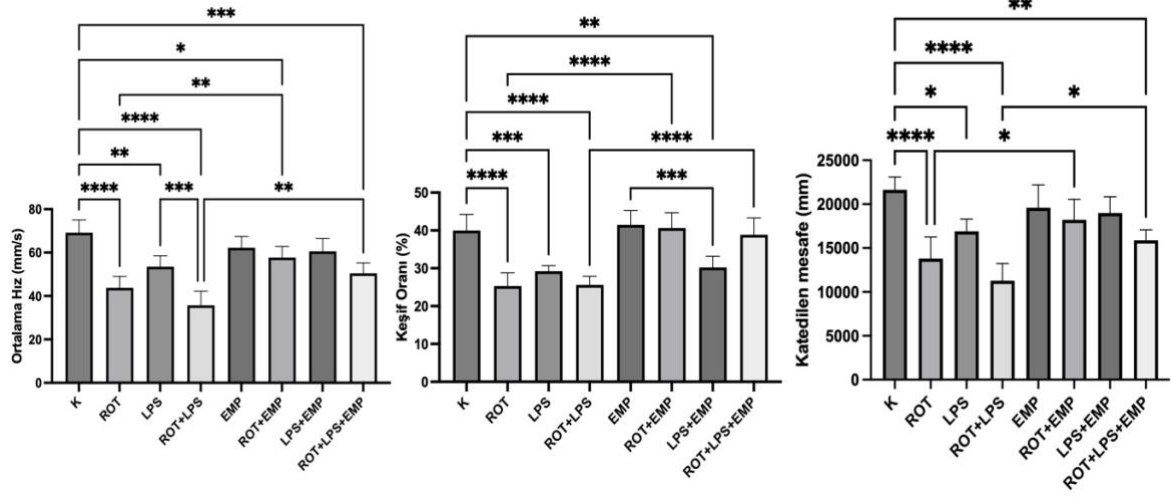


Şekil 21: ROT+LPS+EMP grubu zebra balıklarının keşfettikleri alanın piksel ve çizgi formatında gösterimi.

6.2.2. Grupların lokomotor aktivite değerlerinin karşılaştırması

Lokomotor aktivite çalışmamızda ROT ve ROT+LPS grupları ortalama hız değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. ROT+LPS+EMP ortalama hız değerleri kontrol grubuna göre ve LPS grubu ortalama hız değerleri ROT+LPS grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. ROT, LPS ve ROT+LPS grupları keşif oranı değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. ROT+EMP grubu keşif oranı değerleri ROT grubuna göre ve ROT+LPS+EMP grubunun keşif oranı değerleri ROT+LPS grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. ROT ve ROT+LPS grupları katedilen mesafe değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır.

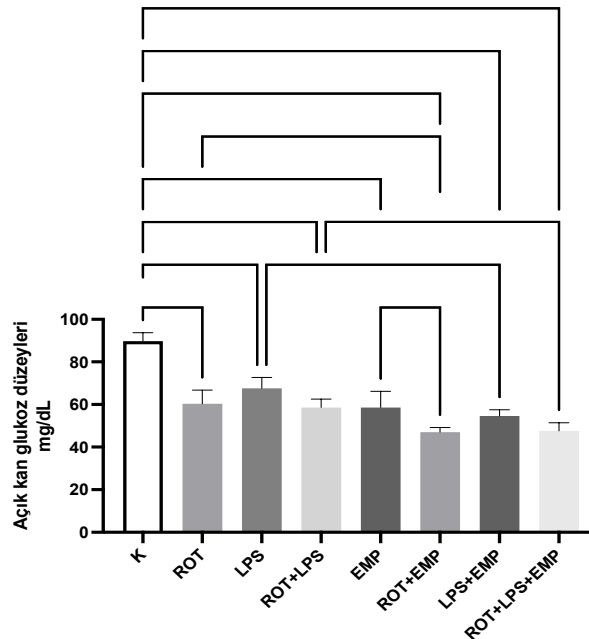
Tüm gruplar beş dakikalık video kaydı sonrası ToxTrac programı ile yapılan analizlerin sonuçları Şekil 22’de verilmiştir.



Şekil 22: Grupların lokomotor aktivite değerlerinin karşılaştırılması (Sırasıyla Ortalama hız (mm/s), Keşif Oranı (%), Katedilen mesafe (mm)) **** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

6.3. Kan Glukoz Tayini Sonuçları

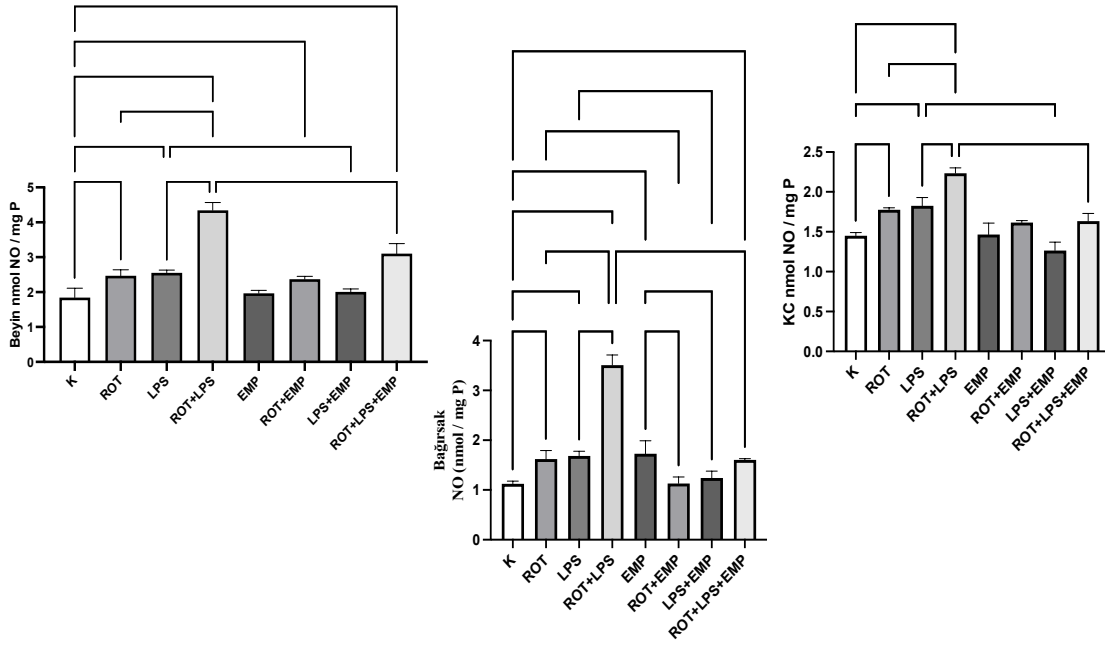
Çalışmamızda ROT grubuna benzer şekilde LPS uygulanan grupta da kan glukoz düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Yine çalışmamızda uygulanan idrarla glukoz atılımını artırarak kan şekerini düşüren, glisemik kontrolü iyileştiren, vücut ağırlığını ve kan basıncını düşüren SGLT2'i'ü yeni bir ajan olarak EMP, kan glukoz düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşürmüştür. Ayrıca ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında EMP uygulaması kan glukoz değerlerinde bu gruplara göre azalmaya neden olmuştur (Şekil 23).



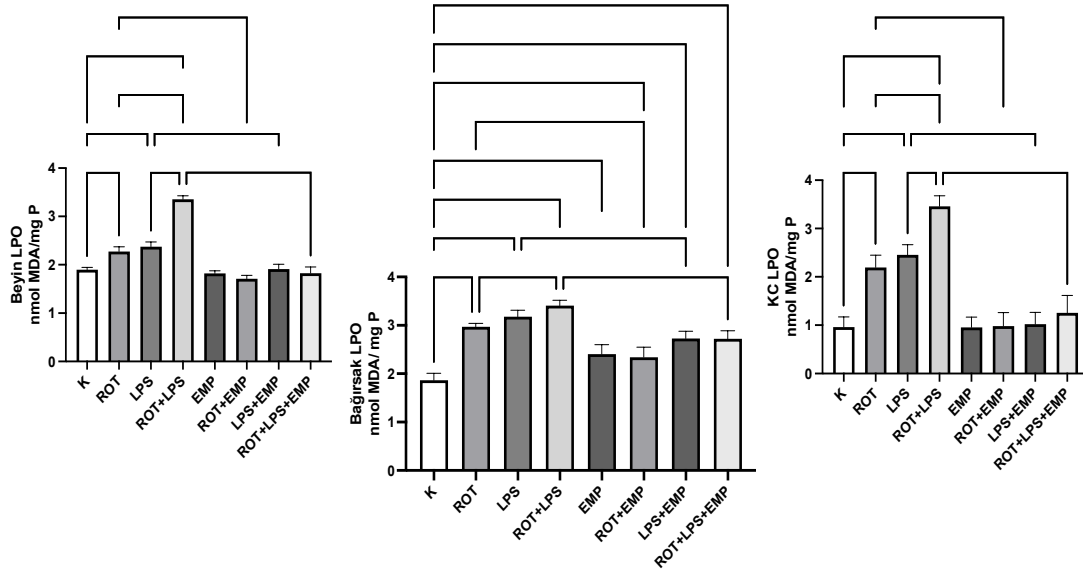
Şekil 23: Grupların 4. Hafta sonunda açlık kan glukoz düzeylerinin karşılaştırılması **** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$

6.4. Biyokimyasal Parametrelerin Sonuçları

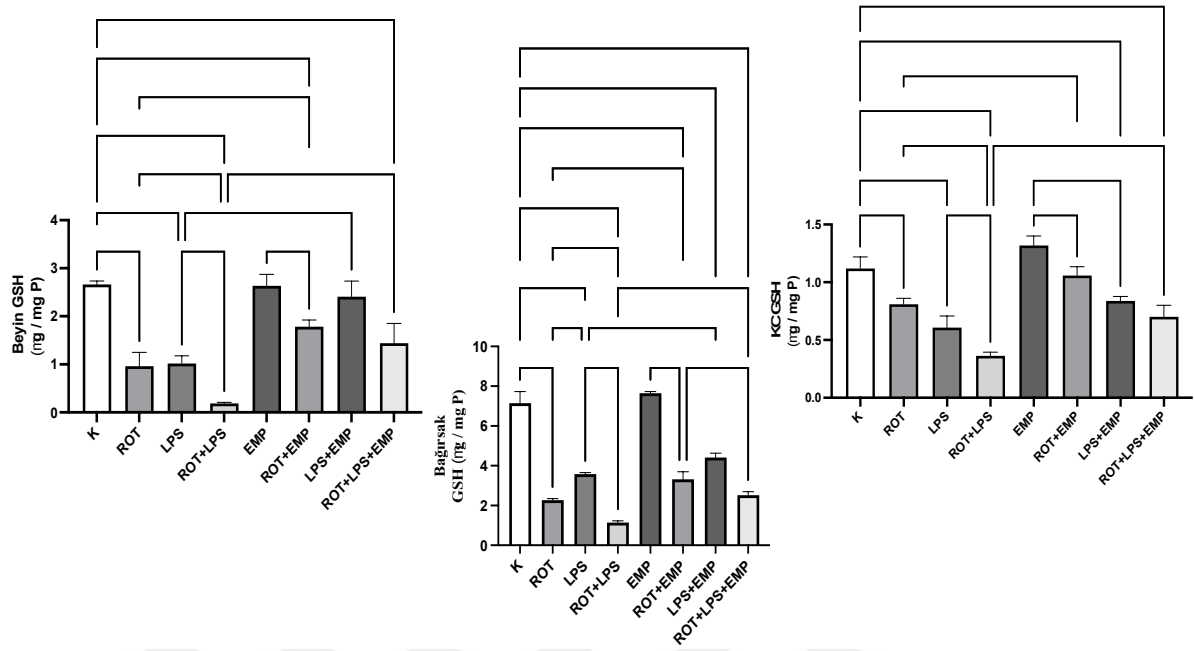
Çalışmamızda ROT, LPS enjeksiyonu ve ROT ile LPS'nin beraber uygulanması beyin, bağırsak ve hepatopankreasda oksidatif stres belirteçlerinden LPO ve NO'da artışa neden olmuştur (Şekil 24, Şekil 25). EMP uygulaması incelenen tüm dokularda antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirmiş ve oksidatif stres belirteçlerini azaltmıştır. EMP, LPO düzeylerini ROT, LPS enjekte edilen ve ROT ile LPS'nin beraber uygulandığı gruplarda azaltırken, NO düzeylerini ROT ile LPS'nin beraber uygulandığı grupta düşürmüştür. EMP'nin antioksidan etkisi dokularda ROT ve LPS'ye bağlı olarak azalan GSH düzeylerini ve SOD aktivitelerini arttırmak yönünde olmuştur (Şekil 26, Şekil 27). Beyin dokusunda GST aktivitesi kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı artışlar göstermiştir. EMP, uygulanan gruplarda GST aktivitesi maruziyet gruplarına göre anlamlı artışlar bulunmuştur. Bağırsak dokusunda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar kaydedilmiştir. ROT+LPS grubuna göre EMP+ROT+LPS grubu bağırsak dokusunda GST aktivitesinde anlamlı artış göstermiştir. Hepatopankreas dokusunda GST aktivitesi EMP hariç diğer gruplarda artışlar gözlenmiştir. LPS grubuna göre LPS+EMP grubunun hepatopankreas dokusunda GST aktivitesi anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 28). Beyin ve hepatopankreasda LPS intraperitoneal enjeksiyonu, sialik düzeylerinde artışa neden olmuştur. Bu artış LPS ile indüklenen inflamasyona ve beyinde mikrogliyal aktivasyona bağlı olabilir. Bu dokularda EMP uygulaması artan sialik düzeylerini normalize etmiştir (Şekil 29). Beyin dokusunda kontrol grubuna göre ROT+LPS grubunda ALP aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bağırsak dokusunda ise kontrol grubuna göre ROT, LPS, ROT+LPS, LPS+EMP ve ROT+LPS+EMP gruplarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. ROT+LPS grubuna göre ROT+LPS+EMP grubunda ALP aktivitesinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Hepatopankreas dokusunda ise kontrol grubuna göre ROT, LPS, ROT+LPS, LPS+EMP ve ROT+LPS+EMP gruplarında ALP aktivitesinde anlamlı artış kaydedilmiştir (Şekil 30). Beyinde ROT ve LPS gruplarında artan asetilkolin düzeyleri bu gruplarda azalan bozulan hafıza yeteneğini iyileştirmeye yönelik bir cevap olarak değerlendirilebilir. EMP, hepatopankreas ve beyinde ROT+LPS gruplarında AChE aktivitesini normalize etmeye yönelik etki göstermiştir (Şekil 31). Çalışmada ele alınan biyokimyasal parametrelerin sonuçları grafiklerde verilmiştir.



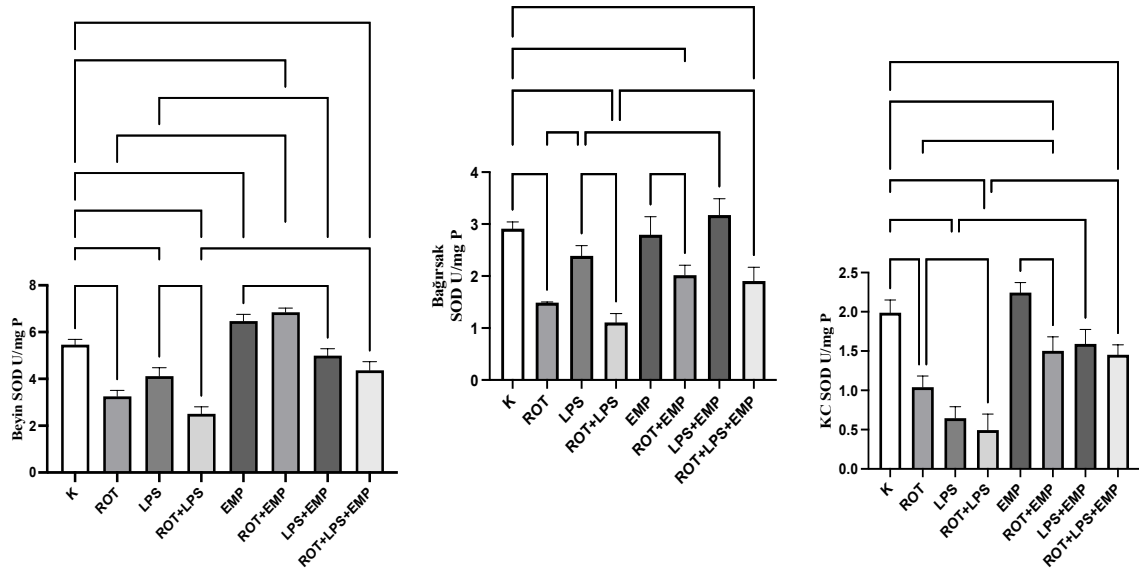
Şekil 24: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



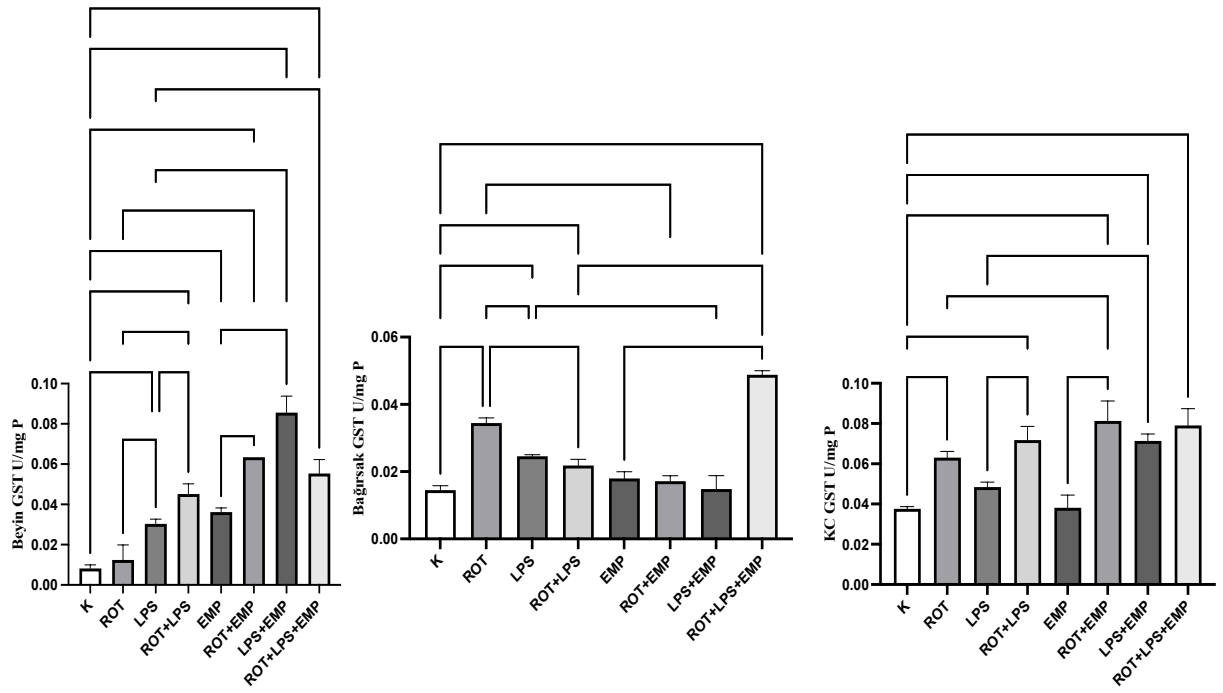
Şekil 25: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas lipid peroksidasyon düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



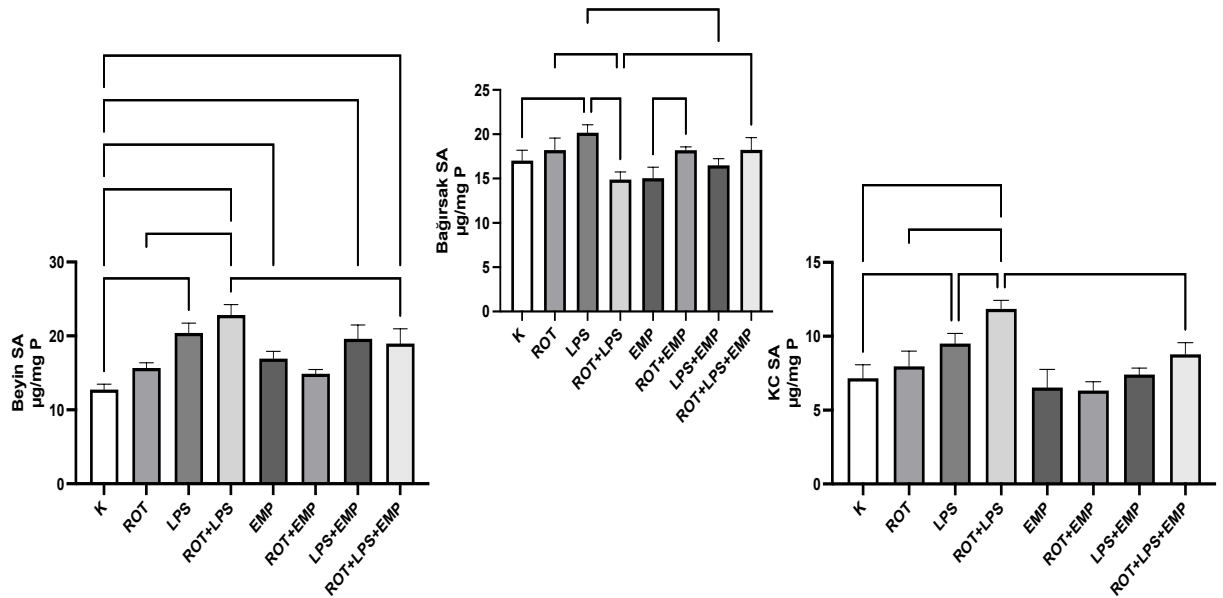
Şekil 26: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



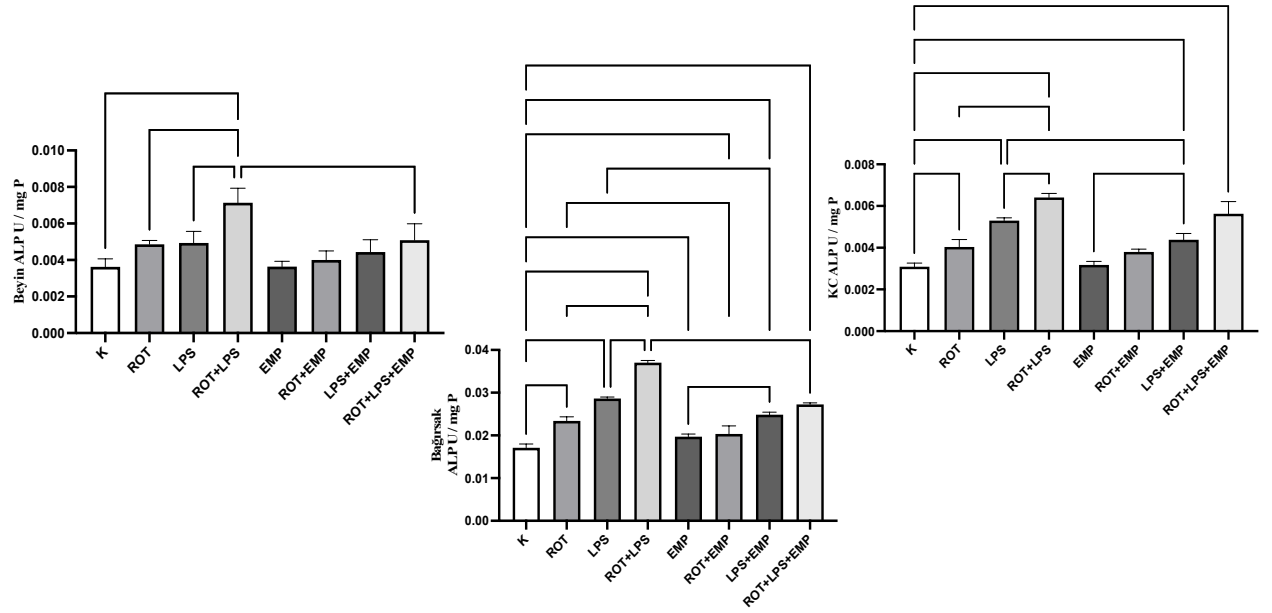
Şekil 27: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



Şekil 28: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas glutatyon s-transferaz aktivitelerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

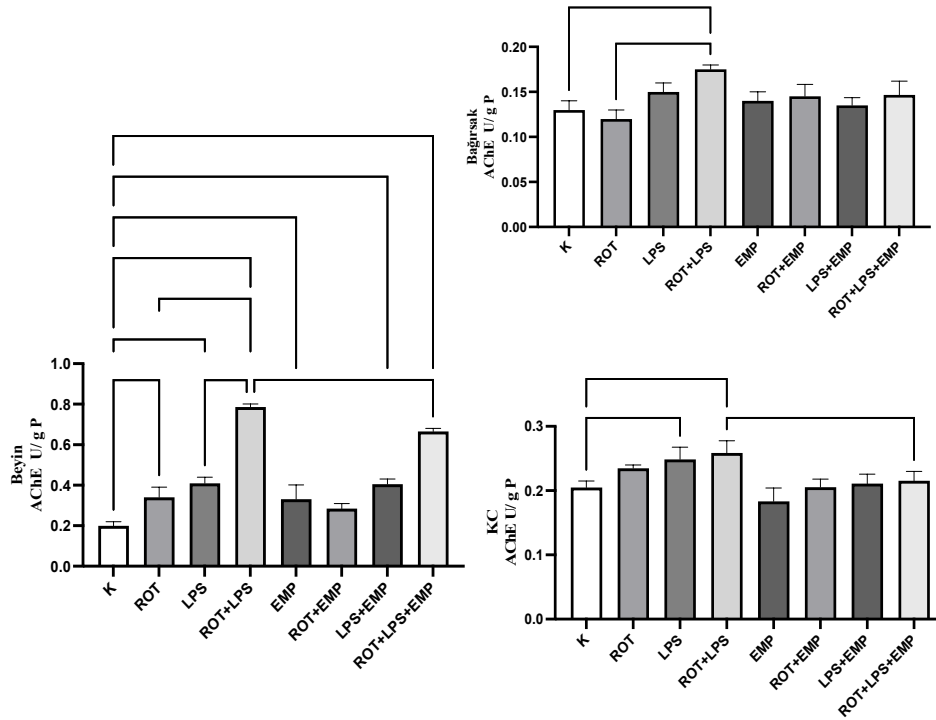


Şekil 29: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas sialik asit düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



Şekil 30: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas alkaleen fosfataz aktivitelerinin karşılaştırılması.

**** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

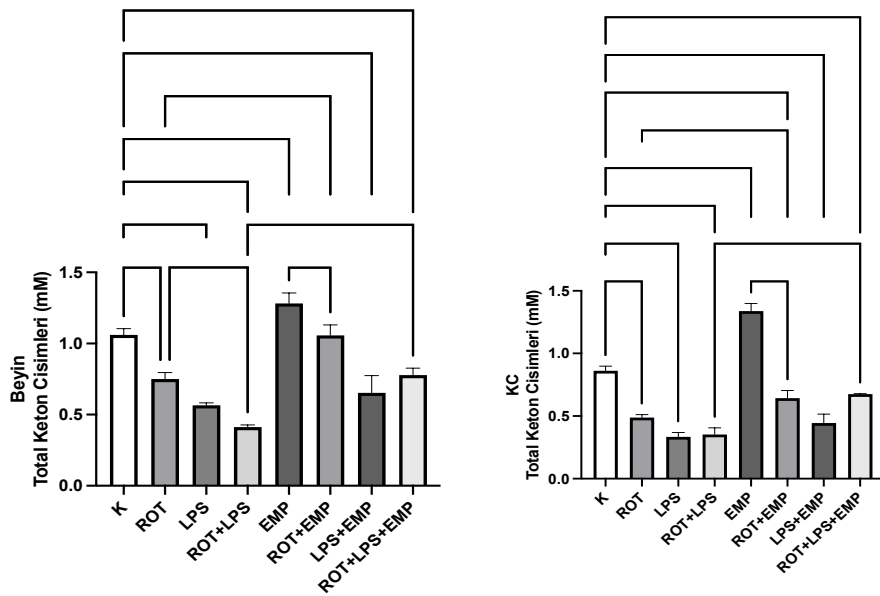


Şekil 31: Grupların beyin, bağırsak ve hepatopankreas asetilkolin esteraz aktivitelerinin karşılaştırılması.

**** p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

6.5. Keton Cisimleri Tayini Sonuçları

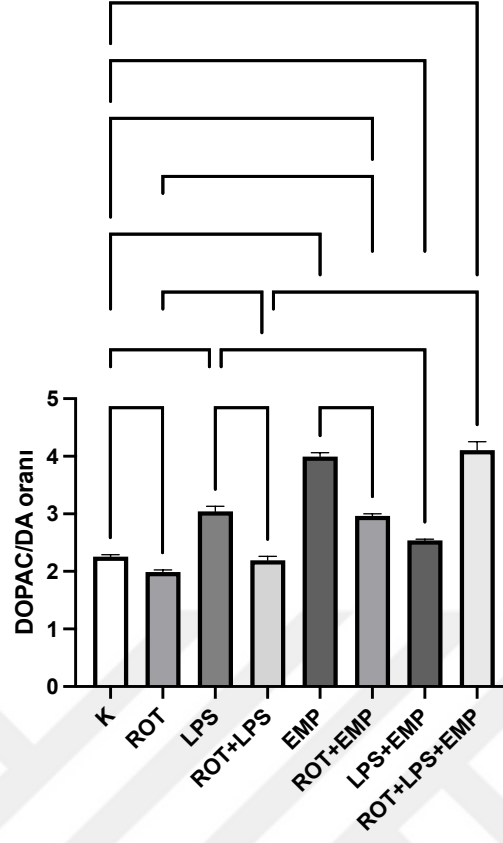
Çalışmamızda beyin ve hepatopankreas dokularında ROT+LPS, ROT ve LPS’de toplam keton cisimleri miktarları anlamlı olarak azalmıştır. Grafiklere EMP grubunda beyin ve karaciğer dokusunda toplam keton cisimleri miktarlarında artış görülmüştür. ROT+LPS+EMP grubu, ROT+LPS grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda EMP’nin etkisi ile keton cisimleri sentezinde anlamlı artışlar görülmüştür. Çalışmamızda alınan beyin ve hepatopankreas dokularında keton cisimleri miktar tayini sonuçları Şekil 32’de verilmiştir.



Şekil 32: Grupların beyin ve karaciğer toplam keton cisimleri miktarlarının karşılaştırılması. ****
p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

6.6. Nörotransmitter Düzeyi Sonuçları

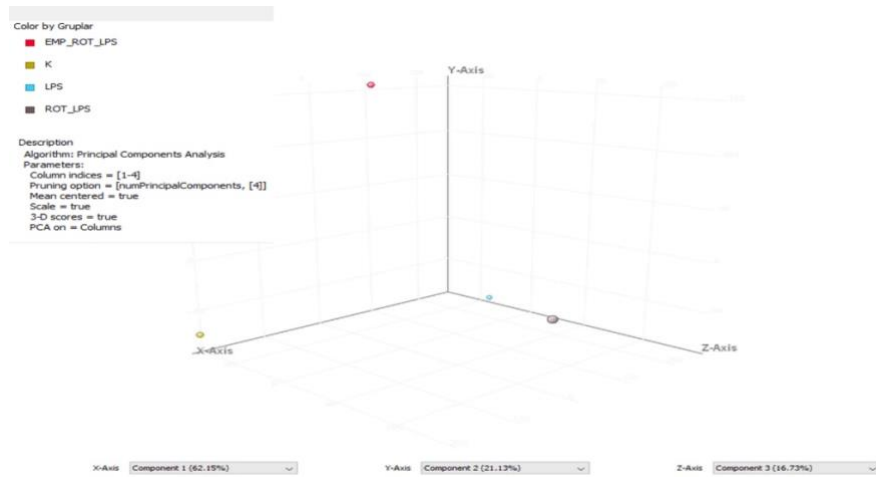
Çalışmamızda DOPAC/DA oranı ROT grubunda KONT grubuna göre azalırken, LPS ve EMP gruplarında artmıştır. EMP uygulaması ise ROT grubunda azalan DOPAC/DA oranını arttırmaya, LPS grubunda ise artan DOPAC/DA oranını azaltmaya yönelik etki göstermiştir. Bu bulgu EMP’nin antioksidan etkisinden dolayı dopamin metabolizmasındaki değişiklikleri düzeltmeye yönelik etkisini işaret etmiştir. Çalışmamızda LC-MS/MS’den çıkan verilere göre nörotransmitter analizi sonuçları Şekil 33’de oransal olarak verilmiştir.



Şekil 33: Grupların DOPAC/Dopamin oranlarının karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

6.7. Mikroarray Analizi Sonuçları

Grupların analizi sonucu ortaya çıkan verilerin temel bileşen analizi yapılmış ve üç boyutlu grafikte gösterilmiştir. ROT+LPS+EMP ve KONT grubu diğer gruplardan açık bir şekilde ayrılmıştır. Ancak LPS ve ROT+LPS gruplarında bu ayrışma gözlenmemiştir (Şekil 34).



Şekil 34: Mikrodizi verilerinin temel bileşen analizi. Verilerin dört ana bileşeni gösterilmektedir. En alttaki sayılar kümülatif katkı oranını gösterir.

Tablo 15: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre azalan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
rab1aa	RAB1A, member RAS oncogene family a	-987,153	Aşağı
kcnk4a	potassium channel, subfamily K, member 4a	-727,252	Aşağı
npr1b	natriuretic peptide receptor 1b	-442,747	Aşağı
ryr2b	ryanodine receptor 2b (cardiac)	-68,628	Aşağı
ubap2l	ubiquitin associated protein 2-like	-42,256	Aşağı
lrp2a	low density lipoprotein receptor-related protein 2a	-37,476	Aşağı
ano1a	anoctamin 1, calcium activated chloride channel a	-32,351	Aşağı
smox	spermine oxidase	-30,805	Aşağı
ilf3a	interleukin enhancer binding factor 3a	-30,092	Aşağı
nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	-28,223	Aşağı
fosb	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	-24,656	Aşağı
klhl22	kelch-like family member 22	-24,058	Aşağı
pvalb5	parvalbumin 5	-21,839	Aşağı
ifi27.2	interferon alpha inducible protein 27.2	-17,022	Aşağı
rubcn	rubicon autophagy regulator	-16,563	Aşağı
usp34	ubiquitin specific peptidase 34	-16,147	Aşağı
ifi27.1	interferon alpha inducible protein 27.1	-13,933	Aşağı
npffl	neuropeptide FF-amide peptide precursor like	-13,488	Aşağı
map3k4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	-13,474	Aşağı
s100a11	S100 calcium binding protein A11	-13,304	Aşağı
pimr128	Pim proto-oncogene, serine/threonine kinase, related 128	-12,993	Aşağı
mycbp2	MYC binding protein 2	-12,888	Aşağı
lrch2	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 2	-12,763	Aşağı
mc2r	melanocortin 2 receptor	-12,734	Aşağı
gmps	guanine monophosphate synthase	-12,633	Aşağı
usp37	ubiquitin specific peptidase 37	-12,379	Aşağı

Tablo 16: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre azalan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
lgals9l4	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)-like 4	-12,266	Aşağı
adcy1b	adenylate cyclase 1b	-11,120	Aşağı
ola1	Obg-like ATPase 1	-11,112	Aşağı
nrxn3a	neurexin 3a	-10,727	Aşağı
abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	-10,612	Aşağı
dagla	diacylglycerol lipase, alpha	-10,506	Aşağı
gripap1	GRIP1 associated protein 1	-10,154	Aşağı
noxo1a	NADPH oxidase organizer 1a	-10,034	Aşağı

Tablo 17: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre belirgin genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
cyp2k19	cytochrome P450, family 2, subfamily k, polypeptide 19	485,719	Yukarı
cldng	claudin g	87,945	Yukarı
serpina1	wu:fb61c07	86,521	Yukarı
cldnd	claudin d	57,329	Yukarı
gnb3b	wu:fk54b04	51,610	Yukarı
serpinf2a	wu:fd57d08	51,058	Yukarı
guca1c	guanylate cyclase activator 1C	44,499	Yukarı
gngt2a	wu:fk53d05	43,204	Yukarı
crp2	C-reactive protein 2	39,792	Yukarı
serpina7	zgc:103617	38,308	Yukarı
gngt2b	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2b	33,656	Yukarı
apoa4b.1	wu:fb64f03	33,211	Yukarı
grk7a	G protein-coupled receptor kinase 7a	31,939	Yukarı

Tablo 18: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
crp3	C-reactive protein 3	30,763	Yukarı
crp	c-reactive protein, pentraxin-related	29,645	Yukarı
apoa2	apolipoprotein A-II	29,200	Yukarı
serpina11	zgc:136659	29,100	Yukarı
comtd1	catechol-O-methyltransferase domain containing 1	26,525	Yukarı
serping1	wu:fb60c09	21,590	Yukarı
pde6ha	zgc:73310	17,696	Yukarı
dnajc16l	zmp:0000000693	16,857	Yukarı
cldnj	claudin j	16,119	Yukarı
tfa	transferrin-a	16,067	Yukarı
elovl6l	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids like	15,966	Yukarı
apom	apolipoprotein M	14,408	Yukarı
agxtb	zgc:65930	14,236	Yukarı
casq1b	calsequestrin 1b	14,132	Yukarı
apoa4b.3	si:dkey-7f3.15	14,095	Yukarı
fgfbp2a	fibroblast growth factor binding protein 2a	13,807	Yukarı
selenoe	selenoprotein e	13,690	Yukarı
map1lc3c	zgc:56565	13,548	Yukarı
pah	phenylalanine hydroxylase	13,502	Yukarı
cyp1a	zgc:109747	13,328	Yukarı
kctd14	potassium channel tetramerization domain containing 14	13,283	Yukarı
pde6hb	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma, paralog b	13,074	Yukarı
olfcb1	olfactory receptor C family, b1	12,920	Yukarı
aqp12	aquaporin 12	12,835	Yukarı
comtd1	catechol-O-methyltransferase domain containing 1	12,735	Yukarı
grk1b	G protein-coupled receptor kinase 1 b	12,662	Yukarı

Tablo 19: ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katı Değişim	Regülasyonu
tdo2a	tryptophan 2,3-dioxygenase a	12,492	Yukarı
pnp4b	purine nucleoside phosphorylase 4b	12,482	Yukarı
klhl31	kelch-like family member 31	11,362	Yukarı
tecra	trans-2,3-enoyl-CoA reductase a	11,151	Yukarı
gnat1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	11,019	Yukarı
guk1b	guanylate kinase 1b	10,726	Yukarı
pde6c	phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	10,691	Yukarı
fbxo40.1	F-box protein 40, tandem duplicate 1	10,608	Yukarı
ppm1na	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1Na (putative)	10,556	Yukarı
gnat2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2	10,221	Yukarı
apobb.1	apolipoprotein Bb, tandem duplicate 1	10,218	Yukarı
apoc4	apolipoprotein C-IV	10,035	Yukarı

Tablo 20: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre azalan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katı Değişim	Regülasyonu
ccdc14	coiled-coil domain containing 14	-66,837	Aşağı
smox	spermine oxidase	-28,069	Aşağı
aga	aspartylglucosaminidase	-26,874	Aşağı
prdm8	PR domain containing 8	-21,429	Aşağı
ano1a	anoctamin 1, calcium activated chloride channel a	-21,272	Aşağı
usp37	ubiquitin specific peptidase 37	-19,465	Aşağı
usp34	ubiquitin specific peptidase 34	-18,317	Aşağı
rubcn	rubicon autophagy regulator	-17,644	Aşağı
acot19	acyl-CoA thioesterase 19	-16,752	Aşağı
gmpp	guanine monophosphate synthase	-16,470	Aşağı

Tablo 21: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre azalan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	-15,259	Aşağı
ola1	Obg-like ATPase 1	-15,204	Aşağı
tmem168a	transmembrane protein 168a	-14,901	Aşağı
s100a11	S100 calcium binding protein A11	-14,311	Aşağı
fbxo10	F-box protein 10	-14,011	Aşağı
fuz	fuzzy planar cell polarity protein	-13,940	Aşağı
cdr2a	cerebellar degeneration-related protein 2a	-13,662	Aşağı
pde6gb	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma, paralog b	-13,536	Aşağı
lrp4	low density lipoprotein receptor-related protein 4	-13,139	Aşağı
aqr	aquarius intron-binding spliceosomal factor	-12,926	Aşağı
klhl22	kelch-like family member 22	-12,901	Aşağı
acsm3	acyl-CoA synthetase medium chain family member 3	-12,881	Aşağı
lgals9l4	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)-like 4	-12,754	Aşağı
ccdc106b	coiled-coil domain containing 106b	-12,529	Aşağı
chrn5b	cholinergic receptor, muscarinic 5b	-12,355	Aşağı
cdh27	cadherin 27	-12,167	Aşağı
ggt1b	gamma-glutamyltransferase 1b	-11,764	Aşağı
nrcama	neuronal cell adhesion molecule a	-11,714	Aşağı
leng8	leukocyte receptor cluster (LRC) member 8	-11,592	Aşağı
tead1a	TEA domain family member 1a	-11,218	Aşağı
adcy1b	adenylate cyclase 1b	-10,977	Aşağı
ddx11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11	-10,949	Aşağı
ptprjb.2	protein tyrosine phosphatase receptor type Jb, tandem duplicate 2	-10,889	Aşağı
vipr1a	vasoactive intestinal peptide receptor 1a	-10,838	Aşağı

Tablo 22: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre azalan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
pimr136	Pim proto-oncogene, serine/threonine kinase, related 136	-10,726	Aşağı
acss2l	acyl-CoA synthetase short chain family member 2 like	-10,574	Aşağı
aqp10b	aquaporin 10b	-10,425	Aşağı
mst1rb	macrophage stimulating 1 receptor b	-10,361	Aşağı
ikbkb	inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta	-10,211	Aşağı
map3k4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	-10,209	Aşağı
il12a	interleukin 12a	-10,009	Aşağı

Tablo 23: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre artan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
serpina1	wu:fb61c07	51,559	Yukarı
guca1c	guanylate cyclase activator 1C	32,821	Yukarı
serpina7	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	32,700	Yukarı
apoc4	apolipoprotein C-IV	23,440	Yukarı
crp	c-reactive protein, pentraxin-related	20,029	Yukarı
ccl34a.4	chemokine (C-C motif) ligand 34a, duplicate 4	18,828	Yukarı
cldng	claudin g	15,267	Yukarı
ifi44d	interferon-induced protein 44d	15,119	Yukarı
gnb3b	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3b	14,570	Yukarı
trim35-29	tripartite motif containing 35-29	14,477	Yukarı
serping1	wu:fb60c09	13,801	Yukarı
crp3	C-reactive protein 3	13,250	Yukarı
spp1	secreted phosphoprotein 1	10,998	Yukarı

Tablo 24: ROT+LPS+EMP grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
elovl6l	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids like	10,121	Yukarı
ppm1na	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1Na (putative)	10,056	Yukarı

Tablo 25: LPS grubunda K grubuna göre azalan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
prdm8	PR domain containing 8	-41,087	Aşağı
ccdc14	coiled-coil domain containing 14	-34,011	Aşağı
copz2	COPI coat complex subunit zeta 2	-24,372	Aşağı
gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	-22,488	Aşağı
lrrn1	leucine rich repeat neuronal 1	-18,544	Aşağı
plcb2	phospholipase C, beta 2	-17,880	Aşağı
dop1b	DOP1 leucine zipper like protein B	-16,169	Aşağı
kcnc1a	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1a	-16,125	Aşağı
cox6b2	cytochrome c oxidase subunit 6B2	-15,600	Aşağı
mindy3	MINDY lysine 48 deubiquitinase 3	-15,288	Aşağı
mon1bb	MON1 secretory trafficking family member Bb	-15,125	Aşağı
ppfia2	PTPRF interacting protein alpha 2	-13,926	Aşağı
prrc2c	proline-rich coiled-coil 2C	-13,317	Aşağı
cerkl	ceramide kinase-like	-12,681	Aşağı
fus	FUS RNA binding protein	-12,681	Aşağı
ctage5	CTAGE family, member 5	-12,412	Aşağı
arhgap32a	Rho GTPase activating protein 32a	-11,732	Aşağı
prkar1b	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	-11,656	Aşağı

Tablo 26: LPS grubunda K grubuna göre azalan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
sema6e	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6E	-11,593	Aşağı
rab11fip4a	RAB11 family interacting protein 4 (class II) a	-11,341	Aşağı
ikbip	IKBKB interacting protein	-11,322	Aşağı
sncaip	synuclein, alpha interacting protein	-11,274	Aşağı
pikfyve	phosphoinositide kinase, FYVE finger containing	-11,233	Aşağı
cngb3.1	cyclic nucleotide gated channel subunit beta 3, tandem duplicate 1	-11,070	Aşağı
tbc1d13	TBC1 domain family, member 13	-10,780	Aşağı
mapkbp1	mitogen-activated protein kinase binding protein 1	-10,752	Aşağı
ero1b	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 beta	-10,636	Aşağı
psmb8a	proteasome 20S subunit beta 8A	-10,291	Aşağı
LOC566378	peroxisomal membrane protein PMP34-like	-10,052	Aşağı
LOC570938	rasGAP-activating-like protein 1	-10,052	Aşağı

Tablo 27: LPS grubunda K grubuna göre artan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
hcn3	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3	379,001	Yukarı
apoeb	apolipoprotein Eb	276,765	Yukarı
kdelr3	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	228,822	Yukarı
gnb3b	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3b	91,199	Yukarı
slc25a21	solute carrier family 25 member 21	69,697	Yukarı
lgals3b	lectin, galactoside binding soluble 3b	54,466	Yukarı
tmem9	transmembrane protein 9	51,308	Yukarı
gtpbp3	GTP binding protein 3, mitochondrial	45,110	Yukarı

Tablo 28: LPS grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
tmem209	transmembrane protein 209	40,294	Yukarı
lyn	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	37,702	Yukarı
tmem238a	transmembrane protein 238a	35,893	Yukarı
coa1	cytochrome C oxidase assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)	35,690	Yukarı
rasd4	rasd family member 4	35,492	Yukarı
tnika	TRAF2 and NCK interacting kinase a	32,453	Yukarı
fbp1a	fructose-1,6-bisphosphatase 1a	30,586	Yukarı
capn9	calpain 9	30,302	Yukarı
alg14	ALG14 UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit	29,621	Yukarı
mpv17	mitochondrial inner membrane protein MPV17	28,716	Yukarı
cyp4t8	cytochrome P450, family 4, subfamily T, polypeptide 8	27,785	Yukarı
guca1c	guanylate cyclase activator 1C	25,758	Yukarı
lman2lb	lectin, mannose-binding 2-like b	25,176	Yukarı
golga7ba	golgin A7 family, member Ba	25,116	Yukarı
s100u	S100 calcium binding protein U	25,056	Yukarı
chrne	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon	23,703	Yukarı
LOC103909724	T-lymphocyte surface antigen Ly-9-like	22,266	Yukarı
cldne	claudin e	21,876	Yukarı
ppifa	peptidylprolyl isomerase Fa	20,513	Yukarı
anxa1a	annexin A1a	20,277	Yukarı
cltb	clathrin, light chain B	19,859	Yukarı
nbr1a	NBR1 autophagy cargo receptor a	19,667	Yukarı
lrrc8da	si:ch211-83f14.3	19,553	Yukarı
trim35-14	tripartite motif containing 35-14	19,507	Yukarı
ndufab1b	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit AB1b	19,055	Yukarı

Tablo 29: LPS grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
got2a	glutamic-oxaloacetic transaminase 2a, mitochondrial	18,818	Yukarı
apex1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	18,123	Yukarı
mttp	microsomal triglyceride transfer protein	17,221	Yukarı
mtrf1	mitochondrial translational release factor 1	16,769	Yukarı
tpte	transmembrane phosphatase with tensin homology	16,638	Yukarı
wsb1	zgc:63905	16,548	Yukarı
atp5pb	zgc:101887	16,328	Yukarı
ifi44d	interferon-induced protein 44d	15,887	Yukarı
smdt1b	si:ch211-133l11.4	15,844	Yukarı
psmb4	proteasome 20S subunit beta 4	15,462	Yukarı
depor	DEP domain containing MTOR-interacting protein	15,460	Yukarı
pvalb2	parvalbumin 2	15,004	Yukarı
dnajb9b	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9b	14,878	Yukarı
ak1	adenylate kinase 1	14,842	Yukarı
npy8br	neuropeptide Y receptor Y8b	14,761	Yukarı
hpda	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase a	14,746	Yukarı
ly6m6	lymphocyte antigen 6 family member M6	14,683	Yukarı
sars2	seryl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	14,668	Yukarı
tmem98	transmembrane protein 98	14,667	Yukarı
cyb5r4	cytochrome b5 reductase 4	14,488	Yukarı
mettl9	methyltransferase like 9	14,177	Yukarı
rgs5a	regulator of G protein signaling 5a	13,960	Yukarı
jpt2	Jupiter microtubule associated homolog 2	13,902	Yukarı
selenoe	selenoprotein e	13,460	Yukarı
cyb5d2	cytochrome b5 domain containing 2	13,344	Yukarı

Tablo 30: LPS grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
dhx36	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	13,175	Yukarı
pbx1a	pre-B-cell leukemia homeobox 1a	13,130	Yukarı
cldnd	claudin d	13,122	Yukarı
serpina1	wu:fb61c07	13,030	Yukarı
tjp1b	tight junction protein 1b	13,001	Yukarı
ppp5c	protein phosphatase 5, catalytic subunit	12,895	Yukarı
mdh1b	malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)	12,796	Yukarı
cyb5d1	cytochrome b5 domain containing 1	12,657	Yukarı
klhl15	kelch-like family member 15	12,426	Yukarı
ppp1r13ba	protein phosphatase 1, regulatory subunit 13Ba	12,406	Yukarı
dnajc4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	12,214	Yukarı
sntb1	syntrophin, basic 1	12,133	Yukarı
acsl4b	acyl-CoA synthetase long chain family member 4b	11,954	Yukarı
slc36a4	solute carrier family 36 member 4	11,903	Yukarı
lamp1a	lysosomal associated membrane protein 1a	11,893	Yukarı
abca4a	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4a	11,769	Yukarı
aup1	AUP1 lipid droplet regulating VLDL assembly factor	11,751	Yukarı
derl1	derlin 1	11,551	Yukarı
trim36	tripartite motif containing 36	11,162	Yukarı
lgals2b	lectin, galactoside-binding, soluble, 2b	10,798	Yukarı
usp13	ubiquitin specific peptidase 13	10,750	Yukarı
lrp12	low density lipoprotein receptor-related protein 12	10,597	Yukarı
rab31	RAB31, member RAS oncogene family	10,505	Yukarı
nmnat2	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2	10,377	Yukarı
tlr1	toll-like receptor 1	10,317	Yukarı

Tablo 31: LPS grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
fahd1	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	10,192	Yukarı

Tablo 32: ROT+LPS grubunda K grubuna göre azalan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
prdm8	PR domain containing 8	-37,833	Aşağı
arhgap12a	Rho GTPase activating protein 12a	-20,834	Aşağı
btr02	bloodthirsty-related gene family, member 2	-17,661	Aşağı
guk1b	guanylate kinase 1b	-16,902	Aşağı
ltk	leukocyte receptor tyrosine kinase	-16,535	Aşağı
ggt1b	gamma-glutamyltransferase 1b	-16,459	Aşağı
ccdc14	coiled-coil domain containing 14	-15,516	Aşağı
naif1	nuclear apoptosis inducing factor 1	-15,273	Aşağı
aspdh	aspartate dehydrogenase domain containing	-15,063	Aşağı
grk7a	G protein-coupled receptor kinase 7a	-14,653	Aşağı
pde6gb	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma, paralog b	-14,475	Aşağı
reep6	receptor accessory protein 6	-13,511	Aşağı
cldnj	claudin j	-13,094	Aşağı
psmg1	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 1	-12,882	Aşağı
chrn5b	cholinergic receptor, muscarinic 5b	-12,536	Aşağı
stx11b.2	syntaxin 11b, tandem duplicate 2	-12,037	Aşağı
slc47a1	solute carrier family 47 member 1	-11,313	Aşağı
dnase1	deoxyribonuclease I	-11,071	Aşağı
ikzf1	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)	-10,911	Aşağı
ptprjb.2	protein tyrosine phosphatase receptor type Jb, tandem duplicate 2	-10,831	Aşağı
vipr1a	vasoactive intestinal peptide receptor 1a	-10,741	Aşağı

Tablo 33: ROT+LPS grubunda K grubuna göre azalan genleri (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
mttp	microsomal triglyceride transfer protein	-10,687	Aşağı
ddx11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11	-10,453	Aşağı
pimr136	Pim proto-oncogene, serine/threonine kinase, related 136	-10,179	Aşağı
shhb	sonic hedgehog signaling molecule b	-10,076	Aşağı
cacna1bb	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit, b	-10,022	Aşağı

Tablo 34: ROT+LPS grubunda K grubuna göre artan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
kcnk4a	potassium channel, subfamily K, member 4a	1376,216	Yukarı
rab1aa	RAB1A, member RAS oncogene family a	517,713	Yukarı
npr1b	natriuretic peptide receptor 1b	405,948	Yukarı
kdelr3	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	163,194	Yukarı
gfod2	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 2	98,775	Yukarı
ryr2b	ryanodine receptor 2b (cardiac)	87,018	Yukarı
apoeb	apolipoprotein Eb	82,040	Yukarı
fgf13a	fibroblast growth factor 13a	55,488	Yukarı
ncbp2	nuclear cap binding protein subunit 2	43,572	Yukarı
slc25a21	solute carrier family 25 member 21	40,941	Yukarı
wdr45	WD repeat domain 45	39,835	Yukarı
slc36a4	solute carrier family 36 member 4	37,462	Yukarı
tmem209	transmembrane protein 209	34,547	Yukarı
tnika	TRAF2 and NCK interacting kinase a	33,112	Yukarı
tmem9	transmembrane protein 9	31,750	Yukarı
vps16	vacuolar protein sorting 16 homolog	29,181	Yukarı
crtc2	CREB regulated transcription coactivator 2	29,152	Yukarı

Tablo 35: ROT+LPS grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
golga7ba	golgin A7 family, member Ba	27,067	Yukarı
wsb1	zgc:63905	25,843	Yukarı
gtpbp3	GTP binding protein 3, mitochondrial	25,465	Yukarı
lgals3b	lectin, galactoside binding soluble 3b	24,740	Yukarı
ubap2l	ubiquitin associated protein 2-like	24,233	Yukarı
alg14	ALG14 UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit	22,148	Yukarı
LOC103909724	T-lymphocyte surface antigen Ly-9-like	21,565	Yukarı
agpat4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	21,221	Yukarı
ifi27.2	interferon alpha inducible protein 27.2	19,913	Yukarı
coa1	cytochrome C oxidase assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)	19,167	Yukarı
nbr1a	NBR1 autophagy cargo receptor a	18,387	Yukarı
usp13	ubiquitin specific peptidase 13	17,563	Yukarı
derl1	derlin 1	17,285	Yukarı
ifi27.1	interferon alpha inducible protein 27.1	17,100	Yukarı
nadk2	NAD kinase 2, mitochondrial	16,276	Yukarı
lman2lb	lectin, mannose-binding 2-like b	16,166	Yukarı
mtrf1	mitochondrial translational release factor 1	15,071	Yukarı
kidins220b	kinase D-interacting substrate 220b	14,550	Yukarı
jpt2	Jupiter microtubule associated homolog 2	14,010	Yukarı
rasd4	rasd family member 4	13,923	Yukarı
tjp1b	tight junction protein 1b	13,068	Yukarı
abr	ABR activator of RhoGEF and GTPase	13,021	Yukarı
got2a	glutamic-oxaloacetic transaminase 2a, mitochondrial	12,791	Yukarı
apex1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	12,647	Yukarı
sntb1	syntrophin, basic 1	12,610	Yukarı

Tablo 36: ROT+LPS grubunda K grubuna göre artan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
cyp4t8	cytochrome P450, family 4, subfamily T, polypeptide 8	12,430	Yukarı
tlr1	toll-like receptor 1	12,378	Yukarı
s100u	S100 calcium binding protein U	12,291	Yukarı
lrrc38b	leucine rich repeat containing 38b	12,251	Yukarı
dnajb9b	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9b	12,158	Yukarı
maf1b	MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymerase III b	11,992	Yukarı
acox3	acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl	11,991	Yukarı
fbxw7	F-box and WD repeat domain containing 7	11,902	Yukarı
slc8a4b	solute carrier family 8 member 4b	11,798	Yukarı
sh3gl1a	SH3-domain GRB2-like 1a	11,588	Yukarı
nrp2a	neuropilin 2a	11,553	Yukarı
ifi44d	interferon-induced protein 44d	11,083	Yukarı
gh1	growth hormone 1	11,056	Yukarı
tmem238a	transmembrane protein 238a	10,846	Yukarı
npy8br	neuropeptide Y receptor Y8b	10,815	Yukarı
trim62.1	tripartite motif containing 62, tandem duplicate 1	10,796	Yukarı
mdh1b	malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)	10,460	Yukarı
trim35-14	tripartite motif containing 35-14	10,396	Yukarı
ilf3a	interleukin enhancer binding factor 3a	10,229	Yukarı
tkta	transketolase a	10,198	Yukarı
akt3a	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3a	10,051	Yukarı

Tablo 37: ROT+LPS grubunda LPS grubuna göre azalan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Kath Değişim	Regülasyonu
irg1l	immunoresponsive gene 1, like	-96,480	Aşağı
cldng	claudin g	-80,793	Aşağı
lyn	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-55,230	Aşağı
grk7a	G protein-coupled receptor kinase 7a	-53,165	Aşağı
cldnd	claudin d	-35,993	Aşağı
guca1c	guanylate cyclase activator 1C	-34,922	Aşağı
crp2	C-reactive protein 2	-32,178	Aşağı
mpv17	mitochondrial inner membrane protein MPV17	-28,800	Aşağı
LOC110438229	syncollin-like	-27,640	Aşağı
gngt2a	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2a	-24,979	Aşağı
glmnb	glomulin, FKBP associated protein b	-23,880	Aşağı
selenoe	selenoprotein e	-22,781	Aşağı
lgals3bp.3	galectin 3 binding protein, tandem duplicate 3	-19,816	Aşağı
gnat1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	-18,883	Aşağı
pias1a	protein inhibitor of activated STAT, 1a	-18,526	Aşağı
gnb3b	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3b	-18,116	Aşağı
fgfbp2a	fibroblast growth factor binding protein 2a	-17,711	Aşağı
pde6c	phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	-17,670	Aşağı
psmg1	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 1	-16,042	Aşağı
pde6ha	zgc:73310	-14,380	Aşağı
cyp8b3	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 3	-14,083	Aşağı
anxa3a	annexin A3a	-13,692	Aşağı
slc2a9l1	solute carrier family 2 member 9, like 1	-13,190	Aşağı
pvalb2	parvalbumin 2	-13,184	Aşağı

Tablo 38: ROT+LPS grubunda LPS grubuna göre azalan genler (devam)

Gen Sembolü	Gen Adı	Kath Değişim	Regülasyonu
elovl6l	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids like	-12,904	Aşağı
pde6hb	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma, paralog b	-12,706	Aşağı
gnat2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2	-12,414	Aşağı
cldnb	claudin b	-12,097	Aşağı
tmem45a	transmembrane protein 45a	-12,051	Aşağı
ddx43	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 43	-11,825	Aşağı
gngt2b	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2b	-11,657	Aşağı
serpina1	wu:fb61c07	-11,268	Aşağı
npffr1	neuropeptide FF receptor 1	-10,914	Aşağı
mst1rb	macrophage stimulating 1 receptor b	-10,854	Aşağı
ppm1na	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1Na (putative)	-10,790	Aşağı
gngt1	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 1	-10,758	Aşağı
crp3	C-reactive protein 3	-10,496	Aşağı
psmb9b	proteasome 20S subunit beta 9b	-10,424	Aşağı
syt5a	synaptotagmin Va	-10,225	Aşağı
apoa4b.3	si:dkey-7f3.15	-10,147	Aşağı
tmem45b	transmembrane protein 45B	-10,123	Aşağı
trpa1b	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1b	-10,031	Aşağı

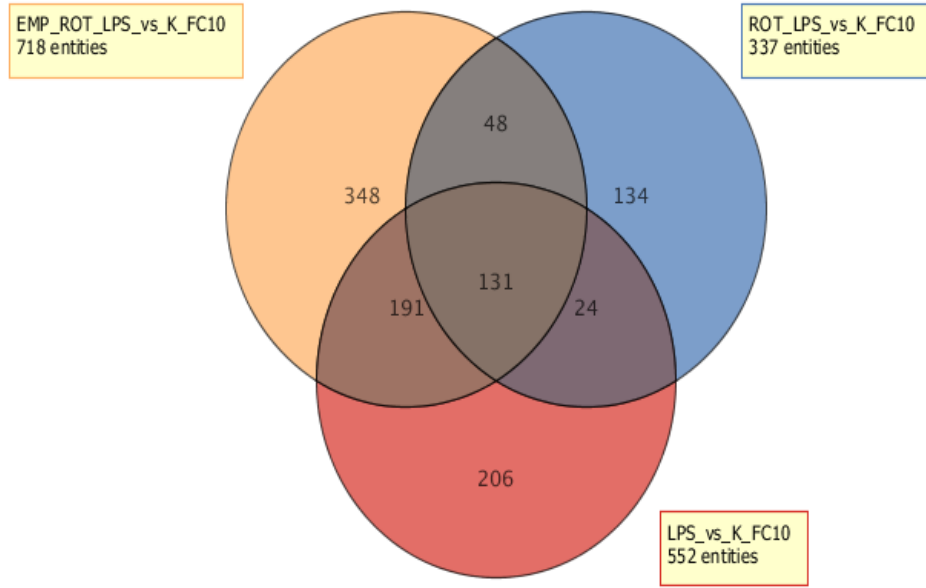
Tablo 39: ROT+LPS grubunda LPS grubuna göre artan genler

Gen Sembolü	Gen Adı	Kath Değişim	Regülasyonu
rab1aa	RAB1A, member RAS oncogene family a	1717,922	Yukarı
npr1b	natriuretic peptide receptor 1b	504,920	Yukarı
kcnk4a	potassium channel, subfamily K, member 4a	493,739	Yukarı
ryr2b	ryanodine receptor 2b (cardiac)	32,053	Yukarı
ubap2l	ubiquitin associated protein 2-like	28,816	Yukarı
gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	26,627	Yukarı
ilf3a	interleukin enhancer binding factor 3a	19,479	Yukarı
lrrn1	leucine rich repeat neuronal 1	18,230	Yukarı
plcb2	phospholipase C, beta 2	17,752	Yukarı
nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	15,729	Yukarı
wdr93	WD repeat domain 93	15,601	Yukarı
ryr1b	ryanodine receptor 1b (skeletal)	15,487	Yukarı
fus	FUS RNA binding protein	15,238	Yukarı
cpamd8	C3 and PZP like alpha-2-macroglobulin domain containing 8	15,076	Yukarı
ppfia2	PTPRF interacting protein alpha 2	14,953	Yukarı
pla2g3	phospholipase A2 group III	14,489	Yukarı
mycbp2	MYC binding protein 2	14,393	Yukarı
sema6e	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6E	14,209	Yukarı
bcas3	BCAS3 microtubule associated cell migration factor	13,800	Yukarı
prkar1b	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	13,724	Yukarı
map2k5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	13,393	Yukarı
kcnc1a	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1a	13,262	Yukarı
skilb	SKI-like proto-oncogene b	13,242	Yukarı
LOC570938	rasGAP-activating-like protein 1	13,168	Yukarı
mon1bb	MON1 secretory trafficking family member Bb	13,168	Yukarı

Tablo 40: ROT+LPS grubunda LPS grubuna göre artan genler (devam)

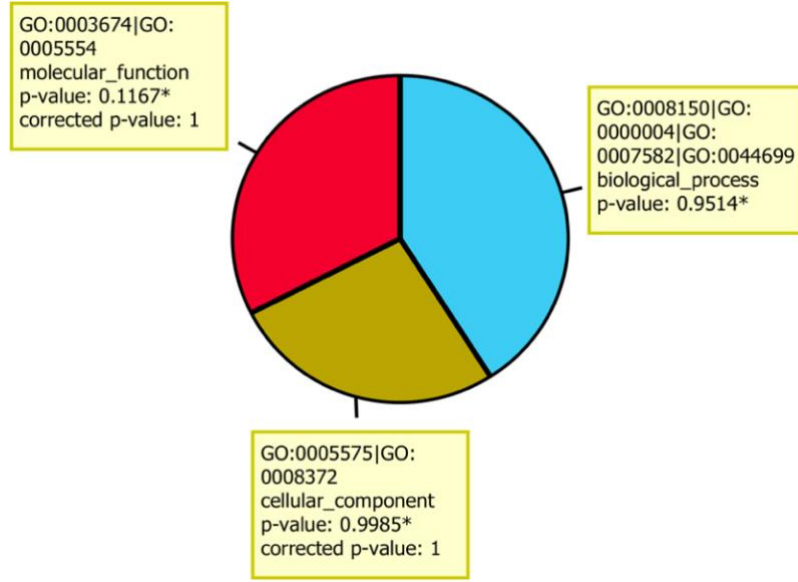
Gen Sembolü	Gen Adı	Katlı Değişim	Regülasyonu
mindy3	MINDY lysine 48 deubiquitinase 3	12,495	Yukarı
psmb8a	proteasome 20S subunit beta 8A	12,493	Yukarı
kcnk1a	potassium channel, subfamily K, member 1a	11,809	Yukarı
clstn2	calsyntenin 2	11,433	Yukarı
usp24	ubiquitin specific peptidase 24	11,393	Yukarı
npffl	neuropeptide FF-amide peptide precursor like	11,250	Yukarı
ctage5	CTAGE family, member 5	11,134	Yukarı
copz2	COPI coat complex subunit zeta 2	11,012	Yukarı
stat1b	signal transducer and activator of transcription 1b	10,662	Yukarı
cadpsa	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion a	10,587	Yukarı
magi2a	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2a	10,573	Yukarı
pikfyve	phosphoinositide kinase, FYVE finger containing	10,527	Yukarı
slc11a2	solute carrier family 11 member 2	10,443	Yukarı
cerkl	ceramide kinase-like	10,201	Yukarı
mlt10	MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor	10,175	Yukarı
usp10	ubiquitin specific peptidase 10	10,115	Yukarı

Karşılaştırmalı gruplardaki gen benzerlikleri şematize etmek için Venn grafikleri kullanılmıştır. ROT+LPS+EMP, ROT+LPS ve LPS gruplarının KONT grubu ile kıyaslamalarından çıkan sonuçların venn diagramı ile gösterildiğinde birbirleri arasında ortak genlerin olduğunu görebiliyoruz. Her grubun genlerindeki katlı değişim 10 kat ve üstüdür. Her üçünün kesişiminde benzer 131 gen olduğu görülmektedir (Şekil 35).

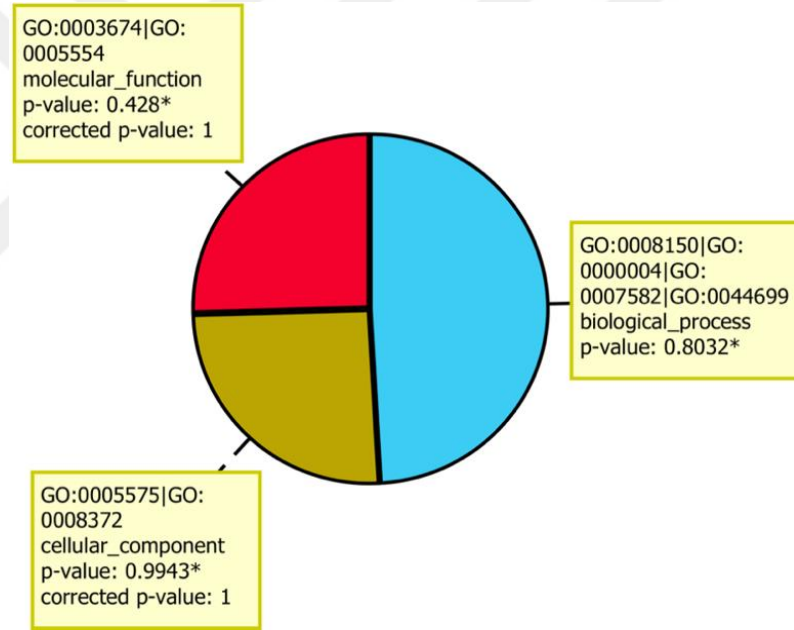


Şekil 35: ROT+LPS+EMP, ROT+LPS, LPS gruplarının K grubuna karşı oluşturdukları gen ekspresyon değişimlerinin Venn şeması ile gösterimi.

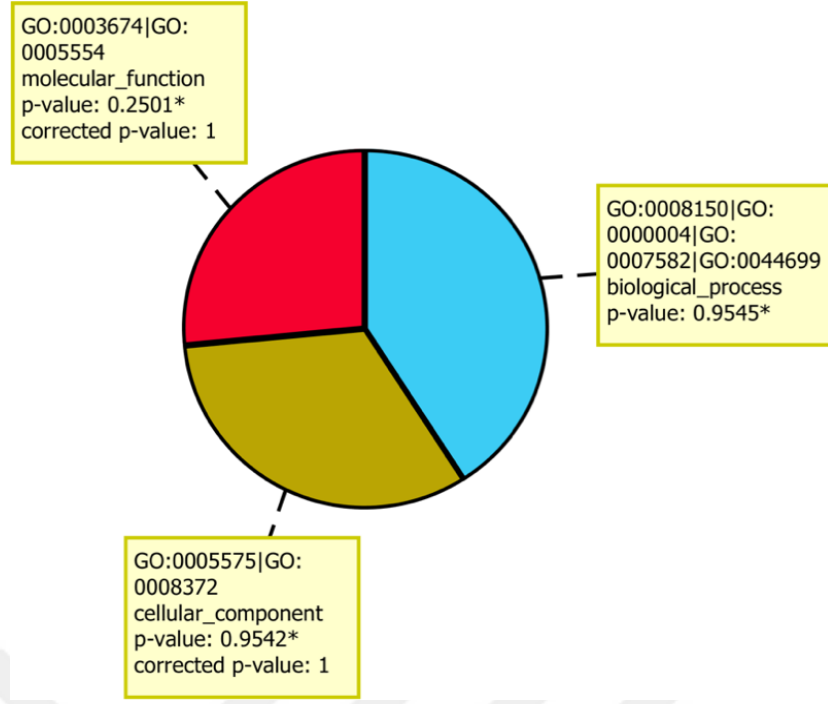
Çalışmamızda, grupların birbiri ile karşılaştırmalarının GO analiz sonuçları pasta dilimi şeklinde gösterilmiştir. Moleküler fonksiyon, biyolojik proses ve hücresel bileşen olarak üç bölümde değişimler gösterilmiştir. Her grubun genlerindeki katlı değişim 10 kat ve üstüdür. ROT+LPS+EMP grubunun ROT+LPS grubu (Şekil 36), LPS grubu (Şekil 37) ve K grubu (Şekil 38) ile karşılaştırıldığında katlı değişimi 10 ve üzeri olan genlerin biyolojik proseslerde büyük oranda etkili olduğunu şekillerde görebiliyoruz. EMP'nin biyolojik proseslerde görev alan genler üzerinde daha fazla etki gösterdiğini düşünebiliriz. ROT+LPS grubunun K grubu (Şekil 40) ile karşılaştırıldığında katlı değişimi 10 ve üzeri olan genlerin hücresel bileşenlerdeki değişimlerin oranının daha yüksek olduğunu görebiliyoruz.



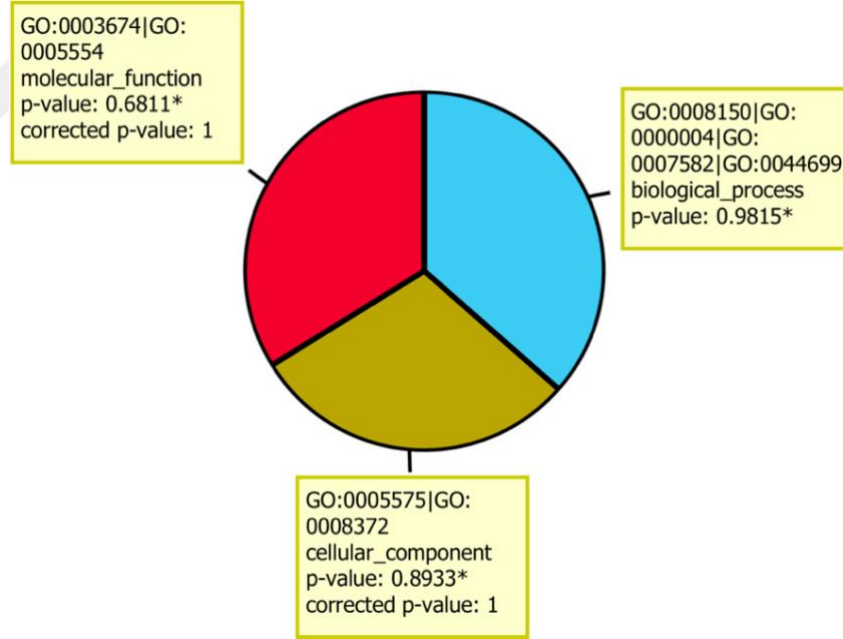
Şekil 36: ROT+LPS+EMP grubunun ROT+LPS grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri



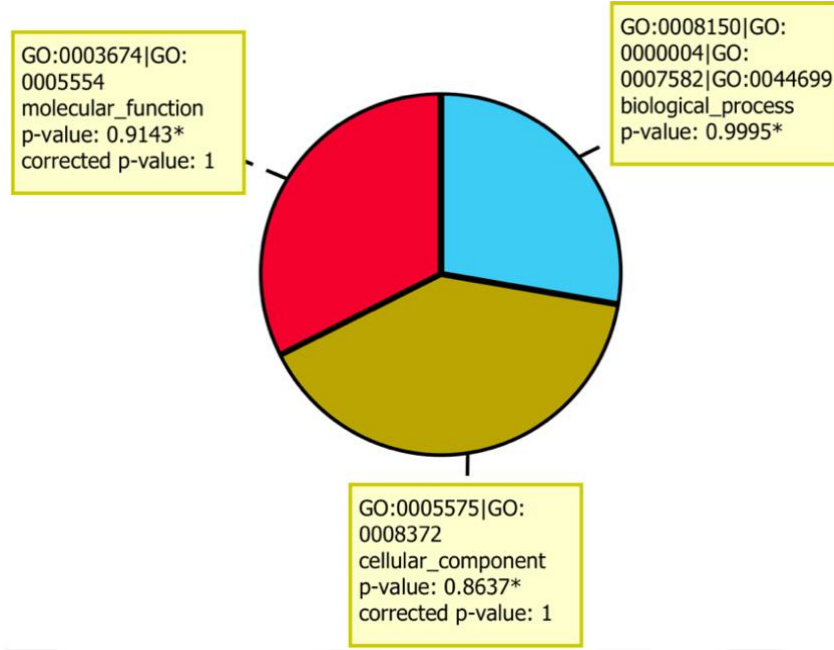
Şekil 37: ROT+LPS+EMP grubunun LPS grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerler



Şekil 38: ROT+LPS+EMP grubunun K grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri



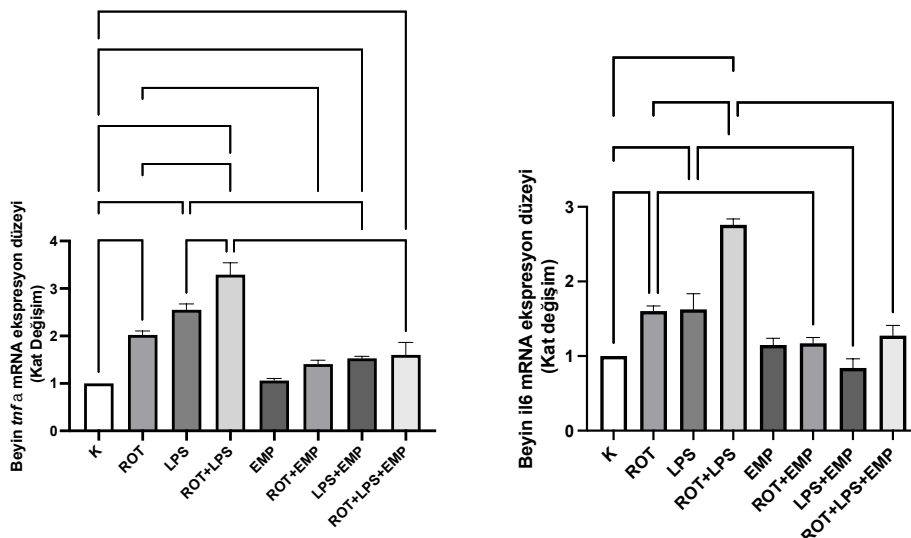
Şekil 39: ROT+LPS grubunun LPS grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri



Şekil 40: ROT+LPS grubunun K grubuna karşı (katlı değişim >10) Gen Ontoloji analizi ve p değerleri

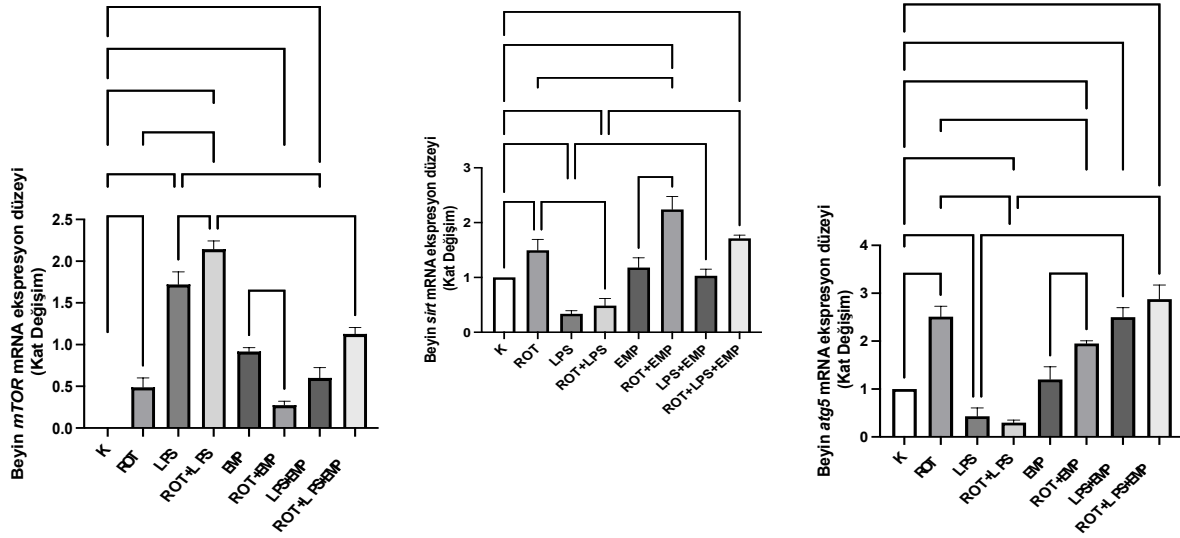
6.8. RT-PCR Sonuçları

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz RT-PCR sonuçları grafiklerde verilmiştir. Beyin dokusunda *tnfα* ve *il6* mRNA ekspresyon düzeyleri ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında artış göstermiş. EMP uygulaması ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında *il6* mRNA ekspresyon düzeylerini azaltmıştır. EMP uygulaması *tnfα* mRNA ekspresyon düzeylerini LPS ve ROT+LPS gruplarında azaltmıştır (Şekil 41).



Şekil 41: Grupların beyin dokusu *tnfα* ve *il6* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. ****
p<0,0001; ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

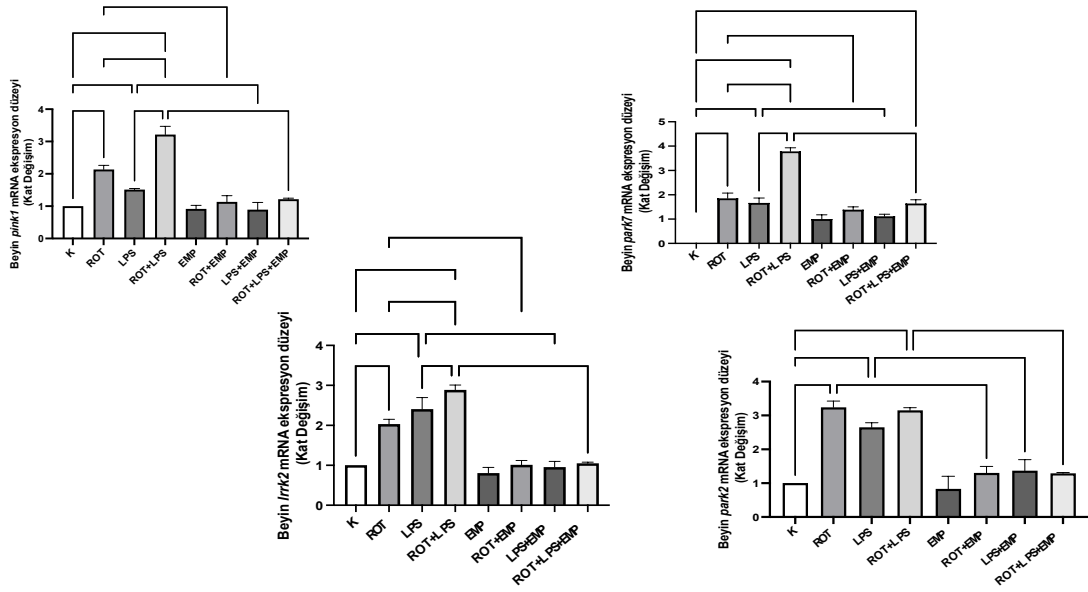
Sirt1 ekspresyonu ROT grubunda koruyucu mekanizmaya bağlı olarak artmıştır (Şekil 42). Çalışmamızda ROT grubunda mTOR ifadesi azalırken, LPS ve ROT+LPS gruplarında artmıştır, EMP normalize edici etki göstermiştir. EMP verilen gruplarda *atg5* gen ekspresyonunda artışlar görülmüştür (Şekil 42).



Şekil 42: Grupların beyin dokusu *mTOR*, *sirt1* ve *atg5* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

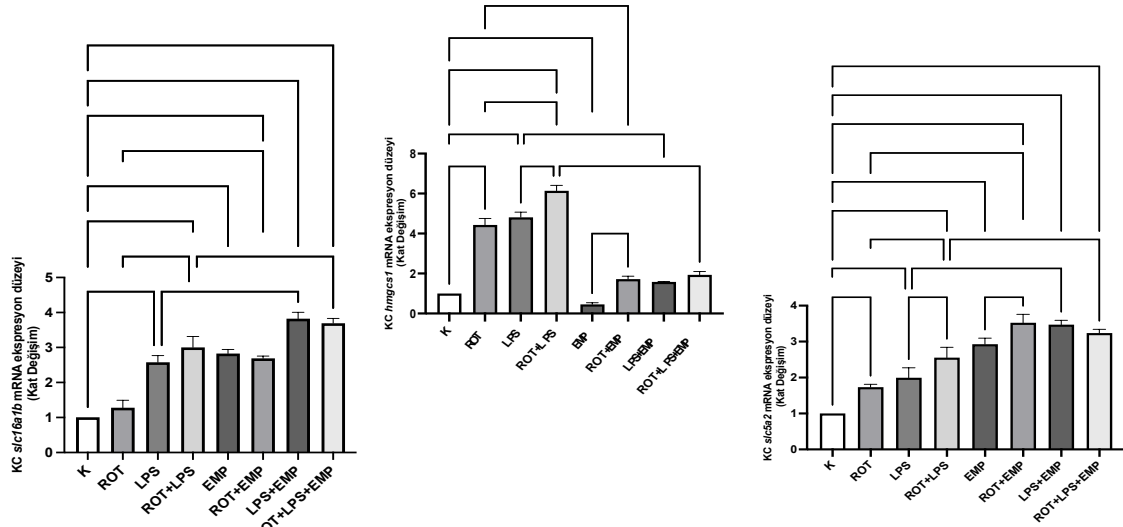
**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Pink1, *lrrk2* ve *park2* genlerinde EMP verilen gruplarda ekspresyonunda azalma görülmüştür. ROT+LPS grubuna göre ROT+LPS+EMP grubunda *park7* geninde anlamlı azalma görülmüştür (Şekil 43).



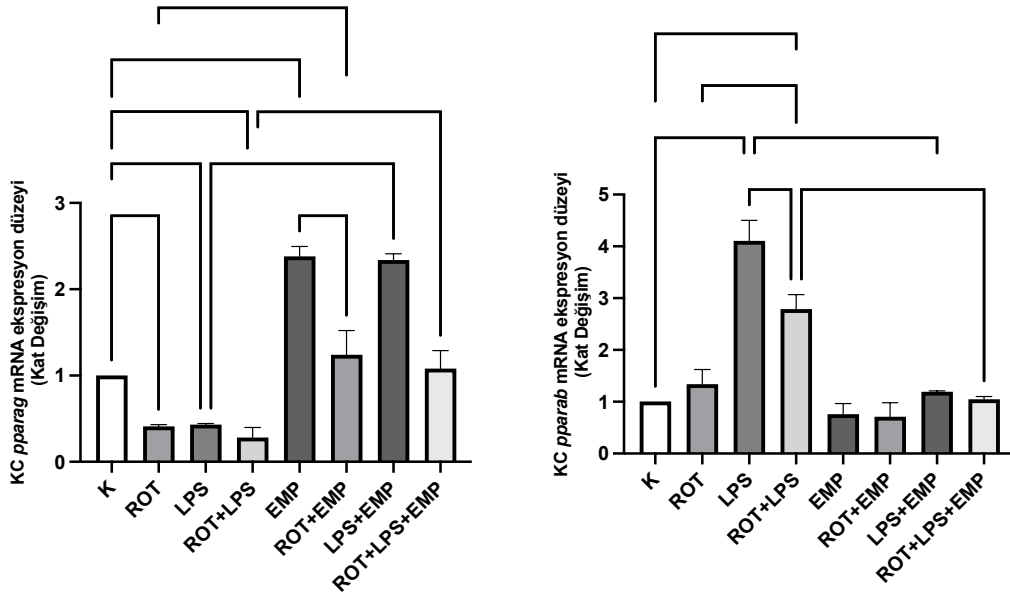
Şekil 43: Grupların beyin dokusu *pink1*, *lrrk2*, *park7* ve *park2* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

EMP uygulanan ROT ve LPS gruplarında *hmgcs1* ifadelerine azalma belirlenmiştir. Kontrol grubunun diğer gruplara göre *slc5a2* ve *slc16a1b* geninde artışlar gözlenmiştir (Şekil 44).



Şekil 44: Grupların karaciğer dokusu *slc16a1b*, *hmgcs1* ve *slc5a2* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Çalışmamızda karaciğer dokusunda ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında *pparag* gen ekspresyonunda azalma görülürken, EMP ve EMP verilen gruplarda artışlar söz konusu olmuştur. *Pparab* gen ekspresyonunda ise LPS ve ROT+LPS gruplarında artışlar gözlenirken EMP ve EMP verilen gruplarda gen ekspresyonunda azalmalar görülmüştür (Şekil 45).

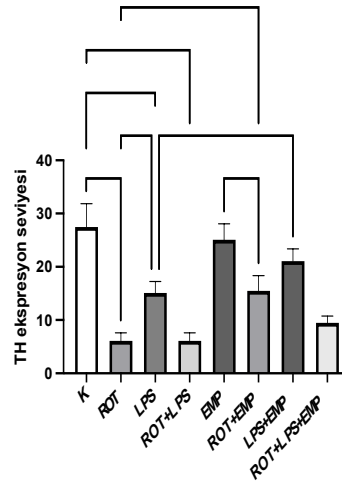
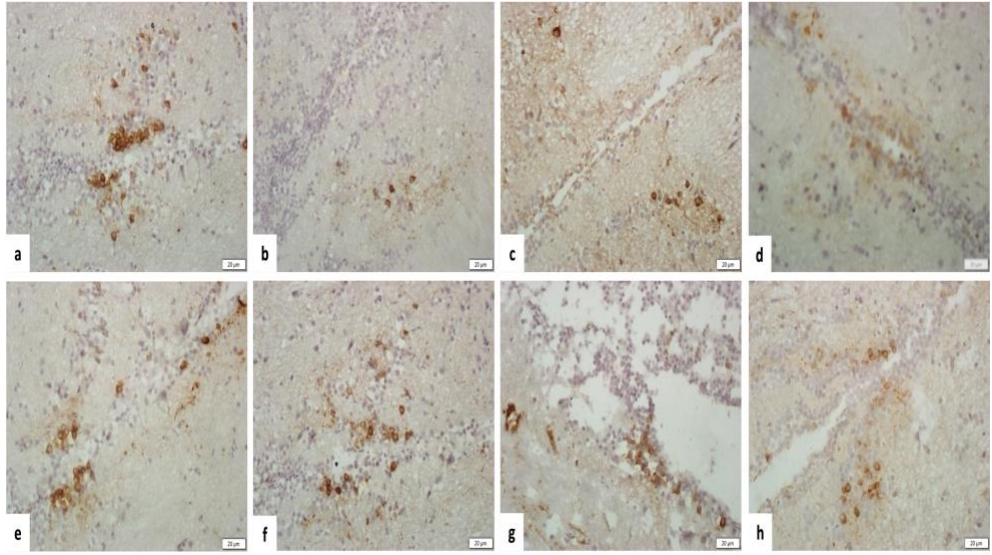


Şekil 45: Grupların karaciğer dokusu *pparag* ve *pparab* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. **** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

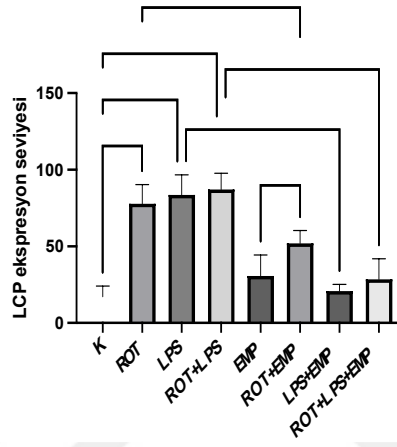
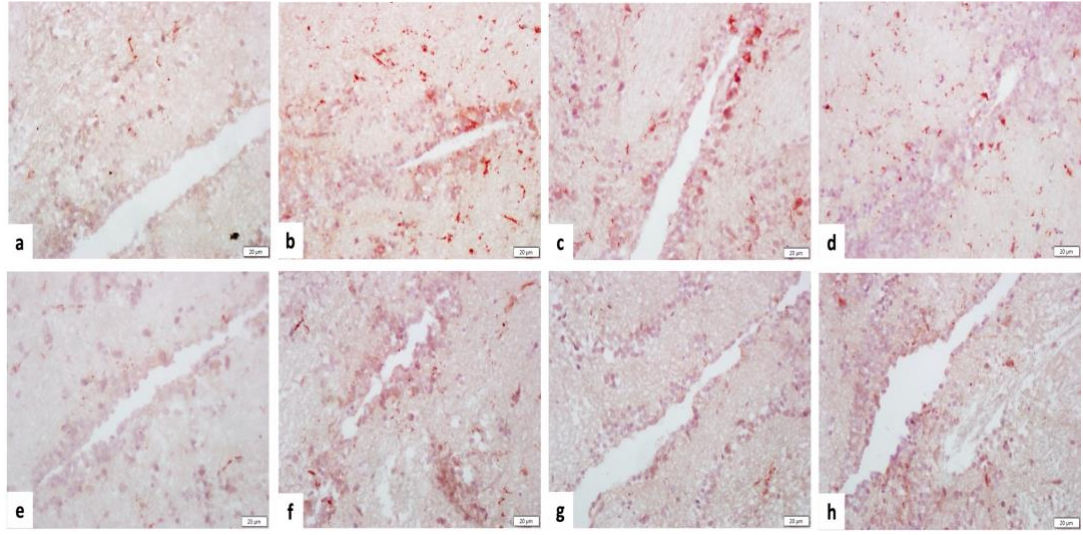
6.9. İmmünohistokimya Sonuçları

Yapılan çalışma sonucunda sonuçlar ve doku üzerindeki bulgular Şekil 46 ve 47’de verilmiştir. ROT, LPS ve ROT ile beraber LPS uygulanan gruplarda TH ifadesi kontrol grubuna göre azalırken, EMP uygulaması ROT ve LPS gruplarında TH ifadesini arttırmıştır (Şekil 46).

ROT, LPS ve ROT ile beraber LPS uygulanan gruplarda lcp1 ifadesi kontrol grubuna göre artmış, bu gruplarda EMP uygulaması ile lcp1 ifadeleri azalmıştır (Şekil 47).



Şekil 46: TH belirtecine ait immünohistokimyasal analiz. Kontrol (a), ROT (b), LPS (c), ROT+LPS (d), EMP (e), ROT+EMP (f), LPS+EMP (g) ve ROT+LPS+EMP (h) gruplarına ait mikrograflar. 40X i: TH ekspresyon seviyesini gösteren grafik. **** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.



Şekil 47: Lcp1 belirtecine ait immünohistokimyasal analiz. Kontrol (a), ROT (b), LPS (c), ROT+LPS (d), EMP (e), ROT+EMP (f), LPS+EMP (g) ve ROT+LPS+EMP (h) gruplarına ait mikrograflar. 40X. Mikrograflar 3. ventrikül çevresindeki lcp1 immün işaretlemesini göstermektedir. 40x. i: 3. ventrikül ve lateral ventriküllerin çevresindeki alanlarda lcp1 ekspresyon seviyesini gösteren grafik. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda ROT, LPS, ROT ile beraber LPS ve EMP uygulanan gruplarda vücut ağırlıkları 4.hafta sonunda kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Bu azalma ROT+LPS+EMP grubu dışında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca başlangıç ile kıyaslandığında ROT, ROT+LPS, EMP, ROT+EMP, LPS+EMP ve ROT+LPS+EMP gruplarında 4.hafta sonunda vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Rotenon uygulamasına bağlı olarak vücut ağırlıklarında azalma olduğu sıçanlarda da gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2017). Ayrıca LPS'nin enerji homeostazındaki rolünü değerlendirmek için farelere karın boşluğuna LPS enjekte edilmesi durumunda LPS'nin anorektik etkisi sonucu vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2013).

Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve diğer birçok nörolojik ve nöropsikiyatrik bozuklukta çalışma belleğinde ve bilişsel veya davranışsal esneklikte bozulmalar yaygın olarak bildirilmektedir (Handra ve ark., 2019). Hafıza bozuklukları, Y-labirentinde aynı kol dönüşlerinin (SAR), alternatif kol dönüşlerinin (AAR) ve Spontan değişim performansının (SAP) oranları ile değerlendirilir (Choi ve ark., 2019). Nöroinflamasyon, bilişsel bozukluğun patogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir nedensel faktördür. Çalışmamızda LPS uygulaması ile artan SAR değerlerine benzer şekilde, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, LPS ile tedavi edilen sıçanlar Y-labirent testlerinde önemli ölçüde bozulmuş öğrenme ve hafıza sergilemiştir (Feng ve ark., 2021). Çalışmamızda ROT ve LPS gruplarında SAP değerleri kontrol grubuna göre azalırken, ROT ve ROT+LPS gruplarında EMP uygulaması SAP değerlerini arttırmıştır. SAP, sıçanların, farelerin ve diğer hayvanların T- veya Y-labirent kollarını ardışık fırsatlarda değiştirme eğilimini içerir. Bir hayvanın bir sonraki denemede seçimini değiştirebilmesi için önceki bir durumda hangi koluna girdiğini hatırlaması gerekir. Bu nedenle, SAP özellikle davranışsal farmakologlar tarafından hızlı ve nispeten basit bir hafıza testi olarak kullanılmaktadır (Hughes, 2004). Y-labirent spontan değişim davranışı, hayvanların keşif aktivitesi sırasında uzamsal belleğini ölçmek için kullanılan bir testtir. Y-labirenti spontan değişim paradigması, hayvanların yeni bir ortamı keşfetmeye yönelik doğal eğilimlerine dayanmaktadır. Y-labirentine yerleştirildiğinde, hayvanlar en son ziyaret edilen kolu keşfedecek ve bu nedenle ziyaretleri üç kol arasında değiştirme eğiliminde olacaktır. Etkili bir değişim için, hayvanın çalışma belleği kullanması gerekir ve bu nedenle, en son ziyaret edilen kolların devam eden bir kaydını tutmaları ve böyle bir kaydı sürekli güncellemeleri gerekir. Bozulmuş bir çalışma belleğine sahip bir balık, hangi kolu ziyaret ettiğini hatırlayamaz ve bu nedenle azalan spontan değişim gösterir (Wietrzyk ve ark., 2005). Çalışmamızda AAR şeklinde ölçülen spontan değişim davranışı, ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında değişmezken

EMP grubunda artmıştır. Bu artış EMP ile artan keton cisimlerinin bilişsel fonksiyonlar üzerindeki düzenleyici etkisi ile ilişkilendirilebilir.

Yapılan bir PH modeli deneyinde, rotenon verilen sıçanlarda hem lokomotor aktivitenin hem de motor koordinasyonların düştüğü gözlenmiştir. Ancak tedavi amaçlı verilen düşük ve yüksek doz şeklinde uygulanan EMP sayesinde bu bulgu olumlu yönde değişmiştir. (Ahmed ve ark., 2022). Yapılan başka bir deneyde, antiepilepsi ilacı verilen sıçanlarda lokomotor aktivitede azalma ve motor fonksiyonlarda bozulma görülmüştür. EMP verildiğinde ise bu olumsuz tablonun iyileştiği görülmüştür (Amer ve ark., 2022). Rotenon ile oluşturulan PH modelinde farelerin kontrol grubuna göre motor fonksiyonlarının bozulmuş olduğu görülmüştür. EMP verildiğinde ise motor fonksiyonların iyileştiğini görülmüştür. Yine aynı deneyde rotenon maruziyeti ile dopaminin azaldığı gösterilmiştir. Locomotor aktivitelerin dopamin azalması ile sekteye uğradığı ve EMP'nin bu durumu düzelttiği gösterilmiştir (Mousa ve ark., 2023). Rotenon ile oluşturulan bir PH deneyinde, sıçanlarda motor fonksiyonlarda, kavrama kuvvetinde ve ayak izi yürüyüşü testinde bozulmalar görülmüştür. EMP verildiğinde ise iyileşmelerin arttığı gözlenmiştir. (Motawi ve ark., 2022). Alzheimer ve Tip 2 diyabet hastalıklarının birlikte oluşturulduğu bir modelde, sıçanlarda bozulan bilişsel fonksiyonlar EMP yardımıyla iyileştirilmiştir (Hierro-Bujalance ve ark., 2020). Bu araştırmalar göstermektedir ki nörotoksinler tarafından oluşturulan bozukluklar EMP'nin oksidatif stresi azaltması, antioksidan parametreleri iyileştirmesi ve oluşan inflamasyonu azaltması sonucu iyileşmeye başlamıştır. Çalışmamızda nörotoksin verilen gruplarda ortalama hız, keşif oranı ve katedilen mesafe kontrol grubuna göre azalırken, EMP bu durumu düzeltmiştir.

Kompleks I inhibisyonunun kan glukoz düzeyleri üzerine olumlu etkileri olabileceği öne sürülmüştür. ROT tarafından kompleks I'in inhibisyonu, glikolizi indükleyerek ve hepatik glukoz çıkışı azaltmış ve diyabetik farelerde hiperglisemiye hafifletmiştir. Kompleks I inhibisyonunun antihiperglisemik etkisinin, hücresel $NAD^+/NADH+H^+$ oranının baskılanmasıyla ilişkili olabileceği ve mitokondriyal kompleks I'in diyabet için bir ilaç hedefi olabileceğine dair görüşler vardır (Hou ve ark., 2018). Bu görüşe uygun olarak çalışmamızda da ROT uygulanan grupta kan glukoz düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Çalışmamızda ROT grubuna benzer şekilde LPS uygulanan grupta da kan glukoz düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarındaki LPS'ler, glukoz metabolizmasında belirgin değişikliklerle ilişkili olarak inflamasyonu tetikler. Hiperglisemi, bakteriyel enfeksiyon sırasında sıklıkla gözlenir ve kritik hastalarda kötü bir klinik sonucun göstergesidir (Nguyen ve ark., 2014). LPS'ye akut maruziyet ise hipoglisemiye ve insülin direncine neden olmaktadır. LPS'nin hipoglisemiye neden olmasındaki mekanizma

olarak sitokinlerden TNF- α ve il-1 β 'in uyarılması olarak gösterilmiştir. İnsülin direncinin ise LPS'nin indüklediği hipoglisemide TLR4, MyD88 ve NF kappa B yolları üzerinden sekonder bir etki olabileceği öne sürülmüştür (Raetzsch ve ark., 2009). Çalışmamızda uygulanan idrarla glukoz atılımını artırarak kan şekerini düşüren, glisemik kontrolü iyileştiren, vücut ağırlığını ve kan basıncını düşüren sodyum glukoz yardımcı taşıyıcı 2 (SGLT2) inhibitörü yeni bir ajan olarak EMP, kan glukoz düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşürmüştür. Ayrıca ROT, LPS ve ROT+LPS gruplarında EMP uygulaması kan glukoz değerlerinde bu gruplara göre azalmaya neden olmuştur.

Çalışmamızda ROT, LPS enjeksiyonu ve ROT ile LPS'nin beraber uygulanması beyin, bağırsak ve karaciğerde oksidatif stres belirteçlerinden LPO ve NO'da artışa neden olmuştur. ROT'un etkisi, kompleks I'deki demir-kükürt merkezlerinden ubikinon'a transfer edilen elektronların bloke edilmesini içerir, bu da minimum ATP üretimi ile oksidatif fosforilasyonun bloke edilmesiyle sonuçlanır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açar (Sürmen ve ark., 2022). LPS'nin *in vivo* ve *in vitro* modellerde nöroinflamasyonun indüklenmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. LPS'nin ayrıca, inflamatuvar mediatörlerin ve genlerin ekspresyonunu indükleyebilen ROS seviyesini yükselttiği de gösterilmiştir. Kontrollü bir ROS seviyesi, başlıca nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ve hemoksijenaz 1 (HO-1) gibi enzimler tarafından indüklenen endojen savunma mekanizması tarafından korunur. Yüksek ROS seviyeleri, başta bazı inflamatuvar reseptörlerin (TLR4) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB), doku nekroz faktörü alfa (TNF α) aktivasyonunu uyararak nöroinflamasyonun indüklenmesinden sorumludur. Ayrıca, yüksek ROS seviyeleri, Bax ve Kaspaz-3'ü aktive ederek ve Bcl-2 ekspresyonunu aşağı regüle ederek apoptotik hücre ölümünün indüklenmesinden de sorumludur (Badshah ve ark., 2019).

Çalışmamızda EMP uygulaması incelenen tüm dokularda antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirmiş ve oksidatif stres belirteçlerini azaltmıştır. EMP, LPO düzeylerini ROT, LPS enjekte edilen ve ROT ile LPS'nin beraber uygulandığı gruplarda azaltırken, NO düzeylerini ROT ile LPS'nin beraber uygulandığı grupta düşürmüştür. EMP'nin antioksidan etkisi dokularda ROT ve LPS'ye bağlı olarak azalan GSH düzeylerini ve SOD aktivitelerini arttırmak yönünde olmuştur. EMP, kan glukoz konsantrasyonunu düşürmek için idrarla glukoz atılımını artırarak diyabeti tedavi eden bir ilaç sınıfı olan SGLT2 inhibitörlerindendir ve son zamanlarda başka hastalıklarda da faydalar göstermiştir. Önceki çalışmalarda, EMP'nin, kalp yetmezliği hastalarını tedavi etmek için FDA tarafından onaylanmasının nedenlerinden biri olarak, bozulmuş mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki koruyucu etkileri gösterilmiştir. EMP'nin azalmış mitokondriyal membran potansiyelini

iyileştirdiği, bozulmuş hücresel ATP üretimini geri kazandırdığı ve mitokondriyal dejenerasyonu inhibe ettiği bulunmuştur (Wang ve ark., 2022). SSS’de mikroglia, bir uyarının varlığında pro-inflamatuar veya anti-inflamatuar fenotipler oluşturabilen bağışıklık hücreleridir. Mikroglia aktivasyonu, sialik asit bağlayıcı immünoglobulin süper ailesi (Siglec) ve bunların karbonhidrat ligandları gibi bağlayıcı reseptörler tarafından düzenlenir. Çoğu Siglec, aktivasyon sinyallerinin sonlandırılmasına yol açar. Bu nedenle, Toll benzeri reseptörler tarafından tetiklenenler gibi pro-inflamatuar bağışıklık tepkileri, mikroglia da inhibitör Siglec sinyali ile engellenebilir (Linnartz-Gerlach ve ark., 2014). Hücre yüzeyindeki terminal monosakkaritler ve hücre dışı proteinler sıklıkla sialik asitlerdir. Bunlar, lökosit iletişimindeki ilk etkileşim bölgesini temsil eder ve genel bağışıklık tepkisini belirler (Crespo ve ark., 2013). Sialik asit, Siglecs gibi bir dizi inhibitör reseptör için bir liganddır, konakçı hücreler tarafından eksprese edilen ligandları patojen tanımadan maskeleyerek yardımcı olur ve kompleman birikimini inhibe ederek otoimmün tepkileri önler. Sonuç olarak, sialik asit ekspresyonundaki veya sialik asitleri içeren glikanlardaki değişiklikler, immün yanıtların gelişiminde önemli bir rol oynar (Crespo ve ark., 2013). Glikozilasyondaki bazı bozukluklar ve özellikle sialik asit eksikliği, bağışıklık hücresi aktivasyonunu şiddetlendirebilir (Videira ve Castro-Caldas, 2018). Oksidatif stres gibi patolojik durumların, muhtemelen asidoz nedeniyle hücre yüzeyindeki sialik asit eksikliğine yol açabildiği öne sürülmüştür (Videira ve Castro-Caldas, 2018). Çalışmamızda ise beyin ve karaciğerde LPS enjeksiyonu, sialik asit düzeylerinde artışa neden olmuştur. Bu artış LPS ile indüklenen inflamasyona ve beyinde mikroglial aktivasyona bağlı olabilir. Bu dokularda EMP uygulaması artan sialik düzeylerini normalize etmiştir. Muskarinik antagonist olan skopolamin’in insanlarda ve hayvanlarda amneziye neden olduğunun gösterilmesinden itibaren, beyin asetilkolini bellek ile yoğun bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Asetilkolinin öğrenmeyi ve hafızayı modüle edebileceği öne sürülmüştür (Gold, 2003). Çalışmamızda beyinde ROT ve LPS gruplarında artan asetilkolin düzeyleri bu gruplarda azalan bozulan hafıza yeteneğini iyileştirmeye yönelik bir cevap olarak değerlendirilebilir. EMP, karaciğer ve beyinde ROT+LPS gruplarında AChE aktivitesini normalize etmeye yönelik etki göstermiştir.

ALP’nin başlıca işlevleri fizyolojik ve fizyolojik olmayan substratların defosforilasyon ve transfosforilasyon tepkimelerini katalize etmektir. Dört homolog gen lokusu tarafından kodlanan ALP izozimleri plasental, üreme hücresi, bağırsak ve dokuya özgü olmayan ALP’dir. Dokuya özgü olmayan ALP çok sayıda dokuda özellikle böbrek ve merkezi sinir sisteminde bulunur (Sebastián-Serrano ve ark., 2015). TNAP, tau proteinin defosforile ederek muskarinik M1 ve M3 reseptörlerinin bir agonisti davranarak sağlam ve sürekli bir hücre içi kalsiyum

artışına sebep olurlar ve sonunda nöral ölümü tetikleyebilir (Díaz-Hernández ve ark., 2010). Dopaminerjik nöron ölümlerine neden olan LC'lerinin içerisinde SNCA ve tau proteinleri de bulunur. Bu durum PH taupatiler ile de ilişkilendirebilir (Zhang ve ark., 2018). Yüz insan katıldığı bir çalışmada, dokuya özgü olmayan ALP aktivitesi, Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Vardy ve ark., 2011). Yakın zaman önce yapılan bir deneyde, metotreksat verilen farelerde ALP düzeyinin arttığı görülmüş, düşük ve yüksek doz EMP verilen gruplarda ise ALP düzeyi azalmıştır. (El-Kashef ve Sewilam, 2023). PH'da tau birikiminin var olduğu bilindiğine göre dokuya özgü olmayan ALP'nin artışı dopaminerjik nörondaki kalsiyum akışını arttırmış ve nöronları ölüme sürüklemiş olabilir. Çalışmamızda ALP aktivitesi beyin, hepatopankreas ve bağırsak dokusunda nörotoksin olan gruplarda yükselirken, EMP maruziyeti olan gruplarda azalma göstermiştir. Bu durum belki de EMP'in ketojenik etkisiyle otofajiyi aktifleştirmesine, oksidatif stres kaynağı olan mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu ortadan kaldırmasına ve bozulan UPS'yi iyileştirmesi ile düzeltmiş olabileceğini öne sürebiliriz. PH'de dokuya özgü olmayan ALP aktivitesi çalışması bu konunun aydınlatılması için çok değerli olacaktır.

Pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nefropatiler, karaciğer hastalıkları, nöral bozukluklar ve kanserler dahil olmak üzere birçok insan hastalığının patogenezinin altında yatan çok önemli bir faktördür. SGLT2i'lerinin serbest radikal oluşumunu azalttığı, pro-oksidanları baskıladığı ve SOD'lar ve GSH peroksidazlar gibi antioksidan sistemleri yukarı regüle ettiği gösterilmiştir (Tsai ve ark., 2021). Yapılan bir fare çalışmasında, metotreksat verilen grupta GSH ve SOD antioksidan parametreleri azalırken, düşük ve yüksek doz EMP uygulanan diğer maruziyet gruplarında bu parametreler anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (El-Kashef ve Sewilam, 2023). Yüksek doz fruktoz verilen fareler ile yapılan deneyde, früktoz maruziyet grubunda katalaz ve SOD aktivitesi azalırken, EMP ve EMP nanopartikülleri verilen maruziyet gruplarında katalaz ve SOD aktivesinde iyileşmeler görülmüştür (Khan ve ark., 2021). Tip 2 diyabetli hastalarda, EMP, GST ve katalaz dahil olmak üzere antioksidatif enzimlerin lökositteki ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Pawlos ve ark., 2021). Yaptığımız çalışmada beyin ve hepatopankreas dokularında bütün grupların kontrole göre GST aktivasyonu artmıştır. EMP verilen gruplardaki artışlar daha fazladır. Bu durum beyin dokusunun kendi antioksidan sistemini mevcut nörotoksinlere karşı korumak istemesinden kaynaklanırken, EMP bu duruma destek olduğu için EMP uygulanan gruplarda daha yüksek aktivite görmüş olabiliriz. Sonuç olarak EMP antioksidan parametrelerinin aktivitelerini artırarak ve oksidatif stresi azaltarak gösteriyor olabilir.

Keton cisim sentezi veya ketogenez, çoğunlukla hepatositlerde gerçekleşir, ancak beyin veya böbrek hücrelerindeki astrositler gibi diğer hücre tiplerinin de keton cisimlerini daha az sentezlediği öne sürülmüştür (García-Rodríguez ve Giménez-Cassina, 2021). SGLT2'nin önemli ekspresyonu hipokampusta, beyincikte ve kan-beyin bariyeri (BBB) endotel hücrelerinde tanımlanmıştır (Wiciński ve ark., 2020). Öte yandan, metabolik substratlar olarak keton vücut kullanımı veya ketoliz, esas olarak beyin, kalp ve iskelet kasında meydana gelir (García-Rodríguez ve Giménez-Cassina, 2021). SGLT2 inhibitörleri, T2DM yönetimine klinik yaklaşımda devrim yaratan daha yeni hipoglisemik ilaçlardır. Ana etki mekanizmaları, böbreklerin proksimal tübüllerindeki SGLT2 reseptörlerini inhibe etmek ve böylece idrardan geri emilimini bloke ederek kan glukoz seviyelerini düşürmektir (Pawlos ve ark., 2021). Dolaşan keton cisimlerinin (yani, β -hidroksibutirat, BHB) EMP tarafından arttırıldığı gösterilmiştir (Abdurrachim ve ark., 2019). Yine başka bir çalışmada SGLT2 inhibitörleri ile tedaviden sonra tip 1 ve 2 diyabetli hastalarda kan keton düzeylerinin arttığı tarif edilmiştir (Pietschner ve ark., 2021). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda EMP'nin etkisi ile keton cisimleri sentezinde anlamlı artışlar görülmüştür.

DOPAC/DA oranı dopamin metabolizmasının veya yıkımının, dopaminin terminal sinirlerdeki yoğunluğundan bağımsız önemli bir göstergesidir (Lookingland ve Moore, 2005). Öte yandan, bu orandaki artışların, artan yenilenme sürecini yansıttığına ve sistemin bütünlüğünü ve iş yükünü ortaya çıkardığına inanılmaktadır (Tillerson ve ark., 2001). Çalışmamızda DOPAC/DA oranı ROT grubunda Kontrol grubuna göre azalırken, LPS ve EMP gruplarında artmıştır. EMP uygulaması ise ROT grubunda azalan DOPAC/DA oranını arttırmaya, LPS grubunda ise artan DOPAC/DA oranını azaltmaya yönelik etki göstermiştir. Bu bulgu EMP'nin antioksidan etkisinden dolayı dopamin metabolizmasındaki değişiklikleri düzeltmeye yönelik etkisini işaret etmiştir.

Otofaji otuz beşten fazla otofaji ile ilişkili proteinler (ATG) tarafından sıkı bir şekilde regüle edilir. Çoğu ATG proteinleri pozitif bir şekilde otofajiyi regüle etmesine rağmen, Rubicon (rubicon otofaji regülatörü) otofajinin bilinen birkaç tane endojen negatif regülatöründen biridir. Rubicon, Beclin 1 kompleksi ile etkileşim kurarak otofajiyi baskılar. Rubicon, aynı zamanda Rab7 ile direkt bir şekilde etkileşim kurarak endozomal trafiği de inhibe eder. Öte yandan, Rubicon, hücre dışı molekül uyaranlarına yanıt olarak LC3 ile ilişkili fagositozu ve endositozu, kanonik olmayan otofaji formlarını pozitif olarak düzenler. PI3K kompleksi ayrıca Atg14L veya UV radyasyon direnci ile ilişkili gen (UVRAG) içerir. PI3K-Atg14L kompleksi ER, endozom ve izolasyon membranında lokalizedir ve otofagozom oluşumu için esastır, oysa PI3K-UVRAG kompleksi esas olarak geç endozomda lokalizedir, dolayısıyla endozomal

trafiğe aracılık eder. UVRAG, Beclin 1/VPS3413 olmadan C sınıfı tip VPS'leri birleştirerek kargonun lizozomlara endozomal akışında ve otofagozom olgunlaşmasında rol oynar. Rubicon, hem otofajinin başlamasını hem de otofagozom olgunlaşmasını düzenler. Rubicon, RUN alanı aracılığıyla doğrudan PI3K-UVRAG kompleksine bağlanır ve PI3K aktivitesini inhibe ederek otofaji başlangıcının baskılanmasına katkıda bulunur (Nah ve ark., 2021). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, knockout rubicon yapılan farelere intrapertonel olarak yüksek dozda LPS verilmiş ve kontrol ile kalp dokusunda otofaji akımı değişimi kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda knockout yapılan farelerin otofaji akımı kontrol grubuna göre artmıştır ve kardiyak morfolojisi normal görülmüştür (Zi ve ark., 2015). PH daha çok yaşlıları etkileyen bir hastalıktır. Yapılan bir kapsamlı çalışmada, Rubicon'un ekspresyonu, yaşlı solucan, sinek ve fare dokularında transkript ve/veya protein seviyelerinde artar, bu da Rubicon'da yaşa bağlı bir artışın zaman içinde otofajiyi bozduğunu ve dolayısıyla hayvan sağlığını negatif yönde etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca Rubicon'un yıkılması, solucan ve sinek ömrünü uzatmış ve yaşa bağlı birkaç fenotipi iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Dokuya özgü deneylerde ise nöronlardaki Rubicon yıkımının yaşam süresi üzerinde en büyük etkiye sahip olduğunu ortaya koyduğu belirtilmiş ve rubicon nakavt fareler, böbrekte interstisyel fibrozda azalma ve beyinde alfa sinüklein birikiminde azalma sergilemiştir. Dahası Rubicon, bazı uzun ömürlü solucan türlerinde ve kalorisi kısıtlanan farelerde baskılanmıştır (Nakamura ve ark., 2019). Rubicon susturulması ya da ekspresyonun azaltılması koruyucu etki gösteriyor olabilir.

Çalışmamızda mikroarray analizinde, ROT+LPS+EMP grubunun ROT+LPS grubuna göre rubicon genin ekspresyonunun 10 kattan daha fazla azaldığını belirledik (Tablo 15). Bu bağlamda EMP otofajinin negatif regülatörünün ekspresyonunu azaltarak otofajiye pozitif etki ediyor olabilir.

OLA1 (Obg benzeri ATPase 1), YchF alt ailesi GTPaz'ın yeni tanımlanmış bir ATPaz üyesidir. GTPazlar, NTP bağlayıcı proteinlerin en bol bulunan sınıfıdır ve protein translasyonu, hücre içi taşıma, sinyal iletimi ve büyüme gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde çok önemli bir role sahiptir. YchF proteinleri mayadan insana yüksek oranda korunur ve diğer GTPazların aksine ATP'yi GTP'den daha verimli bir şekilde bağlar ve hidrolize eder (Mao vd., 2013). Bir çalışmada, OLA1'in knockdown edilmesi, hücreler oksidanlarla tehdit edildiğinde ROS üretiminin azalmasına ve aynı zamanda GSH tükenmesine karşı hücresel direncin artmasına neden olur. Bu nedenle, OLA1, antioksidan tepkinin negatif bir düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009).

Mikroarray analizi sonuçlarımıza göre çalışmamızda ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre ola1 geni 10 kattan fazla azaldığını belirledik (Tablo 15). Bu durumda EMP'nin ola1 ekspresyonu azaltıcı etki yaparak ROS üretimin azalmasını sağlıyor olabileceği düşünüldü.

Hücre içi bir bozunma yolu olan makrotofajide, otofagozom adı verilen çift zarlı bir organel, çeşitli hedefleri içine alır ve onları bozunma için lizozom iletir. Seçici olmayan makrotofaji durumunda, otofagozomların boyutu nispeten homojendir. Seçici otofajide, otofagozom boyutu oldukça heterojendir. Endoplasmik retikulum otofagozom oluşumunda önemli bir role sahiptir. ER-lokalize DnaJ-benzeri proteinlerin bir ailesi olan ERdj proteinleri, bağlayıcı immünoglobulin proteinine bağlanan ve onun ATPaz aktivitesini destekleyen bir J-domeni içerir. Bazı ERdj'ler protein katlanması, ER ile ilişkili protein bozulması veya Ca²⁺ homeostazında yer alır (Yamamoto ve ark., 2020). ERdj8/DNAJC16 (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C16), otofagozomların boyut belirlemede yer alır (Yamamoto ve ark., 2020). Yamamoto ve ark. (2020) yaptığı çalışmada ERdj8 otofagozom oluşumunda yer aldığı ve knockdown durumunda otofajik yutulmanın hedef boyutunun sınırlandırılmasına neden olduğunu bildirmiştir (Yamamoto ve ark., 2020).

Mikroarray analizi sonuçlarına göre çalışmamızda ROT+LPS+EMP grubunda ROT+LPS grubuna göre 10 kattan fazla dnajc16l (insan ortologu DNAJC16/ERdj8) geninde artış gözlemlenmiştir (Tablo 15). EMP'nin otofajiye otofagozom büyüklüğüne etki ederek de etkisini gösterdiğini ileri sürebiliriz.

ATG8 konjugasyon mekanizması, fagofor genişlemesini kontrol eder. İnsan hücreleri, iki alt ailede gruplandırılabilen altı ATG8 ailesi üyesi içerir: i) mikrotübül ile ilişkili proteinler 1A/1B hafif zincir 3A (LC3A), LC3B ve LC3C ve ii) γ -aminobütirik asit reseptörü ile ilişkili protein (GABARAP), GABARAPL1 ve GABARAPL2. LC3 proteinlerinin alt ailesi, fagofor genişlemesinde erken hareket ettiği gösterilmiş, GABARAP proteinleri daha sonra otofagozom kapanması ve olgunlaşması ile ilişkilendirilmiştir (Strohm ve Behrends, 2020). Bilinen diğer LC3C işlevleri arasında ksenofaji, parçalı mitofaji, viral trafik ve proteinlerin endoplasmik retikulumdan çıkışı bulunur. LC3C otofajisi, kanonik olmayan yukarı akış düzenleyici kompleksler gerektirir (Bischoff ve ark., 2021). Beş mitofaji reseptörünün (TAX1BP1, OPTN, NBR1, p62 ve NDP52) nakavt modellerinde, LC3C'nin mitofaji sırasında TAXBP1 tarafından ve LC3B'nin OPTN ve NDP52 tarafından işe alındığı bulundu (Schaaf ve ark., 2016). Çalışmamızda ROT+LPS+EMP grubun ROT+LPS grubuna göre 10 kattan fazla map1lc3c

(insan ortologu MAP1LC3C) geninde artış gözlemlenmiştir (Tablo 15). EMP'nin otofajiye fagozom oluşumunda da map1lc3c genin ekspresyonu artışı ile desteklediği öne sürülebilir.

Otofaji, hücre içi bozunmayı ve sitoplazmik materyallerin lizozomal makineler yoluyla geri dönüşümünü içeren stres kaynaklı katabolik bir süreçtir. Otofaji sırasında, protein kümeleri ve organeller gibi sitoplazmik materyaller, otofagozom adı verilen çift zarlı bir kesecik içinde hapsedilir. Otofagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturur, bu da hücrel yapıların bozulmasına ve ardından besinlerin ve zarların geri dönüşümüne yol açar. Otofaji, genellikle açlık gibi stres koşullarında hücreleri korumak için bir savunma mekanizması olarak kabul edilmiştir (Rubinsztein ve ark., 2012).

Çalışmamızda sirt1 ekspresyonu ROT grubunda koruyucu mekanizmaya bağlı olarak artmıştır. SIRT1, metabolizma, kanser, yaşlanma ve gelişmenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan NAD'ye bağımlı bir histon deasetilazdır. SIRT1, FOXO, tümör baskılayıcı p53 ve nükleer faktör-kappa B (NF-κB) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenler. Otofaji ile ilişkili genlerin Atg5, Atg7, Atg8 ve FoxO1'in deasetilasyonu ile otofaji-lizozom yolunu düzenler. Bu nedenle, SIRT1 ve otofajinin aktivasyonunun, oksidatif stres koşulları altında hücrenin hayatta kalması için önemli bir koruyucu mekanizma oluşturduğunu ortaya konmuştur (Ou ve ark., 2014). Otofaji, hasarlı ve işlevsiz organellerin ve yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması için bir telafi edici mekanizmadır (Mei ve ark., 2016). Otofajinin farmakolojik inhibisyonu veya genetik zayıflaması, farelerde LPS kaynaklı akut böbrek hasarını şiddetlendirdi (Takahashi ve ark., 2012). Tersine, otofajinin rapamisin ile güçlendirilmesi, farelerde sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarını belirgin şekilde hafifletti (Jiang ve ark., 2012). Artan otofajik akış, inflamatuvar sitokin üretimini azaltır ve anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırır ve akut böbrek hasarında yapısal ve fonksiyonel bozuklukları sınırlar. Otofaji, kendi kendine onarım için bir fırsat sağlar ve bozulmuş otofaji, apoptotik hücre ölümünün artmasına neden olur (Jiang ve ark., 2012, Takahashi ve ark., 2012). Daha önce, EMP'nin diyabetik sıçanların böbreğinde otofajiyi aktive ettiği bulunmuştur (Korbut ve ark., 2020). Yapılan son bir çalışmada EMP'nin, diyabetik olmayan sıçanlarda otofajiyi belirgin şekilde arttırdığı ve apoptozu önlediği gösterilmiştir (Ala ve ark., 2022)

Son araştırmalar, otofajinin, ROT kaynaklı PH'nin patogenezinde yer aldığını göstermiştir. Sıçanların beyinlerine ROT enjeksiyonunun, PH patolojisini indükleyebildiği ve aynı zamanda otofagozom veziküllerini artırabildiği bildirilmiştir (Xiong ve ark., 2013). Parkinson hastalarının beyin dokusunda da otofagozom vezikülleri gözlenmiş olup bu durum otofajik akışın bozulmasına işaret etmiştir (Filomeni ve ark., 2012).

Bununla birlikte, nörodejeneratif hastalıklarda otofajinin rolü tartışmalıdır. Bazı araştırmalar, indüklenabilir otofajinin stres koşullarında hayatta kalmaya katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Otofajik sürecin nörodejeneratif hastalıklarda PI3K/Akt/mTOR aktivitesi üzerinden modüle edildiği öne sürülse de aralarındaki etkileşim karmaşıktır (Heras-Sandoval ve ark., 2014, Liang ve ark., 2017). ROT'un Akt/mTOR yolağını inhibe ettiğini, Akt/mTOR yolağının aktivasyonunun ise otofajiyi indükleyerek SH-SY5Y hücrelerini ROT hasarından koruduğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2019). Benzer şekilde çalışmamızda ROT grubunda mTOR ifadesi azalırken, LPS ve ROT+LPS gruplarında artmıştır, EMP normalize edici etki göstermiştir. Bir serin/treonin kinaz olan mTOR, hücre metabolizmasının ana düzenleyicisidir. mTOR, çok çeşitli ipuçlarına yanıt olarak hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenler ve birçok insan hastalığında sinyal yolu düzensizdir. mTOR ayrıca otofajiyi düzenlemede çok önemli bir rol oynar (Laplane ve Sabatini, 2012). Besinler, büyüme faktörleri ve hücre enerji seviyeleri, hücre büyümesi ve çoğalmasının temel belirleyicileridir. Bir serin/treonin kinaz olan mTOR, hücre metabolizmasının ana düzenleyicisidir ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak hücre büyümesini destekler. mTOR sinyalleme sisteminin bozulması, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok insan hastalığında yer almıştır (Kim ve Guan, 2015). mTOR'un iyi bilinen rollerinden biri, hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli yapı taşlarını sağlamak için anabolik hücre metabolizmayı teşvik etmektir. mTOR, protein, lipid ve nükleotidlerin sentezini uyarmak ve transkripsiyon sonrası ve transkripsiyonel seviyelerde otofaji gibi katabolik süreçleri bloke etmek için çeşitli uyarımları ve sinyal ağlarını entegre eder (Kim ve Guan, 2015).

Otofaji aktivasyonunun ROT kaynaklı Parkinson modeline karşı nöroproteksiyon sağladığını önerilmiştir. İnsan neuroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'de ROT uygulamasından sonraki ilk 36 saatte otofajinin zamana bağlı aktivasyonunu ve ROT uygulamasından 48 saat sonra bu hücrelerde otofaji seviyesinde dramatik bir düşüş olduğu gösterilmiştir (Xiong ve ark., 2013). Otofaji, toksinler ve oksidatif stres gibi strese karşı önemli bir hücre yanıtıdır. SH-SY5Y hücrelerinin sitoplazmasında otofajik vakuollerin birikmesi, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon yoluyla ROT kaynaklı toksisiteye bağlanabilir. Bu bulgular, oksidatif stresin otofajinin yukarı akış süreci olabileceğini gösteren önceki çalışmaların sonuçlarına benzerdir (González-Polo ve ark., 2007). Otofajinin aktivasyonu, telafi edici bir oto-düzenleyici mekanizma olarak hücre hasarını önlemeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte, patojenik stresin aşırı yüklenmesi hücre kompanse kapasitesini aştığında, otofaji hücre dengeyi koruma yeteneği altında olabilir ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilir.

ATG5, otofajik vezikül oluşumu için zorunludur. ATG5'in susturulması veya devre dışı bırakılması, otofajinin aşağı regülasyonuna veya tamamen inhibisyonuna neden olabilir, bu da ATG5'in otofajide merkezi bir rol oynadığını gösterir. Bu nedenle ATG5, otofaji gen düzenleme deneylerinde en yaygın olarak hedeflenen genlerden biridir. Ek olarak, ATG5'in oksidatif hasardan sonra mitokondriyal kalite kontrolü; doğuştan gelen antiviral bağışıklık tepkisinin negatif düzenlenmesi gibi farklı görevleri de vardır (Ye ve ark., 2018).

LPS'nin, mTOR'u aktive ederek *in vivo* akut ve kronik deneysel koliti otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Aktive edilmiş mTOR ve bozulmuş otofaji, bağırsak enflamatuvar tepkilerinde ve oksidatif stres hasarında önemli roller oynar. mTOR'un susturulması LPS kaynaklı inflamasyon ve oksidatif hasarı iyileştirirken, ATG5'in susturulması LPS kaynaklı inflamasyon ve oksidatif hasarı daha da ilerletti. mTOR inhibitörleri ve otofaji uyarıcıları ile tedavi, fareleri bağırsak iltihabı ve oksidatif hasardan önemli ölçüde korumuştur. mTOR'a bağlı otofaji, bağırsak inflamatuvar yanıtlarını düzenlemiştir (Zhou ve ark., 2018).

Membran taşınması pasif ve aktif şeklinde iki türe ayrılabilir. Pasif taşıma, difüzyon ve kolaylaştırılmış difüzyon olarak ikiye ayrılabilirken, aktif taşıma, birincil aktif taşıma (taşıma proteini, ABC (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcıları ve P-tipi ATPazlar dahil olmak üzere ATPaz içerir) ve sekonder aktif taşımayı içerir. SLC'ler, kolaylaştırıcı difüzyon ve sekonder aktif taşıma ile işlev görür. Pasif taşıma, çözünen maddelerin ve iyonların zar boyunca hareketini kolaylaştırır ve genellikle spontan ve stokastik konformasyonel değişiklikler eşlik eder (Hu ve ark., 2020).

SLC16 gen ailesinin on dört üyesi vardır. Dört (SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7 ve SLC16A8) mono karboksilat taşıyıcıları (sırasıyla MCT1, MCT4, MCT2 ve MCT3) kodlar ve plazma zarı boyunca l-laktat, piruvat ve keton cisimleri gibi monokarboksilatların proton bağlantılı taşınmasını katalize eder (Halestrap, 2013). Serebral keton cisimlerinin metabolizması (i) kandaki konsantrasyonlara, (ii) kan-beyin bariyerini aşip hücrelere taşınmaya ve (iii) keton cisimlerini metabolize eden enzimlerin aktivitesine bağlıdır. Kan konsantrasyonu, serebral keton cisimlerinin metabolizması oranını etkileyen en önemli faktör olarak kabul edilir. Kan-beyin bariyeri çoğu hidrofilik maddeye karşı nispeten geçirgen olmadığından, keton cisimleri ve laktat gibi kısa zincirli monokarboksilik asitler (MCT'ler, SLC16 ailesi) için ve asetoasetat ve 3-hidroksibutiratın merkezi sinir sistemi dokularına erişimini için taşıyıcılara ihtiyaç vardır. Beyin hücrelerine keton cisim girişi, difüzyon (orta derecede yüksek bir oranda) ve taşıyıcı aracılı süreçler (MCT'ler; muhtemelen daha az düzenlenmiş) ile gerçekleşir (Maurer ve ark., 2011).

Beyin, glukoz ve mono karboksilatları olarak enerji substratları olarak kullanılmak yeteneğine sahiptir. Normalde, mono karboksilatların plazma seviyeleri çok düşüktür ve beyin neredeyse sadece yakıt için glukoz kullanır. Bununla birlikte, yüksek yağlı bir diyet tüketen emziren sıçanlarda, β -hidroksibutirat, asetoasetat ve laktat gibi mono karboksilatların kan seviyeleri yüksektir ve bazen beyin için yakıtın %50'sinden fazlasını sağlar. Buna uygun olarak, emziren sıçanlarda, kan-beyin bariyerindeki MCT1 mRNA (Pellerin ve ark., 1998) ve protein (Gerhart ve ark., 1997) seviyeleri yetişkinlerden çok daha yüksektir. Diyetteki karbonhidrat veya enerji kısıtlamasının başlangıcında, beyinde depolanan glukoz, sadece birkaç dakika boyunca adenosin trifosfat (ATP) sağlayabilir. Keton cisimleri > 4 mmol/L konsantrasyonlara ulaştığında, beyin enerji kaynağında glukozdan keton cisimlere bir geçiş meydana gelir. Keton cisimleri, mikro-vasküler endotel hücreleri ve astrositlerdeki MCT'ler aracılığıyla beyin dokusuna alınabilir ve taşıma süreci, dolaşımdaki keton cisimlerinin konsantrasyonlarına bağlıdır (Jiang ve ark., 2022). Kan-beyin bariyerindeki monokarboksilat taşıma proteininin ifadesinin yüksek yağlı bir diyetle uyarıldığı yıllar önce önerilmiştir (Moore ve ark., 1976). Yetişkin sıçanların, yüksek yağlı bir diyetle plazma keton seviyeleri yükseldiğinde MCT1'i uyarılıp uyarılmadığı incelenmiş ve yetişkin sıçan beyinde MCT1'in endotel ekspresyonunun ketojenik bir diyetle birkaç kat indüklenebileceğini gösterilmiştir (Leino ve ark., 2001). Öte yandan PH'de metabolik bozukluklar olmasına rağmen, dopaminerjik nörodejenerasyonun ardından MCT1, MCT2 ve GLUT1 seviyelerinin değişmediği gösterilmiştir (Puchades ve ark., 2013). LPS'nin, fare monositlerinde MCT1 ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Ochrietor ve Al-Khatib, 2019). BV2 hücre hattında ve mikrogliada ise LPS kaynaklı MCT1 ve MCT4 artışı gösterilmiştir. İnflamatuvar yanıt, özellikle bağışıklıkla ilgili dokular tarafından glukoz talebini artırır ve birçok bağışıklık hücresi zorunlu glukoz kullanıcıları haline gelir. Hepatik ketogenez, sistemik insülin/glukagon oranındaki azalmalar tarafından indüklenir ve EMP'nin, insülin-glukagon oranını azalttığı gösterilmiştir. EMP tedavisi sıçanlarda dolaşımdaki keton düzeylerini ve de idrar keton atılımını ve MCT1, ketojenik enzim BHB dehidrojenaz (BDH1) ve süksinil-CoA:3-ketoasit CoA transferaz (SCOT) ifadelerini arttırmıştır (Yurista ve ark., 2019).

Hmgcs1 geni tarafından kodlanan mitokondriyal 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A sentaz karaciğerde ketogenezin ana kontrol noktalarından biridir. Sitozolik HMG-KoA sentaz ise izoprenoid biyogenezinde görev alır. Mitokondriyal HMG-KoA sentaz ketojenik izozim olarak adlandırılır. Açlık ve sürekli egzersiz gibi kan şekeri seviyeleri düşük olduğunda, karaciğerde HMGCS ekspresyonu yukarı regüle edilir ve yağ asidi β -oksidasyonundan türetilen asetil-KoA'nın β -hidroksibütirat gibi keton cisimlerine dönüştürüldüğü ketogenez indüklenir. Bu

keton cisimleri daha sonra karaciğerden enerji üretimi için yeniden asetil-KoA'ya dönüştürülebilecekleri diğer dokulara taşınır (Bagheri-Fam ve ark., 2020).

Çalışmamızda ROT grubunda artan *hmgcs1* ifadelerine benzer şekilde, PH ilişkili nörotoksin uygulanan dopaminerjik nöronlarda, ER stresine bağlı olarak HMGCS1 dahil kolesterol biyosentezinde görevli olan genlerin yukarı regülasyonunu gösterilmiştir (Fernandes ve ark., 2020). Enfeksiyon ve iltihaplanma, kemirgenlerde ve tavşanlarda serum trigliserit ve kolesterol seviyelerini arttırmıştır. Hem düşük (100 ng/100 g vücut ağırlığı) hem de yüksek doz (100 mikrogram/100 g vücut ağırlığı) LPS'nin hamsterlarda da serum kolesterol seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Feingold ve ark., 1993). Çalışmamızda bu bulgulara benzer şekilde LPS uygulaması sonucu karaciğerde *hmgcs1* ifadesinde artış bulunmuştur. Böbreğin glukozu yeniden emme yeteneği, esas olarak, proksimal kıvrımlı tübül segmentinde yer alan düşük afiniteli, yüksek kapasiteli sodyum-glukoz ortak taşıyıcı 2'yi (SGLT2) içerir. SGLT2, SLC5A2 geni tarafından kodlanır (Li ve ark., 2019). EMP, proksimal renal tübüllerde glukoz reabsorpsiyonunu inhibe eden yeni bir antihiperglisemik ilaç türüdür. Tip 2 diyabetli hastalarda glisemik durum üzerindeki etkilerinin yanı sıra kilo vermeye ve vücut yağının azalmasına da katkı sağlar (Sun ve ark., 2020, Szekeres ve ark., 2021). Son zamanlarda, klinik deneyler SGLT-2'nin alkolik olmayan karaciğer yağlanması üzerinde yararlı etkileri olduğunu bildirmiştir, bu da azaltılmış ALT, AST, trigliseritler, hepatik insülin duyarlılık indeksleri ile kanıtlanmıştır (Ma ve ark., 2021). Farelerde EMP tedavisi sonrasında *hmgcs1* ifadelerine azalma bildirilmiştir (Ma ve ark., 2021). Çalışmamızda da EMP uygulanan ROT ve LPS gruplarında *hmgcs1* ifadelerine azalma belirlenmiştir.

PH ile ilgili genler *pink1*, *dj-1* ve *lrrk2* mitokondriyal fonksiyon, füzyon/fisyon ve oksidatif stresin düzenlenmesinde doğrudan bir role sahiptir. *Pink1* ve *parkin*, ailesel PH'nin resesif formlarıyla ilişkili en yaygın mutasyona uğramış genler arasındadır. Son çalışmalar, bu genler (*pink1* ve *parkin*) tarafından kodlanan proteinlerin, işlevsiz mitokondrilerin otofajik sürecine aracılık etmek için birlikte çalıştığını göstermektedir. *Pink1*, ubiquitini fosforile etmek için dış mitokondriyal zar üzerinde stabilize olur ve Parkin aktivasyonu için bir sinyal üretir. *Pink1*, hasarlı mitokondrinin dış zarında birikerek, hasarlı mitokondriyi yok edilmek üzere işaretler. Yapılan bir PH çalışmasında, rotenon *pink1* ekspresyonunda artışa sebebiyet vermiştir ve bu durumun mitokondriyal hasara tepki olarak oluştuğu düşünülmüştür (Yurtsever ve ark., 2022). Yapılan bir başka PH çalışmasında, rotenon verilen grupta *lrrk2*, *parkin*, *pink1* ve *dj-1* gen ekspresyonlarında artış gözlenmiş ve verilen erusik asidin bu durumu normalize ettiği gösterilmiştir. Rotenonun oluşturduğu oksidatif strese karşı savunma mekanizması olarak arttığı düşünülmüş ve erusik asit yardımıyla oksidatif hasara karşı koruyuculuk sağlandığı

gösterilmiştir (Ünal ve ark., 2023). Başka bir çalışmada, rotenon verilen sıçanlarda *dj-1* gen ekspresyonunu arttığı gösterilmiştir. Bu artışın nöronun ROS'a karşı kendini korumak için olduğu düşünülebilir. Çalışmanın diğer bir grubunda rotenona ek olarak dagliflozin verilmiş ve rotenonun oluşturmuş olduğu oksidatif hasarı onarmaya çalıştığı gösterilmiştir (Arab ve ark., 2021). Yapılan bir çalışmada, farelerde *lrrk2* knockout edilmesinin dopaminerjik nöron kaybını ve parakuat maruziyeti sonrası LPS ile indüklenen davranışsal bozukluklarını önlediği gösterilmiştir. *Lrrk2* nakavtı, LPS maruziyeti ile mikrogliada indüklenen oksidatif stres ve morfolojik değişikliklerin belirtilerini hafifletmiştir (Dwyer ve ark., 2020). Çalışmamızda *parkin*, *pink1*, *dj-1* ve *lrrk2* gen ekspresyonlarının ROT ve LPS verilen gruplarda artmış, EMP verilen gruplarda ise azaldığı görülmüştür. ROT ve LPS'nin oluşturduğu inflamasyon ve oksidatif strese karşı nöronlar savunma oluşturmak adına bu genlerin ekspresyonları arttırmış olabilir. Ancak EMP verilen gruplarda ise EMP'nin oksidatif fosforilasyonu düzenlemesi, ROS üretimini azaltması ve inflamasyon azaltıcı etkisi ile nöronların normal fonksiyonlarını korumasına yardımcı olduğundan bu genlerdeki ekspresyonlar azalmış olabilir.

Besinsel olarak düzenlenen transkripsiyon faktörü peroksizom proliferatörü aktive reseptör gama, PPAR γ , anti-inflamatuar ve anti-oksidan yollarda yer alan genleri düzenler. Ayrıca, PPAR γ 'nin endojen ligandları, ketojenik diyetin etkilerinde potansiyel bir rolü olan yağ asitlerini içerir. Farelerde ketojenik diyetin beyinde PPAR γ ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Jeong ve ark., 2011). PPAR γ , muhtemelen üç PPAR izoformun en yoğun çalışılanıdır. PPAR γ 'nin nakavt edilmesi embriyonik olarak öldürücüdür. PPAR γ aktivasyonu, artan karbonhidrat ve lipid metabolizması, plazma glukoz konsantrasyonunun azalması ve adiposit farklılaşmasının uyarılması ile ilişkilidir. PPAR γ agonistleri tip 2 diyabetin yönetimi için klinik kullanımdadır.

PPAR γ agonistlerinin olumlu etkileri PH'de gösterilmiştir. Antioksidan enzimlerin arttırılması, oksidatif hasarın azaltılması ve apoptozun sınırlandırılması üzerinden PPAR γ agonistleri olumlu etkilerini göstermiştir (Corona ve Duchon, 2016). İntranigral 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahiropiridin tarafından indüklenen PH modelinde hem PPAR γ hem de PPAR γ agonistlerinin nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (Barbiero ve ark., 2014). Farelerde yapılan alkolik olmayan steatohepatit modelinde EMP'nin PPAR- α ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Jojima ve ark., 2016).

Tirozin hidroksilaz (TH), kofaktör olarak tetrahidropterin gerektiren, demir içeren bir monooksijenazdır. TH, dopamin, noradrenalin ve adrenalin dahil olmak üzere katekolaminlerin biyosentez yolundaki ilk ve hız sınırlayıcı adımı katalize eder. Dopamin dahil

olmak üzere katekolaminler, strese duyarlı nörotransmitterler ve hormonlar olarak hareket ederek endokrin sistemin yanı sıra merkezi ve periferik sinir sistemlerinde çeşitli fizyolojik ve davranışsal işlevlerde önemli roller oynarlar. Dopaminerjik nöronlarının nörodejenerasyonu nedeniyle TH ve DA seviyeleri aynı anda azalır (Nagatsu ve ark., 2019). Yapılan bir PH çalışmasında, sıçanlara rotenon verilmiş ve dopaminin, antioksidanların, TH'nin ve prkn geninin anlamlı bir şekilde azaldığı, EMP verildiğinde ise anlamlı artışlar gözlenmiştir (Ahmed ve ark., 2022). Diğer bir çalışma da ise, rotenonla oluşturulan sıçan modelinde dopamin ve TH düzeyi azalırken, dapagliflozin verildiğinde ise bu düzeylerde artış gözlenmiştir (Arab ve ark., 2021). Çalışmamızda ROT ve LPS maruziyet gruplarında TH boyamasında azalmalara gözlenirken, EMP verilen gruplarda anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bu durum EMP'nin antioksidan parametreleri desteklemesi, oksidatif stres baskılaması ve enerji üretim sistemini düzenlemesinden kaynaklanıyor olabilir. Bu sayede dopaminerjik nöronları ölümden korumuş olabilir.

Mikroglia, omurgalıların santral sinir sisteminde (SSS) yerleşik bağışıklık hücreleridir. Bunlar, MSS'yi savunmak için hareket eden ve esas olarak SSS'deki endojen hücre kalıntılarının temizlenmesinden sorumlu olan oldukça uzmanlaşmış fagositik hücrelerdir. Mikroglia ayrıca nörogenezde çok çeşitli fizyolojik işlevlere sahiptir ve SSS'nin yapı ve işlevinin normal gelişimi ve sürdürülmesi için ön koşuldur. Mikroglial fonksiyonların anormallığı, nöral fonksiyonlarda ve nöropsikiyatrik hastalıklarda çoklu bozukluklara neden olur. Birincil rolleri, apoptotik hücre kalıntılarının temizlenmesi olmakla birlikte, aktive edilmiş mikroglia ayrıca sitokinleri serbest bırakır ve SSS'de iltihaplanmaya neden olur. Mikroglia kaynaklı nöroinflamasyon devam ettiğinde, SSS fonksiyonlarını etkiler. Lenfosit sitozolik protein 1 (lcp1), aktin bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir ve antijen reseptör sinyali, adezyon ve makrofaj, T-lenfosit ve diğer bağışıklık hücrelerinde hareketlilik gibi bağışıklık için kritik olan hücresel süreçlerde önemli bir bileşen olduğu bilinmektedir (Yasuda ve ark., 2017). Lcp1, zebra balığı beynindeki mikroglial öncüllerde ve nötrofillerde ifade edilir (Ranawat ve Masai, 2021). Lcp1 ayrıca makrofajlar, monositler ve nötrofiller dahil olmak üzere normal lökositlerde yüksek oranda ifade edilir (Kell ve ark., 2018). Mikroglial aktivasyon, lcp1 ve apolipoprotein E'nin spesifik ifadesi ile gösterilebilir (Yasuda ve ark., 2017). Yapılan bir medaka çalışmasında, ağır iyon mikro ışını verilen medaka embriyolarında ışınlama sonrasında apoptotik hücrelere doğru göç eden mikroglialarda lcp1 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Yasuda ve ark., 2017). Çalışmamızda ROT ve LPS maruziyet gruplarında lcp1 boyamasında artışlar gözlenirken, EMP verilen gruplarda anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Bu durum EMP'nin anti inflamatuvar özellik göstermesi ve o yolları aktive etmesi, antioksidan parametreleri desteklemesi ve otofajik

yolakları aktive etmesinden ileri geliyor olabilir. Bu sayede dopaminerjik nöronları nöroinflamasyondan ve nöron ölümünden korumuş olabilir.

Çalışmamızın sonuçları, EMP'nin ketogenez ve otofajiyi uyararak bilişsel ve lokomotor fonksiyonları geliştirdiğini ve rotenonun nörotoksik etkilerine karşı oksidatif stresi, inflamasyonu ve mikrogliyal aktivasyonu önleyerek nöroprotektif etkiler gösterdiğini göstermiştir. Bu bulgular, PH gelişimine karşı SGLT2 inhibisyonu yoluyla ketojenik yolların aktivasyonunun koruyucu etkilerini göstererek, EMP'nin ve/veya ketojenik diyetlerin PH hastalarının beslenmesinde umut verici etkisine işaret etmektedir.

Bulgularımıza dayanarak EMP'nin PH'de etkilerinin dikkate değer olduğu ve SGLT2 inhibisyonunun terapötik etki sağlayacak yaklaşımlara ön ayak olabileceği görüşündeyiz. EMP'nin oluşturacağı ketojenik etki PH hastaları için en azından hastalığın ilerlemesini ve oluşacak motor olan/olmayan fonksiyonları en aza indirmek için bir umut ışığı olabilir. EMP'nin PH hastalarında görülen bozulmuş glukoz düzeyini onarmak suretiyle gösterdiği bu etki ile hücre hasarlarını asgariye indirmesi muhtemeldir. PH'nin temel sorunlarından biri mitokondriyal fonksiyonun bozulmasıdır. Dopaminerjik nöronlarda EMP, ketogenez ve otofajiyi uyararak mitokondriyal fonksiyonun rutin şekilde devam etmesi için yardımcı olduğunu belirledik. Mitokondriyal fonksiyonlar ile elde edilen enerji hücre fonksiyonları için olmazsa olmazdır, bu nedenle PH'ye duyarlı mutant organizmalar, knockdown ya da knockout hayvan modellerinin kullanılarak EMP'nin etkilerinin inceleneceği daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Konu ile ilgili verilerin artması ile beraber PH'de EMP'nin etkilerinin inceleneceği randomize klinik çalışmalar hayata geçirilebilecektir. Bununla beraber hastada gelişebilecek ketoasidoz riski mutlaka değerlendirilmelidir. Çalışmalar arttırıldıkça negatif ve pozitif yanları mukayese edilerek EMP'nin PH üzerinde kullanılabilirliği tartışılabilir olacaktır.

8. KAYNAKLAR

- Abdul-Ghani, M. A., Norton, L., & DeFronzo, R. A. (2011). Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 32(4), 515-531. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2010-0029>
- Abdurrachim, D., Teo, X. Q., Woo, C. C., Chan, W. X., Lalic, J., Lam, C. S., & Lee, P. T. H. (2019). Empagliflozin reduces myocardial ketone utilization while preserving glucose utilization in diabetic hypertensive heart disease: A hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance spectroscopy study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 21(2), 357-365. <http://dx.doi.org/10.1111/dom.13536>
- Ahmed, S., El-Sayed, M. M., Kandeil, M. A., & Khalaf, M. M. (2022). Empagliflozin attenuates neurodegeneration through antioxidant, anti-inflammatory, and modulation of α -synuclein and Parkin levels in rotenone-induced Parkinson's disease in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(6), 863-873. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2022.03.005>
- Airavaara, M., Parkkinen, I., Konovalova, J., Albert, K., Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2020). Back and to the future: From neurotoxin-induced to human Parkinson's disease models. *Current Protocols in Neuroscience*, 91(1), Article e88. <http://dx.doi.org/10.1002/cpns.88>
- Ala, M., Khoshdel, M. R. F., & Dehpour, A. R. (2022). Empagliflozin enhances autophagy, mitochondrial biogenesis, and antioxidant defense and ameliorates renal ischemia/reperfusion in nondiabetic rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/1197061>
- Amer, R. M., Eltokhy, A. K., Elesawy, R. O., Barakat, A. N., Basha, E., Eldeeb, O. S., Aboalsoud, A., Elgharabawy, N. M., & Ismail, R. (2022). The ameliorative effect of empagliflozin in vigabatrin-induced cerebellar/neurobehavioral deficits: Targeting mTOR/AMPK/SIRT-1 signaling pathways. *Molecules*, 27(12), Article 3659. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27123659>
- Arab, H. H., Safar, M. M., & Shahin, N. N. (2021). Targeting ROS-dependent Akt/Gsk-3 β /Nf- κ B and DJ-1/Nrf2 pathways by dapagliflozin attenuates neuronal injury and motor dysfunction in rotenone-induced Parkinson's disease rat model. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(4), 689-703. <http://dx.doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00722>

- Badshah, H., Ikram, M., Ali, W., Ahmad, S., Hahm, J. R., & Kim, M. O. (2019). Caffeine may abrogate LPS-induced oxidative stress and neuroinflammation by regulating Nrf2/TLR4 in adult mouse brains. *Biomolecules*, 9(11), Article 719. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9110719>
- Bagheri-Fam, S., Chen, H., Wilson, S., Ayers, K., Hughes, J., Sloan-Bena, F., Calvel, P., Robevska, G., Puisac, B., & Kusz-Zamelczyk, K. (2020). The gene encoding the ketogenic enzyme hmgcs2 displays a unique expression during gonad development in mice. *PloS One*, 15(1), Article e0227411. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227411>
- Barbiero, J. K., Santiago, R. M., Persike, D. S., da Silva Fernandes, M. J., Tonin, F. S., da Cunha, C., Boschen, S. L., Lima, M. M., & Vital, M. A. (2014). Neuroprotective effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists in model of parkinsonism induced by intranigral 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Behavioural Brain Research*, 274, 390-399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.014>
- Berg, E. M., Björnfors, E. R., Pallucchi, I., Picton, L. D., & El Manira, A. (2018). Principles governing locomotion in vertebrates: Lessons from zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, Article 73. <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2018.00073>
- Beutler, E. (1975). Glutathione in red cell metabolism: A manual of biochemical methods. *Grune and Stratton*, 112-114.
- Bischoff, M. E., Zang, Y., Chu, J., Price, A. D., Ehmer, B., Talbot, N. J., Newbold, M. J., Paul, A., Guan, J.-L., & Plas, D. R. (2021). Selective MAP1LC3C (LC3C) autophagy requires noncanonical regulators and the C-terminal peptide. *Journal of Cell Biology*, 220(7), Article e202004182. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.202004182>
- Bozadas, P. H., Nadella, R., Sánchez-García, A., Bojórquez, D. R., Hernández, M. R., & Baltazar, D. H. (2019). Lipopolysaccharide-based endotoxemia produce toxicity in peripheral organs and microglia migration in a dose-dependent manner in rat substantia nigra. *Folia Neuropathologica*, 57(3), 258-266. <http://dx.doi.org/10.5114/fn.2019.88454>
- Brown, E., Rajeev, S. P., Cuthbertson, D. J., & Wilding, J. P. (2019). A review of the mechanism of action, metabolic profile and haemodynamic effects of sodium-glucose co-

- transporter-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 21, 9-18.
<http://dx.doi.org/10.1111/dom.13650>
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Kyzar, E., Wu, N., & Kalueff, A. V. (2011). Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PloS One*, 6(3), Article e17597. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017597>
- Caliskan, S., & Alturfan, E. E. (2021). Zebrafish embryo as an emerging model organism in neurodevelopmental toxicity research. *European Journal of Biology*, 80(2), 179-187.
<https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2021.1006402>
- Chi, H., Chang, H. Y., & Sang, T. K. (2018). Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), Article 3082. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19103082>
- Chia, S. J., Tan, E. K., & Chao, Y. X. (2020). Historical perspective: Models of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), Article 2464.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms21072464>
- Choi, H. J., Im, S. J., Park, H. R., Park, S., Kim, C. E., & Ryu, S. (2019). Long-term effects of aripiprazole treatment during adolescence on cognitive function and dopamine D2 receptor expression in neurodevelopmentally normal rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 17(3), Article 400.
<http://dx.doi.org/10.9758/cpn.2019.17.3.400>
- Cleal, M., Fontana, B. D., Ranson, D. C., McBride, S. D., Swinny, J. D., Redhead, E. S., & Parker, M. O. (2021). The Free-movement pattern Y-maze: A cross-species measure of working memory and executive function. *Behavior Research Methods*, 53(2), 536-557.
<http://dx.doi.org/10.3758/s13428-020-01452-x>
- Colwill, R. M., & Creton, R. (2011). Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioural Processes*, 86(2), 222-229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2010.12.003>
- Corona, J. C., & Duchen, M. R. (2016). PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 153-163.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.023>
- Crespo, H. J., Lau, J. T., & Videira, P. A. (2013). Dendritic cells: A spot on sialic acid. *Frontiers in Immunology*, 4, Article 491. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00491>

- Crowe, A. R., & Yue, W. (2019). Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: An integrated protocol. *Bio-protocol*, 9(24), Article e3465. <http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.3465>
- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of Parkinson's disease and implications for clinical practice. *Genes*, 12(7), Article 1006. <http://dx.doi.org/10.3390/genes12071006>
- Deng, I., & Bobrovskaya, L. (2022). Lipopolysaccharide mouse models for Parkinson's disease research: A critical appraisal. *Neural Regeneration Research*, 17(11), Article 2413. <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.331866>
- Díaz-Hernández, M., Gómez-Ramos, A., Rubio, A., Gómez-Villafuertes, R., Naranjo, J. R., Miras-Portugal, M. T., & Avila, J. (2010). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32539-32548. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.145003>
- Dwyer, Z., Rudyk, C., Thompson, A., Farmer, K., Fenner, B., Fortin, T., Derksen, A., Sun, H., & Hayley, S. (2020). Leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) modulates microglial phenotype and dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 91, 45-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.017>
- El-Gamal, M., Salama, M., Collins-Praino, L. E., Baetu, I., Fathalla, A. M., Soliman, A. M., Mohamed, W., & Moustafa, A. A. (2021). Neurotoxin-induced rodent models of Parkinson's disease: Benefits and drawbacks. *Neurotoxicity Research*, 39(3), 897-923. <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-021-00356-8>
- El-Kashef, D. H., & Sewilam, H. M. (2023). Empagliflozin mitigates methotrexate-induced hepatotoxicity: Targeting ASK-1/JNK/Caspase-3 pathway. *International Immunopharmacology*, 114, Article 109494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109494>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Eser, B., & Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51-57. <https://doi.org/10.26567/JOHSE.2018250150>

- Feingold, K. R., Hardardottir, I., Memon, R., Krul, E. J., Moser, A. H., Taylor, J. M., & Grunfeld, C. (1993). Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *Journal of Lipid Research*, 34(12), 2147-2158. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)35355-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275(20)35355-4)
- Feng, X., Hu, J., Zhan, F., Luo, D., Hua, F., & Xu, G. (2021). MicroRNA-138-5p regulates hippocampal neuroinflammation and cognitive impairment by NLRP3/caspase-1 signaling pathway in rats. *Journal of Inflammation Research*, 14, Article 1125. <http://dx.doi.org/10.2147/JIR.S304461>
- Fernandes, H. J., Patikas, N., Foskolou, S., Field, S. F., Park, J.-E., Byrne, M. L., Bassett, A. R., & Metzakopian, E. (2020). Single-cell transcriptomics of Parkinson's disease human in vitro models reveals dopamine neuron-specific stress responses. *Cell Reports*, 33(2), Article 108263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108263>
- Ferrannini, E., Baldi, S., Frascerra, S., Astiarraga, B., Heise, T., Bizzotto, R., Mari, A., Pieber, T. R., & Muscelli, E. (2016). Shift to fatty substrate utilization in response to sodium–glucose cotransporter 2 inhibition in subjects without diabetes and patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 65(5), 1190-1195. <http://dx.doi.org/10.2337/db15-1356>
- Filomeni, G., Graziani, I., De Zio, D., Dini, L., Centonze, D., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2012). Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: Possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 33(4), 767-785. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.021>
- Franco-Restrepo, J. E., Forero, D. A., & Vargas, R. A. (2019). A review of freely available, open-source software for the automated analysis of the behavior of adult zebrafish. *Zebrafish*, 16(3), 223-232. <http://dx.doi.org/10.1089/zeb.2018.1662>
- García-Rodríguez, D., & Giménez-Cassina, A. (2021). Ketone bodies in the brain beyond fuel metabolism: From excitability to gene expression and cell signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, Article 732120. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2021.732120>
- Gence, L., Fernezelian, D., Bringart, M., Veeren, B., Christophe, A., Brion, F., Meilhac, O., Bascands, J.-L., & Diotel, N. (2022). Hypericum lanceolatum lam. medicinal plant: Potential toxicity and therapeutic effects based on a zebrafish model. *Frontiers in Pharmacology*, 13, Article 832928. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.832928>

- Gerhart, D. Z., Enerson, B. E., Zhdankina, O. Y., Leino, R. L., & Drewes, L. R. (1997). Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 273(1), E207-E213. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.1.E207>
- Gialluisi, A., Reccia, M. G., Modugno, N., Nutile, T., Lombardi, A., Di Giovannantonio, L. G., Pietracupa, S., Ruggiero, D., Scala, S., & Gambardella, S. (2021). Identification of sixteen novel candidate genes for late onset Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 16(1), 1-18. <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-021-00455-2>
- Gold, P. E. (2003). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 194-210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2003.07.003>
- González-Polo, R. A., Niso-Santano, M., Ortiz-Ortiz, M. A., Gómez-Martín, A., Morán, J. M., García-Rubio, L., Francisco-Morcillo, J., Zaragoza, C., Soler, G., & Fuentes, J. M. (2007). Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicological Sciences*, 97(2), 448-458. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm040>
- Grochowska, K., & Przeliorz, A. (2022). The effect of the ketogenic diet on the therapy of neurodegenerative diseases and its impact on improving cognitive functions. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 12(2), 100-106. <http://dx.doi.org/10.1159/000524331>
- Guo, F., Liu, X., Cai, H., & Le, W. (2018). Autophagy in neurodegenerative diseases: Pathogenesis and therapy. *Brain Pathology*, 28(1), 3-13. <http://dx.doi.org/10.1111/bpa.12545>
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 77, pp. 398-405). Elsevier.
- Halestrap, A. P. (2013). The SLC16 gene family—structure, role and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 337-349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.003>

- Handra, C., Coman, O. A., Coman, L., Enache, T., Stoleru, S., Sorescu, A. M., Ghită, I., & Fulga, I. (2019). The connection between different neurotransmitters involved in cognitive processes. *Farmacía*, 67(2), 193-201. <http://dx.doi.org/10.31925/farmacía.2019.2.1>
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2010). A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 16(2), 79-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.08.007>
- Hayes, M. T. (2019). Parkinson's disease and parkinsonism. *The American Journal of Medicine*, 132(7), 802-807. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>
- Heimke, M., Lenz, F., Rickert, U., Lucius, R., & Cossais, F. (2022). Anti-inflammatory properties of the SGLT2 Inhibitor empagliflozin in activated primary microglia. *Cells*, 11(19), Article 3107. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11193107>
- Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular signalling*, 26(12), 2694-2701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.019>
- Hierro-Bujalance, C., Infante-Garcia, C., Del Marco, A., Herrera, M., Carranza-Naval, M. J., Suarez, J., Alves-Martinez, P., Lubian-Lopez, S., & Garcia-Alloza, M. (2020). Empagliflozin reduces vascular damage and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12(1), 1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-020-00607-4>
- Hou, X., Watzlawik, J. O., Fiesel, F. C., & Springer, W. (2020). Autophagy in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2651-2672. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.037>
- Hu, C., Tao, L., Cao, X., & Chen, L. (2020). The solute carrier transporters and the brain: Physiological and pharmacological implications. *Asian Journal of Pharmaceutical sciences*, 15(2), 131-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2019.09.002>
- Hughes, R. N. (2004). The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(5), 497-505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.006>

- Iannantuoni, F., M. de Mara  n, A., Diaz-Morales, N., Falcon, R., Ba  uls, C., Abad-Jimenez, Z., Victor, V. M., Hernandez-Mijares, A., & Rovira-Llopis, S. (2019). The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates the inflammatory profile in type 2 diabetic patients and promotes an antioxidant response in leukocytes. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), Article 1814. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm8111814>
- Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(8), 795-808. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
- Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), Article 8767. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228767>
- Jeong, E. A., Jeon, B. T., Shin, H. J., Kim, N., Lee, D. H., Kim, H. J., Kang, S. S., Cho, G. J., Choi, W. S., & Roh, G. S. (2011). Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor-  activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. *Experimental Neurology*, 232(2), 195-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.001>
- Jiang, M., Wei, Q., Dong, G., Komatsu, M., Su, Y., & Dong, Z. (2012). Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney International*, 82(12), 1271-1283. <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2012.261>
- Jiang, X., Feng, X., Huang, H., Liu, L., Qiao, L., Zhang, B., & Yu, W. (2017). The effects of rotenone-induced toxicity via the NF- B–iNOS pathway in rat liver. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(4), 318-325. <http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2017.1285972>
- Jiang, Z., Yin, X., Wang, M., Chen, T., Wang, Y., Gao, Z., & Wang, Z. (2022). Effects of ketogenic diet on neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Aging and Disease*, 13(4), Article 1146. <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2021.1217>
- Jojima, T., Tomotsune, T., Iijima, T., Akimoto, K., Suzuki, K., & Aso, Y. (2016). Empagliflozin (an SGLT2 inhibitor), alone or in combination with linagliptin (a DPP-4 inhibitor), prevents steatohepatitis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis and diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 8(1), 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/s13098-016-0169-x>

- Joniec-Maciejak, I., Wawer, A., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Maciejak, P., Szyndler, J., Mirowska-Guzel, D., & Płaźnik, A. (2018). Octanoic acid prevents reduction of striatal dopamine in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*, 70(5), 988-992. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2018.04.008>
- Kaslin, J., & Panula, P. (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology*, 440(4), 342-377. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.1390>
- Kell, M. J., Riccio, R. E., Baumgartner, E. A., Compton, Z. J., Pecorin, P. J., Mitchell, T. A., Topczewski, J., & LeClair, E. E. (2018). Targeted deletion of the zebrafish actin-bundling protein L-plastin (lcp1). *PloS One*, 13(1), Article e0190353. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0190353>
- Khan, T., Khan, S., Akhtar, M., Ali, J., & Najmi, A. K. (2021). Empagliflozin nanoparticles attenuates type2 diabetes induced cognitive impairment via oxidative stress and inflammatory pathway in high fructose diet induced hyperglycemic mice. *Neurochemistry International*, 150, Article 105158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105158>
- Kim, K. K., Jin, S. H., & Lee, B. J. (2013). Herpes virus entry mediator signaling in the brain is imperative in acute inflammation-induced anorexia and body weight loss. *Endocrinology and Metabolism*, 28(3), 214-220. <http://dx.doi.org/10.3803/EnM.2013.28.3.214>
- Kim, Y. C., & Guan, K. L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 25-32. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI73939>
- Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal models for Parkinson's disease research: Trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), Article 5402. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20215402>
- Koeglsperger, T., Rumpf, S. L., Schließer, P., Struebing, F. L., Brendel, M., Levin, J., Trenkwalder, C., Höglinger, G. U., & Herms, J. (2023). Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), Article 32. <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-023-00622-7>

- Korbut, A. I., Taskaeva, I. S., Bgatova, N. P., Muraleva, N. A., Orlov, N. B., Dashkin, M. V., Khotskina, A. S., Zavyalov, E. L., Konenkov, V. I., & Klein, T. (2020). SGLT2 inhibitor empagliflozin and DPP4 inhibitor linagliptin reactivate glomerular autophagy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), Article 2987. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21082987>
- Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., & Kadziolka, A. (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 155(3), 275-283. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)
- Lehtonen, Š., Sonninen, T.-M., Wojciechowski, S., Goldsteins, G., & Koistinaho, J. (2019). Dysfunction of cellular proteostasis in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, Article 457. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.00457>
- Leino, R. L., Gerhart, D. Z., Duelli, R., Enerson, B. E., & Drewes, L. R. (2001). Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochemistry International*, 38(6), 519-527. [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-0186\(00\)00102-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00102-9)
- Lelieveld, L. T., Gerhardt, S., Maas, S., Zwiers, K. C., de Wit, C., Beijik, E. H., Ferraz, M. J., Artola, M., Meijer, A. H., & Tudorache, C. (2022). Consequences of excessive glucosylsphingosine in glucocerebrosidase-deficient zebrafish. *Journal of Lipid Research*, 63(5), Article 100199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlr.2022.100199>
- Li, S., Yang, Y., Huang, L., Kong, M., & Yang, Z. (2019). A novel compound heterozygous mutation in SLC5A2 contributes to familial renal glucosuria in a Chinese family, and a review of the relevant literature. *Molecular Medicine Reports*, 19(5), 4364-4376. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2019.10110>
- Li, X., Liu, B., Li, X. L., Li, Y. X., Sun, M. Z., Chen, D. Y., Zhao, X., & Feng, X. Z. (2014). SiO₂ nanoparticles change colour preference and cause Parkinson's-like behaviour in zebrafish. *Scientific Reports*, 4(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03810>

- Liang, Y., Zhou, T., Chen, Y., Lin, D., Jing, X., Peng, S., Zheng, D., Zeng, Z., Lei, M., & Wu, X. (2017). Rifampicin inhibits rotenone-induced microglial inflammation via enhancement of autophagy. *Neurotoxicology*, 63, 137-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.015>
- Lind-Holm Mogensen, F., Scafidi, A., Poli, A., & Michelucci, A. (2023). PARK7/DJ-1 in microglia: Implications in Parkinson's disease and relevance as a therapeutic target. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 1-19. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-023-02776-z>
- Linnartz-Gerlach, B., Kopatz, J., & Neumann, H. (2014). Siglec functions of microglia. *Glycobiology*, 24(9), 794-799. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwu044>
- Liu, C., Liu, Z., Fang, Y., Du, Z., Yan, Z., Yuan, X., Dai, L., Yu, T., Xiong, M., & Tian, Y. (2022). Exposure to the environmentally toxic pesticide maneb induces Parkinson's disease-like neurotoxicity in mice: A combined proteomic and metabolomic analysis. *Chemosphere*, 308, Article 136344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136344>
- Lizama, B. N., & Chu, C. T. (2021). Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 82, Article 100972. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2021.100972>
- Lookingland, K. J., & Moore, K. E. (2005). Chapter VIII Functional neuroanatomy of hypothalamic dopaminergic neuroendocrine systems. In S.B. Dunnett, M. Bentivoglio, A. Björklund, & T. Hökfelt (Eds.), *Handbook of chemical neuroanatomy* (Vol. 21, pp. 435-523). Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8196\(05\)80012-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8196(05)80012-0)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Ma, Y., Kan, C., Qiu, H., Liu, Y., Hou, N., Han, F., Shi, J., & Sun, X. (2021). Transcriptomic analysis reveals the protective effects of empagliflozin on lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12, Article 793586. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.793586>

- MacMahon Copas, A. N., McComish, S. F., Fletcher, J. M., & Caldwell, M. A. (2021). The pathogenesis of Parkinson's disease: A complex interplay between astrocytes, microglia, and T lymphocytes?. *Frontiers in Neurology*, 12, Article 666737. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.666737>
- Matheoud, D., Cannon, T., Voisin, A., Penttinen, A. M., Ramet, L., Fahmy, A. M., Ducrot, C., Laplante, A., Bourque, M. J., & Zhu, L. (2019). Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1^{-/-} mice. *Nature*, 571(7766), 565-569. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1405-y>
- Maurer, G. D., Brucker, D. P., Bähr, O., Harter, P. N., Hattingen, E., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Steinbach, J. P., & Rieger, J. (2011). Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: A rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*, 11(1), 1-17. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-315>
- McNaught, K. S. P., Perl, D. P., Brownell, A. L., & Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 56(1), 149-162. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.20186>
- Mei, S., Livingston, M., Hao, J., Li, L., Mei, C., & Dong, Z. (2016). Autophagy is activated to protect against endotoxic acute kidney injury. *Scientific Reports*, 6(1), Article 22171. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22171>
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*, 5(1), 62-71. <http://dx.doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Moore, T. J., Lione, A. P., Sugden, M. C., & Regen, D. M. (1976). Beta-hydroxybutyrate transport in rat brain: Developmental and dietary modulations. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 230(3), 619-630. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.230.3.619>
- Motawi, T. K., Al-Kady, R. H., Abdelraouf, S. M., & Senousy, M. A. (2022). Empagliflozin alleviates endoplasmic reticulum stress and augments autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Targeting the GRP78/PERK/eIF2 α /CHOP pathway and miR-211-5p. *Chemico-Biological Interactions*, 362, Article 110002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110002>

- Mousa, H. H., Sharawy, M. H., & Nader, M. A. (2023). Empagliflozin enhances neuroplasticity in rotenone-induced parkinsonism: Role of BDNF, CREB and Npas4. *Life Sciences*, 312, Article 121258. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121258>
- Myloie, A. A., Collins, H., Umbles, C., & Kyle, J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82(3), 512-520. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90286-3](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(86)90286-3)
- Nagatsu, T., Nakashima, A., Ichinose, H., & Kobayashi, K. (2019). Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders. *Journal of Neural Transmission*, 126, 397-409. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-018-1903-3>
- Nah, J., Zablocki, D., & Sadoshima, J. (2021). The roles of the inhibitory autophagy regulator Rubicon in the heart: A new therapeutic target to prevent cardiac cell death. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(4), 528-536. <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00600-3>
- Nakamura, S., Oba, M., Suzuki, M., Takahashi, A., Yamamuro, T., Fujiwara, M., Ikenaka, K., Minami, S., Tabata, N., & Yamamoto, K. (2019). Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nature Communications*, 10(1), Article 847. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08729-6>
- Natale, G., Kastsiushenka, O., Fulceri, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., & Fornai, F. (2010). MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain Research*, 1355, 195-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.076>
- Navarro-Romero, A., Montpeyó, M., & Martinez-Vicente, M. (2020). The emerging role of the lysosome in Parkinson's disease. *Cells*, 9(11), Article 2399. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9112399>
- Ndefo, U. A., Anidiobi, N. O., Basheer, E., & Eaton, A. T. (2015). Empagliflozin (Jardiance): A novel SGLT2 inhibitor for the treatment of type-2 diabetes. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(6), 364-368.
- Nguyen, A. T., Mandard, S., Dray, C., Deckert, V., Valet, P., Besnard, P., Drucker, D. J., Lagrost, L., & Grober, J. (2014). Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated

- insulin secretion: Involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes*, 63(2), 471-482.
<http://dx.doi.org/10.2337/db13-0903>
- Noel, J. A., Hougen, I., & Sood, M. M. (2022). The intersection of SGLT2 inhibitors, cognitive impairment, and CKD. *Frontiers in Neurology*, 13, Article 1279.
<http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2022.823569>
- Ochrietor, J. D., & Al-Khatib, R. (2019). LPS decreases the expression of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) in mouse monocytes. *The FASEB Journal*, 33(S1), 792.7-792.7.
http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.792.7
- Ou, X., Lee, M. R., Huang, X., Messina-Graham, S., & Broxmeyer, H. E. (2014). SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. *Stem Cells*, 32(5), 1183-1194. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1641>
- Paccosi, E., & Proietti-De-Santis, L. (2023). Parkinson's disease: From genetics and epigenetics to treatment, a miRNA-based strategy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), Article 9547. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24119547>
- Pajares, M., I. Rojo, A., Manda, G., Bosca, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's disease: Mechanisms and therapeutic implications. *Cells*, 9(7), Article 1687. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9071687>
- Pang, M., Peng, R., Wang, Y., Zhu, Y., Wang, P., Moussian, B., Su, Y., Liu, X., & Ming, D. (2022). Molecular understanding of the translational models and the therapeutic potential natural products of Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, Article 113718. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113718>
- Pawlos, A., Broncel, M., Woźniak, E., & Gorzelak-Pabiś, P. (2021). Neuroprotective effect of SGLT2 inhibitors. *Molecules*, 26(23), Article 7213. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26237213>
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Martin, J. L., & Magistretti, P. J. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: Support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3990-3995.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.7.3990>

- Phillips, M. C., Murtagh, D. K., Gilbertson, L. J., Asztely, F. J., & Lynch, C. D. (2018). Low-fat versus ketogenic diet in Parkinson's disease: A pilot randomized controlled trial. *Movement Disorders*, 33(8), 1306-1314. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.27390>
- Piątkowska-Chmiel, I., Herbet, M., Gawrońska-Grzywacz, M., Pawłowski, K., Ostrowska-Leśko, M., & Dudka, J. (2023). Molecular and neural roles of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in alleviating neurocognitive impairment in diabetic mice. *Psychopharmacology*, 240(4), 983-1000. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-023-06341-7>
- Pietschner, R., Kolwelter, J., Bosch, A., Striepe, K., Jung, S., Kannenkeril, D., Ott, C., Schiffer, M., Achenbach, S., & Schmieder, R. (2021). Effect of empagliflozin on ketone bodies in patients with stable chronic heart failure. *Cardiovascular Diabetology*, 20, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1186/s12933-021-01410-7>
- Prasuhn, J., Davis, R. L., & Kumar, K. R. (2021). Targeting mitochondrial impairment in Parkinson's disease: Challenges and opportunities. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, Article 615461. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.615461>
- Puchades, M., Sogn, C. J., Maehlen, J., Bergersen, L. H., & Gundersen, V. (2013). Unaltered lactate and glucose transporter levels in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(3), 371-385. <http://dx.doi.org/10.3233/JPD-130190>
- Quinn, P. M., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., & Alves, C. H. (2020). PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 1-20. <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-020-01062-w>
- Raetzsch, C. F., Brooks, N. L., Alderman, J. M., Moore, K. S., Hosick, P. A., Klebanov, S., Akira, S., Bear, J. E., Baldwin, A. S., & Mackman, N. (2009). Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kb pathway. *Hepatology*, 50(2), 592-600. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22999>
- Ranawat, N., & Masai, I. (2021). Mechanisms underlying microglial colonization of developing neural retina in zebrafish. *Elife*, 10, Article e70550. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.70550>

- Raza, C., & Anjum, R. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*, 226, 77-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
- Razali, K., Othman, N., Mohd Nasir, M. H., Doolaanea, A. A., Kumar, J., Ibrahim, W. N., Mohamed Ibrahim, N., & Mohamed, W. M. (2021). The Promise of the zebrafish model for Parkinson's disease: Today's science and tomorrow's treatment. *Frontiers in Genetics*, 12, Article 655550. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2021.655550>
- Repici, M., & Giorgini, F. (2019). DJ-1 in Parkinson's disease: Clinical insights and therapeutic perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), Article 1377. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm8091377>
- Rivero-Ríos, P., Romo-Lozano, M., Fasiczka, R., Naaldijk, Y., & Hilfiker, S. (2020). LRRK2-related Parkinson's Disease due to altered endolysosomal biology with variable Lewy Body pathology: A hypothesis. *Frontiers in Neuroscience*, 14, Article 556. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2020.00556>
- Robea, M. A., Balmus, I. M., Ciobica, A., Strungaru, S., Plavan, G., Gorgan, L. D., Savuca, A., & Nicoara, M. (2020). Parkinson's disease-induced zebrafish models: Focussing on oxidative stress implications and sleep processes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, Article 1370837. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/1370837>
- Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 109, 249-257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>
- Rubinsztein, D. C., Codogno, P., & Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(9), 709-730. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3802>
- Sarath Babu, N., Murthy, C. L. N., Kakara, S., Sharma, R., Brahmendra Swamy, C. V., & Idris, M. M. (2016). 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics*, 16(9), 1407-1420. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201500291>

- Schaaf, M. B., Keulers, T. G., Vooijs, M. A., & Rouschop, K. M. (2016). LC3/GABARAP family proteins: Autophagy-(un) related functions. *The FASEB Journal*, 30(12), 3961-3978. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201600698R>
- Sebastián-Serrano, Á., de Diego-García, L., Martínez-Frailes, C., Ávila, J., Zimmermann, H., Millán, J. L., Miras-Portugal, M. T., & Díaz-Hernández, M. (2015). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase regulates purinergic transmission in the central nervous system during development and disease. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 95-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.004>
- Shaafi, S., Najmi, S., Aliasgharpour, H., Mahmoudi, J., Sadigh-Etemad, S., Farhoudi, M., & Baniasadi, N. (2016). The efficacy of the ketogenic diet on motor functions in Parkinson's disease: A rat model. *Current Journal of Neurology*, 63-69.
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Strohm, L., & Behrends, C. (2020). Glia-specific autophagy dysfunction in ALS. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 99, 172-182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.024>
- Sun, X., Han, F., Lu, Q., Li, X., Ren, D., Zhang, J., Han, Y., Xiang, Y. K., & Li, J. (2020). Empagliflozin ameliorates obesity-related cardiac dysfunction by regulating sestrin2-mediated AMPK-mTOR signaling and redox homeostasis in high-fat diet-induced obese mice. *Diabetes*, 69(6), 1292-1305. <http://dx.doi.org/10.2337/db19-0991>
- Sürmen, M. G., Sürmen, S., Cansız, D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., Büyükkayhan, D., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Amelioration of rotenone-induced alterations in energy/redox system, stress response and cytoskeleton proteins by octanoic acid in zebrafish: A proteomic study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(5), Article e23024. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.23024>
- Szekeres, Z., Toth, K., & Szabados, E. (2021). The effects of SGLT2 inhibitors on lipid metabolism. *Metabolites*, 11(2), Article 87. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo11020087>
- Takahashi, A., Kimura, T., Takabatake, Y., Namba, T., Kaimori, J., Kitamura, H., Matsui, I., Niimura, F., Matsusaka, T., & Fujita, N. (2012). Autophagy guards against cisplatin-

- induced acute kidney injury. *The American Journal of Pathology*, 180(2), 517-525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.001>
- Tharmaraja, T., Ho, J. S., Sia, C. H., Lim, N. A., Chong, Y. F., Lim, A. Y., Rathakrishnan, R. R., Yeo, L. L., Sharma, V. K., & Tan, B. Y. (2022). Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and neurological disorders: A scoping review. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 13, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1177/20406223221086996>
- Themistokleous, C., Bagnoli, E., Parulekar, R., & Muqit, M. M. (2023). Role of autophagy pathway in Parkinson's disease and related genetic neurological disorders. *Journal of Molecular Biology*, 435(12), Article 168144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168144>
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D. C., Yan, S. D., Naini, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., & Ramasamy, R. (2003). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 892-901. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200318797>
- Tillerson, J. L., Cohen, A. D., Philhower, J., Miller, G. W., Zigmond, M. J., & Schallert, T. (2001). Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *Journal of Neuroscience*, 21(12), 4427-4435. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04427.2001>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 20(5), 385-397. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tsai, K. F., Chen, Y. L., Chiou, T. T. Y., Chu, T. H., Li, L. C., Ng, H. Y., Lee, W. C., & Lee, C. T. (2021). Emergence of SGLT2 inhibitors as powerful antioxidants in human diseases. *Antioxidants*, 10(8), Article 1166. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10081166>
- Ünal, İ., Cansız, D., Sürmen, M. G., Sürmen, S., Sezer, Z., Beler, M., Üstündağ, Ü. V., Güzel, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2023). Identification of molecular network of gut-brain axis associated with neuroprotective effects of PPARδ-ligand erucic acid in rotenone-induced Parkinson's disease model in zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, 57(4), 585-606. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.15904>

- Ünal, İ., Çalışkan-Ak, E., Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., Alturfan, A. A., Altinoz, M. A., Elmaci, I., & Emekli-Alturfan, E. (2020). Neuroprotective effects of mitoquinone and oleandrin on Parkinson's disease model in zebrafish. *International Journal of Neuroscience*, 130(6), 574-582. <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2019.1698567>
- Ünal, İ., & Emekli-Alturfan, E. (2019). Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. *Journal of Clinical Neuroscience*, 62, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.015>
- Üstündağ, F. D., Ünal, İ., Cansız, D., Üstündağ, Ü. V., Subaşı, H. K., Alturfan, A. A., Tiber, P. M., & Emekli-Alturfan, E. (2022). 3-Pyridinylboronic acid normalizes the effects of 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine exposure in zebrafish embryos. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 947-954. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2020.1795189>
- Váradi, C. (2020). Clinical features of Parkinson's disease: The evolution of critical symptoms. *Biology*, 9(5), Article 103. <http://dx.doi.org/10.3390/biology9050103>
- Vardy, E. R., Kellett, K. A., Cocklin, S. L., & Hooper, N. M. (2011). Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 9(1), 31-37. <http://dx.doi.org/10.1159/000329722>
- Vaz, R., Outeiro, T., & Ferreira, J. (2018). Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. *Frontier in Neurology*, 9, Article 347. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2018.00347>
- Videira, P. A., & Castro-Caldas, M. (2018). Linking glycation and glycosylation with inflammation and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, Article 381. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2018.00381>
- Walter, K., & Schült, C. (1974). Acid and alkaline phosphatase in serum (two point method). In H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic Analysis* (2nd ed. pp. 856-886), Academic Press.
- Wang, C., Telpoukhovskaia, M. A., Bahr, B. A., Chen, X., & Gan, L. (2018). Endo-lysosomal dysfunction: A converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 52-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.005>

- Wang, J., & Cao, H. (2021). Zebrafish and medaka: Important animal models for human neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), Article 10766. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910766>
- Wang, Y., Ding, Y., Sun, P., Zhang, W., Xin, Q., Wang, N., Niu, Y., Chen, Y., Luo, J., & Lu, J. (2022). Empagliflozin-enhanced antioxidant defense attenuates lipotoxicity and protects hepatocytes by promoting FoxO3a-and Nrf2-mediated nuclear translocation via the CAMKK2/AMPK pathway. *Antioxidants*, 11(5), Article 799. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11050799>
- Warren, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 234(8), 1971-1975. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69851-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69851-5)
- Wen, S., Aki, T., Unuma, K., & Uemura, K. (2020). Chemically induced models of Parkinson's disease: History and perspectives for the involvement of ferroptosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, Article 581191. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2020.581191>
- Wiciński, M., Wódkiewicz, E., Górski, K., Walczak, M., & Malinowski, B. (2020). Perspective of SGLT2 inhibition in treatment of conditions connected to neuronal loss: Focus on Alzheimer's disease and ischemia-related brain injury. *Pharmaceuticals*, 13(11), Article 379. <http://dx.doi.org/10.3390/ph13110379>
- Włodarek, D. (2019). Role of ketogenic diets in neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). *Nutrients*, 11(1), Article 169. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11010169>
- Xiong, N., Xiong, J., Jia, M., Liu, L., Zhang, X., Chen, Z., Huang, J., Zhang, Z., Hou, L., & Luo, Z. (2013). The role of autophagy in Parkinson's disease: Rotenone-based modeling. *Behavioral and Brain Functions*, 9(1), 1-12. <http://dx.doi.org/10.1186/1744-9081-9-13>
- Xu, B., Li, S., Kang, B., & Zhou, J. (2022). The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management. *Cardiovascular Diabetology*, 21(1), Article 83. <http://dx.doi.org/10.1186/s12933-022-01512-w>
- Yamamoto, Y.H., Kasai, A., Omori, H., Takino, T., Sugihara, M., Umemoto, T., Hamasaki, M., Hatta, T., Natsume, T., & Morimoto, R. I. (2020). ERdj8 governs the size of

- autophagosomes during the formation process. *Journal of Cell Biology*, 219(8), Article e201903127. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201903127>
- Yasuda, T., Kamahori, M., Nagata, K., Watanabe-Asaka, T., Suzuki, M., Funayama, T., Mitani, H., & Oda, S. (2017). Abscopal activation of microglia in embryonic fish brain following targeted irradiation with heavy-ion microbeam. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), Article 1428. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071428>
- Ye, X., Zhou, X. J., & Zhang, H. (2018). Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, Article 2334. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02334>
- Yokono, M., Takasu, T., Hayashizaki, Y., Mitsuoka, K., Kihara, R., Muramatsu, Y., Miyoshi, S., Tahara, A., Kurosaki, E., & Li, Q. (2014). SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. *European Journal of Pharmacology*, 727, 66-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.040>
- Yuan, J. S., Wang, D., & Stewart Jr, C. N. (2008). Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnology Journal*, 3(1), 112-123. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200700169>
- Yurista, S. R., Silljé, H. H., Oberdorf-Maass, S. U., Schouten, E. M., Pavez Giani, M. G., Hillebrands, J. L., van Goor, H., van Veldhuisen, D. J., de Boer, R. A., & Westenbrink, B. D. (2019). Sodium–glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure*, 21(7), 862-873. <http://dx.doi.org/10.1002/ejhf.1473>
- Yurtsever, İ., Üstündağ, Ü. V., Ünal, İ., Ateş, P. S., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(4), 1544-1551. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2020.1846549>
- Zeng, X. S., Geng, W. S., & Jia, J. J. (2018). Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: Pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro*, 10, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1177/1759091418777438>

- Zeng, X. S., Geng, W. S., Jia, J. J., Chen, L., & Zhang, P. P. (2018). Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, Article 109. <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2018.00109>
- Zhang, J., Rubio, V., Lieberman, M. W., & Shi, Z. Z. (2009). OLA1, an Obg-like ATPase, suppresses antioxidant response via nontranscriptional mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15356-15361. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907213106>
- Zhang, X., Gao, F., Wang, D., Li, C., Fu, Y., He, W., & Zhang, J. (2018). Tau pathology in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 9, Article 809. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2018.00809>
- Zhang, Y., Guo, H., Guo, X., Ge, D., Shi, Y., Lu, X., Lu, J., Chen, J., Ding, F., & Zhang, Q. (2019). Involvement of Akt/mTOR in the neurotoxicity of rotenone-induced Parkinson's disease models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), Article 3811. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16203811>
- Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H., & Wang, X. (2016). Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, Article 303. <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2016.00303>
- Zheng, Z., Zhang, S., Zhang, H., Gao, Z., Wang, X., Liu, X., Xue, C., Yao, L., & Lu, G. (2022). Mechanisms of autoimmune cell in DA neuron apoptosis of Parkinson's disease: Recent advancement. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, Article 7965433. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/7965433>
- Zhou, M., Xu, W., Wang, J., Yan, J., Shi, Y., Zhang, C., Ge, W., Wu, J., Du, P., & Chen, Y. (2018). Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- κ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. *EBioMedicine*, 35, 345-360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.035>
- Zi, Z., Song, Z., Zhang, S., Ye, Y., Li, C., Xu, M., Zou, Y., He, L., & Zhu, H. (2015). Rubicon deficiency enhances cardiac autophagy and protects mice from lipopolysaccharide-induced lethality and reduction in stroke volume. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(3), 252-261. <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000188>

9. ÖZGEÇMİŞ



10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

- Ateş, P. S., **Ünal, İ.**, Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., & Emekli-Alturfan, E. (2018). Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant–antioxidant status, ccnd1 and myca expressions in zebrafish embryos. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(3), e22036. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.22036>
- Belçer, M., Cansız, D., **Ünal, İ.**, Üstündağ, Ü. V., Dandin, E., Ak, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Bisphenol A reveals its obesogenic effects through disrupting glucose tolerance, oxidant–antioxidant balance, and modulating inflammatory cytokines and fibroblast growth factor in zebrafish. *Toxicology and Industrial Health*, 38(1), 19-28. <http://dx.doi.org/10.1177/07482337211054372>
- Cansız, D., **Ünal, İ.**, Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., Altinoz, M. A., Elmacı, İ., & Emekli-Alturfan, E. (2021). Caprylic acid ameliorates rotenone induced inflammation and oxidative stress in the gut-brain axis in zebrafish. *Molecular Biology Reports*, 48, 5259-5273. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06532-5>
- Dandin, E., Üstündağ, Ü. V., **Ünal, İ.**, Ateş-Kalkan, P. S., Cansız, D., Belçer, M., Ak, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Stevioside ameliorates hyperglycemia and glucose intolerance, in a diet-induced obese zebrafish model, through epigenetic, oxidative stress and inflammatory regulation. *Obesity Research & Clinical Practice*, 16(1), 23-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2022.01.002>
- Eğimezer, G., Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., **Ünal, İ.**, Üstündağ, F., Alturfan, A. A., Emekli-Alturfan, E., Altinoz, M., & Elmacı, İ. (2020). Methylnitrosourea, dimethylbenzanthracene and benzoapirene differentially affect redox pathways, apoptosis and immunity in zebrafish. *Human & Experimental Toxicology*, 39(7), 920-929. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327120905961>
- Eryılmaz, O., Ateş, P. S., **Ünal, İ.**, Üstündağ, Ü. V., Bay, S., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., Emekli-Alturfan, E., & Akalın, M. (2018). Evaluation of the interaction between proliferation, oxidant–antioxidant status, wnt pathway, and apoptosis in zebrafish embryos exposed to silver nanoparticles used in textile industry. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(1), e22015. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.22015>

- Gündüz, G., Beler, M., **Ünal, İ.**, Cansız, D., Emekli-Alturfan, E., & Kose, K. N. (2023). Endotoxin of *Porphyromonas gingivalis* amplifies the inflammatory response in hyperglycemia-induced zebrafish through a mechanism involving chitinase-like protein YKL-40 analogs. *Toxicological Research*, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1007/s43188-023-00190-4>
- Karaman, G. E., **Ünal, İ.**, Beler, M., Üstündağ, F. D., Cansız, D., Üstündağ, Ü. V., Emekli-Alturfan, E., & Akyüz, S. (2022). Toothpastes for children and their detergent contents affect molecular mechanisms of odontogenesis in zebrafish embryos. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2022.2150208>
- Sürmen, M. G., Sürmen, S., Cansız, D., **Ünal, İ.**, Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., Büyükkayhan, D., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Amelioration of rotenone-induced alterations in energy/redox system, stress response and cytoskeleton proteins by octanoic acid in zebrafish: A proteomic study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(5), e23024. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.23024>
- Sürmen, M. G., Sürmen, S., Cansız, D., **Ünal, İ.**, Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2021). Quantitative phosphoproteomics to resolve the cellular responses to octanoic acid in rotenone exposed zebrafish. *Journal of Food Biochemistry*, 45(10), e13923. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13923>
- Ünal, İ.**, Cansız, D., Sürmen, M. G., Sürmen, S., Sezer, Z., Beler, M., Üstündağ, Ü. V., Güzel, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2023). Identification of molecular network of gut-brain axis associated with neuroprotective effects of PPAR δ -ligand erucic acid in rotenone-induced Parkinson's disease model in zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, 57(4), 585-606. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.15904>
- Ünal, İ.**, Çalışkan-Ak, E., Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., Alturfan, A. A., Altinoz, M. A., Elmaci, I., & Emekli-Alturfan, E. (2020). Neuroprotective effects of mitoquinone and oleandrin on Parkinson's disease model in zebrafish. *International Journal of Neuroscience*, 130(6), 574-582. <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2019.1698567>
- Ünal, İ.**, & Emekli-Alturfan, E. (2019). Fishing for Parkinson's disease: A review of the literature. *Journal of Clinical Neuroscience*, 62, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.015>

- Ünal, İ.,** Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., Eğilmezer, G., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., & Emekli-Alturfan, E. (2019). Rotenone impairs oxidant/antioxidant balance both in brain and intestines in zebrafish. *International Journal of Neuroscience*, 129(4), 363-368. <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2018.1538141>
- Üstündağ, F. D., **Ünal, İ.,** Cansız, D., Üstündağ, Ü. V., Subaşı, H. K., Alturfan, A. A., Tiber, P. M., & Emekli-Alturfan, E. (2022). 3-Pyridinylboronic acid normalizes the effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine exposure in zebrafish embryos. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 947-954. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2020.1795189>
- Üstündağ, F. D., **Ünal, İ.,** Üstündağ, Ü. V., Cansız, D., Beler, M., Alturfan, A. A., Tiber, P. M., & Emekli-Alturfan, E. (2023). Morphine ameliorates pentylene-tetrazole-induced locomotor pattern in zebrafish embryos; mechanism involving regulation of opioid receptors, suppression of oxidative stress, and inflammation in epileptogenesis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 33(2), 151-160. <http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2022.2105182>
- Üstündağ, F. D., **Ünal, İ.,** Üstündağ, Ü. V., Cansız, D., Beler, M., Karagöz, A., Kara Subaşı, H., Alturfan, A. A., Mega Tiber, P., & Emekli-Alturfan, E. (2022). 3-Pyridinylboronic acid ameliorates rotenone-induced oxidative stress through nrf2 target genes in zebrafish embryos. *Neurochemical Research*, 47(6), 1553-1564. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-022-03548-6>
- Üstündağ, Ü. V., Çalışkan-Ak, E., Ateş, P. S., **Ünal, İ.,** Eğilmezer, G., Yiğitbaşı, T., Ata Alturfan, A., & Emekli-Alturfan, E. (2019). White LED light exposure inhibits the development and xanthophore pigmentation of zebrafish embryo. *Scientific Reports*, 9(1), 10810. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-47163-y>
- Üstündağ, Ü. V., **Ünal, İ.,** Ateş, P. S., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., & Emekli-Alturfan, E. (2017). Bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate exert divergent effects on apoptosis and the Wnt/ β -catenin pathway in zebrafish embryos: A possible mechanism of endocrine disrupting chemical action. *Toxicology and Industrial Health*, 33(12), 901-910. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233717733598>
- Yurtsever, İ., Üstündağ, Ü. V., **Ünal, İ.,** Ateş, P. S., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium

homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(4), 1544-1551. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2020.1846549>

Tez Konusu ile İlgili SCI/SCI-Expanded Kapsamında Yayınlanmış Makaleler

Ünal, İ., Cansız, D., Sürmen, M. G., Sürmen, S., Sezer, Z., Beler, M., Üstündağ, Ü. V., Güzel, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2023). Identification of molecular network of gut-brain axis associated with neuroprotective effects of PPAR δ -ligand erucic acid in rotenone-induced Parkinson's disease model in zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, 57(4), 585-606. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.15904>

Ünal, İ., & Emekli-Alturfan, E. (2019). Fishing for Parkinson's disease: A review of the literature. *Journal of Clinical Neuroscience*, 62, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.015>

Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Ateş, P. S., Eğilmezer, G., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., & Emekli-Alturfan, E. (2019). Rotenone impairs oxidant/antioxidant balance both in brain and intestines in zebrafish. *International Journal of Neuroscience*, 129(4), 363-368. <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2018.1538141>

Bildiri

İsmail Ünal, & Ebru Işık Alturfan. Model Organizma Olarak Zebra Balıklarında Lipopolisakkarit Uygulanmasının Beyin Dokusunda *lrrk2*, *dj-1* ve *tnf- α* Gen İfadeleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, 5th *Internatinal Eurasian Conference On Biological and Chemical Sciences*. 23-25 Kasım 2022, Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum)

ORAL PRESENTATION

Model Organizma Olarak Zebra Balıklarında Lipopolisakkarit Uygulanmasının Beyin Dokusunda *lrrk2*, *dj-1* ve *tnf-α* Gen İfadeleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

İsmail ÜNAL^{1*}(ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8664-3298>), Ebru Işık ALTURFAN¹(ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2419-8587>)

¹Marmara Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: ismailunal@marun.edu.tr

Özet

Parkinson hastalığı (PH) dünya üzerinde en çok görülen nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Substansiya nigranın compact parçasındaki dopaminerjik nöronların azalması ile ortaya çıkar. PH gelişiminde etkili başlıca faktörler genetik, yaşlılık ve çevresel tetikleyiciler olarak düşünülmektedir. Araştırmalarda mitokondriyal hasar, oksidatif stres, nöroinflamasyon, protein birikmesi ve otofajik yollarındaki bozukluklar bildirilen nedenlerdendir. *lrrk2* ve *dj-1* dahil olmak üzere bazı genlerin PH gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Zebra balıkları son yıllarda kullanımı yaygınlaşan model organizmalardır. Genom yapısının insanla benzerliği, bakımının kolay ve düşük maliyetli olması ve hızlı çoğalabilmesi gibi nedenlerden dolayı çalışmalarda son yıllarda tercih edilmektedir. Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin hücre zarlarında bulunur ve endotoksin bir moleküldür. LPS, insan bağırsaklarında yaşayan bazı bakteriler tarafından da oluşturulmaktadır. Bağırsak epitel duvarının geçirgenliğinin artması ile LPS bu duvarı aşarak kan yoluyla ya da vagus siniri üzerinden beyin dokusunda nöroinflamasyon oluşmasına neden olabilmektedir. Çalışmamızın amacı zebra balıklarına LPS uygulanmasının beyin dokusunda *lrrk2*, *dj-1* ve *tnf-α* genlerinin ifadeleri üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. LPS, dört hafta boyunca haftada bir kez intraperitoneal olarak 1 µg/gr ve 5 µg/gr dozlarında verilmiştir. İlk ve son hafta olacak şekilde LPS enjeksiyonundan iki gün sonra beyin dokuları alınmış ve RT-PCR için hazırlanmıştır. Yapılan RT-PCR çalışması sonucunda dört hafta boyunca 5 µg/gr LPS verilen grupta kontrol grubuna göre *lrrk2* ve *dj-1*, *tnf-α* genlerinin ifadelerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, Lipopolisakkarit, Nöroinflamasyon, Zebra balığı

11. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

