



**DENEYSEL PARKİNSON MODELİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
BROMELAIN'İN ETKİLERİNİN
LEVODOPA İLE KIYASLANARAK
ARAŞTIRILMASI**

Betül ÇİÇEK

Fizyoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa GÜL**

Doktora Tezi-2020

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA BROMELAIN'İN ETKİLERİNİN
LEVODOPA İLE KIYASLANARAK ARAŞTIRILMASI**

Betül ÇİÇEK

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa GÜL**

**ERZURUM
2020**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA BROMELAIN'İN ETKİLERİNİN
LEVODOPA İLE KIYASLANARAK ARAŞTIRILMASI**

Betül ÇİÇEK

Tez Savunma Tarihi : 25.09.2020

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ufuk OKKAY (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Bayram YILMAZ (Yeditepe Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Ahmet AYAR (Karadeniz Teknik Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2020

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Parkinson Hastalığı	4
2.1.1. Parkinson Hastalığı Tanımı ve Tarihçesi	4
2.1.2. Parkinson Hastalığı Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi	5
2.1.3.1. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Yaşlılık	5
2.1.3.2. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Cinsiyet	6
2.1.3.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Çevresel Faktörler	6
2.1.3.4. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Genetik Faktörler	7
2.1.4. Parkinson Hastalığı Tanı Kriterleri	8
2.1.5. Parkinson Hastalığı Sınıflandırılması	9
2.1.6. Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları.....	10
2.1.6.1. Bazal Gangliyonlar	10
2.1.6.2. Bazal Gangliyon İşlevsel Anatomi	11
2.1.6.3. Bazal Gangliyon Devreleri	12
2.1.7. Dopamin ve Dopamin Reseptörleri	15

2.1.7.1. D1 Benzeri Reseptörler.....	16
2.1.7.2. D2 Benzeri Reseptörler.....	17
2.1.8. Dopamin ve Dopamin Reseptörlerinin Parkinson Hastalığı ile İlişkisi.....	17
2.1.9. Parkinson Hastalığı Klinik Özellikleri.....	19
2.1.9.1. Tremor	20
2.1.9.2. Bradikinezi.....	20
2.1.9.3. Rijidite	20
2.1.9.4. Postüral İnstabilite	21
2.1.10. Motor Olmayan Semptomlar	21
2.1.11. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi.....	22
2.1.12. Parkinson Hastalığı Güncel Tedavi Yaklaşımları.....	25
2.1.12.1. Parkinson Hastalığı Medikal Tedavisi.....	25
2.1.12.2. Parkinson Hastalığında Cerrahi Tedavi	28
2.1.12.3. Parkinson Hastalığı Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	30
2.1.12.4. Parkinson Hastalığında Yeni Tedavi Yaklaşımları.....	30
2.1.13.1. Bromelain ve Biyokimyasal Özellikleri	34
2.1.13.2. Bromelain ve Antiinflamatuvar Aktivite	35
2.1.13.3. Bromelain ve Medikal Kullanımı	36
2.1.14. Parkinson Hastalığı Deneysel Hayvan Modelleri.....	37
2.1.14.1. Farmakolojik Modeller	38
2.1.14.2. Toksik Modeller.....	39
2.1.14.3. Genetik Modeller	43
2.2. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)	44
2.3. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α).....	45
2.4. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS).....	47

3. MATERYAL VE METOT	50
3.1. Materyal	50
3.1.1. Deney Hayvanları	50
3.2. Metot.....	50
3.2.1. Çalışma Grupları.....	50
3.2.2. Bromelain ve L-Dopa Uygulanması	51
3.2.3. 6-OHDA ile Deneysel Parkinson Modelinin Oluşturulması	51
3.3. Davranışsal Testler	53
3.3.1. Apomorfinle İndüklenen Rotasyon Testi.....	53
3.3.2. Silindir Testi	53
3.3.3. Lokomotor aktivitemetre testi.....	54
3.4. Histopatolojik Analizler.....	55
3.4.1. Dokuların Hazırlanması ve Hematoksilin-Eozin Boyama.....	55
3.4.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	55
3.5. Gen İfade Düzeylerinin İncelenmesi	57
3.5.1. RNA İzolasyonu	57
3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması.....	58
3.5.3. cDNA Sentezi	58
3.5.4. Real Time PCR kullanılarak D1 ve D2 Reseptör Ekspresyonunun Ölçülmesi	59
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	60
4. BULGULAR	61
4.1. Davranışsal Testler	61
4.1.1. Apomorfinle İndüklenen Rotasyon Testi Sonuçları	61
4.1.2. Silindir Testi Sonuçları	62
4.1.2. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları	63

4.2. Histolojik Parametreler	69
4.2.1. Histopatolojik Değerlendirme.....	69
4.2.1. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	71
4.3. Gen İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi	76
5. TARTIŞMA.....	79
5.1. Davranışsal Değişiklikler.....	81
5.2. İmmünohistokimyasal Değişiklikler.....	86
5.3. D1 ve D2 Reseptör Değişiklikleri.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	96
KAYNAKLAR	99
EKLER	127
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	127
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	128
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	129
EK-4. TEZ BAŞLIĞI DEĞİŞİKLİĞİ KABUL YAZISI.....	131

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve doktora tezimin hazırlanması sürecinde bana her türlü desteğini veren danışman hocam, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜL'e en içten şekilde saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Fizyoloji eğitimim süresince bana bilgi ve yardımları ile destek olan Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine; lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile hiçbir desteğini esirgemeyen, laboratuvarını açarak her türlü çalışmaya imkân tanıyan, tezin hazırlanma aşamasında tecrübeleriyle bana destek olan Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na; bilgi, tecrübe ve görüşlerini paylaşarak tezin çalışmalarına ve planlanmasına yön veren Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ufuk OKKAY ve Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ali TAGHİZADEHGHJALEHJOUGHİ'e, tezimin histolojik çalışmalarını yürüten Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'A en içten saygılarımla teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamı (TDK-2019-6996 BAP) destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, doktora tez çalışmamın yürütülmesine imkân oluşturan Yüksek Öğrenim Kurumu (YÖK), Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na (ÖYP), Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline teşekkürü bir borç bilirim. Eğitimim hayatım boyunca her an yanımda hissettiğim bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, sevgili anne-babama ve canım kardeşime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Betül ÇİÇEK

ÖZET

Deneyel Parkinson Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Bromelain'in Etkilerinin Levodopa ile Kıyaslanarak Araştırılması

Amaç: Parkinson hastalığı (PH) substansiya nigra pars kompakta (SNc)'da dopaminerjik (DAerjik) nöronların progresif dejenerasyonu ile karakterizedir. L-Dopa günümüzde en etkili farmakolojik tedavi yöntemi olup nörodejeneratif süreci değiştirmeye değil, semptomatik olarak yaşam kalitesini arttırmaya yöneliktir. Bununla birlikte L-Dopa'nın uzun süreli kullanımı diskinezi ve motor dalgalanmalara sebep olmaktadır. Nöroinflamasyonun PH'de rolü olduğu bilinmekte ve bu bakımdan antiinflamatuvar ajanların tedavide etkinlikleri araştırılmaktadır. Bu tezde deneyel PH modeli geliştirilmiş ratlarda antiinflamatuvar özelliğe sahip BRM'nin PH'de alternatif tedavi edici özelliklerini ve aynı zamanda L-Dopa'nın tedavi edici etkilerini artırma potansiyeli olup olmadığını davranış testleri, histopatolojik inceleme ve genetik açıdan araştırmak hedeflenmiştir.

Materyal ve Metot: Ratlar rastgele 5 gruba ayrıldı. Gruplar; Kontrol, PH, PH+BRM, PH+L-Dopa, PH+BRM+L-Dopa olarak belirlendi. Deneyel PH modeli ratlara unilateral 6-OHDA enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirildi. Ratlara 14 gün süre ile BRM, L-Dopa ve BRM+L-Dopa kombinasyonu verildi. Apomorfin, silindir ve lokomotor aktivite testleri sonrası deney sonlandırıldı. İnflamatuvar aktiviteyi belirlemek için ratların substansiya nigra (SN) bölgesinde GFAP, TNF- α ve nNOS ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlendi. Aynı bölgede D1 ve D2 gen ekspresyon seviyesi RT-PCR ile tespit edildi.

Bulgular: PH grubunda apomorfin ile indüklenen rotasyonel testte kontralateral dönme sayısı, silindir testinde ipsilateral pençe kullanım yüzdesi, lokomotor aktivite testinde dinlenme süresi artmıştı. L-Dopa verilmesi bu parametreleri belirgin olarak azalttı, BRM'nin etkileri L-Dopa'nın altında kaldı. BRM ve L-Dopa birlikte verildiğinde bu parametrelerdeki azalmalar maksimum düzeydeydi, yani BRM L-Dopa'nın etkilerini genellikle güçlendirmişti. Locomotor testinde ambulatuvar aktivite, horizontal aktivite ve katedilen mesafe L-Dopa uygulaması PH grubuna göre bu parametrelerde belirgin artışlara yol açtı. BRM uygulanması yalnız başına bu parametreler üzerine anlamlı bir etki yapmazken L-Dopa ile birlikte verildiğinde L-Dopa'nın etkisini arttırmıştır. Vertikal aktivite testinde ise BRM uygulanması L-Dopa ile aynı miktarda artışa neden olmuş, L-Dopa ile birlikte uygulandığı zaman ise L-Dopa'nın etkisini güçlendirmiştir. Histopatoloji bulgularında PH grubunda artan GFAP, TNF- α ve nNOS ekspresyon düzeyleri L-Dopa uygulanan grupta belirgin bir şekilde azalmıştı. BRM uygulaması L-Dopa kadar olmasada bu inflamatuvar parametrelerin ekspresyon düzeylerinde azalmaya yol açmış, L-Dopa ile birlikte verildiğinde L-Dopa'nın etkisini artırmıştır. SN bölgesinde tespit edilen D1 reseptör düzeyi PH grubunda bir miktar azalma göstermiş, L-Dopa uygulaması D1 düzeyini belirgin olarak artırmış, BRM tek başına uygulanması D1 ekspresyon düzeyi üzerine çok az artırırken L-Dopa ile birlikte verilirken L-Dopa'nın etkisini artırdığı görülmüştür. D1'den farklı olarak PH grubunda D2 reseptör düzeylerinde belirgin artış olmuştur. L-Dopa bu artışı önemli oranda azaltmıştır. BRM uygulanması L-Dopa kadar olmasada D2 reseptör düzeylerini azaltmış, L-Dopa ile birlikte verildiğinde L-Dopa'nın etkisini güçlendirdiği görülmüştür.

Sonuç: Bu sonuçlar BRM'nin deneyel PH'de oluşan hasarı iyileştirmede yetersiz olduğunu, fakat hem davranışsal hem de nörodejeneratif süreci iyileştirmede L-Dopa'nın etkilerini artırdığını göstermektedir. BRM'nin PH'de etkisini daha da detaylandırmak için hastalığın patogenezinde yer alan farklı mekanizmaların incelenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, 6-OHDA, Bromelain, L-Dopa, İnflamasyon, D1, D2

ABSTRACT

Investigation of the effects of Bromelain in rats with experimental Parkinson's model by comparison with Levodopa.

Aim: Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNc). Until now, L-Dopa is the most effective pharmacological therapy for PD. Although it does not alter the neurodegenerative process, it is aimed to improve the quality of life symptomatically. Nevertheless, long-term L-DOPA administration leads to the dyskinesias and motor fluctuations. Neuroinflammation is known to play a role in PD. In this respect, the effectiveness of anti-inflammatory agents in treatment of PD is being investigated. In this thesis, it was aimed to investigate the alternative therapeutic properties of BRM, which has anti-inflammatory feature, in rats with experimental PD, as well as its potential to increase the therapeutic effects of L-Dopa by using behavioral tests, and histopathological and genetical examination methods.

Material and Method: Rats were randomly divided into 5 groups as follows; control, PD+BRM, PD+L-Dopa, PD+BRM+L-Dopa. PD rat model were created by unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA. Rats were treated with BRM, L-Dopa and combination of BRM and L-Dopa for 14 days. The experiment was terminated after apomorphine, cylinder and locomotor activity tests. Inflammation in SN was detected by immunohistochemical expression of GFAP, TNF- α and nNOS. D1 and D2 gene expression levels were determined by RT-PCR.

Results: In the PD group, the number of contralateral rotations in the rotational test induced by apomorphine, the percentage of ipsilateral paw use in the cylinder test, and the resting time in the locomotor activity test were increased. Administration of L-Dopa significantly reduced these parameters, however, the effects of BRM remained below L-Dopa. When BRM and L-Dopa were given together, the reductions in these parameters were maximal, i.e., BRM generally increased the effects of L-Dopa. Compared to the PD group, L-Dopa led to significant increases in the parameters of the ambulatory activity, horizontal activity and total distance parameters of the locomotor activity test. While BRM alone did not have a significant effect on these parameters, it generally enhanced the effect of L-Dopa when given together. In the vertical activity test, BRM caused similar amount of increase as L-Dopa, and when it is applied with L-Dopa, it increased its effect. In histopathological examination, increased GFAP, TNF- α and nNOS expression levels in the PD group were significantly decreased by L-Dopa treatment. Although not that much of L-Dopa, BRM treatment caused decreases in the expression levels of these inflammatory parameters, and it enhanced the effect of L-Dopa when given together. The D1 receptor level detected in the SN region showed a slight decrease in the PD group, L-Dopa treatment remarkably increased the D1 level, while BRM alone slightly increased D1 expression level, while it was given with L-Dopa, it increased its effect. Unlike D1, there was a significant increase in D2 receptor levels in the PD group. L-Dopa significantly reduced this increase. Although the effect of BRM was lower than L-Dopa, it has decreased D2 receptor levels, and when given with L-Dopa, it enhanced its effect.

Conclusion: These results show that although BRM is not sufficient enough to improve the damage in experimental PD, it enhances the effect of L-Dopa in improving both behavioral and neurodegenerative processes by increasing its effectiveness. It will be useful to examine the different mechanisms involved in the pathogenesis of the disease in order to further elaborate the effect of BRM in PD.

Keywords: Parkinson's Disease, 6-OHDA, Bromelain, L-Dopa, Inflammation, D1, D2

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

6-OHDA	: 6-Hidroksidopamin
AC	: Adenilat siklaz
ATADEM	: Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi
ATP	: Adenozin trifosfat
BG	: Bazal ganglionlar
BRM	: Bromelain
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CN	: Kaudat nükleus
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DA	: Dopamin
DAerjik	: Dopaminerjik
DAT	: Dopamin taşıyıcısı
EC	: Enzim komisyonu
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GDNF	: Glia kökenli nörotrofik faktör
GFAP	: Glial fibriler asidik proteini
GP	: Globus pallidus
GPe	: Globus pallidus externus
GPi	: Globus pallidus internus
HADYEK	: Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
H-E	: Hematoksilen eozin
IL	: İnterlökin

IUB	: Uluslararası Biyokimya Birliği
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KOMT	: Katekol-O-Metil Transferaz
LB	: Levi (Lewy) cisimciği
Levodopa	: L-DOPA; L-3,4-dihidroksifenilalanin
MAO-B	: Monoamino oksidaz B
MFB	: Medial ön beyin demeti
MPDP⁺	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum
MPP⁺	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSN	: Orta büyüklükte dikensi (medium spiny neurons)
mtDNA	: Wild-tip (yabanıl tip) mitokondriyal DNA
mtNOS	: Mitokondriyal nitrik oksit sentaz
NF-κB	: Nükleer faktör-κB
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrit oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PGE2	: Prostaglandin E2
PH	: Parkinson hastalığı
PKC	: Protein kinaz C
Put	: Putamen
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SF	: Serum fizyolojik

SN	: Substansiya nigra
SNe	: Substansiya nigra pars kompakta
SNr	: Substansiya nigra pars retikularis
STN	: Subtalamik nukleus
TH	: Tirozin hidroksilaz
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
VA	: Ventral anterior
VL	: Ventral lateral
VMAT2	: Veziküler monoamin taşıyıcı 2
VTA	: Ventral tegmental alan

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Bazal gangliyon ve çekirdeklerinin lokalizasyonu.....	12
Şekil 2.2. Bazal gangliyonlarda direkt ve indirekt yolların mekanizması.....	14
Şekil 2.3. Dopaminerjik projeksiyon yolları.....	15
Şekil 2.4. Normal ve Parkinson durumunda direkt ve indirekt yollarının şematik diyagramı.....	19
Şekil 2.5. Bromelain'in kimyasal yapısı.....	34
Şekil 2.6. Parkinson hastalığı hayvan modellerinde uygulanan dopaminerjik nörotoksinlerin moleküler ve hücre içi yollarına şematik bakış	41
Şekil 2.7. Dopamin ve deneysel in vivo Parkinson hastalığı modelinde kullanılan dopaminerjik toksinlerin kimyasal yapısı	43
Şekil 3.1. Stereotaksik cerrahi işleminden bir örnek	52
Şekil 4.1. Apomorfinle indüklenen rotasyonel test sonuçları.....	62
Şekil 4.2. Lokomotor aktivite testinde grupların ambulatuvar aktivite sayıları.	64
Şekil 4.3. Lokomotor aktivite testlerinde grupların vertikal aktivite sayıları.....	65
Şekil 4.4. Lokomotor aktivite testlerinde grupların horizontal aktivite sayıları.....	66
Şekil 4.5. Lokomotor aktivite testinde grupların dinlenme süreleri	67
Şekil 4.6. Lokomotor aktivite testinde grupların katettikleri toplam mesafeler	68
Şekil 4.7. Histoloji sonuçları	70
Şekil 4.8. GFAP ekspresyonu sonuçları	72
Şekil 4.9. TNF- α immünohistokimya sonuçları	73
Şekil 4.10. nNOS ekspresyonu sonuçları	74

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Parkinson Hastalığı Sınıflandırması	10
Tablo 3.1. Doku takip protokolü	55
Tablo 3.2. Primer miksi	58
Tablo 3.3. cDNA sentez miksi	58
Tablo 3.4. D1 ve D2 primerlerinin dizileri	59
Tablo 3.5. Real-Time PCR için miksi içeriği	59
Tablo 4.1. Apomorfinle indüklenen rotasyonel test	62
Tablo 4.2. Silindir testi kontralateral, ipsilateral ve her iki pençeyi birlikte kullanım yüzdesi	63
Tablo 4.3. Ambulatuvar, vertikal, horizontal aktivite, dinlenme süresi ve katedilen mesafe	69
Tablo 4.4. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirmenin Skorlanması ...	75
Tablo 4.5. D1 Reseptör Gen Ekspresyon Düzeyleri	77
Tablo 4.6. D2 Reseptör Gen Ekspresyon Düzeyleri	78

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH) tremor, rijidite, bradikinezi ve postüral instabilite ile karakterize kompleks, progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından “titrek felç” (shaking palsy) olarak tanımlanan bu hastalık daha sonra Jean-Martin Charcot tarafından “Parkinson hastalığı” ismi ile karakterize edildi ve bu isim günümüze kadar geldi¹⁻³. Genellikle ortalama olarak 50 ve 60 yaş arası bireylerde başlayan PH genç yaşlardaki bireyleri de etkileyebilir; yaklaşık olarak tüm hastaların %5’inde 40 yaşından önce PH öyküsü söz konusudur⁴. 65 yaş üstü erişkinlerin yaklaşık %2-3’nü etkileyen PH’nin insidansı yaşın ilerlemesi artış göstermektedir⁵. Artan yaşlı nüfusa bağlı olarak, 2050 yılına kadar PH prevalansının yaklaşık olarak iki kat artacağı ve bu durumun yakın bir gelecekte önemli bir sağlık sorunu haline geleceği tahmin edilmektedir⁶.

PH nigrostriatal dopaminerjik (DAerjik) nöron dejenerasyonu, nöron dejenerasyonuna bağlı olarak striatum bölgesinde dopamin (DA) miktarında azalma, ayrıca α -sinüklein içeren Lewy cisimciklerinin (LC) varlığı ile karakterize, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi PH’ye olan yatkınlığın belirlenmesinde oldukça etkili olmakta ve aynı zamanda hastalığın heterojenitesini açıklamaktadır. PH’nin etyolojisinde nöronal dejenerasyona sebep olan birçok risk faktöründen bahsedilmesine rağmen patofizyolojik süreç tam olarak anlaşılammıştır⁷. Nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir bileşen olan inflamasyon son zamanlarda PH’de yoğun olarak araştırılmaktadır. İmmün sistem disfonksiyonu, genetik mutasyonları ve çevresel faktörlerin etkileşimine katkıda bulunarak hastalığın oluşumuna neden olmaktadır. Bununla birlikte nöroinflamasyonun PH patogenezinde ayırt edici özellik olan DAerjik nöron harabiyetinin başlatılmasında ve progresyonunda rol oynayan önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir^{8, 9}. Postmortem

PH vakalarında ve deneysel PH modellerinde aktif mikroglia ve reaktif astrositler nöronal dejenerasyon ile ilişkili olan bölgelerinde bulunmakta ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)- 6 ve nitrik oksit gibi (NO) gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salınmasıyla inflamatuvar sürece katkıda bulunmaktadır^{10, 11}.

Yapılan yoğun araştırmalara rağmen PH progresyonunu önleyici ve nörodejeneratif süreci iyileştiren etkili farmakolojik tedavi yöntemi henüz bulunamamıştır. DA'nın prekürsörü olan levodopa (L-Dopa) günümüzde PH tedavisinde kullanılan en etkili farmakolojik ajandır ve hastaların yaşam kalitesini ve motor semptomları iyileştirmede diğer ilaçlara göre daha etkilidir¹². Fakat L-Dopa'nın uzun süreli kullanımı PH'li bireylerin yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle modern/konvansiyonel tıp ile birlikte hastalığın tedavisinde ve prognoz sürecini iyileştirecek tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemleri de PH tedavisinde araştırılan bir dizi farklı sağlık uygulamalarıdır. Bu bağlamda PH patogenezinde önemli bir yer tutan inflamasyona yönelik antiinflamatuvar terapötik yöntemler, aynı zamanda hastalığın progresyonunu önleyebilen nöroprotektif etkiye sahip olabilecekleri düşünülen bitkilerden elde edilen bileşikler ve çeşitli bitkisel ürünler in vitro ve prelinik araştırmalarda denenmekte ve hastalığın tedavisinde ilaç etken madde olma potansiyelleri araştırılmaktadır^{13, 14}.

Bromelain (BRM), Bromeliaceae familyasından Ananas comosus (Ananas)' dan izole edilen sülfhidril içeren proteolitik enzim kompleksidir. BRM; inflamasyon, oksidatif stres, immün cevap gibi fizyolojik ve patolojik süreçleri içeren birçok sinyal yolağıyla etkileşime girebilmektedir. Bu nedenle BRM terapötik potansiyeli, tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde, klinik öncesi ve klinik ortamlarda test edilmekte ve bu da bir takım klinik endikasyonları düşündürmektedir^{15, 16}.

Bu tez çalışmasında, PH patogeneğinde görülen ve ilerleyici nörodejeneratif sürece neden olan inflamasyon üzerine BRM'nin etkilerinin araştırılması, hali hazırda kullanılan L-Dopa tedavisinde BRM ile L-Dopa etkileşimlerinin incelenmesi, olası faydalarının araştırılması ve kanıtlanan faydalarının modern tıba kazandırılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla; deney hayvanlarının substansiya nigra (SN) bölgesine unilateral 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) nörotoksinin enjeksiyonu ile PH modeli oluşturulmuş, BRM'nin tek ve L-Dopa ile kombinasyon şeklinde PH modeli oluşan deney hayvanlarına uygulanarak tedavi edilmiş, tedavi ajanlarının etkilerini çeşitli motor testler ve davranış deneyleriyle değerlendirilmiş, patolojik ve genetiksel değişiklikler incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Parkinson Hastalığı Tanımı ve Tarihçesi

Parkinson hastalığı (PH) ilk kez 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından yayınlanan ve bir nöroloji klasığı haline gelen “Titremeli Felç Üzerine Bir Deneme” de “titrek felç” (shaking palsy) olarak tanımlanmış ve bu hastalığa “Paralysis Ajitans” adı vermiştir^{1,2}. 1861 yılında Dr. Jean Martin Charcot hastalığın özgün tanımına kas rijiditesi, mikrografi ve duyuşal değişiklikler gibi birçok özelliği de ekleyerek hastalığın tanımını genişletmiş ve hastalığa onu tanımlayan ilk kişinin adını vermiştir³. 1912 yılında Fritz Heinrich Lewy günümüzde hala PH’de patolojik bir belirteç olarak kabul edilen inklüzyon cisimciklerini tanımlamış ve 1919 yılında Konstantin Tretiakoff substansiya nigra (SN)’da dopaminerjik (DAerjik) nöron kayıplarının hastalık ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir. 1960 yılında Oleh Hornykiewicz PH’de beynin striatum bölgesinde dopamin (DA) eksikliği olduğunu bildirmiştir¹⁷. PH’de substansiya nigra kompakta (SNc)’bölgesinde DAerjik nöron harabiyetine bağlı olarak DA azalması ve beynin farklı bölgelerinde nöronların sitoplazmalarında görülen anormal α -sinüklein protein birikimi ile karakterizedir. Günümüzde PH oluşumundan sorumlu olan bu patofizyolojik olayların nedeni hala tam olarak aydınlatılamamıştır^{7, 18}.

2.1.2. Parkinson Hastalığı Epidemiyolojisi

PH, Alzheimer hastalığından sonra yaşla ilişkili ikinci en sık görülen, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Ortalama yaşam süresinin uzaması ve buna bağlı olarak yaşlı nüfusun giderek artması sonucu PH prevalansı tüm dünyada giderek artış göstermektedir¹⁹.

PH tüm ırklar ve tüm etnik gruplarda görölmesine rağmen hastalığın dağılımı ve görölme sıklığı etnik köken ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir. PH’nin prevalansı

en fazla Avrupalılar ve Kuzey Amerikalılar gibi beyaz ırk, en az ise Afrika'daki siyah ırka mensup insanlarda görülmektedir. Hastalığın insidansı ile ilgili yapılan çalışmalarda yıllık olarak 100.000'de 5 ila 35 kişi arasında değişmektedir. Ayrıca hayatın 6. dekatından 9. dekatına geçişte hastalığın insidansında 5'ten 10 kata kadar bir artış gösterdiği saptanmıştır²⁰. Yapılan meta-analizi çalışmasında dünya genelindeki veriler yaş bazında değerlendirildiğinde hastalığın yaş ile birlikte 100.000'de; 40-49 yaş arası 41, 50- 59 yaş arası 107, 55-64 yaş arası 173, 60-69 yaşlarında 428, 65-74 yaş arası 425, 70-79 yaşlarında 1087 ve 80 yaş üzeri bireylerde 1903 olduğu bildirilmiştir. Sadece 9 çalışma yaş standartlarına göre cinsiyet oranlarını incelemiş olup bu çalışmaların 5'inde erkeklerde anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$)²¹.

2.1.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi

En yaygın ikinci nörodejeneratif hastalık olan PH'nin etiyolojisinde çeşitli risk faktörlerinden söz edilse de hastalığın patofizyolojik süreci tam olarak bilinmemektedir. Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu hastalığın patolojisinde görülen ileri düzeyde nöron dejenerasyonunun meydana geldiği düşünülmektedir. PH'nin oluşumunda, progresyonunda etkisi olabilecek ve PH insidans ve prevalansı ile ilişkili olan bazı risk faktörleri tanımlanmıştır^{22, 23}.

2.1.3.1. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Yaşlılık

Yaşlılık PH için en büyük risk faktörüdür ve 60 yaş üstü bireylerde hastalığın insidansı artmaktadır²⁴. 50-90 yaş arası bireylerde yaşlanma ile birlikte beyin ağırlığının her on yılda yaklaşık olarak % 2-3 oranında azaldığı bildirilmiştir. Nörolojik bozukluğu olmayan bireylerde SN DAerjik nöron sayısının her on yılda % 7 ila 9,8 oranında azaldığı tahmin edilmektedir²³. Protein yanlış katlanmasına bağlı oluşan α -sinükleinin yıllara bağlı birikimi ve DA metabolizmasına bağlı reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu yaşlanma ile beraber daha belirgin bir şekilde görülmektedir. Yaşlılıkla birlikte SN'da

wild-tip mitokondriyal DNA (mtDNA) kopmalarına bağlı adenosin trifosfat (ATP) üretimi ve protein degradasyonunda azalma, oksidatif strese bağlı biriken nöromelaninin kronik inflamasyon ve hücre ölümüne neden olması gibi süreçler sonucu DAerjik nöron kaybı görölmekte ve buna bağlı motor bulgular ortaya çıkmaktadır^{25, 26}. Bununla birlikte, ileriki yaştaki çoğu bireyde PH görölmemektedir. Bu nedenle PH risk faktörü olan yaşlılık aynı zamanda genetik ve çevresel faktörlerle etkileşim halinde olup, bu faktörler hastalıkta görölen klinik çeşitliliği açıklamaya yardımcı olmaktadır²³.

2.1.3.2. Parkinson Hastalığı Etyolojisinde Cinsiyet

PH riski aynı yaş grubundaki kadın ve erkeklerde yapılan çalışmalarda erkeklerde kadınlara oranla iki kat fazla olduğu görölmüştür. PH'de cinsiyet farklılıklarının etyolojik kanıtı olarak östrojen hormonunun DAerjik nöron dejenerasyonu üzerinde nöroprotektif ve semptomatik olarak iyileştirici etkiye sahip olması gösterilmektedir^{27, 28}.

2.1.3.3. Parkinson Hastalığı Etyolojisinde Çevresel Faktörler

PH'de çevresel faktörler tek başına veya genetik faktörler ile kompleks etkileşim göstererek hastalığın oluşumunda ve progresyonunda etkili olmaktadır. Pestisitler, herbisitler ve ağır metallerin PH insidansını arttırdığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Tarım alanlarında 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MTPT), parakuata ve manebe gibi tarım ilaçlarına maruz kalma sonucu nigrostriatal dejenerasyon ve mitokondriyal kompleks-I inhibisyonu; demir, kurşun ve manganez gibi ağır metaller bazal ganglionlar (BG)'da birikerek oksidatif stres, DAerjik nöron ölümü ve nörotransmisyonunda bozukluklara neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir^{29, 30}. PH oluşum riskine bağlı sebeplerden biri mesleki faktörler olmakla birlikte kimyasallara maruz kalan tarım işçileri, tekstil çalışanları ve ressamlar, viral enfeksiyonlara maruz kalan tıp çalışanlarında PH görölme riski artmaktadır³¹. Aynı zamanda travmatik beyin hasarı, içilen suyun kalitesi, X kromozomuna bağlı çekinik özellik, β-blokör kullanımı, sosyoekonomik

durumlar ve influenza A virüsü gibi birçok çevresel faktör PH oluşumunda etkilidir^{30,32}. Bunula birlikte sigara (doz bağımlı), kahve ve kafein tüketiminin PH riskini azalttığını gösteren meta-analizi çalışmaları mevcuttur. Sigara içmenin yaklaşık % 40-50, kafein tüketiminin ise % 25 oranında PH gelişim riskini azalttığı bildirilmiştir. Sigara içen bireylerde nikotinin DAerjik nöronlar üzerinde protektif etkiye sahip olduğu ve DA salınımını stimüle ettiği bildirilmiştir. Aynı zamanda in vivo çalışmalar nikotinin DA transmisyonunu modüle edebileceğini ve L-Dopa kaynaklı diskinezileri azaltabildiğini göstermiştir^{33,34}. Kafein adenosin 2A reseptör antagonisti olup SN'da DAerjik nöronları eksitotoksik hasardan koruduğu, 'off' süresini azalttığı ve klinik motor bulguları iyileştirdiği bildirilmiştir³⁵. Sigara ve kafein tüketimi ile ilgili epidemiyolojik, klinik öncesi ve klinik çalışma sonuçları tutarsızlık göstermektedir. Bu sebepten ötürü sigara ve kahvenin etken maddeleri ile PH ilişkisini araştıran farmakolojik çalışmalar ihtiyaç duyulmaktadır³².

2.1.3.4. Parkinson Hastalığı Etyolojisinde Genetik Faktörler

PH'de görülen DAerjik nöron kaybının temel mekanizması bilinmemekte fakat patogenezinde birçok genin rol oynadığı ve bu genlerde görülen polimorfizmlerin PH gelişiminde ve progresyonunda önemli risk faktörü olabilecekleri tespit edilmiştir. PH'nın %10-15'lik kısmı genetik geçişli olduğu ve hastaların geri kalan büyük kısmının ise sporadik (idiyopatik) olduğu bildirilmiştir. Genetik geçişli PH'nin otozomal dominant ve otozomal resesif olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Otozomal dominant PH geç başlangıçlı olup sorumlu genler α -sinuklein (SNCA), lösinden zengin tekrar içeren kinaz 2 (LRRK2), ve VPS35'dir. LRRK2 genindeki mutasyonlar, otozomal dominant PH'de en yaygın sebebi olup tüm ailesel formların %10'unu oluşturmaktadır. Otozomal resesif PH'den sorumlu genler ise PARKİN (PRKN), PINK1(Pten-Tarafından İndüklenen Kinaz 1), ATP13A2 (PARK9) ve onkogen DJ-1 (DJ-1) genleri olup PRKN geninde görülen

mutasyonlar erken başlangıçlı otozomal resesif vakaların % 50'sinde sorumludur³³. Bunların dışında glukoserebrosidaz (GBA), Mikrotübül-İlişkili Protein Tau (MAPT) ve majör histokompatibilite kompleksi, sınıf II (HLA-DQB1) genlerinde görülen mutasyonlar PH risk faktörleri arasında gösterilmektedir³⁶.

2.1.4. Parkinson Hastalığı Tanı Kriterleri

Günümüzde PH için kabul gören tanı kriterleri Birleşik Krallık Parkinson Hastalığı Derneği Beyin Bankası Tanı Ölçütlerine göre oluşturulan tanı kriterleridir. Bu kriterler dahil etme, dışlama ve destekleyici kriterler olmak üzere üç başlık altında değerlendirilmektedir³⁷.

Parkinson Hastalığı Tanı Kriterleri:

Dahil Etme Kriterleri

○ Bradikinezi (tekrarlayan el, ayak hareketlerinin başlatılmasında güçlük, yavaşlama, hareketin amplitüdünde azalma) ile birlikte aşağıdaki özelliklerden biri veya daha fazlası bulunmalıdır.

Kas rijiditesi

4-7 Hz istirahat tremoru

Postural instabilite. (primer görsel, vestibüler, serebellar veya derin duyu ile ilgili işlev bozukluğundan kaynaklanmayan)

Dışlama Kriterleri

- Tekrarlanan inme öyküsü ve parkinsoniyen bulguların basamaklı seyri
- Tekrarlanan kafa travması öyküsü
- Kesin ensefalit öyküsü
- Semptomların başlangıcında nöroleptik tedavi öyküsü
- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)'ye maruz kalma
- Yüksek dozda L-Dopa'ya olumsuz yanıt (malabsorpsiyon dışlanmalı)

- Birden fazla akrabasının etkilenmesi
- Sürekli remisyon
- 3 yıl sonrada belirtilerin tek taraflı seyretmesi
- Erken evrede otonomik tutulum
- Erken evrede ağır demansiyal bulgular
- Okürolojik krizler
- Supranükleer bakış palsi
- Babinski bulgusu
- Serebellar bulgular
- CT veya MRI'da serebral tümör veya kommunikan hidrosefali bulgusu

Destekleyici Kriterler

PH tanısı için aşağıdaki özelliklerden üç veya daha fazlası gereklidir;

- Tek taraflı başlangıç
- İstirahat tremoru
- Progresif bozukluk
- En çok başlangıç tarafını etkileyen kalıcı asimetri
- L-Dopa'ya çok iyi yanıt (% 70-100)
- L-Dopa'ya bağlı ağır diskineziler
- 5 yıl veya daha uzun süren L-Dopa yanıtı
- 10 yıl veya daha uzun süren klinik seyir

2.1.5. Parkinson Hastalığı Sınıflandırılması

PH; primer (idiopatik) parkinsonizm, sekonder (semptomatik,edinsel) parkinsonizm, parkinson-plus sendromlar ve herediter dejeneratif parkinsonizm olmak üzere dört ana başlıkta incelenmektedir. Bu dört ana başlık altında yer alan diğer alt sınıflandırmalar Tablo 2-1'de gösterilmiştir³⁸.

Tablo 2.1. Parkinson Hastalığı Sınıflandırması

Primer (İdiopatik) Parkinsonizm	<ul style="list-style-type: none">○ Parkinson Hastalığı○ Juvenil parkinsonizm
Sekonder (Semptomatik, edinsel) Parkinsonizm	<ul style="list-style-type: none">○ İnfeksiyöz: Postensefalitik, yavaş virüs enfeksiyonu, AIDS○ İlaçlar: Dopamin reseptör blokerleri (Antipsikotikler, antiemetikler),○ Rezerpin, tetraabenazin, alfa metil dopa, lityum, flunarizin○ Toksinler: MPTP, Co, Mn, Hg, metanol, etanol○ Vasküler: Multienfarkt demans, Binswanger Hastalığı○ Travma: Boksör ensefalopatisi○ Hipoksi○ Metabolik: Paratiroid hastalıkları, hipotiroidi, hepatoserebral dejenerasyon○ Hemiparkinsonizm-hemiatrofi○ Diğer: Beyin tümörleri, normal basınçlı hidrosefali, siringomezensefali
Parkinson-Plus Sendromlar	<ul style="list-style-type: none">○ Progresif supranükleer paralizi (PSP)○ Multisistem Atrofiler (MSA) Shy-Drager sendromu (SDS/MSA-A) Striatonigral dejenerasyon (SND/MSA-P) Sporadik olivopontoserebellar atrofi (OPCA/MSA-C)○ Guam'ın parkinsonizm-demans-ALS kompleksi (PDACG)○ Kortikobazal-gangliyonik dejenerasyon (KBGD)○ Progresif pallidal atrofi – pallidonigral dejenerasyon
Hereditör Dejeneratif Parkinsonizm	<ul style="list-style-type: none">○ Huntington Hastalığı○ Wilson Hastalığı○ Haller Vorden- Spatz Hastalığı○ Familial Olivopontoserebellar atrofi○ Familial bazal gangliyon kalsifikasyonu (Fahr Hastalığı)○ Seroid-lipofuksinoz○ Gerstmann-Straussler-Scheinker Hastalığı○ Machodo-Joseph Hastalığı○ Periferik nöropatili ailesel parkinsonizm○ Nöroakantositozis -Lubag (Filipino X'e bağlı distoni ve parkinsonizm tablosu)○ Striatal nekrozlu mitokondrial sitopatiler

2.1.6. Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları

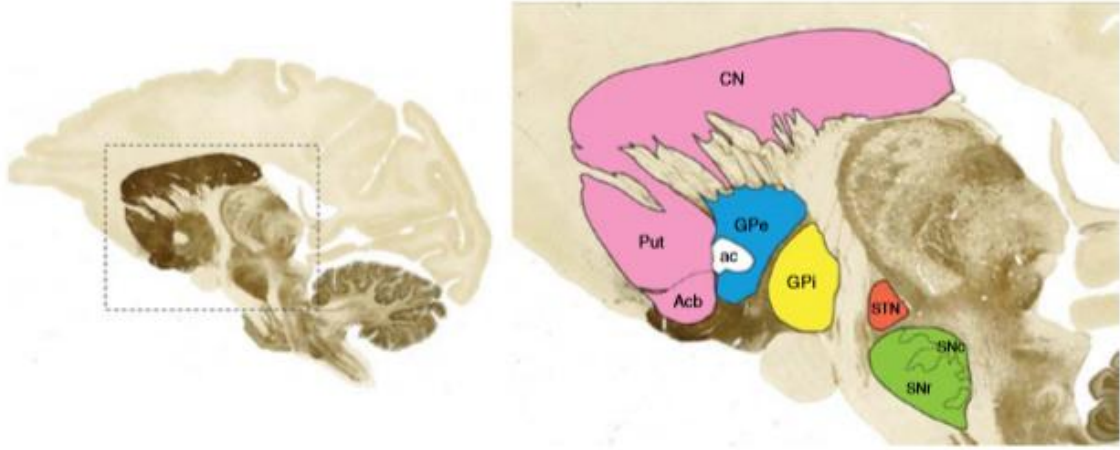
2.1.6.1. Bazal Gangliyonlar

Bazal gangliyonlar (BG) öğrenilmiş hareket paternlerinin yürütülmesini ve sürdürülmesini sağlamak ve bunun yanı sıra dikkat, öğrenme, planlama, ödül davranışı, yanıt seçimi ve inhibisyonu gibi bilişsel işlevlerde de rolleri olan bir grup çekirdektir. BG işlevlerini yerine getirebilmek için afferent uyarılarını bir kısmını frontal korteksten (motor korteks, premotor alan, suplamenter motor alan, singulat korteks, dorsolateral ve

orbitolateral frontal korteks) bir kısmı da parietal korteksten alır ve efferent uyarılarını talamus aracılığı ile serebral korteksin ilgili bölgelerine gönderirler³⁹. BG'nin temel afferent çekirdeği olan striatuma serebral korteksten gelen bilgi direkt ve indirekt yolları kullanarak BG'nin çıkış kapısı olan Globus Pallidus internal segmenti (GPi) ve substansiya nigra pars reticularis (SNr)'e aktarılır. Direkt ve indirekt yolun serebral korteks motor alanlarındaki etkileri zıt olmakla birlikte nöropeptidleri ve reseptörleri de birbirinden farklıdır. Direkt yol gama-aminobütirik asit (GABA), substans P, dinorfin ve D1 reseptörleri ile ilişkili iken; indirekt yol, GABA, enkefalin ve D2 reseptörleri ile ilişkili olmaktadır^{40, 41}.

2.1.6.2. Bazal Gangliyon İşlevsel Anatomi

BG, anatomik olarak beyin hemisferlerinin derinlerinde, talamusun lateralinde ve beyaz cevherde (substantia alba) yer alan iki ana subkortikal yapı olan striatum (nucleus caudatus, putamen) ve globus pallidustan (GP) oluşmaktadır. Aynı zamanda diensefelonda yer alan subtalamik nukleus (STN) ve mezensefelonda yer alan substantia nigra (SN) bu sistemle ilişkilidir. GP, globus pallidus internus (GPi) ve globus pallidus externus (GPe) olmak üzere iki lateral segmentten oluşmaktadır. SN ise substantia nigra pars compacta (SNc) ve substantia nigra pars reticularis (SNr) olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır^{40, 42, 43}. SNc bölgesinde bulunan nöronlar DA sentez yan ürünü olan nöromelanini içerirler ve bu pigmentler SNc bölgesinde koyu renkli bir görünüm kazandırır. Kaudat nukleus ve putamene korpus striatumu, putamen ve GP lentiküler nukleusu oluşturmaktadır. BG'ye gelen ana girdiler yani afferent sinyaller striatumdan giriş yaparken, GPi ise BG'nin ana çıkış kapısını oluşturmaktadır(Şekil 2.1.)^{40, 42}.



Şekil 2.1. Bazal gangliyon ve çekirdeklerinin lokalizasyonu (CN: Kaudat nükleus, Put: Putamen, GPe: Globus pallidus eksterna, GPi: Globus pallidus interna, STN: Subtalamik nükleus, SNc: Substantia nigra pars kompakta, SNr: Substantia nigra pars retikülata)⁴⁰.

2.1.6.3. Bazal Gangliyon Devreleri

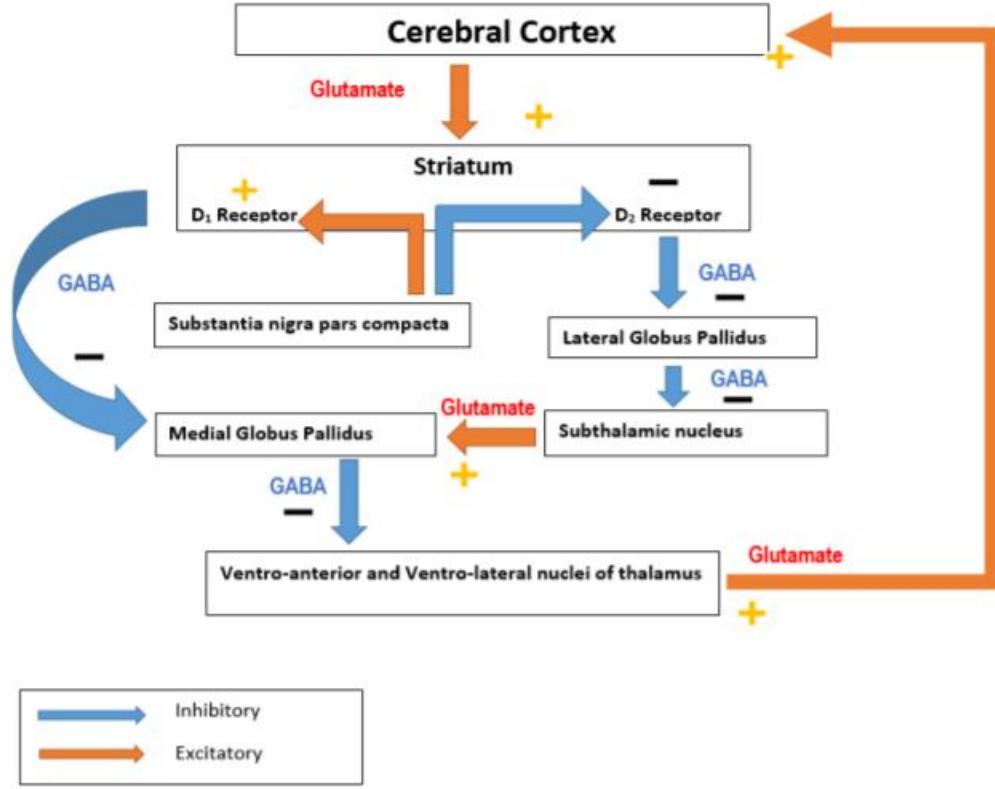
BG'ler tek başına çalışmayan serebral korteks, talamus ve beyin sapı ile sürekli yakın ilişkide olan ve bu bölgelerin işlevlerini koordine eden yardımcı motor sistemdir. BG'lerin kendi aralarında ve bahsedilen bu bölgeler ile arasında çok sayıda anatomik bağlantı bulunmaktadır. BG'ler bu kompleks etkinliği düzenlemede serebral korteksin farklı bölgelerinden afferent uyarılar alır ve fonksiyonun uygun şekilde yapılmasını sağlayacak efferent uyarıları ise talamus aracılığı ile serebral kortekse geri gönderir⁴⁴. Aynı zamanda bahsedilen işlevlerin koordineli bir şekilde gerçekleşebilmesi için ilgili yollara ait bazı özgül nörotransmitterler görev almaktadır. 'Motor devre' bu yollardan en iyi tanımlanmış olanıdır⁴⁵.

BG'lerin afferent uyarılarının çoğunluğunu frontal korteksten (motor korteks, premotor alan, suplamenter motor alan, singulat korteks, dorso-lateral ve orbitolateral frontal korteks) daha az yoğunlukta uyarıyı ise parietal korteksten almaktadır. Afferent uyarılar primer olarak striatumdan BG'lere giriş yaparlar. Serebral korteksten ve SNc'den gelen afferent yollar striatumda sonlanır⁴⁶. Striatum yapısal olarak % 90 orta büyüklükte dikensi (MSN; medium spiny neurons) ve % 10'u ise internöronlar olmak üzere iki farklı

tipte nöron içerir. Tüm MSN'ler nörotransmitter olarak GABA'yı kullanan inhibitör nöronlardır. MSN'ler GPe, GPi ve SNr' ye projeksiyon göndermektedir. Striatumdan GPi ve SNr'ye uzanan MSN'ler direkt, GPe'ye uzanan MSN'ler ise indirekt yolun başlangıcını oluşturmaktadır⁴⁰.

Direkt yol; Striatumda MSN'ler üzerinde toplanan ve entegre edilen sinyallerin, GPi ve SNr'ye, bu bölgelerden talamusun ventral anterior (VA) ve ventral lateral (VL) segmentine, daha sonra ise VA ve VL segmentlerinden çıkan aksonların serebral korteksin prefrontal, premotor ve suplementar motor alanlarına giden döngülerinden oluşur. Direkt yolu başlatan MSN'lerde GABA'nın yanısıra kotransmitter olarak P maddesi (substans P) ve dinorfin bulunmaktadır. BG'lerin efferent uyarılarının çoğunluğu GPi ve SNr üzerinden talamusa giderken, küçük bir kısmı ise beyin sapındaki pedinkülopontin nükleusa gider⁴⁰⁻⁴².

İndirekt yol; Striatumda MSN'ler üzerinde toplanan ve entegre edilen sinyallerin, GPe'ye, buradan STN'ye daha sonra GPi, buradan da talamusun ventral anterior (VA) ve ventral lateral (VL) segmentlerine ve bu segmentlerden çıkan aksonların serebral korteksin prefrontal, premotor ve suplementar motor alanlarına giden döngülerinden oluşur. İndirekt yolda GPe, GABAerjik transmisyon ile STN üzerinde inhibitörük etki gösterirken STN ise glutamaterjik transmisyon ile GPi ve SNr'yi eksitatörük etki göstermektedir. Bazal gangliyonların ana çıktılarını oluşturan GPi ve SNr'de GABAerjik transmisyon ile talamusa inhibitör uzantılar göndermektedir (Şekil 2.2)^{40, 41, 47}.



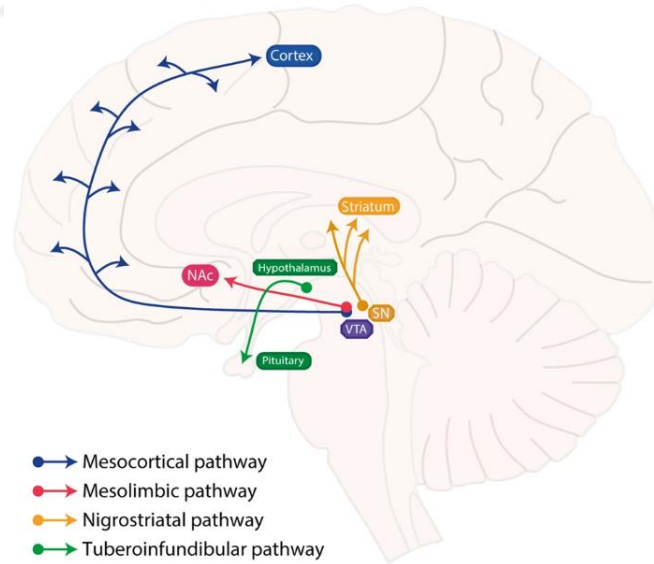
Şekil 2.2. Bazal gangliyonlarda direkt ve indirekt yolların mekanizması⁴⁸

SNc bölgesinden striatuma uzanan nigrostriatal yol BG'lerin kendi aralarında oluşturduğu bağlantılardan biri olup nörotransmitteri DA'dir. Nigrostriatal yolda sentezlenen DA GPi'de yoğun olarak bulunan D1 reseptörü ile direkt yol üzerinde uyarıcı, GPe'de yoğun olarak bulunan D2 reseptörü ile indirekt yolda inhibe edici etkiye sahiptir⁴². Direkt yolda D1 reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak GPi' da inhibisyonu artar, talamus ve pedinkülopontin nükleusda görülen inhibitör etki azalır ve böylece korteks uyarılır ve hareket kolaylaşır. İndirekt yolda ise D2 reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak GPi' da inhibisyon azalır, STN'de görülen inhibisyon artar ve GPi'de daha az aktivasyon görülür⁴⁹. GPi aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak talamusun aktivitesinde görülen artış hareketi kolaylaştırır. Birbirine ters çalışan direkt ve indirekt yol GPi üzerinde sinerjistik etkiye sahiptir ve birbirini tamamlayan bu iki yolağın DAerjik salınımının üzerindeki dinamik dengesi motor hareketin ince ayarını düzenlemektedir. DA

depleasyonu, direkt ve indirekt yolların birbirleriyle fonksiyonel ve yapısal olarak bağlantılarında değişim PH patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır^{40, 50}.

2.1.7. Dopamin ve Dopamin Reseptörleri

3, 4-Dihydroxytyramine olarak da bilinen DA nigral nöronlarda sentezlenen endojen bir nörotransmitterdir. DAerjik nöronlar diensefalon, mezensefalon ve olfaktor bulbusta lokalize olan anatomik ve fonksiyonel bakımdan heterojenik bir hücre grubudur⁵¹. Beyinde bulunan DAerjik hücrelerin yaklaşık olarak %90'ı mezensefalonun ventralinde bulunmaktadır. Mezensefalik DAerjik sistem nigrostratal, mezolimbik, mezokortikal ve tuberoinfundibular gibi nominal sistemlere ayrılmıştır ve bu sistemler içerisinde en iyi bilinen SNc kaynaklanan ve kaudat-putamene (dorsal striatum olarak da bilinir) kadar uzanan nigrostriatal sistemdir. Nigrostriatal yoldan salınan DA, D1 veya D2 reseptörlerini eksprese eden MSN'de kortikostriatal iletimi modüle eder ve böylece bilinçli motor hareketleri düzenlemede önemli rol oynar (Şekil.2.3.)^{52, 53}.



Şekil 2.3. Dopaminerjik projeksiyon yolları⁵³

Tirozin hidroksilaz (TH) enzimi tetrahidrobiopterin, O₂ ve Fe²⁺ kofaktör olarak kullanarak tirozin amino asidini L-Dopa'ya katalizler. L-Dopa, piridoksal fosfata sahip aromatik dekarboksilaz (Dopa dekarboksilaz) enzimi ile dekarboksillenir ve DA üretilir.

DAerjik nöronlarda sentezi takiben, DA veziküler monoamin taşıyıcı 2 (VMAT2) ile sinaptik veziküllerin asidik lümeninde sekestre edilir⁵³⁻⁵⁵.

DA, motor ve motivasyon, kognisyon, emosyonel ve nöroendokrin gibi non-motor fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için DA reseptörlerine etki eder. DA reseptörleri yedi transmembran parçalı yapıda olan G protein kenetli reseptörlerdir (GPCRs). D1, D2, D3, D4 ve D5 olmak üzere beş alt tipi olan DA reseptörleri iki gruba ayrılmaktadır. D1 benzeri D1 ve D5 reseptörlerini içermekte ve etkisini adenilat siklazı (AC) aktivasyonu ile ikincil bir haberci olan siklik adenzin monofosfat (cAMP) üretimine yol açarak göstermektedir. D2 benzeri reseptörler ise D2, D3 ve D4 olmakla birlikte etkilerini AC inhibisyonu ile cAMP üretimini baskılayarak gösterirler. D1 ve D2 benzeri reseptörler transmembran domainlerinde yüksek seviyede homoloji göstermelerine rağmen farklı farmakolojik etkilere sahiptirler. D1 benzeri reseptörler eksitator etki gösterirken D2 benzeri reseptörler inhibitör etkiye sahiptirler. Merkezi sinir sisteminde DA reseptör alt tiplerinin yoğunluğu $D1 > D2 > D3 > D5 > D4$ olarak bildirilmiştir⁵⁶.

2.1.7.1. D1 Benzeri Reseptörler

D1 ve D5 reseptörlerini içeren D1 benzeri reseptör ailesi striatum, kaudo-putamen, nükleus akkumbens, SNr ve olfaktor bulbusda yoğun olarak eksprese edilmektedir. D1 reseptörleri ödül sistemi, lokomotor aktivite, öğrenme ve hafıza sisteminde önemli rol oynamaktadır. D1 ve D5 reseptörleri, AC tarafından cAMP üretimini uyarmak için G proteinlerinin Gs /olf ailesini aktive ederler ve striatumda GABA-erjik MSN'lerde postsinaptik olarak bulunurlar. Aynı zamanda bu reseptörler fosfolipaz C'yi aktive eden ve hücre içi kalsiyum salınımını indükleyen sinyal iletim yollarında da rol oynarlar. Kalsiyum protein kinaz C (PKC) gibi proteinlerin aktivasyonunun yanısıra ekzositoz ile nörotransmitter salınımının modülasyonunu da düzenler. D1 reseptörleri primer olarak 'doğrudan' striato-talamo-kortikal yolakta nörotransmisyonundan sorumludur^{56, 57}.

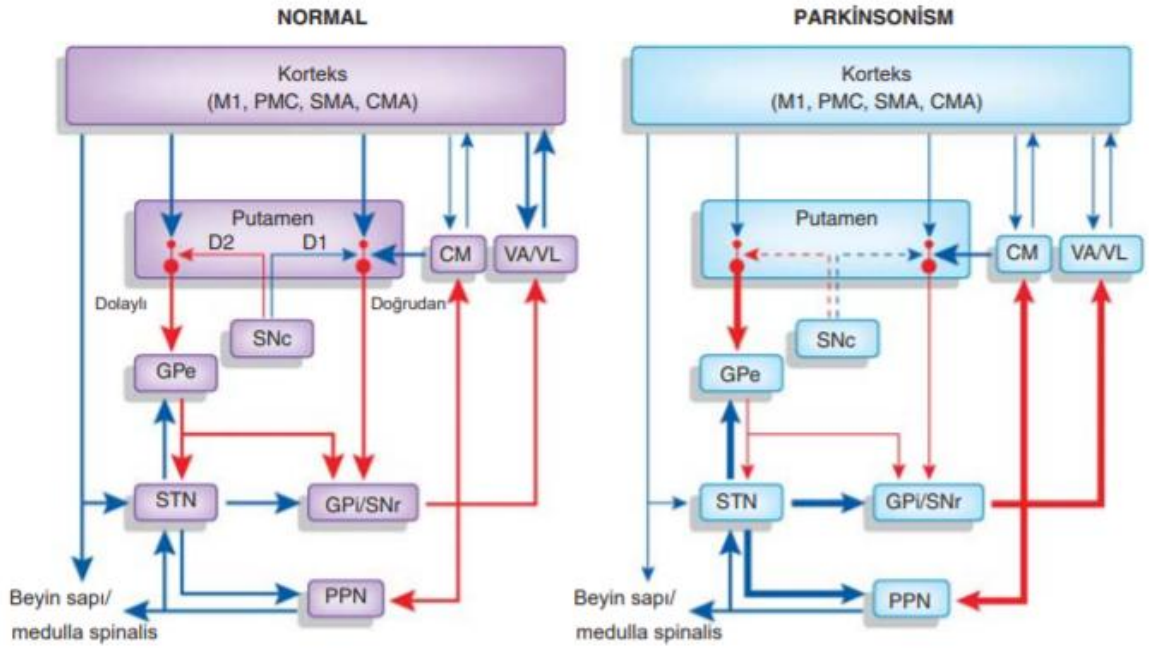
2.1.7.2. D2 Benzeri Reseptörler

D2, D3 ve D4 reseptörleri içeren D2 benzeri DA reseptör ailesi alt tiplerinin D2 kısa ve D2 uzun tip reseptörler olmak üzere 2 izoformu bulunmaktadır. D2 reseptör ailesi beyinde özellikle kaudat, putamen, ventral tegmental alan ve SN'de yoğun olarak eksprese edilirken septal bölge, amigdala, hipokampus, talamus, serebellum ve serebral kortekste daha düşük konsantrasyonlarda eksprese edilmektedir. D2 reseptörleri D1 benzeri reseptörlerinin aksine hem postsinaptik hem de otoreseptör etkilere sahiptir. D2 reseptörler postsinaptik reseptör aracılı davranışsal ve ekstrapiramidal aktivitede önemli bir rol oynar. Otoreseptör olarak D2 reseptörleri, nöronal eksitabilitede azalış, DA sentez ve depolanmasında azalışa yol açarak salınımını inhibe ederek lokomotor aktiviteyi azaltırken postsinaptik D2 reseptörlerinin aktivasyonu lokomasyonu stimüle etmektedir. Bu reseptör ailesinin aktivasyonu tipik olarak G proteinlerinin Gai/Gao ailelerini aktive ederek AC inhibisyonu yoluyla cAMP üretimini azaltarak PKA aktivasyonunun azalmasına yol açar. Striatal D2 reseptörleri 'dolaylı' striato-talamo-kortikal yolda bulunmaktadır. D2 reseptörlerinin yapısal olarak D1 reseptörlerden farkı altıncı ve yedinci transmembran zincir arasındaki hücre içi ilmek (loop)'in daha büyük olmasıdır ve D2 benzeri reseptörler D1 benzeri reseptörlere göre daha küçük C-terminal hücre içi segmentlere sahiptirler^{53, 58, 59}.

2.1.8. Dopamin ve Dopamin Reseptörlerinin Parkinson Hastalığı ile İlişkisi

Beyindeki toplam nöron sayısının % 1'inden daha azını oluşturan DAerjik nöronlar, motor davranış, motivasyon ve hafıza gibi fonksiyonlarda rolü olan spesifik beyin bölgelerini innerve eder. DA seviyesinin kontrolü fiziksel ve zihinsel fonsiyonların normal işleyişinin kontrolünde oldukça büyük öneme sahiptir. SNc bölgesindeki DAerjik nöronların harabiyeti ile karakterize olan PH'de ölen hasta bireylerin etkilenmeyen bireylere kıyasla beynin SNc bölgesindeki DAerjik nöronların yaklaşık % 50-70

harabiyeti görülmektedir⁶⁰. SNc bölgesinde görülen DAerjik nöron harabiyeti/dejenerasyonu PH motor semptomlarının ortaya çıkmasından sorumlu olan BG ağında hücresel ve sinaptik işlev bozukluklarına neden olur. BG'lerin ana giriş kapısı ve kortikal girdilerin ana alıcısı olan striatumda bulunan nöronlarının aktivitesi için DA sisteminin aktif olması gerekmektedir. PH'de görülen DA ve DA reseptör aktivitesindeki düşüş striatum nöron aktivasyonunda azalışa bağlı olarak hareketi başlatmak ve gerçekleştirmek zorlaşır (hipokinezi). DA düzeyinde artış BG'lerde hareketin artışı ve aynı zamanda istenmeyen hareketlerin oluşmasına yol açar (hiperkinezi). DAerjik nöronlar striatumun fonksiyonu için oldukça önemli rol oynamakta ve kortikal girdilere karşı striatal devrenin oluşturacağı tepkiyi ayarlamaktadır⁶¹. Direk ve indirek striatal projeksiyon yollarındaki herhangi bir disfonksiyon hareket bozukluklarına yol açtığı görülmektedir. DA, direkt ve indirek striatal projeksiyon nöronlarında sırasıyla fonksiyon gören D1 ve D2 reseptörleri üzerinde zıt etkilere sahiptir. PH'de SNc'de hücre kaybına bağlı olarak striatal DA eksikliği direk ve indirek yolların fonksiyonlarında sırasıyla azalış ve artışa yol açarak bradikinezi ve hareketlerde yavaşlamaya neden olmaktadır. GPi/SNr'den çıktıkların artışı STN'nin aşırı aktivitesine neden olarak talamokortikal projeksiyonun inhibisyonunda artış ve hareketi başlatma ile ilişkili kortikal nöronal aktivasyonunda azalışa yol açar^{62, 63}. Striatum nöronlarının uyarılabilirliğinde meydana gelen bu değişiklikler sonucu D1 reseptörlerin uyarılmasında görülen azalışa bağlı olarak direk yolağın aktivitesinin azalma olurken; D2 reseptörlerin inhibisyonundaki azalışa bağlı olarak striatopallidal (GPe) projeksiyonlarda aktivitenin artması görülmektedir. Sonuç olarak; PH'de BG'lerin dışarıdan gelen girdiyi modüle ediş ve yanıt veriş bozulmuştur (Şekil 2.4)^{5, 63}.



Şekil 2.4. Normal ve Parkinson durumunda direkt ve indirekt yollarının şematik diyagramı⁵.

2.1.9. Parkinson Hastalığı Klinik Özellikleri

PH, BG'ler ve onların bağlantılı olduğu motor yapıları etkileyen bir ekstrapiramidal sistem hastalığı olup hastalığın klinik özelliklerine yol açan DAerjik nöron dejenerasyonu sonucu motor fonksiyonlarda azalma ile karakterizedir⁶⁴. Tek yanlı, genelde üst ekstremitelerde başlangıçlı olup TRAP kısaltması altında gruplanabilen 'tremor, rijidite, akinezi (veya bradikinezi) ve postüral instabilite' dört kardinal bulguya sahiptir⁶⁵. PH'de motor semptomların heterojenik özelliğe sahip olması hastalığın alt tiplerinin sınıflandırılmasını sağlamıştır. Aynı zamanda PH'i olfaktör disfonksiyon, bilişsel bozukluk, psikiyatrik semptomlar, uyku bozuklukları ve otonomik disfonksiyon gibi non-motor semptomlarla ilişkilidir. PH'nin motor öncesi veya prodromal fazı olarak adlandırılan bu dönem klasik motor semptomların başlamasında 12-14 yıl kadar erken başlayabilen, nörodejenerasyona bağlı hastalığın tanısının henüz kesinleşmediği evredir⁵.

2.1.9.1. Tremor

PH karakteristik bulgusu olan istirahat tremoru hastaların yaklaşık olarak üçte ikisinde görülen, tipik olarak hafif ve aralıklı olarak başlayan ve genellikle 4 ila 6 Hz frekans düzeyinde ölçülen, supinasyon-pronasyon ya da "hap yuvarlaması" şeklinde tabir edilen el titremesidir. Genellikle üst ekstremitelerde distalden unilaterale olarak başlar ve hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ekstremitelerin proksimaline yayılım gösterir. PH tremoru en sık ellerde görülmekle birlikte tremor alt ekstremitelerde, ayak parmakları, dil, çene ya da dudakları da etkileyebilir. Tremor gün içerisinde emosyonel stres, mental aktivite ve diğer ekstremitenin motor hareketi sırasında artar, REM uykusuna dalındığında kaybolur. İstirahat tremoru PH'de görülen en sık tremor olmasına rağmen postural ve kinetik tipte aksiyon tremorları da gözlemlenebilir^{5, 66}.

2.1.9.2. Bradikinezi

BG disfonksiyonunun en karakteristik semptomu olan bradikinezi, PH hastalarında en sık görülen klinik özellik olup istemli hareketin yavaşlığını tanımlamaktadır. Hareketin planlanması, başlatılması ve yürütülmesi ile sıralı ve eş zamanlı hareketlerin gerçekleştirilmesi ile ilgili zorluklar yaşanır. PH'de istemli motor hareketlerin yavaşlamasının yanı sıra mimik hareketlerinin kaybolması, göz kırpması, yürüme sırasında otomatik kol hareketlerinde ve yutkunma gibi otomatik hareketlerde de bir azalma görülmektedir^{65, 67}. PH'de hareketlerdeki yavaşlama sonucu, yüz ifadesinin kaybolması (hipomimi), el yazısı genliklerinin daha küçük olması (mikrografi) ve başı kaldırmadan yukarı bakamama gibi disfonksiyonlar dikkat çekmektedir⁶⁷.

2.1.9.3. Rijidite

Rijidite; genellikle agonist ve antagonist kaslarda eş zamanlı görülen, eklem pasif hareketi (eklem çevresinde fleksiyon, ekstansiyon veya rotasyon) boyunca ortaya çıkan ve 'dişli çark fenomeni'nin eşlik ettiği artan direnç ile karakterizedir. Dişli çark

fenomeni, tremorun rijiditeye eş zamanlı olarak eşlik etmesi sonucu rijiditenin kesikli olarak hissedilmesini tanımlamaktadır. Rijiditenin belirgin olmadığı durumlarda froment manevrası (kontralateral ekstremitelerle yapılan istemli hareketler) ile rijidite kuvvetlendirilir⁶⁸.

2.1.9.4. Postüral İnstabilite

PH'nin tipik olarak en az spesifik bulgusu olan postural instabilite aynı zamanda en fazla özürüllüğe neden olan ve tedaviye en az yanıt veren bulgusudur. Postural instabilite, hem otomatik postural reaksiyon (görsel, vestibüler ve somatosensoriyal girdilere yanıt olarak) hem de beklenen postüral ayarlamaların kaybedilmesi sonucu oluşmaktadır⁶⁸. Postüral instabilitenin derecesi hastanın arkasından omuzlarına uygulanan ani bir çekmeye verdiği postüral yanıtın değerlendirildiği 'çekme (pull) testi' kullanılarak belirlenebilir. Bu bulgunun görüldüğü olgularda gövdede fleksiyon postürü varlığında hastalar 'festinasyon' adı verilen artan hızda ve sanki ağırlık merkezini yakalamaya çalışıyor, durmakta güçlük çeker gibi yürüyüş şekli ortaya çıkar⁶⁹.

2.1.10. Motor Olmayan Semptomlar

SN'de DAerjik nöron dejenerasyonuna bağlı olarak meydana gelen motor semptomlar PH tanısı konulmasında esas faktörler olmasına rağmen PH klasik motor bulguların yanısıra çeşitli motor olmayan semptom ve bulgularla da ilişkilidir. PH'de DAerjik nigrostriatal dejenerasyonunun yanı sıra perifer ve merkezi sinir sistemindeki seratonerjik, glutamaterjik, adrenerjik ve kolinerjik nörotransmitter sistemlerde görülen anormallikler PH'de motor olmayan semptomların görülmesine neden olmakta ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir^{70, 71}. Motor olmayan belirtiler hastalığın tanısından yıllar önce başlamakta olup hastalığın seyri sırasında da ortaya çıkabilen ve hastalığın her evresinde de görülebilen depresyon, anksiyete, cinsel işlev bozukluğu, kognitif disfonksiyon, apati, psikoz, uyku bozuklukları, otonomik ve duysal

bozukluklar gibi çeşitli belirtileri içermektedir. α -sinüklein patolojisi ile birlikte Lewy cisimcikleri (LC)'nin oluşması ile korele olduğu düşünülen bu patolojik süreç beyin sapından başlamakta anterior olfaktör çekirdekler, hipotalamus ve talamusun limbik sistemle ilişkili bölümleri, limbik sistem ve neokortikal tutulum izlemekte ve bu patolojik gidiş Braak evrelemesi ile derecelendirilmektedir⁷¹⁻⁷³.

2.1.11. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi

PH nöropatolojik belirleyicisi beynin SNc bölgesinde DAerjik nöronların dejenerasyonu ve/veya kaybı ile görülen striatal DA eksikliği, LC olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyonların varlığıdır. LC'ler intranöronal fibril olan α -sinüklein mevcudiyeti ile karakterizedir⁷⁴. 140 amino asitten oluşan, SNCA geni tarafından kodlanan α -sinüklein proteini beyinde özellikle neokorteks, hipokampus, SN, talamus ve beyincikte yüksek miktarda eksprese olmaktadır. α -sinüklein proteinin fizyolojik rolü net olmamakla birlikte muhtemel olarak sinaptik vezikül dinamikleri, mitokondriyal fonksiyon, intraselüler transportta rol oynadığı ve aynı zamanda potansiyel bir şaperon olabileceği düşünülmektedir^{22, 75}. SNCA geninde görülen nokta mutasyon ve triplikasyon, çevresel ve genetik faktörlerin etkisi ile çözünebilir yapıda olan α -sinüklein proteinin doğal yapısını kaybedip çözünemeyen α -sinüklein fibrillerini oluşturması ve α -sinüklein proteininde görülen yanlış katlanmalar PH patolojisinde önemli rol oynamaktadır⁷⁵. PH patolojik bulgularında α -sinüklein agregatlarının ilk olarak beyin sapında monoaminerjik ve kolinerjik nöronlarda birikmeye başladığı daha sonra mezensefalon ve bazal ön beyine infiltre olduğu ve hastalığın ilerleyen evrelerinde ise limbik ve neokortikal beyin bölgelerine yayıldığı görülmektedir^{75, 76}. Braak ve ark. PH'nin patolojik evrelendirme sisteminde periferik sinir sisteminden başlayarak MSS'yi aşamalı olarak etkileyen altı evre önermişlerdir. Bu evreler; α -sinüklein agregatlarının medulla oblongata/pontin tegmentum ve olfaktor bulbus/ön olfaktor nukleusta sınırlı

olarak görüldüğü ve premotor semptomların başlangıcı ile uyumlu olan Evre 1-2; SN, mezokorteks ve talamus bölgelerinde görülen ciddi patolojik değişikliğe bağlı olarak motor semptomların görülmesi ve PH'nin klinik fazının ortaya çıktığı Evre 3-4, neokorteksin etkilendiği, hastalığın ileri dereceye ulaştığı ve tüm klinik boyutlarını gösterdiği Evre 5-6'dır^{33, 73, 77}. Braak tarafından önerilen evreleme sistemi postmortem PH vakalarının bir kısmı için geçerli görünmesine rağmen bu paternde önerilen evreleme sisteminin çoğu vakada uyum göstermediği için günümüzde kullanılabilirliği tartışmalıdır^{33, 78}.

PH'de nigrostriatal yolakta oluşan nöronal hasarın klinik patoloji ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte PH patolojisinde Meynert çekirdeğinin bazal kısmı, locus coeruleus, pedüncülopontin çekirdeği, rafe çekirdeği, vagus dorsal motor çekirdeği ve amigdala gibi beynin farklı bölgelerinde nörodejenerasyon görülmektedir^{38, 79}. Snc'de bulunan nigrostriatal nöronlar yoğun miktarda nöromelanin içerirler. Snc'deki melanin içeren DAerjik hücrelerin depigmentasyonu PH'nin nöropatolojik bir bulgusu olup Snc'deki hücre kaybı ile DA transporter mRNA ekspresyon seviyesi ile korele olduğu tespit edilmiştir⁷⁹. PH'de ilk motor semptomların görülmesi için nigrostriatal yolakta DAerjik nöronların % 40 ila % 50 oranında dejenerasyonunu takiben striatumda DA konsantrasyonunun %60-%80 konsantrasyonunda azalmış olması gerektiği saptanmıştır^{19, 80}. Son yıllarda yapılan klinik ve patolojik çalışmalar PH'de motor semptomların başlangıcına kadar Snc bölgesinden striatuma uzanan nöron akson terminallerinde dejenerasyon oluştuğu saptanmıştır. Genellikle PH semptomlar ortaya çıkmadan çok önce başlamasına rağmen 60 yaş ve sonrasında klinik belirtiler görülmektedir⁷⁶.

Nigrostriatal yolakta DAerjik nöron harabiyeti aynı zamanda PH'de görülen non-motor semptomlara da neden olmaktadır. Bununla birlikte PH'de mezensefalonun ventral

tegmental alanında (VTA) hafif-orta düzeyde DAerjik nöron dejenerasyonu görülmektedir. VTA'dan kaynaklanan nöronların aksonları ventral striatum (nukleus accumbens), limbik (hipokampus ve amigdala), orbitofrontal korteks ve anterior singulat korteks alanlarına projekte olur. PH'de mezokortikal limbik sistemde görülen DA nörotransmisyonunda görülen dejenerasyon PH hastalarında görülen kognisyon, davranış ve zihinsel işlevlerde yavaşlama gibi non- motor semptomların görülmesine neden olmaktadır⁶⁹.

Farklı klinik fenotiplere ve genetik etyolojiye sahip heterojen bir hastalık olan PH'nin patolojisinde görülen hücre kaybına yol açan olayların mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Çevresel ve genetik faktörlerin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, protein agregat oluşumu, ubiquitin-proteazom sistemlerinin otofaji-lizozomal sistemlerindeki anormallikler, eksitotoksisite ve nöroinflamasyonun biyokimyasal ve hücresele anormalliklerin temelinde rol oynadığı düşünölmektedir⁹.

İnflamasyon ve oksidatif stresin PH mekanizmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. İnflamasyonun oluşması hücre ve doku harabiyetine bağılı olarak oluşan zararlı ajanları uzaklaştırmak için koruyucu bir cevap olmasına rağmen, inflamasyonun kontrol edilmemesi sonucu normal hücre ve dokularda da dejenerasyona yol açarak kronik inflamasyona neden olur. PH patogeneğinde gerek hasarlı nöronların sürekli varlığı gerek yaşa bağılı olarak gelişen nörodejenerasyonun mikroglia ve astrosit gibi hücrelerin aktivasyonuna yol açarak nöroinflamatuvar süreci tetiklediğı görölmektedir⁸. Ayrıca PH patogeneğinde önemli rol oynayan α -sinöklein birikimide aşırı mikroglial aktivasyona yol açar. Aktifleşen mikroglia ve astrositlerden NF-kB'nın regölasyonu sonucu TNF- α , IL-1 β , iNOS ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi proinflamatuvar sitokinler, ve aynı zamanda ROS ve reaktif nitrojen (RNS) türleri olmak üzere serbest radikaller salınmaktadır^{10, 81}. Oluşan proinflamatuvar sitokinler, ROS ve RNS DAerjik

nöron harabiyetine ve nörodejenerasyonun kronik progresyonuna yol açar. Aynı zamanda inflamasyon ile görülen yüksek demir içeriği, Ca⁺² kanal ekspresyonunda bozulmalar ve antioksidan savunma sisteminde azalmaya bağlı olarak da nigral DAerjik nöronların hassasiyetini artırmaktadır. SN'de görülen DA metabolizması sonucu oluşan metaboliterde ROS artışına yol açmaktadır. PH'de SN bölgesinde detoksifiye edilemeyen ROS'lar, hidrojen peroksit, süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri oluşturur. Serbest radikaller, membran lipitleri ile etkileşerek, SN'de arttığı tespit edilen lipit peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca PH vakalarında görülen oksidatif strese bölgesel olarak biriken melaninin nöronlarda bulunan serbest haldeki metallere bağlanarak DAerjik hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir^{8, 82}. PH'de oksidatif strese bağlı olarak iNOS ve nNOS sentezinde upregülasyon sonucu NO üretiminde artış olmakta ve böylece aktif migroglia toksisitesinde rol oynamaktadır. PH patogenezinde nöroinflamasyon ve oksidatif stres bir feedback döngüsünün elamanları olarak birbirlerini potansiyelize ederek PH'de nörodejenerasyonun ilerlemesine neden olur⁸³.

2.1.12. Parkinson Hastalığı Güncel Tedavi Yaklaşımları

PH multifatöriyel ve heterojen bir hastalık grubu olup etyolojisi ve patogenezi altında yatan sebepler tam olarak anlaşılmasından dolayı, hastalığı tamamen önleyici tedavi yöntemi mevcut değildir. PH tedavisi semptomatik olup; hastalığın progresyonunu azaltmak, fonksiyonel işlev kaybı ve hareket kısıtlılığını iyileştirme/azaltma ve PH hastalarında yaşam kalitesini arttırmaya yöneliktir. Günümüzde PH'ye yönelik medikal, cerrahi ve fiziksel tedavi ve sağlık eğitimi olarak üç farklı tedavi yöntemi mevcuttur^{70, 84}.

2.1.12.1. Parkinson Hastalığı Medikal Tedavisi

PH'nin medikal tedavisinde temel yaklaşım semptomlara neden olan DAerjik nöron dejenerasyonuna bağlı oluşan DA eksikliğini gidermeye yönelik uygulanan DA replasman tedavisidir⁸⁵. Farmakolojik tedaviler hastanın semptomlarına, yaşına ve

spesifik ilaçlara verdiği yanıtlara göre değişebilir. Her hasta için en iyi ilaç kombinasyonunu bulmak genellikle zaman alır. PH tedavisinde kullanılan ilaçlar DA seviyesini artıran, DA agonistleri, DA metabolizmasını inhibe eden ve antikolinerjik ilaçlar olmak üzere dört başlık altında incelenmesine rağmen günümüzde PH tedavisinde en etkili ve altın standart olarak kabul gören ilaç L-Dopa' dır^{12, 86}.

Levodopa

DA metabolik öncüsü olan levodopa (L-Dopa, L-3,4-dihidroksifenilalanin), PH'nin tedavisinde kullanılan en etkili ilaçtır. Yaşam kalitesini ve motor semptomları iyileştirmede diğer ilaçlara göre daha etkilidir¹². DA kan beyin bariyerini geçemediği için tedavide öncüsü olan L-Dopa kullanılmaktadır. L-Dopa tek başına uygulandığı zaman bağırsak mukozasında ve diğer periferik bölgelerde % 95 den fazlası DA'e dekarboksillenir, böylece serebral dolaşıma çok az miktarda L-Dopa katılarak yaklaşık olarak % 1'i kan beyin bariyerini geçerek strial dokuya ulaşabilir. Klinik uygulamada L-Dopa kan beyin bariyerini geçemeyen DA dekarboksilaz periferik inhibitörleri olan karbidopa veya benserazid ile kombine edilir. Böylece uygulanan L-Dopa periferde DA'e dönüşmesi engellenip santral sinir sistemine geçen L-Dopa oranının artması sağlanarak uygulanan L-Dopa dozu % 80 azaltılabilir. Karbidopa gibi ajanlar sayesinde vasküler endotelde büyük dozların DA'e dönüşmesi sonrasında ortaya çıkan bulantı-kusma, iştahsızlık ve ortostatik hipotansiyon gibi DAerjik yan etkiler azaltılmaktadır^{85, 87, 88}. L-Dopa tedavisinde ilk birkaç yılda tremor, rijidite ve bradikinezi gibi motor semptomlar ve hastaların yaşam kalitesini düzeltme eğilimindedir. Bunun nedeni hastalığın erken döneminde nigrostriatal DAerjik nöronlar L-Dopa DA'e çevirip yeterli DA'yı depolayabilirler. Fakat hastalığın ilerleyen yıllarında DAerjik nöron dejenerasyonuna bağlı olarak L-Dopa'nın DA'e çevrilmesinde azalma ve böylece L-Dopa'nın etkinliğinde azalma görülmektedir. Aynı zamanda L-Dopa ile uzun süreli tedavi sonucu her doz

sonrası yarar görülen sürenin kısılması olan (doz sonu fenomeni ="wearing off", aniden ve rastgele bir zamanda iyi ("on") ve kötü ("off") oldukları "on-off" fenomeni gibi dalgalanmalar görülmektedir. Tedavinin ilerleyen dönemlerinde motor dalgalanmalar ile birlikte görülen diskineziler önemli bir sorun teşkil etmektedir^{89, 90}.

Dopamin agonistleri

DA reseptör agonistleri aktif bir metabolite enzimatik dönüşüm gerektirmeyen, direkt olarak post sinaptik DA reseptör aktivasyonunu sağlayarak antiparkinson etkilerini gösterir. DA agonistleri ergot türevleri (bromokriptin, pergolid, lisurid, kabergolin) ve ergot türevleri olmayanlar (piripetil, pramipeksol, ropinirol, apomorfin, rotigotin) diye iki sınıfa ayrılmaktadır⁹¹. 5-hidroksitriptamin reseptörlerini de aktive eden ergot türevi DA agonisti ilaçlar pleuropulmoner ve kardiyak valvüler fibrozis geliştirme riskine sahip oldukları için kullanımı tercih edilmemektedir. PH tedavisinde L-Dopa'dan sonra en etkili ilaç olmaları, daha uzun yarılanma ömrüne sahip olmaları, L-Dopa'ya nispeten daha az motor komplikasyon geliştirme riski ve bu komplikasyonları geciktirmeleri sebebiyle kullanımı tercih edilmektedir^{22, 92}.

Dopamin metabolizmasını inhibe eden ilaçlar

Monoamino oksidaz B (MAO-B) ve Katekol-O-Metil Transferaz (KOMT) inhibitörleri bu grupta yer almaktadır. Glial hücrelerde bulunan MAO-B oksidasyonu sinaptik aralıkta bulunan DA'nın majör temizlenme mekanizmasını oluşturmaktadır⁹³. MAO-B inhibitörü olan selejilin, rasajilin ve safinamid beyinde bulunan DA katabolizmasından sorumlu olan MAO-B'yi inhibe ederek DA yıkılımını azaltarak sinaptik DA konsantrasyonunu ve etkinliğini artırır. Selejilin ve rasajilin MAO-B'yi geri dönüşümsüz olarak bloke ederken safinamid inhibiyonu geri dönüşümlüdür^{94, 95}. KOMT inhibitörü olan tolkapon ve entakapon, periferde L-Dopa'nın KOMT enzimi tarafından yıkımını önleyerek L-Dopa'nın biyoyararlanım ve plazma yarı ömrünü artırmaktadır.

Talkapon kullanımının hepatotoksititeye neden olduğunun görülmesi sebebiyle entakapona yanıt alınmayan durumlarda ve karaciğer enzimlerini sık izleme şartı ile kullanılabilir^{96,97}.

Antikolinergik İlaçlar

L-Dopa'nın keşfinden önce muskarinik asetilkolin reseptör antagonisteri PH tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktaydı. PH patolojisinde striatumdaki DA eksikliği nedeniyle asetilkolin/DA dengesi kolinerjik yollar lehine kaymaktadır ve antikolinergik ilaçların bu dengesizliği düzelterek etki gösterdiği düşünülmektedir⁹⁸. Antikolinergik ilaç kullanımı genellikle genç yaşta ve tremoru kontrol altına alınmak istenen hastalarda tercih edilmektedir⁹. Amantadin influenza A enfeksiyonunu önlemede ve tedavide kullanılan bir antiviral ajan iken antiparkinson etki gösterdiği saptanmıştır. Amantadin etkisini striatumdan DA salınımını artırarak ve antikolinergik etki göstererek gerçekleştirmektedir. PH erken dönem tedavisinde kullanılmakta birlikte L-Dopa ile kombine olarak da kullanılmakta, ayrıca motor dalgalanmalar ve diskineziyi azalttığı düşünülmektedir^{99,100}.

2.1.12.2. Parkinson Hastalığında Cerrahi Tedavi

PH tedavisi için etkili farmakolojik ajanlar mevcut olmasına rağmen, medikal tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda, 'on-off' dalgalanmaları, diskinezi, direçli tremor ve L-Dopa'ya bağlı oluşan yan etkilerin giderilemediği hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen durumlarda cerrahi tedavi seçeneklerinden faydalanılabilir. Doğru endikasyon konulduğu zaman cerrahi tedaviler yüksek etkinlikli ve düşük riskli uygulamalardır. Cerrahi yöntemler; ablatif/lezyon temelli, nörostimulasyon (derin beyin uyarısı) ve transplantasyon uygulamaları olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.^{84,101,102}

Ablatif yöntemler içerisinde yer alan talamotomi ve pallidotomi hareket bozukluğuna yol açan merkezlerde radyofrekans ile lezyon yapılmasını ifade etmektedir.

Talamotomi, medikal tedaviye dirençli tremorun dominant olduğu vakalarda endikedir. Rijidite ve diskinezi üzerinde kısmi düzelme sağladığı görülmesine rağmen bradikinezi üzerinde olumlu semptomatik etkiye sahip değildir. Pallidotomi L-Dopa tedavisine bağlı on-diskinezilerde etkili olmakla birlikte off dönemi uzun süren hastalarda etkisi 3-6 yıl süremekte ve kısmi iyilik hali gözlenmektedir. Bu süre sonunda bradikinezinin ön plana çıktığı ve STN nörostimulasyon gerekebilirliği saptanmıştır^{103, 104}.

Nörostimulasyon uygulamaları başlıca derin beyin yapıları olan, STN, pallidum (internal-posterior segment) ve talamus (nucleus ventrointermedium) gibi merkezlere yüksek frekanslı elektrik stimülasyonun yerleştirilmesi olup PH'de en çok tercih edilen uygulama bölgesi STN'dir. Nörostimulasyon uygulamaları kalıcı lezyon oluşturulmaması, bilateral uygulanabilmesi, kardinal bulgularda semptomatik kontrol sağlamasına bağlı olarak hastalarda yaşam kalitesini artırması gibi nedenlerden dolayı cerrahi tedavide en önemli seçenek halini almıştır. PH'de ilk 3-4 yıl medikal tedaviye iyi yanıt alınması nedeniyle terminal dönem ve 70 yaş üstü ileri yaştaki hastalarda, orta veya ileri demansı bulunan hastalarda nörostimulasyon tedavi yöntemi tercih edilmemektedir^{105, 106}.

Transplantasyon, cerrahi tedavi seçenekleri arasında son yıllarda uygulanmaya başlanan yeni bir yaklaşım olmakla birlikte DA sentezleyen hücrelerin striatal infüzyonunu içermektedir. İlk zamanlar otolog adrenal medüller hücreler striatuma nakledilmiş fakat hücreler uzun süre yaşayamamıştır. Embriyojenik DAerjik doku transplantasyonu sonucu hücreler daha uzun süre yaşamasına rağmen doku reddi gelişme riskine bağlı olarak immünosüpresif ilaç kullanımı, çözümlenemeyen etik problemler, hastalarda şiddetli derecede ve önlenemeyen diskinezi ve distoni gibi motor komplikasyonların görülmesi nedeniyle bu cerrahi girişim yaygınlaşamamıştır ve halen araştırma safhasındadır^{84, 106}.

2.1.12.3. Parkinson Hastalığı Fizyoterapi ve Rehabilitasyon

Progresif seyirli nörodejeneratif bir hastalık olan PH'nin ilerlemesine bağılı olarak hastalar günlük yaşam aktiviteleri ve mobilitiyi sürdürmede zorluk çekmekte ve fonksiyonel kapasitede bozulmaya bağılı olarak günlük yaşam kaliteleri gittikçe azalmaktadır. Fizyoterapi ve rehabilitasyon programları ile egzersiz ve beslenmenin düzenlenmesi, kondüsyonun korunması/arttırılması, hastanın hareket ve fonksiyonel kapasitesini artırılması ve günlük yaşam aktiviteleri becerilerinin sürdürülmesini sağılayarak yaşam kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmaktadır.

Günümüzde PH'de uygulan gerek medikal gerek cerrahi tedavi yöntemleri hastalığın progresyonunu durdurmaya yönelik değıildir. Semptomatik olarak kontrol sağılanmakta ve bireylerin yaşam kalitesinin artırılması amaçlanmaktadır^{107, 108}.

2.1.12.4. Parkinson Hastalığında Yeni Tedavi Yaklaşımları

Gen tedavisi: Moleküler biyoloji ve genetik alanında terapötik stratejilerin geliştirilmesi PH tedavisinde yeni umut kaynağı oluşturmaktadır. Gen tedavisinde viral ve viral olmayan çeşitli vektör sistemleri kullanılmasına rağmen en etkili gen aktarımı yöntemi genlerini hedef hücreye aktarma özelliğine sahip viral vektör sistemleridir. DA sentezini kodlayan hedeflendirilmiş terapötik genlerin beynin putamen ve SN bölgelerine kontrollü bir şekilde viral vektör aracılı aktarımını içeren gen tedavileri PH tedavisinde büyük ilerlemelere yol açmaktadır. PH tedavisinde adeno assosiyasyon virüs serotip 2 (AAV2) ve lentiviral vektör aracılı yaklaşımlar araştırılmaktadır. Aromatik L-amino asit dekarboksilaz (AAV2-AADC), neurturin (AAV2-NRTN) ve güçlü bir nörotrofik faktör olan, glia kökenli nörotrofik faktör (GDNF), glutamik asit dekarboksilaz (GAD) gibi enzimleri kodlayan hedeflendirilmiş genler viral vektör aracılı bilateral olarak putamen ve SN enjekte edilmektedir. Gen tedavisinin klinikte uygulanabilmesi için hedeflenen tedavi genlerinin hücrelere yeterli dozlarda ve genin hedeflenen bölgeye aktarılabilmesi,

aktarılan genlerin vücut tarafından kontrol altında tutulabilmesi gibi biyogüvenlik problemlerinin üstesinden gelinmesine bağlıdır. PH tedavisinde viral vektör aracılı aktarımını içeren gen tedavileri güvenilirlik klinik faz II çalışmaları devam etmektedir^{9, 84}.

Kök Hücre tedavileri: Farklılaşan somatik hücrelerin yeniden programlanması sonucu elde edilen indüklenen pluripotent kök hücreler ile terapötik stratejileri PH tedavisinde kullanılmasına ilişkin gelecek araştırmalara önemli bir teşvik edici unsurdur. Fibroblast gibi fare ve insan somatik hücreleri tanımlanmış transkripsiyon faktörlerinin(Oct3/4, Sox2, c-Myc and Nanog and LIN28) indüklenen pluripotent kök hücrelere programlanması uyarılmış DAerjik nöron eldesi için potansiyel bir yaklaşım sağlar. Fakat yapılan in vivo çalışmalarda fare transkripsiyon faktörlerinin kanserli hücrelerde aşırı ekspresyonu ciddi bir sorun oluşturduğu görülmektedir. PH'li bireylerin fibroblast dokusundan izole edilen indüklenen pluripotent kök hücreler elde edilen DAerjik nöron popülasyonu transplante edildiğinde innervasyonun sağlandığı belirlenmiştir^{84, 109, 110}. Aynı zamanda insan embriyonik kök hücrelerin nöronlara farklılaşma özelliğinden faydalanarak fetuslardan elde edilen embriyonik kök hücrelerin DAerjik nöronlara dönüştürülmesi ve hedef bölgeye transplantasyonu sonucu elde edilen başarılı sonuçlar embriyonik kök hücre transplantasyon tekniğinin PH tedavi modalitesi olarak üzerinde oldukça yoğun bir şekilde çalışılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte in vitro olarak elde edilen DAerjik nöron miktarının yüksek olmasına rağmen transplantasyonu takiben hayatta kalan DAerjik nöron sayısında azalma olması ve tümör oluşumu gibi durumlar önemli bir sorun oluşturmaktadır. Aşılması gereken bu problemlere rağmen kök hücre replasman tedavi yöntemleri geleceğin en ümit verici tedavi yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir fakat bu tedavi yönteminin klinik uygulamalar geçmesi için uzun yıllara ihtiyaç duyulmaktadır^{111, 112}.

Hücre Tedavisi: PH'de hücre tedavisi yöntemleri transplante edilen hücrelerin DA sentezleyebilme, transplante edilen canlıda nigrostriyal sistemle uyum gösterme ve DAerjik dejenerasyonu restore edebilme özelliklerinden yola çıkarak uygulanan yöntemdir. Yapılan in vivo çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlara paralel olarak PH olan bireylere nakledilen fetal DAerjik nöronların striatumda DAerjik dejenerasyonu kompanse ve DAerjik transmisyonu restore ettiği pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntülemesi ile gösterilmiş olup fakat bununla birlikte şiddetli off-diskinezileri geliştiği görülmüştür^{113, 114}.

Nörotrofik faktörler: Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda nörotrofik faktörlerin MPTP ve 6-OHDA gibi toksik maddelere maruz kalan DAerjik nöronların hayatta kalmasını ve fonksiyonları azalan nöronların işlevlerini yeniden kazanmasını sağlayarak nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda gen ifadesi ve protein sentezine etki ederek DAerjik sistem üzerinde uyarıcı ve nörorestoratif etki göstermektedir. Nörotrofik faktörlerin klinikte uygulamalarına ilişkin en büyük sorun kan beyin bariyerini geçememesine bağlı olarak oluşan verim yolu ile ilişkilidir. Nörotrofik faktörlerin veriliş yöntemleri ile ilgili yaklaşımlar araştırılmakta olup gelecekteki sonuçları merakla beklenmektedir^{115, 116}.

Tamamlayıcı ve Alternatif tedavi: Modern/konvansiyonel tıbbın yanısıra günümüz dünyasında PH'nin progresyonunun önlenmesinde ve tedavisinde tamamlayıcı ve alternatif tıp yaygın olarak kullanılmaktadır¹¹⁷. Homeopati, akupunktur, hipnoz, meditasyon ve bitkisel ürünler gibi biyolojik temele dayalı, manuplatif ve enerjiye yönelik uygulamalar olup günümüzde en popüler olanı bitkisel ürünler/gıda takviyelerine dayalı olan fitoterapidir. Bitkisel ürünler ve/veya bitkilerden elde edilen bileşikler bağımsız olarak veya konvansiyonel tıp yaklaşımları ile birlikte kullanılabilir^{117, 118}. İn vitro ve in vivo PH modellerinde bitkisel ürünlerin veya bitkilerden elde edilen

bileşiklerin hastalığın patogeneğinde görülen mitokondrial disfonksiyon, oksidatif stres, nöroinflamasyon gibi süreçleri önleyerek/azaltarak/iyileştirerek striatal DAerjik nöron dejenerasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilere sahip bu bitkisel ürünler ve bileşiklerinin PH patogenezi üzerinde etkilerinin araştırılması tedavide kullanılabilirliğinin belirlenmesi günümüzde halen devam etmektedir¹¹⁹.

PH tedavisi günümüzde semptomatik olup hastalığın progresyonunu önleyici ve nörodejeneratif süreci değiştirmeye yönelik değildir. Bu sebepten ötürü PH tedavisinde uygulanan yöntemlere alternatif olarak hem motor dalgalanmaları iyileştirmeye yönelik semptomatik olup hem de nörodejeneratif süreçleri engelleme bakımından onarıcı yaklaşımlar araştırma konularının ilgi odağı haline gelmiştir. Halen devam etmekte olan bu çalışmaların sonuçlarının olumlu olması durumunda PH tedavi seçeneği olarak gündeme gelebilecektir¹³.

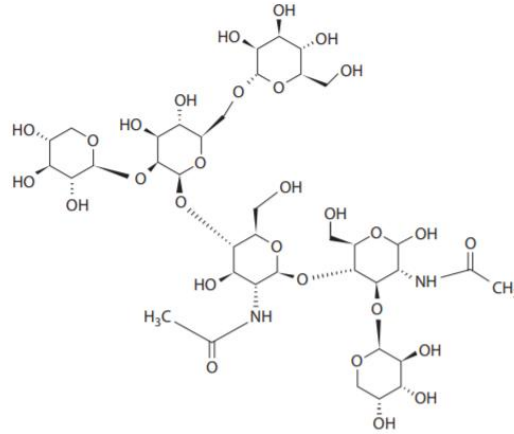
2.1.13. Bromelain

Eski çağlardan beri geleneksel halk tıbbında önemli bir yere sahip olan Ananas cosmosus (ananas) Bromeliaceae familyasına ait olup günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkisel preparatlar içinde bulunmaktadır. Bromelain (BRM), Ananas cosmosus'un kök/gövde ve meyvesinden izole edilebilen bir sistein proteazdır. Fakat tüm ticari formları genel olarak kök/gövde kısmından elde edilmektedir. BRM'nin moleküler etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen güvenilir olması ve yan etkilerinin oluşmaması sebebiyle Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından evrensel bakımından enzim preparatı olarak kabul edilmiştir^{16, 120}. BRM antiinflamatuvar, antioksidan, antitrombotik ve fibrinolitik özellikler, antikanser aktivite ve immünomodülatör tedavi uygulamalarından dolayı tıbbi olarak yaygın

kullanılmaktadır. Aynı zamanda gıda, kozmetik, farmasötik ve tekstil gibi birçok ticari alanda kullanımı bulunmaktadır^{15, 16}.

2.1.13.1. Bromelain ve Biyokimyasal Özellikleri

BRM ilk olarak 1981 yılında Marcano tarafından keşfedildi ve sonrasında Chittenden tarafından detaylı şekilde BRM'in etki mekanizması araştırıldı. 1957 yılında Heinecke'nin yaptığı çalışma sonucu Ananas cosmosus'un kök kısmının meyve bölgesine oranla daha fazla BRM içerdiği keşfedildi. Bu durum BRM enziminin ticari ölçekte üretilmesine ve fitomedikal bir bileşik olarak kullanılmasına olanak sağladı. BRM, Ananas cosmosus'dan elde edilen sıvı kısmın santrifüjleme, ultrafiltrasyon ve liyofilizasyon sonucu elde edilmektedir¹²¹.



Şekil 2.5. Bromelain'in kimyasal yapısı¹²²

Kimyasal yapısı Şekil 2.5'de gösterilen BRM, fosfatazlar, glikosidazlar, peroksidazlar, selülazlar, glikoproteinler, ribonükleaz, karbonhidratlar gibi farklı tiyol endopeptidazlar ve proteaz olmayan bileşenlerin bir kompleksidir. Aynı zamanda BRM'nin yapısında bazı proteinaz inhibitörleri de bulunmaktadır^{121, 123}. Proteinaz BRM'nin yapısındaki en aktif grup olup toplam proteinin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. BRM'nin enzimatik aktivitesi, pH 4.5 ila 8.5 aralığında geniş bir spektrum göstermektedir. BRM Ananas cosmosus'un kök/gövde ve meyvesinden elde edilmekte olup kök/gövde ve meyveden elde edilen BRM farklılık göstermektedir.

Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) kök/gövde BRM için enzim komisyonu numarası (EC numarası) EC. 3.4.22.32 ve gövde BRM) için ise EC. 3.4.22.32 olarak belirlemiştir. Günümüzde ticari olarak kullanılan BRM formu kök/gövde BRM olup sistematik olarak peptidil peptid hidrolaz olarak tanımlanmıştır¹²⁴. BRM, ticari kullanım amaçlı saf olarak elde edilmesi için günümüzde Ananas cosmosus'dan elde edilen sıvı kısmın santrifüjleme, ultrafiltrasyon ve liyofilizasyon işlemleri sonucu elde edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu BRM'nin fizyolojik aktivitesinin tek bir proteolitik fraksiyona bağlı olamayacağı ve BRM'nin faydalı etkilerinin çok sayıda faktörlerden kaynaklanmış olabileceği düşünölmektedir^{121, 124}. Trombosit agregasyon inhibisyonu ve antiinflamatuvar etki BRM'nin proteaz aktivitesi ile ilişkili iken tümörlerde belirgin büyüme inhibisyonu, metastazı engellemesi ve yanık yaralarında debridman sağlaması ise BRM'nin non-proteolitik aktivitesi ile ilişkili olmaktadır¹²³. BRM oral olarak kullanımı oldukça güvenilir olup ince bağırsaklarda herhangi bir degradasyona uğramadan ve biyolojik aktivitesini kaybetmeden önemli miktarda absorpsiyona uğramaktadır. BRM'nin kullanımı sonucu herhangi bir yan etki oluşmadığı gözlenmiştir^{15, 16}.

2.1.13.2. Bromelain ve Antiinflamatuvar Aktivite

PH gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayan inflamasyon mekanizmasının supresyonu ile hastalıkların insidansının azaltılabileceği ve hastalıkların progresyonunun önlenebileceği düşünölmektedir¹²⁵. PH tanısı konulmuş kişilerde ve yapılan in vivo çalışmalarda glial hücre aktivasyonu ve T hücre infiltrasyonu gibi inflamatuvar olaylar DAerjik nöron dejenerasyonuna neden olmaktadır. TNF- α , prostaglandin E2 (PGE2), ROS'lar ve aktive edilmiş immün hücrelerinin ürünü olan birçok inflamatuvar mediyatör PH'li bireylerin SNc bölgesinde yoğun olarak eksprese edilmektedir^{126, 127}. BRM'nin anti-inflamatuvar ve analjezik etkiye sahip olduğu yapılan

çalışmalar sonucu bildirilmiştir. BRM'nin araşidonik asit yolağının inhibisyonu ile seçiçi olarak tromboksan üretiminin azalmasına, tromboksan/prostasiklin oranının değışmesine ve direkt olarak PGE2 reseptörlerine etki ederek nosiseptörleri etkilemesi sonucu antiinflamatuvar ve analjezik etki gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda plazma kallikrein deplesyonu ve fibrinin pıhtılaşıma üzerinde etkisini sınırlandırması sonucu inflamasyon bölgesinde bradikinin sentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır^{15, 120, 128}. İnflamatuvar bağırsak hastalığında görülen TNF- α reseptörünün (TNFR) aktivasyonu sonucu oluşan inflamatuvar yanıtın BRM uygulaması sonucu sitokin profili, epitelyal hücre apoptozisi, epitelyal tight junction bağlantılarında disfonksiyonun azaltarak ve mukozal ülserlerin iyileşmesini sağlayarak inflamatuvar semptomlarını düzelttiği görülmüştür¹²⁹. COX-2, PGE2 oluşumunda temel enzim olup kanser patogeneğinde görülen inflamasyonda önemli rol oynamaktadır. BRM murin hücre ve insan monositik hücre hattında COX-2 ve PGE2 ekspresyonunu downregüle ettiği bildirilmiştir¹³⁰. Bununla birlikte IL-1 β , IL-6, IL-4, TNF- α , NF- κ B1 gibi inflamatuvar genlerin üretimini baskılamaktadır^{131, 132}. BRM ileri glikasyon son ürünlerinin zararlı etkilerini azaltarak inflamasyonu kontrol etmektedir. Aynı zamanda BRM natural killer hücreleri aktive ederek, granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör üretimini artırarak ve T-helper hücrelerin aktivasyonunu azaltarak immünomodülatör etki göstermektedir. Romatoid artrit ve myelofibrosis olan hastalarda BRM kullanımı sonucu inflamasyonda azalma olduğu tespit edilmiştir¹³³⁻¹³⁵. Birçok klinik ve prelinik çalışmada inflamasyon azaltıcı/iyileştirici etkisi kanıtlanan BRM'nin nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde major rol oynayan inflamasyon sürecine etkisini çalışmak araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir.

2.1.13.3. Bromelain ve Medikal Kullanımı

BRM'nin etki mekanizması tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen geniş terapötik etkilerinden dolayı günümüzde birçok klinik uygulamada kullanımı tercih

edilmektedir. Oral olarak kullanılan BRM'nin biyolojik özelliklerini kaybetmeden bağırsak tarafından absorbe edilmesi, uzun süreli kullanımdan sonra bile önemli bir yan etkiye sahip olmaması onu klinik kullanım için oldukça değerli kılmaktadır^{15, 134}. Yapısında bulunan proteolitik enzimler kemoterapide ilaçların yan etkisini azaltmada, radyoterapide inflamasyon ve ödem azaltmada, cerrahide yara iyileşmesini hızlandırma ve ödem azaltmak için medikal kullanıma eklenmektedir¹²³. BRM uygulaması sonucu trombosit agregasyonun önlenmesi, anjina pectoris ve geçici iskemik atakların şiddetini en aza indirildiği, hipertansif hastalarda semptomların ortadan kaldırıldığı belirtilmiştir^{136,137}. Tromboflebitli hastalar üzerinde yapılan çalışma sonucuna göre BRM'nin ağrı, ödem, tendonit, deri sıcaklığı gibi inflamasyon semptomlarında azaltarak tromboflebit tedavisinde etkili bir şekilde rol oynamaktadır¹³⁶⁻¹³⁸. Aynı zamanda aort akım hızını arttırdığı, enfarktüs boyutu ve apoptoz derecesini azalttığı görüldü¹³⁹. BRM antiflojistik etkisi sayesinde günümüzde akut inflamasyon ve spor yaralanmalarının tedavisinde kullanımı tercih edilmektedir¹⁴⁰. Sepsisli çocuklarda BRM antibiyotik ile kombine kullanımı sonucu daha etkin bir tedavi oluşturduğu gözlenmiştir¹⁶. Bununla birlikte BRM kullanımı bulantı, kusma, ishal, hazımsızlık gibi gastrointestinal; deri döküntüsü ve kasıntı gibi alerjik yan etkilere sahiptir. Aynı zamanda antikoagülan etkisinden dolayı kanama bozukluğu ve kan hastalığı olan kişilerde kanama diatezine neden olduğu için BRM kullanımına dikkat edilmeli ve hekim kontrolünde kullanılmalıdır^{141, 142}.

2.1.14. Parkinson Hastalığı Deneysel Hayvan Modelleri

PH ile ilgili çalışmalarda yürütülen deneylerde elde edilen bilgilerin en önemli kaynağını deney hayvanları oluşturmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte çoğu zaman etik kurallar bakımından mümkün değildir. PH'yi taklit eden hayvan modelleri hastalığın patogenezinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına,

bu mekanizmalara odaklanarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine, hastalığın progresyonunu önleyecek ve/veya durduracak nöroprotektif ajanların geliştirilmesine katkı sağlamaya devam etmektedir. Günümüzde PH deneysel hayvan modelleri farmakolojik, toksik ve genetik modeller olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır^{143, 144}.

2.1.14.1. Farmakolojik Modeller

Rezerpin ve haloperidol ile oluşturulan deneysel farmakolojik PH modelinde sırasıyla amaçlanan DA tükenmesi ve striatal DAerjik iletimin blokajının sağlanmasıdır. Rezerpin VMAT2'yi inhibe ederek depolama kapasitesinin azalmasına ve dolayısı ile monoaminlerin (noradrenalin, 5 hidroksitriptamin ve dopamin) tükenmesine yol açar¹⁴⁵. Rezerpin modelinde DA azalması diğer monoaminlere göre daha fazla olmakla birlikte rezerpin SNC'de ~85% DA kaybı ve enjeksiyondan 2 saat sonra striatumda >% 95 DA tükenmesine neden olduğu bildirilmektedir^{143, 146}. Rezerpin enjeksiyonundan 24 saat sonra SNC'de DA miktarı yaklaşık olarak % 30'a kadar yükselmiş olsa bile striatal DA tükenmesi en az 24 saat boyunca >% 95 oranında devam eder. Aynı zamanda bu modelde akinezi ve arka ekstremitte sertliği gibi PH ile ilişkili davranışsal semptomlar gözlenir. Rezerpin modeli PH klinik özelliklerini yansıtan akinezi ve ekstremitte sertliğine neden olmasına rağmen, nigral DAerjik hücre dejenerasyonuna yol açmaz. Bu nedenle bu model semptomatik tedaviye yeni yaklaşımları değerlendirmede sınırlı kalmaktadır^{143, 147}.

Nöroleptik bir ilaç olan haloperidol mezolimbik sistemdeki postsinaptik D2 reseptör ve daha az yoğunlukta D1 reseptörleri antagonize ederek direkt ve indirekt yollar üzerinde etki gösterir. Haloperidol DA transmisyon blokajı, katelepsi ve rijiditeye yol açmaktadır^{148, 149}. Haloperidol modeli rezerpin modeli gibi PH ile ilişkili patolojilerden herhangi birini göstermediği için kullanımı sınırlıdır¹⁴³.

Deneysel olarak oluşturulan farmakolojik modeller PH için semptomatik ilaçların keşfinde önemli bir yere sahip olmasına rağmen geçici etki göstermeleri sebebiyle uzun

sürekli fayda sağlanamaması bu modellerin kullanımını sınırlamaktadır. Aynı zamanda bu modeller PH ile ilişkili herhangi bir patoloji göstermediği için nöroproteksiyon ve sinir onarım ile ilişki yeni stratejileri araştırmada elverişli yöntemler değildir¹⁵⁰.

2.1.14.2. Toksik Modeller

Rotenon modeli

Herbisit ve insektisit olarak bilinen rotenon oldukça lipofilik ve kan beyin bariyerini kolayca geçebilen özelliğe sahiptir. Rotenon diğer modellerden farklı olarak PH'ye ait önemli bir histopatolojik gösterge olan LC oluşmasını sağlar^{151, 152}. Aynı zamanda rotenon mitokondriyal kompleks I aktivitesini inhibe ederek oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, motor ve biyokimyasal defisitler, α -sinüklein agregasyonu gibi PH patolojisinde bulunan birçok özelliği göstermektedir. Rotenon sadece DAerjik nöronlarda değil aynı zamanda serotonin, nördrenerjik ve kolinerjik nöronlarda da dejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir^{152, 153}. Rotenon ile oluşturulan PH sonucu yüksek mortalite, fenotipik değişkenlik ve PH ile ilişkili olmayan semptomlar bu modelin dezavantajlarını oluşturmaktadır¹⁵⁴. Aynı zamanda rotenon DA oksidasyonuna neden olmasına rağmen nigrostriatal yolakta DAerjik dejenerasyona dair bir bulgu sunulamamıştır¹⁵².

Parakuat ve Manabe Modelleri

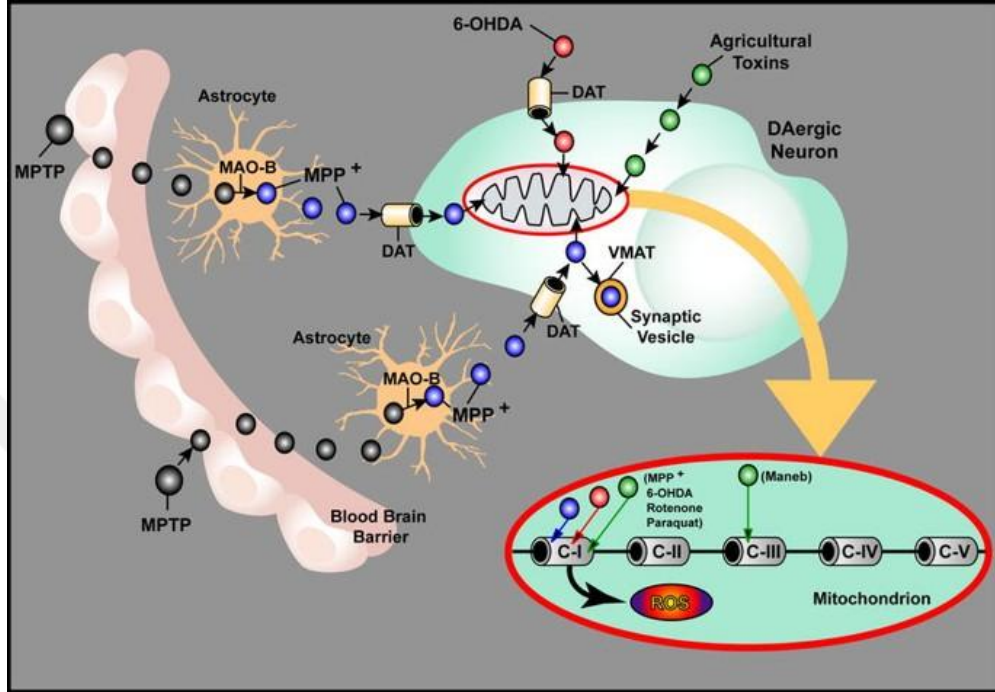
Parakuat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinyum) yapısal olarak MPP⁺'ye benzerlik gösteren bir herbisittir ve nigrostriyal DAerjik sistemde dejenerasyona ve α -sinüklein agregat oluşumuna neden olur¹⁵⁵. Parakuat mitokondriyal kompleks I'in zayıf bir inhibitörü olduğu için parakuat ile indüklenmiş nörotoksisite model oluşumunda kompleks I inhibisyonu önemli rol oynamaz¹⁵¹. MPP⁺ 'dan farklı olarak toksik etkisini süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerini üreterek oksidatif strese neden olur. Aynı zamanda davranışsal olarak motor aktivitelerde

azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir¹⁵⁶. Fungusit olan maneb kompleks III inhibitörüdür ve parakuatin etkisini artırmaktadır. Manebin nörotoksisite oluşturma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte etkisini glutamat transportunu inhibe ederek ve DA salınım mekanizmasını bozarak göstermektedir. Pakuat ve maneb modeli tekrarlanabilirliğin az olması, DAerjik hücre ölümü, striatal DA kaybı ve davranış sonuçları bakımından oldukça çelişkili ve değişken olduğu için değişken ve çelişkili sonuçlar kullanımı çok fazla tercih edilmemektedir¹⁵⁷.

1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridin (MPTP) modeli

MPTP, PH modellemesi için yaygın olarak kullanılan bir nörotoksin olup akut veya kronik olarak uygulanabilir. Lipofilik yapısı nedeniyle kan-beyin bariyerini dakikalar içinde kolayca geçebilir^{38, 109, 153}. Glial hücelere ve serotonerjik nöronlara alınan MPTP, (MAO-B) tarafından 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum'a (MPDP⁺), daha sonra oksidasyon ile toksik bir ajan olan MPP⁺ye dönüşmektedir. Organik katyon taşıyıcı 3 ile ekstraselüler aralığa salınan MPP⁺ DA transporter (DAT) ile seçici olarak DAerjik nöronlara taşınır ve daha sonra VMAT veziküllerinde birikir^{158, 159}. MPP⁺, mitokondriyal elektron transport zincirinde kompleks I inhibe ederek oksidatif stres ve ATP üretiminde azalma, hücre ölümü ve nöroinflamasyona yol açmaktadır. Bu mekanizma PH patogenezinde görülen DAerjik nörodejenerasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve nöroinflamasyon mekanizmalarının çalışmasına olanak sağlar¹⁶⁰. Aynı zamanda primatlarda oluşturulan MPTP toksisitesi sonucu insanlarda görülen PH'nin tüm klinik bulguları ile karakterize edilen tremor, rijidite, akinezi ve postürel instabilite oluşturulmaktadır. MPTP, insan dışı primatlardan kedi ve köpeklere kadar uzanan birçok canlıda PH modeli oluşturmak için kullanılsa da sıçanlar bilinmeyen bir sebepten dolayı MPTP toksisitesine karşı direnç gösterirler. MPTP modeli ile PH ait LC benzeyen intranöronal inklüzyonlar gözlenmiş olmasına rağmen, klasik LC'nin

elektron mikroskop görüntüleri elde edilememiştir. Günümüzde MPTP modeli, PH semptomlarının tedavisinde yeni stratejilerin ve ajanların değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir^{158, 161, 162}.



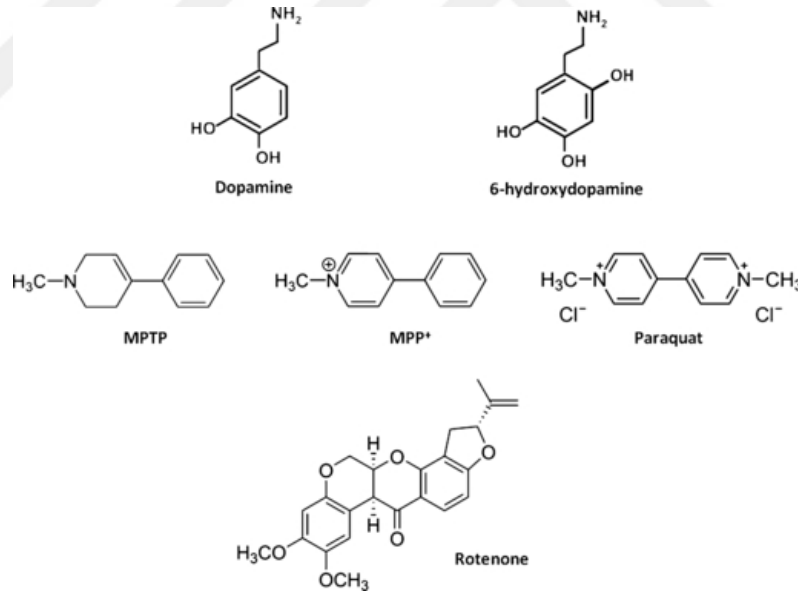
Şekil 2.6. Parkinson hastalığı hayvan modellerinde uygulanan dopaminerjik nörotoksinlerin moleküler ve hücre içi yollarına şematik bakış¹⁶³

6-Hidroksidopamin (6-OHDA) modeli

6-OHDA, hidroksillenmiş DA analogu olup nigrostraital yolaktaki DAerjik dejenerasyona yol açan bir nörotoksindir. 6-OHDA kan beyin bariyerini geçemediği için SN, medial ön beyin demeti (MFB), striatum içine stereotaksik enjeksiyon ile doğrudan uygulanmaktadır¹⁵³. 6-OHDA, DAT'ın yanısıra noradrenalin transporter'larına da yüksek afinite göstermektedir. Bu sebepten ötürü noradrenarjik nöron hasarını önlemek için noradrenalin transporter inhibitörü olan desipramin ve pargilin sistemik olarak verilerek DAerjik nöronlar için 6-OHDA toksisitesinin spesifikliği artırılır¹⁴³. DAerjik nöron içerisine giren 6-OHDA mitokondiyal respiratuvar zincirde kompleks I ve IV inhibisyonuna neden olarak oksidatif strese yol açar ve böylece lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonu oluşur. Aynı zamanda 6-OHDA oksidasyonu sonucu oluşan

başlıca H₂O₂ gibi ROS'lar striatal antioksidan enzimlerin azalmasına neden olur ve böylece DAerjik nöron hasarı oluşur^{143, 158, 164}. Ratlarda 6-OHDA toksisitesi sonucu striatum ve SN bölgesinde mikrogliya aktivasyonu ve buna bağlı olarak TNF- α gibi proinflamatuvar markırlarda artış olduğu ve DAerjik nöronal hasar ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür^{165, 166}. 6-OHDA modeli ile DA tükenmesi, nigral DAerjik hücre dejenerasyonu ve davranışsal defisitler başarılı bir şekilde elde edilir. Fakat bu modelde PH'de görülen protein agregatları ve Lewy benzeri inklüzyonlar oluşturulmaz iken 6-OHDA'nın α -sinüklein ile etkileşime girdiği bildirilmiştir. 6-OHDA ile oluşturulan PH modeli fareler, kediler ve primatlar da dahil birçok hayvanda oluşturulmasına rağmen en çok ratlar bu nörotoksin'e duyarlıdır. 6-OHDA toksisitesi unilateral lezyon oluşturmak için "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Çünkü 6-OHDA'nın bilateral enjeksiyonu sonucu belirgin adipsi, afaji ve nöbetler nedeniyle deney hayvanlarında sıklıkla ölüm görülmektedir¹⁵³. 6-OHDA enjeksiyonundan 24 saat sonra DAerjik nöronların birçoğunda dejenerasyon başlamakta ve birkaç gün içerisinde strial DAerjik nöronların %90'nının dejenere olduğu görülmektedir. Unilateral enjeksiyon modeli L-Dopa'nın neden olduğu diskinezi, asimetric motor defisitler ve rotasyonel davranışlara neden olmaktadır. 6-OHDA'nın unilateral uygulanmasını takiben amfetamin veya apomorfine cevaben oluşan rotasyonel davranış incelenerek SN ve striatal lezyonun derecesi değerlendirilir ve bu davranış potansiyel PH terapötiklerinin etkinliğini test etmek için kullanılmıştır^{109, 153}. Kan beyin bariyerini geçemeyen 6-OHDA; SN, MFB ve striatum içine stereotaksik cerrahi yöntemler ile doğrudan enjekte edilmelidir. Bu durum 6-OHDA modelini kullanmada dezavantaj olup tekniğin öğrenilmesini gerektirmektedir^{166, 167}. Fakat 6-OHDA deneysel PH modelinde en yüksek miktarda nigral hücre kaybı ve striatal DA depleasyonu oluşturulması modelin avantajlarından biridir¹⁶⁴. 6-OHDA'nın intrastriatal enjeksiyonu SN ve ventral tegmental komplekste progresif retrograd nöronal

dejenerasyona neden olmaktadır. Bununla birlikte unilaterale 6-OHDA enjeksiyonu ile hemiparkinson modeli oluşmakta ve sağlam hemisfer internal kontrol olarak kabul edilmektedir. Oluşturulan unilaterale lezyon apomorfin gibi DA reseptör agonistlerinin, L-Dopa ve amfetamin gibi DA salgılayan bileşiklerin sistemik uygulanması ile asimetrik motor davranışları (dönüş, rotasyon) indükler. Bu model ile motor davranışların ölçülebilir olması farmakolojik ajanların DAerjik sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi ve hücre replasman tedavilerinin test edilmesi bakımından büyük bir avantaj sağlamaktadır^{92, 167}. Aynı zamanda 6-OHDA'nın insan beyinde ve idrar örneklerinde endojen olarak bulunabileceğine dair kanıtlar, bu modele ek güven vermektedir¹⁶⁷. Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH modelini kullanmayı daha uygun bulduk.



Şekil 2.7. Dopamin ve deneysel in vivo Parkinson hastalığı modelinde kullanılan dopaminergic toksinlerin kimyasal yapısı¹⁶⁴

2.1.14.3. Genetik Modeller

PH uzun yıllardır sporadik orjinli genetik kökenli olmayan bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen PH vakalarının % 10'unda ailesel geçişli genetik mutasyonların

saptandığı bildirilmiştir. Bunlar otozomal dominant kalıtımda rol oynayan α -sinüklein ve l \ddot{o} sin a \acute{c} sından zengin tekrarlı kinaz 2 (LRRK2) ve otozomal resesif kalıtımdan sorumlu Parkin, DJ-1 ve PTEN-ind \ddot{u} kl \ddot{u} kinaz 1'in (PINK1) genlerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. PH genetik olarak oluşturulmasında bu genlerin overekspresyonu, knockout ve knockdown gibi genetik manip \ddot{u} lasyon teknikleri kullanılmaktadır¹⁶⁸. Bu genetik y \ddot{o} ntemler ile PH'ye ait mitokondriyal disfonksiyon, α -sin \ddot{u} klein agregat oluşumu, motor n \ddot{o} ron kaybı, gliosis ve DAerjik transmisyonunda azalma gibi patolojiler g \ddot{o} r \ddot{u} lmesine rağmen ilerleyici bir DAerjik n \ddot{o} ron kaybı elde edilemememesi sonucu mevcut genetik modellerin PH'yi tam olarak yansıttığını s \ddot{o} ylemek m \ddot{u} mk \ddot{u} n deđildir¹⁴³.

2.2. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)

Lawrence F. Eng. tarafından 1969 yılında keşfedilen glial fibriler asidik proteinin (GFAP) merkezi sinir sisteminde genellikle astrositlerin ayırt edici intra-sitoplazmik \ddot{o} zelliklerine yol a \acute{c} an intermediyer filament (IF) III proteinidir. GFAP; insanda 17q21.1-q25 kromozomda, 8–50 kDa ağırlığında ve asidik \ddot{o} zelliktedir¹⁶⁹. GFAP'ın α , β , γ , δ , ζ , κ , Δ exon, GFAP Δ 135, GFAP Δ exon6 ve GFAP Δ 64 olmak \ddot{u} zere on faklı isoformu bulunmakta ve bunlarda en yoğun olarak insan beyin h \ddot{u} crelerinde GFAP α eksprese olmaktadır¹⁷⁰. Sinir dokusunun tanımlanmasında bir antijen olarak kullanılan GFAP, glial h \ddot{u} crelerin alt tipi olan astrositlerin santral sinir sisteminde rol aldđı fizyolojik ve patolojik s \ddot{u} re \acute{c} lerde selektif bir marker olarak tercih edilmektedir¹⁷¹. Astrositler santral sinir sisteminde en fazla bulunan h \ddot{u} crelerdir ve n \ddot{o} ronların yaşamlarını s \ddot{u} rd \ddot{u} rmeleri, işlevlerini yerine getirebilmeleri i \acute{c} in yapısal ve metabolik destek sađlarlar¹⁷². N \ddot{o} rogenez ve sinaptogenezde rol oynayan, kan beyin bariyerinin yapısal olarak ge \acute{c} irgenliğini kontrol eden, astrosit-n \ddot{o} ron laktat mekiği tarafından n \ddot{o} ronlara enerji sağlayan ve ekstrasel \ddot{u} ler homeostazı koruyan beyin fonksiyonlarını d \ddot{u} zenleyici role sahiptir¹⁷³.

Özellikle DAerjik nöronların gelişimi, korunması ve canlılığını sürdürmesi için gerekli olan GDNF gibi çeşitli nörotrofik moleküllerin üretilmesini sağlar¹⁷². Bununla birlikte beyin hasarı, santral sinir sistemi dejenerasyonu, nöroinflamasyon ve yaşlılık gibi durumlarda astrositlerde görülen morfolojik değişiklikler nöronal yaralanma sonucu oluşan astrogliosis gibi reaktif süreçleri başlatır. Bu süreçte GFAP up-regülasyonu eşlik etmesi GFAP'ın bu patolojik süreçlerde gelişen morfogeneze önemli bir materyal olduğunu göstermektedir¹⁷⁴. Sinir dokusunun harabiyetine bağlı olarak GFAP'ın nöroprotektif etkileri de görülmekte olup reaktif gliozise neden olduğu için sinir dokusunun rejenerasyon yeteneğini engellediği düşünülmektedir¹⁷⁵.

PH'de nöronların primer karakteristik kaybına ilave olarak astrosit disfonksiyonu da görülmektedir. DAerjik nöron dejenerasyonu sonucu oluşan sitokinler ve ROS türleri astrositlerden nörotoksinlerin üretilmesine/ salınımına neden olduğu düşünülmektedir¹⁷⁶. Aynı zamanda PH'nin patogenezinde görülen nöroinflamasyonun başlatılmasında astrositler rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak yapılan in vivo ve klinik çalışmalarda PH'de SN ve striatum bölgelerinde GFAP ekspresyonunun arttığı saptanmıştır¹⁷⁷. Birçok nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi PH'de de astrosit markeri olan GFAP protein ve mRNA ekspresyonu gerek hastalığın progresyonu gerekse terapötik müdahalelere verilen yanıtın değerlendirilmesinde immunhistokimyasal bir belirteç olarak kullanılabilir¹⁷⁶.

2.3. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ilk olarak 1975 yılında Carswell tarafından *Serratia marcescens* polisakkaritlerinin farelere enjeksiyonunu takiben tümör regresyon aktivitesini indüklemesi sonucu keşfedilen bir sitokin olmuştur¹⁷⁸. TNF- α , proliferasyon ve hücre farklılaşması gibi homeostasite rol oynayan fizyolojik fonksiyonların yanı sıra inflamatuvar süreçte konakçı cevabında en erken salgılanan proinflamatuvar

mediatördür^{178, 179}. TNF- α , 233 aminoasit ve 26 kDA ağırlığında tip II transmembran proproteinden eksprese olur ve spesifik matriks metalloproteaz TNF konverting enzim (TACE/ADAM17) tarafından 17 kDA, 157 aminoasitten oluşan solubl monomerik forma dönüştürülür. TNF- α biyolojik aktivitesini gösterebilmesi için 55-kDa TNF reseptör 1 (TNFR1, p55, TNFRSF1A) ve 75-kDa TNF reseptör 2 (TNFR2, p75, TNFRSF1B) iki kognat reseptörüne bağlanmaktadır. TNFR1 genellikle inflamatuvar ve pro-apoptotik, TNFR2 nöroprotektif ve doku rejenerasyon süreçlerinde rol oynamaktadır¹⁸⁰. TNF- α ; inflamatuvar süreçte rol oynayan nükleer faktör-kappa B (NF κ B), apoptotik yollar, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), p38 mitojen aktive protein kinaz (p38MAPK) ve c-Jun. N-terminal kinaz (JNK) gibi sinyal yollarını aktive etmektedir ve bu fizyolojik rolü TNF- α 'nın nöroinflamasyonda major sitokin olarak nitelendirilmesinde neden olmaktadır¹⁷⁸.

Santral sinir sisteminde görülen yaralanma veya disfonksiyona cevap olarak endotel hücrelerden, nöronlardan ve glial hücrelerden TNF- α salınmakta ve bu durum mikroglia, astrosit ve NF- κ B sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Beyinde en yoğun bulunan mikroglia popülasyonlarından biri orta beyinde DAerjik nöronlarda olduğu saptanmıştır¹⁸¹. Mikrogliaların aşırı aktivasyonu sonucu, nörotoksisite, antijen prezentasyonunun ve inflamatuvar faktörlerin üretiminde artışa bağlı olarak SN'de DAerjik nöron kaybı görülmektedir. Postmortem çalışmalar PH hastalarının beyinlerinde SN bölgesinde aktif mikrogliaların yoğunlukta olduğunu doğrulamıştır. Aynı zamanda PH bireylerin serum ve serebrospinal sıvı örneklerinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 proinflamatuvar sitokin düzeyleri artmaktadır¹⁸². Lewy patolojisinin temel komponenti olan α -sinüklein PH oluşumu ve progreyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. α -sinüklein beyinde nöronların yanı sıra astrositlerde de yoğun olarak görülmekte ve reaktif gliozise yol açarak TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salımına neden olmaktadır. Artan sitokin

düzeyleri ve astrosit aktivasyonu sonucu bir kısır döngü ile inflamatuvar süreç hızlanarak sinaptik disfonksiyon ve nöronal hücre ölümüne yol açarak PH progresyonunu hızlandırmaktadır¹⁸³. Deneysel PH modelleri, DAerjik nöronlarının TNF- α 'ya son derece duyarlı olduğunu göstermiştir. Rho-kinaz ve NF- κ B'nin aktivasyonu ile serbestlenen bu sitokin mitokondriyal kompleks I hasarı, ATP düzeyinde azalma, ROS artışı ve otofajik mekanizmalarda bozulmaya neden olarak doğrudan DAerjik nöron harabiyetine neden olmaktadır. Aynı zamanda yapılan in vivo çalışmalarda TNF- α otozomal resesif başlangıçlı PH'de mikroglia, makrofaj ve nöronal hücrelerde bulunan parkin proteini düzeyinin yanı sıra PARKİN mRNA genini downregüle ettiği bildirilmiştir. Represion/aktivasyon döngüsü dikkate alındığında kronik inflamatuvar profilin Parkin seviyesini azalttığı ve buna bağlı olarak Parkin mutasyonlarının fenokopisini oluşturduğu düşünülmektedir. Böylece nigrostriatal yolakta oluşan dejenerasyon PH gelişimini tetiklemektedir¹¹.

2.4. Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS)

1980 yılında Furchgott ve Zawadzki in vitro ortamda arter preparatında asetilkolin uyarısı ile alınan relaksasyon cevabının endotel bağımlı olduğunu ve asetilkolin uyarısı ile endotelden salınan bir maddenin gevşemeye yol açtığını ileri sürdüler. Bu madde endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırıldı ve daha sonrasında 1987 yılında Palmer ve arkadaşları vasküler endotel hücrelerden EDRF'yi izole edip ve EDRF'nin dominant kısmının NO ile aynı etkiye sahip olduğunu belirlediler¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

NO, lipofilik bir gaz nörotransmitter olup, yarılanma ömrü kısa ve diğer nörotransmitterlerden farklı olarak sinaptik veziküllerde depolanmamaktadır¹⁸⁸. L-arjinin oksijen varlığında nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla L-sitrüline dönüşürken, bu oluşum sırasında NO açığa çıkar¹⁸⁹. Santral sinir sisteminde NOS'un aktivitesi farklı olan dört izoformu bulunmaktadır. Bunlar nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS, Tip I, NOS-I),

indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS, Tip II, NOS-II), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS, Tip III, NOS-III) ve mitokondriyal nitrik oksit sentaz (mtNOS)'dır¹⁹⁰. nNOS, sinaptik uç, nöronlar, astrositler ve kan damarları etrafındaki gevşek bağ doku; iNOS, astrosit, mikroglia ve monosit, nötrofil gibi immün sistem hücreleri; eNOS, serebral vasküler endotel hücreleri ve motor nöronlarda; mtNOS mitokondri iç membranında lokalize olmaktadır^{189, 190}.

Sinir sisteminde major izoform olan nNOS nöronlarda baskın NO kaynağı olup 12q24.2-31 kromozomunda kodlanan NOS1 geni tarafından eksprese edilir ve 160.8 kDa ağırlığında olup 1434 amino asitten oluşmaktadır. nNOS türevi NO sinaptik plastisite, nöronal sinyal, öğrenme ve hafıza oluşumu, motor fonksiyonlar gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır. NO fizyolojik konsantrasyonlarda nöroprotektif bir ajan olarak işlev görürken, yüksek konsantrasyonlarda eksitotoksik nöronal hasara neden olmaktadır. Monomerik yapıda inaktif olan nNOS, tetrahidrobiopterin, hem ve L-arjinin bağlanması ile aktif olan dimerik forma dönüşmektedir^{191, 192}. Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı bir enzim olan nNOS, N-metil-D-aspartat (NMDA) -tipi glutamat reseptörü aktivasyonu sonucu hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki artışa bağlı olarak aktive edilir. Son zamanlarda striatal D1 ve D2 reseptörlerinin aktivasyonunda NO sentezinin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Postmortem incelenen PH vakalarının nigrostriatal yolak ve BG'lerde nNOS ekspresyon seviyesinin arttığı saptanmıştır¹⁹⁰. Yapılan in vivo PH deneysel modellerinde MTPT ve 6-OHDA nörotoksinleri uygulaması sonrasında SN bölgesinde nNOS aktivitesinde artış olduğu ve buna bağlı olarak SN bölgesinde ROS ve Ca^{2+} düzeylerinde artışa neden olarak DAerjik nöron harabiyeti olduğu görülmüş ve nörodejenerasyonda artışa sebep olduğu bildirilmiştir¹⁹³. Aynı zamanda PH modeli oluşturulmuş ratlarda nNOS inhibisyonu sonucu motor bulgulardan biri olan diskinezi

gelişiminin azaldığı saptanmıştır. nNOS düzeyindeki artışın PH patogeneğinde yer aldığı yapılan çalışmalarca bildirilmiştir¹⁹⁴.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM), Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D'da yer alan Sinirbilim ve Davranış Laboratuvarları ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji A.D'da gerçekleştirildi.

Çalışma bütçesi TDK-2019-6996 nolu proje kapsamında Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılandı.

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma protokolü Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanı Etik Kurulu tarafından 19.12.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900366156 sayılı yazısı 246 no'lu kararı ile onaylandı. Çalışmada ATADEM'den temin edilen 60 adet Sprague-Dawley türü erkek (8 haftalık, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen) rat kullanıldı. Hayvanlar bir haftalık adaptasyon periyodu ve izleyen deneysel süreçte; özel kafeslerinde 12 saat aydınlık/karanlık döngünün, sabit sıcaklık ve %55-75 nem koşullarının sağlandığı laboratuvar ortamında barındırıldı. Deney süresince ratlara yem ve su ad libitum olarak sağlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Çalışma Grupları

Bu çalışmada herbirinde 12 hayvan bulunan 5 gruptan oluşmuş olup hayvanlar gruplara rastgele dağıtıldı.

Grup 1(Kontrol; n:12): Ratlara 14 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik (SF) i.p olarak uygulandı.

Grup 2 (Parkinson (PH); n:12): Ratlarda SN bölgesine 4 µl hacminde 6-OHDA unilateral olarak sol tarafa Hamilton mikroenjektörü ile uygulandı ve 14 gün boyunca SF i.p olarak uygulandı.

Grup 3(PH+L-Dopa; n:12):Ratlarda PH modeli oluşturulduktan sonra 14 gün boyunca 10 mg/kg L-Dopa i.p olarak uygulandı.

Grup 4 (PH+BRM; n:12) Ratlarda PH modeli oluşturulduktan sonra 14 gün boyunca 50 mg/kg BRM oral olarak uygulandı.

Grup 5 (PH+ BRM+L-Dopa; n:12) Ratlarda PH modeli oluşturulduktan sonra 14 gün boyunca 10 mg/kg L-Dopa i.p ve 50 mg/kg BRM ise oral olarak uygulandı.

3.2.2. Bromelain ve L-Dopa Uygulanması

BRM (Sigma-Aldrich,1.01651), PH+ BRM ve PH+L-Dopa+BRM gruplarına SF içinde çözülerek 50 mg/kg/gün dozda, 14 gün boyunca gavaj yoluyla uygulandı.

L-Dopa (Sigma-Aldrich, 333786) PH+L-Dopa ve PH+L-Dopa+BRM gruplarına SF içinde çözülerek 10 mg/kg/gün dozda, 14 gün boyunca i.p olarak uygulandı. Tüm L-Dopa uygulamaları 2.5 mg/kg benserazid ile kombinasyon halinde gerçekleştirildi.

3.2.3. 6-OHDA ile Deneysel Parkinson Modelinin Oluşturulması

Stereotaksik çalışmalardan önce ratlara noradrenerjik nöronların zarar görmesini engellemek amacıyla 30 mg/kg i.p. desipramin ve 10 mg/kg i.p. pargilin verildi. Deney hayvanları 25 mg/kg tiyopental anestezisi altında stereotaksik cihaza yerleştirildi. Paxinos ve Watson rat beyin atlasına göre SN koordinatları anteroposterior (AP) -4.8mm (bregmadan), lateral (L) 2.5mm (Midsagittal sütürden), ve dorsaventral (DV) 8mm (kafatası yüzeyinden) olarak belirlendi ve unilateral olarak sol taraftan tek adet burr hole açıldı. Kafa derisi povidon iyot ile dezenfekte edilerek tıraş edildi. Kafa derisi orta hattın 1.5 cm kesi atıldı ve yarı steril olacak şekilde temizlendi. PH, PH + L-Dopa, PH + BRM, PH + BRM+ L-Dopa gruplarında yer alan ratların SN bölgelerine 0,1% askorbik asit

4µl'lik hacimde Hamilton mikroenjektörü ile toplam 8 µg/ µl 6-OHDA (Sigma-Aldrich, H438) miktarı stereotaksik mikroenjeksiyon unilateral olarak uygulandı. Enjeksiyon hızı dakikada 0,5 µl olacak şekilde ilgili koordinatlara enjekte edildi. Enjeksiyon kanülü sonrası 3 dakika yerinde bırakıldıktan sonra mikroenjektör 5 sn'de bir 1 mm yukarı çekilerek yavaşça ilgili bölgeden çıkarıldı. Sonrasında batikon ile temizlenen kafa derisine 3 mm'lik cerrahi iplik ile dikiş atıldı. Cerrahi işlem sırasında bir hayvana ait örnek prosedür Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Cerrahi işlemlerden sonra deney hayvanlarında ağrıyı azaltmak için 10 mg/ml parasetamol i.p olarak uygulandı. Kontrol ve PH grubunda yer alan ratlara 14 gün boyunca i.p olarak SF uygulanırken, PH + L-Dopa grubuna 14 gün boyunca i.p olarak L-Dopa, PH + BRM grubuna 14 gün boyunca oral olarak BRM, PH + L-Dopa+ BRM grubuna ise 14 gün boyunca L-Dopa (i.p) ve BRM (oral) kombinasyonu uygulandı. 14 gün sonunda sırasıyla apomorfin ile indüklenen dönme, silindir ve lokomotor aktivite davranış testleri yapıldı



Şekil 3.1. Stereotaksik cerrahi işleminden bir örnek

3.3. Davranışsal Testler

3.3.1. Apomorfinle İndüklenen Rotasyon Testi

Apomorfin non-selektif DA reseptör agonisti olup postsinaptik DAerjik reseptörler aracılığı ile etkisini göstermektedir. Unilateral apomorfin enjeksiyonu sonucu hayvanlarda denerve olan striatum bölgesinde DA reseptörlerin hiperstimulasyonuna bağlı olarak lezyonlu bölgenin zıt tarafında kontralateral dönmeler görülmektedir. Apomorfin ile indüklenen rotasyon testi lezyonların DAerjik sistem üzerindeki etkisi ve PH modeli oluşturulmuş ratlarda tedavinin etkinliğini göstermek için yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁹⁵.

Bu test için 28 cm çapı ve 38 cm yüksekliği olan üstü açık bir silindir kap kullanıldı. Ratlar silindir kap içine konularak 5 dk süre ile bekletildi. 5 dk'lık alışma süresinden sonra 0.5 mg/kg i.p. apomorfin HCl (Sigma-Aldrich, 41372-20-7) verildi. Enjeksiyonu takiben video kamera takip sistemiyle (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) 60 dakika kayıt alındı. Apomorfinle indüklenen rotasyon testi için enjeksiyonu takiben 60 dakika boyunca 360 derecelik dönme sayısı hesaplandı. Kontralateral ve ipsilateral dönmeler sırasıyla pozitif (+) ve negatif (-) skor olarak kabul edildi ve net dönme sayısı + dönme ve – negatif dönme olarak tanımlandı¹⁹⁶.

3.3.2. Silindir Testi

Silindir testi deney hayvanlarında duysal-motor fonksiyonu değerlendirmek için spontan pençe kullanımını ölçme esasına dayanan bir testir. Stereotaksik cerrahi girişim sonrası meydana gelen unilateral nigrostriatal hasar sonucu oluşan motor asimetriyi ve Parkinson benzeri motor belirtilerin değerlendirilmesi amacı ile silindir testi kullanıldı¹⁹⁷.

¹⁹⁸.

Bu test için ratlar 20 cm çapa ve 30 cm yüksekliğe sahip pleksiglas bir silindire yerleştirildi. Silindirin arka kısmına uygun pozisyonlarda yerleştirilen aynalar ile kayıt esnasında silindirin her alanının görülebilir olması sağlandı ve böylece deney hayvanlarının arkası dönük hareketleri de kaydedildi. 20 dakika boyunca deney hayvanlarının davranışları video kamera (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) ile kayıt altına alındı. Hayvanların sağ ve sol ön pençelerini silindir çeperine dokunmak için kullandığı, sağ ve sol pençeleri ayrı ayrı dokunmak için kullandığı durumlar izlendi. Hayvanların ayakları üzerindeyken lezyon tarafa ipsilateral ve kontralateral ön pençeleri ile silindir duvarını incelemesi veya düşmesi izlendi, toplam pençe kullanımı sayısı ile karşılaştırıldı ve % kullanım olarak ifade edildi.(Formül 3.1 ve 3.2).

$$\% \text{ Ipsilateral Dokunma} = 100 \times (\text{Sağ} / (\text{Yalnız Sağ} + \text{Yalnız Sol} + (2 \times \text{Hem Sağ Hem Sol})) \quad (3.1)$$

$$\% \text{ Kontralateral Dokunma} = 100 \times (\text{Sol} / (\text{Yalnız Sağ} + \text{Yalnız Sol} + (2 \times \text{Hem Sağ Hem Sol})) \quad (3.2)$$

3.3.3. Lokomotor aktivitemetre testi

Ratlarda lokomotor aktivite ölçümü için 42x42x42 cm ölçülerindeki aktivitemetre (May Act 508) kullanıldı. Bu sistem, kızılötesi fotoseller ile donatılmış sekiz plastik cam kafesten oluşan ve veri kayıt sistemine bağlı otomatik bir cihazdır. Bu kafes içindeki ratlar herhangi bir hareket yaptığında karşılıklı IR sensörler arasındaki iletişimi kestiği için deneğin yaptığı hareketin şekline göre aktiviteleri farklı parametreler şeklinde kaydedilir. Bu sistem sayesinde ratların deney süresince ambulatuvar, vertikal ve horizontal aktivite, dinlenme süresi ve toplam katettiği mesafe ölçüldü. Tüm parametreler için ratlar transparan kafesin ortasına teker teker bırakılarak 20 dk boyunca kayıt alındı Bu test ile lokomotor aktivitedeki artma ya da azalma tespit edildi¹⁹⁹.

3.4. Histopatolojik Analizler

3.4.1. Dokuların Hazırlanması ve Hematoksilen-Eozin Boyama

Yapılan nekropsi sonucu histolojik değerlendirme amacıyla alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda fiksasyon amaçlı 24 saat süreyle bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra doku örnekleri çeşme suyunda yıkandı ve dereceleri artan alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Dehidratasyon sonrası dokular ksilolde şeffaflaştırılıp parafin bloklara gömüldü. Her bloktan Leica RM 2245 mikrotomu (Leica Biosystems, Germany) kullanılarak 5 µm'lik kalınlığında alınan kesitler normal lamlara aktararak hematoksilen- eozin (H&E) ile boyandı. Histopatolojik olarak kesitler nekrotik ve dejeneratif değişiklikleri görüntülemek için ışık mikroskopunda (Olympus BX-51) incelendi ve tipik histopatolojik bulgulara ait fotoğraflar kaydedildi (MC170 HD, Leica, Almanya).

Tablo 3.1. Doku takip protokolü

Sıra	İşlem	Süre
Fiksatiften Uzaklaştırma	Çeşme suyu	1 gece
Dehidratasyon	%60'lik Alkol	1 Saat
	%70'lik Alkol	1 Saat
	%80'lik Alkol	1 Saat
	%96'lik Alkol	1 Saat
	%100'lik Alkol	1 Saat
Şeffaflaştırma	Ksilol I	1 Saat
	Ksilol II	1 Saat
Bloklama	Parafin I	1 Saat
	Parafin I	1 Saat

3.4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Ratlarda, beynin SN bölgesinde GFAP, TNF- α ve nNOS ekspresyonları immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analizler için ayrılan

bloklardan adhezivli (poly-L-Lysin) lam üzerine 5 µm kalınlığında kesitler alınarak 56 °C'lik etüvde bir gece boyunca bekletildi. İnkübasyon sonrası lamlar 2 kez 5 dk süre ile ksilolde bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirilerek deparafinize edildi. Antijenik yapıların antikora karşı yanıt oluşturabilmesi için kesitler %10 sitratlı tampon solüsyonunda (pH = 6.0) 700 watt'ta 5 dk süre ile kaynatıldı. Tüm kesitler 20 dk oda sıcaklığında soğutuldu ve sonrasında fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS; pH 7.4) ile 3 defa 5 dk süre ile yıkandı. Yıkamayı takiben %3'lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit)'te 10 dk. bekletilerek endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı ve ardından tekrar PBS ile 3 defa 5 dk süre ile yıkandı. İlgili olmayan antikor komplekslerini uzaklaştırmak için 5 dk süre ile UV bloklama solüsyonunda (Scytek AAA125) bekletildi ve 1/400 oranında sulandırılmış primer antikorlar (Anti- GFAP, Anti-TNF-α, Anti- nNOS; sırasıyla Cat no: sc-33673, sc-52746, sc-5302 Santa Cruz, USA) örneklerin üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak uygun nem koşulları sağlanan etüvde bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 3 kere 5 dk süre boyunca PBS ile yıkanarak 1/400 oranında sulandırılmış sekonder antikorlar (ab64259, Abcam, Cambridge, UK) ile oda ısısında 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında tekrar 3 kere 5 dk süre boyunca PBS ile yıkanarak streptavidin-biotin peroksidaz (ab64259, Abcam, Cambridge, UK) kompleksine 20 dk boyunca maruz bırakıldı. Tekrar yıkama sonrası (3x5 dk PBS) kesitlere diaminobenzidine (DAB) kromojen (ab64238, Abcam, Cambridge, UK) damlatılarak kahverengi renk oluşumu görüldü. Ardından distile su ile yıkama yapıp, Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Kesitler musluk suyu ile yıkandı, artan alkol (%70, %80, %96 ve %100'lük) ve ksilol serilerinden geçirilerek lamlar entallen ile kapatıldı. Tüm kesitlerin aynı şartlarda ve prosedürde boyanmasından sonra dokulardaki ekspresyon yoğunlukları ışık mikroskopunda (Leica DM 1000)

değerlendirildi. Kesitler immunpozitifliklerine göre yok (-), çok hafif (+), hafif (++), orta (+++) ve şiddetli (++++) olarak değerlendirildi.

3.5. Gen İfade Düzeylerinin İncelenmesi

3.5.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Texas, ABD) kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapıldı. Ratların beyin bölgesinden çıkarılan SN dokusundan 20 mg tartılarak içerisinde 1 adet steril çelik bilye bulunan 2 ml'lik ependorf tüpe konuldu ve 700 µl Buffer + 10 µl β-mercaptoethanol (β-ME) solüsyonu eklenerek Tissue Lyse homojenizatör cihazı ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatant 3 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilerek üzerine 650 µl %80'lik etanol eklendi ve pipetle karıştırıldı. Sonrasında süpernatantın 650 µl'si kolonlara (RNeasy mini spin colon 2 ml) yüklendi, 1 dk 10.000g'de santrifüj edildi ve alttaki toplama tüpünde kalan süzöntü döküldü. Süpernatant tekrar kolonlara yüklendi ve 500 µl Wash buffer eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirilerek kolonlara (RNeasy mini spin colon) 70 µl DNase I Digestion karışımı eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Sonrasında kolon üzerine 500 µl inhibitör removal tampon eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirildi, kolonlara 500 µl Wash buffer eklenerek 1 dk 10.000 g'de santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü döküldü ve kuruması için 1 dk 10.000 g'de santrifüj edildi. Kolon yeni ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklendi ve 1 dk 10.000 g'de santrifüj edildi. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80° C de saklandı.

3.5.2. RNA Saflığının Belirlenmesi ve Konsantrasyon Hesaplanması

cDNA sentezine başlamak için elde edilen RNA miktarı 260-280nm dalga boyunda nano drop spektrofotometri (Biotek, EPOCH Take3) cihazı kullanılarak optik dansite ölçüldü. Saflık değerleri 1,8 civarı olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

3.5.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lar cDNA sentez işlemi için kullanıldı. Her bir reaksiyon için her bir kuyuya RNA (10 ng) koyularak 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) ile aşağıdaki koşullar sağlanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA konsantrasyonu nano drop spektrofotometri (Biotek, EPOCH Take3) kullanılarak ölçüldü ve cDNA kullanılacağı zamana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.2. Primer miks

Ürün	Miktar
RNA	7 µl
dNTP Miks	1 µl
Oligo-dT Primer (40 µM)	1 µl
Nuclease-free water	1 µl
Toplam Miktar	10 µl

0.2 ml'lik PCR tüpünde hazırlanan primer miks Thermal Cyclers' da 5 dk. 65 °C'de inkübe edilip, hemen buzun içine koyulup 2 dk bekletildi.

Tablo 3.3. cDNA sentez miksi

Ürün	Miktar
10X Buffer M-MuLV	2 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase	0.1 µl
Nuclease-free water	7.9 µl
Toplam Miktar	10 µl

RNA içeren primer miksinin üzerine, 10 µl'lik cDNA sentez miksi eklenip, pipetaj yapılmıştır. Daha sonra Thermal Cycler' da 42°C'de 60 dk ardından 85°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Toplamda 20 µl olan cDNA real time PCR reaksiyonu için hazır hale getirildi.

3.5.4. Real Time PCR kullanılarak D1 ve D2 Reseptör Ekspresyonunun Ölçülmesi

Rat SN dokularındaki D1 ve D2 reseptör ekspresyonu Roche cihazı ile ölçüldü. D1 ve D2 genlerinin primer problemleri Primer Design Ltd. firmasından satın alındı. D1 ve D2 ekspresyon sonuçları değerlendirilmesi β-actin ile karşılaştırılarak rölatif kat uygulamasına göre yapıldı.

Tablo 3.4. D1 ve D2 primerlerinin dizileri

Gen	No	Oligonükleotid Dizisi
D1		Sense: AACTGTATGGTGCCCTTCTGTGG Anti-Sense: CATTCGTAGTTGTTGTTGCCCG
D2		Sense: CACTCCGCCACTTCTTGACATACA Anti-Sense: TCTCCTCCGACACCTACCCCGA

Real-Time PCR için toplam Tablo 3.5'de görülen 25 µl reaksiyonu miksi hazırlandı.

Tablo 3.5. Real-Time PCR için miks içeriği

Ürün	Miktar
DNTPs mix	1 µl
Master Miks 1	6 µl
Master Miks 2	6 µl
1X Vi Buffer	1.25
cDNA	5 µl
RNase free H ₂ O	5.75 µl
Toplam	25 µl

Elde edilen cDNA'lar buz kalıbının üzerinde tutularak her örnekten 5 µl alınarak PCR tüpüne konuldu. Üzerine master miks 1 ve 2'den eşit olarak 6 µl hacminde ilave edildi. Devamında 1X Vi Buffer ve DNTP karışımı ilave edildikten sonra 25 µl hacmi elde edebilmek için geri kalan hacmi RNase free H₂O tamamlandı. PCR'a konulan tüpler 5 dk 95 kaldıktan sonra 45 siklus uygulandı ve PCR sonlandırdı.

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler IBM 20.00 SPSS paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlarımız Tukey veya LSD posthoc testleri ile birlikte one-way ANOVA testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Histopatolojik değerlendirmede elde edilen veriler semikantitatif olarak değerlendirildi. Herbir doku örneğinde 6 farklı alanın ortalama boyanma yoğunluğu dikkate alınarak skorlama işlemi yapıldı. İmmün pozitif ve immün negatif boyama özelliklerine göre; çok az ya da yok ise yok (-), çok hafif (+), hafif (++) , orta (+++) ve şiddetli (++++) şeklinde belirlendi.

4. BULGULAR

Çalışmada elde edilen bulgular apomorfinle indüklenen rotasyon, silindir ve lokomotor aktivitemetre testi, histolojik parametreler ve gen ifade düzeyleri ana başlıkları altında ele alındı.

4.1. Davranışsal Testler

Bu başlık altında apomorfinle indüklenen rotasyon, silindir ve lokomotor aktivitemetre testi sonuçları değerlendirildi.

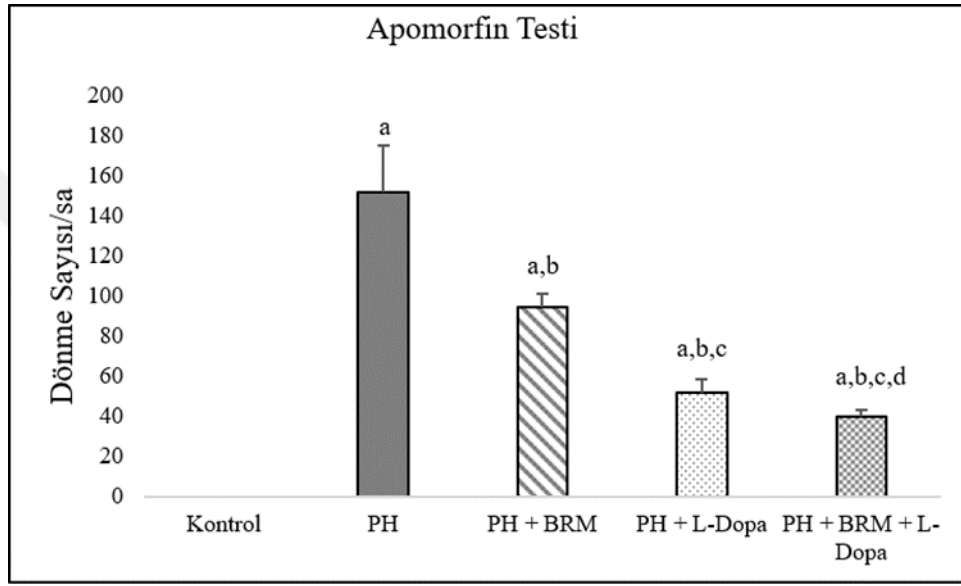
4.1.1. Apomorfinle İndüklenen Rotasyon Testi Sonuçları

Apomorfinle indüklenen rotasyon test sonuçları Şekil 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir. Ratlara 0.5 mg/kg apomorfin subkutan olarak uygulanmış ve kontralateral dönme hareketleri sayılarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda kontralateral ya da ipsilateral yönde herhangi bir dönüş gözlenmedi. PH grubunda kontralateral dönme sayısı kontrol grubuna göre artış gösterdi (0’dan yaklaşık 152/saat). PH+L-Dopa grubunda PH’ye bağlı kontralateral dönmenin anlamlı olarak azaldığı gözlendi (yaklaşık 152/sa’dan 52/sa’ye, $p<0.001$). BRM’nin yalnız başına uygulandığı PH grubunda L-Dopa uygulanan PH grubundaki kadar olmasa da kontralateral dönme sayısının anlamlı olarak azaldığı gözlendi (152/sa’dan 95/sa’ye, $p<0.001$). BRM ve L-Dopa kombinasyonunun birlikte uygulandığı PH grubunda kontralateral dönme sayısının yalnızca L-Dopa uygulanan PH grubunda gözlenen 52/sa’dan yaklaşık 36/sa’ye düştüğü, bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaştığı görüldü ($p=0.039$).

Tablo 4.1. Apomorfinle indüklenen rotasyonel test

	Gruplar				
	Kontrol	PH	PH+BRM	PH+L-Dopa	PH+BRM+L-Dopa
Apomorfinle indüklenen rotasyonel test	0,0±0,0	151,8±25,4 ^a	94,5±7,6 ^{ab}	51,7±7,5 ^{abc}	36,2±1,3 ^{abcd}

Sonuçlar ortalama ± SS olarak verilmiştir. SS: Standart Sapma (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı, p<0.001)



Şekil 4.1. Apomorfinle indüklenen rotasyonel test sonuçları (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı, p<0.001).

4.1.2. Silindir Testi Sonuçları

Silindir testi sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Silindir testinde hayvanların dikeme hareketi sırasında her iki pençesini kullanma oranı kontrol grubunda %69,91 iken, PH grubunda %14,3’ e düşmüştür. L-Dopa uygulanan PH grubunda bu değer %14,3’den %39,53’e yükseldiği görülmektedir. BRM uygulanan PH grubunda ise iki pençe birlikte kullanma yüzdesi L-Dopa kadar olmasa da %14,3’den % 22,74’e yükselmiştir. BRM ve L-Dopa’nın kombinasyon formunun uygulandığı PH grubunda ise sadece L-Dopa verilen PH grubundaki iki pençe birlikte kullanma yüzdesinin

%39,53'den %49,18'e yükseldiği, yani BRM'nin L-Dopa'nın iki pençe birlikte yüzdesi üzerine etkisini artırdığı görülmektedir.

Silindir testinde hayvanların dikelme hareketi sırasında ipsilateral pençe yüzdesi kullanma oranı kontrol grubunda %18,51 iken, PH grubunda %70,28'e yükselmiştir. L-Dopa uygulanan PH grubunda bu değer %70,28'den %42,22'e düştüğü görülmektedir. BRM uygulanan PH grubunda ise ipsilateral pençe kullanma yüzdesi L-Dopa kadar olmasa da %70,28'den %56,14'e düşmüştür. BRM+L-Dopa'nın birlikte kullanıldığı PH grubunda ise sadece L-Dopa uygulanan PH grubundaki ipsilateral pençe kullanma yüzdesinin %42,22'den %36,22'e düşürdüğü, yani BRM'nin L-Dopa'nın ipsilateral pençe kullanma yüzdesi üzerine etkisini artırdığı görülmektedir.

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi ipsilateral pençe kullanma yüzdesi ve iki pençe birlikte kullanma yüzdesi PH'den etkilenmekte, L-Dopa kullanılması bu etkilenmeyi belirgin bir şekilde azaltmakta, BRM'in yalnız uygulanması bu etkilenmeyi hafifletmekte, BRM+L-Dopa'nın birlikte uygulanması ile bu etkilenme çok daha fazla bir şekilde önlenmekte, yani BRM'nin L-Dopa'nın etkisini artırdığı görülmektedir.

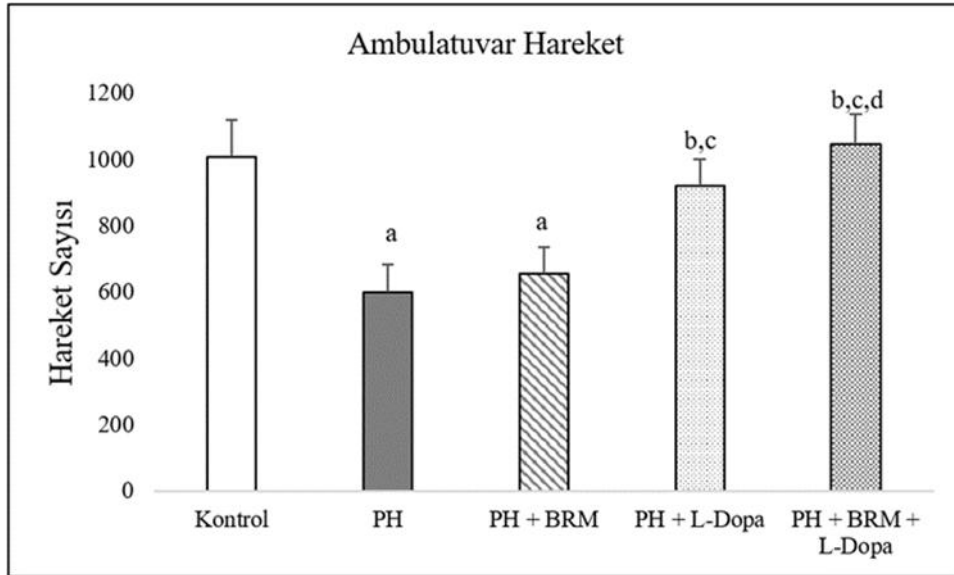
Tablo 4.2. Silindir testi kontralateral, ipsilateral ve her iki pençeyi birlikte kullanım yüzdesi

Gruplar	Kontralateral pençe yüzdesi	İpsilateral pençe yüzdesi	İki pençe birlikte yüzdesi
Kontrol	11,58	18,51	69,91
PH	15,42	70,28	14,3
PH+BRM	21,12	56,14	22,74
PH+L-Dopa	18,25	42,22	39,53
PH+BRM+L-Dopa	14,6	36,22	49,18

4.1.2. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçları

Lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için; ambulatuvar, vertikal, horizontal aktivite, dinlenme süresi ve katedilen mesafe olmak üzere 5 parametre değerlendirildi.

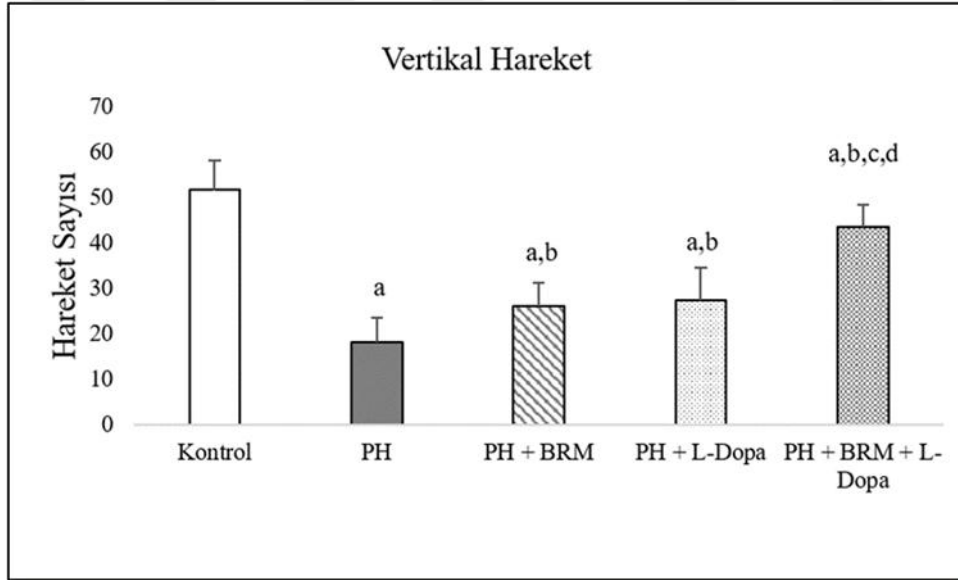
Ambulatuvar aktivite: Ambulatuvar aktivite sonuçları Şekil 4.2 ve Tablo 4.3’de verilmiştir. Ambulatuvar aktivitenin PH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$). L-Dopa uygulan PH grubunda ambulatuvar aktivite düzeyi PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı ($p=0.074$) görüldü. BRM’nin yalnız başına uygulandığı PH grubunda ambulatuvar aktivitenin PH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişmediği ($p=0.267$) gözlenirken, BRM ve L-Dopa’nın birlikte uygulandığı PH grubunda ambulatuvar aktivite düzeyi PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görüldü ($p=0.440$). PH+L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarda yapılan ikili karşılaştırmalarda; PH+BRM+L-Dopa grubunda ambulatuvar aktivite düzeyinin daha fazla olduğu ve kontrol grubu değerine daha yakın olduğu bulundu. Elde edilen sonuçlar BRM uygulanmasının PH grubuna kıyasla tek başına ambulatuvar aktivite üzerine etkili olmadığını, buna karşılık L-Dopa ile birlikte uygulandığında L-Dopa’nın ambulatuvar aktiviteyi artırıcı etkisini güçlendirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Lokomotor aktivite testinde grupların ambulatuvar aktivite sayıları (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı, $p<0.001$).

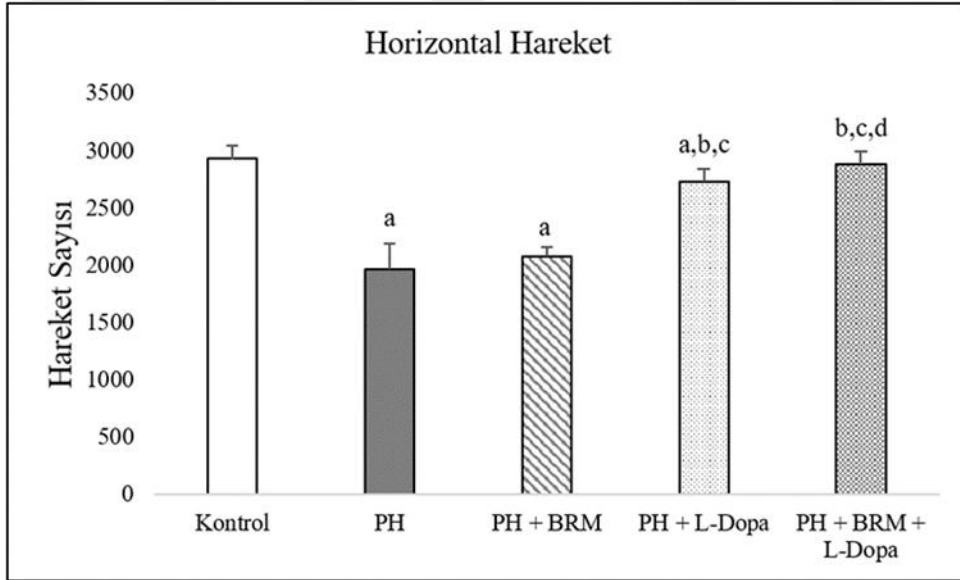
Vertikal aktivite: Vertikal aktivite sonuçları Şekil 4.3 ve Tablo 4.3’de verilmiştir.

Vertikal aktivitenin PH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$). BRM ve L-Dopa’nın yalnız başına uygulandığı PH gruplarında vertikal aktivite düzeyleri PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı (sırasıyla $p=0.018$, $p=0.008$) ve vertikal aktivitede görülen bu artışın iki grup arasında benzer olduğu bulundu ($p=0.713$). BRM ve L-Dopa’nın birlikte uygulandığı PH grubunda ise vertikal aktivite düzeyi PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) ve bu artışın PH+BRM, PH+L-Dopa gruplarına göre de daha fazla olduğu, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığa ulaştığı ($p<0.001$), aynı zamanda kontrol grubu değerine daha da yaklaştığı görüldü. Bu bulgular PH grubunda vertikal aktivitenin azaldığı, bu azalmanın hem BRM hem de L-Dopa uygulaması sonucu anlamlı olarak önlendiğini, ve L-Dopa ile birlikte verildiğinde BRM’nin L-Dopa’nın PH’de azalmış olan vertikal aktivitedeki azalmayı önleyici etkisini belirgin bir şekilde artırdığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Lokomotor aktivite testlerinde grupların vertikal aktivite sayıları (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı)

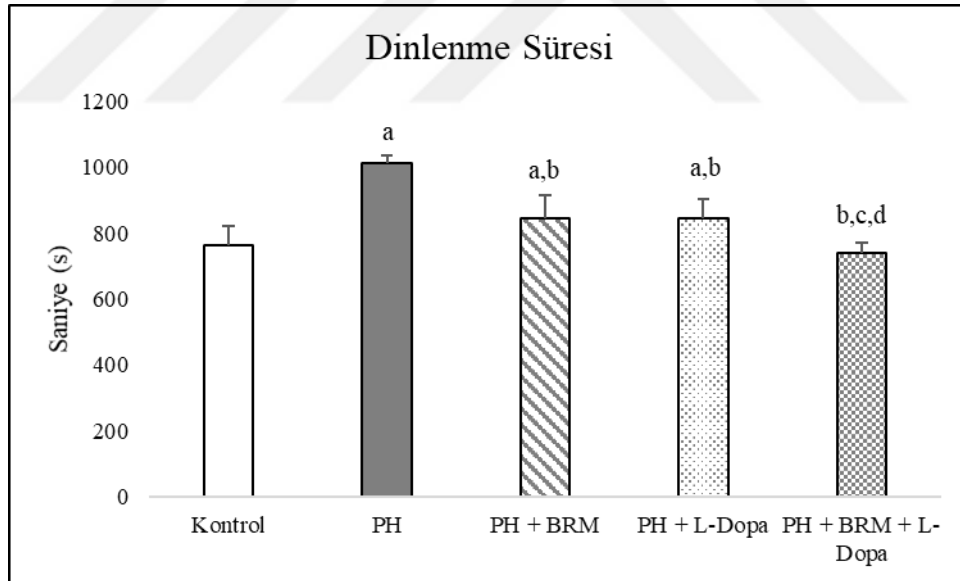
Horizontal aktivite: Horizontal aktivite sonuçları Şekil 4.4 ve Tablo 4.3’de verilmiştir. Horizontal aktivitenin PH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$). L-Dopa uygulanan PH grubunda horizontal aktivite düzeyi PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) bulunurken, BRM uygulanan PH grubunda ise horizontal aktivitenin PH grubu değerlerine benzer olduğu görüldü ($p=0.152$). BRM ve L-Dopa kombinasyonunun uygulandığı PH grubunda horizontal aktivite düzeyi PH grubuna göre artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel anlamlılığa ulaştığı görüldü ($p<0.001$). PH+L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarda yapılan ikili karşılaştırmada; PH+BRM+L-Dopa grubunda horizontal aktivite düzeyinin daha fazla olduğu ($p=0.039$) ve kontrol grubu değerine benzer olduğu görüldü ($p=0.583$). Bu sonuçlar BRM uygulamasının PH grubuna kıyasla tek başına horizontal aktivite üzerine etkili olmadığını, buna karşılık L-Dopa ile birlikte verildiğinde L-Dopa’nın horizontal aktiviteyi artırıcı etkisini güçlendirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.4. Lokomotor aktivite testlerinde grupların horizontal aktivite sayıları (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı)

Dinlenme süresi: Dinlenme süresi sonuçları Şekil 4.5 ve Tablo 4.3’de verilmiştir.

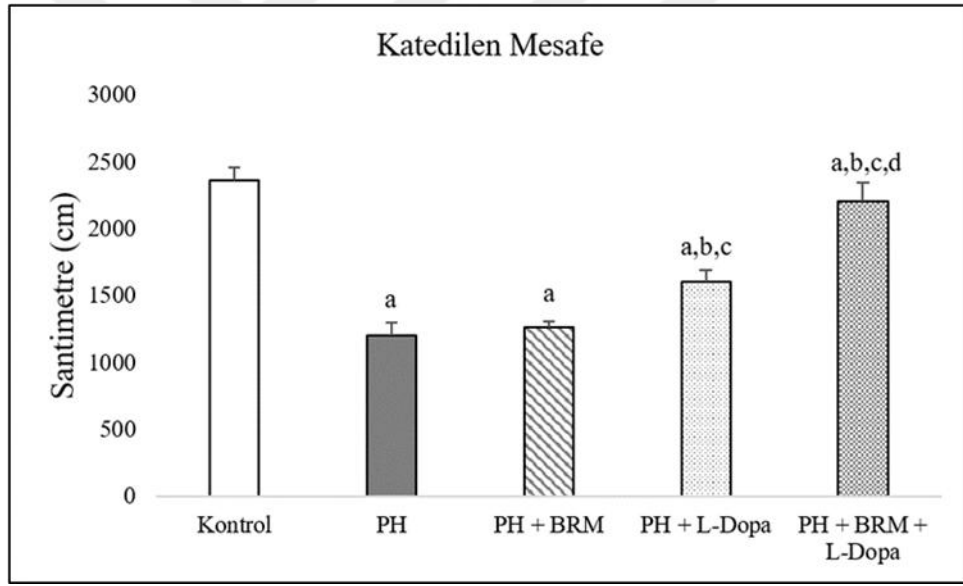
Dinlenme süresinin PH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p<0.001$). BRM ve L-Dopa’nın yalnız başına uygulandığı PH gruplarında dinlenme süresinin PH grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) ve bu azalışın iki grup arasında benzer olduğu bulundu ($p=0.999$). BRM ve L-Dopa’nın birlikte uygulandığı PH grubunda ise dinlenme süresinin PH grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) ve bu azalışın PH+BRM, PH+L-Dopa gruplarına göre daha fazla olduğu, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığa ulaştığı ($p<0.001$), aynı zamanda kontrol grubu değerine daha da yaklaştığı görüldü ($p=0.398$). Bu veriler PH grubunda dinlenme süresini uzadığı, bu uzamanın hem BRM hem de L-Dopa uygulaması sonucu azaldığı, BRM’nin L-Dopa’nın dinlenme süresindeki azaltıcı etkisini daha da artırarak L-Dopa’nın etkisini güçlendirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. Lokomotor aktivite testinde grupların dinlenme süreleri (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı)

Katedilen mesafe: Katedilen mesafe sonuçları Şekil 4.6 ve Tablo 4.3’de verilmiştir. Katedilen mesafenin PH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$). L-Dopa uygulana PH grubunda katedilen mesafe düzeyinin

PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) bulunurken, BRM uygulanan PH grubunda ise katedilen mesafenin PH grubuna göre değişmediği bulundu ($p=0.307$). BRM ve L-Dopa kombinasyonunun uygulandığı PH grubunda katedilen mesafe düzeyinin PH grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.001$). PH+BRM+L-Dopa grubunda katedilen mesafenin PH+L-Dopa grubuna göre daha fazla olduğu ($p<0.001$) ve kontrol grubu değerine daha yakın olduğu bulundu. Bu bulgular PH grubunda katedilen mesafenin azaldığı, BRM uygulamasının bu katedilen mesafedeki azalma üzerine etkisinin olmadığı, buna karşılık L-Dopa'nın PH grubuna göre katedilen mesafedeki bu azalmayı önlediği; BRM yalnız başına katedilen mesafe üzerine etkili olmadığı halde, L-Dopa ile birlikte verildiğinde L-Dopa'nın etkisini artırdığını göstermektedir.



Şekil 4.6. Lokomotor aktivite testinde grupların katettikleri toplam mesafeler (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı)

Tablo 4.3. Ambulatuvar, vertikal, horizontal aktivite, dinlenme süresi ve katedilen mesafe

	Gruplar				
	Kontrol	PH	PH+BRM	PH+L-Dopa	PH+BRM+L-Dopa
Ambulatuvar Aktivite	1010,8±110,4	602,2±82,5 ^a	656,3±81,1 ^a	922,3±81,5 ^{bc}	1048,3±88,9 ^{bcd}
Vertikal Aktivite	51,7±6,4	18,3±5,2 ^a	26,2±5,2 ^{ab}	27,3±7,2 ^{ab}	43,5±5,1 ^{abcd}
Horizontal Aktivite	2929,5±120,1	1965,8±224,8	2074,6±85,1	2728,7±114,1	2888,3±104,1
Dinlenme Süresi	762,6±60,8	1013,4±22,0	846,0±70,1	846,1±57,1	738,9±31,6
Katedilen Mesafe	2362,7±97,1	1210,8±89,5	1264,9±45,4	1608,5±90,2	2210,6±140,3

Sonuçlar ortalama ± SS olarak verilmiştir. SS: Standart Sapma (^aKontrol, ^bPH, ^cPH+BRM, ^dPH+L-Dopa grubuna göre istatistiksel olarak farklı)

4.2. Histolojik Parametreler

4.2.1. Histopatolojik Değerlendirme

Çalışmamızda histopatolojik değerlendirmeler deney hayvanlarında SN bölgesinde H-E boyama yöntemi kullanılarak yapıldı.

Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7. A).

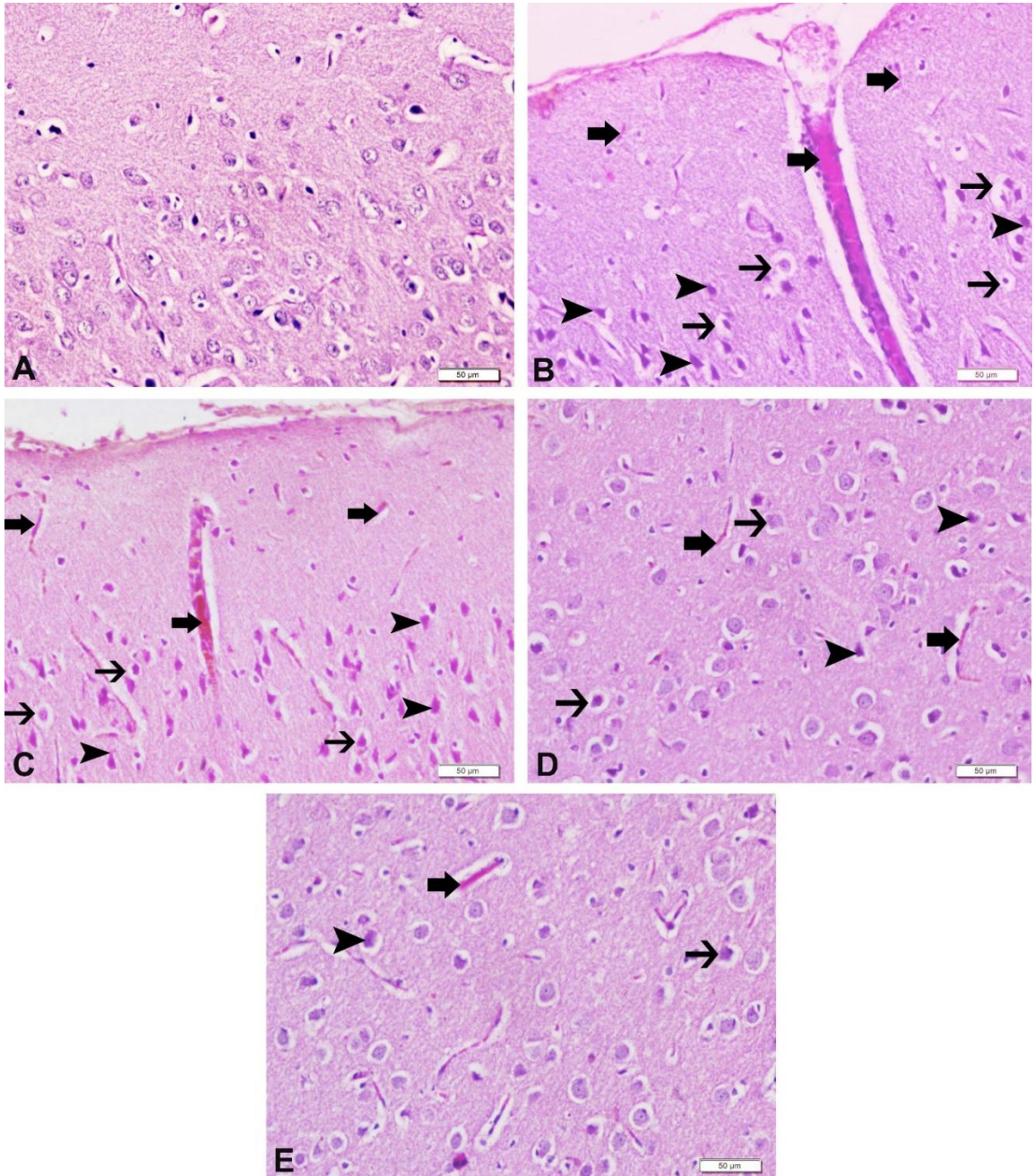
PH grubu: Kontrol grubuna ait kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, meninjal ve paranşimal damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.7. B).

PH+BRM grubu: BRM uygulanan PH grubuna ait kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, nöronlarda orta düzeyde yozlaşma ve nekroz, damarlarda hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.7. C).

PH+L-Dopa grubu: L-Dopa uygulanan PG grubuna ait kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon ve nekroz, meninjal ve paranşimal damarlarda hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.7. D).

PH+BRM+L-Dopa grubu: BRM ve L-Dopa kombinasyonu uygulanan PH grubuna ait kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, nöronlarda hafif düzeyde

dejenerasyon ve nekroz, paransim ve meningeal damarlarda çok hafif düzeyde hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.7. E). Histopatolojik bulgular Tablo 4.4’de özetlendi.



Şekil 4.7. Kontrol grubu; normal histolojik yapıda (A), **PH grubu;** şiddetli düzeyde nöronlarda dejenerasyon (ince oklar), nekroz (ok başları), damarlarda hiperemi (kalın oklar) (B), **PH+BRM grubu;** orta şiddette nöronlarda dejenerasyon (ince oklar), nekroz (ok başları), damarlarda hiperemi (kalın oklar) (C), **PH+L-Dopa grubu;** hafif düzeyde nöronlarda dejenerasyon (ince oklar), nekroz (ok başları), damarlarda hiperemi (kalın oklar) (D), **PH+BRM+ L-Dopa grubu;** çok hafif düzeyde nöronlarda dejenerasyon (ince oklar), nekroz (ok başları), damarlarda hiperemi (kalın oklar) (E), **H&E, Bar: 50 µm.**

4.2.1. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

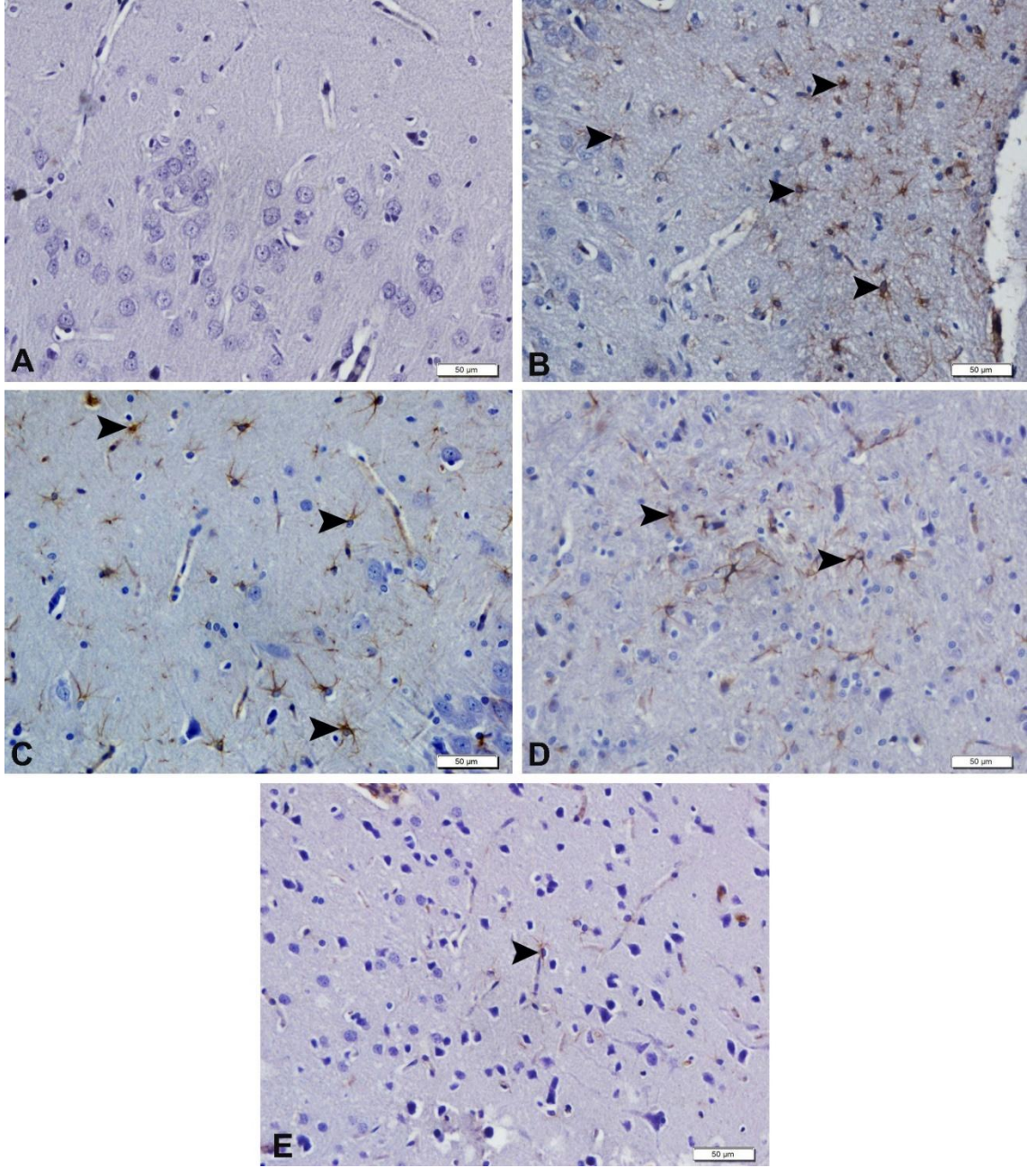
Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait kesitler immunhistokimyasal olarak incelendiğinde, negatif GFAP, TNF- α ve nNOS ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.8A, 4.9A, 4.10A).

PH grubu: PH grubuna ait kesitler immunhistokimyasal olarak incelendiğinde, astrositlerde şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.8 B). Meningeal ve parankimal damarların çevrelerinde şiddetli düzeyde TNF- α ekspresyonu görüldü (Şekil 4.9 B). Nöronlarda şiddetli düzeyde sitoplazmik nNOS ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.10 B).

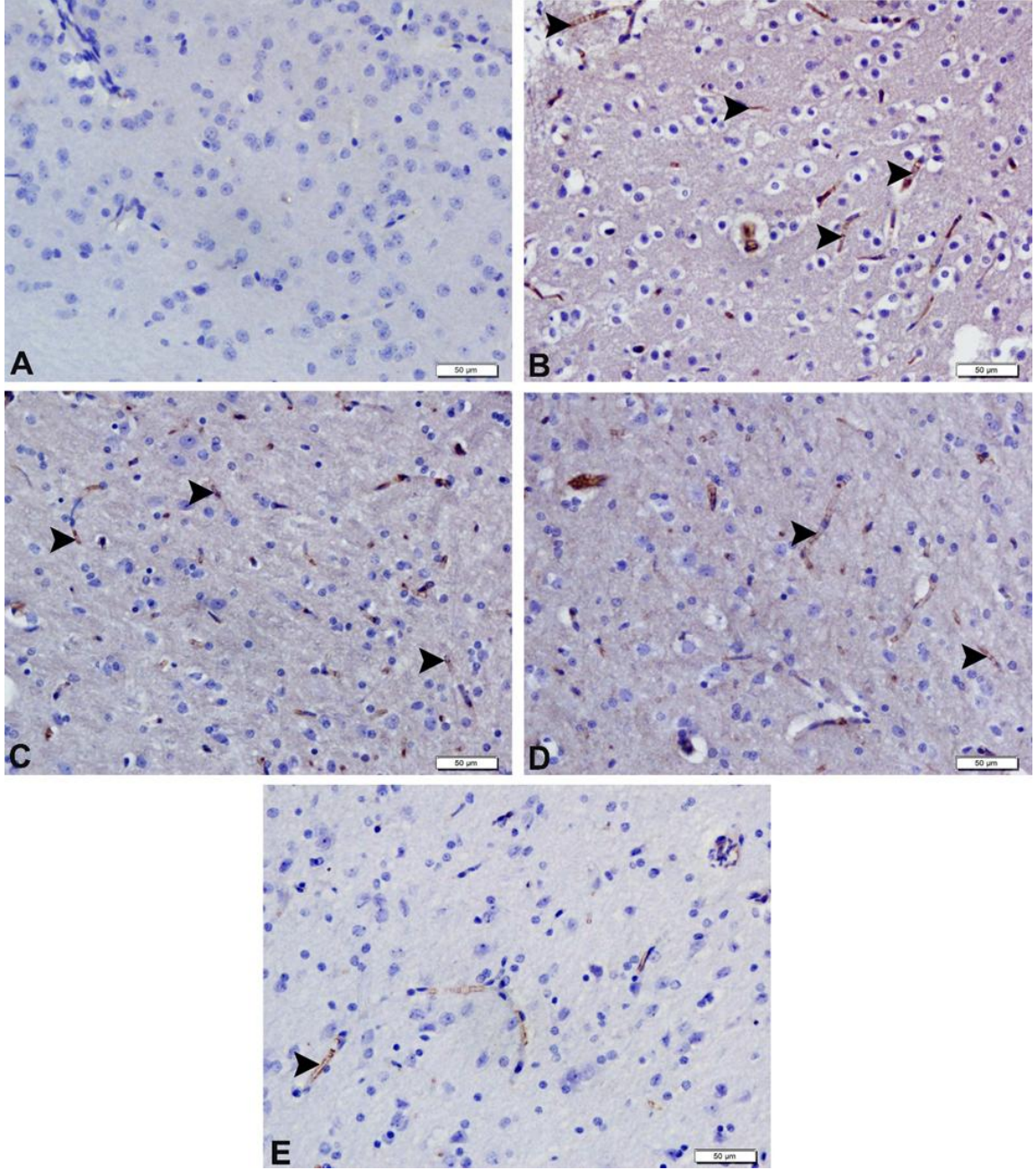
PH+BRM grubu: BRM uygulanan PH grubuna ait kesitler immunhistokimyasal yöntemle incelendiğinde astrositlerde orta düzeyde GFAP ekspresyonu (Şekil 4.8 C), meningeal ve parankimal damarlarda orta düzeyde TNF- α ekspresyonu (Şekil 4.9 C), nöronlarda orta düzeyde nNOS ekspresyonu (Şekil 4.10 C) tespit edildi.

PH+L-Dopa grubu: L-Dopa uygulanan PH grubuna ait kesitler immunhistokimyasal yöntemle incelendiğinde, astrositlerde hafif düzeyde GFAP ekspresyonu (Şekil 4.8 D), hafif düzeyde perivasküler lokalizasyonlu TNF- α ekspresyonu (Şekil 4.9 D) nöronlarda hafif düzeyde nNOS ekspresyonu (Şekil 4.10 D) gözlemlendi.

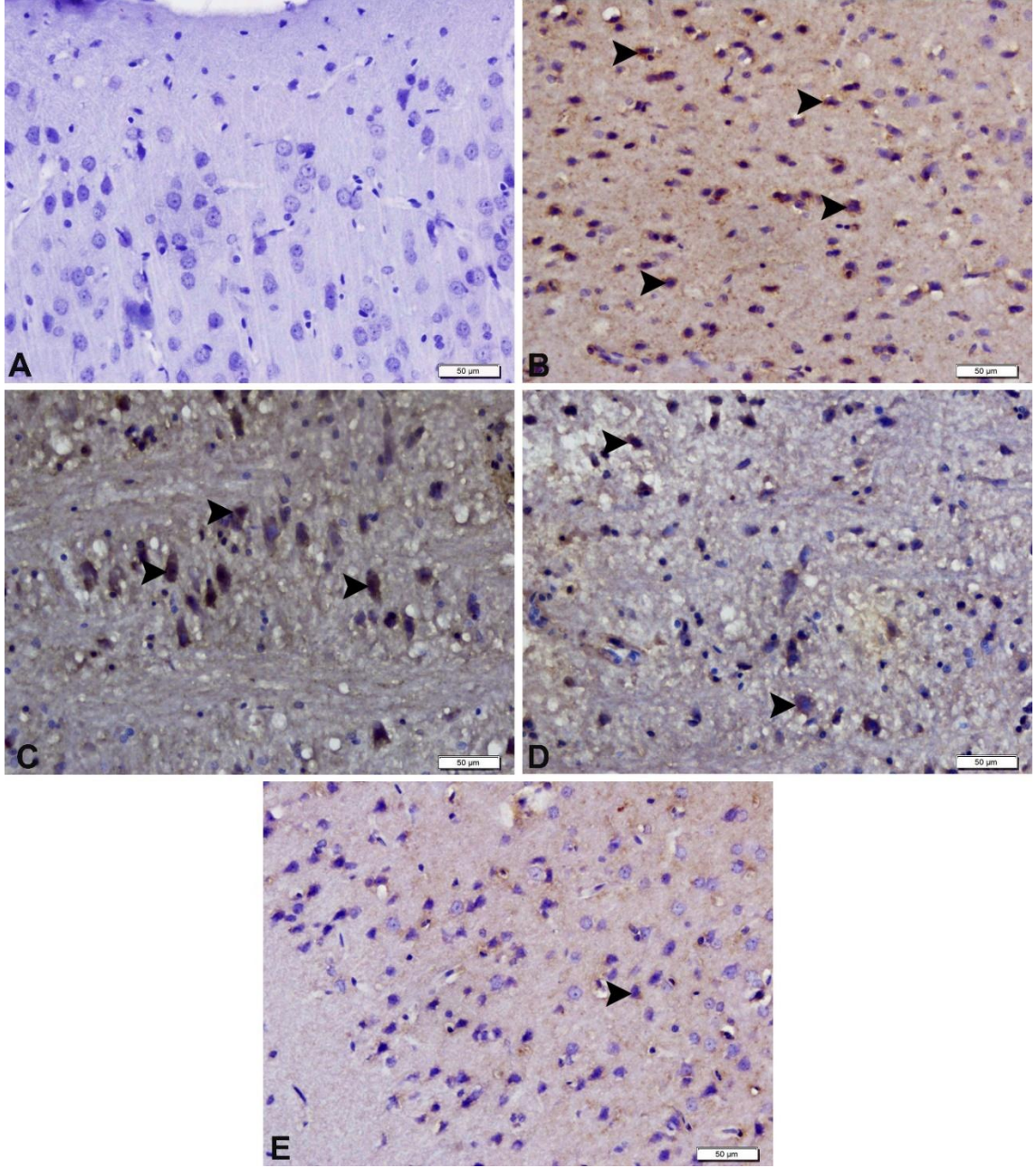
PH+BRM+L-Dopa grubu : BRM ve L-Dopa kombinasyonu uygulanan PH grubuna ait kesitler immunhistokimyasal yöntemle incelendiğinde, astrositlerde çok hafif düzeyde GFAP ekspresyonu (Şekil 4.8 E), çok hafif düzeyde perivasküler lokalizasyonlu TNF- α ekspresyonu (Şekil 4.9 E).nöronlarda çok hafif düzeyde sitoplazmik nNOS ekspresyonu (Şekil 4.10 E) belirlendi. İmmünpozitiflik açısından yapılan semikantitatif değerlendirmeler Tablo 4.4' de özetlendi.



Şekil 4.8. Kontrol grubu, negatif GFAP ekspresyonu (A), **PH grubu,** astrositlerde şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu (ok başları) (B), **PH+BRM grubu,** astrositlerde orta şiddette GFAP ekspresyonu (ok başları) (C), **PH+L-Dopa grubu,** astrositlerde hafif düzeyde GFAP ekspresyonu (ok başları) (D), **PH+BRM+L-Dopa grubu,** astrositlerde çok hafif düzeyde GFAP ekspresyonu (ok başları) (E), **H&E, Bar: 50 µm.**



Şekil 4.9. Kontrol grubu, negatif TNF- α ekspresyonu (A), **PH grubu,** şiddetli düzeyde perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (B), **PH+BRM grubu,** orta şiddette perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (C), **PH+L-Dopa grubu,** hafif düzeyde perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (D), **PH+BRM+L-Dopa grubu,** çok hafif düzeyde perivasküler TNF- α ekspresyonu (ok başları) (E), **H&E, Bar: 50 μ m.**



Şekil 4.10. Kontrol grubu, negatif nNOS ekspresyonu (A), **PH grubu,** nöronlarda şiddetli düzeyde nNOS ekspresyonu (ok başları) (B), **PH+BRM grubu,** nöronlarda orta şiddette nNOS ekspresyonu (ok başları) (C), **PH+L-Dopa grubu,** nöronlarda hafif düzeyde nNOS ekspresyonu (ok başları) (D), **PH+BRM+L-Dopa grubu,** nöronlarda çok hafif düzeyde nNOS ekspresyonu (ok başları) (E), **H&E, Bar: 50 µm.**

Tablo 4.4. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirmenin Skorlanması

	Kontrol	PH	PH+BRM	PH+L- Dopa	PH+BRM+LDopa
Nöronlarda dejenerasyon	-	++++	+++	++	+
Nöronlarda nekroz	-	++++	++	+	-
Damarlarda hiperemi	-	++++	+++	+++	++
GFAP ekspresyonu	-	++++	+++	++	+
TNF-α ekspresyonu	-	++++	+++	++	+
nNOS ekspresyonu	-	++++	+++	++	+

Histopatolojik HE ile yapılan boyama sonuçlarında; kontrol grubunda nöronlarda dejenerasyon, nöronlarda nekroz ve damarlarda hiperemi yok (-); PH grubunda nöronlarda dejenerasyon, nöronlarda nekroz ve damarlarda hiperemi şiddetli (++++); PH+BRM grubunda nöronlarda dejenerasyon orta (+++), nöronlarda nekroz hafif (++) ve damarlarda hiperemi orta (+++); PH+L-Dopa grubunda nöronlarda dejenerasyon hafif (++) , nöronlarda nekroz hafif (+) ve damarlarda hiperemi orta (+++); PH+BRM+L-Dopa grubunda ise nöronlarda dejenerasyon çok hafif (+), nöronlarda nekroz yok (-) ve damarlarda hiperemi hafif (++) olarak belirlendi.

GFAP antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarında; kontrol immün negatif (-), PH şiddetli immünpozitiflik (++++), PH+BRM orta (+++), PH+L-Dopa hafif (++) , PH+BRM+L-Dopa grubunda ise çok hafif immünpozitiflik (+) belirlendi (Şekil 4.8.).

TNF- α antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarında; kontrol immün negatif (-), PH şiddetli immünpozitiflik (++++), PH+BRM orta (+++), PH+L-Dopa hafif (++) , PH+BRM+L-Dopa grubunda ise çok hafif immünpozitiflik (+) belirlendi (Şekil 4.9.).

nNOS antikoru ile yapılan boyama sonuçlarında; kontrol immün negatif (-), PH şiddetli immünpozitiflik (++++), PH+BRM orta (+++), PH+L-Dopa hafif (++) , PH+BRM+L-Dopa grubunda ise çok hafif immünpozitiflik (+) izlendi (Şekil 4.10.).

4.3. Gen İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Bu başlık altında deney hayvanlarının beyin dokularında SN bölgesinde D1 ve D2 reseptör gen ifade düzeyleri değerlendirildi.

D1 Reseptör Gen İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi

D1 reseptör gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.5’de verilmiştir. Kontrol grubu deney hayvanlarının SN bölgesinde elde edilen D1 reseptör ekspresyon seviyesi sonucu 1 olarak kabul edildi. PH, PH+BRM, PH+ L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarından elde edilen veriler ise ayrı ayrı kontrol grubu verilerine göre oranlanarak değerlendirildi. PH ve BRM uygulanan PH grubunda D1 reseptör ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre daha az olduğu fakat aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). L-Dopa ve BRM ve L-Dopa kombinasyonlarının birlikte uygulandığı PH gruplarında D1 reseptör ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre sırasıyla 3 ve 4 kat arttığı bulundu ($p<0.001$). D1 reseptör ekspresyon düzeylerine bakıldığında PH grubunda D1 reseptör düzeyini istatistiksel anlamlılığa erişmese de bir miktar azaldığı, BRM uygulamasının bu azalmayı kısmen önlediği, buna karşılık PH grubuna L-Dopa verilmesinin D1 reseptör miktarını 3 kat arttırdığı, L-Dopa’nın BRM ile birlikte verilmesinin ise D1 reseptör seviyesini L-Dopa’nın etkisini güçlendirerek 4 katına çıkardığı görülmektedir.

Tablo 4.5. D1 Reseptör Gen Ekspresyon Düzeyleri

	D1	±	SH		
Kontrol	1	±	0,06		
PH	0,8	±	0,09	▼	
PH+BRM	0,9	±	0,08	▼	
PH+L-Dopa	3	±	0,12	▲	**
PH+BRM+L-Dopa	4	±	0,14	▲	**

Kontrol grubuna göre; * (p<0.05), ** (p<0.001). Sonuçlar ortalama ± SH olarak verilmiştir. SH: Standart hata

D2 Reseptör Gen İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi

D2 reseptör gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.6’de verilmiştir. Kontrol grubu deney hayvanlarının SN bölgesinde elde edilen D2 reseptör ekspresyon seviyesi sonucu 1 olarak kabul edildi. PH, PH+BRM, PH+ L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarından elde edilen veriler ise ayrı ayrı kontrol grubu verilerine göre oranlanarak değerlendirildi. PH ve BRM uygulanan PH gruplarında D2 reseptör ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre sırasıyla 4,5 ve 3,2 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.001). L-Dopa’nın tek başına ve BRM ve L-Dopa kombinasyonlarının birlikte uygulandığı PH gruplarında D2 reseptör ekspresyon seviyesinde artış olduğu görüldü fakat bu artış L-Dopa uygulanan PH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterirken (p<0.001), BRM ve L-Dopa kombinasyonunun birlikte uygulandığı PH grubunda bu artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı ve kontrol grubu değerlerine yakın düzeyde olduğu bulundu (1,4 kat, p>0.05). Bu veriler PH grubunda D2 reseptör düzeyinin belirgin bir şekilde arttığını, L-Dopa uygulanmasının bu artışı belirgin bir şekilde durdurduğunu, BRM uygulamasının da L-Dopa kadar olmasa da D2 reseptör artışını önlediğini ve BRM’nin L-Dopa’nın etkisini güçlendirerek D2 reseptör düzeyini kontrole yakın değerlere getirdiğini göstermektedir.

Tablo 4.6. D2 Reseptör Gen Ekspresyon Düzeyleri

	D2		SH		
Kontrol	1	±	0,06		
PH	4,5	±	0,06	▲	**
PH+BRM	3,2	±	0,05	▲	**
PH+L-Dopa	1,9	±	0,09	▲	*
PH+BRM+L-Dopa	1,4	±	0,28	▲	

Kontrol grubuna göre; * (p<0.05), ** (p<0.001). Sonuçlar ortalama ± SH olarak verilmiştir. SH: Standart hata



5. TARTIŞMA

PH, en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olup, bireyler zamanla günlük aktivitelerini yerine getirmede bile zorluk çeker ve yaşam kaliteleri olumsuz yönde etkilenir. Ortalama yaşam süresinin uzaması ve buna bağlı olarak yaşlı nüfus oranının giderek artması PH prevalansının tüm dünyada giderek artışına yol açmakta ve önemli bir sağlık sorunu haline gelmesine neden olmaktadır. Sosyoekonomik ve fiziksel kayıplara neden olan bu hastalığın tedavisine yönelik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır¹⁹. Günümüzde PH'nin progresyonunu tamamen önleyici bir tedavi yöntemi henüz mevcut değildir. PH tedavisi semptomatik olup tedavinin ana hedefi hastanın günlük faaliyetlerini rahat yerine getirmesini sağlayarak hastanın yaşam kalitesini artırmaktır^{70, 84}. PH tedavisinde en etkili ilaç olarak kabul gören L-Dopa hastaların yaşam kalitesini ve motor semptomları iyileştirmede diğer ilaçlara göre daha etkili olmasına rağmen tedavinin ilerleyen yıllarında görülen motor dalgalanmalar ve diskinezi önemli bir sorun teşkil etmektedir^{89, 90}. Nigrostriatal DAerjik innervasyon kaybı ile karakterize olan PH'ye ait patofizyolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, nöroinflamasyonun DAerjik nöron dejenerasyonunun başlatılmasında ve progresyonunda rol oynayan önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür²⁰⁰. L-Dopa'nın uzun süreli kullanımına bağlı olarak hastalığın patogenezinde yer alan inflamatuvar yanıtın ve toksikasyonun artışı şeklinde yan etkiler görülmektedir. Bu nedenle uygulanan tedavi yöntemlerine ek olarak PH'yi semptomatik olarak iyileştirmenin yanı sıra prognozu ve nörodejeneratif süreci değiştirmeye yönelik yeni tedavi yaklaşımları önem kazanmaktadır^{201, 202}. Günümüzde bitkilesel ürünler ve/veya bitkilerden çeşitli metodlarla elde edilen bileşikler PH'nin tedavisinde ve prognozunun iyileştirilmesinde etkili olduğu düşünülmekte ve elde edilen bu bileşikler araştırmacıların ilgi odağı haline gelmektedir. Yapılan prelinik çalışmalarda bitkisel ürünlerin ve/veya bileşiklerin tekli veya mevcut

ilaçlarla birlikte kullanımı doğrudan veya dolaylı olarak PH patogenezinde görülen inflamasyonu azaltarak hastalığın progresyonunu önleyici bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür¹¹⁷⁻¹¹⁹. Proteolitik enzim kompleksi olan BRM antiinflamatuvar özellikte ve FDA tarafından evrensel bakımından onaylanmıştır. Çeşitli prelinik ve klinik çalışmalarda etkinliği kabul edilen BRM'nin nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisini araştıran çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır^{120, 138}.

Bu tez çalışmasında; 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH modelinde hastalığın patogenezinde rol oynayan inflamasyon üzerine BRM'nin etkileri L-Dopa ile karşılaştırılmalı olarak davranış testleri, histopatolojik ve genetik bakımdan incelenmiştir.

PH ile ilişkili olarak insanlar üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı olup etik kurallar bakımından uygun değildir. Bu yüzden deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesi PH patogenezi ve progresyonunu daha iyi anlayabilmek ve PH tedavisi için olası terapötik ajanların test edilmesi bakımından oldukça avantajlıdır. Bununla birlikte PH patogenezindeki ilerleyici nörodejeneratif süreci ve klinik bulguları tam olarak yansıtan bir model bulunmamaktadır. Deney hayvanlarında 6-OHDA, MPTP, parakuat, rotenon ve maneb gibi nörotoksinlerle DAerjik nöronları dejenerasyona uğratarak PH modellemek araştırmacıların en sık kullandığı yöntemlerden bazılarıdır^{143, 151, 166}. Bu tez kapsamında ratlarda 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH modeli tercih edilmiştir. DA'nın hidrosillenmiş analogu olan 6-OHDA kan beyin bariyerini geçemediği için stereotaksik enjeksiyon ile doğrudan uygulanması gerekmektedir. 6-OHDA; SN, MFB veya striatum bölgelerine unilateral taraflı veya bilateral olarak uygulanabilir¹⁴³. Çalışmamızda 6-OHDA SN bölgesine unilateral olarak verilmiştir. Çünkü 6-OHDA'nın bilateral enjeksiyonu adipsi, afaji ve nöbetler nedeniyle deney hayvanlarında ölüme sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte unilateral modelin apomorfinle indüklenen dönme

davranışı ve silindir testini değerlendirmek açısından bilateral modele karşı üstünlüğü vardır. 6-OHDA unilateral enjeksiyonu ile oluşturulan PH modeli DAerjik lezyon büyüklüklüğünün kontrolü ve yeni farmakolojik ajanların değerlendirilmesi için diğer yöntemlere göre daha üstündür. 6-OHDA ile oluşturulan PH modelini ratlara uygulamak farelere göre daha avantajlıdır. Çünkü ratların anatomik yapısı gerek sterotaksik yöntemde gerek davranış testlerinde farelere göre daha fazla olanak tanır. 6-OHDA nörotoksinini unilateral uygulama yöntemimiz literatürde çokça kullanılmaktadır^{153, 203, 204}.

5.1. Davranışsal Değişiklikler

PH, BG ve BG'lerin bağlantılı olduğu yapıları etkileyen, DAerjik nöron dejenerasyonu sonucu istirahat tremoru, rijidite, bradikinezi ve postural instabilite gibi motor disfonksiyonların görüldüğü ekstrapiramidal sistem hastalığıdır⁵. 6-OHDA aracılı PH modeli DAerjik nöron hasarı ve ilişkili motor defisitleri incelemeye uygundur. Hassas ve güvenilir davranış testleri deneysel olarak oluşturulan PH modellerinde motor bozuklukları ve yeni potansiyel terapötikleri test etmek için kullanılmaktadır^{109, 143}. Bu çalışmada 6-OHDA ile PH modeli oluşturulan deney hayvanlarında apomorfin, silindir ve lokomotor aktivite davranışsal parametreler olarak değerlendirilmiştir.

Rotasyonel testler deneysel hayvanlar ile gerçekleştirilen PH modellerinde tek taraflı nigrostriatal DAerjik dejenerasyonu, motor defisitleri ve tedavide elde edilen başarıyı değerlendirmede kullanılmaktadır. DA agonistleri kullanılarak yapılan bu testlerde rotasyonel hareketler değerlendirilmektedir^{143, 205}. 6-OHDA uygulanmasına bağlı olarak azalan DA salınımı postsinaptik DA reseptörlerinde süpersensitiviteye yol açmaktadır. DA reseptör agonisti olan apomorfinin ratlara uygulanması sonucu denerve striatumdaki süpersensitiviteye uğrayan DA reseptörlerin aşırı uyarılmasına neden olarak kontralateral dönme hareketleri oluşmaktadır. Apomorfin ile indüklenen rotasyonel

hareketlerin gözlenebilmesi için striatal DAerjik dejenerasyonun %90 civarında olması gerekmektedir^{195, 196}. Bu çalışmada apomorfin (0.5 mg/kg) subkütan olarak tüm gruplara uygulandı. Kontrol grubunda apomorfin ile indüklenen rotasyonel hareketler gözlenmezken 6-OHDA ile unilateral lezyon oluşturulan PH grubunda kontralateral yönde rotasyon hareketlerinde belirgin artış görüldü. Bu durum DA reseptör denervasyonu ile ilişkili olup 6-OHDA enjeksiyonunun DAerjik sistemde anlamlı düzeyde hasara yol açtığını düşündürmektedir. BRM ve L-Dopa ile ayrı ayrı ve kombinasyonları ile tedavi edilen PH gruplarında rotasyonel hareketlerin PH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı ve bu azalışın PH+L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarında daha fazla olduğu görülmüştür. PH+L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarında kontralateral dönüşlerin ortalamaları arasında fark olduğu, bu farklılığın istatistiksel anlamlılık düzeyine eriştiği görüldü. Bu veriler BRM tedavisinin tek başına L-Dopa kadar etkili olmadığını, fakat tedavide etkinliği kanıtlanan L-Dopa ile birlikte uygulandığı zaman L-Dopa'nın etkinliğini güçlendirdiği görülmüştür. Bu iyileştirici etkinin DA reseptörlerinin ekspresyonlarındaki restorasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Silindir testi PH modellerinde unilateral geliştirilen SN'deki DAerjik nöron deplesyonu ve buna bağlı olarak gelişen ön pençe asimetrisini değerlendirmede kullanılmaktadır¹⁹⁸. Silindir testin apomorfin ile indüklenen rotasyonel testten farkı gelişen motor asimetrinin değerlendirilmesinde herhangi bir kimyasal ajan kullanılmaması ve DA denervasyonunu ölçmede daha hassas değerlendirme yapılmasına olanak sağlamasıdır²⁰⁶. Bu testte silindir içine yerleştirilen hayvanların rearing(dikelme) hareketinde sağ ve sol pençelerini hemen hemen eşit şekilde kullandıkları görülürken, PH modeli oluşan ratlarda lezyon oluşturulan bölgenin kontralateralindeki ön pençe kullanımının hasarın büyüklüğü ile ilişkili olarak azaldığı bildirilmiştir¹⁹⁷. Çalışmamızda

grupların kontralateral, ipsilateral ve her iki pençeyi kullanma yüzdeleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda her iki pençeyi birlikte kullanma yüzdesi yaklaşık olarak %70 olup sağa ya da sola doğru hareketini iki pençeye kısmen eşit şekilde dengeleyerek gerçekleştirmiştir. PH grubunda yer alan hayvanlarda ipsilateral pençe kullanımı %70,28 çıkarken her iki pençe kullanım yüzdesi 14,3'lere düşmüştür. 6-OHDA toksisitesine bağlı olarak PH gruplarında gözlenen motor asimetri beklenen bir bulgu olup PH modelinin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuç daha önceki veriler ile uyumluluk göstermektedir^{199, 207} Sensörimotor kortekste ön pençe bölgesinin temsilini oluşturan alanın 6-OHDA nörotoksini ile oluşturulan unilateral lezyonu sonucu ipsilateral pençe kullanımı, sensörimotor ve somatosensoriyel fonksiyonlarda defisitlere neden olarak motor asimetriye yol açabilir^{198, 207}. Aynı zamanda bu durum nigrostriatal yolaktaki DA seviyesinin azaldığını ve buna bağlı olarak ipsilateral pençenin maksimum düzeyde kullanıldığını gösterir¹⁹⁷. PH+BRM grubunda ipsilateral pençe kullanımı % 56,14 iken her iki pençe kullanımı % 22,74'e düşmüştür. PH+ L-Dopa grubunda ipsilateral pençe kullanımı % 42,22 iken her iki pençe kullanımı % 39,53 olduğu görülmüştür. Bunun yanısıra, BRM+L-Dopa kombinasyonu ile tedavi edilen PH grubunda ipsilateral pençe kullanımı % 36,22, her iki pençe kullanımı ise % 49,18 düzeyine çıktığı gösterilmiştir. PH+BRM+L-Dopa grubunda görülen iki pençe kullanma yüzdesinin kontrol grubu değerine yaklaştığı görülmektedir. Bu veriler, BRM'nin tek başına kullanımının motor asimetriyi düzeltmede L-Dopa kadar etkili olmadığını fakat BRM'nin L-Dopa ile kombinasyonunun BRM'nin L-Dopa'nın etkinliğini artırarak sensorimotor performansta iyileşme sağladığını ve buna bağlı olarak motor asimetride düzelmeye neden olduğunu düşündürmektedir. 6-OHDA ile deneysel PH modeli oluşturulan ratlarda profilaktik BRM tedavisi sonucu yapılan silindir testinde önemli ölçüde iyileşme görülürken²⁰⁸, buna karşılık bizim çalışmamızda etkili bir sonuç elde

edilememiştir. Bu bulgu BRM'nin 6-OHDA'nın oluşturacağı hasara karşı koruyucu etki gösterirken, 6-OHDA'nın oluşturduğu hasarı yeterli düzeyde iyileştiremediğini düşündürmüştür.

Aktivitemetre testleri deney hayvanlarında spontan lokomotor ve keşif hareketleri, motor hasar hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Deney hayvanlarında DAerjik nöron dejenerasyonuna bağlı lokomotor aktivitede azalış ve hareketsiz kaldığı süre ile ilişkili olarak dinlenme süresinde artış olması beklenir. Ratlara uygulanan 6-OHDA'nın nöronlarda oluşturduğu dejenerasyona bağlı olarak lokomotor aktivitede bozulmalar olduğu bildirilmiştir. DA konsantrasyonundaki azalış hipoaktiviteye yol açarken DA konsantrasyonunda görülen artış hiperaktivite ile sonuçlanmaktadır^{199, 209}. Bu çalışmada lokomotor aktivite testi ile ambulatuvar, vertikal ve horizontal aktivitelerin yanı sıra dinlenme süresi ve katedilen mesafe de değerlendirilmiştir. PH grubunda ambulatuvar, vertikal ve horizontal aktivite, katedilen mesafede kontrol grubuna göre anlamlı azalış, dinlenme süresinde ise kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu bulunmuştur. 6-OHDA ile PH modeli oluşturulan grupta lokomotor aktivitenin değişmesi beklenen bir bulgu olup 6-OHDA nörotoksininin DAerjik dejenerasyona neden olduğu ve buna bağlı olarak motor disfonksiyonun görüldüğü düşünülmektedir. Spontan lokomotor aktivitenin DAerjik dejenerasyon ile ilişkisi 6-OHDA ile indüklenen PH modellerinde gösterilmiştir^{210, 211}. BRM ile tedavi edilen PH grubunda ambulatuvar, horizontal aktivite ve katedilen mesafede PH grubu ile karşılaştırılmış ve ambulatuvar, horizontal aktivite ve katedilen mesafenin benzer düzeylerde olduğu görülmüştür. Bunun yanısıra, PH+BRM grubunda vertikal aktivite düzeyi PH grubuna göre artış, dinlenme süresi ise azalış göstermekteydi. Bu bulgulara göre 6-OHDA ile nigrostriatal DAerjik sistemde oluşturulan hasarın BRM tarafından ambulatuvar, horizontal aktivite ve katedilen mesafede üzerinde etkisi olmazken, vertikal aktivite ve dinlenme süresi üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

PH+L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa grupları PH grubu ile kıyaslandığında L-Dopa ve BRM+L-Dopa uygulanan PH gruplarında ambulatuvar, vertikal ve horizontal aktivite ve katedilen mesafenin PH grubuna göre arttığı dinlenme süresinin ise azaldığı ve bu artış ve azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. PH+BRM+L-Dopa grubunda lokomotor aktivite parametrelerindeki iyileşme PH+L-Dopa grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığa ulaştığı görüldü. Bu verilere göre; PH'de görülen DA azalışına bağlı meydana gelen hipoaktivitenin L-Dopa ve BRM+L-Dopa kombinasyonu uygulaması sonucu giderildiği düşünülmektedir. Aynı zamanda BRM'nin L-Dopa'nın etkisini güçlendirerek iyileşme düzeylerini daha da arttırdığı görülmüştür.

Deneysel 6-OHDA ile oluşturulan PH hayvan modellerinde görülen motor defisitler DAerjik sistem ile doğrudan ilişkili olup DAerjik nöron harabiyetine bağlı olarak motor performansta bozukluklar olduğu düşünülmektedir¹⁴³. BRM ile tedavi edilen PH grubu L-Dopa ile tedavi edilen PH grubu ile karşılaştırıldığında BRM'nin tek başına etkisinin L-Dopa kadar iyileştirici düzeyde olmadığı hatta bazı davranış parametreleri üzerinde tamamen etkisiz olduğu gözlemlendi. L-Dopa ile uzun süreli tedavi sonucu gelişen diskinezi ve motor dalgalanmalar L-Dopa ile tedavideki en önemli yan etkilerden biridir²⁰¹. Bu çalışmada L-Dopa ile erken dönem tedavi yöntemi tercih edilmiş olup yapılan apomorfin, silindir ve lokomotor aktivite gibi davranış testleri üzerinde önemli ölçüde iyileşme sağladığı görülmüştür. Bu bulgu literatür ile uyumludur²⁰⁷. DA ajanı olarak bilinen L-Dopa erken dönem tedavide etkinliğini DAerjik transmisyon üzerinden göstermektedir. Bunun yanısıra BRM ve L-Dopa kombinasyonu ile tedavi edilen PH grubunda BRM'nin L-Dopanın etkinliğini artırdığı tespit edilmiştir. BRM bu etkisini L-Dopa'nın motor fonksiyonel bağlantıları artırarak L-Dopa'nın etki süresini uzattığı ve böylece motor performanstaki iyileşmeyi üst düzeye çıkararak L-Dopa'nın terapötik verimliliğine katkıda bulunduğu düşünülür.

Yaptığımız literatür taramasında BRM ve BRM+L-Dopa kombinasyonu ile tedavinin deneysel PH modelinde apomorfin ve lokomotor aktivite davranış testleri ile ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle sonuçlarımızı başka çalışmalarla karşılaştırma imkânımız olmadı. Elde ettiğimiz bulgular deneysel PH modelinde ilk kez gösterilmiş olup literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

5.2. İmmünohistokimyasal Değişiklikler

İmmünohistokimyasal parametreler deneysel PH modellerinde hem model gelişimini desteklemek hem de yeni ajanların PH'ye yönelik irdelenen yeni terapötik stratejilerde kullanılabilirliğini sınamak ve test etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada GFAP, TNF- α ve nNOS immünreaktiviteyi 6-OHDA nörotoksini ile oluşturulan deneysel PH modelinde immünohistokimyasal parametreler olarak araştırılmıştır.

Nöroinflamasyonun PH patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Beyindeki hücrelerin yaklaşık olarak %50'sini oluşturan glial hücrelerin birçok alt tipi bulunmasına rağmen en yaygın bulunan alt tip astrositlerdir. Astrositler fizyolojik olarak; yapısal ve metabolik destek, sinaptik transmisyon, kan beyin bariyeri özelliklerinin oluşumu ve sürdürülmesi, sitokin salınımı, DAerjik nöronların gelişimi ve yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan GDNF gibi nörotrofik faktörlerin sentezi gibi birçok fonksiyona sahiptir^{172, 212}. Bununla birlikte nörodejeneratif süreçlerde görülen astrosit disfonksiyonu nöronal kayıplara neden olmaktadır. PH patogenezinde görülen inflamatuvar sürecin etkilerine dair literatürde yer alan önemli bulgulardan biri striatum ve SN bölgelerinde görülen reaktif astrositlerin varlığıdır^{176, 213}. Astrositler PH gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta terapötik intervasyonda hedef hücrelerdir. PH primer karakteristik özelliği olan DAerjik nöron kaybının yanısıra hastalığın patogenezinde astrosit disfonksiyonu önemli yer tutmaktadır²¹³. GFAP, astrositlerde eksprese edilen bir

intermediyer filament protein olup PH patogenezinde GFAP hipofosforilasyonu ve aşırı ekspresyonu astrositlerdeki değişimin bir göstergesidir. Astrosit aktivasyonuna bağlı olarak TNF- α , IL-1 β gibi proinflatuvar sitokin düzeylerindeki artış nigrostriatal yolaktaki DAerjik nörön dejenerasyonunu hızlandırmakta ve böylece astrositlerde görülen bu değişiklikler sonucu hastalığın ilerlediği düşünölmektedir. Bu nedenle PH artmış astrosit aktivasyonuna bağlı olarak yüksek GFAP seviyeleri ile tanımlanabilir¹⁷². 6-OHDA gibi nörotoksinler ile geliştirilen deneysel PH modellerinde artmış GFAP protein ve mRNA ekspresyonu model gelişimini destekler niteliktedir. Aynı zamanda PH tedavisine yönelik nöroprotektif ajanların etkinliğinin araştırılmasında astroglial yanıtın değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünölmektedir^{214, 215}. Çalışmamızda astrositlerin nöroinflamasyondaki rolünü değerlendirmek için GFAP ekspresyon düzeyi SN'de histopatolojik yöntemle semi-kantitatif olarak tespit edildi. Kontrol grubunda negatif GFAP ekspresyonu saptanırken deney hayvanlarına 6-OHDA nörotoksininin uygulanması sonucu oluşturulan PH modelinde astrositlerde şiddetli düzeyde GFAP immünoreaktivitesi tespit edildi. Literatürdeki mevcut veriler, 6-OHDA uygulaması sonucu reaktif astrosit sayısında yükselme ve buna bağlı olarak GFAP immünoreaktivitesinde artış olduğuna işaret eder^{214, 215}. Bu çalışmanın bulguları da bu durumu doğrulamaktadır. Deneysel PH model oluşumunu takiben tedaviye verilen yanıtta GFAP düzeylerinde azalış tedaviye verilen nöroprotektif yanıtın değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak düşünölmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda 6-OHDA ile lezyon oluşturulan deney hayvanlarında BRM tedavisi sonucu astrositlerde GFAP immünoreaktivitesi orta düzeyde gözlemlenirken L-Dopa tedavisi sonucu ise astrositlerde hafif düzeyde GFAP ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte BRM+L-Dopa kombinasyonu ile tedavi edilen PH grubunda ise astrositlerde çok hafif düzeyde GFAP immünoreaktivitesi gözlemlenmiştir. Bu verilere göre BRM uygulaması

6-OHDA nörotoksinin oluşturduğu astrogliyal hasarı iyileştirmede L-Dopa kadar nöroprotektif etkiye sahip olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte L-Dopa'nın erken dönem tedavisinde DAerjik nöron kaybının ve reaktif astrogliyozun baskılanmasıyla ilişkili olarak GFAP immünoreaktivitesinde azalma olduğunu bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur^{214, 216}. Standart L-DOPA tedavisi ilk dönemlerde nöron koruyucu etki gösterirken uzun süreli kullanımı sonucu bu etkinin tersine dönebileceği ve belirgin reaktif astrogliozise de yol açabileceği ileri sürülmüştür²¹⁷. Çalışmamızda erken dönem L-Dopa tedavisi sonucu GFAP ekspresyonunda azalma ve 6-OHDA'nın neden olduğu astrogliyal hasarda düzelme olduğu görülmüştür. Bununla birlikte BRM'nin L-Dopa'nın etkisini artırarak ederek oluşan astrogliyal hasarda maksimum düzeyde iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir.

TNF- α potent bir inflamatuvar mediyatör olup nöroinflamasyonda primer rol oynamaktadır. Diğer proinflamatuvar sitokinlere göre oldukça erken salınan TNF- α , konakçı cevabında en etkili mediyatördür. Pleiotropik etkiye sahip olan bu sitokin birçok inflamatuvar hastalığın patogenezi ile ilişkilidir. Sağlıklı bireylerden elde edilen serum ve doku örneklerinde TNF- α ekspresyonu görülmezken inflamatuvar bir uyarana ile karşılaşınca TNF- α üretimi gözlenmektedir¹⁷⁸. PH'de nörodejeneratif süreçte rol oynayan inflamasyonda reaktif astrositlerden salınan TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler lokal mikrogliyalı aktive ederek inflamatuvar sürecin hızlanmasına neden olur. DAerjik nöronlar TNF- α sitokinine oldukça duyarlıdır ve reaktif astrositlerden salınan TNF- α , DAerjik nöronlarda bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak proapoptotik mekanizmaları aktive etmekte ve böylece nöronal harabiyete yol açmaktadır²¹⁸. Aynı zamanda TNF- α kendi gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve daha fazla üretimini indükleyerek doğrudan reseptör aracılı ve/veya dolaylı olarak striatum ve SN'de sitotoksiteyi artırarak nöral hasarı hızlandırdığı ve nörodejeneratif süreci daha da

şiddetlendirdiği bildirilmiştir²¹⁹. Yapılan literatür taraması sonucu PH'li bireylerin beyin omurilik sıvısında, TNF- α düzeyinde ve postmortem çalışmalarda SN ve striatum bölgelerinde TNF- α immünoreaktivitesinde artışlar olduğu görülmüştür¹²⁶. TNF- α 'nın nörodejenerasyondaki rolünü aydınlatmak için geliştirilmiş TNF- α mutant farelerde MPTP nörotoksini uygulaması sonrası striatum bölgesinde DA kaybında azalma, SN'deki TH pozitif hücrelerde bir farklılık olmadığı tespit edilirken bu veriler TNF- α 'nın DA metabolizması üzerinde zararlı etkileri olduğunu düşündürmektedir²²⁰. Aynı zamanda 6-OHDA nörotoksini ile PH modeli geliştirilen ratların striatum ve SN bölgelerinde TNF- α ekspresyonunda artış olduğu ve nigrostriatal yolakta TNF- α düzeyindeki artışa astroglial aktivitenin eşlik ettiği görülmüştür²¹⁹. Çalışmamızda TNF- α immünoreaktivitesi SN'de histopatolojik yöntemle semi-kantitatif olarak tespit edildi. Kontrol grubunda negatif TNF- α ekspresyonu saptanırken deney hayvanlarına 6-OHDA nörotoksininin uygulanması sonucu perivasküler alanda şiddetli düzeyde TNF- α immünoreaktivitesi tespit edildi. Literatürdeki mevcut veriler, 6-OHDA uygulaması sonucu TNF- α ekspresyonunda artış olduğunu göstermektedir²²¹. Bulgularımız bu durumu destekler niteliktedir. Nörolojik hasarın meydana geldiği SN ve striatum bölgelerinde TNF- α 'nın yüksek düzeyde olması bu sitokinin nöronal hasarda bir aracı olduğu ve bu nedenle PH'nin tedavisinde önemli bir hedef olduğunu düşündürmektedir²²¹. 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH sonucu BRM ile tedavi edilen grupta perivasküler alanda TNF- α immünoreaktivitesinin orta düzeyde gözlemlenirken L-Dopa tedavi sonucu ise TNF- α ekspresyon düzeyinin hafif düzeyde olduğu tespit edildi. BRM+L-Dopa kombinasyonu ile tedavi edilen PH grubunda ise TNF- α ekspresyon düzeyinin tüm tedavi gruplarına göre en az düzeyde olduğu saptandı. Bu verilere göre BRM'nin DAerjik nöronlar için toksik etkiye sahip olan TNF- α 'nın olumsuz etkisini önleyecek düzeyde nöroprotektif etkiye sahip olmadığı gözlemlenirken erken dönem L-Dopa tedavisinin

TNF- α 'nın oluşturduğu hasarı tersine çevirdiği bulunmuştur. Literatürde hem klinik hem de 6-OHDA ile deneysel indüklenen PH modelinde artan TNF- α immünoaktivitesinin L-Dopa tedavisi ile azaldığını gösteren çalışmalar mevcut olup bizim bulgumuzu desteklemektedir^{222, 223}. Yeterli düzeyde nöroprotektif etkiye sahip olmayan BRM, L-Dopanın etkisini güçlendirerek maksimum düzeyde iyileşme sağladığı tespit edilmiştir.

NO; hormon, ROS, nörotransmitter, konstitütif ve indüklenebilir bir medyatör, sitoprotektif ve sitotoksik molekül gibi birçok işleve sahip olan yegane endojen moleküldür²²⁴. Santral sinir sisteminde nöroprotektif ve nörotoksik etkilere sahip NO nöronlarda nNOS tarafından sentezlenmekte ve yüksek konsantrasyonu eksitotoksik nöronal hasara neden olmaktadır²²⁵. nNOS tarafından üretilen yüksek düzeyde NO, PH'de DAerjik nöron kaybına neden olan inflamasyon ve oksidatif stres süreçlerine katılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada inflamasyonun artan ROS ve/veya RNS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir²²⁶. PH'de NO ile indüklenen inflamatuvar DAerjik nörotoksisite; mitokondriyal kompleks I, II ve IV inhibisyonu, lipid ve protein oksidasyonu, peroksinitrit gibi toksik radikallerin artması sonucu görülmektedir²²⁷. 6-OHDA ile geliştirilen deneysel PH modelinde Ca⁺² homeostazisinin bozulması sonucu NO, nitrit/nitrat düzeyi ve nNOS ekspresyonunda artış olduğu ve bu durumun mitokondriyal disfonksiyon, endonükleaz, fosfolipaz ve proteaz aktivasyonu, siklooksijenaz sinyal yolağının indüklenmesi sonucu nöronal dejenerasyona neden olduğu görülmüştür^{228, 229}. DAerjik nöronal hücre ölümüne neden olan mekanizmalar tam olarak anlaşılmasına rağmen NO üretiminde ve nNOS sentezindeki artış nöronal toksisite görülen nöroinflamasyon sürecinde önemli rol oynamaktadır²²⁷. Postmortem incelenen PH vakalarında nigrostriatal bölgede ve BG'de yüksek nNOS seviyeleri bulunduğu ve bu durumun nöronal hücre ölümüne yol açarak hastalığın progresyonunda rol oynadığı düşünülmektedir¹⁹⁰. nNOS'un farmakolojik olarak inhibe edildiği ve nNOS

geni eksik farelerde MPTP ile geliştirilen PH modelinde DAerjik nöron harabiyetiinin olmadığı saptanmıştır^{230, 231}. Çalışmamızda nNOS nöroinflamasyondaki rolünü değerlendirmek için nNOS ekspresyon düzeyi SN'de histopatolojik yöntemle semikantitatif olarak tespit edildi. Kontrol grubunda negatif nNOS ekspresyonu saptanırken deney hayvanlarına 6-OHDA nörotoksininin uygulanması sonucu nöronlarda şiddetli düzeyde nNOS immünoaktivitesi tespit edildi. Literatürdeki mevcut veriler, 6-OHDA uygulaması sonucu nNOS ekspresyonunda artış olduğunu göstermektedir^{224, 228, 232}. Bu durum çalışmamızdan elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir. nNOS'un DAerjik dejenerasyon mekanizmasında etkin rol oynamasına bağlı olarak PH tedavisinde nNOS enzimi potansiyel bir hedef haline gelmiştir. nNOS'un farmakolojik olarak baskılanması PH'nin progresyonunu kontrol etmede önemli potansiyele sahiptir²²⁴. BRM uygulanan PH grubunda nöronlarda orta düzeyde nNOS immünoaktivitesi görülürken L-Dopa uygulanması sonucu ise nöronlarda hafif düzeyde nNOS ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. BRM+L-Dopa kombinasyonu ile tedavi edilen PH grubunda ise nöronlarda çok hafif düzeyde nNOS immünoaktivitesi gözlemlendi. Elde edilen verilere göre BRM tedavisi 6-OHDA nörotoksinin oluşturduğu hasarı geri döndürmede yeterli düzeyde değilken, L-Dopanin etkisini potansiyalize ederek oluşan hasarı maksimum düzeyde iyileştirmiştir.

Yaptığımız literatür taraması sonucu BRM ve BRM+L-Dopa kombinasyonu uygulanan deneysel PH modelinde, PH patogenezinde önemli rol oynayan inflamasyonla ilişkili olan GFAP, TNF- α ve nNOS parametreleri ile ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu bakımdan elde ettiğimiz bulgular orijinal olup literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

5.3. D1 ve D2 Reseptör Değişiklikleri

Nigrostriatal DAerjik yol, beyinde SN bölgesinde majör DAerjik projeksiyon bölgesi olup orta büyüklükte dikensi striatal nöronları innerve etmektedir. DAerjik sinir terminallerinden salınan DA, D1 ve D2 reseptör alttipleri ile etkileşime girerek lokomotor aktivite dahil olmak üzere birçok nöronal fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar^{43, 44}. SNc alanından salınan DA direkt yolda bulunan D1 reseptörlerini eksprese eden nöronları aktive ederken indirekt yolda D2 reseptörlerini eksprese eden nöronları inaktivite etmektedir. PH'de DAerjik nöron kaybına bağlı olarak direkt ve indirekt yolaklar arasındaki denge değişmekte ve PH patogenezinde görülen uzun süreli hücrel modifikasyonlar sonucu DA reseptörleri düzeyinde reorganizasyon görülmektedir⁶¹. DA aktivitesindeki yetersizliğe bağlı olarak, motor döngüde hareketlerin başlamasında stimülasyon ve/veya inhibisyon dengesinin bozulmasına yani D1 reseptörlerinin bulunduğu striatal nöron uyarılmasındaki azalışı takiben direkt yolun aktivitesinde azalma, D2 reseptörlerinin bulunduğu striatal nöron inhibisyonundaki azalmaya bağlı olarak indirekt yolun aktivitesinde artma ile sonuçlanmaktadır⁴³. PH patogenezinin açıklamak için tercih edilen mekanizmalardan biri olan D1 reseptör ekspresyon seviyesine ilişkin literatürde farklı veriler mevcuttur.

D1 reseptör bakımından incelendiğinde literatürde elde edilen veriler oldukça tartışmalıdır. Hem klinik hem de prelinik çalışmalarda PH ile birlikte D1 reseptör ekspresyonunda artış gözlenen çalışmalar mevcut iken D1 reseptör ekspresyon düzeyinde azalma olduğunu ileri süren veriler de bulunmaktadır²³³⁻²³⁵. DA eksikliğine bağlı olarak D1 reseptörünün aşırı duyarlı hale geldiği, aynı zamanda 6-OHDA gibi nörotoksinler ile geliştirilen unilateral deneysel PH modelinde DA agonistlerinin uygulanması sonucunda görülen kontralateral dönüşlerin striatal nöronlar tarafından DA kaybının DA reseptör ekspresyonundaki artış ile kompanse edilmesi ile açıklanmaktadır^{195, 236}. Bu verilerin

aksine DA düzeyinde azalmaya bağlı olarak D1 reseptör ekspresyon düzeyinde azalma olduğu ve bu azalış hastalığın klinik belirtilerinden biri olan bradikinezi ile ilişkilendirilmiştir^{236, 237}. Bunun yanısıra çoğu çalışmada PH'li bireylerde PET yöntemiyle D1 reseptör seviyesinde anlamlı düzeyde değişim olmadığı gösterilmiştir²³⁸. 6-OHDA nörotoksini ile yapılan çalışmalarda denerve striatal D1 reseptör düzeyinde herhangi bir değişiklik olmadığı fakat yüksek affinite gösteren bağlanma bölgeleri içerdiği tespit edilmiştir²³⁹. Çalışmamızda SN bölgesinden alınan doku örneklerinde incelenen D1 gen ekspresyon seviyesinin PH grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görülmüştür. Bu bilgi doğrultusunda çalışmamızda PH grubunda D1 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmaması literatürdeki bazı veriler ile paralellik göstermektedir^{238, 239}. D1 reseptör ekspresyon düzeyinin PH+BRM grubunda kontrol grubuna göre azaldığı ve bu azalışın PH grubuna benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadığı saptanmıştır. Bu veri BRM tedavisinin PH'de nöroprotektif bir etki göstermediğini düşündürmüştür. Bunun aksine PH+L-Dopa ve PH+BRM+L-Dopa gruplarında ise D1 gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttı ve bu artışın PH+BRM+L-Dopa grubunda daha fazla olduğu görüldü. Kronik L-Dopa tedavisine yanıtta D1 reseptör ekspresyonunda artış olduğu ve D1 reseptör düzeyindeki bu artışın L-Dopa ile indüklenen diskineziye neden olduğu bilinmektedir^{234, 240}. Çalışmamızda L-Dopa tedavisi erken süreli olup davranış testlerinde elde edilen bulgular L-Dopa ve BRM+L-Dopa kombinasyonları ile tedavi edilen PH gruplarındaki deney hayvanlarında herhangi bir şekilde diskinezi gelişmediğini göstermektedir. Bu verilere göre D1 reseptör mRNA düzeyindeki artışa rağmen diskinetik bir bulgu görülmemesini eksprese olan D1 mRNA'ların tamamının proteine dönüşümünün tamamlanmadığı ve

reseptör sinyal transdüksiyon sistemindeki bağlanma değişiklikleri ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

PH'de nigrostriatal dejenerasyon sonucu DA azalışına bağlı olarak D2 reseptör mRNA ekspresyonunda artış olduğu ve bu artışa bağlı olarak lokomotor aktivite ve motor koordinasyonda azalma olduğu işaret edilmektedir^{241, 242}. Aynı zamanda hem 6-OHDA gibi nörotoksinler ile indüklenen PH modelinde deney hayvanlarında hem de PH'li bireylerde görülen hipokinezinin D2 reseptör ekspresyon seviyesindeki artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir²⁴¹. Bu bulgular doğrultusunda çalışmamızda PH grubunda D2 gen ekspresyon seviyesinde görülen artış literatür ile paralellik göstermektedir. Aynı zamanda PH +BRM grubunda D2 ekspresyon seviyesinde anlamlı derecede artış görülmesi BRM'nin PH'de görülen nörodejeneratif süreci iyileştirmede yeterli protektif etkiye sahip olmadığını düşündürmektedir. Radyoizotop etiketli yüksek afiniteli ligandlar kullanılarak yapılan birçok çalışmada PH'de D2 reseptörlerinin yoğunluğunun arttığını ve L-Dopa tedavisi sonrası D2 reseptörlerinin yoğunluğunun normal seviyeye döndüğünü göstermiştir²³⁹. Çalışmamızda L-Dopa ile tedavi edilen PH grubunda D2 ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artış olduğu fakat bu artışın PH ve PH+BRM gruplarına göre daha az olduğu görülmüştür. Bununla birlikte BRM+L-Dopa kombinasyonu ile tedavi edilen PH grubunda D2 ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna en yakın değerde olduğu gözlemlenmiştir. Bu verilere göre BRM, L-Dopa'nın etkisini güçlendirerek PH'de görülen motor bozuklukların düzelmesine katkıda bulunmuş olabilir.

Yaptığımız literatür taraması sonucu BRM ve BRM+L-Dopa kombinasyonu uygulanan deneysel PH modelinde D1 ve D2 reseptör düzeyleri ile ilişkisini açıklayan herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle sonuçlarımızı karşılaştırma imkânımız

olmadı. Elde ettiğimiz bulgular deneysel PH modelinde ilk kez gösterilmiş olup literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ratlarda 6-OHDA nörotoksini ile unilateral olarak deneysel PH modeli geliştirilmiş olup, BRM'nin etkisi hem tek başına hem de L-Dopa ile birlikte kombine edilerek araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. 6-OHDA ile unilateral deneysel PH oluşturulan grupta belirgin kontralateral dönüşler, ipsilateral pençe kullanımında artış ve lokomotor aktivitede azalış görülmüştür.
2. 6-OHDA ile unilateral deneysel PH oluşturulan grupta SN bölgesinde GFAP, TNF- α ve nNOS immünoaktivitesinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir.
3. 6-OHDA ile unilateral deneysel PH oluşturulan grupta SN bölgesinde D1 reseptör ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre azalış göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadığı görülmüş, D2 reseptör ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin artış gösterdiği bulunmuştur.
4. L-Dopa uygulanan PH grubunda kontralateral dönme sayısının PH grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, BRM uygulanan PH grubunda ise L-Dopa uygulanan PH grubundaki kadar olmasa da kontralateral dönme sayısının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. BRM ve L-Dopa'nın birlikte uygulandığı grupta kontralateral dönüş sayısındaki azalma tüm tedavi grupları içerisinde en düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir.
5. L-Dopa uygulanan PH grubunda ipsilateral pençe kullanım yüzdesi PH grubuna göre azalmıştır. BRM uygulanan PH grubunda ipsilateral pençe kullanma yüzdesi L-Dopa kadar olmasa da düşüş göstermiştir. BRM ve L-Dopa kombinasyonunun uygulandığı PH grubunda ise ipsilateral pençe

kullanım yüzdesi tüm uygulama grupları içinde en düşük seviyede bulunmuştur.

6. L-Dopa uygulanması PH grubunda lokomotor aktivite testi parametrelerinden ambulatuvar aktivite, horizontal aktivite ve katedilen mesafe üzerine PH grubuna göre belirgin artışa yol açmıştır. BRM'nin tek başına uygulandığı PH grubunda bu parametrelerde herhangi bir değişiklik görülmezken, L-Dopa ile birlikte uygulandığı grupta tüm uygulama gruplarına göre belirgin artış görülmüştür.
7. L-Dopa ve BRM'nin yalnız başına uygulandığı PH gruplarında vertikal aktivite düzeyleri benzer bulunmuştur. Buna karşılık, BRM ve L-Dopa'nın birlikte uygulandığı grupta ise tüm tedavi gruplarına göre belirgin artış olduğu tespit edilmiştir.
8. PH grubunda artan GFAP, TNF- α ve nNOS ekspresyon düzeyleri L-Dopa uygulanan PH grubunda belirgin bir şekilde azalmıştır. BRM uygulanan PH grubunda ise L-Dopa kadar olmasa da bu parametrelerin immünoreaktivitesinde azalma olduğu, L-Dopa ile birlikte uygulandığında ise L-Dopa'nın etkisini artırdığı görülmüştür.
9. L-Dopa uygulanan PH grubunun SN bölgesinde D1 reseptör ekspresyon düzeyi belirgin olarak artarken BRM uygulanan PH grubunda ise D1 ekspresyon düzeyinin çok az arttığı fakat bu artışın anlamlılık düzeyine ulaşmadığı bulunmuştur. BRM ve L-Dopa'nın birlikte uygulandığı PH grubunda D1 reseptör ekspresyon düzeyinin tüm gruplar içerisinde en belirgin artışı gösterdiği tespit edilmiştir.
10. L-Dopa uygulanan PH grubunda D2 reseptör düzeyinde belirgin azalış, BRM uygulanan PH grubunda ise L-Dopa uygulanan grup kadar olmasa da D2

reseptör düzeyinde bir azalma görülmüştür. BRM ve L-Dopanin birlikte uygulandığı grupta ise D2 reseptör düzeyi tüm tedavi grupları içerisinde en fazla azalışı göstermiştir.

Bu bulgular BRM'nin 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH modelinde oluşan hasarı iyileştirmede tek başına yetersiz olduğu, ancak BRM'nin L-Dopa'nın etkinliğini güçlendirerek hem davranışsal hem de nörodejeneratif süreci iyileştirmede etkisini maksimum düzeye ulaştırdığı görüldü. Elde ettiğimiz veriler gelecekteki benzer çalışmalara temel oluşturabilir. İleriki çalışmalarda, BRM'nin PH'deki iyileştirici etki mekanizmaları aynı zamanda SN bölgesinde DA düzeyleri daha detaylı olarak araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 2002, 14: 223-236.
2. McDonald C, Gordon G, Hand A, Walker RW, Fisher JM. 200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson? *Age and ageing*, 2018, 47: 209-214.
3. Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2011, 1: 1-15.
4. akmur R. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi ve klinik özellikleri. *Türkiye klinikleri Nöroloji Dergisi*, 2003, 1: 160-163.
5. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's disease and its management: part 1: disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *Pharmacy and therapeutics*, 2015, 40: 504-510.
6. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature medicine*, 2010, 16: 653-661.
7. Mochizuki H, Choong C-J, Masliah E. A refined concept: α -synuclein dysregulation disease. *Neurochemistry international*, 2018, 119: 84-96.
8. Flood P, Arbabzada N, Sharma M. Inflammation: role in Parkinson's disease and target for therapy. *Challenges in Parkinson's Disease*, 2016: 57.
9. Raza C, Anjum R. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life sciences*, 2019, 226: 77-90.

10. Jiang X, Ganesan P, Rengarajan T, Choi D-K, Arulseivan P. Cellular phenotypes as inflammatory mediators in Parkinson's disease: interventional targets and role of natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 1052-1062.
11. Lindenau JD, Altmann V, Schumacher-Schuh AF, Rieder CR, Hutz MH. Tumor necrosis factor alpha polymorphisms are associated with Parkinson's disease age at onset. *Neuroscience letters*, 2017, 658: 133-136.
12. Haddad F, Sawalha M, Khawaja Y, Najjar A, Karaman R. Dopamine and levodopa prodrugs for the treatment of Parkinson's disease. *Molecules*, 2018, 23: 40-57.
13. Dong J, Cui Y, Li S, Le W. Current pharmaceutical treatments and alternative therapies of Parkinson's disease. *Current neuropharmacology*, 2016, 14: 339-355.
14. Lu D-S, Chen C, Zheng Y-X, Li D-D, Wang G-Q, Liu J, Shi J, Zhang F. Combination treatment of icariin and L-DOPA against 6-OHDA-Lesioned dopamine neurotoxicity. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2018, 11: 155-165.
15. Pavan R, Jain S, Kumar A. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnology research international*, 2012, 33: 28-34.
16. Rathnavelu V, Alitheen NB, Sohila S, Kanagesan S, Ramesh R. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. *Biomedical reports*, 2016, 5: 283-288.
17. Rodríguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Fahn S, Tolosa E. Two-hundred Years Later: Is Parkinson's Disease a Single Defined Entity? *Revista de Investigación Clínica*, 2018, 69: 308-313.
18. Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 2018, 109: 249-257.

19. Draoui A, El Hiba O, Aimrane A, El Khat A, Gamrani H. Parkinson's disease: from bench to bedside. *Revue Neurologique*, 2020, 176: 543-559.
20. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease epidemiology, pathology, genetics and pathophysiology. *Clinics in geriatric medicine*, 2019, 36: 1-12.
21. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 2016, 46: 292-300.
22. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag A-E, Lang AE. Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*, 2017, 3: 1-21.
23. Pang SY-Y, Ho PW-L, Liu H-F, Leung C-T, Li L, Chang EES, Ramsden DB, Ho S-L. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 2019, 8: 23-34.
24. Rodriguez M, Rodriguez- Sabate C, Morales I, Sanchez A, Sabate M. Parkinson's disease as a result of aging. *Aging cell*, 2015, 14: 293-308.
25. Reeve A, Meagher M, Lax N, Simcox E, Hepplewhite P, Jaros E, Turnbull D. The impact of pathogenic mitochondrial DNA mutations on substantia nigra neurons. *Journal of Neuroscience*, 2013, 33: 10790-10801.
26. Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing research reviews*, 2014, 14: 19-30.
27. Miller IN, Cronin- Golomb A. Gender differences in Parkinson's disease: clinical characteristics and cognition. *Movement disorders*, 2010, 25: 2695-2703.
28. Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *Journal of Parkinson's disease*, 2019, 9: 501-515.
29. Ball N, Teo W-P, Chandra S, Chapman J. Parkinson's disease and the environment. *Frontiers in neurology*, 2019, 10: 218-226.

30. Chen H, Ritz B. The search for environmental causes of Parkinson's disease: moving forward. *Journal of Parkinson's disease*, 2018, 8: 9-17.
31. Firestone JA, Lundin JI, Powers KM, Smith- Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth Jr W, Checkoway H. Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population- based case–control study. *American journal of industrial medicine*, 2010, 53: 217-223.
32. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders*, 2011, 26: 1049-1055.
33. Kouli A, Torsney KM, Kuan W-L. Parkinson's disease: etiology, neuropathology, and pathogenesis. *Exon Publications*, 2018, e.2018.ch:13-26.
34. Ma C, Liu Y, Neumann S, Gao X. Nicotine from cigarette smoking and diet and Parkinson disease: a review. *Translational neurodegeneration*, 2017, 6: 18-25.
35. Munoz DG, Fujioka S. Caffeine and Parkinson disease: A possible diagnostic and pathogenic breakthrough. *Neurology*, 2018,90:1-2.
36. Zhang P-L, Chen Y, Zhang C-H, Wang Y-X, Fernandez-Funez P. Genetics of Parkinson's disease and related disorders. *Journal of medical genetics*, 2018, 55: 73-80.
37. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1992, 55: 181-184.
38. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003, 39: 889-909.
39. Moretti R, Caruso P, Crisman E, Gazzin S. Basal ganglia: Their role in complex cognitive procedures in experimental models and in clinical practice. *Neurology India*, 2017, 65: 814-825.

40. Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, 2: 1-21.
41. Gonzales KK, Pare JF, Wichmann T, Smith Y. GABAergic inputs from direct and indirect striatal projection neurons onto cholinergic interneurons in the primate putamen. *Journal of Comparative Neurology*, 2013, 521: 2502-2522.
42. Young CB, Sonne J. Neuroanatomy, basal ganglia :In *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, 2018.
43. Obeso JA, Marin C, Rodriguez- Oroz C, Blesa J, Benitez- Temiño B, Mena-Segovia J, Rodríguez M, Olanow CW. The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 2008, 64: 30-46.
44. Leisman G, Braun-Benjamin O, Melillo R. Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development. *Frontiers in systems neuroscience*, 2014, 8: 16-34.
45. Sian J, Youdim M, Riederer P, Gerlach M. Biochemical anatomy of the basal ganglia and associated neural systems. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999: 1090-1100
46. DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology*, 2007, 64: 20-24.
47. DeLong M, Wichmann T. Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clinical EEG and neuroscience*, 2010, 41: 61-67.
48. Roshan MH, Tambo A, Pace NP. Potential role of caffeine in the treatment of Parkinson's disease. *The open neurology journal*, 2016, 10: 42-58.
49. Yamada K, Takahashi S, Karube F, Fujiyama F, Kobayashi K, Nishi A, Momiyama T. Neuronal circuits and physiological roles of the basal ganglia in terms of

- transmitters, receptors and related disorders. *The Journal of Physiological Sciences*, 2016, 66: 435-446.
50. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature neuroscience*, 2014, 17: 1022-1030.
51. Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2005, 37: 942-946.
52. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 2019, 39: 31-59.
53. Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Molecular neurodegeneration*, 2019, 14: 35-56.
54. Monzani E, Nicolis S, Dell'Acqua S, Capucciati A, Bacchella C, Zucca FA, Mosharov EV, Sulzer D, Zecca L, Casella L. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58: 6512-6527.
55. Mishra A, Singh S, Shukla S. Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. *Journal of experimental neuroscience*, 2018, 12: 1-8.
56. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 2011, 63: 182-217.
57. Butini S, Nikolic K, Kassel S, Brückmann H, Filipic S, Agbaba D, Gemma S, Brogi S, Brindisi M, Campiani G. Polypharmacology of dopamine receptor ligands. *Progress in Neurobiology*, 2016, 142: 68-103.

58. Cave JW, Baker H. Dopamine systems in the forebrain. *Development and engineering of dopamine neurons*, Springer, 2009: 15-35.
59. Xia N, Zhang P, Fang F, Wang Z, Rothstein M, Angulo B, Chiang R, Taylor J, Pera RAR. Transcriptional comparison of human induced and primary midbrain dopaminergic neurons. *Scientific reports*, 2016, 6: 31-39.
60. Squire L, Berg D, Bloom FE, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. *Fundamental neuroscience*. 4th ed. China, Academic Press, 2012:651-654.
61. Mallet N, Delgado L, Chazalon M, Miguelez C, Baufreton J. Cellular and synaptic dysfunctions in Parkinson's disease: stepping out of the striatum. *Cells*, 2019, 8: 1005-1034.
62. Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. *Clinical Neurophysiology*, 2008, 119: 1459-1474.
63. Cazorla M, Kang UJ, Kellendonk C. Balancing the basal ganglia circuitry: a possible new role for dopamine D2 receptors in health and disease. *Movement disorders*, 2015, 30: 895-903.
64. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2008, 79: 368-376.
65. De Virgilio A, Greco A, Fabbrini G, Inghilleri M, Rizzo MI, Gallo A, Conte M, Rosato C, Appiani MC, de Vincentiis M. Parkinson's disease: autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmunity reviews*, 2016, 15: 1005-1011.
66. Hasan H, Athauda DS, Foltynie T, Noyce AJ. Technologies assessing limb bradykinesia in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 2017, 7: 65-77.
67. Erro R, Stamelou M. The motor syndrome of Parkinson's disease. *International review of neurobiology*, Elsevier, 2017,132: 25-32.

68. Hess CW, Hallett M. The phenomenology of Parkinson's disease. *Seminars in neurology*, 2017, 37: 109-117.
69. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: targets for potential treatments. *Translational neurodegeneration*, 2017, 6: 28-63.
70. Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, De Deurwaerdere P, Miguelez C. The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1-13.
71. Schapira AH, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2017, 18: 433-450.
72. Kon T, Tomiyama M, Wakabayashi K. Neuropathology of Lewy body disease: Clinicopathological crosstalk between typical and atypical cases. *Neuropathology*, 2020, 40: 30-39.
73. Kaidery NA, Ahuja M, Thomas B. Crosstalk between Nrf2 signaling and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2019, 101: 1-11.
74. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 2016, 21:29-29.
75. Halliday GM, McCann H. The progression of pathology in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1184: 188-195.
76. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Steur ENJ, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 2003, 24: 197-211.

77. Rietdijk CD, Perez-Pardo P, Garssen J, van Wezel RJ, Kraneveld AD. Exploring Braak's hypothesis of Parkinson's disease. *Frontiers in neurology*, 2017, 8: 37-46.
78. Kalia L, Lang A. Parkinson's disease. *Lancet*, 2015, 386: 896–912.
79. Lang AE, Obeso JA. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *The Lancet Neurology*, 2004, 3: 309-316.
80. Wei L, Hu X, Yuan Y, Liu W, Chen H. Abnormal ventral tegmental area-anterior cingulate cortex connectivity in Parkinson's disease with depression. *Behavioural brain research*, 2018, 347: 132-139.
81. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 2013, 3: 461-491.
82. Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, Garrison DE, Meade JR, Peace TI, Zhou T. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: From molecular mechanisms to novel treatments. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20: 1-39.
83. He J, Zhu G, Wang G, Zhang F. Oxidative Stress and Neuroinflammation Potentiate Each Other to Promote Progression of Dopamine Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 47:1-12.
84. Iarkov A, Barreto GE, Grizzell JA, Echeverria V. Strategies for the treatment of Parkinson's disease: Beyond dopamine. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2020,14:1-12.
85. Goldenberg MM. Medical management of Parkinson's disease. *Pharmacy and therapeutics*, 2008, 33: 590-594.
86. Zahoor I, Shafi A, Haq E. Pharmacological treatment of Parkinson's disease. *Exon Publications*, 2018: 129-144.

87. Kriebel-Gasparro A. Parkinson's disease: update on medication management. *The Journal for Nurse Practitioners*, 2016, 12: 81-89.
88. Salamon A, Zádori D, Szpisjak L, Klivényi P, Vécsei L. Opicapone for the treatment of Parkinson's disease: an update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2019, 20: 2201-2207.
89. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's disease and its management: treatment of motor complications. *Pharmacy and Therapeutics*, 2015, 40(11), 747-753.
90. Mueller T, Russ H. Levodopa, motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2006, 7: 1715-1730.
91. Hollingworth SA, McGuire TM, Pache D, Eadie MJ. Dopamine agonists: time pattern of adverse effects reporting in Australia. *Drugs-real world outcomes*, 2015, 2: 199-203.
92. Hisahara S, Shimohama S. Dopamine receptors and Parkinson's disease. *International journal of medicinal chemistry*, 2011, 7;32-39.
93. Bette S, Shpiner DS, Singer C, Moore H. Safinamide in the management of patients with Parkinson's disease not stabilized on levodopa: a review of the current clinical evidence. *Therapeutics and clinical risk management*, 2018, 14: 1737-1745.
94. Dezsai L, Vecsei L. Monoamine oxidase B inhibitors in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 2017, 16: 425-439.
95. Hallett PJ, Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics*, 2004, 102: 155-174.
96. Borges N. Tolcapone in Parkinson's disease: liver toxicity and clinical efficacy. *Expert opinion on drug safety*, 2005, 4: 69-73.
97. Heikkinen H, Varhe A, Laine T, Puttonen J, Kela M, Kaakkola S, Reinikainen K. Entacapone improves the availability of L- dopa in plasma by decreasing its

- peripheral metabolism independent of L- dopa/carbidopa dose. *British journal of clinical pharmacology*, 2002, 54: 363-371.
98. Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K, Masuda M. Acetylcholine–dopamine balance hypothesis in the striatum. *Geriatrics & gerontology international*, 2010, 10: 148-157.
99. Tarakad A, Jankovic J. Diagnosis and management of Parkinson's disease. *Seminars in neurology*, 2017, 37(2); 118-126.
100. Brenner M, Haass A, Jacobi P, Schimrigk K. Amantadine sulphate in treating Parkinson's disease: clinical effects, psychometric tests and serum concentrations. *Journal of neurology*, 1989, 236: 153-156.
101. Demiryurek BE, Barut BO. Surgical Treatment Methods in Movement Disorders: Mechanisms of Action and Indications. *Bezmialem Science*, 2017, 5: 126-134.
102. Pahwa R, Factor S, Lyons K, Ondo W, Gronseth G, Bronte-Stewart H, Hallett M, Miyasaki J, Stevens J, Weiner W. Practice Parameter: Treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 2006, 66: 983-995.
103. Frighetto L, Bizzi J, Oppitz P. Stereotactic radiosurgery for movement disorders. *Shaped Beam Radiosurgery*, 2011: 209-218.
104. Lee DJ, Lozano AM. The Future of Surgical Treatments for Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*, 2018, 8: 79-83.
105. Hartmann CJ, Fliegen S, Groiss SJ, Wojtecki L, Schnitzler A. An update on best practice of deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 2019, 12: 1–20.

106. Walter BL, Vitek JL. Surgical treatment for Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 2004, 3: 719-728.
107. Keus SH, Munneke M, Nijkrake MJ, Kwakkel G, Bloem BR. Physical therapy in Parkinson's disease: evolution and future challenges. *Movement disorders*, 2009, 24: 1-14.
108. Redecker C, Bilsing A, Csoti I, Fogel W, Ebersbach G, Hauptmann B, Hellwig B, Müngersdorf M. Physiotherapy in Parkinson's disease patients: recommendations for clinical practice. *Basal Ganglia*, 2014, 4: 35-38.
109. Stoker TB, Greenland JC. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Codon Publications, 2018, 37(2):118-126.
110. Parmar M, Grealish S, Henchcliffe C. The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2020: 1-13.
111. Fan Y, Ng S-Y. Replacing what's lost: a new era of stem cell therapy for Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 2020, 9: 1-10.
112. Palmer C, Coronel R, Liste I. Treatment of Parkinson's disease using human stem cells. *Journal of Stem Cell Research and Medicine.*, 2016, 1: 71-77.
113. Yasuhara T, Kameda M, Sasaki T, Tajiri N, Date I. Cell therapy for Parkinson's disease. *Cell transplantation*, 2017, 26: 1551-1559.
114. Ma Y, Peng S, Dhawan V, Eidelberg D. Dopamine cell transplantation in Parkinson's disease: challenge and perspective. *British medical bulletin*, 2011, 100: 173-189.
115. Sullivan AM, O'Keefe GW. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease: past, present and future. *Neural regeneration research*, 2016, 11: 205-207.
116. Bhardwaj R, Deshmukh R. Neurotrophic factors and Parkinson's disease. *Clinical Investigation*, 2018, 8: 53-62.

117. Bega D, Zadikoff C. Complementary & alternative management of Parkinson's disease: an evidence-based review of eastern influenced practices. *Journal of movement disorders*, 2014, 7: 57–66.
118. Kim T-H, Cho K-H, Jung W-S, Lee MS. Herbal medicines for Parkinson's disease: a systematic review of randomized controlled trials. *PLoS One*, 2012, 7: e35695.
119. Carrera I, Cacabelos R. Current drugs and potential future neuroprotective compounds for Parkinson's disease. *Current neuropharmacology*, 2019, 17: 295-306.
120. Abdul Muhammad Z, Ahmad T. Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care-A review. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 2017, 67:121-125.
121. de Lencastre Novaes LC, Jozala AF, Lopes AM, de Carvalho Santos- Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa Junior A. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnology progress*, 2016, 32: 5-13.
122. Khalid N, Suleria HAR, Ahmed I. Pineapple juice. *Beverages and Human Health*, 2016, 1: 489-498.
123. Maurer H. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58: 1234-1245.
124. Manzoor Z, Nawaz A, Mukhtar H, Haq I. Bromelain: Methods of extraction, purification and therapeutic applications. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2016, 59:1-16.
125. Lee Y, Lee S, Chang S-C, Lee J. Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. *Archives of pharmacal research*, 2019, 42: 416-425.

126. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of immunology research*, 2018, 2018, 23:1-12.
127. Su X, Federoff HJ. Immune responses in Parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems. *BioMed research international*, 2014, 42:24-36.
128. Ueno A, Oh-ishi S. Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. *Journal of pharmacological sciences*, 2003, 93: 1-20.
129. Zhou Z, Wang L, Feng P, Yin L, Wang C, Zhi S, Dong J, Wang J, Lin Y, Chen D. Inhibition of epithelial TNF- α receptors by purified fruit bromelain ameliorates intestinal inflammation and barrier dysfunction in colitis. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1-10.
130. Desser L, Rehberger A, Paukovits W. Proteolytic enzymes and amylase induce cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 1994, 9: 253-263.
131. Mohamad NE, Abu N, Yeap SK, Alitheen NB. Bromelain Enhances the Anti-tumor Effects of Cisplatin on 4T1 Breast Tumor Model In Vivo. *Integrative cancer therapies*, 2019, 18: 1-7.
132. Onken JE, Greer PK, Calingaert B, Hale LP. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clinical Immunology*, 2008, 126: 345-352.
133. Stopper H, Schinzel R, Sebekova K, Heidland A. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. *Cancer letters*, 2003, 190: 151-156.

134. Rajan SG, Sharma A, Kumari P, Biswas S. Comparative molecular characterization to reveal surface behaviour of non-proteolytic bromelain mutants. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2018, 19: 886-895.
135. Cohen A, Goldman J. Bromelains therapy in rheumatoid arthritis. *Pennsylvania medical journal*, 1964, 67: 27-30.
136. Gutfreund A, Taussig S, Morris A. Effect of oral bromelain on blood pressure and heart rate of hypertensive patients. *Hawaii medical journal*, 1978, 37: 143-146.
137. Juhasz B, Thirunavukkarasu M, Pant R, Zhan L, Penumathsa SV, Secor Jr ER, Srivastava S, Raychaudhuri U, Menon VP, Otani H. Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium. *American journal of physiology-Heart and circulatory physiology*, 2008, 294: 1365-1370.
138. Tochi BN, Wang Z, Xu S-Y, Zhang W. Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): a review. *Pakistan journal of nutrition*, 2008, 7: 513-520.
139. Gunde M, Amnerkar N. Ethnobotanical and pharmacological properties of pineapple protease (Bromelain): a review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2015, 2: 126-135.
140. Dighe NS, Pattan SR, Merekar AN, Laware RB, Bhawar SB, Nirmal SN, Gaware VM, Hole MB, Musmade DS. Bromelain a wonder supplement: a review. *Pharmacologyonline*, 2010, 1: 11-18.
141. de Souza GM, Fernandes IA, Dos Santos CRR, Falci SGM. Is bromelain effective in controlling the inflammatory parameters of pain, edema, and trismus after lower third molar surgery? A systematic review and meta- analysis. *Phytotherapy Research*, 2019, 33: 473-481.

142. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Herbal medicine. Expanded commission E monographs. Integrative Medicine Communications, 1st ed. Boston, 2000:33-35.
143. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*, 2011, 164: 1357-1391.
144. Ko WKD, Bezard E. Experimental animal models of Parkinson's disease: A transition from assessing symptomatology to α -synuclein targeted disease modification. *Experimental Neurology*, 2017, 298: 172-179.
145. Lohr KM, Bernstein AI, Stout KA, Dunn AR, Lazo CR, Alter SP, Wang M, Li Y, Fan X, Hess EJ. Increased vesicular monoamine transporter enhances dopamine release and opposes Parkinson disease-related neurodegeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111: 9977-9982.
146. Leal PC, Lins LC, de Gois AM, Marchioro M, Santos JR. Commentary: evaluation of models of Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*, 2016, 10: 283-287.
147. Heeringa MJ, Abercrombie ED. Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *Journal of neurochemistry*, 1995, 65: 192-200.
148. Saeed A, Shakir L, Khan MA, Ali A, Yousaf M, Zaidi AA. Haloperidol induced Parkinson's disease mice model and motor-function modulation with Pyridine-3-carboxylic acid. *Biomedical Research and Therapy*, 2017, 4: 1305-1317.
149. Buhidma Y, Rukavina K, Chaudhuri KR, Duty S. Potential of animal models for advancing the understanding and treatment of pain in Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*, 2020, 6: 1-7.

150. Leão AH, Sarmiento- Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, Silva RH. Molecular, neurochemical, and behavioral hallmarks of reserpine as a model for Parkinson's disease: new perspectives to a long- standing model. *Brain Pathology*, 2015, 25: 377-390.
151. Zeng X-S, Geng W-S, Jia J-J. Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: pathogenic mechanism and assessment. *ASN neuro*, 2018, 10: 1–15.
152. Konnova EA, Swanberg M. Animal models of Parkinson's disease. *Exon Publications*, 2018: 83-106.
153. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 2012, 18: S183-S185.
154. Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in pharmacological sciences*, 2009, 30: 475-483.
155. Zhang X-f, Thompson M, Xu Y-h. Multifactorial theory applied to the neurotoxicity of paraquat and paraquat-induced mechanisms of developing Parkinson's disease. *Laboratory investigation*, 2016, 96: 496-507.
156. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 23:1-10.
157. Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology*, 2002, 23: 621-633.
158. Gubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Revue Neurologique*, 2015, 171: 750-761.
159. Kin K, Yasuhara T, Kameda M. Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20: 1-14.

160. Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2004, 36: 375-379.
161. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2012, 211: 51-76.
162. Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's disease in primates: the MPTP model. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, 2: a009308.
163. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research*, 2004, 318: 215-224.
164. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *The FEBS journal*, 2012, 279: 1156-1166.
165. Huang C, Lin F, Wang G, Lu D, Wu Q, Liu J, Shi J, Zhang F. Tetrahydroxystilbene glucoside produces neuroprotection against 6-OHDA-induced dopamine neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 41:33-43.
166. Hisahara S, Shimohama S. Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease. *Parkinson's disease*, 2011, 20:1-15.
167. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2011, 1: a009316.
168. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*, 2010, 66: 646-661.
169. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain research*, 2015, 1600: 17-31.
170. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*, 2015, 32: 121-130.

171. Middeldorp J, Hol E. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 2011, 93: 421-443.
172. Booth HD, Hirst WD, Wade-Martins R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis. *Trends in neurosciences*, 2017, 40: 358-370.
173. Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: role and functions in brain pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1-10.
174. Guillamon-Vivancos T, Gomez-Pinedo U, Matias-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia*, 2015, 30: 119-129.
175. Wang H, Song G, Chuang H, Chiu C, Abdelmaksoud A, Ye Y, Zhao L. Portrait of glial scar in neurological diseases. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2018, 31: 2058738418801406.
176. Batassini C, Broetto N, Tortorelli LS, Borsoi M, Zanotto C, Galland F, Souza TM, Leite MC, Gonçalves C-A. Striatal injury with 6-OHDA transiently increases cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural plasticity*, 2015, 31:1-10.
177. van den Berge SA, Kevenaer JT, Sluijs JA, Hol EM. Dementia in Parkinson's disease correlates with α -synuclein pathology but not with cortical astrogliosis. *Parkinson's disease*, 2012, 43:46-59.
178. Frankola K, Greig N, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2011, 10: 391-403
179. Yan L, Zheng D, Xu R-H. Critical role of tumor necrosis factor signaling in mesenchymal stem cell-based therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1-13.

180. Orti-Casan N, Wu Y, Naudé PJ, De Deyn PP, Zuhorn IS, Eisel UL. Targeting TNFR2 as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*, 2019, 13: 49-57.
181. Jung YJ, Tweedie D, Scerba MT, Greig NH. Neuroinflammation as a factor of neurodegenerative disease: thalidomide analogs as treatments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, 7: 313-337.
182. Lecours C, Bordeleau M, Cantin L, Parent M, Paolo TD, Tremblay M-E. Microglial implication in Parkinson's disease: loss of beneficial physiological roles or gain of inflammatory functions? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12: 282-290.
183. Du R-H, Zhou Y, Xia M-L, Lu M, Ding J-H, Hu G. α -Synuclein disrupts the anti-inflammatory role of Drd2 via interfering β -arrestin2-TAB1 interaction in astrocytes. *Journal of neuroinflammation*, 2018, 15: 1-13.
184. Moncada S, Higgs E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology*, 2006, 147: S193-S201.
185. Furchgott R, Cherry P, Zawadzki J, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 1984, 6: S336-343.
186. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84: 9265-9269.
187. Palmer RM, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327: 524-526.
188. Czarnecka A, Lenda T, Domin H, Konieczny J, Smiałowska M, Lorenc-Koci E. Alterations in the expression of nNOS in the substantia nigra and subthalamic

- nucleus of 6-OHDA-lesioned rats: the effects of chronic treatment with L-Dopa and the nitric oxide donor, molsidomine. *Brain research*, 2013, 1541: 92-105.
189. Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015, 9: 322-345.
190. Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochemical research*, 2008, 33: 2416-2426.
191. Zhou L, Zhu D-Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide*, 2009, 20: 223-230.
192. Santos-Lobato BL, Borges V, Ferraz HB, Mata IF, Zabetian CP, Tumas V. Association of a neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism with levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Nitric oxide*, 2018, 74: 86-90.
193. Parlak H, Ozkan A, Dilmac S, Tanriover G, Ozsoy O, Agar A. Neuronal nitric oxide synthase phosphorylation induced by docosahexaenoic acid protects dopaminergic neurons in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2018, 56: 27-37.
194. Ba M, Ding W, Guan L, Lv Y, Kong M. S-nitrosylation of Src by NR2B-nNOS signal causes Src activation and NR2B tyrosine phosphorylation in levodopa-induced dyskinetic rat model. *Human & experimental toxicology*, 2019, 38: 303-310.
195. Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6- hydroxy- dopamine induced degeneration of the nigro- striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1971, 82: 69-93.

196. Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Molecular brain research*, 1996, 39: 127-136.
197. Glajch KE, Fleming SM, Surmeier DJ, Osten P. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*, 2012, 230: 309-316.
198. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 2000, 39: 777-787.
199. Su RJ, Zhen JL, Wang W, Zhang JL, Zheng Y, Wang XM. Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17: 3356-3363.
200. Pajares M, I Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, 2020, 9: 1-32.
201. Dorszewska J, Prendecki M, Lianeri M, Kozubski W. Molecular effects of L-dopa therapy in Parkinson's disease. *Current genomics*, 2014, 15: 11-17.
202. Zhang SF, Xie CL, Lin JY, Wang MH, Wang XJ, Liu ZG. Lipoic acid alleviates L- DOPA- induced dyskinesia in 6- OHDA parkinsonian rats via anti- oxidative stress. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17: 1118-1124.
203. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, 2005, 2: 484-494.

204. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, 2: 325-332.
205. Grealish S, Mattsson B, Draxler P, Björklund A. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6- hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 2010, 31: 2266-2278.
206. Shi L-H, Woodward DJ, Luo F, Anstrom K, Schallert T, Chang J-Y. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Brain research*, 2004, 1013: 98-106.
207. de Araujo DP, De Sousa CNS, Araujo PVP, Menezes CE dS, Sousa Rodrigues FT, Escudeiro SS, Lima NBC, Patrocínio MCA, Aguiar LMV, Viana GS dB. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic Acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA in rat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 43:21-34.
208. Adu TS, Mabandla MV. Effects of bromelain on motor responses following intramedial forebrain bundle 6-OHDA injection in rat model of parkinsonism. *Metabolic Brain Disease*, 2019, 34: 1557-1564.
209. Lima LA, Lopes MJP, Costa RO, Lima FAV, Neves KRT, Calou IB, Andrade GM, Viana GS. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. *Journal of neuroinflammation*, 2018, 15: 1-11.
210. Singh S, Kumar P. Piperine in combination with quercetin halt 6-OHDA induced neurodegeneration in experimental rats: Biochemical and neurochemical evidences. *Neuroscience Research*, 2018, 133: 38-47.

211. Khan MM, Raza SS, Javed H, Ahmad A, Khan A, Islam F, Safhi MM, Islam F. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 2012, 22: 1-15.
212. Hindeya Gebreyesus H, Gebrehiwot Gebremichael T. The Potential Role of Astrocytes in Parkinson's Disease. *Medical Sciences*, 2020, 8: 7-19.
213. Tremblay M-E, Cookson MR, Civiero L. Glial phagocytic clearance in Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*, 2019, 14: 16-30.
214. Ren R, Shi C, Cao J, Sun Y, Zhao X, Guo Y, Wang C, Lei H, Jiang H, Ablat N. Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract of safflower against neurotoxin-induced cellular and animal models of Parkinson's disease. *Scientific reports*, 2016, 6: 1-13.
215. Zhuang W, Chen C, Ma Y, Song L, Lyu E, Fu W. Polyphenols from *Toona sinensis* seeds alleviate neuroinflammation in rats with Parkinson's disease via inhibiting p38MAPK signaling pathway. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 2019, 35: 794-799.
216. Wang Q, Liu Z, Wang Y, Li J, Lu G, Jing Z, Liu Y, Guo Y. Effects of Xiusanzhen treatment on ultrastructure of olfactory bulb and GFAP expression in mice with Parkinson's disease. *Chinese acupuncture & moxibustion*, 2018, 38: 1093-1097.
217. Bortolanza M, Cavalcanti-Kiwiatkoski R, Padovan-Neto FE, da-Silva CA, Mitkovski M, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. Glial activation is associated with 1-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 2015, 73: 377-387.
218. Kery R, Chen AP, Kirschen GW. Genetic targeting of astrocytes to combat neurodegenerative disease. *Neural regeneration research*, 2020, 15(2): 199-211.

219. Yan J, Fu Q, Cheng L, Zhai M, Wu W, Huang L, Du G. Inflammatory response in Parkinson's disease. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10: 2223-2233.
220. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J. Genetic ablation of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and pharmacological inhibition of TNF- synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *Journal of neurochemistry*, 2004, 89: 822-833.
221. Leal MC, Casabona JC, Puntel M, Pitossi F. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013, 7: 53-63.
222. Ping Z, Xiaomu W, Xufang X, Liang S. Vinpocetine regulates levels of circulating TLRs in Parkinson's disease patients. *Neurological Sciences*, 2019, 40: 113-120.
223. Mulas G, Espa E, Fenu S, Spiga S, Cossu G, Pillai E, Carboni E, Simbula G, Jadzic D, Angius F. Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous l-Dopa delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 2016, 286: 83-92.
224. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS, Ferreira NR, Fontanari C, Faccioli LH, Del Bel E. Suppressing nNOS Enzyme by small-interfering RNAs protects SH-SY5Y cells and nigral dopaminergic neurons from 6-OHDA injury. *Neurotoxicity research*, 2019, 36: 117-131.
225. Zhou L, Zhu D-Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide*, 2009, 20: 223-230.
226. Vaz AR, Silva SL, Barateiro A, Fernandes A, Falcão AS, Brito MA, Brites D. Pro-inflammatory cytokines intensify the activation of NO/NOS, JNK1/2 and caspase cascades in immature neurons exposed to elevated levels of unconjugated bilirubin. *Experimental Neurology*, 2011, 229: 381-390.

227. Choi Y-G, Hong Y-M, Kim L-H, Yeo S, Lim S. Moutan Cortex Radicis inhibits the nigrostriatal damage in a 6-OHDA-induced Parkinson's disease model. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2018, 16: 490-498.
228. Guo S, Bezard E, Zhao B. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS–NO pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39: 682-695.
229. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide*, 2010, 23: 153-165.
230. Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal J-S, Amouyel P, Tzourio C, Alperovitch A, Chartier-Harlin M-C. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case–control study. *Human molecular genetics*, 2003, 12: 79-86.
231. Choi J-Y, Park C-S, Kim D-J, Cho M-H, Jin B-K, Pie J-E, Chung W-G. Prevention of nitric oxide-mediated 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate. *Neurotoxicology*, 2002, 23: 367-374.
232. Yuste J, Echeverry M, Ros-Bernal F, Gomez A, Ros C, Campuzano C, Fernandez-Villalba E, Herrero M. 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *neuropharmacology*, 2012, 63: 1258-1267.
233. Pierot L, Desnos C, Blin J, Raisman R, Scherman D, Javoy-Agid F, Ruberg M, Agid Y. D1 and D2-type dopamine receptors in patients with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Journal of the neurological sciences*, 1988, 86: 291-306.
234. Rangel-Barajas C, Silva I, García-Ramírez M, Sánchez-Lemus E, Floran L, Aceves J, Erlij D, Florán B. 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-Dopa

- treatment increase dopamine D1-stimulated [3H]-GABA release and [3H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *neuropharmacology*, 2008, 55: 704-711.
235. Rangel-Barajas C, Coronel I, Floran B. Dopamine receptors and neurodegeneration. *Aging and disease*, 2015, 6(5): 349–368.
236. Gerfen CR. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *The Neuroscientist*, 2003, 9: 455-462.
237. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences*, 1990, 13: 266-271.
238. Shinotoh H, Inoue O, Hirayama K, Aotsuka A, Asahina M, Suhara T, Yamazaki T, Tateno Y. Dopamine D1 receptors in Parkinson's disease and striatonigral degeneration: a positron emission tomography study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1993, 56: 467-472.
239. Cai G, Wang H-Y, Friedman E. Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 302: 1105-1112.
240. Soghomonian JJ. L- Dopa- induced dyskinesia in adult rats with a unilateral 6-OHDA lesion of dopamine neurons is paralleled by increased c- fos gene expression in the subthalamic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 2006, 23: 2395-2403.
241. Lin CH, Huang JY, Ching CH, Chuang JI. Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in

rotenone- induced parkinsonian rats. *Journal of pineal research*, 2008, 44: 205-213.

242. Zheng X, Wu J, Zhu Y, Chen S, Chen Z, Chen T, Huang Z, Wei J, Li Y, Lei W. A Comparative study for striatal-direct and-indirect pathway neurons to DA depletion-induced lesion in a PD rat model. *Neurochemistry international*, 2018, 118: 14-22.



EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı Betül Çiçek Doğum tarihi 10.08.1987 Doğum yeri Erzincan Medeni hali Bekar Uyruğu T.C. Adres Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı 25240 ERZURUM Tel E-mail Metin girmek için burayı tıklatın.
Eğitim
Lise Erzincan Anadolu Milli Piyango Lisesi (2005) Lisans Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2005-2010) Yüksek lisans Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı(2013-2016) Doktora
Yabancı Dil Bilgisi
Metin girmek için burayı tıklatın.
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences


ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Fizyoloji Ana Bilim Dalında doktora Tezi olarak **Prof.Dr. Mustafa Gül** danışmanlığında sunulan “**Deneysel Parkinson Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Bromelain’in Etkilerinin Levodopa ile Kıyaslanarak Araştırılması**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre yazıldığını, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	6	15
Genel Bilgiler	8	30
Materyal ve Metod	11	35
Bulgular	7	10
Tartışma	0	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 02 / 10/ 2020


Öğrenci Adı-Soyadı
İmza
Betül Çiçek


Danışman Adı-Soyadı
İmza
Prof.Dr.Mustafa Gül

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900378916
Konu : HADYEK Kararı.

31.12.2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 19.12.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900366156 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 26.12.2019 tarih ve 16 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 246 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!/birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=6E982C9540B>

TOPLANTI TARİHİ : 26.12.2019

TOPLANTI SAYISI : 16

KARAR NO 246: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fiziyojji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mustafa GÜL'ün yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan “**Deneysel Parkinson Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Bromelain'in Etkilerinin Levodopa ile Kıyaslanarak Araştırılması**” isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 19.12.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900366156 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; (**Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı**), karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



EK-4. TEZ BAŞLIĞI DEĞİŞİKLİĞİ KABUL YAZISI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 20369917-300-E.2000008453
Konu : Betül ÇİÇEK'in Tez Başlığı
Değişikliği Hk.

09.01.2020

DAĞITIM YERLERİNE

Enstitümüz Yönetim Kurulunun 08.01.2019 tarihli oturumunda alınan 20369917-050.02.04-E.2000007359 sayılı, 2020/2 Yönetim Kurulu Kararları konulu belgede yer alan karar metni aşağıya çıkarılmıştır.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Karar 10: Enstitümüz Fizyoloji Anabilim Dalı doktora programı öğrencilerinden **Betül ÇİÇEK'in** tez başlığının **"DeneySEL Parkinson Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Bromelain'in Etkilerinin Levodopa ile Kıyaslanarak Araştırılması"** olarak belirlenmesine, oy birliği ile karar verildi.

Dağıtım:

Gereği:

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığına

Bilgi:

Sayın Prof.Dr. Mustafa GÜL

Atatürk Üniversitesi Enstitüler Binası Kat:1 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2314886
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!/birim=saglik-bilimleri-enstitusu>

Bilgi: Hakan AKSAKAL
Faks: +90 442 2314888

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr



Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=06CBED2DCD8>