



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PARKİNSON MODELLERİNDE VAZOAKTİF
İNTESTİNAL PEPTİD (VIP)'İN STRİATUM VE SUBSTANTİA
NİGRADAKİ α -SİNÜKLEİN BİRİKİMİNE VE NÖROGENEZE
OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEMİLE CEREN MERAL EVİŞ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ORHAN TANSEL KORKMAZ

Eskişehir, 2023



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PARKİNSON MODELLERİNDE VAZOAKTİF
İNTESTİNAL PEPTİD (VIP)'İN STRİATUM VE SUBSTANTİA
NİGRADAKİ α -SİNÜKLEİN BİRİKİMİNE VE NÖROGENEZE
OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEMİLE CEREN MERAL EVİŞ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ORHAN TANSEL KORKMAZ

Eskişehir, 2023

ÖZET

Başlık: Deneysel Parkinson Modellerinde Vazoaktif İntestinal Peptid (VİP)'in Striatum Ve Substantia Nigradaki α -Sinüklein Birikimine Ve Nörogeneze Olan Etkisinin Araştırılması

Amaç: 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) ve rotenon ile oluşturulan deneysel Parkinson modellerinde, nöromodülatör, nörotrofik ve nöroprotektif etkileri olan VİP'in α -sinüklein birikimine ve nörogeneze olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Rotenon ve 6-OHDA Parkinson modelleri için kontrol/sham, toksin ve toksinle VİP uygulanan gruplar olmak üzere 200-250 gram ağırlığında 36 adet Sprague-Dawley sıçan (n=6) kullanıldı. 6-OHDA modeli intrastriatal 6-OHDA çözeltisi stereotaksik olarak; rotenon modeli sekiz hafta süreyle 2,5 mg/kg/gün rotenon intraperitoneal verilerek oluşturuldu. Her iki VİP grubuna sekiz hafta boyunca 25 ng/kg günaşırı VİP, diğer gruplara eşit hacimde serum fizyolojik intraperitoneal uygulandı. Sekizinci haftada lokomotor aktivite testi uygulandı. Sonlandırma sonrası olfaktor bulbus, subventriküler zon (SVZ), dentat girus, striatum ve substantia nigra kesitleri immünohistokimyasal olarak işaretlendi. Kesitlerden elde edilen görüntüler Image-J programında analiz edilerek elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: VİP uygulaması, rotenon grubunda azalan lokomotor aktiviteyi kontrol grubu düzeylerine yaklaştırdı ($p<0,05$), 6-OHDA modelinde etki göstermedi. Rotenon modeli gruplarında α -sinüklein birikiminde anlamlı farklılık gözlenmedi. Her iki toksin modelinde SVZ'de artan nestin immünoreaktivitesine ($p<0,05$) VİP uygulamasının etkisi gözlenmezken; 6-OHDA modelinde VİP uygulaması doublecortin immünoreaktivitesini kontrol ve toksin grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,05$). VİP diğer parametrelerde anlamlı değişikliğe neden olmadı.

Sonuç: Rotenon ve 6-OHDA Parkinson modellerinde nörogenez süreçlerindeki değişim eşzamanlı karşılaştırılmış, *in-vivo* VİP uygulamasıyla 6-OHDA modelinde SVZ nöroblast alanı artarken aynı etkinin rotenon modelinde görülmediği, VİP'in farklı modellerde etkinliğinin farklı olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, 6-hidroksidopamin, rotenon, nörogenez, α -sinüklein, vazoaktif intestinal peptid.

ABSTRACT

Title : Investigation of the Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on α -synuclein Accumulation in Striatum and Substantia Nigra and Neurogenesis in Experimental Parkinson Models

Aim : Our aim is to evaluate the potential effect of VIP, renowned for neuromodulatory, neurotrophic and neuroprotective effects, on α -synuclein accumulation and neurogenesis in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and rotenone experimental Parkinson model rats.

Methods: For rotenone and 6-OHDA models, 36 Sprague-Dawley rats weighing 200-250 grams were used as control/sham, toxicated and toxicated VIP treated groups (n=6). 6-OHDA model was established by stereotaxic injection of 6-OHDA intrastrially, rotenone model was achieved by 2.5 mg/kg/day injection of rotenone intraperitoneally for eight weeks. Both treatment groups received 25 ng/kg VIP every other day throughout eight weeks, other groups received an equal volume of saline intraperitoneally. Locomotor activity test was performed in eighth week. After sacrifice, olfactory bulb, subventricular zone (SVZ), dentate gyrus, striatum and substantia nigra sections were immunohistochemically stained. Section images were analysed using Image-J and data was compared statistically.

Results: While VIP treatment exerted an increase comparable to controls in locomotor activity lowered by rotenone ($p < 0,05$), caused no alterations in 6-OHDA model. No significant alteration in α -synuclein aggregation was observed in rotenone groups. In SVZ, while VIP showed no effect on nestin immunoreactivity elevation in toxicated groups ($p < 0,05$), it increased doublecortin immunoreactivity in 6-OHDA model compared to sham and toxicated groups ($p < 0,05$). VIP did not exert significant alterations in remaining parameters.

Conclusion: Alterations in neurogenesis process was compared simultaneously in rotenone and 6-OHDA Parkinson models, *in-vivo* VIP treatment increased SVZ neuroblast area in 6-OHDA but not rotenone model, providing a differential effect of VIP in distinct models.

Keywords: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, rotenone, neurogenesis, α -synuclein, vasoactive intestinal peptide.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	
ETİK BEYAN	
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bazal Gangliyonlar.....	4
2.1.1. Bazal gangliyonlar ve anatomik bağlantıları.....	4
2.1.2. Bazal gangliyon bağlantılarında dopaminin yeri	6
2.2. Parkinson Hastalığı	8
2.2.1. Parkinson hastalığı ve α -sinüklein	8
2.2.2. Parkinson hastalığı hayvan modelleri	10
2.2.2.1. <i>6-Hidroksidopamin</i>	11
2.2.2.2. <i>Rotenon</i>	12
2.2.3. Parkinson hastalığında motor olmayan bulgular	12
2.3. Erişkin Nörogenez	13
2.3.1. Subventriküler zon	14
2.3.2. Subgranüler zon.....	17
2.3.3. Klasik bölgelerin dışında nörogenez	18
2.4. Vazoaktif İntestinal Peptit	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
3.1. Kullanılan Gereçler	22
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.1.2. Kullanılan cihazlar	22
3.2. Yöntemler.....	23
3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı ve uygulanışı.....	24
3.2.2. Deneysel Parkinson modellerinin oluşturulması.....	25
3.2.2.1. <i>Stereotaksik 6-OHDA lezyon modeli oluşturulması</i>	25
3.2.2.2. <i>Rotenon modeli oluşturulması</i>	26

3.2.3. İn-vivo motor fonksiyon değerlendirmesi.....	26
3.2.3.1. Lokomotor aktivite testi	26
3.2.4. Sonlandırma prosedürü ve doku eldesi	27
3.2.4.1. Perfüzyon fiksasyonu	27
3.2.4.2. Beyin dokularının çıkarılması.....	27
3.2.5. İmmünohistokimyasal işlemler	29
3.2.5.1. Kullanılan primer antikorlar	29
3.2.6. Görüntü eldesi	30
3.2.6.1. Nörogeniz değerlendirmesi için alınan görüntüler.....	30
3.2.6.2. Alfa-sinüklein ve tirozin hidroksilaz değerlendirmesi için alınan görüntüler	31
3.2.7. Görüntü analizleri.....	31
3.2.8. İstatistiksel değerlendirme.....	33
3.3. Araştırmanın Kısıtlılıkları	34
4. BULGULAR	35
4.1. Lokomotor Aktivite Testi Analizleri.....	35
4.2. İmmünohistokimyasal İşaretleme Analizleri	37
4.2.1. Tirozin hidroksilaz immünoreaktivitesi	37
4.2.2. Alfa-sinüklein immünoreaktivitesi.....	41
4.2.3. SVZ’de GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktivitesi.....	43
4.2.4. OB’de GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktivitesi.....	47
4.2.5. DG bölgesinde DCX ve nestin immünoreaktivitesi.....	52
4.2.6. Nigral DCX ve nestin immünoreaktivitesi	54
4.2.7. Diğer bulgular	55
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	66
8. EKLER DİZİNİ.....	81
EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı	
EK-2. İntihal Raporu	
EK-3. Otofloresan Görüntüleme Örnekleri	
EK-4. Diğer Bulgularla İlgili Görseller	
9. ÖZGEÇMİŞ	89
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Striatumun kortikal girdileri ve projeksiyonları.....	6
Şekil 2.2.	Nörogenez bölgelerinin şematik gösterimi	14
Şekil 2.3.	SVZ hücrelerinin şematik olarak gösterimi	15
Şekil 2.4.	OB hücre tabakaları.....	16
Şekil 2.5.	Hipokampal DG hücrelerinin şematik olarak gösterimi	18
Şekil 3.1.	Deney akış çizelgesi	24
Şekil 3.2.	Stereotaksimetre sistemi	25
Şekil 3.3.	Lokomotor aktivite test düzeneği	27
Şekil 3.4.	Koronal kesi seviyelerinin görüntülenmesi.....	28
Şekil 3.5.	Elde edilen parafin bloklar	28
Şekil 3.6.	Nörogenez değerlendirmesi yapılan bölgelerin gösterilmesi	31
Şekil 3.7.	Image J programında “threshold” fonksiyonunun gösterilmesi.....	32
Şekil 3.8.	SVZ bölgesinde ölçüm alınan alanın gösterilmesi.....	32
Şekil 3.9.	SNC bölgesi alan çiziminin gösterilmesi	33
Şekil 4.1.	6-OHDA modeli grupları arasında lokomotor aktivite test verilerinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.2.	Rotenon modeli grupları arasında lokomotor aktivite test verilerinin karşılaştırılması	36
Şekil 4.3.	6-OHDA modeli grupları arasında striatal TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	37
Şekil 4.4.	6-OHDA modeli gruplarında striatal TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi	37
Şekil 4.5.	Rotenon modeli grupları arasında striatal TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	38
Şekil 4.6.	Rotenon modeli grupları arasında striatal TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi	38

Şekil 4.7. 6-OHDA modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	39
Şekil 4.8. 6-OHDA modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi	39
Şekil 4.9. Rotenon modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	40
Şekil 4.10. Rotenon modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi	40
Şekil 4.11. Rotenon modeli gruplarında striatal α -sinüklein immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	41
Şekil 4.12. Rotenon modeli gruplarında striatal α -sinüklein immünoreaktivitesinin gösterilmesi	41
Şekil 4.13. Rotenon modeli gruplarında SNr ve SNc α -sinüklein immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	42
Şekil 4.14. Rotenon modeli gruplarında SNr ve SNc α -sinüklein immünoreaktivitelerinin gösterilmesi	42
Şekil 4.15. SVZ bölgesinde GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktivitelerinin gösterilmesi	43
Şekil 4.16. 6-OHDA (a) ve rotenon (b) modeli gruplarında GFAP immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	44
Şekil 4.17. 6-OHDA modeli gruplarında SVZ nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	44
Şekil 4.18. Rotenon modeli gruplarında SVZ nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	45
Şekil 4.19. 6-OHDA modeli gruplarında SVZ DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	45
Şekil 4.20. Rotenon modeli gruplarında SVZ DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	46
Şekil 4.21. SVZ’de NeuN immünoreaktivitesinin gösterilmesi	46

Şekil 4.22. OB bölgesinde GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktivitelerinin gösterilmesi	47
Şekil 4.23. 6-OHDA modeli gruplarında OB GFAP immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	48
Şekil 4.24. Rotenon modeli gruplarında OB GFAP immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	48
Şekil 4.25. 6-OHDA modeli gruplarında OB nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	49
Şekil 4.26. Rotenon modeli gruplarında OB nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	49
Şekil 4.27. 6-OHDA modeli gruplarında OB DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	50
Şekil 4.28. 6-OHDA modeli gruplarında OB DCX immünoreaktivitesinin gösterilmesi	50
Şekil 4.29. Rotenon modeli gruplarında OB DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	51
Şekil 4.30. 6-OHDA modeli gruplarında OB NeuN immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	51
Şekil 4.31. Rotenon modeli gruplarında OB’de NeuN immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	52
Şekil 4.32. DG bölgesinde GFAP, DCX ve NeuN immünoreaktivitelerinin gösterilmesi	52
Şekil 4.33. 6-OHDA modeli gruplarında DG bölgesi DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	53
Şekil 4.34. Rotenon modeli gruplarında DG bölgesi DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması	53
Şekil 4.35. DG’de nestin immünoreaktivitesinin gösterilmesi.....	54
Şekil 4.36. SN bölgesinde nestin ve DCX immünoreaktivitesi.....	55

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar
6-OHDA	:6-hidroksidopamin
BDNF	:Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BOS	:Beyin omurilik sıvısı
BrdU	:Bromodeoksiüridin
DAB	:3,3'-diaminobenzidin
DAT	:Dopamin taşıyıcısı
DCX	:Doublecortin
DG	:Dentat girus
DNA	:Deoksiribonükleikasit
EGFR	:Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EPN	:Entopedinküler nükleus
FGF-2	:Fibroblast büyüme faktörü-2
GABA	:Gama amino bütirik asit
GL	:Glomerüler tabaka
Gpe	:Globus pallidus eksternus
Gpi	:Globus pallidus internus
i.p.	:İntraperitoneal

IPC	:Ara öncül hücreler
kg	:Kilogram
KK	:Korpus kallosum
LV	:Lateral ventrikül
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
MPTP	:3-metil-4-fenil-tetrahidropiridin
MSN	:Medium spini nöron
NeuN	:Nöronal çekirdek
ng	:Nanogram
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NKH	:Nöral kök hücre
nM	:Nanomolar
NO	:Nitrik oksit
OB	:Olfaktör bulbus
ONL	:Olfaktör sinir tabakası
OSN	:Olfaktör duyu nöronları
OV	:Olfaktör ventrikül
PACAP	:Pitüiter adenilat siklaz aktifleyen polipeptit
PAC1	:PACAP reseptörü 1
PBS	:Fosfat tamponlu salin

PCNA	:Proliferatif hücre çekirdek antijeni
PFA	:Paraformaldehit
PSA-NCAM	:Poli-sialil-nöral hücre adhezyon molekülü
REM	:Hızlı göz hareketleri
RMS	:Rostral göç akımı
ROS	:Reaktif oksijen türevleri
SGZ	:Subgranüler zon
SN	:Substantia nigra
SNc	:Substantia nigra pars kompakta
SNr	:Substantia nigra pars retikülata
STN	:Subtalamik nükleus
SVZ	:Subventriküler zon
TH	:Tirozin hidroksilaz
VEGF	:Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VİP	:Vazoaktif intestinal peptit
VPAC	:VİP reseptörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bazal gangliyonlar, temelde motor kontrol ve istemli hareketten sorumlu nükleuslar grubudur. Substantia nigra (SN), pars kompakta (SNc) ile bazal gangliyonların kortikal girdiyi alan temel kısmı olan striatum üzerinde dopaminerjik modülasyon gerçekleştirirken; pars retikülata (SNr) ile motor kontrol devresinin talamusa olan çıktısına katkı sağlar (Crittenden & Graybiel, 2011). Parkinson hastalığı, SNc'den striatuma projeksiyon yapan dopaminerjik nöronların hasarıyla ortaya çıkan motor bulgularla tanımlanmış, bunun yanında nöropsikiyatrik, otonom, duyuşsal, gastrointestinal şikayetlerin, koku ve uyku bozukluklarının semptomları oluşturduğu motor olmayan bulgularla da karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (Alexander, 2004; Chaudhuri vd., 2011). Günümüzde hastalığın patolojisine karşı bazı sınırlı semptomatik tedaviler uygulansa da, hastalıktaki ilerleyici nörodejenerasyonun durdurulması henüz mümkün değildir.

Parkinson hastalığının patolojik bulgusu olan Lewy cisimcikleri ve nöritlerindeki agregatların temel yapısını oluşturan α -sinüklein, santral sinir sisteminde katekolaminerjik sinaps yapısının oluşturulmasında ve vezikül trafiğinde önemi bilinen bir proteindir (Cheng vd., 2011; Taguchi vd., 2019). Agregate α -sinüklein, dopamin sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan tirozin hidroksilaz (TH) aktivitesini azaltarak dopamin sentezini bozar, aynı zamanda stabil dopamin salıverilmesini de engeller ve Parkinson patolojisini indükler (Giráldez-Pérez vd., 2014).

Nörogenez, memeli santral sinir sisteminde erişkin hayatta devam ettiği bilinen, subventriküler zon ve hipokampal dentat girus subgranüler zonda süreçleri ayrıntılı şekilde ortaya konmuş; hipotalamus, serebellum, korteks, striatum ve SN gibi pek çok bölgede de varlığıyla ve mekanizmalarıyla ilgili değişik düzeylerde kanıtların literatürde yer aldığı bir süreçtir (Jurkowski vd., 2020; Mamber vd., 2013; Pino vd., 2017). Subventriküler zonda yerleşik öncül hücrelerle başlayan nörogenez süreci, rostral göç akımı ile olfaktör bulbusa yönelir ve öncül hücrelerin olgunlaşarak sinirsel devrelere entegrasyonu ile sonlanır. Subgranüler zon bölgesi de öğrenme, hafıza gibi ileri fonksiyonların hipokampal devrelere katkı sağlar (Pino vd., 2017). Çeşitli patolojilerde bu öncül hücre havuzlarının farklı bölgelere göç edip etmediği ya da başka bölgelerde hücrelerin benzer bir öncüllük vasfı elde ederek

tamir mekanizmalarına dahil olma ihtimali hücrel belirteçler yardımıyla araştırılmaktadır.

Vazoaktif intestinal peptit (VIP), çeşitli visseral fonksiyonları yanında, bağışıklık sistemi hücrelerinde ve nöronal sonlanmalarda bulunan, antioksidan, antiinflamatuvar, nörorejeneratif, myelinizasyon sağlayıcı, nöroprotektif etkinliği gösterilmiş bir peptittir (Korkmaz & Tunçel, 2019). Nöroinflamatuvar süreçlerde VIP, astrositlerin aşırı çoğalmasını engeller, nöron ölümünü azaltır (Morell vd., 2012). 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) toksisitesine karşı nöron koruyucu olduğu, MPTP fare modelinde nigrostriatal dopaminerjik nöron ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Delgado & Ganea, 2003; Offen vd., 2000). Tunçel ve ark.'nın 6-OHDA sıçan Parkinson modeli ile yaptıkları çok sayıda çalışmada VIP; nöronal hasarı ve demyelinizasyonu azaltmış (Tunçel vd., 2005), striatal nöronlarda 6-OHDA etkisiyle azalan dendritik dallanma sayısını değiştirmeden dendritik diken yoğunluğunu arttırmış ve nigral dopaminerjik nöron kaybını engellemiştir (Korkmaz vd., 2012). VIP, striatal ve talamik gama amino bütirik asit (GABA) düzeylerini arttırmış, striatal dopamin düzeylerini değiştirmeden motor fonksiyon asimetrisini geri döndürmüştür (Korkmaz vd., 2010; Tunçel vd., 2005; Yelkenli vd., 2016). VIP, erken postnatal sıçanlardan elde edilen hipokampal kök hücre kültüründe proliferasyonu arttırarak öncül hücrelerin nestin pozitif fenotip yönüne bölünmesini sağlamıştır (M. Zaben vd., 2009). VIP ayrıca, mikroglia kaynaklı interleükin-4 aracılı proliferatif etkiyi de arttırmış (Nunan vd., 2014) ve nöronal farklılaşmada rolü olduğu öne sürülmüştür (M. Zaben vd., 2009). Bir başka çalışmada ise VIP ve aynı peptit ailesinden olup VIP ile ortak reseptörleri kullanan bir diğer molekül pitüiter adenilat siklaz aktifleyen polipeptit (PACAP) uygulaması, hücrelerin apoptozuyla birlikte nöronal veya glial farklılaşmasını engellemiş (Scharf vd., 2008); bu etkiler farklı yazarlar tarafından farklı reseptör etkileşimleriyle ilişkilendirilmiştir (Scharf vd., 2008; M. J. Zaben & Gray, 2013). Fare hipokampusunda nörogenezle ilgili *in-vivo* bir çalışmada ise VIP eksprese eden ara nöronların nestin eksprese eden öncüller üzerine etkisi gösterilememiştir (Song vd., 2012). VIP ile nörogenezi ilişkilendiren *in-vivo* çalışmaların azlığı, *in-vitro* bulgular ile *in-vivo* çalışmalar arasındaki farklılıklar, VIP'in nörogenez üzerine etkisiyle ilgili *in-vivo* çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Nigrostriatal hasarın oluşumunda da rolü olan nitrik oksitin (NO), subventriküler zon ve olfaktör bulbusta nörogenezi azalttığı gösterilmiştir (Y. He vd., 2003; Moreno-López vd., 2004). VİP, 6-OHDA modelinde striatumda NO düzeyini azaltmış; GABA düzeylerini ve sinir büyüme faktörü (NGF) ifade eden mast hücrelerini ise arttırmıştır (Korkmaz vd., 2010; Tunçel vd., 2012; Yelkenli vd., 2016). NGF, Parkinson hastalarında ve 6-OHDA modeli sıçanlarda serum düzeylerinin azaldığı gösterilmiş bir nörotrofindir (Lorigados Pedre vd., 2002; Müller vd., 2005). GABA'erjik uyarının ise; erişkin nörogenez süreçlerinde önemi ortaya konmuştur (Ge vd., 2007). VİP'in striatal ve talamik GABA düzeylerini değiştirebilmesi, NO ve NGF üzerindeki etkinliğiyle birlikte değerlendirildiğinde, VİP'in nörogeneze de etki edebileceği hipotezini doğurmaktadır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda planlanan bu tez çalışmasında iki farklı Parkinson sıçan modelinde, nörogenezin yoğun olarak gerçekleştiği bilinen bölgelerde farklı öncül hücre popülasyonlarında olası değeriklikleri hücre sel belirteçler aracılığıyla değerlendirmek; nöromodülatör, nörotrofik ve nöroprotektif bir moleköl olan VİP'in nörogenez sürecine etkisini araştırmak amaçlanmaktadır. Bunun yanında α -sinüklein patolojisi gösterdiği bilinen rotenon modelinde, Parkinson hastalığının patolojik bulgusu olan α -sinüklein agregasyonuna VİP'in olası etkisi de araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bazal Gangliyonlar

Bazal gangliyonlar, beyin hemisferlerinin derininde yerleşmiş, motor kontrolden sorumlu, bunun yanında motor öğrenme, davranış ve duygulanımla ilgili nükleuslar grubudur. Geçmişte bazal gangliyonların yalnızca istemli harekette görev aldığı düşünülürken, artık genel kabul gören görüş şu şekildedir: Bazal gangliyonlar istemli hareketten başka, skeletomotor, okülomotor, kognitif ve emosyonel davranışların oluşmasında görev alır (Kandel vd., 2000).

2.1.1. Bazal gangliyonlar ve anatomik bağlantıları

Bazal ganglionlar yapısında birbiriyle bağlantılı çok sayıda nükleustan oluşmakla birlikte; bağlantıları yönünden 4 temel yapıda incelenir. Striatum, globus pallidus (GP), substantia nigra (SN) ve subtalamik nükleus (STN) bu yapılardır. Serebral korteks, talamus ve SN'den gelen bilginin alıcısı olan kaudat nükleus, putamen ve akübens nükleus, birlikte striatumu oluşturur. Striatumun projeksiyonları, GP'nin dış segmentine (GPe), iç segmentine (GPi) ve SN'nin SNr bölgesine olur. Bu projeksiyonların doğrudan GPi ve SNr'ye ulaştığı yol monosinaptik direkt yoldur. İlk durağı GPe olan projeksiyonlar ise buradan STN aracılığıyla yahut aracısız olarak yine GPi ve SNr'ye ulaşır; buna indirekt yol denir. GPi ve SNr, bazal gangliyonların oluşturduğu bilgiyi talamusa (ventral çekirdeğe) ve beyin sapına gönderen çıktı nükleuslarıdır. Talamustan kortekse olan projeksiyonlar eksitatördür; bazal gangliyonların çıktı nükleusları (GPi ve SNr) ise yüksek frekanslı tonik inhibitör deşarjlarla talamusu kontrol altında tutar. Talamusun frontal loba verdiği projeksiyonların frontal lob içinde yönlendirildiği bölge yine frontal korteksten bazal ganglion devresine striatum üzerinden girdi sağlayan aynı bölgeleridir ve böylece korteks, bazal gangliyonlar ve talamus arasında bir çember devre oluşur (Kandel vd., 2000).

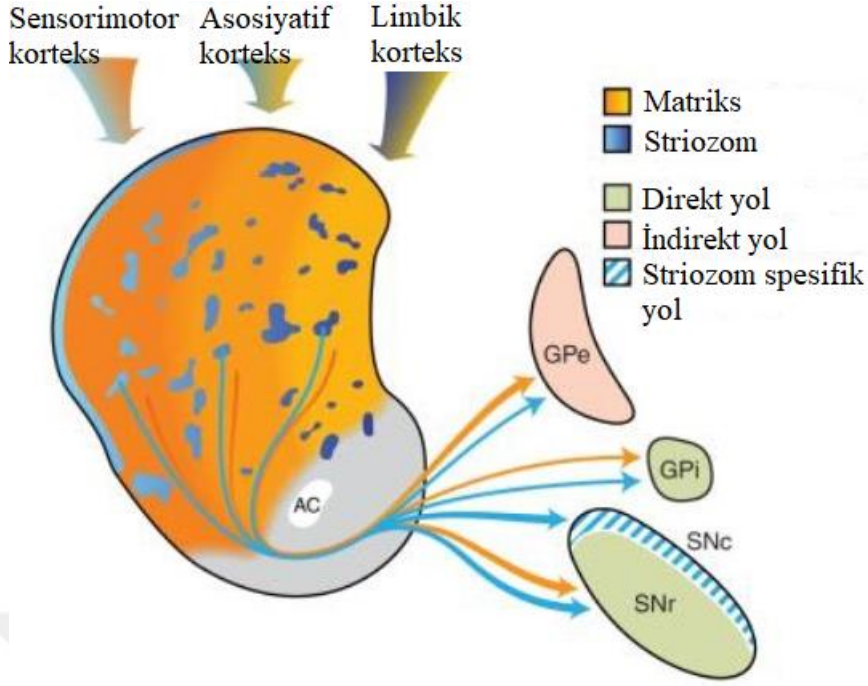
Direkt yol ile indirekt yolun GPi, SNr ve talamus üzerindeki etkileri birbirine zıttır. Direkt yolun aktivasyonu, çıktı nükleusları olan GPi ve SNr'deki tonik aktiviteli nöronları kısa süreli (fazik) inhibe ederek bu nöronların talamusa olan inhibitör deşarjlarını geçici olarak durdurur; böylece talamokortikal aktiviteyi artırıp hareketin ortaya çıkarılmasını sağlar. İndirekt yolun aktive olması halinde ise GPe nöronları baskılanır, bu da STN üzerindeki tonik inhibisyonun kaldırılmasına yol

açar. STN kaynaklı eksitatör (uyarıcı) deşarjların artışı çıktı nükleuslarının tonik aktiviteli nöronlarını daha fazla uyarır ve talamus üzerine gönderilen tonik inhibitör deşarjlar arttırılır, talamokortikal nöronlar daha çok inhibe olur; böylece hareket yavaşlatılır veya durdurulur (Lanciego vd., 2012).

STN; GPe'den, serebral korteksten, talamustan ve beyin sapından girdiler toplar; GPe, GPi ve SNr'ye projeksiyonlar gönderir; oluşturduğu bu kısa devreye hiperdirekt yol da denir (Kandel vd., 2000).

Striatumun fonksiyonel yapısı ile ilgili klasik modele göre striatal çıktı nöronları, yani dikenli projeksiyon nöronlarının (medium spini nöron, MSN) direkt ve indirekt yol nöronları olarak sınıflanması, hareketin kontrolünün açıklanması için kullanışlıdır. Diğer yandan, öğrenme ve karar verme ile ilgili başka striatal fonksiyonlar içinse, çıktı veren nöronların striozom ve matriks nöronları olarak sınıflanması, nöronal bağlantılar ve gerçekleştirilen görevler bağlamında uygun bulunmuştur (McGregor vd., 2019).

Striatum; limbik, asosiyatif ve sensorimotor korteksten girdiler alır. Striatumun laterali sensorimotor ve asosiyatif; mediali ise limbik korteksten girdi alır. Limbik girdiler daha çok striozomlara yönelirken; sensorimotor ve asosiyatif alanlardan gelen girdiler çoğunlukla matrikse doğrudur (Şekil 2.1.) (Crittenden & Graybiel, 2011; Perrin & Venance, 2019).



Şekil 2.1. Striatumun kortikal girdileri ve projeksiyonları

Renklerin işaret ettiği striatal alt bölgeler ve projeksiyonları şekil üzerinde belirtilmiştir. Striatuma projeksiyon gönderen merkezler medialden laterale doğru limbik, asosiyatif ve sensorimotor korteks olarak belirtilmiş ve striatal renk geçişinde şematize edilmiştir. Limbik korteksin daha çok striozomlara, motor ve asosiyatif kortekslerin daha çok matrikse projekte olduğu renk kodlarıyla şematize edilmiştir. Gri alan akümbens nükleusu gösterir. AC; anterior kommisur. Kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır (Crittenden & Graybiel, 2011).

2.1.2. Bazal gangliyon bağlantılarında dopaminin yeri

SN'nin SNc bölgesi; ventral tegmental alanın bazı kısımları ve orta beyindeki başka bazı bölgeler gibi dopaminerjik nöronların kalelerinden biridir ve buradan çıkan dopaminerjik projeksiyonlar striatuma ve diğer bazal gangliyon nükleuslarına gider (Kandel vd., 2000).

Striatumda en çok bulunan nöron tipi aksonal sonlanmalarından GABA salıveren yani GABA'erjik MSN'lerdir. Bu ismi küçük-orta boyutlu hücre gövdelerinden ve dendritleri üzerinde bulundurdıkları çok sayıda dikenden alırlar. Kortikal ve talamik projeksiyonlardan başka, striatumdaki kolinerjik ve GABA'erjik lokal ara nöronlar da bu dendritik dikenler üzerine çok sayıda sonlanma gönderir.

Bunlardan başka SNc ve ventral tegmental alandan gelen dopaminerjik sonlanmalar da MSN'leri modüle eder (Kandel vd., 2000; Lanciego vd., 2012) .

Çok çeşitli hücre tipleri bulunmakla birlikte striatal hücre popülasyonunda çoğunluğu oluşturan striatal projeksiyon nöronları (MSN), çıktıdan sorumlu tek yapıdır. Projeksiyonları, matriksten direkt ve indirekt yolda SNr/GPi ve GPe'ye, striozomal yolda striozomlardan SNc'ye olur (Şekil 2.1.) (Crittenden & Graybiel, 2011; Matsuda vd., 2009). Dopamin reseptör özelliği açısından da MSN'ler farklılık gösterir. GPe'ye projeksiyon veren indirekt yol nöronları D2 reseptörleri, enkefalin ve nörotensin eksprese ederken; GPi (sıçan beyinde karşılığı entopedinküler nükleus, EPN) ve SNr'ye projeksiyon veren direkt yoldaki nöronlar ise D1 reseptörleri, substans P ve dinorfin eksprese eder. Çeşitli çalışmalarda, %6 ila %60 arasında değişen oranlarda hem D1 hem D2 reseptörleri birlikte eksprese edebilen MSN'lerin varlığı ve bu nöronların heteromerik D1/D2 reseptörü de bulundurabildikleri gösterilmiştir (Bertran-Gonzalez vd., 2010; Perreault vd., 2011).

Direkt yolda doğrudan SNr ve GPi'ye sonlanmalarını gönderen striatal efferent nöronlar; D1 reseptörlerini yoğun olarak bulundurur ve bu reseptörlerin aktivasyonu nöronal transmisyonu kolaylaştırır. İndirekt yolda projeksiyon veren striatal nöronlarda ise D2 reseptörleri yoğundur ve bu reseptörler uyarıldığında nöronal transmisyon baskılanır (Kandel vd., 2000).

SNc kaynaklı dopamin striatal nöronlar üzerine salıverildiğinde; direkt yolun nöronları D1 reseptörleri aracılığıyla uyarılıp direkt yolun neden olduğu talamokortikal aktivitedeki artış kuvvetlendirilirken, indirekt yolun nöronları D2 reseptörleri aracılığıyla baskılanır ve indirekt yolun aktivasyonu ile ortaya çıkan talamokortikal baskılanma (inhibisyon) hafifletilir. Nihai dopaminerjik etki her iki yol üzerinden de arttırılmış bir talamokortikal aktivasyon ve hareketin kolaylaştırılmasıdır. Dolayısıyla, striatumdaki dopamin düzeyinin azalması, Parkinson hastalığında olduğu gibi, hareket bozukluklarına yol açmaktadır.

Tüm bu bilgiler bazal gangliyonlar ve dopamin ilişkisinin anlaşılması ve değerlendirilmesini kolaylaştırmıştır; ne var ki, sıçan striatumunda bir MSN'nin yaklaşık 200 dopaminerjik nöronun etkisi altında olduğu, her bir dopaminerjik nöronun 75.000 striatal nöronla bağlantı kurabildiği, bu sayının primatlarda milyona ulaşabildiği göz önüne alındığında dopaminin etkisinin yalıtılmış bir etkiden çok

striatal bağlantıların geneli üzerinde yoğun modölatör bir etki olduğu anlaşılacaktır (Lanciego vd., 2012; Matsuda vd., 2009).

2.2.Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, 60 yaş üstü nüfusun %1'ini etkileyen, nigrostriatal yolaktaki dopaminerjik nöronların progresif kaybı ve buna bağlı olarak bazal ganglion dopaminerjik girdilerinin azalmasına bağlı; harekette yavaşlama, rijidite ve istirahat tremoru gibi karakteristik motor bulguların olduğu ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır (Alexander, 2004). İlk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlanmıştır (Parkinson, 2002).

Parkinson hastalığı, motor bulguları yönünden hipokinetik karakterde bir hareket bozukluğu tablosudur. Akinezi (hareketi başlatmada güçlük), bradikinezi (istemli hareketlerin amplitüd ve hızında azalma), rijidite (pasif harekete karşı artmış kas direnci), istirahat tremoru (4-6 Hertz frekanslı titremeler) ve fleksiyon postürü görülmesi tanısaldır (Fahn, 2003; Jankovic, 2008; Regensburger vd., 2014). Yürüme ve konuşmada bozukluklar, yazı karakterinde değişme, parmak kavrama fonksiyonunda bozulma, hedefe yönelik hareket sırasında ortaya çıkan istirahat tremoru gibi çok çeşitli sekonder motor bulguların da görülebileceği bilinmektedir (Moustafa vd., 2016). Parkinson hastalığının patolojik bulguları, SNc dopaminerjik nöronlarının kaybı ve Lewy cisimcikleri olarak bilinen protein çökeltilerinin dopaminerjik nöronlarda gözlenmesidir. Bu nöronlardaki dejenerasyon striatal dopamin düzeyinde %80'lik bir azalmaya yol açtığı ve SNc dopaminerjik nöronlarında %60-70'lik kayıp olduğunda motor semptomlar ortaya çıkar (Dauer & Przedborski, 2003; Tieu, 2011).

2.2.1.Parkinson hastalığı ve α -sinüklein

Alfa-sinüklein; santral sinir sisteminde çoğunlukla katekolaminerjik sinapslarda bulunan, sinaps yapısının oluşturulması ve sağlığında, sinaptik vezikül trafiğinde görevi olduğu düşünülen bir proteindir (Cheng vd., 2011; Taguchi vd., 2019). Parkinson hastalığının da dahil olduğu sinükleinopatilerde patolojik bulgu olan Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri olarak bilinen intraselüler agregatların temel bileşeni de α -sinükleindir (Stefanis, 2012; Taguchi vd., 2019). Alfa-sinükleinin ekstraselüler alanda da bulunabildiği, nöronal sonlanmalardan aktivite ilişkili olarak

salıverildiği, Lewy cisimciklerinin gözlendiği nörodejeneratif hastalıklarda bu yolun da önemi olduğu bildirilmiştir (Lee vd., 2014; Yamada & Iwatsubo, 2018).

Agregatlar çözünür formdaki α -sinükleinin çözünmez hale geçip agregat çekirdeğini oluşturmasıyla başlar. Doğal halinde katlanmamış yapıya sahipken, membran fosfolipidlerine bağlanmasıyla alfa-helikal, uzun süre inkübasyon sonrası beta-helikal yapı kazanır (Stefanis, 2012). Agregasyon eğilimi arttıkça α -sinükleinin proteininin yapısı amiloid benzeri fibrillere dönüşür (Si vd., 2017; Stefanis, 2012). Bu nedenle agregat oluşumu için endojen α -sinükleinin ekspresyonu gereklidir (Taguchi vd., 2019). Hipokampal GABA'erjik nöronlarda α -sinükleinin ekspresyonunun düşük olduğu ve Lewy cisimciklerinin oluşmadığı, buna karşın önceden oluşturulmuş α -sinükleinin fibrillerinin verilmesiyle agregatların görüldüğü bildirilmiştir (Taguchi vd., 2014).

Alfa-sinükleinin proteininin nöronlarda aşırı ekspresyonunun inklüzyon cisimcikleri oluşumuna ve nöron kaybına neden olduğu gösterilmiştir. İntraselüler α -sinükleinin seviyeleri nörodejeneratif hastalıklar açısından risk oluşturmaktadır (Taguchi vd., 2019). Alfa-sinükleinin, dopamin sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan tirozin hidroksilaz (TH) aktivitesini azaltarak dopamin sentezini bozabilir. Tirozin hidroksilazın defosforile yani inaktif konumda kalmasını sağlayarak dopamin sentezini azaltır. Bu etki fosforillenmiş α -sinükleinin için gösterilememiştir. Alfa-sinükleinin, dopaminin veziküle alınmasında ve veziküllerin stabil dopamin salıverilmesini sağlayacak şekilde konumlandırılmasında da görevlidir. Alfa-sinükleinin fizyolojik olarak ubiquitin-proteazom ve otofaji-lizozom sistemleri aracılığıyla yıkılır. Oksidatif stres ilişkili mekanizmalar proteinin agregasyonunu kolaylaştırır. Proteazom ve otofaji inhibitörleri α -sinükleinin yıkımını zorlaştırır (Giráldez-Pérez vd., 2014).

Alfa-sinükleinin proteinini kodlayan SNCA geninde aminoasit değişikliğine neden olan çeşitli mutasyonların otozomal dominant kalıtılan Parkinson hastalığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Si vd., 2017). SNCA gen bölgesi duplikasyonları ve triplikasyonları da otozomal dominant kalıtmalı Parkinson hastalığına neden olmaktadır. Gen bölgesi triplikasyonunun, erken başlangıçlı ve ciddi seyirli Parkinson hastalığına neden olduğu bildirilmiştir (Stefanis, 2012).

Bazal gangliyon yapılarında α -sinüklein ekspresyonu bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. SNC, SNr'ye göre çok daha zayıf α -sinüklein boyanması gösterir. Taguchi ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları çalışmada SNC'de dopaminerjik nöronların sitoplazmasında, ayrıca hem eksitator hem inhibitör sinapsların bazılarında α -sinüklein pozitifliği gözlenmiştir. SNr'de α -sinüklein daha çok inhibitör sinapslarda kolokalizedir (Taguchi vd., 2016).

Bazal ganglionların çıktığı nükleusları olan SNr/GPi ile GPe'de, α -sinüklein pozitifliği eksitator sinapslardan çok inhibitör sinapslarda kolokalizedir. Bu yapıların afferent girdilerinin striatal MSN'lerden gelen yoğun GABA'erjik innervasyon olduğu düşünüldüğünde, MSN'ler yoğun olarak α -sinüklein eksprese etmektedir. Striatum, STN ve talamus ise GABA'erjik innervasyon açısından zengin olmalarına karşın, buralarda α -sinüklein daha çok eksitator sinapslarda kolokalizedir. Buna göre; STN ile talamusa aksonlarını gönderen GPe ile GPi/SNr yapılarında yerleşmiş GABA'erjik nöronların α -sinüklein ekspresyonlarının düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Taguchi vd., 2016, 2019).

Yaşa bağlı artan α -sinüklein ekspresyonu, nigral TH ekspresyonunu baskılar. Alfa-sinüklein proteinini aşırı eksprese eden farelerde proteaza dirençli α -sinüklein birikimiyle birlikte nöron ölümünün eşlik etmediği motor davranışlarda bozulma izlenmiştir (Cheng vd., 2011).

2.2.2. Parkinson hastalığı hayvan modelleri

Parkinson hastalarının çoğunda hastalığın oluşma nedeni bilinmemektedir. Hastaların %10'undan azında tek gen mutasyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hastalığın ortaya çıkmasında, çevresel etmenler ve genetik özelliklerin aynı bireyde bir araya gelmesi rol oynamaktadır. Bu bağlamda, Parkinson hastalığı çalışmaları için model oluştururken, dış kaynaklı nörotoksik ajanlar, hastalıkla ilişkili olduğu bilinen genetik mutasyonlar veya bunların kombinasyonları kullanılmıştır (Tieu, 2011).

Dopamine yapısal benzerlik gösteren bazı kimyasallar dopaminerjik nöronları hasarlayarak Parkinson benzeri fenotipe neden olabilir. Tarımda kullanılan bazı kimyasallara kronik maruziyet de Parkinson hastalığı gelişme riskini artırır. Parkinson hastalığı hayvan modellerinde sıkça kullanılan nörotoksinler; 6-

hidroksidopamin (6-OHDA), 3-metil-4-fenil-tetrahidropiridin (MPTP), rotenon, parakuat gibi maddelerdir (Dauer & Przedborski, 2003; Zeng vd., 2018).

2.2.2.1. 6-Hidroksidopamin

6-Hidroksidopamin (6-OHDA), kan beyin bariyerini geçemediğinden intraserebral enjeksiyonla uygulanarak, SNc veya striatuma uygulama sonrası dopamin taşıyıcısı (DAT) aracılığıyla dopaminerjik nöronlara alınır, mitokondride birikir ve mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I ve kompleks IV inhibisyonu üzerinden mitokondriyal membran potansiyelini düşürür (Zeng vd., 2018). SNc dopaminerjik nöronları yüksek reaktif oksijen türevleri ve düşük glutatyon peroksidaz düzeylerine sahip olmaları, dopaminin otooksidasyona açık bir molekül olması nedeniyle oksidatif strese karşı hassas nöronlardır (Hernandez-Baltazar vd., 2017). Hücre içine alınan 6-OHDA, otooksidasyona ve metabolik yıkıma uğrayarak, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikallerini oluşturur. Hücresel yapıların oksidasyonu sonucu oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyona yol açar. GABA ve glutamati arttırıp glutamini azaltması astrosit-nöron arası glutamin-glutamat dengesini bozarak eksitasyon-inhibisyon devrelerinin işlevselliğine zarar verir (Zeng vd., 2018).

İntrastriatal uygulanan 6-OHDA, striatal sonlanmalarda hasarı başlatarak, takiben SNc nöronlarının progresif ölümüne neden olur. Bu yolla ortaya çıkan SNc nöron ölümü, toksinin nigral uygulandığı modele göre daha az olup nigral nöronların yaklaşık %50-70'inde gözlenmiştir. Model oluşturulan hayvanlarda rotasyonel hareket gibi motor bozuklukların gözlenmesi için %95'ten fazla yani tama yakın nigrostriatal lezyon oluşması gerekir. Parsiyel nigrostriatal lezyon oluşan hayvanlarda, model oluşturulduktan 2-4 ay sonra motor fonksiyonlarda geri dönüş gözlenebilir (Blandini vd., 2008; Stanic vd., 2003).

Hücre kültüründe uygulanan 6-OHDA'nın; α -sinüklein proteininin proteazomal degradasyonunu bozarak anti-apoptotik özelliğine engel olduğu, buna bağlı olarak proteinin intraselüler konsantrasyonunun artarak agregasyon eğiliminin arttığı öne sürülmüştür (da Costa vd., 2006). Ancak 6-OHDA hayvan modeli, Parkinson hastalığında görülen Lewy-benzeri inklüzyonların veya protein agregatlarının oluşmasına neden olmamaktadır (Blandini vd., 2008; Hernandez-Baltazar vd., 2017; Tieu, 2011).

2.2.2.2. Rotenon

Rotenon, bitki köklerinden elde edilen ve pestisit olarak kullanılan bir flavonoiddir. Yüksek lipofilik özelliği nedeniyle, sistemik uygulandığında kan-beyin bariyerini kolayca geçer ve dopaminerjik nöronlara giriş için DAT proteinine ihtiyaç duymaz. Hücre içinde mitokondriyal kompleks I aktivitesini inhibe ederek reaktif oksijen türevlerinin (ROS) ciddi miktarda birikimine sebep olur, proteazom aktivitesini inhibe eder (Blandini & Armentero, 2012).

Rotenon nigrostriatal dopaminerjik nöron ölümüne ve Lewy cisimciklerine benzer α -sinüklein ve ubikuitin içeren inklüzyonların oluşmasına sebep olur. Hayvanlarda hipokinezi, rijidite, eğik postür gibi Parkinson benzeri fenotipik bulguları da ortaya çıkarır (Blandini & Armentero, 2012).

Rotenon modeli, deneysel Parkinson modelleri arasında nörodejenerasyonun mitokondriyal mekanizmalarına sağladığı katkılar açısından önemlidir. Öte yandan rotenonun karaciğer, kalp, böbrek ve gastrointestinal sistem üzerinde oluşturduğu sistemik toksisite hayvan modellerinde kullanımı açısından göz önünde bulundurulmalıdır. Gastrointestinal motilite ve enterik sinir sistemi üzerindeki patolojik etkisi Parkinson hastalığının motor olmayan bulgularına benzerliği açısından önemlidir (Xiong vd., 2012). Rotenon modeliyle ilgili bir diğer çekince ise modelin tekrarlanabilirliğinin düşük olması, hayvanlarda ortaya çıkan histolojik ve davranışsal bulguların çeşitlilik göstermesidir. Tam nigrostriatal lezyonun oluşturulabildiği hayvan sayısı değişkenlik göstermektedir (Blandini & Armentero, 2012; Giráldez-Pérez vd., 2014; Xiong vd., 2012).

2.2.3. Parkinson hastalığında motor olmayan bulgular

Parkinson hastalığının motor bulguları; hem santral hem periferik sinir sisteminde çeşitli nöron gruplarının kaybıyla ortaya çıkan motor, bilişsel, afektif, otonomik ve duyuşsal bozuklukların bir arada olduğu buzdağının görünen yüzüdür (Alexander, 2004). Motor olmayan semptomlar denen çok çeşitli nöropsikiyatrik, otonom, duyuşsal, gastrointestinal semptomlar, uyku bozuklukları gibi problemler Parkinson hastalarının %90'dan fazlasında görülmektedir (Chaudhuri vd., 2011). Uykuda hızlı göz hareketleri fazı (REM) davranış bozukluğu, koku almayla ilgili bozukluklar ise bu geniş yelpazedeki semptomlar içinde daha erken dönemde çıkan öncül semptomlardır (Braak vd., 2003; Jankovic, 2008). Duygudurum ve bilişsel

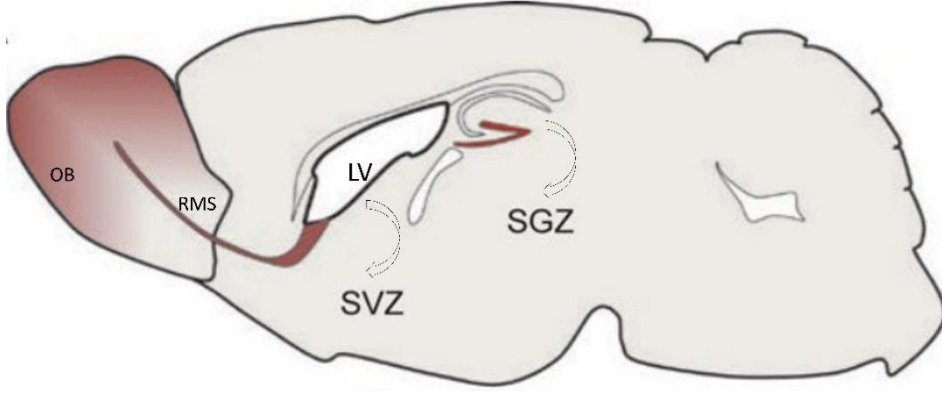
süreçlerdeki değişikliklerle birlikte koku almada azalma (hiposmi) Parkinson hastalığının motor kayıp öncesi ortaya çıkan (premotor) bulguları arasında en erken başlayanlardır. Braak ve arkadaşları, Parkinson hastalarının beyin dokularında hastalığın patolojik belirteci olan Lewy cisimcikleri ve nöritlerinin dağılımını değerlendirerek evreleme sistemini tanımladıkları çalışmalarında; OB ve ön olfaktör nükleusun en erken tutulan olfaktör yapılar olduğunu, bunu olfaktör tüberkül, piriform korteks, periamigdaloid korteks gibi ilişkili yapıların izlediğini bildirmişlerdir. Parkinson hastalığının erken evre tanısı için koku bozukluklarının değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir (Braak vd., 2003). Parkinson hastalığında motor semptomlardan önce erken evrede patolojik tutulum görülen bölgelerden biri de OB ve ilişkili yapılarıdır (Braak vd., 2003; Marxreiter vd., 2013).

OB aynı zamanda erişkin hayatta lateral ventrikül duvarından rostral göç akımı aracılığıyla gelen hücrelerin entegrasyonunun gösterildiği ve erişkin nörogenezin tanımlandığı bölgedir (Marxreiter vd., 2013).

2.3. Erişkin Nörogenez

Germinal tabakalardan yeni nöron oluşumunun embriyonik döneme sınırlı olduğu fikrinin kabul gördüğü uzun yıllardan sonra, erişkin merkezi sinir sisteminde nörogenezin varlığını öne süren erken dönem çalışmaların karşı karşıya kaldığı itibarsızlık, 1900'lerin ortalarına değin sürmüştür (Gross, 2000; Pignatelli & Belluzzi, 2010).

Smart'ın 1961 tarihli çalışması ile Altman ve Das'ın 1960'lı yıllarda yayımladıkları çok sayıda çalışmadan bugüne geçen yarım yüzyılda artık açıklığa kavuşmuştur ki; erişkin beyninde yeni nöronların oluşumu devamlı gerçekleşen bir süreçtir (Abbott & Nigussie, 2020; Altman, 1962; Altman & Das, 1965; Gross, 2000; Lledo & Valley, 2016; Pino vd., 2017). Kabuklularda, sürüngenlerde, kuşlarda, rodentlerde, primatlarda ve insanda erişkin dönemde nörogenezin gerçekleştiği gösterilmiştir (Lledo vd., 2006; Pignatelli & Belluzzi, 2010; Pino vd., 2017). Erişkin memeli beyninde nörogenezin varlığına dair genel kabul gören iki bölge; lateral ventrikülleri çevreleyen hat boyunca yerleşen subventriküler zon ve hipokampal dentat girusun granüler hücre tabakası ile hilusu arasında uzanan subgranüler zondur (Şekil 2.2.) (Pino vd., 2017).



Şekil 2.2. Nörogenez bölgelerinin şematik gösterimi

LV: Lateral ventrikül, SVZ: Subventriküler zon, SGZ: Subgranüler zon, RMS: Rostral göç akımı, OB: Olfaktör bulbus. Kaynağından değiştirilerek alınmıştır (Ma vd., 2009).

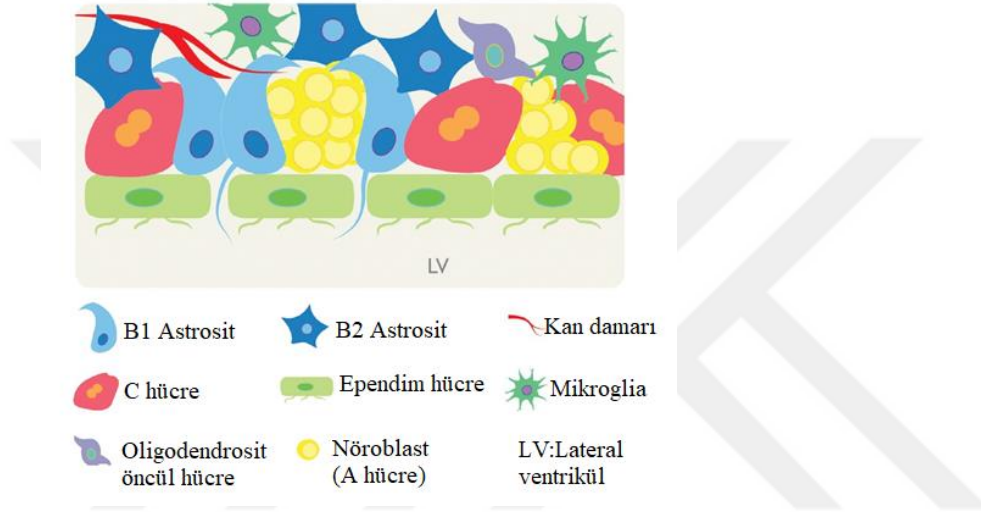
2.3.1. Subventriküler zon

Memeli beyninde lateral ventriküllerin duvarları binlerce nöral kök hücre (NKH) ile doludur. Lateral ventrikülleri döşeyen endim hücre tabakasının hemen altında yerleşen subventriküler zon (SVZ), ventrikül boşluğundaki beyin-omurilik sıvısı (BOS) içeriğinde bulunan besin maddeleri ve büyüme faktörlerine oldukça yakın konumdadır (Curtis vd., 2007).

Embriyonik dönemin radial glia hücreleri, erişkin SVZ’de yavaş çoğalan hücreler de denen tip B hücreleri oluştururlar. B hücreler astrositlere benzer yapısal özellikler gösterirler. Glial fibriler asidik protein (GFAP), vimentin ve nestin pozitifler. Kromatin yapı farklılığına göre B1 ve B2 olarak sınıflanırlar. B2 hücreler nörojenik olmayan astrositlerdir ve parankimal tarafta, göç eden hücrelerle alttaki striatum arasında yerleşerek glial bir sınır oluşturur (Mamber vd., 2013). B1 hücreler göç eden hücrelerle endim tabakası arasında yerleşirler. Ventrikül duvarını döşeyen endim hücreleri apikal yüzeyde çok sayıda hareketli silyum bulundurur. B1 hücreler ise kan damarlarına uzattıkları ayakçıkları ve endim hücrelerinin arasından uzatarak ventrikül lümenindeki BOS ile temas ettikleri hareketsiz apikal tek silyumları ile benzersiz astrositlerdir. (Lim & Alvarez-Buylla, 2016; Pino vd., 2017).

Sessiz B1 hücreler nestin negatifken, aktive olmuş B1 hücre popülasyonları nestin eksprese ederler. Aktive B1 hücreler; ara öncül hücreler (IPC), hızlı bölünen

progenitörler veya geçici-çoğalan prekürsörler denen tip C hücreleri ortaya çıkarırlar. Bu esnada oligodendrosit öncülleri de oluşabilir (Mamber vd., 2013). Tip C hücreler SVZ içinde kümeler şeklinde dağılmışlardır, nestin eksprese ederler ve farklılaşarak OB'ye göç edecek nöroblastları yani tip A hücreleri oluşturur. Tip A hücreler doublecortin (DCX) ve poli-sialil nöral hücre adhezyon molekülü (PSA-NCAM) ekspresyonu ile tip C hücrelerden ayrılırlar (Doetsch vd., 1997; Lim & Alvarez-Buylla, 2016; Pino vd., 2017). Tip A hücre toplulukları tip B hücreler tarafından sarmalanmıştır ve çoğalan C hücre kümelerine yakın konumlanır (Şekil 2.3.).



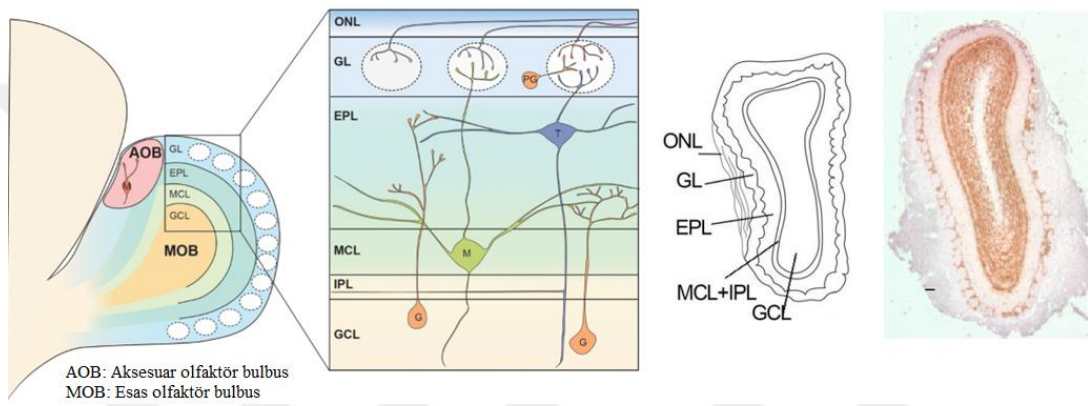
Şekil 2.3. SVZ hücrelerinin şematik olarak gösterimi

Kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır (Mamber vd., 2013).

Lateral ventrikül duvarları boyunca karmaşık bir ağ yapısı oluşturan bu hücreler, nöroblastların zincir halinde uzun mesafeler boyunca rostral göç akımı (RMS) içinde göç etmeleri için organize olmuşlardır. Nöroblastlar SVZ'nin ön kısmından çıkarak RMS içinde OB'ye göç ederler. Nöroblastlar RMS içinde göç ederken, kan damarlarınca desteklenir ve astroglial hücreler tarafından oluşturulan glial tüp içinde sarmalanırlar. Böylece hedef dışına dağılmaları engellenir. Göç süreci nörogenezin devamı ve nöronal maturasyon için olmazsa olmazdır (Pino vd., 2017).

Esas OB beynin en rostral kısmında yerleşir. Aksesuar OB ise esas OB'nin postero-dorsalinde yerleşen, feromonal bilgidenden sorumlu alandır ve cinsel dimorfizm geliştiren canlılarda evrimsel olarak körelmiştir (Imamura vd., 2020; Suárez vd., 2009). OB'nin histolojik yapısı iç içe organize olmuş sirküler tabakalardan oluşur.

Olfaktör duyu nöronlarının (OSN) aksonları olfaktör sinir tabakasında bulunur (ONL) ve bulbusu en dıştan tanjansiyel şekilde sararak glomerüler tabakaya uzanır. Hemen alttaki glomerüler tabakada (GL) periglomerüler hücreler bulunur. Periglomerüler hücreler ile OB'nin efferent hücreleri (projeksiyon nöronları) olan mitral ve tiftiksi hücreler primer dendritlerini glomerüllere uzatarak burada olfaktör duyu nöronlarının aksonlarıyla sinaps yaparlar. Tiftiksi hücrelerin hücre gövdeleri dış pleksiform tabakada iken, mitral hücrelerin gövdeleri ise mitral tabakada yer alır (Imamura vd., 2020). En içteki tabaka ise granül hücre tabakasıdır ve merkezinde olfaktör ventrikülü barındırır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. OB hücre tabakaları

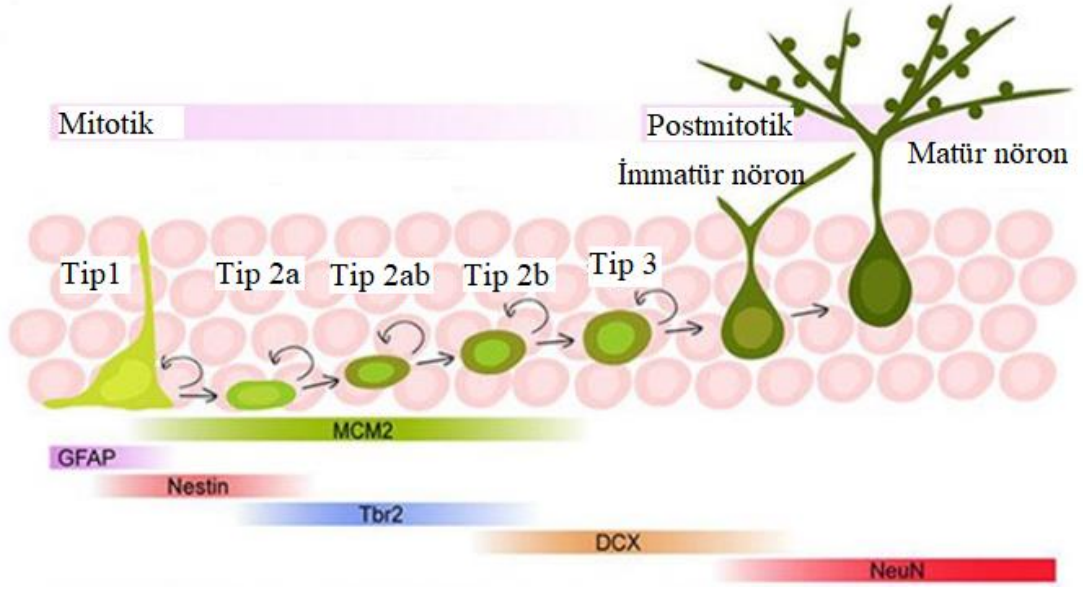
İlk görselde parasagittal kesitte OB tabakaları, ikinci görselde hücrelerin bağlantıları görülmektedir. Üçüncü görsel koronal kesitte tabakaları şematize etmektedir. Son görsel nöronal çekirdek proteini (NeuN) ile immünohistokimyasal işaretlenmiş OB kesitinde tabakalaşmayı göstermektedir. Objektif 2,5x, ölçek 100 µm. GCL: Granül hücre tabakası, MCL: Mitral hücre tabakası, IPL: İç pleksiform tabaka, EPL: Dış pleksiform tabaka, GL: Glomerüler tabaka, ONL: Dış sinirsel tabaka, AOB: Aksesuar olfaktör bulbus, MOB: Esas olfaktör bulbus (Hasegawa-Ishii vd., 2020; Imamura vd., 2020).

Nöroblastlar OB'ye ulaştığında, radyal yönde göç ederek fonksiyonel periglomerüler (%4) ve granüler (%94) ara nöronlara dönüşür (Lim & Alvarez-Buylla, 2016; Lledo & Valley, 2016; Pino vd., 2017).OB'nin farklı tip hücrelerinin kaynağı SVZ'nin farklı bölgeleridir. Ventral SVZ NKH'leri derin granül nöronlarını ve kalbindin-pozitif periglomerüler nöronları oluştururken, dorsal NKH'ler yüzeyel

granül nöronlarını TH eksprese eden periglomerüler nöronları oluşturur (Lim & Alvarez-Buylla, 2016). Yeni hücreler hedef katmana ulaşır matüre olurken, üst beyin bölgelerinden gelen sentrifugal aksonlar da ara nöronlarla kurdukları sinaptik bağlantılar sayesinde bu nöronların matürasyonu ve sağkalımında rol oynar (Lledo & Valley, 2016).

2.3.2. Subgranüler zon

Hipokampal subgranüler zon (SGZ), hipokampusun dentat girus (DG) bölgesinde, granüler tabakanın merkezi hilusa komşu kısmında bulunan nörojenik bölgedir. Hipokampal SGZ bölgesinde, morfolojik özellikleri ve özgün proteinlerine göre çok sayıda progenitör hücre tanımlanmıştır. Radial glia benzeri olduğu kabul edilen, Tip 1 hücreler de denen yavaş proliferen olan astrositler (B hücreler) nestin ve GFAP eksprese ederler ve tüm granül nöron tabakasını kat ederek moleküler tabakaya uzanan uzun radial uzantıya sahiptirler (C. Zhao vd., 2008). Tip 1 hücreler Tip 2 de denen non-radyal prekürsörleri oluşturabilir (Ming & Song, 2011; C. Zhao vd., 2008). Öncül hücrelerden bir diğeri intermediyat progenitör hücrelerdir. Bu öncüllerin nöroblastta dönüşmesinden itibaren DCX ekspresyonu başlar (Ming & Song, 2011). Nöroblastlar hızlı çoğalan progenitörler veya tip D hücreler olarak da adlandırılmaktadır (Pino vd., 2017). DCX ve PSA-NCAM eksprese ederler. Nöroblastlar matürasyon basamaklarını tırmandıkça kısa uzantılar oluşturarak moleküler tabakaya uzanırlar (Ming & Song, 2011). Bu genç nöronlar, yaklaşık iki ay süren matürasyon sürecinde, granüler tabakanın “yaşlı” nöronlarına göre daha kolay uyandırılabilir durumdadır. Doğuşlarından 1 hafta sonra ilk GABA’erjik sinaptik girdilerini alırlar (Bischofberger, 2007). Sinapsların eksitator GABA’erjik fenotipten inhibitör GABA’erjik fenotipe dönüşmeleri ise üçüncü haftada olur (Bischofberger, 2007; C. Zhao vd., 2008). Eksitator glutamaterjik sinapsların oluşumu da bu zamanda başlar ve sayıları altı ila sekiz haftada maksimuma ulaşır. Bu süreçte genç nöronlarda DCX ve PSA-NCAM ekspresyonu devam etmektedir. Nöroblastlar iki ay sonunda tip G olarak da sınıflandırılan NeuN eksprese eden matür granüler tabaka nöronlarına farklılaşırlar (Şekil 2.5.) (Bischofberger, 2007; Pino vd., 2017). Dendritlerini moleküler tabakaya, aksonlarını ise hilus üzerinden CA3 bölgesine uzatırlar (Ming & Song, 2011; Toni vd., 2008). Yeni granül nöronlar, yaşlandıkça granüler tabakanın katmanlarında derinleşirler ve buradaki nöron ağına entegre olurlar (Pino vd., 2017; C. Zhao vd., 2008).



Şekil 2.5. Hipokampal DG hücrelerinin şematik olarak gösterimi

Kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır (Hussaini vd., 2013).

2.3.3. Klasik bölgelerin dışında nörogenez

Merkezi sinir sisteminin diğer bölgelerinde nörogenezin varlığı ile ilgili araştırmalarda sıklıkla transgenik modeller, bromodeoksiüridin (BrdU) gibi timidin analogları ve klasik nörogenez bölgelerinde ekspresyonları bilinen hücre belirteçleri kullanılmaktadır.

Memeli mezensefalonunda nörogenezle ilgili çeşitli çalışmalarda BrdU tutulumu olan hücrelerin glial hücrelere dönüştüğü, nörona dönüşüm göstermediği sonucuna varılmıştır (Farzanehfar, 2018). Mezensefalonda birçok olgun nöron nestin proteini eksprese edebilir ve bu hücreler göç etmeyip lokal kalırlar (Farzanehfar vd., 2017). Midsagittal hat yapıları olan medial septal çekirdek, diagonal band çekirdeği, serebral akuaduktusun çevresi gibi bölgelerde; ayrıca striatum ve hipokampusta da nestin eksprese eden, aynı zamanda erişkin nöron karakteri gösteren NeuN pozitif hücreler tespit edilmiştir (Hendrickson vd., 2011).

Hipokampusla karşılaştırıldığında daha küçük bir popülasyon oluşturan mezensefalik nestin eksprese eden hücrelerin dopaminerjik nörona dönüştüğünü iddia eden çalışmalar da vardır (Albright vd., 2016; Shan vd., 2006). Bu hücrelerin serebroventriküler hattın göç etmiş olabileceği de öne sürülmüştür (M. Zhao vd., 2003).

Neokortekste bazı glial hücrelerin nörona dönüşüm potansiyeli barındırdıkları düşünülmektedir (Magnusson & Frisén, 2016). Tavşan, fare ve insan striatumunda ise nörogenezin varlığıyla ilgili kuvvetli kanıtlar mevcuttur (Ernst vd., 2014; Luzzati vd., 2006, 2011).

2.4. Vazoaktif İntestinal Peptit

Vazoaktif İntestinal Peptit (VİP), akciğerler ve ince bağırsaktaki vazodilatör etkinliği ile tanımlanmış, daha sonra kalp, böbrek, tiroid bezi gibi birçok organda, merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunduğu gösterilmiş bir nöropeptittir (Morell vd., 2012). Bağışıklık sisteminin anahtar oyuncularından biri olarak, nöroendokrin-immün iletişimde önemlidir (Korkmaz & Tunçel, 2019; Morell vd., 2012). Öğrenme ve hafızada, normal sirkadyen ritimlerin oluşmasında rol oynar (Morell vd., 2012). Hipokampal CA1 bölgesinde VİP eksprese eden ara nöronların spasyal öğrenmede görevi olduğu gösterilmiştir (Turi vd., 2019). VİP eksprese eden OB ara nöronları koku duyusunun algılanmasında ve OB'nin sirkadyen ritimlerinin oluşumunda da görevlidir (Miller vd., 2014; Wang vd., 2022). Striatumda kolesistokininle birlikte VİP eksprese eden ara nöronların varlığı gösterilmiştir (Muñoz-Manchado vd., 2018). VİP'in nörorejeneratif, myelinizasyon sağlayıcı, nöroprotektif etkinlik gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Korkmaz & Tunçel, 2019; Morell vd., 2012). Nöroinflamatuvar süreçlerde VİP, astrositlerin aşırı çoğalmasını engeller, nöron ölümünü azaltır. Mikroglia kaynaklı sitotoksik mediatörleri azaltır, otoimmün yanıtları deaktive eder (Morell vd., 2012). *In-vitro* koşullarda rotenonun neden olduğu mikroglyal aktivasyonu hafiflettiği, 6-OHDA toksisitesine karşı nöron koruyucu olduğu; nöroblast kültüründe VİP uygulamasının döngüsel AMP düzeylerini artırarak DNA sentezini ve sağkalımı uyardığı gösterilmiştir (Broome vd., 2022; Offen vd., 2000; Pincus vd., 1990). Kronik konstipasyon yaşayan Parkinson hastalarının bağırsak dokularında, submukozal VİP eksprese eden nöron sayısı ve VİP reseptör ekspresyonları kontrole kıyasla azalmıştır (Giancola vd., 2017). Deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde VİP eksprese eden mezenşimal kök hücrelerin uygulanması, inflamasyon ve demyelinizasyonu azaltarak hastalığın progresyonunu durdurmuş ve semptomları geriletmiştir. Aynı etki VİP'in lentiviral vektör aracılığıyla uygulanmasında sağlanamamıştır (Cobo vd., 2013). Fare MPTP toksin modelinde, VİP uygulamasıyla dopaminerjik nöron ölümünün azaldığı gösterilmiştir (Delgado & Ganea, 2003).

PACAP ve VİP, aynı aileye mensup iki peptittir ve G protein ilişkili ortak reseptörleri üzerinden trofik etki gösterdikleri bilinmektedir (Vaudry vd., 2000). VİP reseptörleri (VPAC) adenilil siklaz aracılı etki gösterirken, PACAP reseptörü-1 (PAC1) adenilil siklaz, fosfolipaz C ve ilişkili hücrel sinyal yollarını aktifler. PACAP; PAC1 reseptörüne yüksek affinite gösterirken, her iki peptit molekül de VPAC1 ve VPAC2 reseptörlerini yüksek affiniteyle aktifler (Scharf vd., 2008). VİP'in PAC1 reseptörüne affinitesi ise 1000 kata kadar düşüktür (M. J. Zaben & Gray, 2013).

Hipokampusta VİP içeren nöron gövdeleri ve uzantıları, CA1, CA3 bölgelerinde ve DG'de mevcuttur. Hipokampusta VİP bulunduran ara nöronların %40'ı GABA'eriiktir. VİP reseptörleri de hipokampusta yaygın olarak bulunmaktadır (M. J. Zaben & Gray, 2013). Sıçan hipokampal NKH kültüründe, VİP, 1µM konsantrasyonda hücre proliferasyonunu; 30nM konsantrasyonda nestin-pozitif öncüller üzerine trofik etki göstererek nöronal sağkalımı artırmıştır (M. Zaben vd., 2009). VİP, VPAC-2 reseptörleri aracılığıyla *in-vitro* koşullarda hipokampal progenitörlerin nestin-pozitif fenotipe yönelmesini sağlamıştır (M. Zaben vd., 2009; M. J. Zaben & Gray, 2013). VİP, erken postnatal farelerden elde edilen NKH'lerin apoptozuyla birlikte nöronal veya glial farklılaşmasını da engellemiş (Scharf vd., 2008); farklı çalışmalarda bu etkilerin PAC1 ya da VPAC2 reseptörü aracılı olabileceği değerlendirilmiştir (Scharf vd., 2008; M. J. Zaben & Gray, 2013). Erişkin fare SVZ hücre kültüründe ise VİP'in yüksek konsantrasyonlarda proliferasyonu arttırdığı, bu etkinin PAC1 reseptörü aracılı olduğu öne sürülerek, bu bulgular *in-vivo* PACAP uygulamasıyla artan SVZ ve DG hücre proliferasyonu ile desteklenmiştir (Mercer vd., 2004). VİP, VPAC1 reseptörü üzerinden oluşan etkiyle mikroglia kaynaklı interlökin-4 aracılı proliferatif etkiyi arttırmış (Nunan vd., 2014), bu reseptörün nöronal farklılaşmada rolü olduğu öne sürülmüştür (M. Zaben vd., 2009).

Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronlarda gözlenen mitokondriyal disfonksiyon, temel olarak reaktif oksijen türevlerinin oluşumuyla yani oksidatif stresle karakterizedir. Oksidatif stres, hücrelerin DNA, protein ve lipid içeriklerine hasar vermekle kalmaz, apoptotik yolları da aktifler (Ang vd., 2010; Korkmaz & Tunçel, 2019). Tunçel vd'nin 6-OHDA sıçan Parkinson modeli ile yaptıkları çok sayıda çalışmada VİP; nöronal hasarı ve demyelinizasyonu azaltmış (Tunçel vd., 2005), lipid peroksidasyonunu ve DNA fragmentasyonunu azaltarak striatal dokuda

6-OHDA hasarına karşı oksidatif stresten ve apoptozdan koruyucu etki göstermiştir (Tunçel vd., 2012). Striatal MSN'lerde 6-OHDA etkisiyle azalan dendritik dallanma sayısını değiştirmeden dendritik diken yoğunluğunu arttırmış ve nigrada dopaminerjik nöron kaybını engellemiştir (Korkmaz vd., 2012). Sıçan 6-OHDA modelinde uygulanan VIP, striatal GABA ve glutamat düzeylerini arttırmış, glutasyon düzeyini kontrole yaklaştırmış (Yelkenli vd., 2016), dopamin düzeylerini değiştirmeden rotasyonel hareket asimetrisini geri döndürmüş, bu etkisi 6-OHDA uygulamasıyla azalmış talamik GABA düzeylerini arttırmasıyla açıklanmıştır (Korkmaz vd., 2010; Tunçel vd., 2005).

Parkinson hastalığına yönelik olarak, nörorestoratif stratejileri değerlendiren deneysel çalışmalarda, oluşturulan lezyonun başlangıçtaki kısmi dopaminerjik nöron kaybını takip eden progresif dejenerasyon, yani parsiyel progresif model şeklinde dizayn edilmesi önerilmektedir (Aponso vd., 2008). Bu bağlamda bu tez çalışmasında intrastriatal 6-OHDA modeli ilk model olarak tercih edilmiştir (Aponso vd., 2008; Korkmaz vd., 2010). Parkinson hastalığının patolojik bulgusu olan α -sinüklein agregasyonunun da gözleendiği bilinen rotenon modeli ise diğer model olarak seçilmiştir (Cannon vd., 2009; Sherer vd., 2003; Zhang vd., 2017).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda planlanan bu tez çalışmasında iki farklı Parkinson sıçan modelinde, nörogenezin yoğun olarak gerçekleştiği bilinen bölgelerde farklı öncül hücre popülasyonlarında nasıl değişiklikler olduğunu hücreler belirteçler aracılığıyla değerlendirmek; nöroprotektif ve nöromodülatör bir molekül olarak nöral öncüller üzerine proliferatif etkisi gösterilen VIP'in nörogenez sürecine etkisini araştırmak amaçlanmaktadır. Bununla birlikte α -sinüklein patolojisi gösterdiği bilinen rotenon modelinde, Parkinson hastalığının patolojik bulgusu olan α -sinüklein agregasyonuna VIP'in olası etkisi de araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Fosfat tamponlu salin	:Thermo Scientific
Tamponlu sitrat çözeltisi	:Thermo Scientific
Etanol	: Sigma Aldrich
Dimetil sülfoksit	: Sigma Aldrich
Hidrojen peroksit	: Thermo Scientific
Antikor dilüsyon çözeltisi	: Thermo Scientific
Antijen blokaj çözeltisi	: Thermo Scientific
Biotinlenmiş keçi anti-serumu	: Thermo Scientific
Streptavidin peroksidaz	: Thermo Scientific
DAB substrat	: Thermo Scientific
VİP	: Sigma Aldrich
6-OHDA	: Sigma Aldrich
Rotenon	: Abcam
Miglyol 812N	: Ioi Oleochemical

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No-Frost, Türkiye
Stereotaksimetric tabla	: Kopf 5600, David Kopf Ins., ABD
İnfüzyon pompası	: CMA, ABD
Hamilton mikroenjektör	: CMA, ABD
Peristaltik pompa	: Ismatec, ABD
Hassas terazi	: Shimadzu AUX220, Japonya
Tartı	: Sinbo, Türkiye
Lokomotor aktivite test sistemi:	Commat, Ankara, Türkiye

Işık mikroskobu	: DM3000, Leica, CMS GmbH
Görüntü analiz programı	: Image J, NIH, ABD
İstatistik programı	: GraphPad 9.4.1, ABD

3.2. Yöntemler

"Deneysel Parkinson Modellerinde Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)'in Striatum ve Substantia Nigradaki α -Sinüklein Birikimine ve Nörojeneze Olan Etkisinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28/07/2016 tarih ve 98 sayılı toplantısında Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak 537 sayılı karar ile onaylanmıştır (Ek 1.). Araştırma bütçesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nca 201811019 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmada 36 adet 200-250 gram ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Rotenon modeli ve 6-OHDA modelinin değerlendirilmesi için üçer grup belirlendi (Şekil 3.1.).

Rotenon modeli için;

Kontrol grubu (n=6), her gün 1 ml/kg %2 dimetilsülfoksit (DMSO) - %98 Miglyol 812N karışımı ve gūnaşırı 1 ml/kg serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) uygulanan grup

Rotenon grubu (n=6), her gün 2,5 mg/kg/ml rotenon çözeltisi ve gūnaşırı 1 ml/kg serum fizyolojik i.p. uygulanan grup

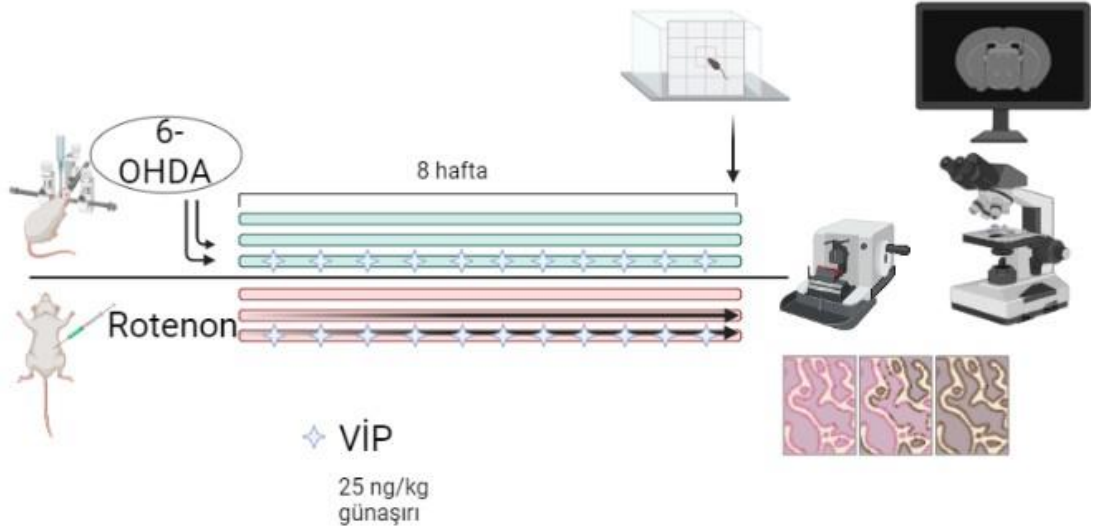
Rotenon ve VIP grubu (n=6), her gün 2,5 mg/kg/ml rotenon çözeltisi ve gūnaşırı 25 ng/kg VIP i.p. uygulanan grup

6-OHDA modeli için;

Sham (taklit operasyon) grubu (n=6), intrastriatal olarak 2 mikrolitre (μ l) %0,3'lük askorbik asit (serum fizyolojik içinde) çözeltisi enjekte edilen ve gūnaşırı 1 ml/kg serum fizyolojik i.p. uygulanan grup

6-OHDA grubu (n=6), intrastriatal olarak 12 mikrogram (μ g)/2 μ l 6-OHDA çözeltisi enjekte edilen ve gūnaşırı 1 ml/kg serum fizyolojik i.p. yoldan uygulanan grup

6-OHDA ve VIP grubu (n=6), intrastriatal olarak 12 μ g/2 μ l 6-OHDA çözeltisi enjekte edilen ve gūnaşırı 25 ng/kg VIP i.p. uygulanan grup



Şekil 3.1. Deney akış çizelgesi

“BioRender.com” uluslararası ağ adresi üzerinde üretilmiştir.

3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı ve uygulanışı

6-OHDA çözeltisi için 6-OHDA hidrobromid (H116, Sigma, ABD) kullanıldı. Çözücü olarak izotonik sodyum klorür içinde %0,3'lük askorbik asit çözeltisi ışıktan korunarak hazırlandı. 6-OHDA hidrobromid, çözücü içinde 6 µg/µl konsantrasyonda hazırlanarak 2 µl tek sefer uygulandı (Tunçel vd., 2005).

Rotenon (ab143145, Abcam) çözeltisi, 1 ml çözeltilde 2,5 mg madde olacak şekilde hazırlandı (von Wrangel vd., 2015). Çözücü olarak %2 DMSO ile %98 Miglyol 812N (Ioi Oleochemical, Hamburg) karışımı kullanıldı (Cannon vd., 2009). Her gün 2,5 mg/kg dozda i.p. sekiz hafta uygulandı (von Wrangel vd., 2015).

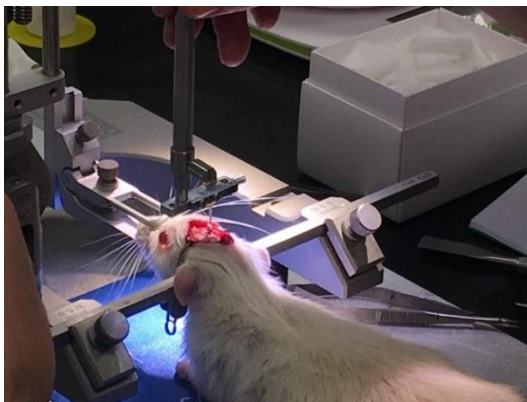
VİP (V3628, Sigma; 3325,80 g/mol) çözeltisi, 1 ml çözelti içinde 25 ng madde olacak şekilde; 7,5 nanomolar (nM) konsantrasyonda hazırlandı. Gūnaşırı 25 ng/kg dozda i.p. enjeksiyonla sekiz hafta uygulandı (Tunçel vd., 2005).

Perfüzyon fiksasyonda kullanılan %4'lük paraformaldehit çözeltisinin hazırlanmasında, her bir litrelik çözelti için 40 gram toz paraformaldehit maddesi (1040051000, Merck) 900 ml distile su içine kondu. Isıtıcı tablalı karıştırıcıda 60°C'de çözünmesi ve şeffaflaşması sağlandı. Soğuduktan sonra 100 ml 10X fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi (TA-999-PB, ThermoScientific) eklenerek 1 litre fosfat tamponlu paraformaldehit çözeltisi elde edildi.

3.2.2. Deneysel Parkinson modellerinin oluşturulması

3.2.2.1. Stereotaksik 6-OHDA lezyon modeli oluşturulması

Stereotaksik 6-OHDA lezyon modeli için, stereotaksimetre altında intrastriatal olarak 6-OHDA hidrobromid (Sigma, ABD) verildi. Uygulama alanının belirlenmesi için sıçanlar 80 mg/kg Ketamin – 10 mg/kg Ksilazin (i.p.) anestezisine alınarak parmak kıstırmaya ekstremitelere çekme yanıtına göre yeterli anestezi derinliği sağlandıktan sonra stereotaksik sisteme yerleştirildi (Şekil 3.2.). Midsagittal insizyon ile baş derisi açıldı. Sırasıyla Bregma ve Lambda için lateral ve AP koordinatlar ölçülerek not edildi. Bu esnada kılavuzun orta hatta olduğu kontrol edildi. Paxinos-Watson sıçan beyin atlası baz alınarak striatum için Bregma'ya göre AP: 1,60 mm, Lateral: 2,60 mm hesaplanarak hedef koordinat belirlendi (Paxinos & Watson, 1997). Parietal kemik üzerine işaret kondu ve mini matkap ile delindi. Dura yüzeyine göre Ventral: 5,10 mm derinliğine inilerek 2 µl enjeksiyon uygulandı. 6-OHDA gruplarına, çözücü olarak kullanılan izotonik sodyum klorür içindeki %0,3'lük askorbik asit çözeltisi içinde 6 µg/µl konsantrasyonda hazırlanan 6-OHDA verilirken, sham grubuna izotonik sodyum klorür içindeki %0,3'lük askorbik asit çözeltisi eşit hacimde uygulandı. Doku hasarını minimize etmek için belirlenen derinliğe 1 dakika sürede inildi. İnfüzyon pompası 1 µl/dakika hıza ayarlandı ve Hamilton mikroenjeksiyon enjektörü aracılığıyla uygun çözelti 2 dakika süreyle uygulandı. Enjektör ucu beyin parankimi içinde tutularak 2 dakika beklendi, böylece maddenin difüzyonuna zaman bırakıldı. Ardından enjektör ucu 2 dakika sürede kafatası dışına çekildi (Tunçel vd., 2005). İşlem sonrası cilt insizyonu sütürlenerek antiseptik çözeltiyle temizlendi ve hayvan uyanması beklenmek üzere sıcak ortamda istirahate alındı.



Şekil 3.2. Stereotaksimetre sistemi

3.2.2.2. Rotenon modeli oluşturulması

Rotenon modeli için, her gün aynı saatte; toksin gruplarına yukarıda tarif edildiği şekilde hazırlanan rotenon çözeltisi, kontrol grubuna ise toksin bulundurmayan %2 DMSO - %98 Miglyol 812N karışımı i.p. enjeksiyon ile sekiz hafta uygulandı (Cannon vd., 2009; von Wrangel vd., 2015). Sıçanlarda çekum sıklıkla sol alt kadrana yerleşimli olduğundan rotenon (kontrol grubunda çözücü) enjeksiyonları sağ alt kadrana yapıldı (Coria-Avila vd., 2007). Bu gruplarda serum fizyolojik ve VİP enjeksiyonları sol alt kadrana yapıldı.

3.2.3 İn-vivo motor fonksiyon değerlendirmesi

Motor fonksiyonların değerlendirilmesi için sekizinci haftada lokomotor aktivite testi uygulandı.

3.2.3.1 Lokomotor aktivite testi

Lokomotor aktivite testi lokomotor ve davranışsal aktivite düzeyini kapsamlı olarak değerlendiren bir testtir. Locomotor bozukluklar ve potansiyel tedavilerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevresel etkiler, anksiyete, sirkadiyen ritim gibi etmenlerden etkilenmesi testin kısıtlılıklarındandır (Tatem vd., 2014).

Lokomotor aktivite değerlendirmesi için otomatize aktivitemetre sistemine entegre 40 cm x 40 cm x 40 cm ölçülerinde şeffaf pleksicamdan imal edilmiş açık test kabini (Commat, Ankara) kullanıldı. Test süresince ortamın sessiz olmasına dikkat edildi. Deney hayvanları test odasına 20 dakika alıştırdıktan sonra, 120 lüks aydınlatma ortamında açık kabinin ortasına bırakılarak beş dakika süreyle kayıt alındı (Aydın vd., 2021). Her kayıt sonrasında kabin içindeki fekal materyal ve idrar uzaklaştırılarak %70'lik etanol çözeltisi ile temizlenip kurulandı (Şekil 3.3.).

Stereotipik, ambulatuar, vertikal ve toplam hareket sayıları; stereotipik ve ambulatuar hareket ile dinlenme sürelerinin yüzdeleri, toplam kat edilen mesafe (cm) verileri kaydedildi.



Şekil 3.3. Lokomotor aktivite test düzeneği

Görselde vertikal hareket (şahlanma hareketi) görülmektedir.

3.2.4 Sonlandırma prosedürü ve doku eldesi

Sekiz hafta boyunca uygun enjeksiyonları alan hayvanlar süre sonunda anestezi altında perfüzyon fiksasyon ile sakrifiye edildi.

3.2.4.1 Perfüzyon fiksasyonu

Perfüzyon için PBS ve %4'lük paraformaldehit (PFA) çözeltileri hazırlandı. Sonlandırma gününde deney hayvanlarına 80 mg/kg Ketamin - 10 mg/kg Ksilazin (i.p.) enjeksiyonu uygulanarak anestezi sağlandı. Anestezi derinliği için parmak kısırtmaya ekstremite çekme yanıtı takip edildi. Anestezi derinliği sağlandığında sternal ksifoid çıkıntının altından karın cildi kesilerek karına girildi. Diyafram önden başlanıp iki yana doğru kesilerek açıldı, aşağıdan yukarıya doğru kostaların kesilmesiyle göğüs kafesine girildi. Peristaltik pompaya bağlı kateter ucu (21G, BD Vacutainer) sol ventriküle yerleştirilerek, sağ atriuma kesi yapıldı ve 100cc PBS ardından 100cc PFA çözeltileri 37°C'de 10 ml/dakika hızda verilerek perfüzyon fiksasyonu uygulandı.

3.2.4.2 Beyin dokularının çıkarılması

Perfüzyon sonrası kafatasına foramen magnumdan girildi, dorsalde anteriora ve laterale ilerlenerek kemik yapılar kaldırıldı. Bu esnada beyin dokusunun hasarlanmamasına özen gösterildi. Ventralde kafa tabanına giren kranyal sinirler kesildi. Dura mater dokusuna tutunan bölgelerde dura tarafından kesi yapılarak beyin serbestleştirildi. Anteriorda OB bölgesinin hasarlanmaması için kribriform plaka

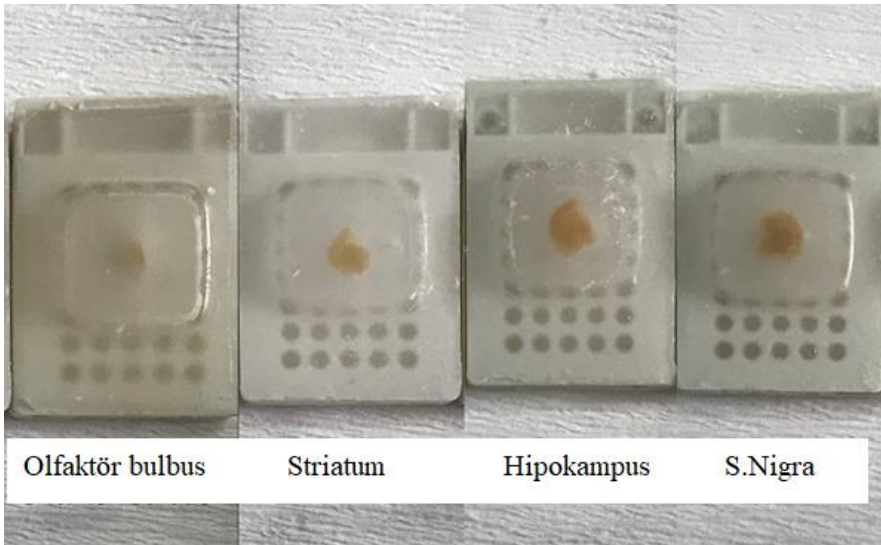
içine doğru doku takip edildi, OB korunarak plakaya en yakın seviyede yapılan kesilerle olfaktor sinirlerden ayrıldı. Böylece tüm beyin kafa tabanından ayrılmış oldu.

Kafatasından serbestleştirilen beyinler midsagittal hat boyunca yapılan kesi ile iki hemisfere ayrılarak %4'lük paraformaldehit çözeltisi içinde postfiksasyona alındı. 24 saat sonra her beyinin sağ hemisferleri ventralde makroskopik olarak ayırt edilebilen yapılar incelenerek yapılan üç koronal kesi ile dört parçaya ayrıldı. En posterior kesi mamiller cisimin arkasından serebral pedinkül seviyesinden, ortadaki kesi optik kiazma seviyesinden, en anterior kesi ise lateral yüzeyde beyaz madde görüntüsünde gözlenen lateral optik traktus trasesinin dorsoventral kalınlığının azaldığı koronal seviyeden yapıldı (Şekil 3.4.) (Bolon vd., 2006). Her dört segment rostralden kaudale doğru incelenmek üzere ayrı ayrı kasetlendi. Doku takip sonrası parafin blok içine alındı (Şekil 3.5.).



Şekil 3.4. Koronal kesi seviyelerinin görüntülenmesi

Sağ hemisfer ventralden görüntülenmektedir.



Şekil 3.5. Elde edilen parafin bloklar

3.2.5. İmmünohistokimyasal işlemler

İmmünohistokimyasal işlemler için -10°C’de soğutulan parafin bloklardan 2um kalınlığında koronal kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alındı. Deparafinizasyon işlemi için aşağıdaki basamaklar sırayla uygulandı.

Etüv	60°C 40 dakika
Ksilol	3x5 dakika
%100 Etanol	5 dakika
%96 Etanol	5 dakika
%70 Etanol	5 dakika
%50 Etanol	5 dakika
Distile su	2 x 1 dakika

Sonrasında lamlar, antijen maskesinin kaldırılması için sitrat tamponu içinde (pH:6) (TA-9003-999, ThermoScientific) 11 dakika düdüklü tencerede ısıtıldı. Beş dakika sonra kapağı açılıp oda sıcaklığına çıkarılan lamlar 40 dakika soğumaya bırakıldı. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için %0,3'lük hidrojen peroksid (TA-125-HP, ThermoScientific) çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Ardından Tween-20 içeren PBS çözeltisi (PBST, TA-999-PT, ThermoScientific) içinde on dakika bekletilerek membran permeabilizasyonu sağlandı.

3.2.5.1 Kullanılan primer antikolar

Primer antikor öncesinde protein blokaj çözeltisinde (TA-125-UB, ThermoScientific) beş dakika bekletilen lamlar, ardından antikor dilüsyon çözeltisinde (TA-125-UD, ThermoScientific) uygun dilüsyonda hazırlanmış primer antikor damlatılarak 12 saat oda sıcaklığında bekletildi. Antikolar seri kesitlere aynı sırayla uygulandı.

Kullanılan antikorlar ve hazırlanan dilüsyonlar aşağıdadır:

Tirozin hidroksilaz (E2L6M) 1:300 (58844, Cell Signaling Technology)

Alfa-sinüklein (E4U2F) 1:100 (51510, Cell Signaling Technology)

DCX 1:1500 (4604, Cell Signaling Technology)

Nestin (Rat-401) 1:200 (4760, Cell Signaling Technology)

GFAP (G-A-5) 1:2000 (IF03L, Calbiochem)

NeuN (D4G4O) 1:700 (24307, Cell Signaling Technology)

Primer antikorla inkübasyon sonrasında PBS ile yıkanan lamalar sırayla biotinlenmiş keçi serumu (TP-125-BN, ThermoScientific) ve streptavidin peroksidaz (TS-125-HR, ThermoScientific) ile bekletildi. Her aşamada PBS ile yıkama tekrarlandı. Kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidin (DAB, TA-125-HD, ThermoScientific) uygulaması sonrası çeşme suyuyla yıkanan lamalar, 10 saniye hematoksilen ile boyandıktan sonra artan alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek kapatma mediumu ile kapatıldı.

3.2.6. Görüntü eldesi

İmmünohistokimyasal boyanmış kesitlerin fotoğraflanması için Leica DM3000 mikroskop entegre bilgisayar destekli sistemde Q-Capture programı kullanıldı. Fotoğraflar “tiff” dosya formatında kaydedildi.

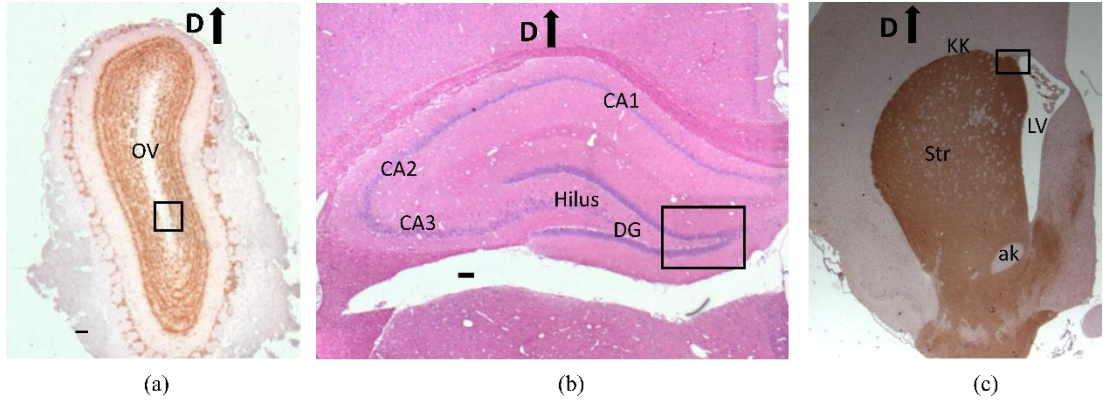
3.2.6.1. Nörogenез değerlendirme için alınan görüntüler

Nörogenез değerlendirme için GFAP, nestin, DCX ve NeuN antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerin görüntüleri alındı.

OB bölgesi için, olfaktör ventrikülün dorsoventral mesafede orta hattı belirlendi. Ventral yarıda, orta üçte birlik kısımdan, olfaktör ventrikülün uzun eksenine fotoğraf alanının köşegenine konumlandırılarak 40x objektif ile görüntü alındı (Şekil 3.6. (a)).

Dorsal hipokampus kesitlerinde DG'nin granüler hücre tabakasının suprapiramidal ve infrapiramidal kısımlarının birleşimi fotoğraf alanının içinde kalacak şekilde konumlandırılarak 10x objektifle görüntü alındı (Şekil 3.6. (b)).

Lateral ventrikül bölgesinde, lateral ventrikülün dorsolateral köşesinde endim hücre tabakası sınırı fotoğraf alanının köşe dörtte birlik kısmında konumlandırılarak, SVZ bölgesinin subkallosal uzantısı 40x objektif ile görüntülendi (Şekil 3.6. (c)).



Şekil 3.6. Nörogenez değerlendirmesi yapılan bölgelerin gösterilmesi

OB (a), hipokampal DG (b), lateral ventrikül ve striatum bölgesi (c) koronal kesitleri gösterilmiştir. Ölçümler için görüntü alınan bölgeler şematik olarak dikdörtgen ile işaretlenmiştir. Şekildeki (a) ve (b) görseli 2,5x; (c) görseli 1,6x objektifle elde edilmiştir. D: Dorsal yönü göstermektedir. OV: Olfaktör ventrikül; CA1, CA2 ve CA3: Hipokampal cornu ammonis bölgeleri, DG: Hipokampal DG, LV: Lateral ventrikül, KK: Korpus kallosum, Str: Striatum, ak: anterior kommisur.

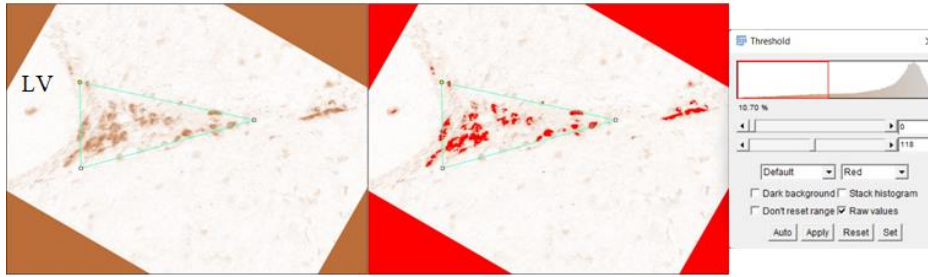
3.2.6.2 Alfa-sinüklein ve tirozin hidroksilaz değerlendirmesi için alınan görüntüler

Alfa-sinüklein değerlendirmesi için striatum ve orta beyin kesitlerinde 5x objektifle görüntü elde edildi. Striatum bölgesinin fotoğraflaması anterior kommisurun dorsal sınırından geçen horizontal seviye ile korpus kallosum kesişimi gözlenecek şekilde yapıldı. Tirozin hidroksilaz değerlendirmesi için striatum kesitlerinde 2,5x; SN bölgesini de içeren orta beyin kesitlerinde ise 5x objektifle elde edilen görüntüler kullanıldı.

3.2.7. Görüntü analizleri

Tüm görüntüler Image J programına aktarıldı (Schneider vd., 2012). “Colour Deconvolution 2” eklentisi kullanılarak DAB ile uyumlu görüntü segmenti hematoksilin segmentinden ayrıldı ve 8 bit boyutlu görüntüler elde edildi (Şekil 3.7. ve Şekil 3.8.) (Ruifrok vd., 2003). Bu görüntülerde hücre gövdesi ve uzantı hatlarının, hücreler arası boşlukların ve immün negatif alanların korunacağı şekilde “threshold” uygulanarak, eşik değeri ile siyah için tanımlanan “sıfır” değeri arasında kalan değerlerin kaydedildiği piksel kare cinsinden alan, ölçümün yapıldığı toplam

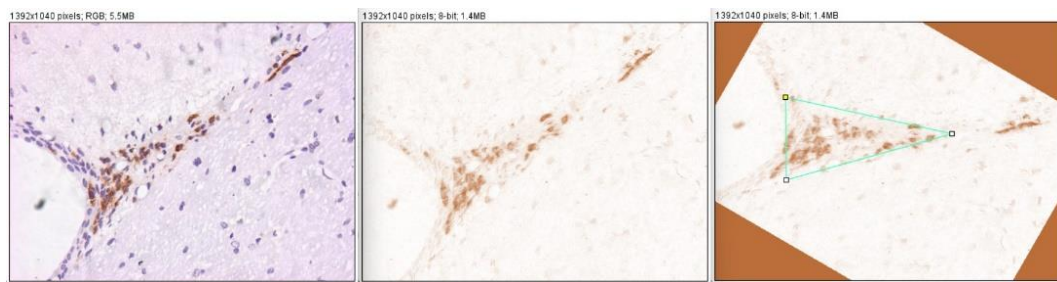
alana oranlanarak yüzde alan ölçümü olarak analiz edildi (Şekil 3.7.) (Korkmaz vd., 2019).



Şekil 3.7. Image J programında “threshold” fonksiyonunun gösterilmesi

İlk görsel 8 bit boyutlu DAB ile uyumlu görüntüyü göstermektedir. Ortadaki görsel, ilk görselde “threshold” uygulandıktan sonra eşik içinde kalan alanları göstermektedir. Analize esas ölçüm üçgen alanında yapılmıştır. Son görsel Image J programı “threshold” ekranını göstermektedir. LV; Lateral ventrikül.

SVZ bölgesinde ölçüm için üçgensel alan belirlenerek; elde edilen görüntüler, üçgenin tabanı lateral ventrikülün dorsolateral köşesinde ependim hücre tabakasının lateral sınırında, üçgenin tepesi SVZ hücrelerinin subkallosal uzantısında olacak şekilde konumlandırıldı. Tüm ölçümler belirlenen standart üçgensel alanda yapıldı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. SVZ bölgesinde ölçüm alınan alanın gösterilmesi

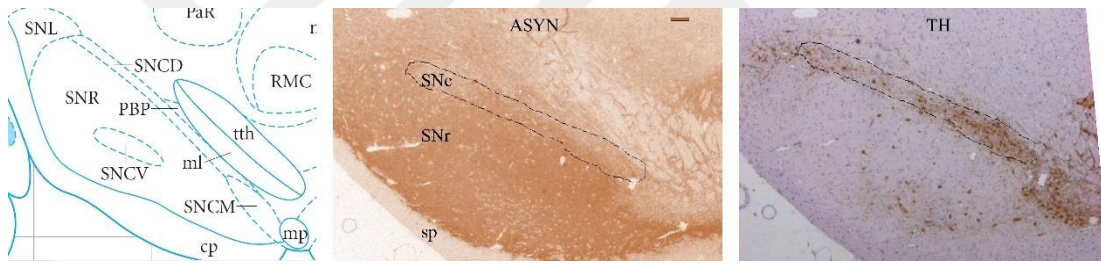
İlk görüntü DCX immünohistokimyasal işaretlenmiş kesitten 40x objektifle elde edilmiştir. Ortadaki görüntü, ilk fotoğrafın DAB segmentini göstermektedir. Son görüntü açılal döndürme sonrası standart ölçüm alanının konumlandırılışını gösterir.

OB kesitlerinde tüm 40x’lik fotoğraf alanından ölçüm alındı.

Dorsal hipokampus kesitlerinde Image J programında 900x900 piksel kare standart alan çizilerek, DG'nin granüler tabakasının suprapiramidal ve infrapiramidal kısımlarının birleşimi bu karenin kenar orta noktasına konumlandırıldı. Böylece 900 piksel mesafe standardize edilerek DG granüler tabaka ve SGZ'yi içeren alanın her bir görüntüde çizimi yapıldı. Ölçümler bu alandan elde edildi.

Striatum görüntülerinde anterior kommissurun dorsal sınırından geçen hat ile korpus kallosumun kesiştiği horizontal seviye standart ölçüm alanının ventral sınırı olarak belirlendi. Standart dikdörtgen alanda ölçüm yapıldı.

Orta beyin kesitlerinde SN bölgesinde ölçüm için belirlenen standart dairesel alan, SN bölgesinin ventrolateral sınırını oluşturan serebral pedinkül komşuluğundaki hattın ortasına konumlandırılarak ölçüm alındı. SNc bölgesi için her bir tirozin hidroksilaz immünoaktif kesit görüntüsünde alan çizilerek α -sinüklein değerlendirmesi de bu alanda yapıldı (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. SNc bölgesi alan çiziminin gösterilmesi

Soldaki görsel sıçan beyin atlasında SN bölgesini göstermektedir (Paxinos & Watson, 1997). Diğer görseller ardışık SN kesitlerinde α -sinüklein ve TH immünoaktivitesiyle birlikte SNc ve SNr bölgelerini göstermektedir. Objektif 5x, ölçek 100 μ m. (ASYN; α -sinüklein, TH: tirozin hidroksilaz, sp: Serebral pedinkül)

3.2.8. İstatistiksel değerlendirme

In-vivo testlerden ve histolojik görüntülerin analizinden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel değerlendirmesi için GraphPad 9.4.1 programı kullanıldı. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve “Tukey çoklu karşılaştırma testi” ile, normal dağılım göstermeyen veriler için “Kruskal-Wallis testi” sonrası “Dunn çoklu karşılaştırma testi” ile analiz yapıldı. Veriler ortalama \pm

standart hata olarak ifade edildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi (Korkmaz vd., 2010).

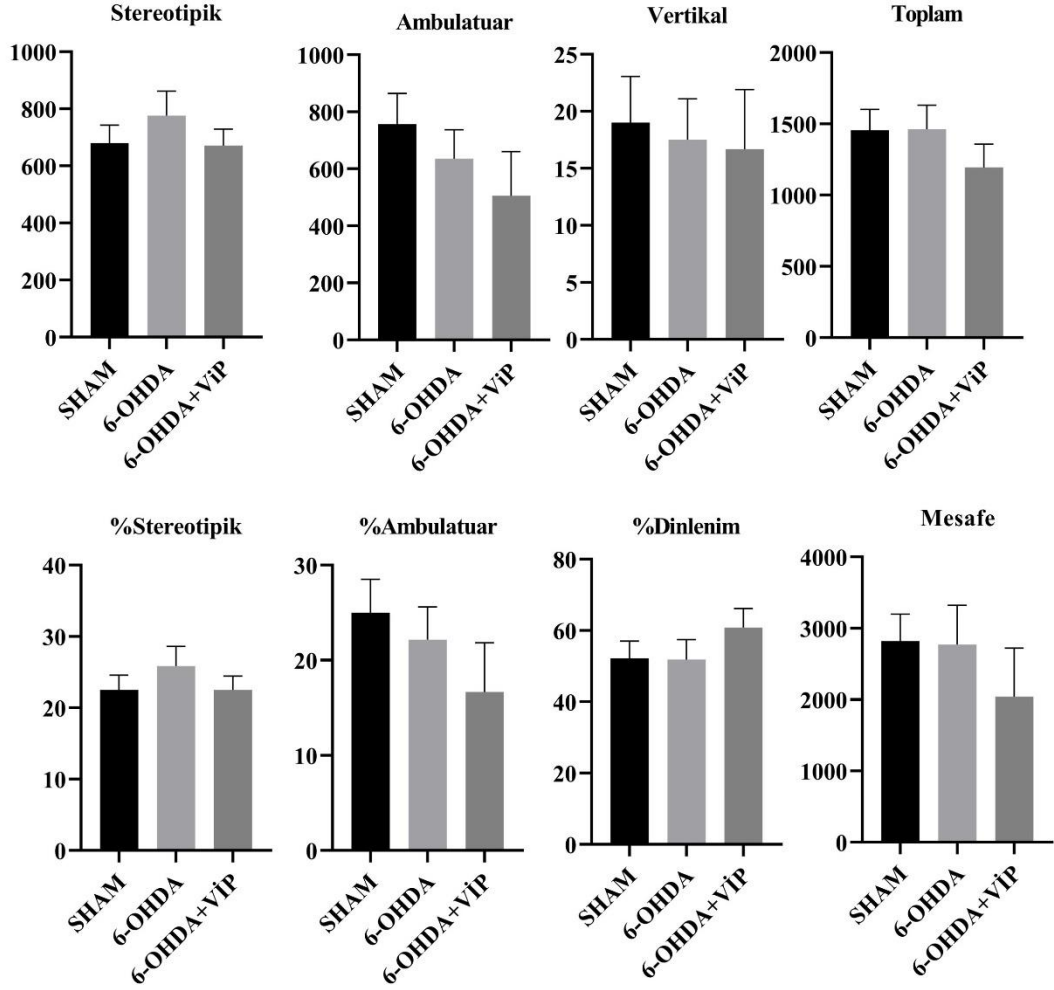
3.3. Araştırmanın Kısıtlılıkları

Araştırma bütçesinde, alım öncesinde kısa sürede gerçekleşen ciddi kur artışı sebebiyle malzeme miktarında azaltmaya gidilmesi zorunlu olmuştur. Araştırma öncelikle immünfloresan yöntemle üçlü antikor işaretlemeleriyle yapılarak konfokal mikroskopiyle görüntülenmek ve analiz edilmek üzere planlanmıştır. Ancak sıçan beyin dokusunda bilinen bir sorun olan otofloresans yoğun olarak gözlenmiştir. Otofloresansı azaltmak üzere sodyum borohidür, Sudan siyahı, ultraviyole ışığa maruz bırakma gibi çeşitli yöntemler ve kombinasyonları uygulanmıştır (Clancy & Cauller, 1998; Oliveira vd., 2010; Spitzer vd., 2011). Ancak otofloresansın ortadan kaldırılamaması sebebiyle immünohistokimyasal yöntemle geçilmek zorunda kalınmıştır. Floresan mikroskopik görüntülemeler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır ve Ek 3.'te sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Lokomotor Aktivite Testi Analizleri

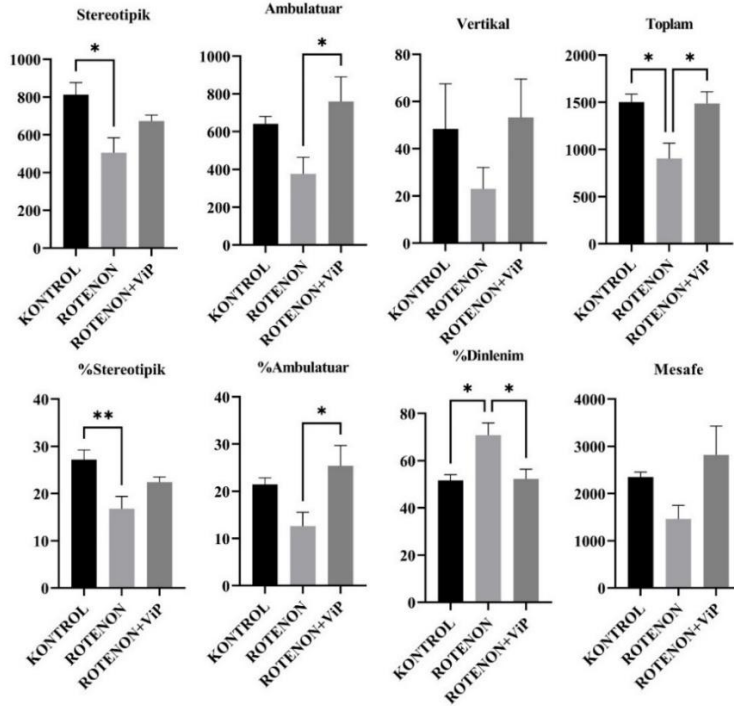
6-OHDA modelinde lokomotor aktivite testi verilerinde 6-OHDA modeli grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. 6-OHDA modeli grupları arasında lokomotor aktivite test verilerinin karşılaştırılması

Grafiklerin ait olduğu test verisi her grafiğin üzerinde tanımlanmıştır. Yüzde değerler toplam test süresine göre süre yüzdesini ifade etmektedir. Toplam hareket verisi; stereotipik, ambulatuvar ve vertikal hareket sayılarının toplamını gösterir. (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

Rotenon modelinde lokomotor aktivite testine göre; stereotipik hareketlerin sürece yüzdeleri ve sayıları rotenon grubunda kontrole göre azaldı ($p<0,05$), VIP uygulanan grupta rotenon grubuna kıyasla anlamlı artış görülmedi. Ambulatuvar hareket sayısı ve sürece yüzdesi rotenon grubunda kontrole göre anlamlı azalış göstermedi, rotenon ve VIP uygulanan grupta ise rotenon grubuna göre artış gösterdi ($p<0,05$). Toplam hareket sayısı rotenon grubunda kontrole göre azaldı ($p<0,05$), rotenon ve VIP uygulanan grupta ise rotenon grubuna göre artış gösterdi ($p<0,05$). Sürece dinlenme yüzdesi rotenon grubunda kontrole göre arttı, rotenon ve VIP uygulanan grupta ise rotenon grubuna göre azaldı ($p<0,05$). Vertikal aktivite sayısı ve test süresinde kat edilen toplam mesafede gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 4.2.).



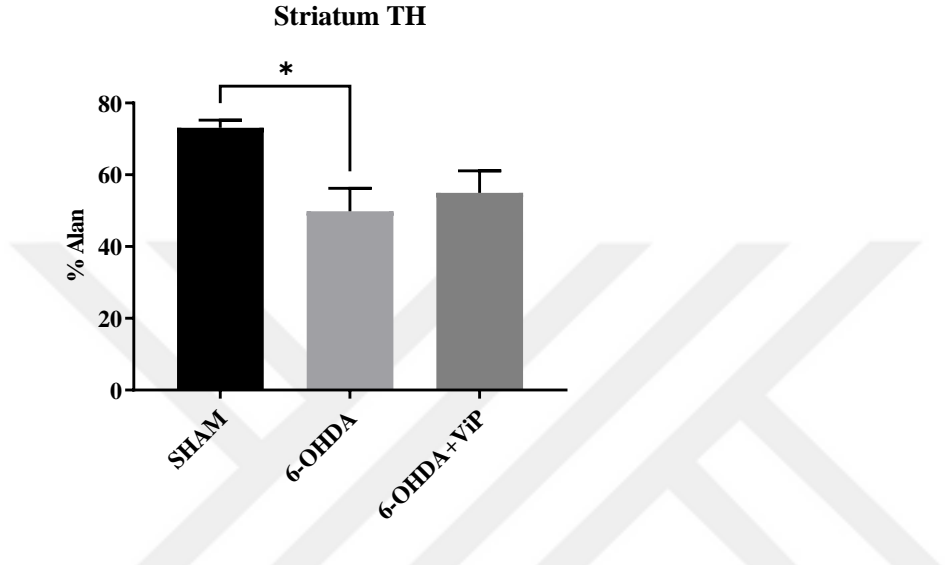
Şekil 4.2. Rotenon modeli grupları arasında lokomotor aktivite test verilerinin karşılaştırılması

Grafiklerin ait olduğu test verisi her grafiğin üzerinde tanımlanmıştır. Yüzde değerler toplam test süresine göre süre yüzdesini ifade etmektedir. Toplam hareket verisi; stereotipik, ambulatuvar ve vertikal hareket sayılarının toplamını gösterir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$. (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma; vertikal hareket Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)

4.2. İmmünohistokimyasal İşaretleme Analizleri

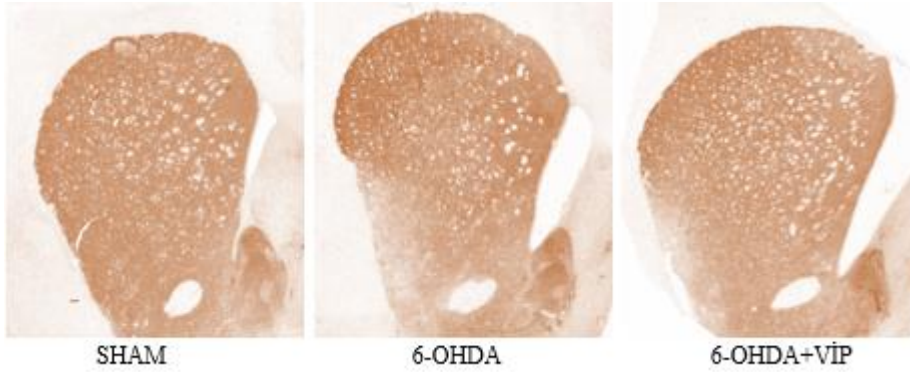
4.2.1. Tirozin hidroksilaz immünoreaktivitesi

6-OHDA uygulanan grupta striatal TH immünoreaktivitesi, sham grubuna göre azalmış bulundu ($p<0,05$). 6-OHDA verilip VIP uygulanan grupta sham grubuna veya 6-OHDA grubuna göre anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. 6-OHDA modeli grupları arasında striatal TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

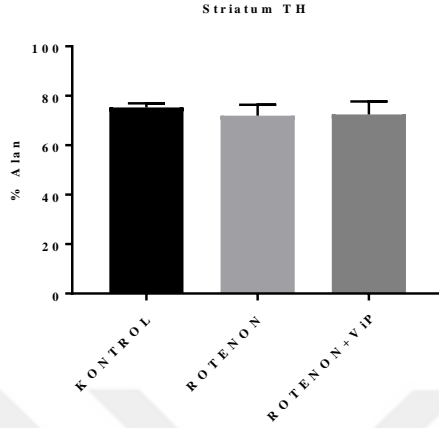
*: $p<0,05$ (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)



Şekil 4.4. 6-OHDA modeli gruplarında striatal TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi

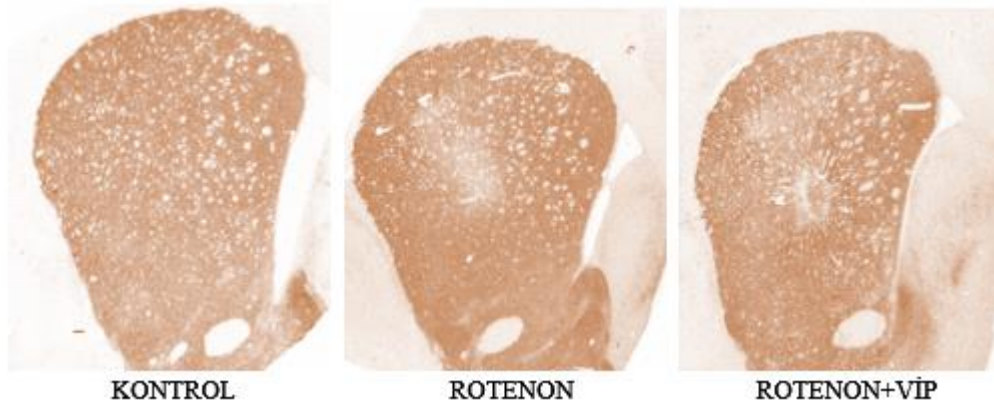
Görüntüler 2,5x objektifle elde edilmiştir. Sol alt köşedeki ölçek (100 μ m) her üç görsel için de geçerlidir.

Striatal TH immünoreaktivitesi kontrol, rotenon ve rotenon verilip VİP uygulanan gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. Rotenon modeli grupları arasında striatal TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

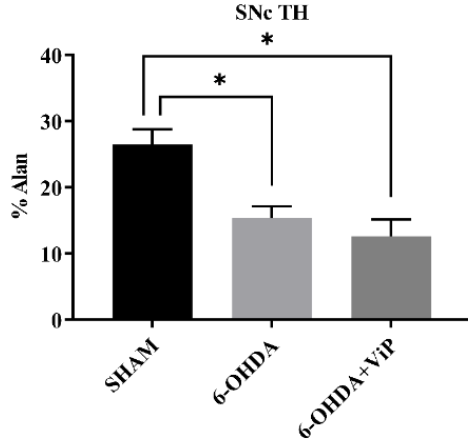
(Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)



Şekil 4.6. Rotenon modeli grupları arasında striatal TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi

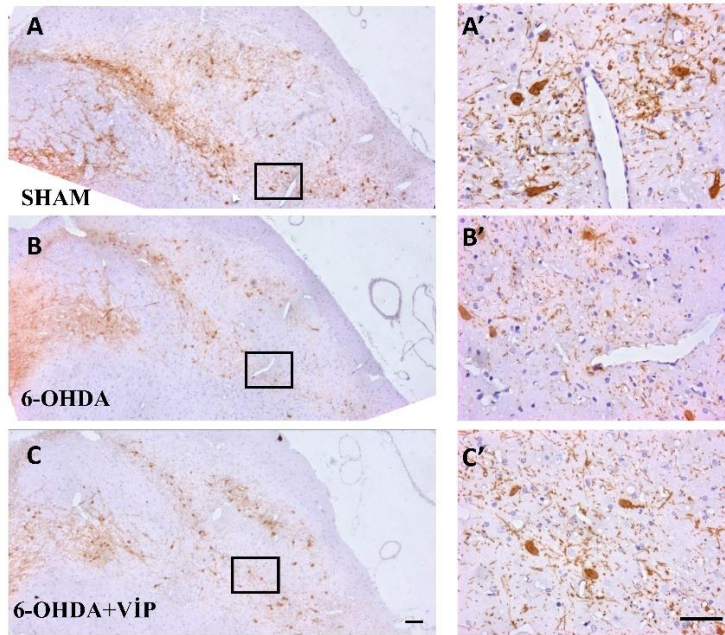
Görüntüler 2,5x objektifle elde edilmiştir. Sol alt köşedeki ölçek (100 µm) her üç görsel için de geçerlidir.

Nigral SNc bölgesi TH immünoreaktivitesi 6-OHDA uygulanan ve 6-OHDA uygulanıp VİP verilen gruplarda, sham grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0,05$). VİP uygulanan grupta 6-OHDA grubuna göre anlamlı değişiklik olmadı (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. 6-OHDA modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

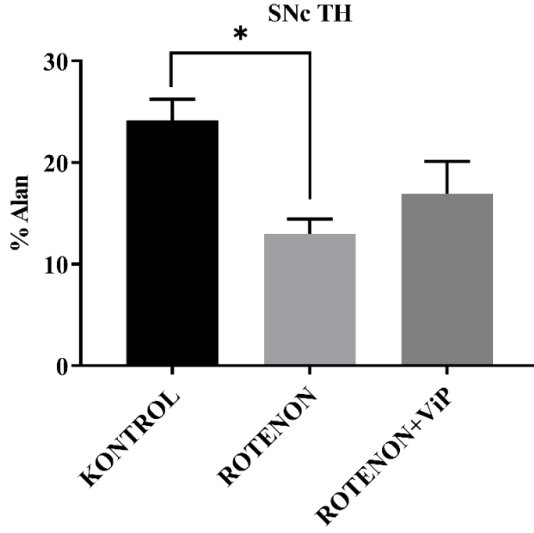
* $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)



Şekil 4.8. 6-OHDA modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi

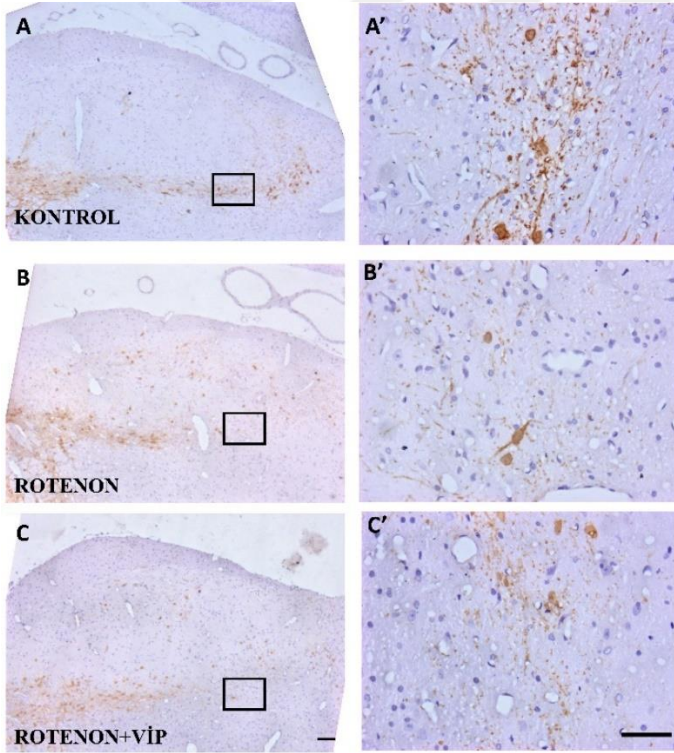
Görüntüler 5x (A, B, C) ve 40x (A', B', C') objektifle elde edilmiştir. Ölçekler: 100 μ m (A, B, C) ve 50 μ m (A', B', C').

Nigral SNc bölgesi TH immünoreaktivitesi rotenon grubunda kontrole göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0,05$). VIP uygulanan grupta rotenon grubuna göre anlamlı değişiklik olmadı, kontrol grubuna göre de anlamlı farklılık oluşmadı (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Rotenon modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

* $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)



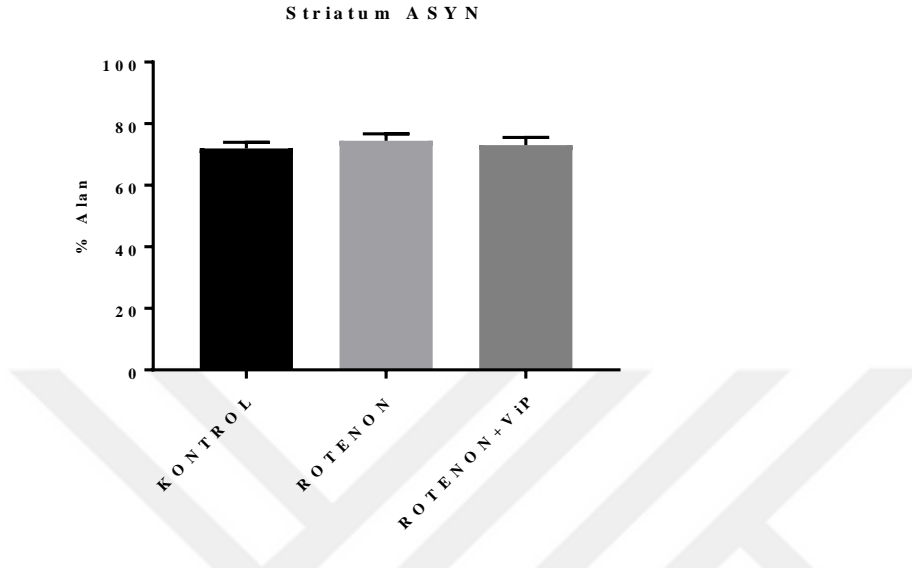
Şekil 4.10. Rotenon modeli gruplarında SNc bölgesi TH immünoreaktivitesinin gösterilmesi

Görüntüler 5x (A, B, C) ve 40x (A', B', C') objektifle elde edilmiştir.

Ölçekler: 100 μ m (A, B, C) ve 50 μ m (A', B', C').

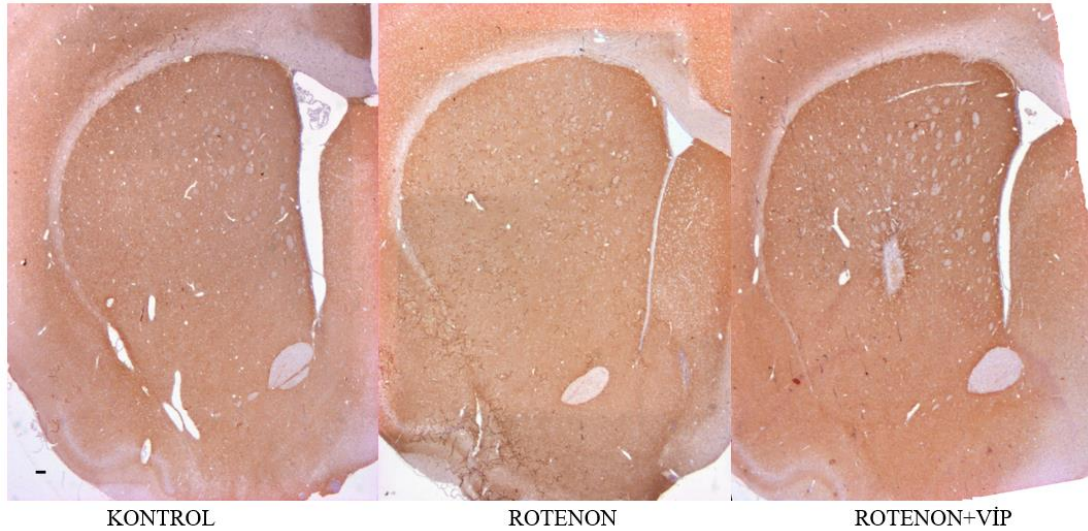
4.2.2. Alfa-sinüklein immünoaktivitesi

Rotenon modeli gruplarında yapılan striatal α -sinüklein değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.)



Şekil 4.11. Rotenon modeli gruplarında striatal α -sinüklein immünoaktivitesinin karşılaştırılması

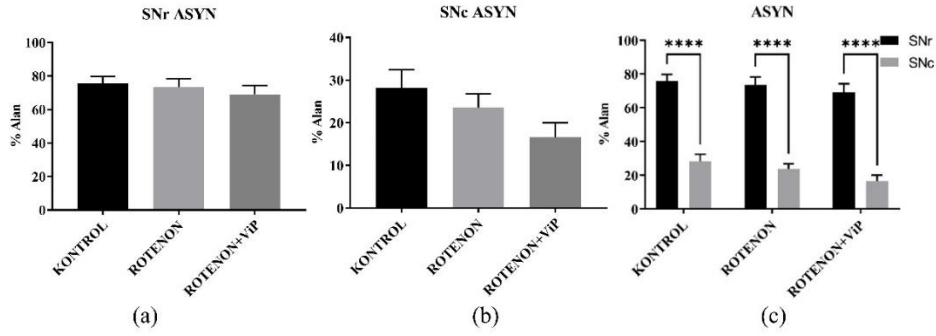
ASYN: α -sinüklein (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)



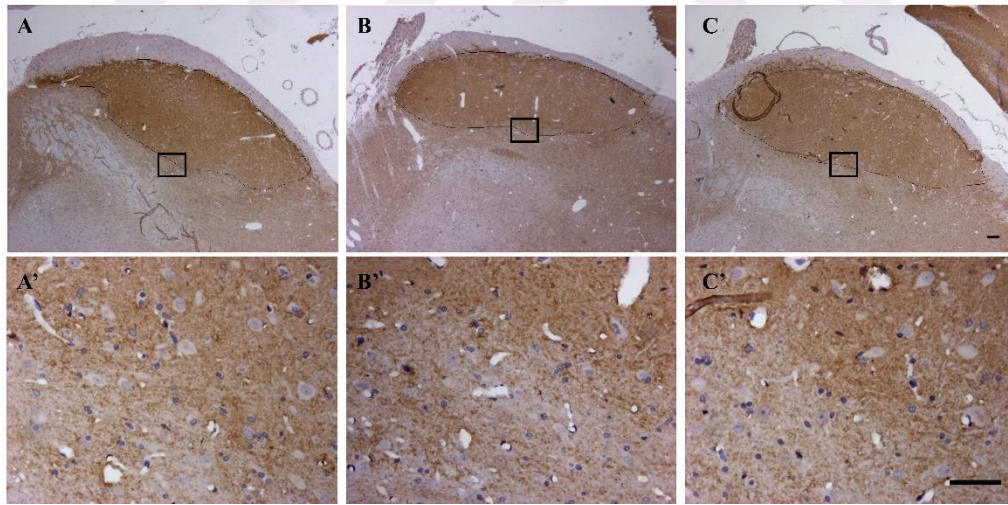
Şekil 4.12. Rotenon modeli gruplarında striatal α -sinüklein immünoaktivitesinin gösterilmesi

Görüntüler 2,5x objektifle elde edilmiştir. Sol alttaki ölçek 100 μ m göstermektedir ve her üç görüntü için geçerlidir.

Rotenon modeli gruplarında yapılan nigral α -sinüklein değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.13.). Rotenon modelinde tüm gruplarda α -sinüklein immünoreaktivitesi SNr'de SNc'ye göre yüksek bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 4.13. (c)).



Şekil 4.13. Rotenon modeli gruplarında SNr ve SNc α -sinüklein immünoreaktivitelerinin karşılaştırılması
 **** $p<0,0001$. ASYN: α -sinüklein (a, b: Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma; c: Bağımsız örneklem T testi)

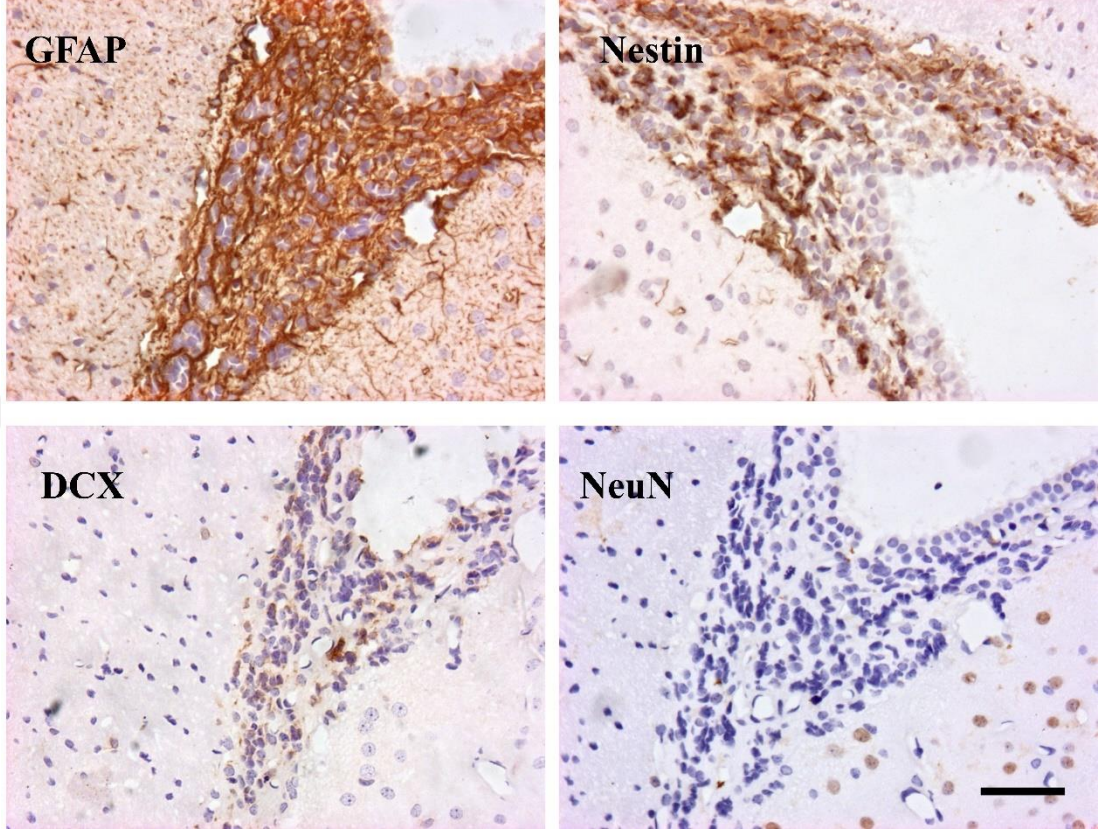


Şekil 4.14. Rotenon modeli gruplarında SNr ve SNc α -sinüklein immünoreaktivitelerinin gösterilmesi

Görüntüler kontrol (A, A'), rotenon (B, B'), rotenon ve VIP (C, C') gruplarında SN bölgesinde α -sinüklein immünoreaktivitesini göstermektedir. SNr bölgesi çizilmiştir. Ölçekler: 100 μ m (A, B, C) ve 50 μ m (A', B', C').

4.2.3. SVZ'de GFAP, Nestin, DCX ve NeuN immünoaktivitesi

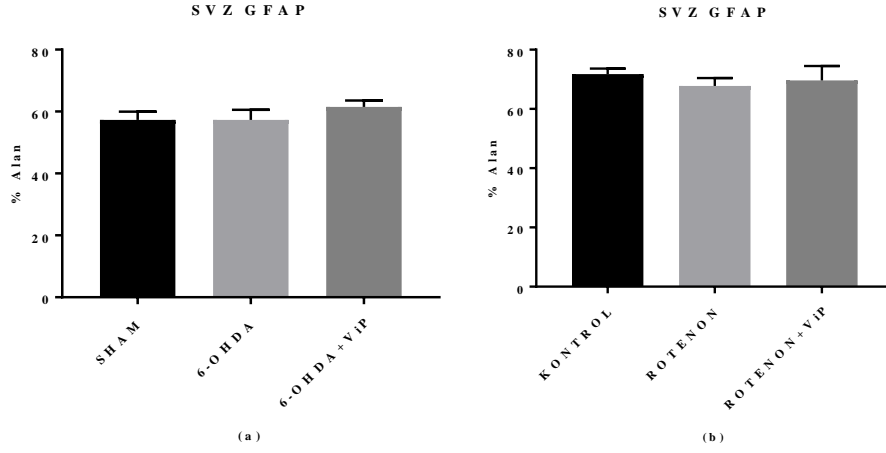
SVZ bölgesinde gözlenen GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoaktiviteleri gösterilmiştir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. SVZ bölgesinde GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoaktivitelerinin gösterilmesi

İmmünohistokimyasal işaretlemeler 6-OHDA grubundan elde edilen dokuda ardışık kesitlerde yapılmıştır. Uygulanan antikorlar şekil üzerinde belirtilmiştir. Görüntüler 40x objektifle elde edilmiştir. Ölçek (50 µm) tüm görseller için geçerlidir.

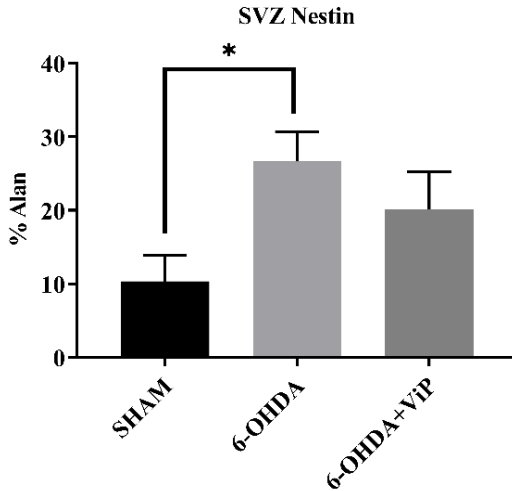
SVZ bölgesinde GFAP değerlendirmesine göre her iki modelde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. 6-OHDA (a) ve rotenon (b) modeli gruplarında GFAP immünoaktivitesinin karşılaştırılması

(a; Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma, b; Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)

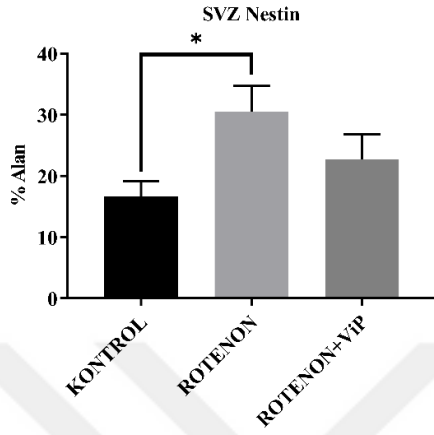
SVZ bölgesinde Nestin immünoaktivitesi 6-OHDA grubunda sham grubuna göre artış gösterdi ($p < 0,05$). 6-OHDA uygulanıp VIP verilen grupta 6-OHDA grubuna göre anlamlı farklılık yoktu, sham grubuna göre de anlamlı farklılık oluşmadı (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. 6-OHDA modeli gruplarında SVZ nestin immünoaktivitesinin karşılaştırılması

* $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)

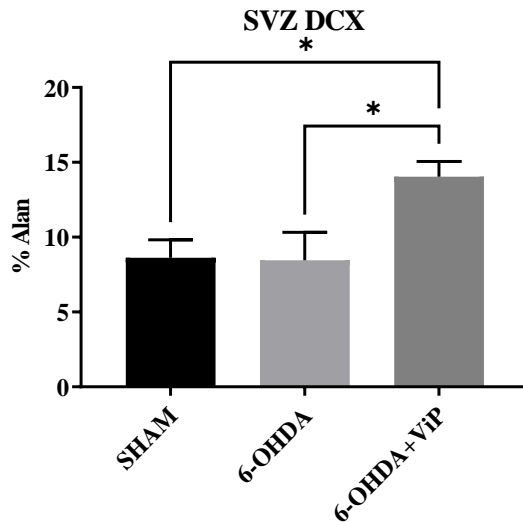
SVZ bölgesinde nestin immünoreaktivitesi rotenon uygulanan grupta kontrole göre artış gösterdi ($p<0,05$). Rotenon uygulanıp VIP verilen grupta rotenon grubuna göre anlamlı farklılık yoktu, kontrol grubuna göre de anlamlı farklılık oluşmadı (Şekil 4.18.)



Şekil 4.18. Rotenon modeli gruplarında SVZ nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

* $p<0,05$ (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

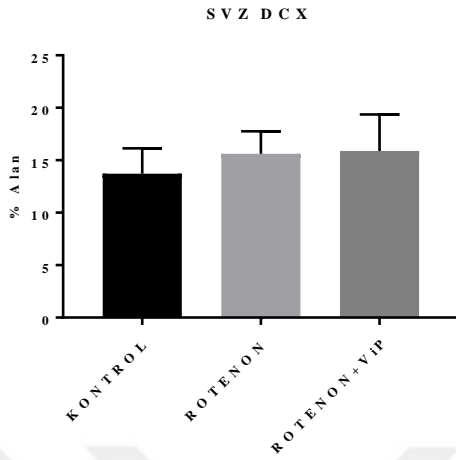
SVZ bölgesinde DCX immünoreaktif alan 6-OHDA uygulanıp VIP verilen grupta, 6-OHDA grubuna ve sham grubuna göre arttı ($p<0,05$) (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. 6-OHDA modeli gruplarında SVZ DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

* $p<0,05$ (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

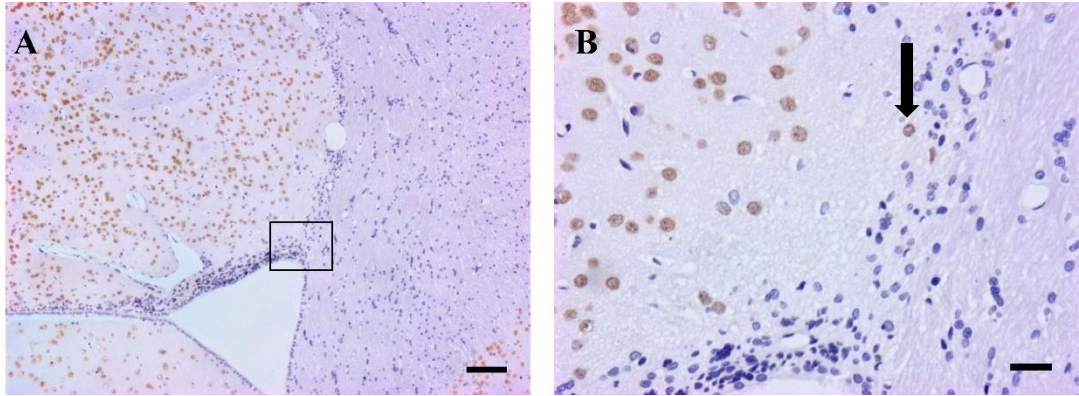
SVZ bölgesinde DCX immünoaktif alan açısından rotenon modeli grupları arasında anlamlı fark oluşmadı (Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. Rotenon modeli gruplarında SVZ DCX immünoaktifitesinin karşılaştırılması

(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

SVZ'de NeuN immünoaktif hücreler seyrek olarak gözlenmiştir (Şekil 4.21.).

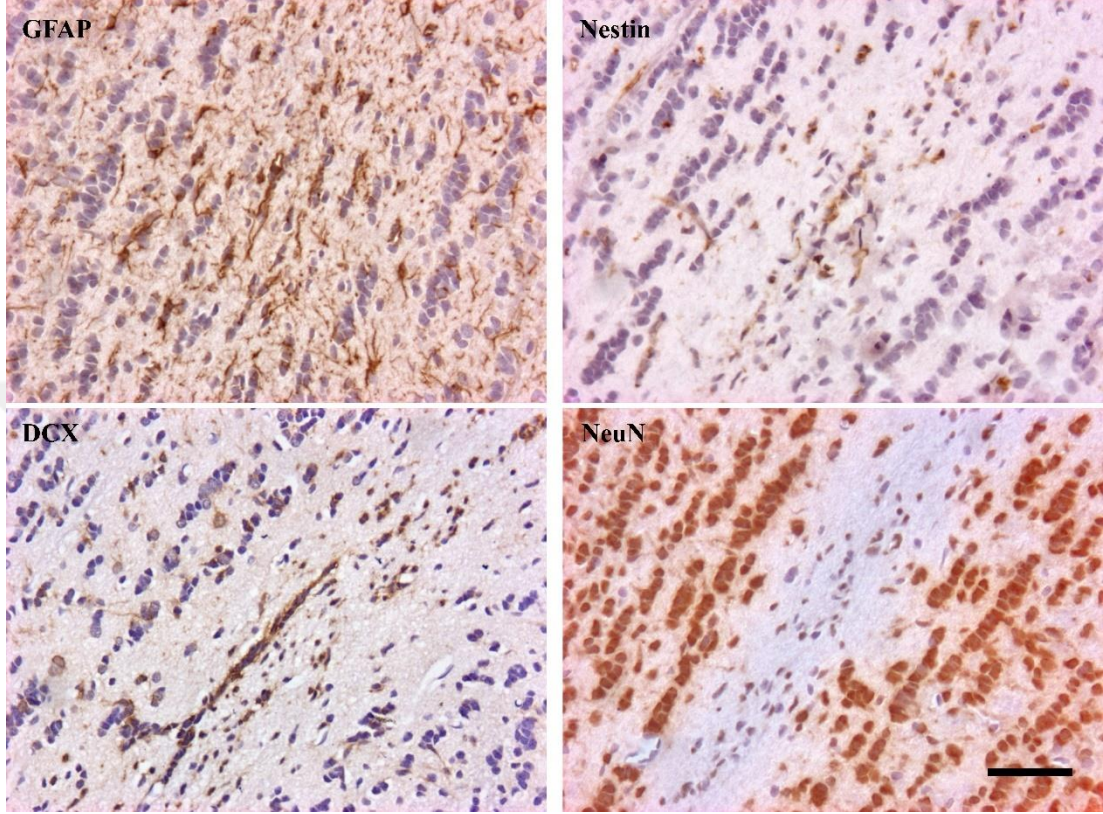


Şekil 4.21. SVZ'de NeuN immünoaktifitesinin gösterilmesi

A görselinde dikdörtgen işaretlenen alan B görselinde görülmektedir. Ok işareti SVZ subkallozal uzantısında NeuN immünoaktif hücreyi işaret etmektedir. A 10x, B 40x objektifle elde edilmiştir. Ölçekler: 100 μ m (A), 25 μ m (B).

4.2.4. OB’de GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktivitesi

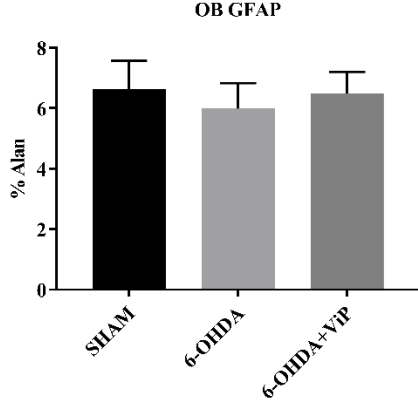
OB bölgesinde GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktiviteleri gösterilmiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. OB bölgesinde GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktivitelerinin gösterilmesi

İmmünohistokimyasal işaretlemeler kontrol grubundan elde edilen dokuda ardışık kesitlerde yapılmıştır. GFAP, nestin, DCX ve NeuN immünoreaktiviteleri görülmektedir. Görüntüler 40x objektifle elde edilmiştir. Ölçek (50 µm) tüm görseller için geçerlidir.

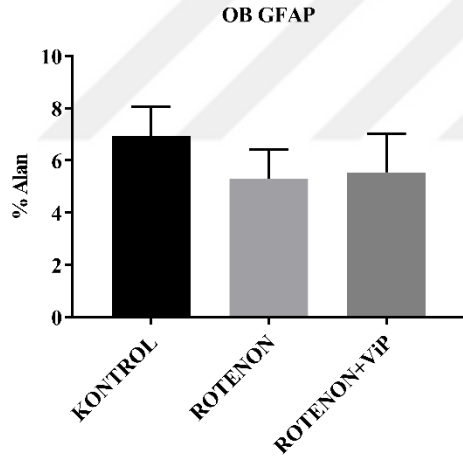
OB’de GFAP immünoreaktivitesi 6-OHDA modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. 6-OHDA modeli gruplarında OB GFAP immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

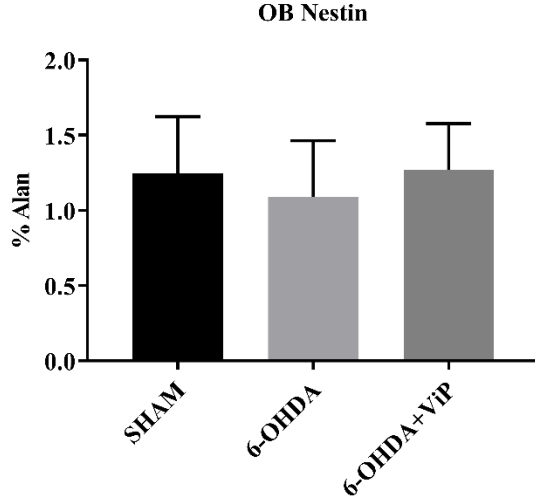
OB'de GFAP immünoreaktivitesi rotenon modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Rotenon modeli gruplarında OB GFAP immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

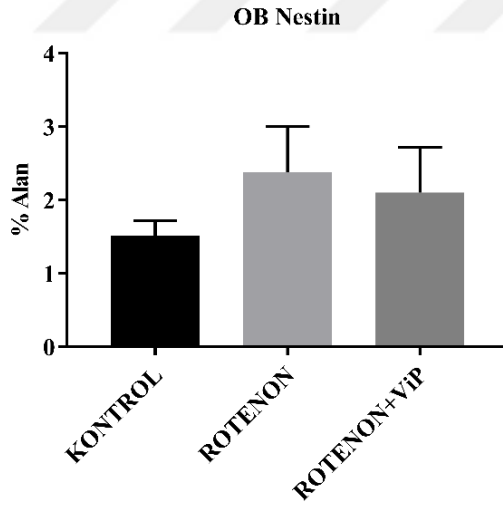
(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

OB'de nestin immünoreaktivitesi 6-OHDA modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.25.).



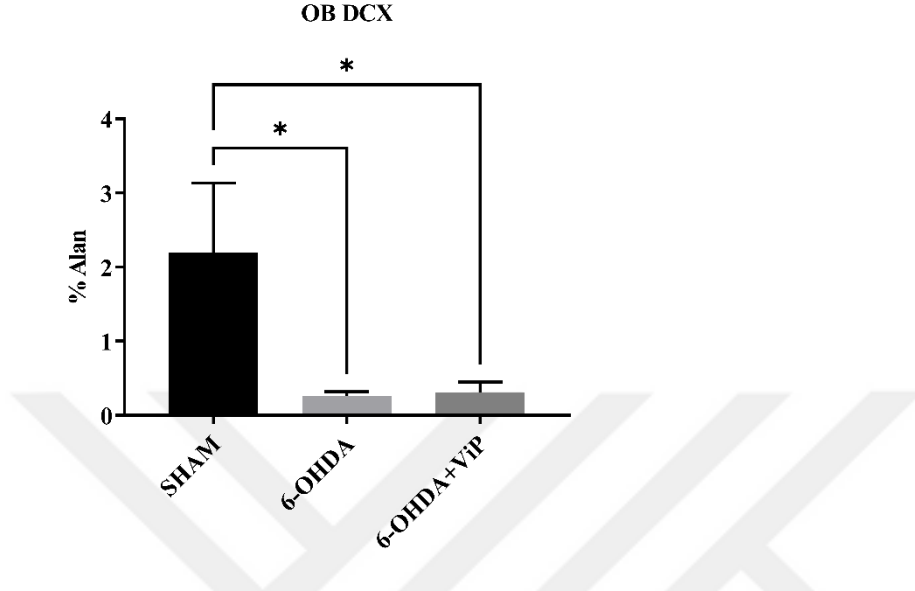
Şekil 4.25. 6-OHDA modeli gruplarında OB nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması
(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

OB'de nestin immünoreaktivitesi rotenon modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.26.)



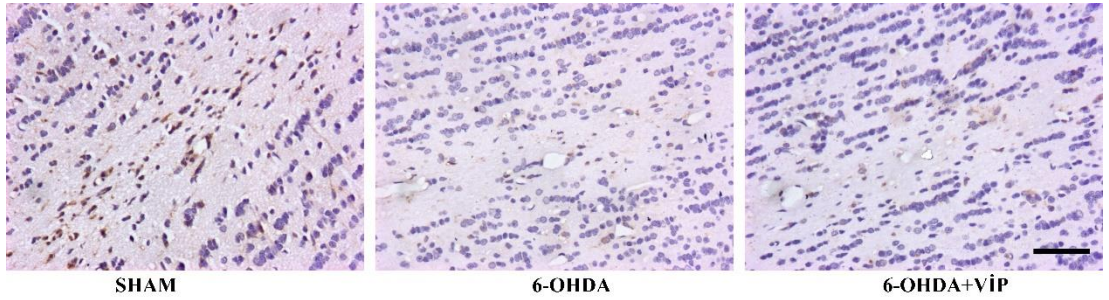
Şekil 4.26. Rotenon modeli gruplarında OB nestin immünoreaktivitesinin karşılaştırılması
(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

OB'de DCX immünoaktivitesi, 6-OHDA grubu ve 6-OHDA verilip VİP uygulanan grupta sham grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$) (Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.).



Şekil 4.27. 6-OHDA modeli gruplarında OB DCX immünoaktivitesinin karşılaştırılması

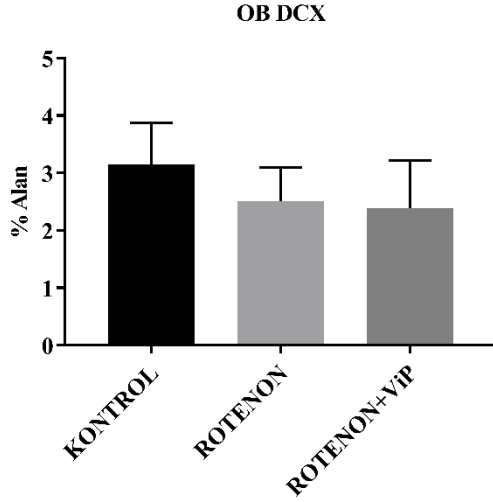
* $p<0,05$ (Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)



Şekil 4.28. 6-OHDA modeli gruplarında OB DCX immünoaktivitesinin gösterilmesi

Görüntüler 40x objektifle elde edilmiştir. Sağ alt köşede yerleşen ölçek (50 μm) her üç görsel için de geçerlidir.

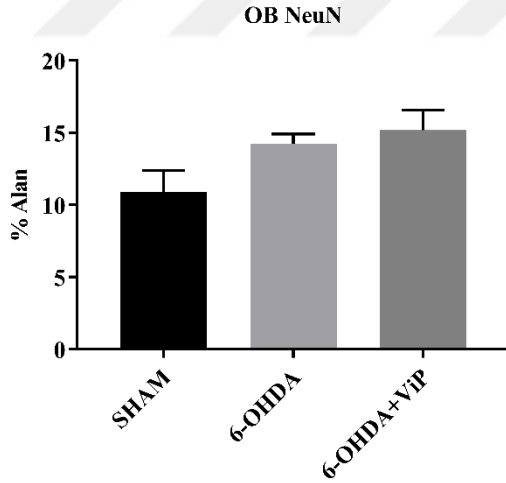
OB'de DCX immünoaktivitesi rotenon modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. Rotenon modeli gruplarında OB DCX immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

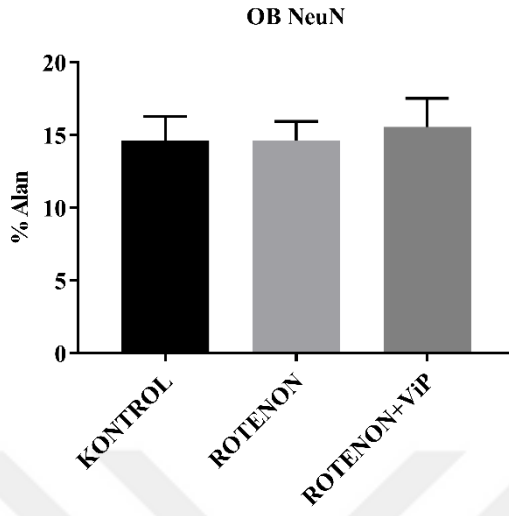
OB'de NeuN immünoreaktivitesi 6-OHDA modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.30.).



Şekil 4.30. 6-OHDA modeli gruplarında OB NeuN immünoreaktivitesinin karşılaştırılması

(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

OB'de NeuN immünoaktivitesi rotenon modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.31.).

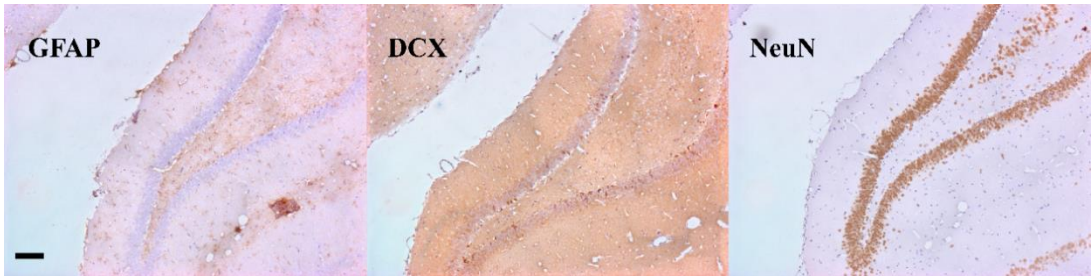


Şekil 4.31. Rotenon modeli gruplarında OB'de NeuN immünoaktivitesinin karşılaştırılması

(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

4.2.5. DG bölgesinde DCX ve nestin immünoaktivitesi

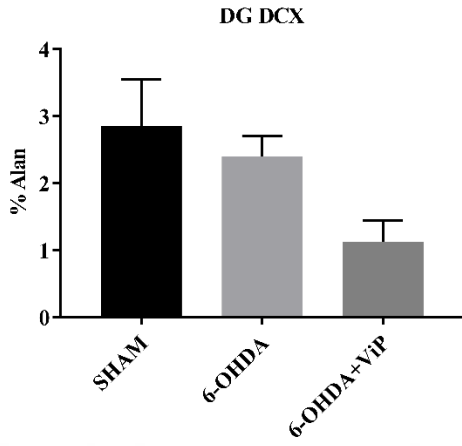
DG bölgesinde gözlenen GFAP, DCX ve NeuN immünoaktiviteleri gösterilmiştir (Şekil 4.32.).



Şekil 4.32. DG bölgesinde GFAP, DCX ve NeuN immünoaktivitelerinin gösterilmesi

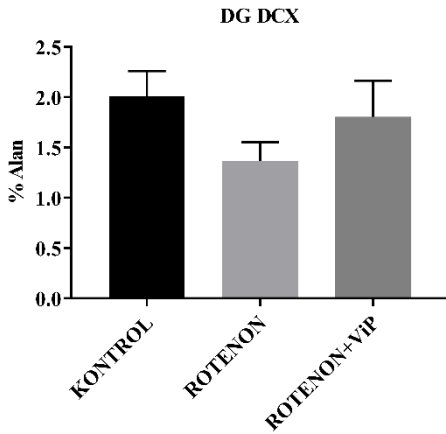
İmmünohistokimyasal işaretlemeler rotenon grubundan elde edilen dokuda ardışık kesitlerde yapılmıştır. Uygulanan antikorlar resim üzerinde belirtilmiştir. Görüntüler 10x objektifle elde edilmiştir. Ölçek (100 µm) tüm görseller için geçerlidir.

DCX immünoaktivitesi, DG’de 6-OHDA modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.33.).



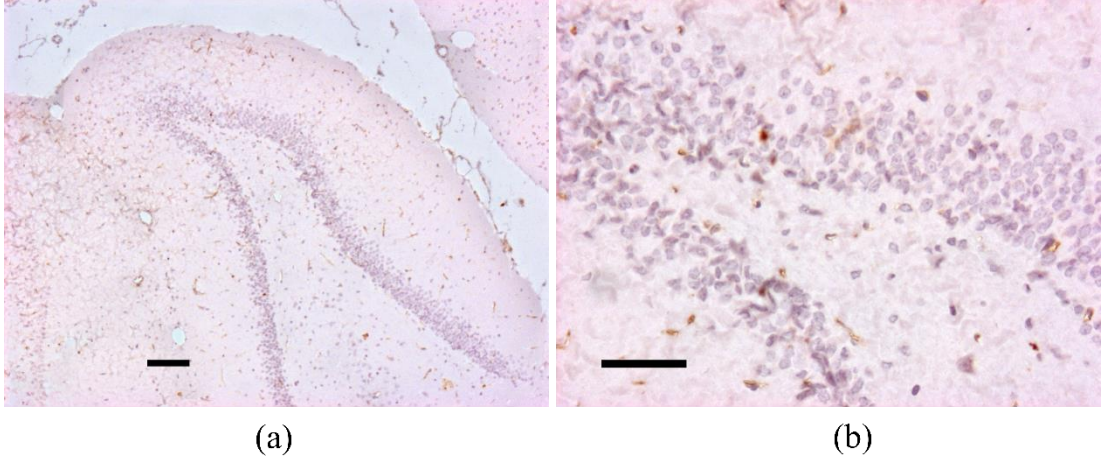
Şekil 4.33. 6-OHDA modeli gruplarında DG bölgesi DCX immünoaktivitesinin karşılaştırılması
(Kruskal Wallis, Dunn çoklu karşılaştırma)

DCX immünoaktivitesi, DG’de rotenon modeli grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. Rotenon modeli gruplarında DG bölgesi DCX immünoaktivitesinin karşılaştırılması
(Tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma)

DG’de nestin immünoaktif hücre gözlenmemiştir (Şekil 4.35.).

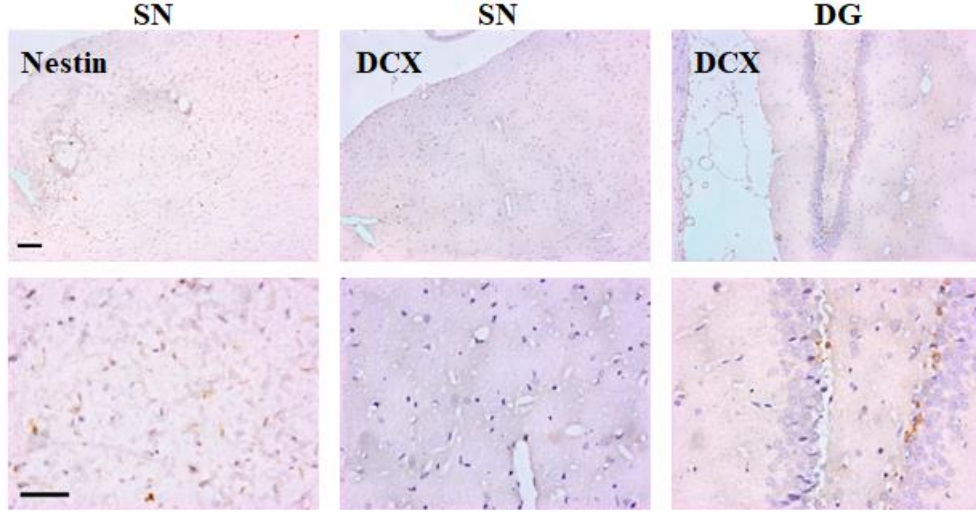


Şekil 4.35. DG’de nestin immünoaktivitesinin gösterilmesi

DG bölgesinde nestin immünoaktivitesi gözlenmemiştir. Görüntüler sırayla 10x (a) ve 40x (b) objektifle elde edilmiştir. Ölçekler sırayla (a) 100 μm ve (b) 50 μm göstermektedir.

4.2.6. Nigral DCX ve nestin immünoaktivitesi

Orta beyin kesitlerinde yapılan DCX ve nestin immünohistokimyasal işaretlenmiş kesit görüntülemelerinde, SN bölgesinde DCX ve nestin immünoaktivitesi gözlenmedi (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. SN bölgesinde nestin ve DCX immünoreaktivitesi

SN bölgesinde nestin ve DCX immünoreaktivitesi gözlenmedi. Üst sıradaki görseller 10x objektif ile elde edilmiş olup, alt sırada üstteki her bir kesitin 40x objektifle alınan görüntüsü yer almaktadır. Kullanılan antikorlar ve kesit bölgesi en üstte belirtilmiştir. Ortadaki DCX immünohistokimyasal işaretlenmiş SN bölgesini içeren tüm kesit alanında hipokampal DG bölgesi de görüntülenebilmektedir. En sağdaki görüntülerde DG bölgesinde DCX immünoreaktif hücreler net olarak görülmektedir ve pozitif kontrol olarak sunulmuştur. Üst sıradaki görseller için üst sırada ilk görseldeki ölçek (100 µm) geçerlidir. Alt sıradaki görseller için alt sırada ilk görseldeki ölçek (50 µm) geçerlidir.

4.2.7. Diğer bulgular

Striatum bölgesinde DCX ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş kesitlerde dağınık yerleşimli kısa uzantılara sahip hücreler gözlenmiştir. 6-OHDA uygulanan hayvanlarda prob hattında GFAP, nestin ve DCX immünoreaktivitesi gösteren, NeuN immünoreaktivitesi açısından negatif alan tespit edilmiştir. İlişkili görseller Ek 4.'te sunulmuştur.

5. TARTIŞMA

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, 6-OHDA modelinde lokomotor aktivitede farklılık gözlenmezken, rotenon uygulanan hayvanlarda VİP, azalan lokomotor aktiviteyi arttırmıştır. 6-OHDA modelinde nigral ve striatal TH immünoreaktivitesinin azalması nigrostriatal dopaminerjik innervasyondaki azalmayı ortaya koymuştur. Benzer şekilde, rotenon uygulamasıyla nigral TH immünoreaktivitesinin azalması nigrostriatal dopaminerjik innervasyonda azalmayı göstermekle birlikte; striatumda TH immünoreaktivitesinde anlamlı azalma görülmemiştir. Her iki toksin modelinde de VİP uygulaması TH immünoreaktivitesini dolayısıyla nigrostriatal dopaminerjik azalmayı geri döndürememiştir. SVZ’de nestin immünoreaktivitesi her iki toksin grubunda da kontrole göre artmakla birlikte VİP uygulamasıyla anlamlı bir farklılık görülmemiştir. SVZ’de DCX immünoreaktivitesinde toksin gruplarında kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlenmezken; VİP uygulaması 6-OHDA modelinde DCX immünoreaktivitesini anlamlı derecede arttırmıştır. Bu da VİP uygulamasının 6-OHDA toksin modeli için nöroblastları, dolayısıyla nöral kök hücreden nörona dönüşümü indüklüyor olabileceğini göstermektedir. Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre; bizim çalışmamız 6-OHDA modeli sıçanlarda *in-vivo* VİP uygulamasıyla SVZ nöroblast artışını gösteren ilk çalışmadır. OB bölgesinde ise VİP uygulaması, 6-OHDA ile azalan DCX immünoreaktivitesinde anlamlı değişikliğe neden olmamıştır. Nöroblast belirteci olan DCX immünoreaktivitesi SVZ’de 6-OHDA modelinde VİP uygulamasıyla kontrole ve 6-OHDA grubuna göre artmasına karşın, OB’de DCX immünoreaktivitesi ise 6-OHDA ve 6-OHDA ile VİP uygulanan gruplarda kontrole kıyasla düşük bulunmuştur.

Lokomotor aktivite testi lokomotor ve davranışsal aktivite düzeyini kapsamlı olarak değerlendiren bir testtir (L. Chen vd., 2012). Kronik rotenon uygulamasında ise lokomotor aktivitenin azaldığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2017). Stereotipik hareketler belirli bir amaca yönelik olmayan tekrarlayıcı davranışlardır ve dopaminerjik etkinliğin artması, özellikle stereotipik hareketler üzerinden lokomotor aktiviteyi artırır (H. Steiner, 2016). Bu tez çalışmasının bulgularına göre, rotenon uygulanan hayvanlarda lokomotor aktivite kontrole göre azalmıştır; bu bulgu dopaminerjik etkinliğin azalması yönünde yorumlanabilir. Azalan lokomotor aktivitenin VİP uygulamasıyla kontrol grubu düzeylerine gelmesi, VİP’in

nigrostriatal dopaminerjik yolağı modüle edici etkisi ile açıklanabilir. Rotenon toksisitesinin periferik etkilerine bağı olarak da davranışsal bulguların oluşabilmesi mümkündür (Höglinger vd., 2006). VİP periferik etkiler üzerinden de fonksiyonel iyileşme sağlıyor olabilir. Ayrıca rotenon modelinde davranışsal bulguların şiddetinde seçilen sıçan türü ve tercih edilen sistemik uygulama yolunun etkisinin görülebileceğı de bildirilmiştir (Cannon vd., 2009; Sherer vd., 2003; von Wrangel vd., 2015; Zhang vd., 2017). Daha önce yapılan bir çalışmada VİP uygulamasının 6-OHDA modelinde azalmış striatal dopamin düzeyini değıştirmeden motor bulguları düzelttiğı gösterilmiştir (Tunçel vd., 2005). Bu tez çalışmasının bulgularına göre ise, 6-OHDA modelinde lokomotor aktivite testlerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Tunçel ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada, motor fonksiyon testleri ikinci haftada; bu tez çalışmasında ise sekizinci haftada gerçekleştirilmiştir (Tunçel vd., 2005). Bu bağlamda aradaki altı haftalık sürede motor fonksiyon kaybına neden olan dopaminerjik kayıp telafi ediliyor olabilir. Diğer taraftan, bu tez çalışmasında, unilateral Parkinson modelini en iyi ortaya koyan motor fonksiyon testi olan apomorfinle tetiklenen rotasyonmetri testi uygulanamamıştır. Dolayısıyla bu noktada, 6-OHDA modelinde VİP uygulamasının motor fonksiyonlar üzerine etkisi hakkında kesin yargıya ulaşmak mümkün değildir.

6-OHDA modelinde striatal sonlanmalardan alınan toksinin striatumda TH immünoreaktivitesini azaltması, buna karşın kronik intraperitoneal rotenon uygulamasının nigrada dopaminerjik hasara neden olurken striatal TH düzeyinde kontrole karşı anlamlı azalmaya neden olmaması, rotenon patolojisinin çıkan yolla ortaya çıkması fikrini kuvvetlendirmektedir (Drolet vd., 2009; Kim vd., 2019; Uemura vd., 2018). Parkinson hastalarından elde edilen bulgulara göre, klinik hastalık enterik ve otonomik sinir sistemi bulgularıyla başlayıp vagal yol ve sempatik bağlantılarla santral sinir sistemine taşınabileceğı gibi, beyin içinde, amigdala, OB gibi bölgelerden başlayarak da periferik otonom sinir sistemine yayılabileceğı; bu özelliklerine göre Parkinson hastalığının beyin-başlangıçlı ve beden-başlangıçlı olarak iki tip olduğı öne sürülmüştür (Bohnen & Postuma, 2020; Borghammer & van den Berge, 2019). Bu bağlamda uyguladığımız prosedürdeki rotenon modelinin, hayvanlarda, beden başlangıçlı Parkinson hastalığıyla uyumlu bir fenotip geliştirdiğı ve bundan dolayı striatal TH immünoreaktivitesinin azalmadığı söylenebilir.

Çalışmamızda kullandığımız dozda rotenon uygulanan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sprague-Dawley sıçanlara 2,5 mg/kg/gün rotenon uygulanan bir çalışmada nigral TH pozitif nöron sayısı (%30 azalış) ve normalize edilmiş striatal TH dansitesi (1'e karşı 0,26) kontrole kıyasla azalmıştır (von Wrangel vd., 2015). Bir başka çalışmada ise Sprague-Dawley sıçanlara 48 gün boyunca 2,5 mg/kg/ml i.p. rotenon uygulanan grupta striatum ve nigra dokularından protein tayini ile dopamin düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Alam & Schmidt, 2004). Wistar sıçanlarda yapılan bir çalışmada on günlük rotenon (2,5 mg/kg/ml) enjeksiyonu sonrası 33. günde alınan nigral dokularda TH optik dansitesi kontrole göre %13 azalmış bulunmuştur (Zaminelli vd., 2014). Rotenonun 10-18 mg/kg/gün intravenöz uygulandığı bir çalışmada ise nigral TH nöron sayısı azalmamıştır (Ferrante vd., 1997). Richter vd.'nin (2007) çalışmalarında ise farelerde nigrostriatal dopaminerjik nöron kaybının oluşmadığı bildirilmiştir. Subkutan yoldan 30-45 gün süreyle sistemik rotenon uygulanan bu çalışmada farelerin spontan motor aktivitesi azalırken nigral dopaminerjik nöron yoğunluğu ve striatal TH lif dansitesi azalmamış, yalnızca 12 aylık yaşlı hayvan grubunda yüksek dozla (4 mg/kg) uygulamada nöron sayısında azalma eğilimi oluşmuştur (Richter vd., 2007). Lewis sıçanlarda 2,75 mg/kg/gün rotenon uygulamasıyla belirgin striatal lezyon olmadan hipertrofik ve olasılıkla disfonksiyonel dopaminerjik sonlanmaların gözlemlendiği bildirilmiştir (Cannon vd., 2009). Rotenon modelinde striatal dopaminerjik innervasyon kaybının görülme oranı %20'ye kadar düşebilmektedir (Höglinger vd., 2006). Farklı hayvanlarda, dozlarda ve uygulama sürelerinde rotenonla oluşturulan striatal patoloji değişkenlik gösterebilmektedir (Cannon vd., 2009; Y. He vd., 2003; Sherer vd., 2003; Zhang vd., 2017).

Rotenon modelinde α -sinüklein immünoaktivitesinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Betarbet vd. (2000) intravenöz kanülasyonla rotenon uyguladıkları çalışmalarında, Sprague-Dawley sıçanlara göre Lewis sıçanlarda daha tutarlı bulgular elde ettiklerini belirterek çalışmalarına bu sıçan türü ile devam etmişlerdir (Betarbet vd., 2000). Aynı grubun bir başka çalışmasında Lewis sıçanlarda nigral nöronlarda α -sinüklein inklüzyonları 3mg/kg/gün 32 günlük rotenon enjeksiyonu grubunda gösterilebilmiştir (Sherer vd., 2003). Cannon vd. (2009) çalışmalarında rotenonun 3 mg/kg/gün uygulanmasıyla nigral nöronlarda α -sinüklein ve poli-ubikuitin içeren inklüzyonlar gözlemlendiği

bildirilmiş, ancak bu nöronlarda TH immüno pozitifliği net olarak gösterilmemiştir (Cannon vd., 2009). Subkutan yoldan 2,5 mg/kg/gün dört hafta boyunca rotenon uygulanan farelerde, nigral dopaminerjik nöronların bazılarında α -sinüklein birikimi sitoplazmada ve uzantılarda gösterilmiştir (Miyazaki vd., 2020). Wistar sıçanlara subkutan yoldan beş hafta boyunca 2-2,5 mg/kg/gün rotenon uygulamasında, doz artışı ile α -sinüklein pozitif nigral dopaminerjik nöron sayısının arttığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2017). Bir başka çalışmada Sprague Dawley sıçanlara 1 mg/kg subkutan rotenon uygulanmış, nigral dopaminerjik nöronlarda α -sinüklein birikimi gösterilmiştir (Yuan vd., 2016). Nigral dopaminerjik nöronların dışında α -sinüklein ekspresyonunun yüksek olduğu bilinen komşu SNr alanında α -sinüklein immüno reaktivitesi gözlenmemesi ise dikkat çekmektedir (Taguchi vd., 2016; Yuan vd., 2016). Görüldüğü gibi çeşitli çalışmalarda nigrostriatal dopaminerjik nöron hasarı ve α -sinüklein birikimi açısından birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Hayvanların tümünde tipik nöronal hasarın gösterilemediği bildirilmiştir (Abdel-Salam, 2015; Sherer vd., 2003). Rotenon dozu, sıklığı, uygulama süresi, seçilen hayvan türü birbirinden farklı histolojik sonuçlara yol açabilmektedir. Rotenon modelinin kullanılabilirliği açısından soru işaretlerine neden olan farklılıklar ve tekrarlanamama durumu, çok sayıda derlemede dikkate alınmıştır (Abdel-Salam, 2015; Cicchetti vd., 2009, 2010; Giráldez-Pérez vd., 2014; Höglinger vd., 2006). İmmünohistokimyasal ve immüno floresan yöntem farklılıkları, kullanılan antikor özellikleri bu farklılıklarda rol oynayabilir. Uygulama yolu, süresi ve hayvan türüne göre oluşabilecek farklılıklar da göz önünde bulundurulması gereken değişkenlerdir. Bu nedenlerle bizim çalışmamızda, toksin uygulama yolu, hayvan türü ve kullanılan antikor özelliklerine bağlı olarak α -sinüklein patolojisi gösterilememiş olabilir.

Erişkin memeli beyinde nörogenezin devam ettiği bilinen SVZ, OB, SGZ bölgelerinde çeşitli toksin uygulamalarının etkileriyle ilgili ve nörodejeneratif süreçlerdeki nörogenezi hedefleyen tedavi stratejilerine yönelik çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır.

SVZ'de, tip B hücrelerin bazıları ve tip C hücrelerce ifade edilen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) pozitif proliferatif hücrelerin MPTP uygulamasıyla erken dönemde azaldığı gösterilmiş, MPTP etkisiyle azalan dopamin nedeniyle bu hücrelerin mitotik aktivitelerinin azalmış olabileceği ileri sürülmüştür; ilerleyen dönemde ise proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) değerlendirmesine

göre proliferasyon gösteren hücre sayısı kontrolden farksızdır. Nigrostriatal 6-OHDA uygulanan sıçanlarda da SVZ'de PCNA pozitif proliferatif hücre sayısının azaldığı, D2 reseptör agonisti uygulanmasıyla proliferasyonun arttığı gösterilmiştir. (Höglinger vd., 2004). Memeli beyinde SVZ'nin tip C ve tip A hücreleri D1 ve D2 reseptörleri eksprese ederler. Parkinson hastalarının beyinlerinde SNe'den SVZ'ye gelen dopaminerjik girdinin azalması D2 ve D3 reseptörlerinden zengin tip C hücrelerin ölümüne neden olmuştur. Parkinson'lu SVZ daha az öncül (progenitör) hücre barındırmaktadır (Curtis vd., 2007). Bulgularımıza göre SVZ'de nestin immünopozitif hücre alan toksin gruplarında kontrole kıyasla artmıştır. Aktif tip B ve tip C hücrelerce ifade edilen nestin immünoreaktivitesinde toksin uygulamasıyla azalma olmaması, tersine artış olması bu hücreler üzerindeki dopaminerjik innervasyonda kayıp olmadığını düşündürmektedir. Bu durum 6-OHDA grubunda gözlenen striatal TH immünoreaktivite kaybının SVZ komşuluğundaki medial striatumdan ziyade, motor merkezlerden girdi alan lateral striatumda gözlenmesiyle ilişkili olabilir (Crittenden & Graybiel, 2011). Rotenon uygulanan hayvanların bazılarında gözlenebilen striatal TH immünoreaktivite kaybı da SVZ komşuluğundaki striatal alanda yer almamıştır. SVZ'deki nestin pozitif hücre alanının her iki toksin grubunda kontrole göre artması, proliferatif kapasitesi yüksek olan tip C öncüllerde toksinlere yanıt olarak proliferasyonun tetiklenmesine bağlı olabilir (Mamber vd., 2013). SVZ'de toksin uygulamalarının erken dönemde nöroblastlarda apoptoza neden olabileceği de bildirilmiştir (X. J. He vd., 2006). SVZ'de nöroblast belirteci DCX değerlendirmemize göre toksin uygulamalarıyla kontrole kıyasla fark oluşmamıştır. Toksin gruplarında gözlediğimiz nestin artışı, nöroblastlarda apoptotik süreçlerin başlamasına yanıt olarak da nestin pozitif hücrelerde proliferasyonun tetiklenmiş ve farklılaşan hücrelerin DCX pozitif tip A nöroblastları ikame etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımıza göre SVZ'deki nestin immünopozitifliği açısından, VIP uygulanan gruplarda toksin gruplarına göre anlamlı bir fark gözlenmemekle birlikte azalma eğilimi vardır. Bu durumda da VIP'in nöroprotektif etkisi apoptotik süreçleri yavaşlatıyor olabilir.

SVZ'de nöroblastlarca ifade edilen DCX pozitif hücre sayısı nigrostriatal 6-OHDA modelinde ilk iki haftada kontrole kıyasla azalmış (Winner vd., 2008); SVZ'de DCX pozitif-PCNA pozitif tip A hücreler MPTP uygulamasıyla erken dönemde azalırken iki ila dört haftada kontrol değerlerine dönmüştür (X. J. He &

Nakayama, 2015). MPTP uygulamasıyla SVZ'de özellikle nöroblastlarda yani tip A hücrelerde başlangıçta apoptozun arttığı, nörogenezin baskılandığı (X. J. He vd., 2006), sonrasında onarım süreci ile tip A hücrelerde toparlanmanın gerçekleştiği ifade edilmiştir (X. J. He & Nakayama, 2015). Bulgularımıza göre SVZ'de DCX immünoreaktif hücresel alan toksin uygulamasıyla kontrole göre fark göstermemiştir. DCX pozitif hücresel alan erken dönemde azalmış bile olsa, sekiz haftalık deney sürecimizin sonunda literatürle benzer şekilde toparlanmaya bağlı olarak kontrol değerlerine dönmüş olabilir. Uyguladığımız VIP ise SVZ'de DCX immünoreaktivitesini arttırmıştır. Bu durumda, deneye başladığımızda uygulanan 6-OHDA sonrası, SVZ nöroblastlarında gözlemlediğimiz olası toparlanma, sekiz haftalık VIP uygulaması ile daha da indüklenmiş gözükmektedir. Bizim bulgularımızla benzer şekilde, Yang ve arkadaşları serebral iskemi modelinde intraserebroventriküler VIP uygulamasıyla SVZ'de DCX pozitif hücrelerin arttığını göstermişlerdir (Yang vd., 2015). Bulgularımıza göre, 6-OHDA modelinin aksine, rotenon toksin gruplarında VIP aynı etkinliği gösterememiştir. Bu durum, rotenon toksisite mekanizmasının farklılığıyla ilişkili olabilir.

Postnatal beş haftalık genç erişkin farelerden elde edilen SVZ ve striatum dokularında VIP reseptör genlerinin ifade edildiği gösterilirken, primer kültür ortamında çoğaltılan nöral kök hücrelerde ise VPAC1 reseptörünün ekspresyonu gösterilememiştir (Mansouri vd., 2012). Erişkin fare SVZ'sinden elde edilen nöral kök hücre kültüründe 0,003-0,01-0,03 μ M uygulamada VIP'e yanıt alınmamış, 0,3 μ M uygulamada proliferasyonda anlamlı artış gösterilmiş; ancak bu konsantrasyonun fizyolojik olmadığı, VIP'in 100-1000 kat daha düşük afiniteyle bağlandığı PAC1 reseptörünü uyaran konsantrasyon olduğu belirtilmiştir. Kültürde gösterilen nöral kök hücre proliferasyonunun VPAC reseptörlerinden ziyade PAC1 reseptörleri aracılığıyla ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Mercer vd., 2004). SVZ kaynaklı nöral kök hücre kültüründe, hücre çoğalması PACAP uygulamasıyla uyarılmıştır. PAC1 reseptörlerinin SVZ'de eksprese edildiği, farelerde intraventriküler PACAP uygulamasıyla SVZ'de proliferasyonun arttığı gösterilmiştir (Mercer vd., 2004). Bu bağlamda, *in-vivo* bulgular ile *in-vitro* çalışmaların farklı sonuçlara ulaşması noktasında reseptör aktivasyon düzeyinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

SVZ'de, nöroblastların matürasyon sırasında NeuN eksprese edebilecekleri, bu hücrelerin küçük hücre çekirdekleri ile olgun nöronlardan ayırt edilebileceği

bildirilmiştir (Saito vd., 2018). SVZ’de seyrek olarak gözlediğimiz NeuN immünpozitif hücreler, olasılıkla matürasyon sırasında NeuN ekspresyonu başlayan nöroblastları göstermektedir. Ancak bu hücrelerin net karakterizasyonu için ikili immün işaretleme yapılması gerekmektedir.

OB bölgesinde, MPTP uygulamasının göç etmiş nöroblastları azalttığı gösterilmiş (Höglinger vd., 2004); 6-OHDA modelinde OB glomerüler ve granüler hücre tabakalarında NeuN pozitif hücre sayısı ise değişmemiştir (Winner vd., 2008). OB bölgesindeki değerlendirmelerimize göre, literatürle benzer şekilde, nöroblast belirteci olan DCX immünoaktivitesi 6-OHDA uygulanan hayvanlarda kontrol grubuna göre azalmıştır; VİP uygulanan grupta ise 6-OHDA grubuna göre fark oluşmamıştır. OB’de nöroblastlarda azalmanın nedeni; stereotaksik 6-OHDA uygulama koordinatları ile RMS’nin yakınlığı sebebiyle apoptoza açık tip A nöroblastlarda göç sırasında toksin etkisiyle hücre ölümünün gerçekleşmesi olabilir. VİP, 6-OHDA’nın göç eden nöroblastlar üzerindeki toksisitesine karşı koruyuculuk göstermemiştir. Rotenon modelinde ise OB’de DCX pozitif nöroblast alanında gruplar arasında fark oluşmamıştır. Bu durum çıkan yol üzerinden oluştuğunu düşündüğümüz rotenon toksisitesinin rostral koordinatlara ulaşmamasıyla ilişkili olabilir. OB’de nestin eksprese eden öncüllerde ve NeuN pozitif matür nöronal alanda ise her iki modelde de gruplar arasında farklılık görülmemiştir. OB’nin merkezinde nestin pozitif öncüllerin varlığı (Liu & Martin, 2003), OB’de nörogenez sonucu oluşan ara nöronlar arasında VİP ifade eden ara nöronların da olduğu (R. Chen vd., 2012) bilinmektedir. Tespit ettiğimiz öncüllerin postmitotik aşamada hangi tip matür fenotip kazandıklarına ve VİP uygulamasının bu sürece etkisine dair değerlendirme yapabilmek için ek çalışmalar gerekmektedir.

DG bölgesinde, MPTP uygulaması ile DCX pozitif-BrdU pozitif hücrelerin arttığı bildirilmiştir (Peng vd., 2008). MPTP uygulanan hayvanlarda hipokampal DG’de BrdU pozitif hücrelerde değişiklik olmadığını (X. J. He & Nakayama, 2015; M. Zhao vd., 2003) ya da geçici artış olduğunu (Park & Enikolopov, 2010) bildiren çalışmalar da mevcuttur. Sıçan 6-OHDA modelinde DG’de proliferasyonun azaldığını gösteren çalışmalar olduğu gibi değişmediğini gösteren sonuçlar da elde edilmiştir (Suzuki vd., 2010; Winner vd., 2009). MPTP modeli farelerde transkriptom analizi yapılan bir çalışmada, hipokampal DG’de VİP gen ekspresyonu azalmıştır (Bao vd., 2017). Postnatal sekiz-on günlük sıçanlardan elde edilen

hipokampal NKH kültüründe VPAC1 reseptör agonisti, PAC1 reseptörünü uyarmayan konsantrasyonda nöronal farklılaşmayı arttırmış; 30 nM VIP uygulaması olasılıkla VPAC2 reseptör ekspresyonunu arttırarak öncül hücrelerin nestin pozitif fenotip yönüne bölünmesini sağlamıştır. VPAC2 reseptör geni susturulmuş farelerde SGZ'de nestin pozitif hücrelerin azaldığı gösterilmiştir (M. Zaben vd., 2009; M. J. Zaben & Gray, 2013). Erken postnatal fare beyninden elde edilen nöral öncül hücre kültüründe ise 100 nM VIP ve PACAP uygulaması, hücrelerin apoptozuyla birlikte nöronal veya glial farklılaşmasını da engellemiş, zayıf VPAC2 ekspresyonu ile değerlendirildiğinde bu etkiler yüksek olasılıkla PAC1 reseptör aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Scharf vd., 2008). Zaben vd.'nin (2009) çalışmalarında yaptıkları değerlendirmeye göre ise bu etki kendi çalışmalarında elde ettikleri VPAC2 reseptör aracılı etkiyle uyumludur (M. Zaben vd., 2009). *In-vivo* bir çalışmada farelerde intraserebroventriküler PACAP uygulamasının, PAC1 reseptör ekspresyonuna bağlı olarak DG bölgesinde proliferatif hücreleri arttırdığı ifade edilmiştir (Mercer vd., 2004). Arttırılmış uyaran ortamına maruziyetin hipokampal nörogeneze etkisiyle ilgili bir çalışmada ise endojen PACAP'ın etkisi gen susturma yöntemiyle değerlendirilmiş, DG granül hücrelerinin proliferasyonuna olmasa da sağkalımlarına katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Ago vd., 2011). Bir başka çalışmada fare hipokampusunda parvalbuminerjik ara nöronların optogenetik olarak aktivasyonu ile nestin pozitif öncüller sessiz döneme yönlendirilmiş ancak VIP ve somatostatin eksprese eden ara nöronların nestin pozitif öncüller üzerine etkisi gösterilememiştir (Song vd., 2012). Yenidoğan hayvanlardan elde edilen DG hücrelerinin sağladığı bulgular ile erişkin hayvanlardaki *in-vivo* bulguların farklılığı dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasının bulgularına göre, hipokampal DG bölgesinde DCX pozitif nöroblast alanının değerlendirilmesinde gruplar arasında anlamlı fark oluşmamış, nestin eksprese eden öncüllere ise rastlanamamıştır. VIP uygulaması her iki toksin modelinde de hipokampal DG bölgesindeki nöroblast yoğunluğuna katkıda bulunmamıştır. Nestin pozitif öncüllerin gözlenememesi, dokuların yaklaşık beş aylık hayvanlardan elde edilmiş olmasından kaynaklanabilir. VIP uygulamasının ve VIP eksprese eden ara nöronların DG bölgesinde nörogeneze etkisi ve mekanizmalarına dair, reseptör protein düzeyleri ve aktivasyonunu da içeren *in-vivo* çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Nigrostriatal dejenerasyon modellerinde hasara uğrayan bölgelerde nörogenezin aktive olarak rejenerasyon sağlama potansiyeli birçok araştırmancının çıkış noktasıdır. Proliferatif hücreleri göstermek üzere timidin analogu kullanılan bir çalışmada, farelerde nigral dokuda bazı proliferatif hücrelerin DCX pozitifliği de gösterdiği bildirilmiş, ancak bu nöronların matür fenotip kazandığı gösterilememiş, 6-OHDA uygulaması bu hücrelerde sayıca değişikliğe yol açmamıştır (Worlitzer vd., 2013). Buna göre nigral DCX pozitif hücrelerin SVZ ve DG progenitörlerine benzer nörogenez kapasitesi gösteremeyecekleri yorumlanarak; progenitör hücre göçünde bilinen rolü yanında, nöronal hücresel plastisitede de önemi olduğundan, DCX'in nörogenez belirteci olarak değerlendirilmesinde dikkatli olunması önerilmiştir (Worlitzer vd., 2013). Birçok başka çalışmaya göre ise nigrada DCX pozitif hücrelere rastlanmamıştır (Frielingsdorf vd., 2004; Kay & Blum, 2000; Klaissle vd., 2012; B. Steiner vd., 2006; van Kampen & Eckman, 2006). MPTP modelinde nigrada BrdU tutulumu gösteren hücrelerin immatür (DCX) veya matür (NeuN) nöronal belirteçler yönünden pozitiflik göstermediği (Klaissle vd., 2012), striatal 6-OHDA modelinde ve kontrol grubunda nigral BrdU hücrelerin glial belirteç gösterdikleri bildirilmiştir (B. Steiner vd., 2006). Elde ettiğimiz bulgulara göre de nigrada DCX pozitif hücrelere rastlanmamış, benzer şekilde nigral nestin pozitifliği de izlenmemiştir.

Striatal nörogeneze yönelik olarak, çeşitli iskemi modellerinde iskemik alanda artmış DCX pozitifliği bildirilmiştir (Arvidsson vd., 2002; Lv vd., 2018; Magnusson vd., 2014; Plane vd., 2008; Thored vd., 2006; Yamashita vd., 2006). Bu çalışmalar, iskemide nöroblast göçünün tetiklendiğini göstermektedir. Öte yandan; glial yara oluşumunda astrositlerin nestin ekspresyone edebildikleri bilinmektedir (Frisén vd., 1995; Lin vd., 1995; Wachter vd., 2010). Astrositlerin geriye doğru farklılaşarak (dediferansiyasyon) nestin ekspresyone ettikleri ileri sürülmüştür (Wachter vd., 2010). 6-OHDA uygulanan hayvanlardan elde ettiğimiz kesitlerde, stereotaksik uygulama probunun geçtiği hatta, probun madde geçişine izin veren porlarının bulunduğu kısımda, DCX ve nestin pozitif alanın yoğunlaştığı, bu bölgenin NeuN negatif olduğu dikkati çekmiştir. Bu değişiklikler glial yara dokusu ile uyumlu görünmektedir. Prob uygulama bölgesinde gözlemlediğimiz hücrelerin nörojenik potansiyelinin değerlendirilmesi ileri çalışmaları gerektirmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında nöroprotektif, nöromodülatör ve nörotrofik etkileri bilinen VİP'in, oluşum mekanizmaları birbirinden farklı iki Parkinson modelinde gerçekleşen nörogenez sürecine etkisi, belirteçler aracılığıyla bütünsel bir yaklaşımla değerlendirilmiştir. Bu iki modelde nörogenez süreçlerinin, özellikle göç eden nöroblastlar bağlamında, farklı etkilenebileceği görülmüştür. Yine, kronik VİP uygulamasının etkilerinin iki modelde birbirinden farklı olduğu anlaşılmıştır. VİP, rotenon modelinde lokomotor aktiviteyi arttırmış; 6-OHDA modelinde ise nöroblast oluşumunu tetiklemiştir. Çalışmamız iki farklı Parkinson modelinde VİP'in nörogeneze etkisini *in-vivo* olarak ilk kez ortaya koymuştur.

VİP'in iki farklı Parkinson modelinde nörogeneze olan etkinliğinin farklı olarak gözlenmesine neden olan fizyopatolojik mekanizmaların neler olduğu ve VİP'in bu mekanizmaları nasıl değiştirdiği; dahası VİP etkisinin ortaya çıkışında özellikle nöral öncüllerde reseptör etkileşimlerinin rolü gelecek çalışmalarla değerlendirilmeyi beklemektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbott, L. C., & Nigussie, F. (2020). Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 49(1), 3-16. <https://doi.org/10.1111/ahe.12496>
- Abdel-Salam, O. M. E. (2015). The Rotenone Model of Parkinson's Disease in Studying the Mechanisms of Nigrostriatal Cell Death. *Jacobs Journal of Pharmacology and Pharmacovigilance*, 2015(1), 7.
- Ago, Y., Yoneyama, M., Ishihama, T., Kataoka, S., Kawada, K., Tanaka, T., Ogita, K., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., Takuma, K., & Matsuda, T. (2011). Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 172, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.044>
- Alam, M., & Schmidt, W. J. (2004). L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behavioural Brain Research*, 153(2), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.12.021>
- Albright, J. E., Stojkowska, I., Rahman, A. A., Brown, C. J., & Morrison, B. E. (2016). Nestin-positive/SOX2-negative cells mediate adult neurogenesis of nigral dopaminergic neurons in mice. *Neuroscience Letters*, 615, 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.019>
- Alexander, G. E. (2004). Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(3), 259-280. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2004.6.3/galexander>
- Altman, J. (1962). Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science*, 135(3509), 1127-1128.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Post-natal Origin of Microneurons in the Rat Brain. *Nature*, 207, 953-956.
- Ang, E. T., Tai, Y. K., Lo, S. Q., Seet, R., & Soong, T. W. (2010). Neurodegenerative diseases: Exercising toward neurogenesis and neuroregeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2(JUL). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00025>
- Aponso, P. M., Faull, R. L. M., & Connor, B. (2008). Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 151(4), 1142-1153. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.11.036>
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine*, 8(9), 963-970. <https://doi.org/10.1038/nm747>
- Aydin, S., Yazici, Z. G., Kilic, C., Ercelen Ozozturk, B., & Kilic, F. S. (2021). An overview of the behavioral, neurobiological and morphological effects of topiramate in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *European Journal of Pharmacology*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174578>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bao, X. J., Wang, G. C., Zuo, F. X., Li, X. Y., Wu, J., Chen, G., Dou, W. C., Guo, Y., Shen, Q., & Wang, R. Z. (2017). Transcriptome profiling of the subventricular zone and dentate gyrus in an animal model of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 771-783. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3052>
- Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J. A., & Valjent, E. (2010). What is the degree of segregation between striatonigral and striatopallidal projections? *Frontiers in Neuroanatomy, OCT*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00136>
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. v, & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301.
- Bischofberger, J. (2007). Young and excitable: new neurons in memory networks. *Nature Neuroscience*, 10, 273-275. <http://www.nature.com/natureneuroscience>
- Blandini, F., & Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS Journal*, 279(7), 1156-1166. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x>
- Blandini, F., Armentero, M. T., & Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related Disorders*, 14(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.015>
- Bohnen, N. I., & Postuma, R. B. (2020). Body-first versus brain-first biological subtyping of Parkinson's disease. *Brain*, 143(10), 2871-2873. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa293>
- Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., & Stuart, B. (2006). A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing—for Today. *Toxicologic Pathology*, 34(3), 296-313. <https://doi.org/10.1080/01926230600713269>
- Borghammer, P., & van den Berge, N. (2019). Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *Journal of Parkinson's Disease*, 9(s2), S281-S295. <https://doi.org/10.3233/JPD-191721>
- Braak, H., Tredici, K. del, Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. İçinde *Neurobiology of Aging* (C. 24).
- Broome, S. T., Musumeci, G., & Castorina, A. (2022). PACAP and VIP Mitigate Rotenone-Induced Inflammation in BV-2 Microglial Cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01968-1>
- Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E., & Greenamyre, J. T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 34(2), 279-290.
- Chaudhuri, K. R., Odin, P., Antonini, A., & Martinez-Martin, P. (2011). Parkinson's disease: The non-motor issues. *Parkinsonism and Related Disorders*, 17(10), 717-723. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.02.018>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Chen, L., Chen, M., Wang, F., Sun, Z., Quanzhi, H., Geng, M., Chen, H., & Duan, D. (2012). Antidepressant-like effects of shuyusan in rats exposed to chronic stress: Effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/940846>
- Chen, R., Lin, C., You, Y., & Liu, F. (2012). Characterization of immature and mature 5-hydroxytryptamine 3A receptor-expressing cells within the adult SVZ-RMS-OB system. *Neuroscience*, 227, 180-190. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.062>
- Cheng, F., Vivacqua, G., & Yu, S. (2011). The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(4), 242-248. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.12.001>
- Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., & Gross, R. E. (2009). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(9), 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.06.005>
- Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., & Gross, R. E. (2010). Viability of the rotenone model in question. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(4), 141-142. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.006>
- Clancy, B., & Cauller, L. J. (1998). Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. İçinde *Journal of Neuroscience Methods* (C. 83).
- Cobo, M., Anderson, P., Benabdellah, K., Toscano, M. G., Muñoz, P., García-Pérez, A., Gutierrez, I., Delgado, M., & Martin, F. (2013). Mesenchymal stem cells expressing vasoactive intestinal peptide ameliorate symptoms in a model of chronic multiple sclerosis. *Cell Transplantation*, 22(5), 839-854. <https://doi.org/10.3727/096368912X657404>
- Coria-Avila, G. A., Gavrila, A. M., Ménard, S., Ismail, N., & Pfaus, J. G. (2007). Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. *Lab Animal*, 36, 25-30. www.labanimal.com
- Crittenden, J. R., & Graybiel, A. M. (2011). Basal ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in Neuroanatomy*, SEP. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00059>
- Curtis, M. A., Faull, R. L. M., & Eriksson, P. S. (2007). The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 712-723. <https://doi.org/10.1038/nrn2216>
- da Costa, C. A., Dunys, J., Brau, F., Wilk, S., Cappai, R., & Checler, F. (2006). 6-Hydroxydopamine but not 1-methyl-4-phenylpyridinium abolishes α -synuclein anti-apoptotic phenotype by inhibiting its proteasomal degradation and by promoting its aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9824-9831. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513903200>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39, 889-909. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- Delgado, M., & Ganea, D. (2003). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(8), 944-946. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0799fje>
- Doetsch, F., Manuel García-Verdugo, J., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *The Journal of Neuroscience*, 17(13), 5046-5061.
- Drolet, R. E., Cannon, J. R., Montero, L., & Greenamyre, J. T. (2009). Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.017>
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., & Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), 1072-1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. İçinde *Ann. N.Y. Acad. Sci* (C. 991, ss. 1-14).
- Farzanehfar, P. (2018). Comparative review of adult midbrain and striatum neurogenesis with classical neurogenesis. *Neuroscience Research*, 134, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.01.002>
- Farzanehfar, P., Horne, M. K., & Aumann, T. D. (2017). An investigation of gene expression in single cells derived from Nestin-expressing cells in the adult mouse midbrain in vivo. *Neuroscience Letters*, 648, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.03.028>
- Ferrante, R. J., Schulz, J. B., Kowall, N. W., & Flint Beal, M. (1997). Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. İçinde *Brain Research* (C. 753).
- Frielingsdorf, H., Schwarz, K., Brundin, P., & Mohapel, P. (2004). *No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401229101
- Frisén, J., Johansson, C. B., Török, C., Risling, M., & Lendahl, U. (1995). Rapid, Widespread, and Longlasting Induction of Nestin Contributes to the Generation of Glial Scar Tissue after CNS Injury. *The Journal of Cell Biology*, 131(2), 453-464. <http://rupress.org/jcb/article-pdf/131/2/453/1265113/453.pdf>
- Ge, S., Pradhan, D. A., Ming, G., & Song, H. (2007). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, 30(1), 1-8.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Giancola, F., Torresan, F., Repposi, R., Bianco, F., Latorre, R., Ioannou, A., Guarino, M., Volta, U., Clavenzani, P., Mazzoni, M., Chiocchetti, R., Bazzoli, F., Travagli, R. A., Sternini, C., & de Giorgio, R. (2017). Downregulation of neuronal vasoactive intestinal polypeptide in Parkinson's disease and chronic constipation. *Neurogastroenterology & Motility*, 29(5). <https://doi.org/10.1111/nmo.12995>
- Giráldez-Pérez, R. M., Antolín-Vallespín, M., Muñoz, M. D., & Sánchez-Capelo, A. (2014). Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0176-9>
- Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 67-73.
- Hasegawa-Ishii, S., Imamura, F., Nagayama, S., Murata, M., & Shimada, A. (2020). Differential effects of nasal inflammation and odor deprivation on layer-specific degeneration of the mouse olfactory bulb. *ENeuro*, 7(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0403-19.2020>
- He, X. J., & Nakayama, H. (2015). Transiently impaired neurogenesis in MPTP mouse model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 50, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.07.007>
- He, X. J., Nakayama, H., Dong, M., Yamauchi, H., Ueno, M., Uetsuka, K., & Doi, K. (2006). Evidence of Apoptosis in the Subventricular Zone and Rostral Migratory Stream in the MPTP Mouse Model of Parkinson Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(9), 873-882. <https://academic.oup.com/jnen/article/65/9/873/2646727>
- He, Y., Imam, S. Z., Dong, Z., Jankovic, J., Ali, S. F., Appel, S. H., & Le, W. (2003). Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury. *Journal of Neurochemistry*, 86(6), 1338-1345. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01938.x>
- Hendrickson, M. L., Rao, A. J., Demerdash, O. N. A., & Kalil, R. E. (2011). Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *Plos One*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018535>
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. İçinde *Neurología* (C. 32, Issue 8). www.elsevier.es/neurologia
- Höglinger, G. U., Oertel, W. H., & Hirsch, E. C. (2006). The Rotenone model of Parkinsonism-the five years inspection. İçinde *J Neural Transm* (C. 70). Springer-Verlag.
- Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., & Hirsch, E. C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(7), 726-735. <https://doi.org/10.1038/nn1265>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hussaini, S. M. Q., Jun, H., Cho, C. H., Oon, Kim, H. J. in, Kim, W. R. Young, & Jang, M. H. (2013). Heat-induced antigen retrieval: an effective method to detect and identify progenitor cell types during adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 78. <https://doi.org/10.3791/50769>
- Imamura, F., Ito, A., & LaFever, B. J. (2020). Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Frontiers in Neural Circuits*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.561822>
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(4), 368-376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jurkowski, M. P., Bettio, L., K. Woo, E., Patten, A., Yau, S. Y., & Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.576444>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science* (Fourth). McGraw-Hill.
- Kay, J. N., & Blum, M. (2000). Differential Response of Ventral Midbrain and Striatal Progenitor Cells to Lesions of the Nigrostriatal Dopaminergic Projection. *İçinde Dev Neurosci* (C. 22). www.karger.comwww.karger.com/journals/dne
- Kim, S., Kwon, S. H., Kam, T. I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Lee, J. H., Kim, W. R., Kook, M., Foss, C. A., Shen, C., Lee, H., Kulkarni, S., Pasricha, P. J., Lee, G., Pomper, M. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ko, H. S. (2019). Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*, 103(4), 627-641.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.035>
- Klaissle, P., Lesemann, A., Huehnchen, P., Hermann, A., Storch, A., & Steiner, B. (2012). *Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/13/132>
- Korkmaz, O. T., Ay, H., Aytan, N., Carreras, I., Kowall, N. W., Dedeoglu, A., & Tuncel, N. (2019). Vasoactive Intestinal Peptide Decreases β -Amyloid Accumulation and Prevents Brain Atrophy in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 68(3), 389-396. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1226-8>
- Korkmaz, O. T., Ay, H., Ulupinar, E., & Tunçel, N. (2012). Vasoactive intestinal peptide enhances striatal plasticity and prevents dopaminergic cell loss in parkinsonian rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(3), 565-573. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9781-x>
- Korkmaz, O. T., & Tunçel, N. (2019). Advantages of Vasoactive Intestinal Peptide for the Future Treatment of Parkinson's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 24(39), 4693-4701. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190111150953>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Korkmaz, O. T., Tunçel, N., Tunçel, M., Öncü, E. M., Şahintürk, V., & Çelik, M. (2010). Vasoactive intestinal peptide (VIP) Treatment of parkinsonian rats increases thalamic gamma-Aminobutyric acid (GABA) Levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, *41*(2), 278-287. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9307-3>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(12), a009621. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lee, H. J., Bae, E. J., & Lee, S. J. (2014). Extracellular α -synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Çinde Nature Reviews Neurology* (C. 10, Issue 2, ss. 92-98). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.275>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The adult ventricular–subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
- Lin, R. C. S., Matesic, D. F., Marvin, M., McKay, R. D. G., & Brüstle, O. (1995). Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiology of Disease*, *2*, 79-85.
- Liu, Z., & Martin, L. J. (2003). Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *Journal of Comparative Neurology*, *459*(4), 368-391. <https://doi.org/10.1002/cne.10664>
- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(3), 179-193. <https://doi.org/10.1038/nrn1867>
- Lledo, P. M., & Valley, M. (2016). Adult olfactory bulb neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018945>
- Lorigados Pedre, L., Pavón Fuentes, N., Alvarez González, L., McRae, A., Serrano Sánchez, T., Blanco Lescano, L., & Macías González, R. (2002). Nerve growth factor levels in Parkinson disease and experimental parkinsonian rats. *Brain Research*, *952*(1), 122—127. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03222-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03222-5)
- Luzzati, F., de Marchis, S., Fasolo, A., & Peretto, P. (2006). Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *Journal of Neuroscience*, *26*(2), 609-621. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4371-05.2006>
- Luzzati, F., de Marchis, S., Parlato, R., Gribaudo, S., Schütz, G., Fasolo, A., & Peretto, P. (2011). New striatal neurons in a mouse model of progressive striatal degeneration are generated in both the subventricular zone and the striatal parenchyma. *PLoS ONE*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025088>
- Lv, Z. M., Zhao, R. J., Zhi, X. S., Huang, Y., Chen, J. Y., Song, N. N., Su, C. J., & Ding, Y. Q. (2018). Expression of DCX and transcription factor profiling in photothrombosis-induced focal ischemia in mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00455>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ma, D. K., Bonaguidi, M. A., Ming, G. L., & Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Çinde Cell Research (C. 19, Issue 6, ss. 672-682)*. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.56>
- Magnusson, J. P., & Frisén, J. (2016). Stars from the darkest night: unlocking the neurogenic potential of astrocytes in different brain regions. *Development, 143(7)*, 1075-1086.
- Magnusson, J. P., Göritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D. O., Smith, E. M. K., Lindvall, O., Kokaia, Z., & Frisén, J. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science, 346(6206)*, 237-241. <https://doi.org/10.1126/science.346.6206.237>
- Mamber, C., Kozareva, D. A., Kamphuis, W., & Hol, E. M. (2013). Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Progress in Neurobiology, 111*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.07.003>
- Mansouri, S., Ortsäter, H., Pintor Gallego, O., Darsalia, V., Sjöholm, Å., & Patrone, C. (2012). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide counteracts the impaired adult neural stem cell viability induced by palmitate. *Journal of Neuroscience Research, 90(4)*, 759-768. <https://doi.org/10.1002/jnr.22803>
- Marxreiter, F., Regensburger, M., & Winkler, J. (2013). Adult neurogenesis in Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences, 70(3)*, 459-473. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1062-x>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *Journal of Neuroscience, 29(2)*, 444-453. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4029-08.2009>
- McGregor, M. M., McKinsey, G. L., Girasole, A. E., Bair-Marshall, C. J., Rubenstein, J. L. R., & Nelson, A. B. (2019). Functionally Distinct Connectivity of Developmentally Targeted Striosome Neurons. *Cell Reports, 29(6)*, 1419-1428.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.076>
- Mercer, A., Rönholm, H., Holmberg, J., Lundh, H., Heidrich, J., Zachrisson, O., Ossoinak, A., Frisén, J., & Patrone, C. (2004). PACAP Promotes Neural Stem Cell Proliferation in Adult Mouse Brain. *Journal of Neuroscience Research, 76(2)*, 205-215. <https://doi.org/10.1002/jnr.20038>
- Miller, J. E. K., Granados-Fuentes, D., Wang, T., Marpegan, L., Holy, T. E., & Herzog, E. D. (2014). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythms in mammalian olfactory bulb and olfaction. *Journal of Neuroscience, 34(17)*, 6040-6046. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4713-13.2014>
- Ming, G. li, & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Çinde Neuron (C. 70, Issue 4, ss. 687-702)*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Miyazaki, I., Isooka, N., Imafuku, F., Sun, J., Kikuoka, R., Furukawa, C., & Asanuma, M. (2020). Chronic systemic exposure to low-dose rotenone induced central and peripheral neuropathology and motor deficits in mice: reproducible animal model of parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093254>
- Morell, M., Souza-Moreira, L., & González-Rey, E. (2012). VIP in Neurological Diseases: More Than A Neuropeptide. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 12, 323-332.
- Moreno-López, B., Romero-Grimaldi, C., Noval, J. A., Murillo-Carretero, M., Matarredona, E. R., & Estrada, C. (2004). Nitric Oxide Is a Physiological Inhibitor of Neurogenesis in the Adult Mouse Subventricular Zone and Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 24(1), 85-95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1574-03.2004>
- Moustafa, A. A., Chakravarthy, S., Phillips, J. R., Gupta, A., Keri, S., Polner, B., Frank, M. J., & Jahanshahi, M. (2016). Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Çinde Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (C. 68, ss. 727-740). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.010>
- Müller, T., Lang, U. E., Muhlack, S., Welnic, J., & Hellweg, R. (2005). Impact of Levodopa on Reduced Nerve Growth Factor Levels in Patients With Parkinson Disease. *Clinical Neuropharmacology*, 28(5). https://journals.lww.com/clinicalneuropharm/Fulltext/2005/09000/Impact_of_Levodopa_on_Reduced_Nerve_Growth_Factor.6.aspx
- Muñoz-Manchado, A. B., Bengtsson Gonzales, C., Zeisel, A., Munguba, H., Bekkouche, B., Skene, N. G., Lönnerberg, P., Ryge, J., Harris, K. D., Linnarsson, S., & Hjerling-Leffler, J. (2018). Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Reports*, 24(8), 2179-2190.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.053>
- Nunan, R., Sivasathiseelan, H., Khan, D., Zaben, M., & Gray, W. (2014). Microglial VPAC1R mediates a novel mechanism of neuroimmune-modulation of hippocampal precursor cells via IL-4 release. *Glia*, 62(8), 1313-1327. <https://doi.org/10.1002/glia.22682>
- Offen, D., Sherki, Y., Melamed, E., Fridkin, M., Brenneman, D. E., & Gozes, I. (2000). Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Research*, 854, 257-262.
- Oliveira, V. C., Carrara, R. C. V., Simoes, D. L. C., Saggiaro, F. P., Carlotti, C. G., Covas, D. T., & Neder, L. (2010). Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histology and Histopathology*, 25(8), 1017-1024. <https://doi.org/10.14670/HH-25.1017>
- Park, J. H., & Enikolopov, G. (2010). Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. *Experimental Neurology*, 222(2), 267-276. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.01.004>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223-236; discussion 222. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Compact 3rd Edition). Academic Press.
- Peng, J., Xie, L., Jin, K., Greenberg, D. A., & Andersen, J. K. (2008). Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 153(3), 664-670. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.063>
- Perreault, M. L., Hasbi, A., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2011). The dopamine D1-D2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: Evidence for a third distinct neuronal pathway in basal ganglia. İçinde *Frontiers in Neuroanatomy* (Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00031>
- Perrin, E., & Venance, L. (2019). Bridging the gap between striatal plasticity and learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.09.007>
- Pignatelli, A., & Belluzzi, O. (2010). Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb. İçinde A. Menini (Ed.), *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Pincus, D. W., DiCicco-Bloom, E. M., & Black, I. B. (1990). Vasoactive intestinal peptide regulation of neuroblast mitosis and survival: role of cAMP. *Brain Research*, 514(2), 355-357. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91433-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91433-H)
- Pino, A., Fumagalli, G., Bifari, F., & Decimo, I. (2017). New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies. *Biochemical Pharmacology*, 141, 4-22. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.003>
- Plane, J. M., Whitney, J. T., Schallert, T., & Parent, J. M. (2008). Retinoic acid and environmental enrichment alter subventricular zone and striatal neurogenesis after stroke. *Experimental Neurology*, 214(1), 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.08.006>
- Regensburger, M., Prots, I., & Winner, B. (2014). Adult hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: Impact on neuronal survival and plasticity. İçinde *Neural Plasticity* (C. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/454696>
- Richter, F., Hamann, M., & Richter, A. (2007). Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 85(3), 681-691. <https://doi.org/10.1002/jnr.21159>
- Ruifrok, A. C., Katz, R. L., & Johnston, D. A. (2003). Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 11(1), 85-91.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Saito, K., Koike, T., Kawashima, F., Kurata, H., Shibuya, T., Satoh, T., Hata, Y., Yamada, H., & Mori, T. (2018). Identification of NeuN immunopositive cells in the adult mouse subventricular zone. *Journal of Comparative Neurology*, 526(12), 1927-1942. <https://doi.org/10.1002/cne.24463>
- Scharf, E., May, V., Braas, K. M., Shutz, K. C., & Mao-Draayer, Y. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate murine neural progenitor cell survival, proliferation, and differentiation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 36(1-3), 79-88. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9097-z>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. İçinde *Nature Methods* (C. 9, Issue 7, ss. 671-675). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shan, X., Chi, L., Bishop, M., Luo, C., Lien, L., Zhang, Z., & Liu, R. (2006). Enhanced De Novo Neurogenesis and Dopaminergic Neurogenesis in the Substantia Nigra of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Parkinson's Disease-Like Mice. *Stem Cells*, 24(5), 1280-1287. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0487>
- Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Experimental Neurology*, 179(1), 9-16. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8072>
- Si, X., Pu, J., & Zhang, B. (2017). Structure, Distribution, and Genetic Profile of α -Synuclein and Their Potential Clinical Application in Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders*, 10(2), 69-79. <https://doi.org/10.14802/jmd.16061/J>
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z. J., Ge, S., Enikolopov, G., Deisseroth, K., Luscher, B., Christian, K. M., Ming, G. L., & Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 489(7414), 150-154. <https://doi.org/10.1038/nature11306>
- Spitzer, N., Sammons, G. S., & Price, E. M. (2011). Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 197(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.029>
- Stanic, D., Finkelstein, D. I., Bourke, D. W., Drago, J., & Horne, M. K. (2003). Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 18(5), 1175-1188. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02800.x>
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Steiner, B., Winter, C., Hosman, K., Siebert, E., Kempermann, G., Petrus, D. S., & Kupsch, A. (2006). Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *199*(2), 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.11.004>
- Steiner, H. (2016). Psychostimulant-Induced Gene Regulation in Striatal Circuits. İçinde *Handbook of Behavioral Neuroscience* (C. 24, ss. 639-672). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00031-3>
- Suárez, R., Villalón, A., Künzle, H., & Mpodozis, J. (2009). Transposition and intermingling of Gai2 and Gao afferences into single vomeronasal glomeruli in the Madagascan lesser tenrec *Echinops telfairi*. *PLoS ONE*, *4*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008005>
- Suzuki, K., Okada, K., Wakuda, T., Shinmura, C., Kamen, Y., Iwata, K., Takahashi, T., Suda, S., Matsuzaki, H., Iwata, Y., Hashimoto, K., & Mori, N. (2010). Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: Reversal by fluoxetine. *PLoS ONE*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009260>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., & Tanaka, M. (2016). Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(6), 1236-1258. <https://doi.org/10.1002/cne.23901>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., & Tanaka, M. (2019). Expression of α -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner. *Anatomical Science International*, *94*(1), 11-22. <https://doi.org/10.1007/s12565-018-0464-8>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., Tatebe, H., Miyata, S., Tokuda, T., Mizuno, T., & Tanaka, M. (2014). Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. *PloS One*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089327>
- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *Journal of Visualized Experiments*, *91*. <https://doi.org/10.3791/51785>
- Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2006). Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke. *Stem Cells*, *24*(3), 739-747. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0281>
- Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*, *11*(8), 901. <https://doi.org/doi:10.1038/nn.2156>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tunçel, N., Korkmaz, O. T., Tekin, N., Şener, E., Akyüz, F., & Inal, M. (2012). Antioxidant and anti-apoptotic activity of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) against 6-hydroxy dopamine toxicity in the rat corpus striatum. *Journal of Molecular Neuroscience*, 46(1), 51-57. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9618-z>
- Tunçel, N., Şener, E., Cerit, C., Karasu, U., Gürer, F., Şahintürk, V., Bayçu, C., Ak, D., & Filiz, Z. (2005). Brain mast cells and therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide in a Parkinson's disease model in rats: Brain microdialysis, behavior, and microscopy. *Peptides*, 26(5), 827-836. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.019>
- Turi, G. F., Li, W. K., Chavlis, S., Pandi, I., O'Hare, J., Priestley, J. B., Grosmark, A. D., Liao, Z., Ladow, M., Zhang, J. F., Zemelman, B. V., Poirazi, P., & Losonczy, A. (2019). Vasoactive Intestinal Polypeptide-Expressing Interneurons in the Hippocampus Support Goal-Oriented Spatial Learning. *Neuron*, 101(6), 1150-1165.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.009>
- Uemura, N., Yagi, H., Uemura, M. T., Hatanaka, Y., Yamakado, H., & Takahashi, R. (2018). Inoculation of α -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0257-5>
- van Kampen, J. M., & Eckman, C. B. (2006). Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(27), 7272-7280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0837-06.2006>
- Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., & Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological Reviews*, 52(2), 269-324.
- von Wrangel, C., Schwabe, K., John, N., Krauss, J. K., & Alam, M. (2015). The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings. *Behavioural Brain Research*, 279, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.002>
- Wachter, B., Schürger, S., Rolinger, J., von Ameln-Mayerhofer, A., Berg, D., Wagner, H. J., & Kueppers, E. (2010). Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: Evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell and Tissue Research*, 342(2), 147-160. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1061-x>
- Wang, D., Wu, J., Liu, P., Li, X., Li, J., He, M., & Li, A. (2022). VIP interneurons regulate olfactory bulb output and contribute to odor detection and discrimination. *Cell Reports*, 38(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110383>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Winner, B., Couillard-Despres, S., Geyer, M., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, H. G., & Winkler, J. (2008). Dopaminergic Lesion Enhances Growth Factor-Induced Striatal Neuroblast Migration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *67*, 105-116. <https://academic.oup.com/jnen/article-abstract/67/2/105/2916841>
- Winner, B., Desplats, P., Hagl, C., Klucken, J., Aigner, R., Ploetz, S., Laemke, J., Karl, A., Aigner, L., Masliah, E., Buerger, E., & Winkler, J. (2009). Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Experimental Neurology*, *219*(2), 543-552. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2009.07.013>
- Worlitzer, M. M. A., Viel, T., Jacobs, A. H., & Schwamborn, J. C. (2013). The majority of newly generated cells in the adult mouse substantia nigra express low levels of Doublecortin, but their proliferation is unaffected by 6-OHDA-induced nigral lesion or Minocycline-mediated inhibition of neuroinflammation. *European Journal of Neuroscience*, *38*(5), 2684-2692. <https://doi.org/10.1111/ejn.12269>
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., & Wang, T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Critical Reviews in Toxicology*, *42*(7), 613-632. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.680431>
- Yamada, K., & Iwatsubo, T. (2018). Extracellular α -synuclein levels are regulated by neuronal activity. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0241-0>
- Yamashita, T., Ninomiya, M., Acosta, P. H., García-Verdugo, J. M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., Araki, N., Abe, K., Okano, H., & Sawamoto, K. (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *Journal of Neuroscience*, *26*(24), 6627-6636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0149-06.2006>
- Yang, J., Shi, Q. D., Yang, Y. B., Qian, Y. H., Feng, G. F., Chang, L., & Zong, C. H. (2015). Vasoactive intestinal peptide administration after stroke in rats enhances neurogenesis and improves neurological function. *Brain Research*, *1625*, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.001>
- Yelkenli, İ. H., Ulupinar, E., Korkmaz, O. T., Şener, E., Kuş, G., Filiz, Z., & Tunçel, N. (2016). Modulation of Corpus Striatal Neurochemistry by Astrocytes and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) in Parkinsonian Rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, *59*(2), 280-289. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0757-0>
- Yuan, J., Ren, J., Wang, Y., He, X., & Zhao, Y. (2016). Acteoside binds to caspase-3 and exerts neuroprotection in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162696>
- Zaben, M. J., & Gray, W. P. (2013). Neuropeptides and hippocampal neurogenesis. *Neuropeptides*, *47*(6), 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.002>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Zaben, M., Sheward, W. J., Shtaya, A., Abbosh, C., Harmar, A. J., Pringle, A. K., & Gray, W. P. (2009). The neurotransmitter VIP expands the pool of symmetrically dividing postnatal dentate gyrus precursors via VPAC2 receptors or directs them toward a neuronal fate via VPAC1 receptors. *Stem Cells*, 27(10), 2539-2551. <https://doi.org/10.1002/stem.184>
- Zaminelli, T., Gradowski, R. W., Bassani, T. B., Barbiero, J. K., Santiago, R. M., Maria-Ferreira, D., Baggio, C. H., & Vital, M. A. B. F. (2014). Antidepressant and Antioxidative Effect of Ibuprofen in the Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*, 26(4), 351-362. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9467-y>
- Zeng, X. S., Geng, W. S., & Jia, J. J. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *American Society for Neurochemistry Neuro*, 10. <https://doi.org/10.1177/1759091418777438>
- Zhang, Z.-N., Zhang, J.-S., Xiang, J., Yu, Z.-H., Zhang, W., Cai, M., Li, X.-T., Wu, T., Li, W.-W., & Cai, D.-F. (2017). Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Research*, 1655, 104-113. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.020>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlé, M., Cassidy, R. M., Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisé, J., & Marie Janson, A. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7925-7930. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1131955100