



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL PARKİNSON FARE MODELİNDE ORİDONİNİN
OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Kübra YİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Programı

TEZ DANIŞMANI
Dr.Öğr.Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU

II. TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Songül ÇERİBAŞI

Gaziantep
2023

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**DENEYSEL PARKİNSON FARE MODELİNDE ORİDONİNİN OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Kübra YİĞİT

Tez Savunma Tarihi: 11/01/2023

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne; Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Ramazan BAL

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr.Öğr. Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Songül ÇERİBAŞI
II. Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

Prof.Dr. Ramazan BAL

Dr. Öğr. Üyesi Seçil EROĞLU

Dr.Öğr. Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU

BEYAN

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

11.01.2023

Kübra YİĞİT



TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca bana yol gösterip deneyimlerinden faydalanmamı sağlayan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU'ya,

Biyokimyasal analizlerimi gerçekleştirmek için bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Seyithan TAYSI ve Öğr. Gör. Kenan ERCAN'a,

Fizyoloji alanında bana bütün kattıkları için bölümdeki saygı değer tüm hocalarıma,

Attığım her adımda her zaman yanımda olan en büyük destekçilerim, emekleri sayesinde birçok şeyi başarmamı sağlayan canım annem Edibe YİĞİT'e, canım babam Bilal YİĞİT'e ve canımdan öte kardeşim Yağmur Yiğit'e,

Varlığı, sevgisi ve desteğiyle hep yanımda olan yol arkadaşım Mehmet Can UYGURLU'ya,

Ne zaman zora düşsem yanımda olan ve bilgileriyle bana yol gösteren canım arkadaşlarıma,

Tez sürecim boyunca yardımını esirgemeyen canım arkadaşım Hatice Kübra YİĞİT'e,

Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde görev yapmakta olan ve deney sürecimde bana yardımcı olan tüm personellere,

En içten sevgi ve teşekkürlerimle...

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.YLT.22.02 numaralı proje ile desteklenmiştir. Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne de katkıları için teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGE VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
RESİM LİSTESİ.....	XII
TABLO LİSTESİ	XII
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Parkinson Hastalığı	5
2.1.1. Parkinson hastalığı tanımı ve tarihçesi	5
2.1.2. Hastalığın epidemiyolojisi	5
2.1.3. Hastalığın etiyolojisi	6
2.1.4. Parkinson hastalığının sınıflandırılması.....	7
2.1.5. Parkinson hastalığının nöropatolojisi.....	7
2.1.6. Klinik bulgular	8
2.1.6.1. Bradikinezi	9
2.1.6.2. Tremor	9
2.1.6.3. Rijidite	10
2.1.6.4. Postural instabilite.....	10

2.1.7. Motor olmayan semptomlar.....	11
2.1.8 Parkinson hastalığında deneysel hayvan modelleri	11
2.1.8.1. Toksik modeller	11
2.1.8.2. Farmakolojik modeller.....	14
2.1.8.3. Genetik modeller.....	15
2.2. Parkinson ve oksidatif stres	15
2.3. Oridonin	18
2.3.1. Oridonin ve nörodejeneratif hastalıklar	18
2.3.2 Oridonin ve Parkinson hastalığı.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Çalışma Grupları.....	20
3.2. Deney Protokolü	20
3.2.1. Deneysel parkinson modeli.....	21
3.2.2. Oridonin uygulaması.....	21
3.3. Deneysel Parametreler	221
3.3.1. Motor aktivite tayini	221
3.3.1.1. Çubuk (pole) testi.....	21
3.3.1.2. Rotarod performans testi.....	21
3.3.2. Yükseltilmiş artı labirent testi.....	22
3.3.3. Açık alan testi	22
3.4. Deneyin Sonlandırılması ve Striatum İzolasyonu	23
3.5. Biyokimyasal Parametreler.....	24
3.5.1. Dokunun homojenizasyonu	24
3.5.2. ELISA kitleri ile SOD, GSHPx, Nrf-2 ve MDA tayini	24
3.5.2.1. Standart çalışma solüsyonu ve standart grafik hazırlama	24
3.5.2.2. ELISA kit protokolü	25
3.5.3 Bradford yöntemi ile protein tayini	26
3.6. Histopatolojik Yöntem.....	26
3.6.1. Substantin nigra ve Corpus striatumdaki hücre sayıları belirlenmesi.....	26
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	26
4. BULGULAR.....	28

4.1. In vivo Deneyler	28
4.1.1. Çubuk (pole) testi.....	28
4.1.2. Rotarod motor aktivite testi	29
4.1.3. Yükseltilmiş artı labirent testi.....	29
4.1.4. Açık alan testi	33
4.2. Biyokimyasal analiz sonuçları	36
4.2.1. SOD	36
4.2.2. MDA	36
4.2.3. Nrf-2.....	37
4.2.4. GSHPx	37
4.3. Histolojik Bulgular	38
5. TARTIŞMA	43
5.1. Motor Fonksiyon Değerlendirilmesi.....	43
5.2. Anksiyete ve Depresyon Durumunun Değerlendirilmesi.....	43
5.3. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi.....	45
5.4. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi.....	47
6. SONUÇ	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	61
EKLER	62

SİMGE VE KISALTMALAR

5-HT	: 5-hidroksitriptamin
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
Aβ1-42	: Amiloid beta 1-42
AH	: Alzheimer hastalığı
AKT	: Protein kinaz B
ARE	: Antioksidan yanıt elemanı
ASN	: Alfa sinüklein
CAT	: Katalaz
CS	: Corpus striatum
DA	: Dopamin
DAT	: Dopamin taşıyıcı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ELISA	: Enzime bağlı immünosorban yöntemi
ETZ	: Elektron transfer zinciri
eNOS	: Endotelyal nitrik asit sentaz
GAÜNDAM	: Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi
GCL	: Glutamat sistein ligaz
GSH	: Glutasyon
GSK 3β	: Glikojen sentaz 3 β
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit

HE	: Hematoksilen-eozin
HO-1	: Hemoksijenaz 1
IL	: İnterlökin
Keap1	: Kelch benzeri ech ile ilişkili protein 1
KBB	: Kan beyin bariyeri
LB	: Lewy cisimciği
L-DOPA	: 3,4-dihidroksifenilalanin
LRRK2	: Lösinden tekrarlayan kinaz 2
MAO-B	: Monoamin oksidaz-B
MDA	: Malondialdehit
MPP+	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
MPTP:	: 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NFκB	: Nükleer faktör kappa-β
NRF-2	: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
NQO1	: NAD(P)H-kinon oksido redüktaz
O₂⁻	: Süperoksit
PH	: Parkinson Hastalığı
PPARγ	:Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SN	: Substantia nigra
SNpc	: Substantia nigra pars compacta
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Merkezi sinir sisteminde (MSS) MPTP'nin yapısı, farmadinamiği ve farmakinetiği.....	13
Şekil 2. 2	Nrf-2'nin aktivasyonu	17
Şekil 2. 3	Oridoninin fiziksel ve kimyasal yapısı.....	18
Şekil 3. 1	Standart grafik elde etmek için kullanılan konsantrasyonla.....	25
Şekil 4. 1	Grupların Tturn süreleri.....	28
Şekil 4. 2	Grupların Ttotal süreleri	29
Şekil 4. 3	Grupların rotarod süresi.....	29
Şekil 4. 4	Grupların ortalama kat ettikleri mesafe.....	30
Şekil 4. 5	Grupların ortalama hızları	30
Şekil 4. 6	Grupların ortalama mobilitesi	31
Şekil 4. 7	Grupların açık kolda geçirdikleri süre.....	32
Şekil 4. 8	Grupların ortalama kapalı kolda geçirdikleri süre.....	32
Şekil 4. 9	Grupların ortalama kat ettikleri mesafe.....	33
Şekil 4. 10	Grupların ortalama orta bölgede geçirdikleri süre	34
Şekil 4. 11	Grupların ortalama çevrede geçirdiği süre	34
Şekil 4. 12	Grupların ortalama hızı	35
Şekil 4. 13	Grupların ortalama mobilitesi	35
Şekil 4. 14	Grupların ortalama striatum SOD seviyesi	36
Şekil 4. 15	Grupların ortalama striatum MDA seviyesi	37
Şekil 4. 16	Grupların ortalama striatum Nrf-2 seviyesi.....	37
Şekil 4. 17	Grupların ortalama striatum GSHPx seviyesi	38
Şekil 4. 18	Sham ve deneme gruplarında SN'daki ortalama hücre sayısı.....	42
Şekil 4. 19	Sham ve deneme gruplarında CS'daki ortalama hücre sayısı.....	42

RESİM LİSTESİ

Resim 3. 1 Yükseltilmiş artı labirent testi	22
Resim 3. 2 Açık alan testi.....	23
Resim 3. 3 Striatum izolasyonu.....	24
Resim 4. 1 HE boyama ile grupların SN görünümü.....	40
Resim 4. 2 HE boyama ile grupların CS görünümü.....	41



TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Parkinson hastalığı sınıflandırılması.....	7
Tablo 3. 1 Standart grafiği oluşturmak için kullanılan konsantrasyonlar	25
Tablo 4. 1 Sham, MPTP ve MPTP+Oridonin gruplarında HE boyamada SN ve CS bölgelerindeki ortalama hücre sayıları.....	39



ÖZET

DENEYSEL PARKİNSON FARE MODELİNDE ORİDONİNİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Kübra YİĞİT

Yüksek Lisans Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU

Ocak 2023, 60 sayfa

Dopaminerjik nöronların ilerleyici kaybıyla oluşan Parkinson hastalığı dünyada en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. L-dopa tedavisi ile semptomatik tedavi edilmesi dışında bilinen kesin bir tedavisi yoktur ancak hastaların hayat kalitesini arttırmak amacıyla çeşitli tedavi yöntemlerinin varlığı daima araştırılmaktadır. *Rabdosia rubescens*'ten elde edilen oridonin anti-inflamatuar, antibakteriyel, antitümoral gibi çeşitli farmakolojik ve biyolojik aktivitelere sahip bir bileşiktir. Alzheimer üzerine etkisinin incelendiği birkaç çalışmada, oridoninin sinaptik kayıpları önlediği, uzamsal öğrenmeyi ve hafıza bozukluklarını iyileştirdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, PC12 hücrelerinde MPTP ile indüklenen hasara karşı etkisi araştırılmış ve oridoninin reaktif oksijen türlerinin sayısını azalttığı, glutasyon seviyesini yükselttiği, antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur. Biz de bu çalışma ile MPTP ile indüklenmiş Parkinson fare modelinde, oridoninin motor ve motor olmayan semptomlar ile oksidatif stres üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık. Bu çalışmada, 8-10 haftalık, C57BL/6 erkek fareler (n=6) 3 gruba ayrıldı: 1) Sham grubuna yalnızca oridonin çözünürü verildi, 2) MPTP grubuna MPTP (intraperitoneal) verilerek Parkinson hastalık modeli oluşturuldu, 3) MPTP+oridonin grubuna önce MPTP verilerek Parkinson hastalık modeli oluşturuldu, daha sonra 15 gün boyunca 10 mg/kg oridonin verildi. Motor semptomlar ve bradikinezi değerlendirmesi rotarod performans testi ve çubuk testi ile, anksiyete ve depresyon ise yükseltilmiş artı labirent testi ve açık alan testi ile yapıldı. Deney sonunda striatum dokusunda SOD, GSHPx, Nrf-2 ve MDA seviyeleri ELISA yöntemiyle belirlendi. Striatum ve substantia nigra bölgelerinde hematoksilen-eozin boyama ile hücre sayıları, hücresel bozulmalar incelendi. Sonuçlarımızda, Parkinson fare modelinde oridonin tedavisinin, lokomotor aktivite ile anksiyete, depresyon benzeri davranışlar üzerinde iyileştirici etkisinin bulunmadığı ancak oridonin tedavisi alan grupta antioksidan seviyelerinin, MPTP grubuna göre arttığı ve oksidatif hasar belirteçlerinin azaldığı belirlenmiştir. Histopatolojik bulgularımız ise MPTP uygulanan farelerin nöronlarında nörofaji ve dejenerasyonun görüldüğünü, substantia nigra ve striatumdaki hücre sayılarında önemli derecede azalma olduğunu, ayrıca MPTP+oridonin grubunda nörofaji görülmemekle birlikte, MPTP grubuna göre daha hafif şiddette nöronal dejenerasyon izlendiğini gösterdi. Sonuç olarak, oridoninin parkinsonun motor ve motor olmayan semptomlarında belirgin bir iyileşme sağlayamadığı ancak oksidatif stresi azaltabileceği ve oksidatif stres sonucu oluşan hasara karşı nöroprotektif bir ajan olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: MPTP, Nrf-2, Oksidatif Stres, Oridonin, Parkinson Hastalığı

ABSTRACT

EFFECT OF ORIDONIN ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN EXPERIMENTAL PARKINSON'S MOUSE MODEL

Kübra YİĞİT

M. Sc. Thesis, Department of Physiology

Supervisor: Asst.Prof. Nadide ÖZKUL DOĞRU

January 2023, 60 page

Parkinson's disease, caused by the progressive loss of dopaminergic neurons, is the second most common neurodegenerative disease in the world. There is no known definitive treatment except symptomatic treatment with L-dopa therapy, but the existence of various treatment methods is always being investigated in order to increase the life quality of patients. Oridonin obtained from *Rabdosia rubescens* is a compound with various pharmacological and biological activities such as anti-inflammatory, antibacterial and antitumoral. In several studies examining its effect on Alzheimer, it has been reported that oridonin prevents synaptic losses, improves spatial learning and memory disorders. However, its effect against the damage induced with MPTP in PC12 cells was investigated and it was found that oridonin decreased the number of reactive oxygen species, increased the glutathione level, increased antioxidant enzyme activities. In this study, we aimed to investigate the effect of oridonin on motor and non-motor symptoms and oxidative stress in MPTP-induced Parkinson's mouse model. For this, 8-10 weeks old, C57BL/6 male mice (n=6) were divided into 3 groups: 1) Sham group was given only oridonin solvent, 2) MPTP group was given MPTP (intraperitoneal) to form Parkinson's disease model, 3) The MPTP+oridonin group was first given MPTP to create a Parkinson's disease model, then 10 mg/kg oridonin was given for 15 days. Motor symptoms and bradykinesia were evaluated with the rotarod performance test and stick test, and anxiety and depression with the elevated plus maze test and open field test. At the end of the experiment, SOD, GSHPx, Nrf-2 and MDA levels in striatum tissue were determined by ELISA method. Cell numbers and cellular deterioration were examined by hematoxylin-eosin staining in the striatum and substantia nigra regions. In our results, it was determined that oridonin treatment did not have a curative effect on locomotor activity, anxiety and depression-like behaviors in the Parkinson's mouse model, but antioxidant levels increased and oxidative damage markers decreased in the oridonin treatment group compared to the MPTP group. Our histopathological findings showed that neurophagia and degeneration were observed in the neurons of MPTP-treated mice, there was a significant decrease in the number of cells in the substantia nigra and striatum, and neurophagia was not observed in the MPTP+oridonin group, but milder neuronal degeneration was observed in the MPTP group. As a result, it has been shown that oridonin cannot provide a significant improvement in motor and non-motor symptoms of Parkinson's, but it can reduce oxidative stress and be a neuroprotective agent against damage caused by oxidative stress.

Key words: MPTP, Nrf-2, Oridonin, Oxidative stress, Parkinson's Disease

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), yaygın nörolojik bir hastalıktır (1). James Parkinson tarafından 1817 yılında ‘titreyen felç üzerine deneme’ adlı eserinde ilk kez tanımlanmıştır (2). PH, patolojik olarak orta beyinde yerleşimli olan substantia nigra pars compacta (SNpc)’daki dopaminerjik nöronların kaybı ve çözünmeyen alfa sinüklein (ASN) agregatlarını içeren sitoplazmik inklüzyonlar olan Lewy bodyler (LB) ile ilişkili olarak tanımlanmıştır (3). Motor ve motor olmayan bulgularla kendini göstermektedir (1). Başlıca motor belirtileri rijidite, bradikinezi ve tremordur. Motor olmayan belirtilerinde ise kabızlık, demans, depresyon vb. bulguların olduğu bilinmektedir (4). Bu hastalık yaşlı insanlar arasında daha yaygındır ve çoğu vakalar 50 yaş sonrasında görülmektedir (5). Küresel nüfus yaşlandıkça PH prevalansının hızlı bir şekilde artması (3) ve 2040 yılına gelindiğinde yaklaşık 13 milyon insanı etkilemesi beklenmektedir (2). Bu artışla beraber, hastalığın daha etkili tedavi edilmesi veya önlenmesi sağlanamadığı sürece ekonomik ve toplumsal yükü artacaktır (3).

Güncel tedavilerle hastaların hayat kalitesi önemli ölçüde iyileşmektedir fakat günümüzde belirlenmiş kesin bir tedavi yoktur. Şu ana kadar hastalara 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) verilmesi en etkili tedavi seçeneklerinden biridir (6). Bu yüzden ilaç tedavisinin yanında kişinin hayat kalitesini arttıracak alternatif tedavi seçenekleri aranmaktadır.

Oridonin, Rabdosia excise ve Rabdosia rubescens’ten izole edilen diterpenoid yapısında bir bileşiktir. Rabdosia rubescens Doğu Asya geleneksel tıbbında inflamasyon ve kanser tedavisinde kullanılan otsu bir bitkidir. İlk olarak 1967 yılında anti-tümör bileşiği olarak tanımlanmıştır (7). Oridonin, anti-inflamatuar, antiviral ve antibakteriyel aktiviteler gibi çeşitli farmakolojik ve biyolojik özelliklere sahiptir (8). Birçok kanser türüne karşı anti-tümoral aktivitesi olduğu da çeşitli çalışmalarla belgelenmiştir (9).

Beta-amiloid birikiminin neden olduğu düşünülen Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılarda bunamanın en yaygın sebebidir ve ilerleyici nörodejenaratif bir hastalıktır. Amiloid beta 1-42 (A β 1-42) ile indüklenmiş AH’nın fare modeliyle yapılan bir çalışmada, oridonin etkileri araştırılmış ve sonuca göre oridoninin A β 1-42 ile indüklenmenin neden olduğu sinaptik kayıpları önlediği ifade edilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada bilişsel işlevleri

değerlendirmek için yapılan testlerde, oridonin tedavisi alan farelerde uzamsal öğrenme ve hafıza bozukluklarında iyileşme olduğu belirtilmiştir (10).

Oridoninin, PH üzerindeki etkisi ise daha az çalışılmıştır. Hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, PC12 hücrelerinde 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) ile indüklenen hasara karşı oridoninin ön tedavi etkisi araştırılmış ve oridoninin reaktif oksijen türlerinin sayısını azalttığı, glutasyon (GSH) seviyesini yükselttiği, glutasyon peroksidaz (GSHPx), katalaz (CAT), glutasyon redüktaz aktivitelerini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu ön tedavinin tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve prostaglandin E2 seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir (11).

Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışma PH'nın 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile indüklenmiş hayvan modelinde oridonin intraperitoneal olarak uygulamasının, hastalığın motor ve motor olmayan semptomların ve oksidatif stres belirteçleri üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca bu veriler hastalığın tetiklenmesine yol açan oksidatif stresin hastalığın oluşumundaki etkisini ve ilerleyiş sürecini nasıl etkileyeceğini de ortaya koyan veriler sunmaya çalışmıştır. Bu amaç doğrultusunda hayvan gruplarının motor aktivite düzeylerini ölçmek için çubuk testi, rotarod performans testi, lokomotor aktivite ve motor olmayan semptomları ölçmek için yükseltilmiş artı labirent testi ve açık alan testi uygulanmıştır. Tüm gruplara, enzime bağlı immünosorban aktivite tayini (ELİSA) kitleri kullanılarak süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, Malondialdehit (MDA), nükleer ilişkili faktör 2 (NRF 2) ve GSHPx seviyeleri ölçülüp oridoninin oksidatif stresle ilişkisi araştırılmıştır.

Hedefler

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın 2 hipotezi vardır;

Hipotez 1: Parkinson hastalığı hayvan modelinde oridonin tedavisi motor ve motor olmayan semptomlarda iyileşme sağlar.

Hipotez 2: Parkinson hastalığı hayvan modelinde oridonin tedavisi antioksidan seviyelerini arttırarak nöroprotektif bir ajan olarak görev yapar.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Parkinson hastalığı tanımı ve tarihçesi

Parkinson hastalığı, ilk defa 1817 yılında James Parkinson'un 'Titreyen Felç Üzerine Deneme' (An Essay on Shaking Palsy) adlı makalesinde tanımlanmıştır. Parkinson makalesinde gözlemlerine dayanarak PH'yi sinsi başlangıçlı, ilerleyici ve sakat bırakıcı seyirli bir hastalık olarak ifade etmiştir (12). Ayrıca klasik Parkinson duruşunu ve tremoru tanımlamıştır. Parkinson, bu sendromu 'Paraliz Ajitans' olarak adlandırmıştır (13). Jean-Martin Charcot'un çalışmaları, PH hakkındaki bilgilerin artmasına önemli katkıda bulunmuştur (14). Charot, James Parkinson'un gözlemlerinden farklı olarak bradikinezi ve rijiditeyi hastalığın temel özellikleri olarak belirtmiştir ve hastalığın 'Parkinson hastalığı' olarak tanımlanmasını önermiştir (12). 1893'te Blocq ve Marinesco, substantia nigradaki (SN) patoloji ile PH arasında bir ilişki olduğunu önermişlerdir (13). Frederic Lewy 1912 yılında kümelenmiş inklüzyonları gözlemlemiştir. Daha sonra 1919'da Konstantin Tretiakoff bu kümelenmelerin, SN içinde yer aldığını belirtmiş ve LB olarak adlandırmıştır. Oleh Hornykiewicz 1960 yılında Parkinson hastalarının striatumunda DA seviyelerinin azaldığını bulmuştur (15). 1967 yılına gelindiğinde George Cotzais L-DOPA tedavisini hastalar üzerinde uygulamaya başlamış ve etkili olduğuna dair sonuçlar almaya başlamıştır (13). PH'nin patolojik özellikleri; azalmış DA seviyeleri, dopaminerjik nöron kaybı ve dejenere olmamış SNpc nöronlarında LB olarak adlandırılan intranöronal sitoplazmik inklüzyonlardır (16).

2.1.2. Hastalığın epidemiyolojisi

Günümüze kadar yapılan keşifler, PH ve belirleyicileri hakkında anlayışımızı değiştirmiştir (17). Epidemiyolojik çalışmalar, şüpheli risk faktörleri, koruyucu faktörler ve hastalığın birincil nedenleri hakkında bilgi vermekte ve PH'nin doğal seyrini araştırmak için kullanılabilir (18). PH görülme sıklığı erkeklerde kadınlardan daha fazladır. Yapılan bir meta analizde kadınlar ve erkekler kıyaslandığında, erkeklerde PH görülme riskinin 1.5 kat daha fazla olduğu görülmüştür (19). 50 yaş altında PH insidansı düşüktür ancak yaşla birlikte hızla artmaktadır. Artan yaş ve muhtemelen yetersiz tanı nedeniyle PH insidansı 80 yaş civarında çoğu çalışmada zirveye ulaşmaktadır (17).

2.1.3. Hastalığın etiyojisi

Yıllardır süren yoğun çalışmalara rağmen PH'nin nedenleri hala aydınlatılmayı beklemektedir. Günümüzde yaygın görüş, PH'nin genetik yatkınlık, çevresel maruziyet ve karmaşık genetik çevresel etkileşimlerin birleşik etkilerinden kaynaklandığı yönündedir (20) ve beynin duyarlı bölgelerinde bu etkileşimlerin nöron kayıplarına sebebiyet verdiği düşünülmektedir (21).

Yaşlanma PH için en önemli risk faktörüdür. Dünya çapında PH ile ilgili 1985-2010 yılları arasında yapılan 47 epidemiyolojik çalışmanın meta-analizi sonuçları yaş ilerledikçe artan PH riskini ve 50-80 yaşları arasında gidildikçe riskin 10 kat arttığını doğrulamaktadır (22).

Parkinson hastalarının %15'nin ailesel öyküsü bulunmakta ve %5-10'u Mendel kalıtmı monogenik formundan müzdarıdır fakat çoğu Parkinson vakasının gelişimi sporadiktir (23). PH'de yapılan genetik çalışmalar, hastalığın çok sayıda monogenik tipini ve hastalığın prevalansını arttıran genetik belirleyicileri ortaya çıkarmıştır (19). Yapılan çalışmalarla birlikte 20'den fazla monogenik PH formu ve 100'den fazla alan risk faktörü olarak belirtilmiştir (2).

Alfa sinüklein geni, PH'nin ailesel formunda keşfedilen ilk genidir (24). SNCA geninde oluşan mutasyonlar otozomal dominant PH'ye sebep olmaktadır. Bu gen, ASN'yi kodlamaktadır. ASN'nin işlevi hala tam olarak bilinmemektedir. ASN, sinaptik veziküllere bağlanır ve beyin plastitesine dahil olabileceği düşünülmektedir (25). Lösün açısından zengin tekrarlayan kinaz 2 (LRRK2) mutasyonu, geç başlangıçlı ailesel otozomal PH formunu oluşturmaktadır (26). LRRK2'de şu ana kadar yaklaşık 80 varyant bildirilmiştir fakat sadece yedisinin patojenik olduğu doğrulanabilmiştir (23).

PARK2'deki (parkin) mutasyonlar otozomal resesif geçişli PH'ye sebep olmaktadır (25). Otozomal resesif geçişli bazı ailesel PH formları ise çok erken başlangıçlı olarak ortaya çıkabilmektedir ve hem tipik hem atipik PH semptomları göstermektedir (27).

Literatürden elde edilen kanıtlar çevresel faktörlerin de PH'nin oluşmasında ve ilerleyişinde katkısı olduğunu göstermektedir. Bu faktörler fungusit, herbisit, pestisit (MPTP, rotenone, paraquat), endüstriyel atıklar, kırsal yaşam, çiftçilik ve kuyu suyu kullanımını kapsamaktadır (19).

2.1.4. Parkinson hastalığının sınıflandırılması

Tablo 2. 1 Parkinson hastalığı sınıflandırılması (28)

Primer (İdyopatik) Parkinsonizm a. Parkinson hastalığı (sporadik ve genetik)
Sekonder (Sonradan Kazanılan) Parkinsonizm a. İlaça bağlı: DA reseptörü blokörleri, antiemetikler, reserpin, tetraabenzin ve lityum gibi DA tüketen ilaçlar. b. Enfeksiyonlar c. Toksinler: MPTP, CO, Mn, Hg, CS ₂ . d. Vasküler: beyin çoklu enfarktüs durumu. e. Travma kaynaklı f. Bazal ganglia gibi beyin bölgelerindeki tümörler g. Hidrosefali h. Hipoksi i. Metabolik
Atipik Parkinsonizm a. İlerleyici supranuklear palsi b. Multipl sistem atrofisi c. Kortikobazal gangliyonik dejenerasyonu d. ALS-Parkinsonizm-Demens- Guam kompleksi
Parkinsonizme Neden Olan Ailesel Nörodejenaratif Hastalık a. Huntington hastalığı b. Wilson hastalığı c. Hllervorden-spatz hastalığı d. Olivopontoserebellar ve spinoserebellar dejenerasyon e. Ailesel bazal ganglia kalsifikasyonu f. Periferik nöropatili ailesel parkinsonizm g. Nöroakantositoz

2.1.5. Parkinson hastalığının nöropatolojisi

Substantia nigra pars kompakta'daki nöronların ilerleyici kaybı Parkinsonda başlıca görülen patolojik değişikliktir. Bu nöronlar striatuma DA iletilmesinde görev almaktadır.

Nöronlarda görülen bu kayıp, motor kortikal alanları ve bazal gangliyonları içeren devrelerde işlev bozukluğuna yol açmaktadır. Sonuç olarak bu değişiklikler bireyin yaşamını olumsuz etkileyen ve PH'nin başlıca belirtileri olan hareket anormalliklerine sebep olmaktadır. Parkinsonun bir başka karakteristik özelliği ise LB'lerdir (29). LB'ler, genişlemiş nöritler ve iplikler parkinsonian Substantia nigra'da görülmektedir (30). LB'ler ve nöritler, dejeneratif sürecin bozulmamış yan ürünleri olarak sitoplazmada depolanan normal, yanlış katlanmış ve kesilmiş proteinler ve ubikuitin kümelerinden oluşmaktadır. Bunların ana bileşeni ise anormal şekilde fosforlanmış, nitratlanmış ve oksitlenmiş yapıda olan ASN'lerdir (30). Hem sporadik hem de kalıtsal PH'de ASN'lerin LB'lerin ana bileşeni olduğu artık bilinmektedir (29). ASN, SNCA geninin protein ürünüdür ve mutasyonu PH'nin monogenik formlarından birine sebep olmaktadır (31). ASN konformasyonel değişikliklerini ve agregasyonunu oksidatif stres ve aşırı ekspresyon da etkilemektedir (2).

LB'ler olfaktör bulbus, hipotalamus, substantia nigra, lokus serolus, dorsal rafe çekirdeği, dorsal vagal çekirdek, serebellum ve omurilik dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminde yaygın olarak görülebilir (29). Parkinsonizm olmaksızın beyin sapında LB varlığı bulunan vakalar, çeşitli nöropatolojik çalışmalar sonrasında beklenmedik bir şekilde buldukları için tesadüfi LB hastalığı olarak adlandırılmıştır (30).

Braak ve meslektaşları 2002 yılında, ASN inklüzyon patolojisi için bir evreleme şeması önermişlerdir. Bu şemaya göre; Aşama I ve aşama II, koku alma bölgelerinde ve alt beyin sapında (vagus sinirinin dorsal motor çekirdeği, ara retiküler bölge ve lokus serolus) LB ve nörit tutulumunu göstermektedir. Aşama III ve aşama IV'te ise ASN kümelenmelerinin SNpc'de ve bazal önbeyine kadar transentorhinal korteks ve hipokampusun CA2 bölgesine kadar uzandığı görülmektedir. Aşama V ve VI'ya gelindiğinde ise tüm neokortekse yayılan tutulumlar görülmektedir (32).

2.1.6. Klinik bulgular

Substantia nigrada bulunan DA üreten hücrelerin kaybı PH'nin motor semptomların çıkmasına sebep olmaktadır. Hastalığın ilerleyiş sürecinde en belirgin bulgular hareketlerle ilgilidir: tremor, rijidite, bradikinezi ve postrual instabilite (5).

Özellikle hastalığın klinik başlangıcından sonraki ilk yıllarda yapılan DA tedavisi, motor semptomların çoğunu etkili bir şekilde hafifletmektedir (33).

Motor olmayan semptomlarında ise bilişsel değişiklikler, davranışsal/nöropsikiyatrik değişiklikler, otonom sinir sistem yetmezliği, duyuşal ve uyku bozuklukları yer almaktadır. Motor semptomlar gibi DA tedavisine yanıt vermediğinden, PH'de yaşam kalitesi ve hastalığın yönetimi açısından en büyük zorluklarından bazılarını temsil etmektedir. Bazı motor olmayan semptomlar, motor semptomlardan yıllar öncesinde hastalarda görülebilmektedir fakat hastaların yaklaşık %90'ında motor olmayan semptomlar hastalık seyri sırasında gözlenmektedir (34). Yakın tarihte yapılan iki ayrı çalışmada hastaların tamamında en az bir motor olmayan semptom görüldüğü belirtilmiştir (35).

2.1.6.1. Bradikinezi

Yunanca bir kelime olan bradikinezi; hareketin (kinezi) yavaşlığı (bradi) anlamına gelmektedir ve parkinsonun ana motor semptomlarından biridir. James Parkinson tarafından orijinal olarak ifade edildiği şekliyle, 'düşük kas gücü' olarak nitelendirilen 'shaking palsy (titreyen felç)'in 'felç' kısmıdır. PH üzerinde yapılan çalışmaların çoğu da birbiriyle tutarlı olarak kas aktivasyonundaki bir gecikme nedeniyle hareket hazırlığının anormal şekilde uzadığını göstermiştir. Deneysel çalışmalar DA'nın motor kontroldeki rolüyle de ilgili olarak dopaminerjik nöronların spontan hareket öncesinde hızlı ve geçici bir şekilde aktive olduğunu göstermiştir (36).

Bradikinezi, parkinson semptomları arasında DA eksikliği ile en temel ilişkili olan semptomdur. DA replasman terapisine iyi cevap vermektedir ve bu da DA'nın hareket gücünü modüle etmede görevi olduğu düşüncesini doğrulamaktadır (33).

Bradikinezi, hipomimiye (ifadesiz yüz) ve el yazısının genliklerinin küçülmesine (mikrografi) sebep olabilmektedir (37). Yüz kasları daha ağır hareket ettiği için duyguları verecek mimikler yavaştır. Durumun ilerleyişiyle beraber genellikle ağız hafif açık kalmaktadır. Konuşma daha monoton ve yumuşak bir hale gelmektedir. Kendiliğinden olan yutma azalır ve yutma mekaniğinin etkilenmesiyle birlikte hastalarda siyalore (tükürük salgısının artması) gelişebilmektedir (1). Bradikinezi sebebiyle hasta günlük işleri (diş fırçalama, gömlek düğmeleme, yiyecekleri kesme) yapamayacak duruma gelmektedir (19).

2.1.6.2. Tremor

Tremor, vücut kaslarının anormal, istemsiz, periyodik hareketleridir (19). Tremor, Parkinsonun en karakteristik özelliklerinden biridir ve Parkinson hastalarının

%75'inde görülmektedir. İstirahat halindeki tremor istemli hareketin oluşmasıyla kaybolur ve genellikle asimetrik ve frekansı 4-7 Hz'tir. Parkinson için istirahat tremoru pozitif tanı kriteridir (38). Tremor, başlangıçta tek taraflı olup hastalığın ilerlemesiyle vücudun iki tarafını da etkilemektedir (19). PH ile ilişkili olan istirahat tremoru tipik olarak eller, dudaklar, çene, yanak ve bacaklarla ilişkilendirilmiştir. Hastaların %31-44'ünde dışarıdan görünür olmayan, titreyen bir his olan 'iç tremoru' tanımladıkları belirtilmiştir (39). El tremoru bir elden diğerine yayılan supinasyon-pronasyon (hap yuvarlama) titremeleri olarak tanımlanmaktadır (40). Klinik-patolojik çalışmalar, PH olan ve belirgin tremoru hastalarda orta beyin nöronlarının (A8) bir alt grubunda dejenerasyon olduğunu fakat tremoru olmayan Parkinson hastalarında bu alanın korunduğunu göstermiştir (40).

2.1.6.3. Rijidite

Parkinson hastalarının çoğu rijidite (sertlik) veya harekete direnç bulgularından etkilenmektedir (41). Rijidite, bir uzvun pasif hareketi (eklem etrafında fleksiyon,, ekstansiyon veya rotasyon) boyunca mevcut olan ve genellikle 'dişli çark' fenomenin eşlik ettiği artan direnç ile karakterizedir (40). Froments manevrası olarak bilinen güçlendirici manevralar (örneğin kontralateral uzvun istemli hareketleri) genellikle rijiditeyi artırır ve hafif rijidite vakalarını tespit etmede faydalıdır (41). Rijiditenin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, artmış spinal nöron uyarılabilirliğinin rol oynadığı düşünülmektedir (42).

2.1.6.4. Postural instabilite

Postural instabilite, postural reflekslerin kaybına bağlı ve hastalığın ileri seviyelerinde, diğer klinik özelliklerin başlangıcından sonra ortaya çıkmaktadır (40). Duruş ve dengeyi koruma özelliği kaybolur ve bu da bazı eylemleri gerçekleştirirken (ayakta durmak, sandalyeden kalkmak, eğilmek) kararsızlığa neden olabilmektedir. Bu kararsız hareketler parkinson hastalarında düşmeye sebep olmakta ve yaralanmaların ana nedeni olmaktadır (41).

Postural instabilite 'çekme testi' ile değerlendirilebilmektedir. Hasta omuzlarından hızlıca geriye çekilerek test edilmektedir. Anormal bir yanıt, hastanın geriye doğru iki adımdan fazla atması veya herhangi bir postural yanıtın olmaması ile karakterizedir (42). Postural instabiliteyi diğer Parkinson semptomları ve ortostatik hipotansiyon, yaşa bağlı

duyusal değişiklikler, görsel, vestibüler ve proprioseptif duyusal girdiyi (kinestezi) entegre etme yeteneęi etkilemektedir (40).

2.1.7. Motor olmayan semptomlar

Motor olmayan semptomların bilinmesi tanı için ve aynı zamanda yaşam kalitesinde önemli değişikliklere sebep oldukları için önemlidir (43). Motor olmayan semptomlar; depresyon, anksiyete, apati (motivasyon kaybı), psikoz, bilişsel bozukluk, demans, otonomik işlev bozukluğu, uykusuzluk, koku alma bozukluğu gibi bulguları içerir (2). Motor olmayan semptomlar hastalığın şiddetiyle ve ilerleyen yaşla ilgilidir fakat bazı motor olmayan semptomlar (koku alma sorunları, kabızlık, depresyon ve hızlı göz hareketi bozukluğu gibi) hastalığın erken dönemlerinde ortaya çıkabilmektedir (44).

Bilişsel işlev bozukluğu ve demans sıklıkla görülmektedir fakat hastalığın ilerleyen sürecinde gelişir. Parkinson hastalarında görsel halüsinasyonlar en sık psikotik sendromdur. Geç ve erken başlangıçlı Parkinson hastalarında duygu durum bozuklukları, idaresi en zor motor olmayan semptomlar arasındadır. Anksiyete her 3 hastanın 1'inde görülür ve en sık karşılaşılan psikiyatrik duygu durum bozukluğudur. Apati ve abulia (düşünme veya hareket etme yeteneği kaybı) da görülmektedir ve bu semptomlar hastaların yaşam kalitesini oldukça sarsmaktadır. Uyku bozuklukları hastaların yaklaşık %98'inde görülmektedir ve genelde gece boyunca sık uyanma ve sabah erken uyanma olarak bildirilmiştir (34).

2.1.8 Parkinson hastalığında deneysel hayvan modelleri

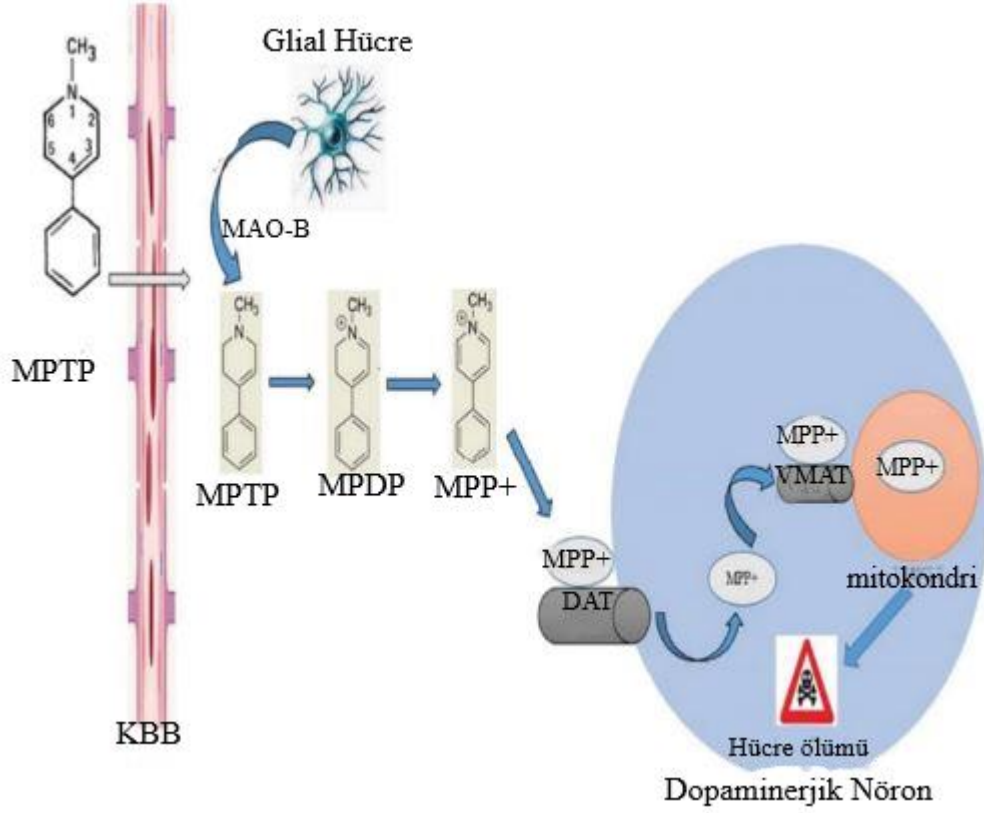
2.1.8.1. Toksik modeller

Parkinson hastalığının altında yatan patofizyolojik sürecin aydınlatılması ve motor semptomların tedavisinde terapötik stratejilerin geliştirilmesi için toksin kaynaklı hayvan modelleri önem arz etmektedir. Buna ek olarak, bu modeller PH kaynaklı nöronal hücre ölümünde yer alan patojenik mekanizmaların anlaşılması ve hastalığın ilerleyişini durdurmak için nöroprotektanların geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (45). Geliştirilen bu nörotoksik modellerin arasında 6-hidroksidopamin (6-OHDA), MPTP, paraquat ve rotenon gibi belirgin nigrostriatal dopaminerjik nöron dejenerasyonu görülen modeller bulunmaktadır. Ancak bu modellerin hiçbiri tam olarak PH özelliklerini göstermemektedir (46).

6-hidroksidopamin: 6-OHDA, katekolaminlerin yapısal bir analogudur ve etkisini katekolaminerjik nöronlar üzerinde gösterir (47). Sıçanlarda Parkinsonu geliştirmek için

6-OHDA mükemmel bir toksindir. Bu toksinin sistemik olarak uygulanması, periferik sinir sistemindeki sempatik nöron sinir terminallerini yok etmektedir (45). Kan-beyin bariyerini (KBB) geçemediği için intraserebral olarak enjeksiyonu gerekmektedir. Hücre içine girdikten sonra hızla oksitlenir ve hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açan hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri üretir (48). Ventral orta beyin dopaminerjik grupları arasında 6-OHDA'ya karşı farklı duyarlılıklar vardır; SNpc'de en büyük kayıp gözlenirken tuberoinfundibular nöronlar neredeyse tamamen dirençlidir. SN'ye veya orta beyine yapılan 6-OHDA enjeksiyonunu takiben 24 saat içerisinde dopaminerjik nöronlar dejenere olmaya başlar. 6-OHDA, striatuma enjekte edildiğinde ise 1-3 hafta süren nigrostriatal nöronların daha uzun süreli retrograd dejenerasyonuna sebep olmaktadır (49). Bu uygulama PH hayvan modellerinde olabilecek en yüksek seviyede (%90-100) nigral hücre kaybı ve striatal DA kaybını sağlar. Enjeksiyon genelde tek taraflı seçilmektedir çünkü bilateral enjeksiyon yüksek ölüm oranı ile ilişkilendirilmiştir (50).

MPTP: Dört uyuşturucu bağımlısının MPTP toksinini içeren yasadışı bir ilacı kullanımı sonucunda MPTP'nin parkinsonizme neden olduğu ilk kez 1983'te Langston ve çalışma arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. MPTP, KBB'yi geçebilir (Şekil 2.1) ve daha sonra gliyal hücrelerde monoamin oksidaz-b (MAO-B) tarafından güçlü bir dopaminerjik nörotoksin olan MPP+'a dönüştürülür (46). Bu madde daha sonra dopamin taşıyıcısı (DAT) tarafından, SN'deki mitokondriyal kompleks I'i inhibe edeceği dopaminerjik nöronlara taşınır (50). Bunun sonucunda solunum zinciri boyunca elektron akışı bozulur; ATP üretimi azalır ve süperoksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna sebep olur. Hücre ölümüyle ilgili sinyal yollarının aktivasyonu büyük olasılıkla azalmış ATP ve artmış ROS bileşiklerinin birlikte etkisiyle oluşmaktadır (51). MPTP, insanlarda ve maymunlarda tremor, rijidite, hareket yavaşlığı, postural instabilite ve donma gibi PH'nin tüm özellikleriyle karakterize, geri dönüşü olmayan ve şiddetli bir Parkinson sendromu üretir (49). Bu modelin eksik yanı, PH patolojisinde görülen LB'lerin oluşmamasıdır (52). Sıçanlar dahil birçok tür MPTP'nin toksik etkilerine karşı duyarsızdır. Ancak, özellikle siyah C57 ve Swiss Webster gibi fare türleri MPTP'ye karşı duyarlıdır ve PH'nin MPTP ile fare modelinin gelişmesine olanak sağlamıştır (51).



Şekil 2. 1 Merkezi sinir sisteminde (MSS) MPTP'nin yapısı, farmadinamiği ve farmakinetiği. (53)

MPTP ile oluşturulan modeller, 6-OHDA ile oluşturulan modellere göre bazı üstünlüklere sahiptir. En önemlisi farelerin satın alınması ve barınması için gereken maliyetin oldukça az olmasıdır ve bu durum ekonomik açıdan avantaj sağlamaktadır. Ayrıca sistemik olarak MPTP uygulaması, 6-OHDA lezyonu yapılması için yetenek gerektiren stereotaksik cerrahiye gerektirmez. Yine sistemik olarak enjeksiyon uygulanması, nigrostriatal sistemde iki taraflı dejenerasyona sebep olarak, PH'de görülen bulguları daha çok yansıtır. MPTP modeli ayrıca PH'de görülen striatal DA ve tirozin hidrosilaz seviyesinin azalması gibi birçok biyokimyasal özellikleri taklit eder (51).

Rotenon: Herbisit ve pestisit olarak kullanılan rotenon, doğal olarak tropikal bitkilerde bulunmaktadır ve nörotoksik bir ajandır. Lipofilik bir yapısı olduğundan KBB'yi geçebilir. Diğer canlı türlerine kıyasla Lewis sıçanları rotenona daha duyarlıdır (54). Rotenon, ROS ve mitokondriyal disfonksiyon oluşumuna sebep olarak mitokondriyal kompleks I'in aktivitesini inhibe eder (26). DA ve glutasyon düzeylerini düşürür ve dopaminergic nöronlarda lipid peroksidasyonunu artırması sebebiyle oksidatif hasara neden olur. In vitroda rotenonun, hücre apoptozuna sebep olduğu gösterilmiştir. In vivo sıçan modellerinde ise, rotenona kronik sistemik (intravenöz) maruz kalma nigrostriatal

dopaminerjik nöron dejenerasyonuna, LB benzeri patolojilere ve bradikinezi, postural instabilite ve tremor gibi PH bulgularına sebep olur. Ayrıca rotenona maruz kalan sıçanlarda oksidatif hasarın, demir birikiminin ve mikrogliozun arttığı ifade edilmiştir (55). Rotenon parkinsonizmi incelemek için iyi bir araçtır fakat sadece dopaminerjik sisteme özgü değildir. Bu seçicilik eksikliği yüzünden diğer nöronal alanlar üzerinde zararlı bir etkiye sebep olabilir (26).

Paraquat: Paraquat veya 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium diklorür, yapısal olarak MPP+ benzeyen tarımsal bir herbisittir (55) ve bundan dolayı PH araştırmalarında kullanılmaktadır. KBB'yi Na+ bağımlı kanal yardımıyla geçebilir (26). Mitokondride redoks döngüsünü etkiler ve oksidatif stresi artırarak DNA, RNA, protein ve lipid hasarına neden olabilir. Nigrostriatal hasar, farelerde paraquat enjeksiyonu sonrası doza bağımlıyken, bazı araştırmalar bu bölgede hasar tespit edilmediğini ifade etmiştir. Rappold ve meslektaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada yüksek dozlarda paraquat uygulamasının dopaminerjik nöronlarda toksisitesi bildirilmiştir (54).

2.1.8.2. Farmakolojik modeller

Bazı sınırlamaları olsa da farmakolojik modeller Parkinsonun semptomatik tedavisi ile ilgili ilaçların keşfinde çok önemlidir. Hayvan modellerinde semptomatik iyileşmeyi değerlendirmek için PH gibi hastalıklarda ilacın kronik uygulanması gerekir. Bundan dolayı kronik uygulamanın yapılabildiği hayvan modelleri birinci derecede önemlidir. Farmakolojik modeller, parkinsonizme benzer patolojik bir durum üretmez, bu da yine araştırmalara sınır koymaktadır (26).

Rezerpin: Parkinson çalışmalarında kullanılan en eski hayvan modellerinden biri rezerpin modelidir (51). L-DOPA'nın etkinliğinin gösterimi için kritik bir model olmuştur (56). Rezerpin, vesiküler monoamin taşıyıcı-2'yi engelleyerek noradrenalin, 5-hidroksitriptamin (5-HT) ve DA gibi monoaminlerin tükenmesine neden olur. Ancak DA seçiciliğinin olmaması PH benzeri biyokimyayı taklit etmede bir başarısızlık olarak kabul edilmiştir (26).

Haloperidol: Antipsikotik ilaç sınıfına giren haloperidol etkisini dopaminerjik D1 ve D2 reseptörlerini antogonize ederek gösterir. Striatal dopaminerjik nörotransmisyonu engeller. Haloperidol enjeksiyonundan (0,5-2 mg/kg doz) 1 saat sonra kemirgen ve primatlarda rijidite ve katelepsi gözlenir. Rijiditenin yanı sıra aynı zamanda parkinsonizmle direkt ilgili olmayan katelepsi gibi bulguları da içerir. Haloperidol,

Parkinsonun biyokimyasal özelliklerini yansıtmada eksiklik gösterdiği için zayıf bir model olarak kabul edilmiştir. Fakat bazı araştırmalar akut haloperidol uygulamasının striatumdaki DA, noradrenalin ve 5-HT içeriğini azalttığını göstermiştir (26).

2.1.8.3. Genetik modeller

Diğer modellere göre genetik modeller daha yeni bir yaklaşımdır ve genlerin değiştirilmesiyle yapılır. Transgenik modeller, ailesel PH vakalarıyla nedensel olarak bağlantılı insan mutasyonlarının tanımlanmasından sonra oluşturulmuştur. Spesifik genlerdeki mutasyonlar sonucu mitokondriyal disfonksiyon ile enerji metabolizmasında bozukluklar olduğu ve bunların da PH'ye sebep olduğu düşünülmektedir (57). Parkinson vakalarının çoğu sporadik olmasına rağmen yaklaşık %20'si aileseldir ve %5'i otozomal dominant veya resesif genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. PH kaynaklı en az 18 gen veya alan belirlenmiştir (55).

2.2. Parkinson ve oksidatif stres

Hücrel homeostazın gerekli bir bileşeni olan reaktif oksijen türleri, normal şartlar altında hücrede mitokondriyal elektron transfer zinciri (ETZ) veya redoks reaksiyonları sırasında üretilmektedir. Süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan proteinler ise -her ne kadar fizyolojik şartlar altında ROS'lar önemli olsa da- ROS'ların fazla yükselmesini engeller. Bu antioksidanların ROS seviyelerini düzenlemedeki başarısızlığı, çeşitli zararlı etkilere sahip olabilen oksidatif strese yol açar. Hücre içerisindeki makromoleküllerin rastgele oksidasyonu hücrel yapılara zarar verebilir ve hücre ölümüne yol açabilir (58). Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), ksantin oksidaz, peroksizom oksidazlar, sitokrom P-450 oksidaz, mitokondriyal solunum, doymamış yağ asitleri, demir ve inflamatuvar yanıtlar ROS'un en yaygın kaynaklarıdır (59). Beyin hem fosfolipit hem de çoklu doymamış yağ asitleri içeriği bakımından zengindir ve bu yapılar oksidanlara karşı hassastır. PH'deki dopaminerjik nöronların kaybında oksidatif stresin de katkısı vardır (60).

Oksidatif stres hem ailesel hem sporadik Parkinson hastalarının beyin dokularında, oksitlenmiş DNA, lipid ve proteinlerin varlığıyla daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (58). Oksidatif stres artışında, SN'deki çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarı azalırken, lipid oksidasyonunun bir belirteci olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonu artar (61).

Sağlıklı yaşlanma sürecinde mitokondriler birincil hücre içi ROS kaynağıdır. Enerji üretiminin fizyolojik bir yan ürünü olarak süperoksit (O_2^-) radikalleri meydana gelir. Bu

ROS'ların üretimi, mitokondri içinde ve dışında birincil nöronal oksidatif hasara etki ettiği düşünülen hidroksil radikallerinin oluşumuna sebep olabilir. Mitokondri, süperoksidi daha az zararlı olan hidrojen peroksit'i (H_2O_2) detoksifiye eden üç süperoksit dismutazdan (SOD) ikisini (SOD1 ve SOD2) içerir (62). Mitokondri içerisindeki antioksidanlar sayesinde ROS'lar minimal seviyede tutulur fakat mitokondriyal disfonksiyon durumunda ROS seviyesi hızlı bir şekilde artmaktadır (61).

Dopaminerjik nöronlarda oksidatif strese yol açabilecek iki temel mekanizma vardır. Birincisi dopaminerjik nöronları oksidatif strese meyilli hale getirmekten sorumlu olan ROS yolu enzimleridir (tirozin hidroksilaz ve monoamin oksidaz). İkincisi ise, nöronlarda demir bulunması nedeniyle nigral dopaminerjik nöronlarda gerçekleştirilen ve süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit üretimi yoluyla oksidatif stresi daha da artıran fenton reaksiyonudur (63).

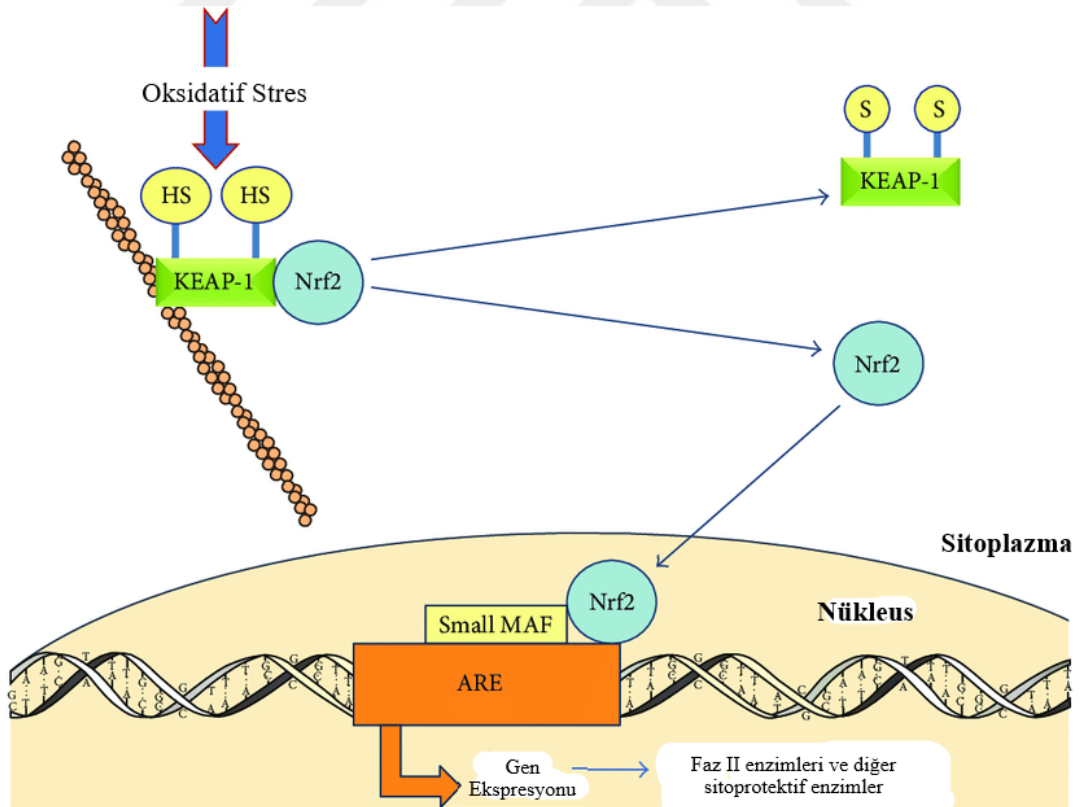
Antioksidanlar, vücudu oksidatif hasara karşı koruyan, serbest radikallerin ve oksidanların etkisini azaltan veya engelleyen moleküllerdir (64). GSHPx, H_2O_2 'nin glutatyon tarafından suya ve O_2 'ye indirgenmesini katalize eder. GSHPx, hücreler içinde üretilen peroksitleri ortadan kaldırarak, akut stres sırasında redoks durumunun korunmasında kritik bir rol oynar. Parkinson hastalarının beyinde GSHPx'in azaldığı bulunmuştur ve bu durum artan oksidatif stresin sebebi olarak düşünülmektedir (60).

Süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalize etmektedir. Daha önceki yayınlarda SOD'un, enzimleri ve proteinleri oksijen toksisitesine karşı koruduğu bildirilmiştir (64). Bazı hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, SOD aktivitesinin orta beyinde arttığını belirtirken (60), bazı çalışmalarda ise SOD aktivitesinin azaldığını belirtmiştir (63).

Parkinson hastalığının patojenik süreçlerinde yer alan bir diğer antioksidatif sinyal yolu Nrf-2 yoludur. MPTP veya 6-OHDA ile tedavi edilmiş farelerde Nrf-2 inaktivasyonu gözlenmiştir (65). Nrf-2 bir transkripsiyon faktörü olup faz II detoksifikasyon enzimlerini aktive ederek reaktif türlere ve redoks potansiyellerine yanıt vermektedir (66). Nrf-2, NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz-1(NQO1), SOD, glutatyon S-transferaz(GST), GSHPx, hem oksijenaz-1 (HO-1), glutamat sistein ligaz (GCL), katalaz ve tioredoksin gibi birçok strese duyarlı veya sitoprotektif enzimlerin ya da ilgili genleri kodlayan genlerin koordineli indüksiyonu için gereklidir. Nrf-2 dinlenme halindeki hücrelerde, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'e (Keap1) bağlı bir şekilde sitoplazmada inaktif bir

şekilde bulunur. Keap1 hücrel redoks değışikliklerine duyarlı reseptörlere sahiptir ve hücrel redoksun bozulması halinde Nrf-2 Keap1'den ayrılıp hücrenin çekirdeğine geçer. Nrf-2 çekirdeğe geçtikten sonra antioksidan yanıt elemanı (ARE) olarak adlandırılan düzenleyiciye bağlanır ve bu şekilde çeşitli sitoprotektif ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu artırır (Şekil 2.2) (67). Bu nedenle Keap1/ Nrf-2/ ARE sinyal yolu hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli bir rol oynar (66).

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2, glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β) enzimi tarafından fosforillenerek degradasyona uğrayabilir. Yapılan çalışmalarla artmış GSK-3β enzim aktivitesinin PH dahil birçok nörodejeneratif hastalığın oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. GSK-3β enzimi hücrede yapısal olarak aktif yani defosforiledir. Normal şartlar altında, protein kinaz B (AKT) aracılı fosforilasyon ile inhibe edilerek inaktif halde bulunur. GSK-3β'ün inhibitörler aracılığıyla inaktive edilmesi veya protein kinazlar aracılı fosforilasyonu Nrf-2'yi degradasyondan korumaktadır (68). Daha önceki çalışmalar, oridoninin makrofajlarda AKT'nin fosforilasyonunu teşvik ederek Nrf-2'nin aktivitesini düzenleyebileceğini göstermiştir (69).

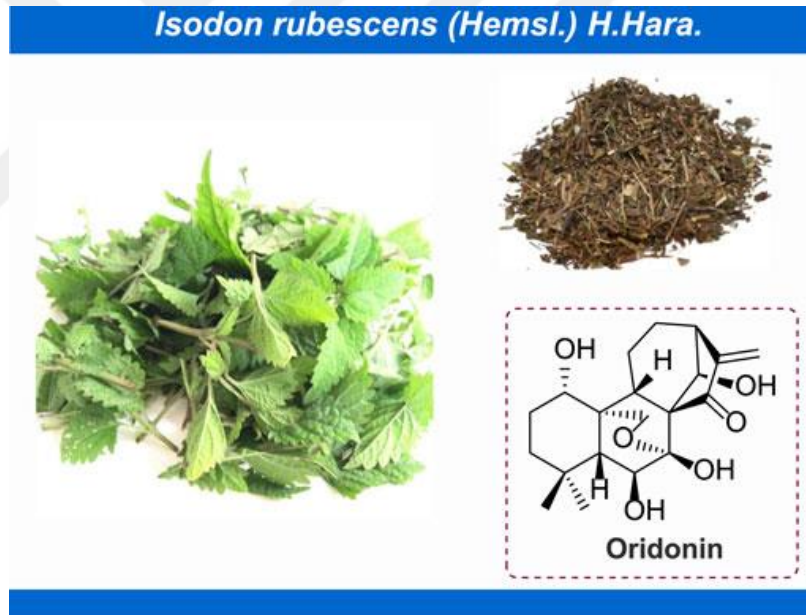


Şekil 2. 2 Nrf-2'nin aktivasyonu (70).

2.3. Oridonin

Molekül formülü $C_{20}H_{28}O_6$ olan oridonin, *Rabdosia rubescens*'ten izole edilmiştir. Kimyasal yapısı ve antitümör etkisi 1976 yılında Fujita E. ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Oridonin ilk olarak antitümör ajan olarak bildirilmiştir ve zamanla ortaya konulan yeni kanıtlarla çeşitli hastalıklarda anti-inflamatuar, antibakteriyel, antifibrotik, oto-immün düzenleyici ve nöro-düzenleyici ajan olarak hareket edebildiği gösterilmiştir. Oridoninin anti-inflamatuar etkisi ise ilk olarak nükleer faktör kappa beta (Nf-kB) sinyal yolunu baskılaması, IL-6 ve TNF- α dahil serum sitokinlerinin salınımını azaltması ile bildirilmiştir (71).

Son yıllarda oridoninin anti-tümör özellikleri birçok tümör türü (örneğin; göğüs, kolon, pankreatik, akciğer, gastrik, prostat ve cilt) üzerinde çalışılmıştır (72). İnsan osteosarkomu üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada, oridoninin osteosarkom hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği gösterilmiştir (73).



Şekil 2. 3 Oridoninin fiziksel ve kimyasal yapısı (9).

2.3.1. Oridonin ve nörodejeneratif hastalıklar

Alzheimer hastalığı, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır ve beta-amiloid fibrillerinin ekstrasöronal birikmesiyle karakterizedir. Beta-amiloid birikimi glia hücrelerinin aktivasyonuna ve proinflamatuar sitokinlerin üretiminde artışa neden olmaktadır (74). NF- $\kappa\beta$ yolağı aktivasyonunun AH için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (75). Xu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada oridoninin, mikroglia fonksiyonlarını modüle ederek proinflamatuar mediatörlerin salınımını engellediğini göstermişleridir (76). Bu

bilgiler doğrultusunda Wang ve arkadaşları, A β 1–42 ile indüklenmiş AH'nın fare modelini oluşturmuş ve oridoninin bu modelde bilişsel bozukluğu hafiflettiğini ve Nf- κ B yolağını baskılayarak inflamatuvar yanıtı inhibe ettiğini rapor etmiştir (77). Yine aynı çalışmacıların AH fare modeliyle yaptığı başka bir çalışmada oridoninin A β 1–42 ile indüklenmenin neden olduğu sinaptik kayıpları önlediği ifade edilmiştir (10).

2.3.2 Oridonin ve Parkinson hastalığı

Parkinson hastalığı ve oridonin arasındaki ilişki ise daha az çalışılmıştır. Hücre hattıyla yapılan bir çalışmada PC12 hücrelerinde MPP+ ile indüklenen hasara karşı oridoninin ön tedavi etkisi araştırılmış ve oridoninin reaktif oksijen türlerinin sayısını azalttığı, glutatyon seviyesini yükselttiği, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz aktivitelerini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu ön tedavinin TNF- α ve IL-1 β , IL-6 ve prostaglandin E2 seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir (78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Merkezi (GAÜNDAM) tarafından temin edilen 8-10 haftalık, 20-25 g ağırlığında, erkek C57BL/6 fareler kullanıldı. Çalışmamız Gaziantep Üniversitesi Fizyoloji ve Biyokimya laboratuvarlarında, GAÜNDAM'da ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Çalışma Grupları

Çalışmada oluşturulacak deney grupları arasında büyük bir etki büyüklüğü ($f=0,5$) oluşacağı beklentisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunması için gerekli minimum denek sayısı 18 olarak belirlenmiştir ($\alpha=0,05$, $1-\beta=0,80$). Analiz Gpower3.1 versiyonunda yapılmıştır.

GAÜNDAM'dan rastgele seçilen 18 adet fare her grupta 6 adet olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Çalışma grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

1. Sham grubu
2. MPTP grubu
3. MPTP + Oridonin grubu

Sham grubu: Hayvanlara 15 gün boyunca oridonin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) intraperitoneal olarak verildi.

MPTP grubu: Hayvanlara deney başlangıcında Parkinson modeli oluşturmak için intraperitoneal olarak MPTP verildi.

MPTP + oridonin grubu: Hayvanlara deney başlangıcında Parkinson modeli oluşturmak için intraperitoneal olarak MPTP verildi. Daha sonra 15 gün boyunca intraperitoneal olarak oridonin uygulaması yapıldı.

3.2. Deney Protokolü

Çalışma süresi boyunca hayvanlar GAÜNDAM laboratuvarlarında, ortam ısısı 23 ± 2 °C'de ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde barındırıldı. Tüm hayvanlar standart pellet yemi ve musluk suyu ile ad-libitum olarak beslendi.

3.2.1. Deneysel Parkinson modeli

Parkinson modelini oluşturmak için MPTP ve MPTP + oridonin grubuna intraperitoneal olarak 20 mg/kg MPTP toksini enjekte edildi. MPTP, serum fizyolojikte 3 mg/ml olacak şekilde çözdürüldü. Enjeksiyon 12 saatte bir, her doz 20 mg/kg ve toplam 4 dozda 80 mg/kg olacak şekilde uygulandı (79).

3.2.2. Oridonin uygulaması

MPTP + oridonin grubuna, son MPTP uygulamasından 7 gün sonra intraperitoneal olarak 10 mg/kg oridonin enjeksiyonu 15 gün boyunca her gün aynı saatte (08.00) yapıldı. Oridonin, 20 mg/ml DMSO içerisinde çözdürüldü. Daha sonra son hacim serum fizyolojik ile tamamlandı (80).

Sham grubuna ise, 15 gün boyunca oridonin çözücüsü DMSO intraperitoneal olarak enjekte edildi.

3.3. Deneysel Parametreler

3.3.1. Motor aktivite tayini

3.3.1.1. Çubuk (pole) testi

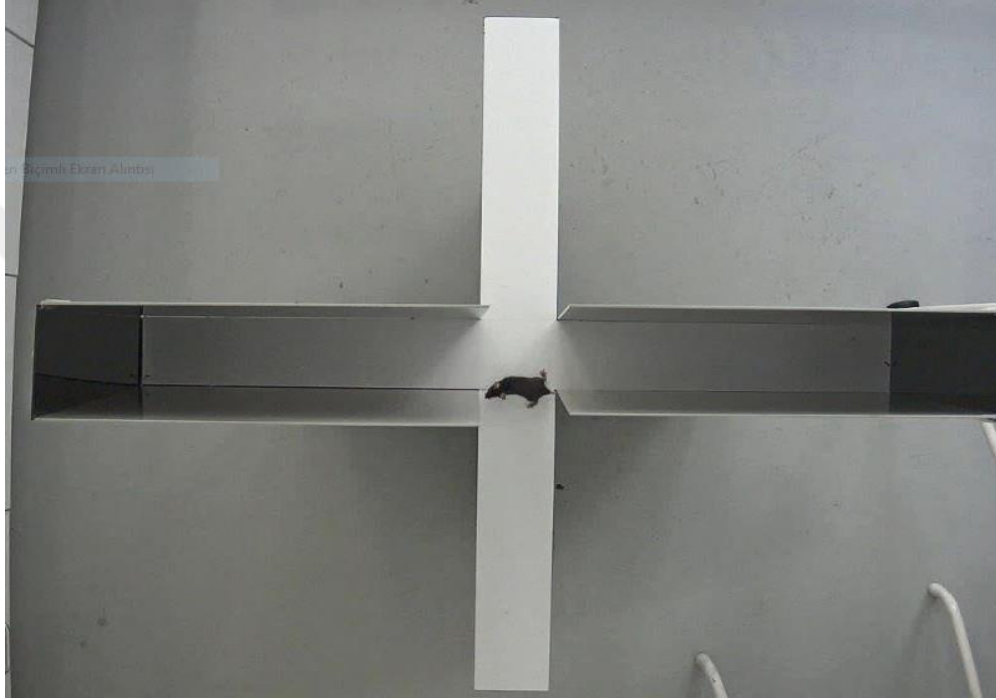
MPTP enjeksiyonundan sonraki 7. günde 'pole test=çubuk testi' uygulanarak PH'nın semptomlarından olan bradikinezi değerlendirildi. Bu testte, hayvanın daha iyi tutunabilmesi için sargı beziyle sarılmış 8 mm çapında ve 50 cm yüksekliğindeki metal çubuk kullanıldı. Hayvan çubuğun en üst noktasına baş yukarı bakacak şekilde yerleştirildi. Hayvan bu konumdayken geri dönmesi (Tturn) ve zemine ulaşma süresi (Ttotal) ayrı ayrı olacak şekilde kaydedildi. Test her hayvan için 3 kez tekrarlandı ve ortalama değer alındı. Her test arasında 10 dakikalık aralıklar bırakıldı (79).

3.3.1.2. Rotarod performans testi

Rotarod testinde fareler 3 cm çapında yavaş yavaş dönen bir bar üzerine yerleştirildi ve 300 saniye boyunca artan hızda (5-40 rpm/5 dk) dönen teker üzerinde koşmaları izlendi. 300 sn'yi tamamlamadan düşen fareler tekrar el ile bara geri konuldu ve bu süre içinde 3 kez düşen hayvanlar için ölçüm sonlandırıldı. Düşme süreleri üç düşüş için de ayrı ayrı kaydedilip ortalamaları alındı. 300 saniyede düşmeyen hayvan için ise deney sonlandırıldı (81).

3.3.2. Yükseltilmiş artı labirent testi

Deney sürecinin sonunda tüm gruplardaki farelere 1 kez 5 dakika boyunca yükseltilmiş artı labirent testi uygulandı (Resim 3.1). Fare merkeze konduktan sonra açık ve kapalı alanlardaki geçirdiği süre, ortalama hız, kat edilen mesafe ve mobilite süreleri belirlendi. Bu ölçümler hayvanlardaki anksiyetik davranışların bir göstergesi olarak kabul edilir. Her hayvan deneyinin sonunda deney düzeneği %30'luk etanolle silindi ve kuruması beklendi (82).



Resim 3. 1 Yükseltilmiş artı labirent testi

3.3.3. Açık alan testi

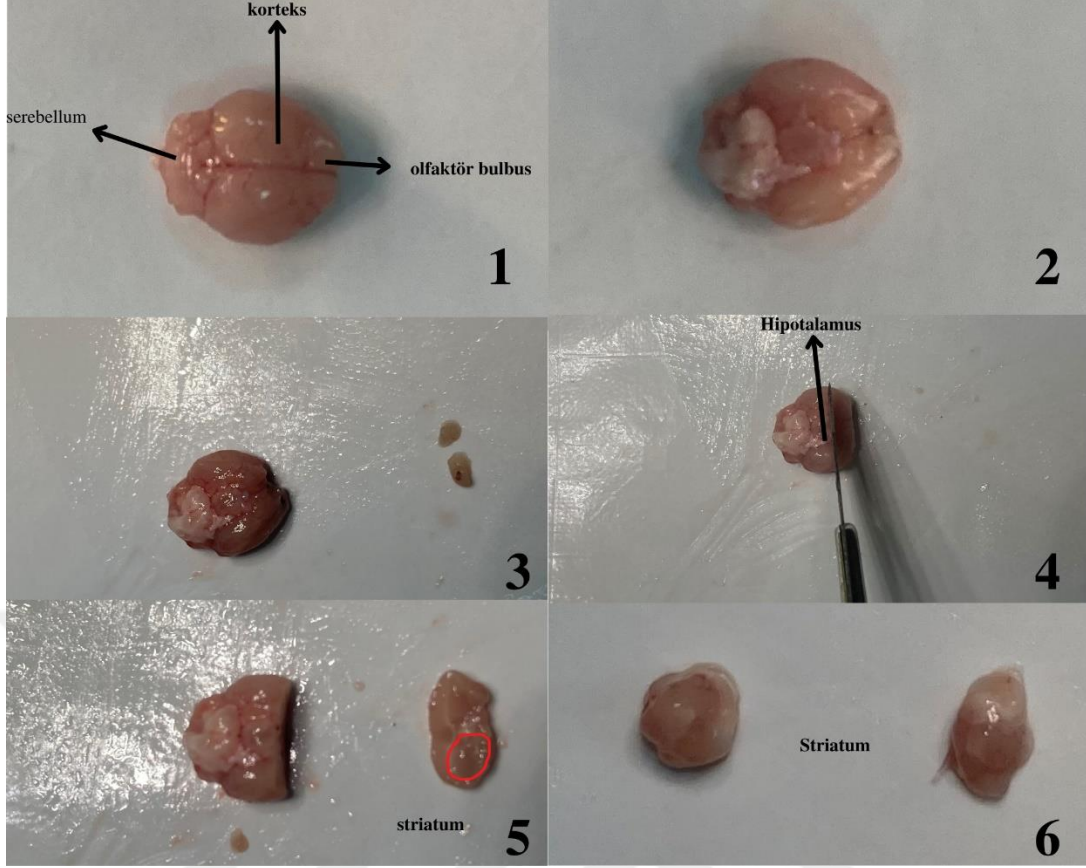
Motor aktivite düzeylerini belirlemek için tüm gruplardaki farelere deney sonunda 1 kez 5 dakika boyunca açık alan testi uygulandı (Resim 3.2). Açık alan testinde, fare tam merkeze bırakılarak ortalama hız, kat edilen mesafe, mobilite, merkezde ve periferde geçirdiği süreler kaydedildi (82).



Resim 3. 2 Açık alan testi

3.4. Deneyin Sonlandırılması ve Striatum İzolasyonu

Sakrifikasyon zamanı geldiğinde tüm hayvanlar 80 mg/kg ksilazin ve 10 mg/kg ketaminin intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Anestezi etkisini gösterdikten sonra damardan enjektörle tüm kanı çekilerek ötenazi edildi. Hayvanın kafası sagittal sütur ile açıldı. Beyin dokusu tamamen çıkarılıp buz üzerine alındı. Olfaktör bulbus uzaklaştırıldıktan sonra frontal lob enine kesiyle tüm beyinden ayrıldı. Son olarak hipotalamusun hemen önünden enine bir kesi yapılarak ön kısımda kalan striatum izole edildi (83) (Resim 3.3). Alınan örnekler -80 °C’de saklandı.



Resim 3.3 Striatum izolasyonu

3.5. Biyokimyasal Parametreler

3.5.1. Dokunun homojenizasyonu

Dokuların homojenizasyonu için -80 °C'de saklanan dokuların çözülmesi beklendi. Daha sonra soğuk ortamda dokular tek tek hassas terazide tartıldı. Dokular tartıldıktan sonra tüplere alınıp üzerlerine uygun miktarda serum fizyolojik eklendi. Buzlu suda 40 sn mekanik parçalama ve daha sonra 20 sn boyunca sonifikasyon yapıldı. Ardından örnekler santrifüj cihazında 15 dakika boyunca, +4 °C'de, 5500 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmı pipet yardımıyla ependorflara alındı. Çalışmaya bu örneklerle devam edildi.

3.5.2. ELISA kitleri ile SOD, GSHPx, Nrf-2 ve MDA tayini

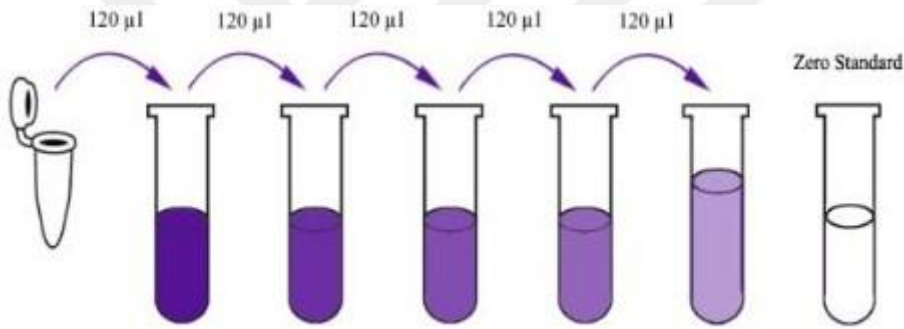
3.5.2.1. Standart çalışma solüsyonu ve standart grafik hazırlama

Plazma, serum, homojenat ve çeşitli biyolojik sıvılardaki in vitro kantitatif ölçümleri belirlemek amacıyla ELISA testi yapılmaktadır. Öncelikle kit içerisindeki solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Ardından ölçüm kiti içerisindeki standart (2400 ng/L) dilüe edildi (120 µl standart (2400 ng/L + 120 µl seyreltici) ve 1200 ng/L standart stok

solüsyonu oluşturuldu (Şekil 3.1). Daha sonra standart stok solüsyon $\frac{1}{2}$ oranında seyreltilerek 600 ng/L, 300 ng/L, 150 ng/L ve 75 ng/L'lik solüsyonlar oluşturuldu (Tablo 3.1). Hazırlanan solüsyonlar sırasıyla kuyucuklara yüklendi ve mikropilaka (BioTek™ ELx800™ Absorbance Microplate Readers, Midland, ON, Canada) okuyucu ile renge bağlı konsantrasyon belirleme işlemi gerçekleştirilip standart grafik oluşturuldu.

Tablo 3. 1 Standart grafiği oluşturmak için kullanılan konsantrasyonlar

1200 ng/L	Standart No.5	120 µl orjinal standart + 120 µl standart dilüent
600 ng/L	Standart No.4	120 µl Standart No.5 + 120 µl standart dilüent
300 ng/L	Standart No.3	120 µl Standart No.4 + 120 µl standart dilüent
150 ng/L	Standart No.2	120 µl Standart No.3 + 120 µl standart dilüent
75 ng/L	Standart No.1	120 µl Standart No.2 + 120 µl standart dilüent



Şekil 3. 1 Standart grafik elde etmek için kullanılan konsantrasyonlar.

3.5.2.2. ELISA kit protokolü

Tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra ELISA kitlerinden çıkan kuyucuklar hazırlandı. Standart kuyucuğa sadece 50 µl standart eklendi. Numune kuyucuklar ise 40 µl numune ve her kite uygun olarak 10 µl fare GSHPx, MDA, NRF-2 ve SOD antikoru eklendi. Ardından 50 µl streptavidin-HRP standart ve numune kuyucuklarına eklendi ve iyice karışması sağlandı. Üzeri kapatılıp 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Süre dolduktan sonra kuyucukların 300 µl yıkama tamponu ile otomatik yıkama cihazında her yıkama 1 dakika olmak üzere 5 defa yıkanması sağlandı. Daha sonra her kuyuya 50 µl substrat solüsyonu A ve ardından substrat solüsyonu B eklendi. Üzeri tekrardan kapatılarak 10 dakika boyunca 37°C'de karanlık ortamda inkübe edildi. Son aşamada ise her kuyucuğa 50µl reaksiyonu durdurucu solüsyon eklendi ve 10 dakika içerisinde 450 nanometreye ayarlanmış mikropilaka okuyucuda kuyucukların optik yoğunluğu belirlendi.

3.5.3 Bradford yöntemi ile protein tayini

Coomassie brilliant blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanılır ve negatif yüke sahiptir, protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ve mavi formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun maviye dönüşünü sağlar. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı tepkime oluşur, 2 dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi 1 saatin üzerinde devam eder. Bu çalışmada, 10-200µg protein bulunan 0,1 mL çözelti, 5,0 mL Coomassie blue boya reaktifine (100 mg Coomassie brillante blu G-250, 50 mL %95 etil alkol içinde çözdürüldü. 100 mL %85 fosforik asit eklendi ve toplam hacim su ile 1 litreye tamamlandı. 5 dakika sonra, absorbans 595 nm’de ölçüldü. Standart eğri serum albümin kullanılarak hazırlandı.

3.6. Histopatolojik Yöntem

Farelerden alınan beyin ve beyincik doku örnekleri %10’luk tamponlu formalinde 48 saat tespit edildi. Dokular bir gece çeşme suyunda yıkandıktan sonra, sırasıyla %80, %90 %96’lık etil alkollerde 3 saat ve %100’lük etil alkolde ise 2 saat tutularak dokulardan suyun uzaklaşması sağlandı. Ksilol içinde üç defa 45'er dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı. 58 °C’ye ayarlanmış etüvde sıvı parafin serilerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. SN ve Corpus striatum’un (CS) histolojik olarak değerlendirilmesi için alınacak koronal kesitlerin aralığı fare beyin atlasına göre belirlendi (84). Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığında kesitler hematoksilin-eozin (HE) yöntemi ile boyandı (85).

3.6.1. Substantin nigra ve Corpus striatum’daki hücre sayıları belirlenmesi

Gerçekleştirilen boyamalar sonrası; mikroskopta 40’lık büyütmede her hayvana ait SN ve CS bölgelerine ait 5 farklı alanın görüntüsü dijital kamera ile fotoğraflandı. Elde edilen görüntüler bilgisayara aktarılarak görüntülerde Image J (Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA, Version 1.53t) programı ile H-E boyalı kesitlerde CS ve SN bölgelerindeki hücre sayıları belirlendi.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Davranış testleri ve biyokimyasal bulguların istatistiksel değerlendirmesi için SPSS paket programı kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Her değişken için normallik testi uygulandı, normal dağılıma sahip olan veriler için ‘Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)’ ve takiben ‘Tukey Post Hoc Testi’ uygulandı. Normal dağılıma uymayan

veriler için ise nonparametrik olan 'Kruskal Wallis Varyans Analiz' ve takiben 'İkili Karşılaştırma' testi kullanıldı. Hata çubukları standart sapma verildi.

Histopatolojik veriler, IBM SPSS (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Veriler tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ile test edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar yapılırken post hoc olarak Tukey's testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verildi ve $p < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edildi.

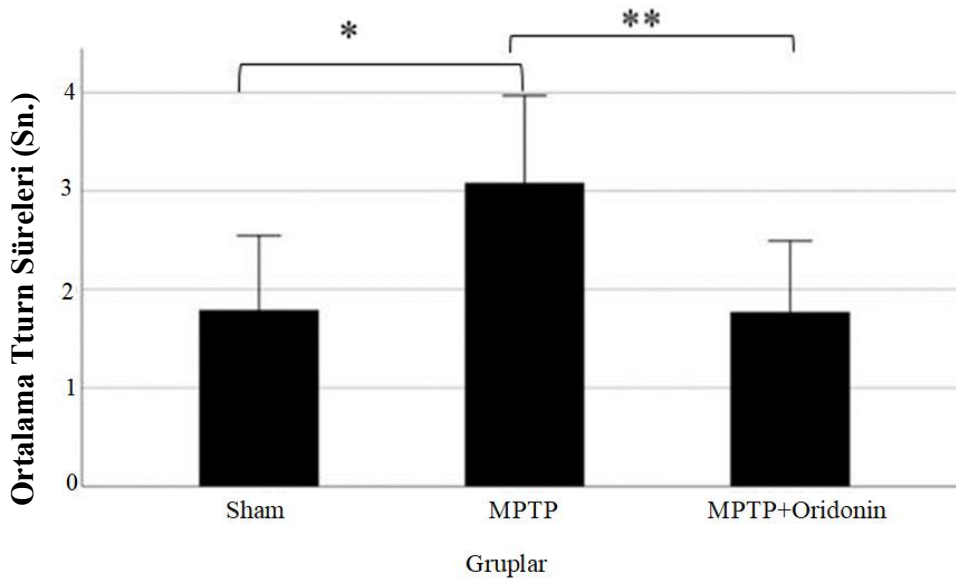


4. BULGULAR

4.1. In vivo Deneyler

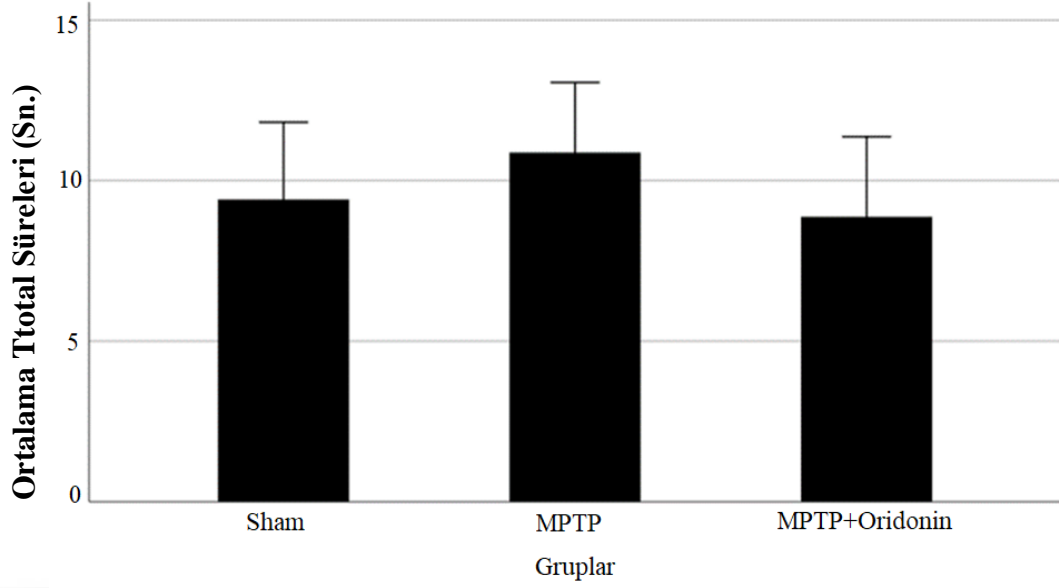
4.1.1. Çubuk (pole) testi

MPTP grubunun Tturn süresinin sham grubuna göre uzadığı görülmüştür ($p<0.05$). MPTP grubunun Tturn süresi MPTP+oridonin grubuna göre daha çok uzadığı görülmüştür ($p<0.01$). Tedavi alan grup ve sham grubu karşılaştırıldığında Tturn süresinde istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Grupların Tturn süreleri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

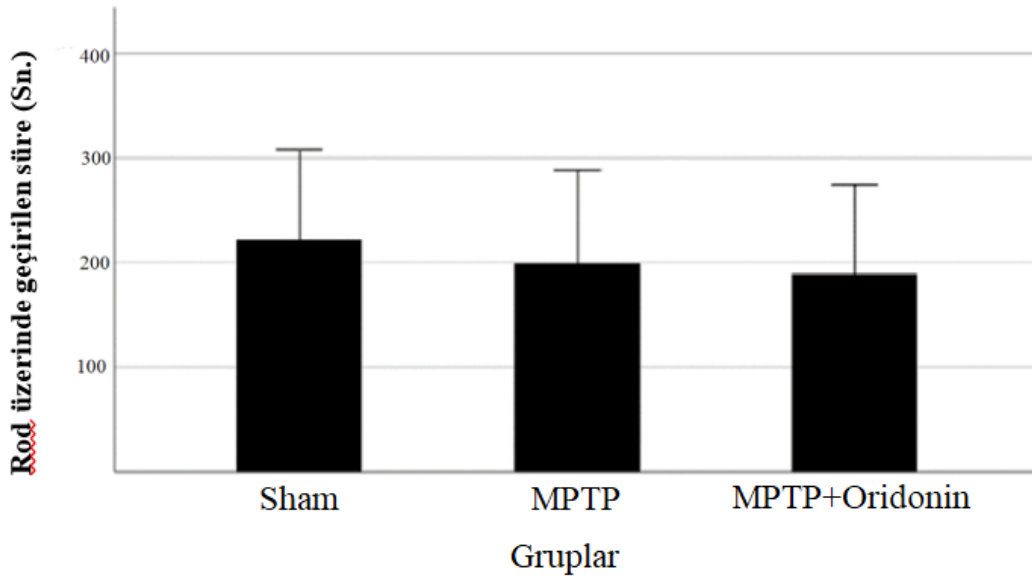
Ttotal sürelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2 Grupların Ttotal süreleri

4.1.2. Rotarod motor aktivite testi

Rod üzerinde geçirilen süre kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.3).

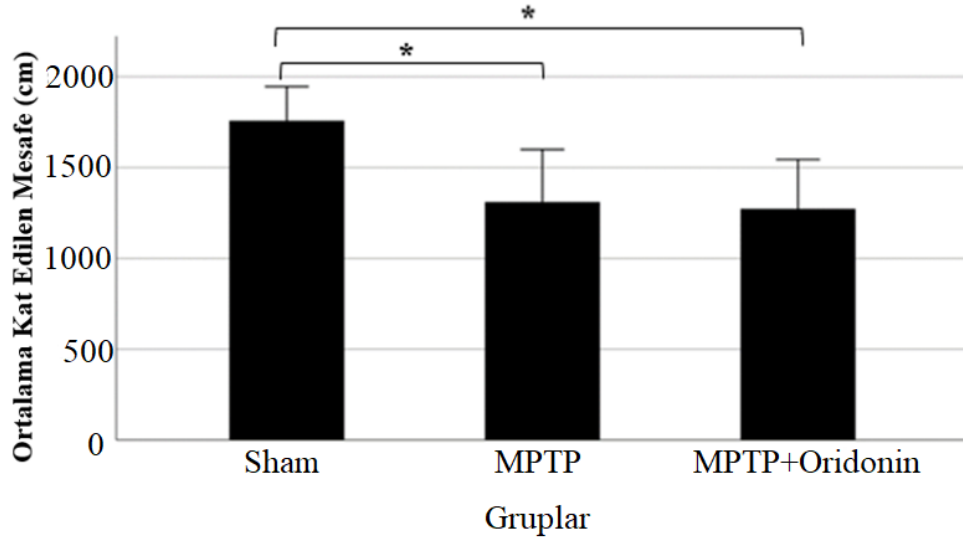


Şekil 4. 3 Grupların rotarod süresi

4.1.3. Yükseltilmiş artı labirent testi

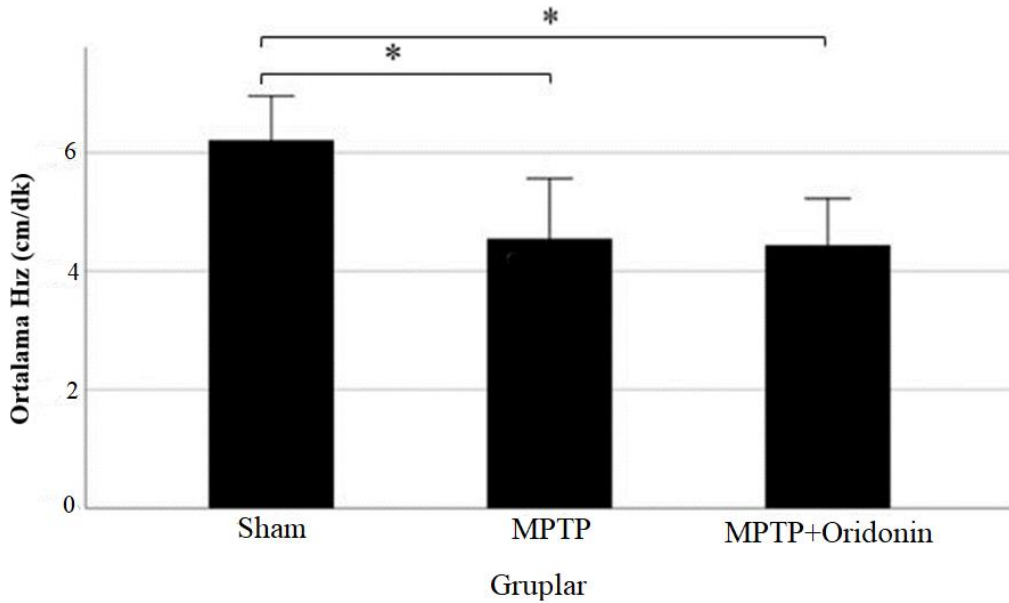
Bu testte, ortalama kat edilen mesafeye bakıldığında sham grubuna göre MPTP+ oridonin grubunda ortalama kat edilen mesafe istatistiksel olarak daha az bulunmuştur ($p<0.05$). MPTP grubunda sham grubuna göre kat edilen mesafe istatistiksel olarak daha az

bulunmuştur ($p<0.05$). Tedavi alan grupla MPTP grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.4).



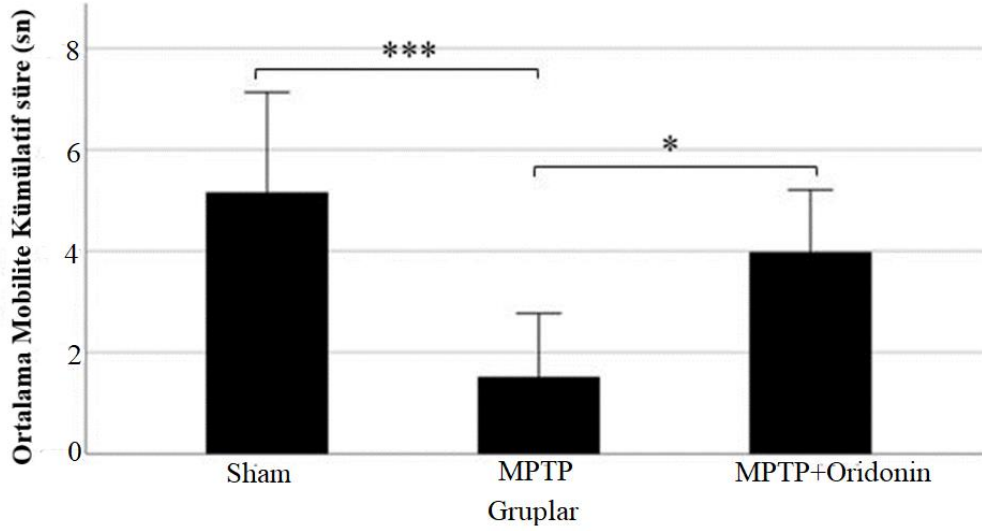
Şekil 4. 4 Grupların ortalama kat ettikleri mesafe (* $p<0.05$)

Grup hızlarının ortalaması kıyaslandığında, sham grubuna göre oridonin tedavisi alan grupta ortalama hız istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az çıkmıştır ($p<0.05$). MPTP grubunda, sham grubuna göre hız istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az bulunmuştur ($p<0.05$). Oridonin tedavisi alan grupla MPTP grubu kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.5).



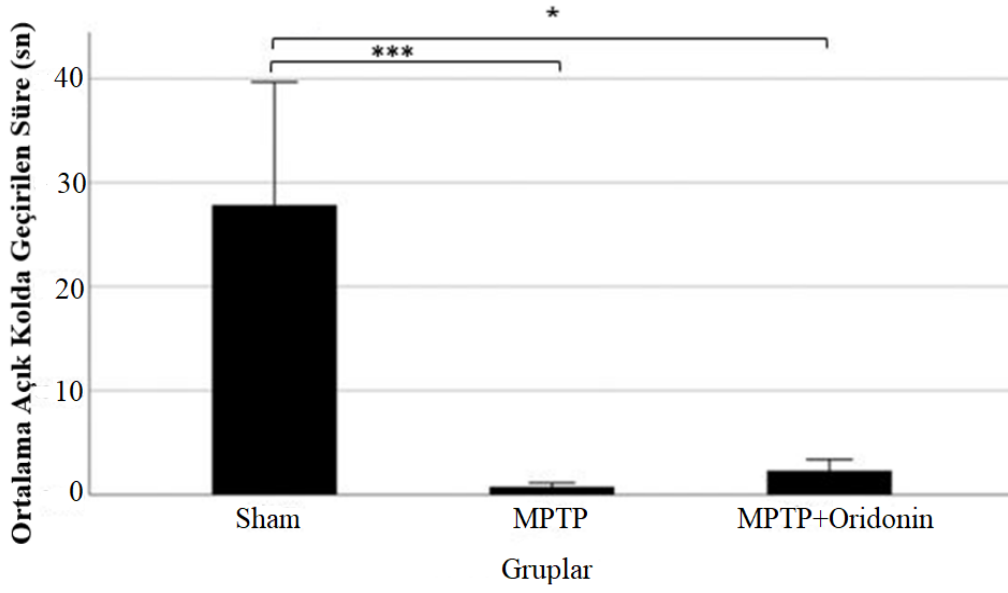
Şekil 4. 5 Grupların ortalama hızları (* $p<0.05$)

Gruplardaki mobilitenin ortalama kümülatif süresi kıyaslandığında, sham grubunda MPTP grubuna göre istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlılık bulunmuştur ($p<0.001$). Oridonin tedavisi alan grupla sham grubu kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır. MPTP grubuyla oridonin tedavisi alan grup kıyaslandığında ise tedavi grubunda süre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.6).



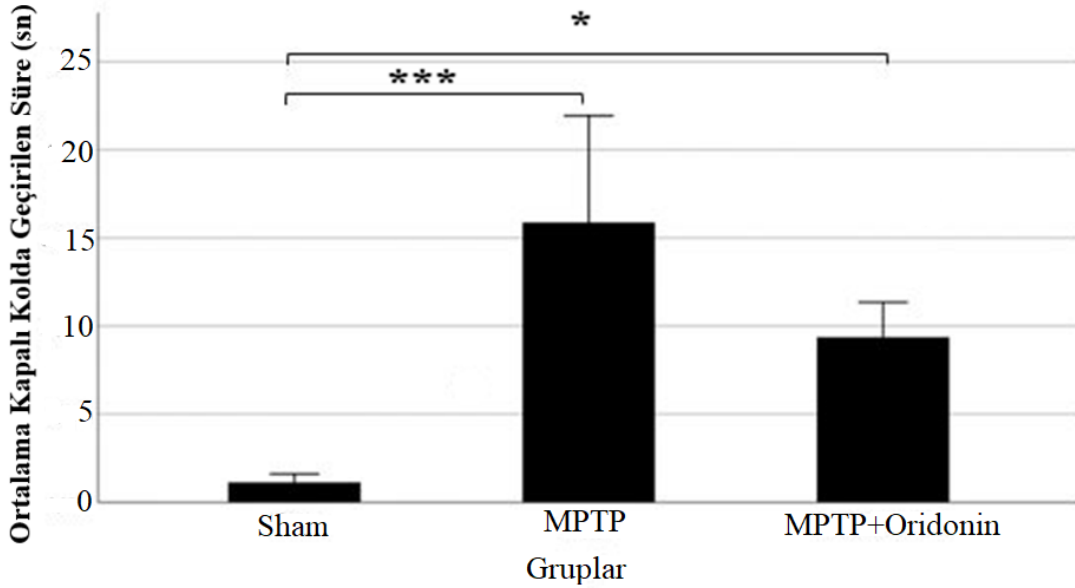
Şekil 4. 6 Grupların ortalama mobilitesi (* $p<0.05$, *** $p<0.001$)

MPTP grubunun sham grubuna göre açık kolda geçirdiği süre istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olarak daha kısa bulunmuştur ($p<0.001$). Oridonin tedavisi alan grupla sham grubu kıyaslandığında ise tedavi grubunda süre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa bulunmuştur ($p<0.05$). MPTP grubu ve oridonin tedavisi alan grup kıyaslandığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7 Grupların açık kolda geçirdikleri süre (* p<0.05, ***p<0.001)

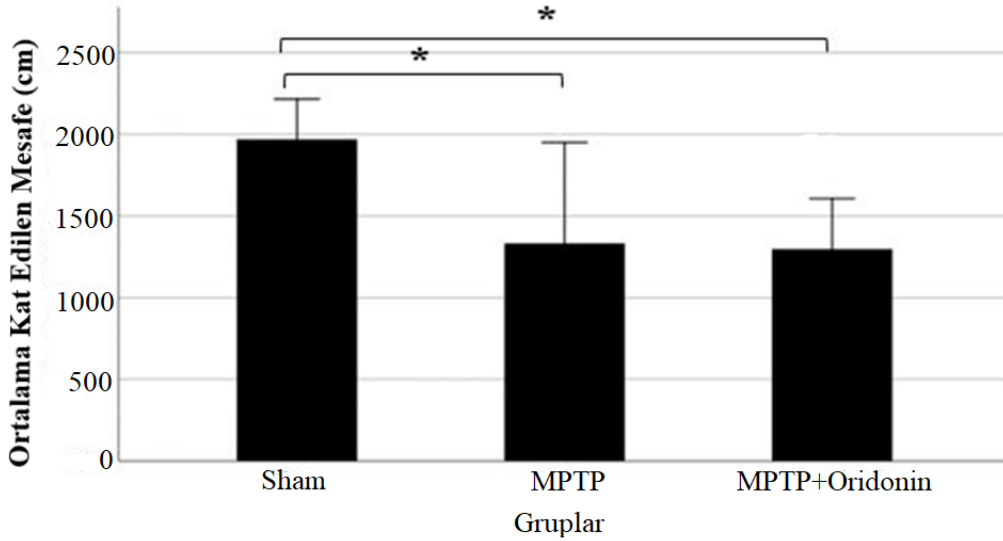
MPTP grubunun kapalı kolda geçirdikleri süre sham grubuna kıyasla istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı uzamıştır (p<0.001). Oridonin tedavisi alan gruba, sham grubu kıyaslandığında tedavi alan grubun kapalı kolda geçirdikleri süre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (p<0.05). MPTP grubu ve oridonin tedavisi alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05) (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8 Grupların ortalama kapalı kolda geçirdikleri süre (* p<0.05, ***p<0.001)

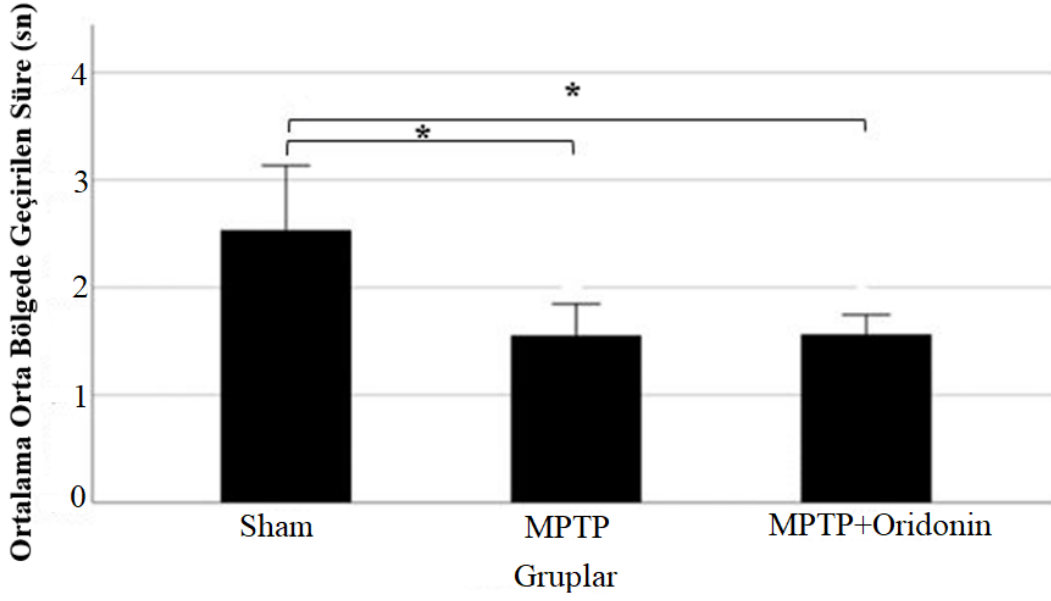
4.1.4. Açık alan testi

Kat edilen mesafenin ortalama değeri kıyaslandığında, MPTP grubunun sham grubuna göre kat ettiği mesafe istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az çıkmıştır ($p<0.05$). Oridonin tedavisi alan grupta kat edilen mesafe sham grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha az bulunmuştur ($p<0.05$). MPTP grubu ve oridonin tedavisi alan grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.9).



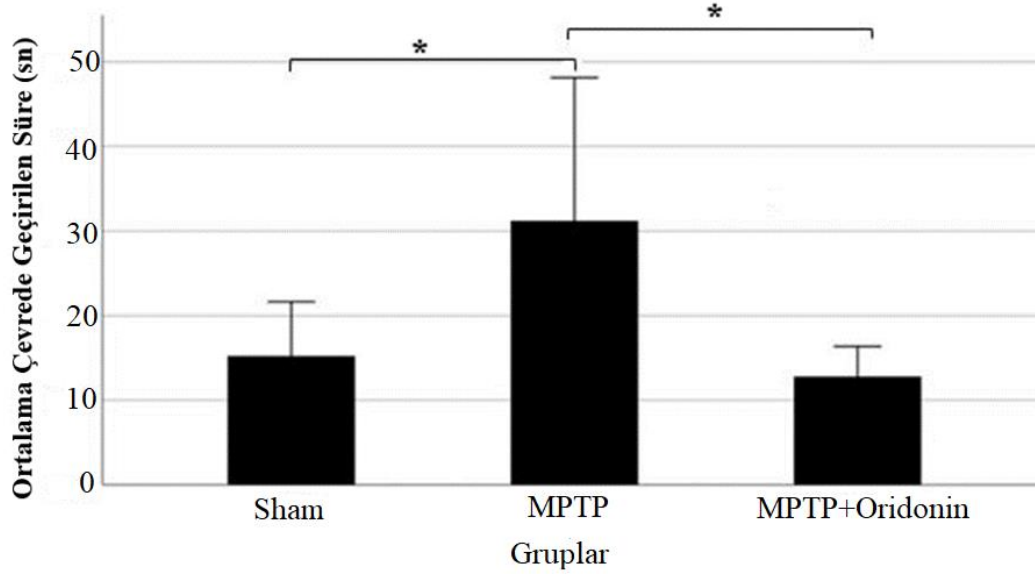
Şekil 4. 9 Grupların ortalama kat ettikleri mesafe (* $p<0.05$)

Orta bölgede geçirilen süre kıyaslandığında, MPTP grubunun sham grubuna göre orta bölgede geçirdiği süre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısalmıştır ($p<0.05$). Oridonin tedavisi alan grubun sham grubuna göre orta bölgede geçirdiği süre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa bulunmuştur ($p<0.05$). MPTP grubu ve oridonin tedavisi alan grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10 Grupların ortalama orta bölgede geçirdikleri süre (* p<0.05)

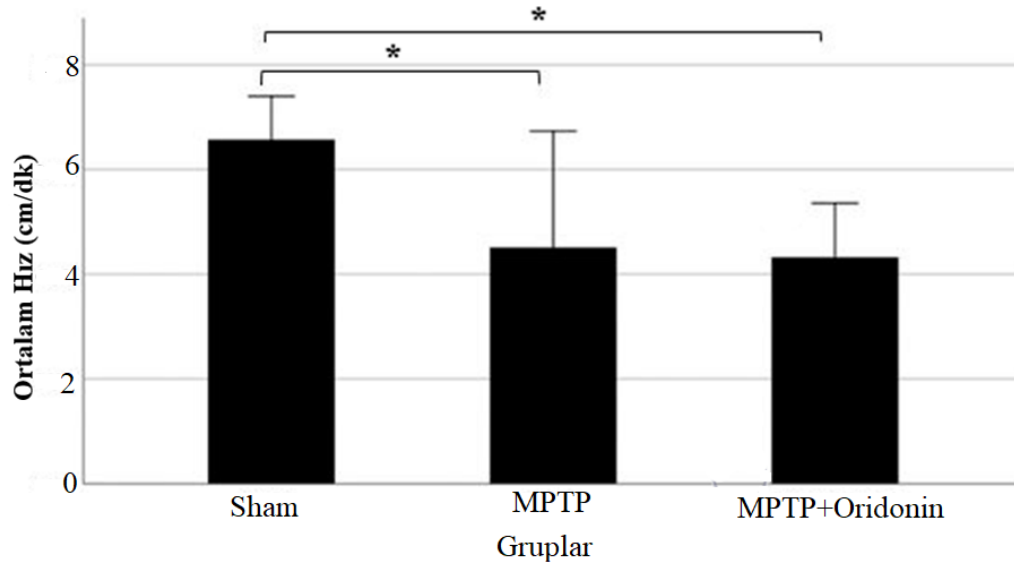
MPTP grubunun sham grubuna kıyasla çevrede geçirdiği süre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (p<0.05). Oridonin tedavisi alan grubun MPTP grubuna kıyasla çevrede geçirdiği süre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az çıkmıştır (p<0.05). Sham grubu ve oridonin tedavisi alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır (p>0.05) (Şekil 4.11).



Şekil 4. 11 Grupların ortalama çevrede geçirdiği süre (* p<0.05)

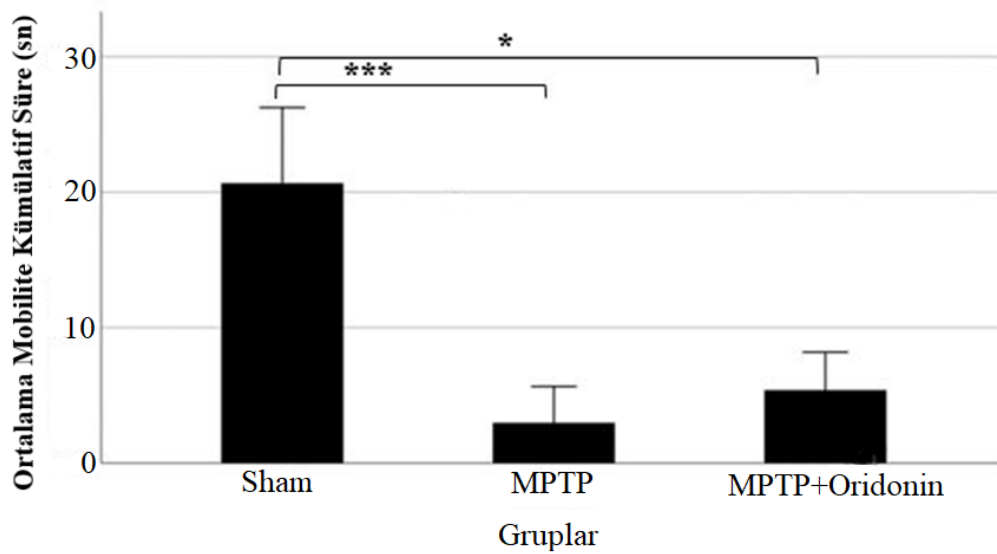
Sham grubu ve MPTP grubu karşılaştırıldığında MPTP grubunda hız istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük çıkmıştır (p<0.05). Oridonin tedavisi alan grupta sham

grubuna kıyasla hız istatistiksel açıdan daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). MPTP grubu ve oridonin tedavisi alan grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12 Grupların ortalama hızı (* $p<0.05$)

Mobilitenin ortalama kümülatif süresi karşılaştırıldığında sham grubuna göre MPTP grubunda süre istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olarak kısalmıştır ($p<0.001$). Sham grubuna kıyasla oridonin tedavisi alan grubun süresi istatistiksel olarak daha kısa bulunmuştur ($p<0.05$). MPTP grubu ve oridonin tedavisi alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.13).

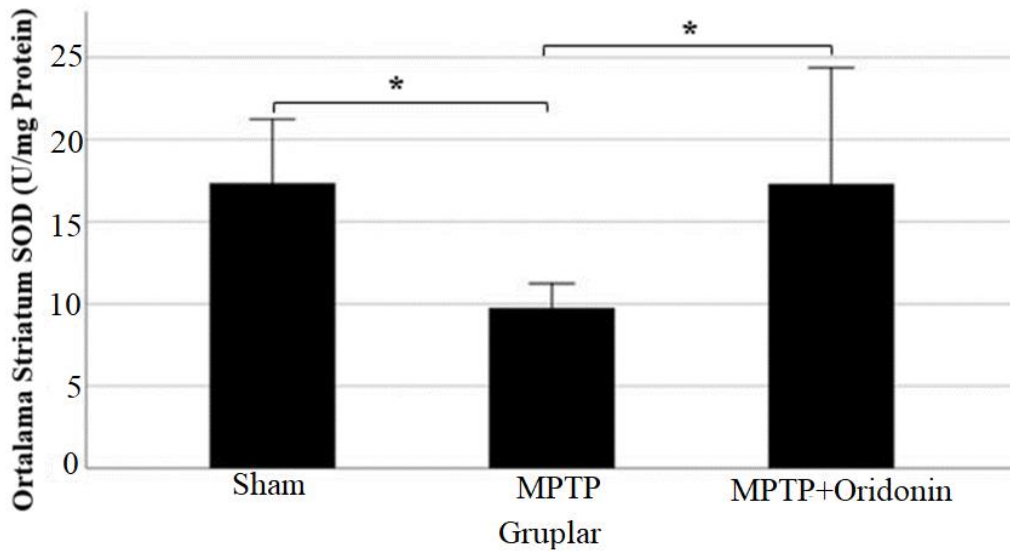


Şekil 4. 13 Grupların ortalama mobilitesi (* $p<0.05$, *** $p<0.001$)

4.2. Biyokimyasal analiz sonuçları

4.2.1. SOD

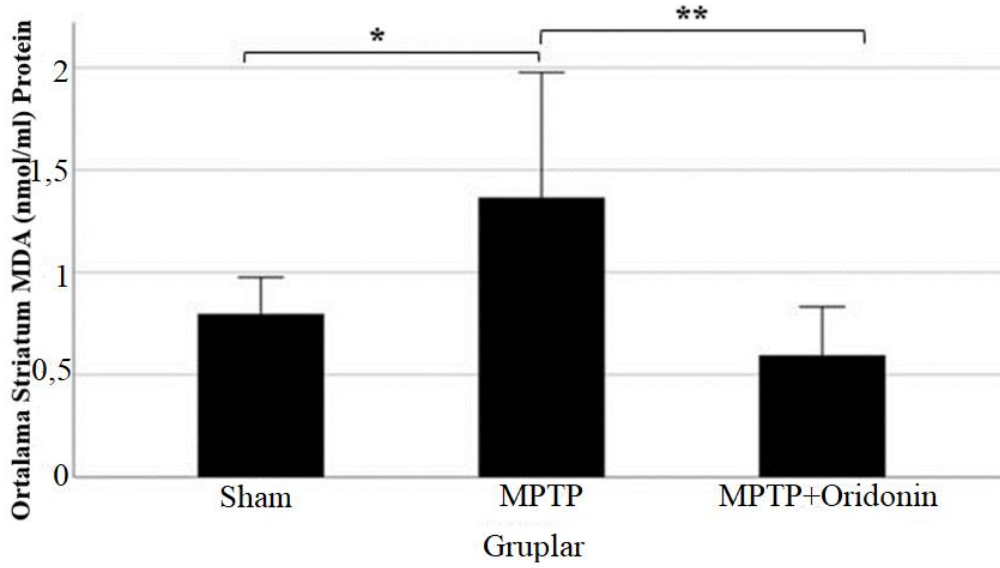
Striatum SOD seviyesi MPTP grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Oridonin tedavisi alan grup ve sham grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). MPTP grubuna göre oridonin tedavisi alan grubun striatum SOD seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14 Grupların ortalama striatum SOD seviyesi (* $p<0.05$)

4.2.2. MDA

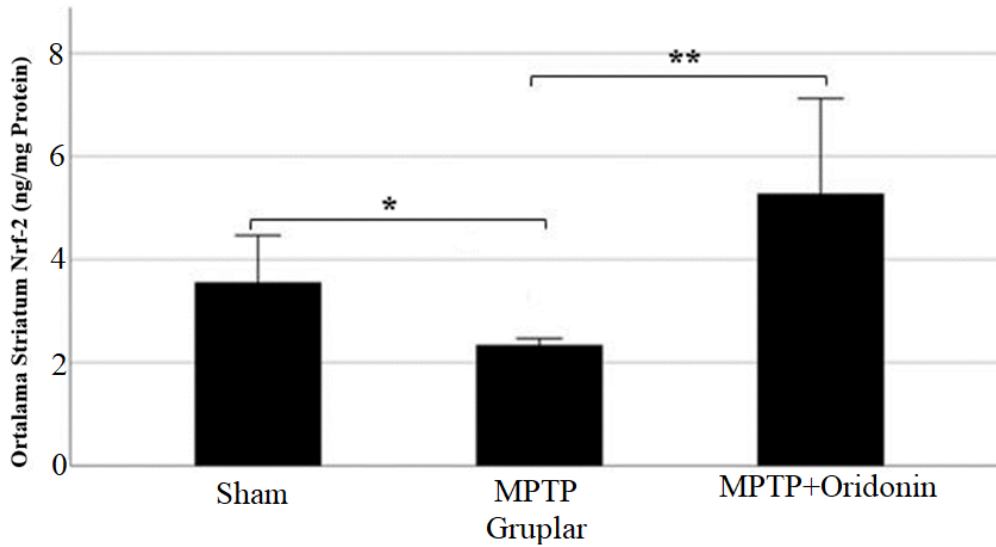
Striatum MDA seviyeleri, sham grubu ve oridonin tedavisi alan grup arasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Oridonin tedavisi alan gruba göre MPTP grubunda MDA seviyesi istatistiksel olarak çok anlamlılık derecesinde yüksek çıkmıştır ($p<0.01$). Sham grubuna göre MPTP grubunun MDA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15 Grupların ortalama striatum MDA seviyesi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.2.3. Nrf-2

Striatum Nrf-2 seviyesi sham grubuna göre MPTP grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıkmıştır ($p<0.05$). MPTP grubuna göre oridonin tedavisi alan grupta Nrf-2 seviyesi istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Oridonin tedavisi alan grup ve sham grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.16).

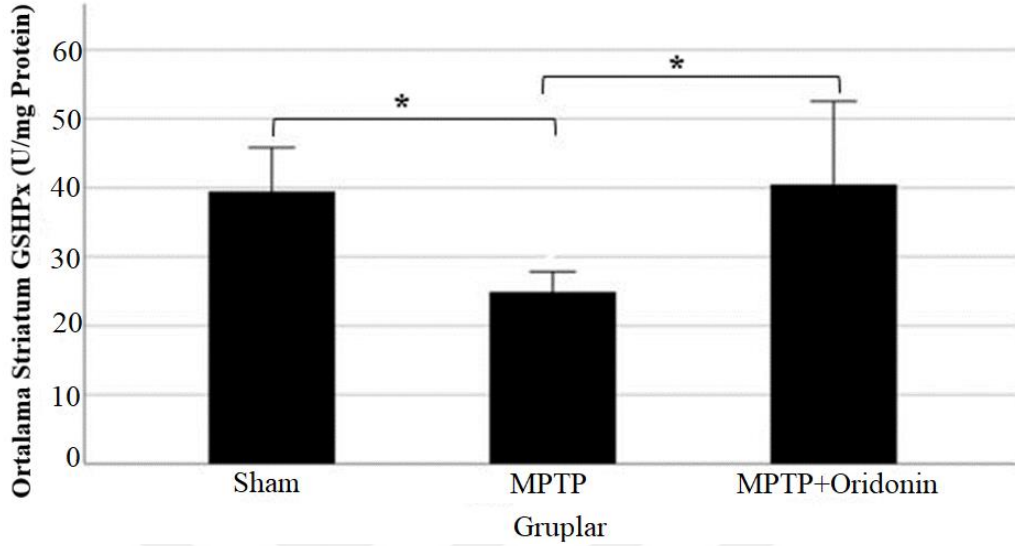


Şekil 4. 16 Grupların ortalama striatum Nrf-2 seviyesi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.2.4. GSHPx

MPTP grubunda GSHPx seviyesi sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Oridonin tedavisi alan grubun MPTP grubuna göre GSHPx

seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ($p<0.05$). Sham grubu ve oridonin tedavisi alan grup kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.17).



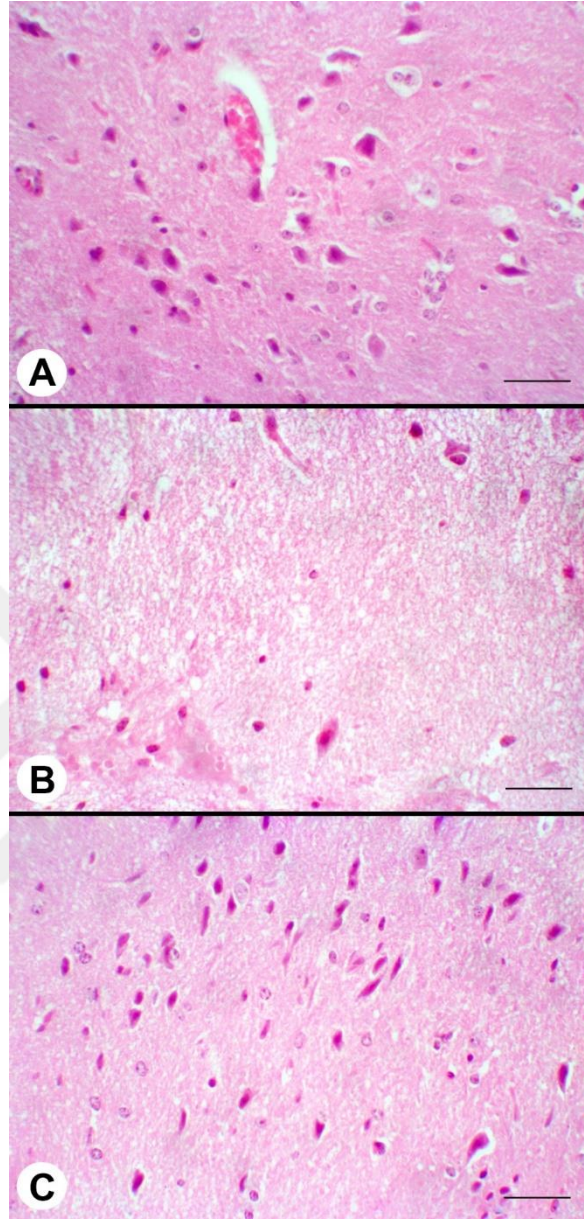
Şekil 4. 17 Grupların ortalama striatum GSHPx seviyesi (* $p<0.05$)

4.3. Histopatolojik Bulgular

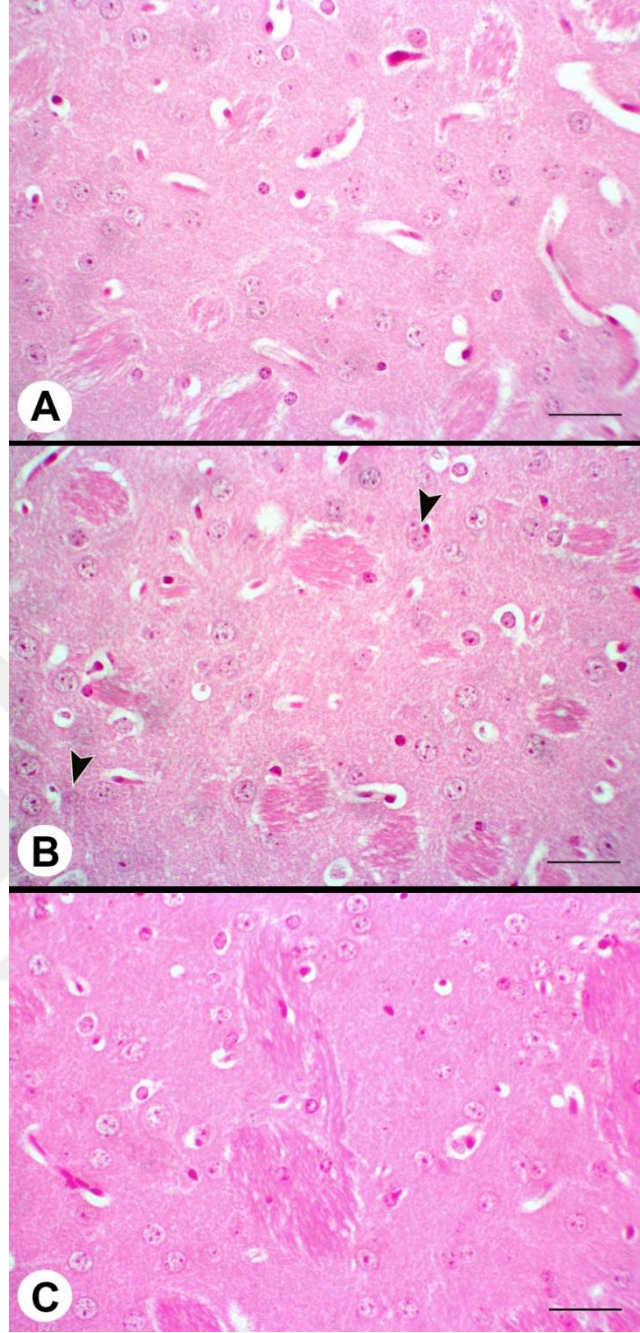
Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde SN ve CS bölgelerindeki hücre sayıları Tablo 4.1’de özetlendi. Histolojik olarak Sham grubundaki hayvanlarda SN ve CS bölgelerinin normal görünümde oldukları gözlemlendi (Resim 4.1, A; Resim 4.2, A). MPTP uygulanan farelerde nöronlarda nörofaji ve dejenerasyon ile birlikte diğer gruplara göre SN bölgelerinde daha belirgin olmak üzere hem SN hem de CS’daki hücre sayılarında önemli derecede azalma dikkati çekti (Resim 4.1 B; Resim 4.2, B). MPTP ile birlikte oridonin uygulanan farelerde nörofaji görülmemekle birlikte, tek başına MPTP uygulanan gruba göre daha hafif şiddette nöronal dejenerasyon izlendi (Resim 4.1, C; Resim 4.2, C). Ancak bu grupta da SN’deki hücrelerde azalma kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı idi (Şekil 4.18). CS bölgesindeki nöron sayılarının kontrol ile MPTP+Oridonin gruplarında benzer olduğu saptandı (Şekil 4.19).

Tablo 4. 1 Sham, MPTP ve MPTP+Oridonin gruplarında HE boyamada SN ve CS bölgelerindeki ortalama hücre sayıları (^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır (p< 0.001). SH: Standart Hata)

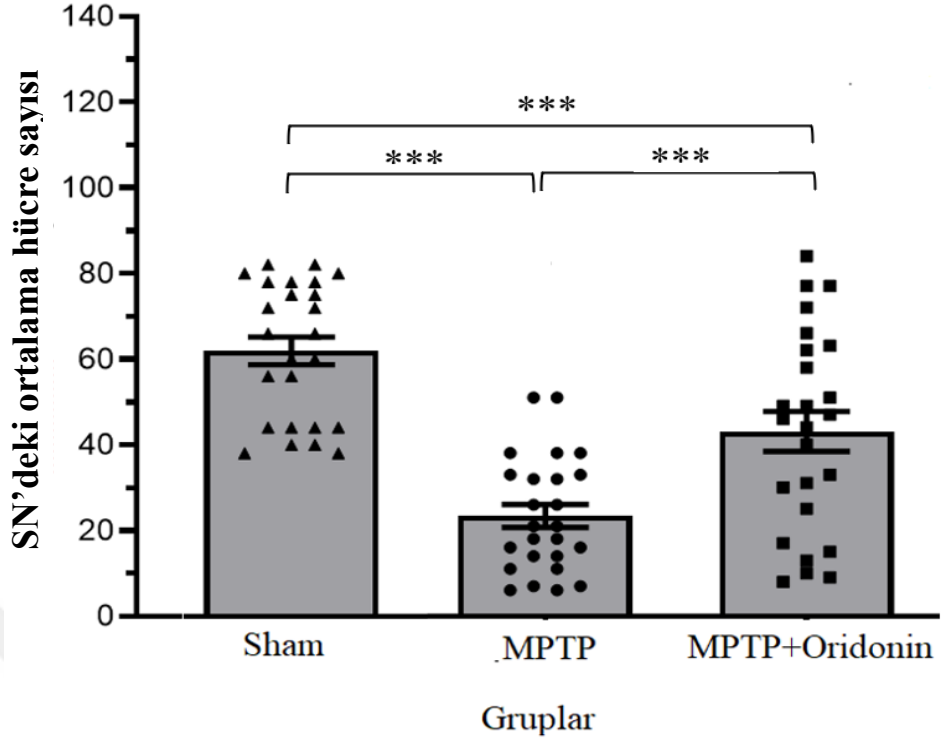
	SHAM	MPTP	MPTP+ORİDONİN	SH	P
H-E SN	61.92 ± 3.24 ^a	23.36 ± 2.68 ^c	43.04 ± 4.67 ^b	2.76	0.001
H-E CS	72.36 ± 2.14 ^a	61.84 ± 2.58 ^b	75.00 ± 1.88 ^a	1.43	0.001



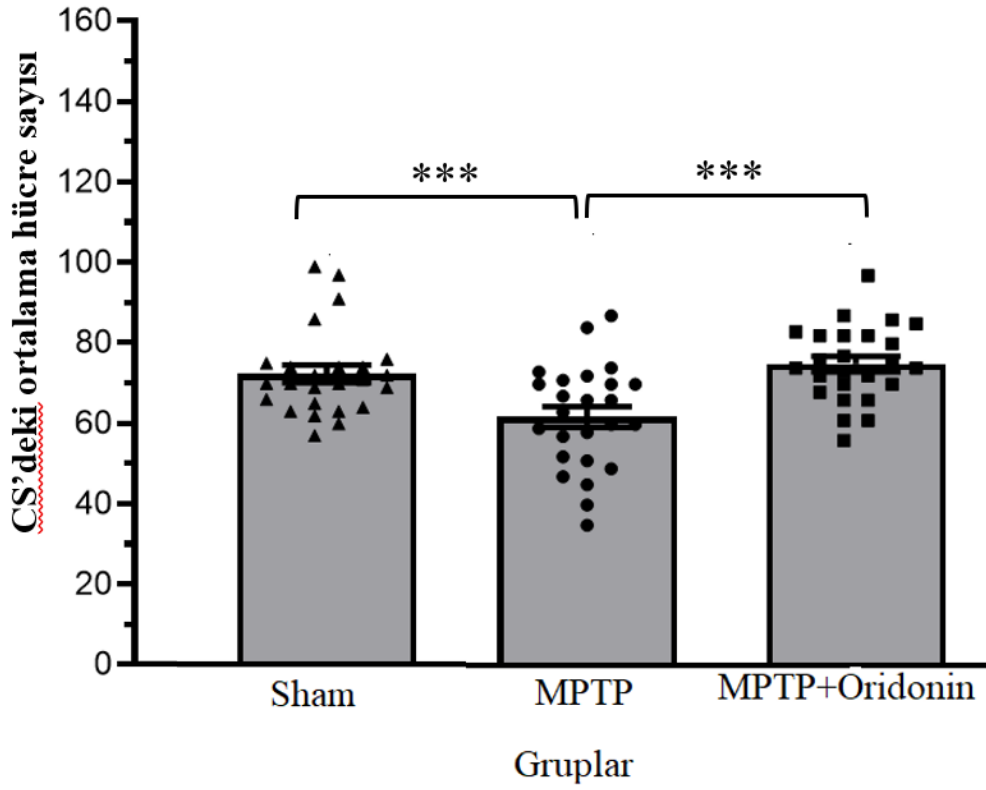
Resim 4. 1 A. Sham grubunda SN'nin normal histolojik görünümü, B. MPTP grubunda SN bölgesinde nöronal hücre kaybının görünümü, C. MPTP+Oridonin grubunda SN bölgesindeki nöronların görünümü, HEx200, Bar=50 µm



Resim 4. 2 A. Sham grubunda CS'nin normal histolojik görünümü, B. MPTP grubunda CS bölgesinde dejeneratif nöronların görünümü (ok başları), C. MPTP+Oridonin grubunda CS'da nöronların görünümü, HEx200, Bar=50 µm.



Şekil 4. 18 Sham ve deneme gruplarında SN'deki ortalama hücre sayısı (**p<0.001).



Şekil 4. 19 Sham ve deneme gruplarında CS'deki ortalama hücre sayısı (**p<0.001).

5. TARTIŞMA

5.1. Motor Fonksiyon Değerlendirilmesi

Parkinson hastalığı, tremor, bradikinezi, rijidite ve postüral instabilite ile karakterize bir hastalıktır (86). Çalışmamızda bradikineziyi değerlendirdiğimiz çubuk testinde diğer gruplara kıyasla MPTP grubunda Tturn süresinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı yani harekete başlama kabiliyetinin azaldığı görülmüştür. Buna karşılık, MPTP+oridonin grubunun harekete başlama kabiliyeti, sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmamıştır. Yapılan bazı çalışmalar, MPTP enjeksiyonu sonrasında striatal DA eksikliği olacağını ve bu duruma bağlı olarak hayvanlarda harekete başlama kabiliyetinde azalma meydana geldiğini bildirmektedir (87 , 88). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla tutarlıdır. Ttotal süresinde, MPTP grubunda diğer gruplara kıyasla bir uzama görülmüş olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. PH hastalarda harekete başlamada zorluğa yol açan bir bozukluk olması ile birlikte, hareketin sürdürülmesi aşamasında sorun oluşmamaktadır. Bu nedenle Tturn süresinin uzamasına rağmen, Ttotal süresinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemesi muhtemel bir durum olarak görülebilir. Çünkü; Tturn süresi bize harekete başlamayı tetikleyen mekanizmalardaki bozukluğu gösterirken, Ttotal ise başlanan hareketin sürdürülmesini gösteren bir parametredir.

Çalışmamızda motor performansı değerlendirmek amacı ile, kemirgenlerde en sık kullanılan testlerden biri olan rotarod performans testi kullanıldı. Gruplar arasında rot üzerinde geçirilen süreler bakımından istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı. DA eksikliğinin etkisini, rotarod performans testiyle inceleyen bir çalışmada; kontrol, MPTP ve L-DOPA tedavisi alan gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı, hatta en düşük DA seviyelerinde dahi rod üzerinde kalma süresinin değişmediği gösterilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda DA miktarı ve rotarod performans testi arasında bir ilişki olmadığı da bildirilmiştir (89). Elde ettiğimiz veriler bu çalışma ile tutarlıdır.

5.2 Anksiyete ve Depresyon Durumunun Değerlendirilmesi

Parkinson hastalarının yaklaşık %60'ı anksiyeteden etkilenmektedir ve genelde depresyonun da bu duruma eşlik ettiği bildirilmiştir (90). Yükseltilmiş artı labirent testi kemirgenlerde anksiyeteyi ölçmek için kullanılan yaygın bir davranış testidir (91). Bu test kemirgenlerin yeni ortamları keşfetmeye yönelik doğal eğilimlerine ve yüksek yerlerden

(açık kollar tarafından temsil edilir) doğuştan kaçınmalarına dayanır (92). Açık ve kapalı kolda geçirdikleri süre anksiyete benzeri davranışı veya bir ilacın anksiyete önleyici etkisini ölçmek için kullanılmaktadır (93). Bu teste göre; kaygı seviyesi düşük bir hayvan, açık kollarda daha fazla, kapalı kollarda daha az zaman geçirme eğilimindedir (94). Yükseltilmiş artı labirent testi sonuçlarımızda; lokomotor aktivitenin göstergesi olan ortalama kat edilen mesafe ile ortalama hızın, MPTP ve MPTP+oridonin grubunda, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı bulundu. Ayrıca anksiyeteyi incelemekte kullanılan açık kollarda geçirilen süre değerleri, MPTP ve MPTP+oridonin grubunda, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmışken, kapalı kollarda geçirilen süre MPTP ve MPTP+oridonin grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı. Literatüre göre bunun sebebi; beyindeki DA miktarının azalmasıyla birlikte gelişen anksiyeteden ve ayrıca motor koordinasyonun bozulmasından kaynaklı olabilir (95). Mobilite durumları incelendiğinde, oridonin tedavisinin mobilite süresini hastalık modeli oluşturulmuş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı belirlendi. Daha önce yapılan bir çalışmada oridoninin peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gamma (PPAR- γ) ekspresyonunu arttırarak, immobilityyi azalttığı rapor edilmiştir (96). Bizim sonuçlarımız da bu çalışma ile tutarlıdır. Bir derlemede ise PPAR- γ 'nın Nf- κ B aracılı inflamatuvar süreci inhibe ettiği ve bundan dolayı PPAR- γ agonistlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavi sürecinde yararlı etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir (97). Yükseltilmiş artı labirent testinde, açık ya da kapalı kollarda geçirilen süre bakımından, hastalık modeli olan MPTP grubu ve oridonin alan tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, oridoninle uygulanan tedavinin Parkinsonda görülen anksiyete, depresyon gibi motor olmayan bozuklukları tedavi edebilecek potansiyelde olmayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca yine aynı testte, MPTP grubu ile oridonin tedavi grubu arasında hız, kat edilen mesafe gibi verilerde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, bu ajanının motor fonksiyonlarda da iyileşme sağlamadığı fikrini doğrulamıştır.

Açık alan testi, kemirgenlerde lokomotor aktivite ve anksiyeteyi ölçmek için kullanılan bir başka davranış testidir (98). Deney zamanının çoğunu merkeze yakın bir yerde geçiren hayvan, çevre alanı tercih eden hayvanlara göre daha az korkak veya daha az kaygılı kabul edilir (93). Deney sonucunda, hız, kat edilen mesafe ve mobilite sonuçlarının, MPTP ve MPTP+oridonin gruplarında, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede

azaldığı bulundu. Bu sonuçlarımız MPTP enjeksiyonu sonrası farelerde motor fonksiyonu değerlendiren diğer çalışmalarla da tutarlıdır ve sebebinin DA eksikliği kaynaklı olduğu bildirilmiştir (99 , 100 , 101). Orta bölgede geçirilen süre, MPTP ve MPTP+oridonin gruplarında, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azdı. Anksiyetinin bir göstergesi olan çevrede (periferde) geçirilen süre ise MPTP grubunda, sham ve MPTP+oridonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı. Li ve arkadaşları oridoninin depresyon üzerindeki terapötik etkisini araştırmış ve sonuçlar, oridoninin NLRP3 inflamasyonunu inhibe ederek, depresyon benzeri davranışları azalttığını göstermiştir (102). Genel olarak açık alan testi sonuçlarımızın tamamında, oridonin tedavisinin tam olarak iyileştirici etkisi görülmesine de periferde geçirilen süre tedavi grubunda azalmıştır.

5.3 Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi

Parkinson hastalığında mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif hasar ve inflamasyonunun olası rolleri yıllardır bilinmektedir. Hastalığın patogenezinde, ROS oluşumuyla birlikte, oksidatif stresin önemli katkısı bulunmaktadır. ROS oluşumu; proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri olumsuz bir şekilde etkilemektedir (66). Çalışmamızda hastalık modelinin indükleyici ajanı olarak kullanılan MPTP metabolizma sonucunda MPP+'ye dönüşür ve oksidatif stresi arttırarak nöronal kalsiyum homestazını bozar. Böylece hücre hasarına sebep olur (103). Zheng ve arkadaşları oridoninin antioksidan kapasite üzerindeki etkisini araştırmak için bir araştırma yapmış ve lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu sebebiyle artan MDA seviyesinin oridonin tedavisi alan grupta azaldığını göstermiştir. Yine aynı çalışmada Nrf-2, SOD, CAT ve GSHPx mRNA seviyelerinin arttığı ve bu artışın Nrf-2 yolunun aktivasyonu sebebiyle olduğu rapor edilmiştir (104).

Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun başlıca ürünüdür (105). MDA miktarı dolaylı olarak oksijen radikallerinin metabolik seviyesini yansıtır ve oksidatif hasarın bir göstergesidir (106). Parkinson hastalarının substantia nigra ve striatumlarında MDA seviyelerinin arttığı bilinmektedir (60). 2015 yılında yapılan bir çalışmada, MPTP enjeksiyonu sonrasında artan oksidatif stresle beraber MDA seviyesinin arttığı gösterilmiştir (107). Sonuçlarımıza göre MPTP enjeksiyonu sonrasında striatum MDA seviyesi sham grubuna göre MPTP grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. MPTP+oridonin grubunda sham grubuna göre striatum MDA seviyesinde istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. MPTP grubunda, MPTP+oridonin grubuna göre striatum MDA seviyesi istatistiksel olarak çok anlamlı derecede artmıştır. Bu bilgiler

doğrultusunda, oridonin tedavisinin PH'de görülen oksidatif stresi azaltabileceği fikri oluşmuştur.

Süperoksit dismutaz'ın, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ye dönüşmesini katalize ederek (64) hücreleri oksidatif strese karşı korumada önemli görevi bulunmaktadır ve bu sayede nöronal hücreleri apoptozdan koruyabilmektedir (108). Shen ve arkadaşları MPTP ile PH modeli oluşturmuş ve MPTP enjeksiyonu sonrasında striatum SOD seviyesinin azaldığını rapor etmişlerdir (106). MPTP grubunda striatum SOD seviyesi, sham ve MPTP+oridonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıkmıştı. MPTP+oridonin grubu ve sham grubu arasında ise istatistiksel açıdan fark bulunmadı. Bu sonuçlara bakarak oridonin tedavisinin striatum SOD seviyesini koruyabildiği şeklinde yorum yapabiliriz.

Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 'nin suya indirgenmesini katalize ederek hücreleri oksidatif stresin yarattığı hasardan korumada görev almaktadır. PH'nin hayvan modellerinde daha önceden yapılan çalışmalar, striatumda azalan GSHPx aktivitesini rapor etmiştir (60). Yine benzer bir sonuç Guo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada görülmüştür; bu çalışmada MPP^{+} 'nin striatum SOD ve GSHPx seviyelerinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (109). Çalışmamızda MPTP grubunun GSHPx seviyesi, sham ve MPTP+oridonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Bununla birlikte, MPTP+oridonin grubunun striatum GSHPx seviyesi ile sham grubunun striatum GSHPx seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Sonuç olarak, verilerimiz göstermektedir ki; oridonin tedavisi dokudaki GSHPx seviyesini korumaktadır.

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2, oksidatif strese karşı savunma yapan ana proteindir ve tüm organlarda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf-2'nin transkripsiyonel aktivitesindeki bir bozukluk dopaminerjik nöronları oksidatif strese karşı daha hassas hale getirir. Nrf-2 fonksiyonu üzerine yapılan birkaç çalışmada, Nrf-2 stimülasyonunun nörodejeneratif süreci engellediği; baskılanmasının ise bu süreci hızlandırdığı gösterilmiştir (59). Çalışmamızda MPTP grubunda, sham grubuna göre striatum Nrf-2 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıktı. MPTP+oridonin grubunda, MPTP grubuna göre Nrf-2 seviyesi istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu. Oridonin ve Nrf-2 ilişkisi, başka bir çalışmada incelenmiş ve iskemik felç sonrası oluşan endotelial oksidatif stres hasarının oridonin tedavisiyle iyileştiği rapor edilmiştir. Oridoninin, AKT(Ser473)/GSK3 β (Ser9) yolağının aktivasyonunu sağlayarak Nrf-2'nin nükleer translokasyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir (110). Bu bilgiler ışığında,

bizim sonuçlarımız da oridoninin, Nrf-2'nin aktivasyonunu sağlamış olabileceğini ve böylece tedavi grubu ile MPTP grubunun sonuçlarını kıyasladığımızda elde ettiğimiz veriler, oridoninin dopaminerjik hücrelerin zarar görmesine yol açan oksidatif stresi Nrf-2 üzerinden engelleyebileceği fikrini akla getirmektedir.

5.4. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Parkinson hastalığının, SN'deki dopaminerjik nöronların kaybından kaynaklanan kronik ve ilerleyici bir hastalık olduğu bilinmektedir (111). Bu nöronların dejenerasyonu, motor kortikal alanların ve bazal gangliyonları içeren nöronal devrelerin işlev bozukluğuna yol açar (112). Yang ve arkadaşlarının paraquat ile PH modeli oluşturduğu bir çalışmada, paraquatın SN'de dopaminerjik nöronları dejenere ettiği gösterilmiştir (113). Histopatolojik sonuçlarımız incelendiğinde, MPTP grubunda SN'deki hücre sayısının, sham ve MPTP+oridonin grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azaldığı görülmektedir. Ayrıca MPTP+oridonin grubunda da SN'deki hücre sayısı, sham grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalmıştır. Striatumdaki hücre sayıları incelendiğinde ise MPTP grubunda striatumdaki hücre sayıları, sham ve MPTP+oridonin grubuna göre istatistiksel olarak azalmış olduğu görülmüştür. MPTP+oridonin grubu ve sham grubu kıyaslandığında ise striatumdaki hücre sayılarında istatistiksel açıdan fark bulunamamıştır. Oridoninin, Nrf-2 yolunu aktive ederek SOD ve GSHPx seviyelerini arttırmış olabileceğinden bir önceki bölümde bahsedilmiştir. Tüm bu veriler sonucunda, oridonin tedavisinin PH'de antioksidan seviyelerini arttırarak, SN ve striatumdaki hücreleri oksidatif hasardan koruyabileceği fikri oluşmuştur.

6. SONUÇ

Çalışmamızda, MPTP ile Parkinson modeli oluşturulmuş farelerde oridonin tedavisinin motor, motor olmayan semptomlarda ve oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisini inceledik. Çalışmamız Parkinson fare modelinde oridonin tedavisinin etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bulgularımıza göre oridonin tedavisinin Parkinson hayvan modellerinde azaldığı bilinen lokomotor aktiviteyi tam anlamıyla iyileştirici bir etkisi olmadığı ve ayrıca Parkinsonda görülen motor olmayan semptomlardan anksiyete, depresyon gibi davranışlar üzerinde de azaltıcı bir etkide bulunmadığı görülmüştür. Deneyimizin sonucunda MPTP grubunda antioksidan enzim olan SOD, GSHPx ve Nrf-2 seviyeleri düşük bulunmuştur ve oksidatif stresin bir belirteci olan MDA seviyesinde ise bir artış söz konusudur. Oridoninle tedavi edilen grupta antioksidan seviyeleri yükselirken, oksidatif stresin göstergesi olan parametrede de azalma meydana gelmiştir. MPTP grubunun SN ve striatumdaki hücre sayıları, oridonin tedavisi alan gruba göre azalmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında; oridoninin, Nrf-2 yolunu aktive ederek antioksidan seviyelerini arttırabileceği ve oksidatif stresi baskılayabileceği düşünülmektedir. Bu etkiyi gösterirken hangi mekanizmaların dahil olabileceğinin tam olarak anlaşılması için ileride yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. Vol. 132, American Journal of Medicine. Elsevier Inc.; 2019. p. 802–7.
2. Jankovic J, and Tan EK. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. 2020;91:795–808.
3. Simon DK, Tanner CM, and Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. Clinics in Geriatric Medicine. 2020;36:1–12.
4. Mermer M, and Yildiran H. Effects of Essential Fatty Acids and Cholesterol in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi. 2020;11.
5. Opara JA, Małecki A, Małecka E, and Socha T. Motor assessment in parkinson's disease. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2017;24:411–15.
6. Lees AJ, Hardy J, and Revesz T. Parkinson's disease. Vol. 373, The Lancet. Elsevier B.V.; 2009. p. 2055–66.
7. Xu J, Wold EA, Ding Y, Shen Q, and Zhou J. Therapeutic potential of oridonin and its analogs: From anticancer and antiinflammation to neuroprotection. Molecules. 2018;23.
8. Lu C, Chen C, Chen A, Wu Y, Wen J, Huang F, and Zeng Z. Oridonin Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Downregulating Oxidative Stress and NLRP3 Inflammasome Pathway in Mice. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2020;2020.
9. Li X, Zhang CT, Ma W, Xie X, and Huang Q. Oridonin: A Review of Its Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicity. Frontiers in Pharmacology. 2021;12.
10. Wang S, Yu L, Yang H, Li C, Hui Z, Xu Y, and Zhu X. Oridonin attenuates synaptic loss and cognitive deficits in an A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease. PLoS ONE. 2016;11:1–16.
11. Lin KH, Li CY, Hsu YM, Tsai CH, Tsai FJ, Tang CH, Yang JS, Wang ZH, and

- Yin MC. Oridonin, A natural diterpenoid, protected NGF-differentiated PC12 cells against MPP⁺ and kainic acid-induced injury. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;133.
12. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezzard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, and Stoessl AJ. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*. 2017;32:1264–1310.
 13. McDonald C, Gordon G, Hand A, Walker RW, and Fisher JM. 200 Years of Parkinson's disease: What have we learnt from James Parkinson? *Age and Ageing*. 2018;47:209–14.
 14. Parent M, and Parent A. Substantia nigra and Parkinson's disease: A brief history of their long and intimate relationship. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2010;37:313–19.
 15. Li S, and Le W. Milestones of Parkinson's Disease Research: 200 Years of History and Beyond. *Neuroscience Bulletin*. 2017;33:598–602.
 16. Raza C, Anjum R, and Shakeel N ul A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences* [Internet]. 2019;226:77–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
 17. Ascherio A, and Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology* [Internet]. 2016;15:1257–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
 18. Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, and Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European Neuropsychopharmacology*. 2005;15:473–90.
 19. Khan AU, Akram M, Daniyal M, and Zainab R. Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. *International Journal of*

- Neuroscience [Internet]. 2019;129:55–93. Available from: <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1486837>
20. Huang Z, de la Fuente-Fernandez R, and Stoessl J. Etiology of Parkinson ' s disease. *The Canadian journal of neurological sciences*. 2003;10–18.
 21. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, and Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*. 2014;29:1583–90.
 22. Collier TJ, Kanaan NM, and Kordower JH. Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin? *Movement Disorders*. 2017;32:983–90.
 23. Deng H, Wang P, and Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. Vol. 42, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 72–85.
 24. Delamarre A, and Meissner WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. Vol. 46, *Presse Medicale*. Elsevier Masson SAS; 2017. p. 175–81.
 25. Schulte C, and Gasser T. Genetic basis of Parkinson's disease: Inheritance, penetrance, and expression. Vol. 4, *Application of Clinical Genetics*. 2011. p. 67–80.
 26. Pingale T, and Gupta GL. Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* [Internet]. 2020;199:173060. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173060>
 27. Zhang PL, Chen Y, Zhang CH, Wang YX, and Fernandez-Funez P. Genetics of Parkinson's disease and related disorders. *Journal of Medical Genetics*. 2018;55:73–80.
 28. No Title. Available from: <https://pdprogram.org/classification-of-parkinsonism/>
 29. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, and Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. Vol. 47, *Molecular neurobiology*. 2013. p. 495–508.
 30. Ferrer I, Martinez A, Blanco R, Dalfó E, and Carmona M. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: Preclinical

- Parkinson disease. Vol. 118, Journal of Neural Transmission. 2011. p. 821–39.
31. Miller DB, and O’Callaghan JP. Biomarkers of Parkinson’s disease: Present and future. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2015;64:S40–46.
 32. Halliday GM, and Mccann H. The progression of pathology in Parkinson’s disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
 33. Meder D, Herz DM, Rowe JB, Lehericy S, and Siebner HR. The role of dopamine in the brain - lessons learned from Parkinson’s disease. *NeuroImage*. 2019;190:79–93.
 34. Beitz JM. Parkinson’s disease: a review. *Frontiers in Bioscience*. 2014;6:65–74.
 35. Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson’s disease. *Parkinsonism and Related Disorders* [Internet]. 2016;22:S119–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.004>
 36. Bologna M, Paparella G, Fasano A, Hallett M, and Berardelli A. Evolving concepts on bradykinesia. *Brain*. 2020;143:727–50.
 37. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry*. 2016;139:318–24.
 38. Gironell A, Pascual-Sedano B, Aracil I, Marín-Lahoz J, Pagonabarraga J, and Kulisevsky J. Tremor Types in Parkinson Disease: A Descriptive Study Using a New Classification. *Parkinson’s Disease*. 2018;2018.
 39. Tarakad A, and Jankovic J. Diagnosis and Management of Hansen ’ s Disease. *Seminars in Neurology*. 2017;37:118–26.
 40. Jankovic J. Parkinson’s disease: Clinical features and diagnosis. Vol. 79, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. BMJ Publishing Group; 2008. p. 368–76.
 41. Jagadeesan AJ, Murugesan R, Devi SV, Meera M, Madhumala G, Vishwanathan Padmaja M, Ramesh A, Banerjee A, Sushmitha S, Khokhlov AN, Marotta F, and Pathak S. Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson’s disease: a review. *Acta Biomed* [Internet]. 2017;88:249–62. Available from: www.actabiomedica.it

42. Shahed J, and Jankovic J. Motor symptoms in Parkinson's disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2007;83:329–42.
43. Massano J, and Bhatia KP. Clinical approach to Parkinson's disease: Features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2:1–15.
44. Chaudhuri KR, Healy DG, and Schapira AH V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease : diagnosis and management. 2006;5.
45. Bové J, and Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. Vol. 211, *Neuroscience*. 2012. p. 51–76.
46. Zeng XS, Geng WS, and Jia JJ. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*. 2018;10.
47. Simola N, Morelli M, and Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 2007;11:151–67.
48. Chia SJ, Tan EK, and Chao YX. Historical perspective: Models of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:1–14.
49. Dauer W, and Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. 2003;39:889–909.
50. Blandini F, and Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. Vol. 279, *FEBS Journal*. 2012. p. 1156–66.
51. Duty S, and Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*. 2011;164:1357–91.
52. Jackson-Lewis V, Blesa J, and Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* [Internet]. 2012;18:S183–85. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70057-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70057-8)
53. Mustapha M, and Taib CNM. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021;21:422–33.
54. Salari S, and Bagheri M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's

- disease. *Physiological Research*. 2019;68:17–24.
55. Le W, Sayana P, and Jankovic J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics*. 2014;11:92–110.
 56. Leão AHFF, Sarmento-Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, and Silva RH. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathology*. 2015;25:377–90.
 57. Kin K, Yasuhara T, Kameda M, and Date I. Animal models for Parkinson's disease research: Trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20.
 58. Puspita L, Chung SY, and Shim JW. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*. 2017;10:1–12.
 59. Hemmati-Dinarvand M, saedi S, Valilo M, Kalantary-Charvadeh A, Alizadeh Sani M, Kargar R, Safari H, and Samadi N. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. *Neuroscience Letters*. 2019;709.
 60. Surendran S, and Rajasankar S. Parkinson's disease: Oxidative stress and therapeutic approaches. *Neurological Sciences*. 2010;31:531–40.
 61. Zhou C, Huang Y, and Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. *annals of the new york academy of sciences*. 2008;1147:93–104.
 62. Trist BG, Hare DJ, and Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*. 2019;18:1–23.
 63. Khan Z, and Athar Ali S. Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Current Journal of Neurology*. 2019;17:137–44.
 64. Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, and Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*. 2020;44:1–13.
 65. Madeo J. The Role of Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease. *Journal of*

- Alzheimer's Disease & Parkinsonism. 2013;03:1–31.
66. Kumar H, Koppula S, Kim I-S, More V, Kim B-W, and Choi D-K. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Signaling in Parkinson Disease: A Promising Multi Therapeutic Target Against Oxidative Stress, Neuroinflammation and Cell Death. 2012.
 67. Surh YJ, Kundu JK, and Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*. 2008;74:1526–39.
 68. Sevgili E. Dopaminerjik Nöronal Hasarda GSK-3 β Enzim İnhibisyonu ile NRF2/ARE Yolağı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. 2016, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 102 sayfa, İzmir, (Doç. Dr. Güliz Armagan).
 69. Li D, Wang H, Ding Y, Zhang Z, Zheng Z, Dong J, Kim H, Meng X, Zhou Q, Zhou J, Fang L, and Shen Q. Targeting the NRF-2/RHOA/ROCK signaling pathway with a novel aziridonin, YD0514, to suppress breast cancer progression and lung metastasis. *Cancer Letters* [Internet]. 2018;424:97–108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.029>
 70. Houghton CA, Fassett RG, and Coombes JS. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016.
 71. Liu X, Xu J, Zhou J, and Shen Q. Oridonin and its derivatives for cancer treatment and overcoming therapeutic resistance. *Genes and Diseases* [Internet]. 2021;8:448–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.06.010>
 72. Abdullah NA, Md Hashim NF, Ammar A, and Zakuan NM. An insight into the anti-angiogenic and anti-metastatic effects of oridonin: Current knowledge and future potential. *Molecules*. 2021;26:1–17.
 73. Lu Y, Sun Y, Zhu J, Yu L, Jiang X, Zhang J, Dong X, Ma B, and Zhang Q. Oridonin exerts anticancer effect on osteosarcoma by activating PPAR- γ and inhibiting Nrf2 pathway article. *Cell Death and Disease*. 2018;9.
 74. Zhang YY, Fan YC, Wang M, Wang D, and Li XH. Atorvastatin attenuates the

- production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease or statin attenuates the production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the hippocampus of an amyloid β 1-42-induced. *Clinical Interventions in Aging*. 2013;8:103–10.
75. Jones SV, and Kounatidis I. Nuclear factor-kappa B and Alzheimer disease, unifying genetic and environmental risk factors from cell to humans. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
 76. Xu Y, Xue Y, Wang Y, Feng D, Lin S, and Xu L. Multiple-modulation effects of Oridonin on the production of proinflammatory cytokines and neurotrophic factors in LPS-activated microglia. *International Immunopharmacology*. 2009;9:360–65.
 77. Wang S, Yang H, Yu L, Jin J, Qian L, Zhao H, Xu Y, and Zhu X. Oridonin attenuates A β 1-42-induced neuroinflammation and inhibits NF- κ B pathway. *PLoS ONE*. 2014;9.
 78. Lin KH, Li CY, Hsu YM, Tsai CH, Tsai FJ, Tang CH, Yang JS, Wang ZH, and Yin MC. Oridonin, A natural diterpenoid, protected NGF-differentiated PC12 cells against MPP⁺ and kainic acid-induced injury. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. 2019;133:110765. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110765>
 79. Ozsoy O, Tanriover G, Derin N, Uysal N, Demir N, Gemici B, Kencebay C, Yargicoglu P, Agar A, and Aslan M. The effect of docosahexaenoic acid on visual evoked potentials in a mouse model of Parkinson's disease: The role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa-B. *Neurotoxicity Research*. 2011;20:250–62.
 80. Wang S, Yang H, Yu L, Jin J, Qian L, Zhao H, Xu Y, and Zhu X. Oridonin attenuates A β 1-42-induced neuroinflammation and inhibits NF- κ B pathway. *PLoS ONE*. 2014;9:1–7.
 81. Rothman SM, Griffioen KJ, Vranis N, Ladenheim B, Cong WN, Cadet JL, Haran J, Martin B, and Mattson MP. Neuronal expression of familial Parkinson's disease A53T α -synuclein causes early motor impairment, reduced anxiety and potential sleep disturbances in mice. *Journal of Parkinson's Disease*. 2013;3:215–29.
 82. Peña-Oliver Y, Buchman VL, and Stephens DN. Lack of involvement of alpha-

- synuclein in unconditioned anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*. 2010;209:234–40.
83. Pasquarelli N, Voehringer P, Henke J, and Ferger B. Effect of a change in housing conditions on body weight, behavior and brain neurotransmitters in male C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research* [Internet]. 2017;333:35–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.018>
84. Paxinos G, and Keith B. F. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier. 2001.
85. Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. In 1968. p. 33–39.
86. Yokoyama H, Kuroiwa H, Kasahara J, and Araki T. Neuropharmacological approach against MPTP mouse model of Parkinson ' s disease. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2011;71:269–80.
87. Li R, and Chen J. Salidroside Protects Dopaminergic Neurons by Enhancing PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019.
88. Zhou H, Niu L, Xia X, Lin Z, Liu X, Su M, Guo R, Meng L, and Zheng H. Wearable Ultrasound Improves Motor Function in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2019;66:3006–13.
89. Ayton S, George JL, Adlard PA, Bush AI, Cherny RA, and Finkelstein DI. The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. *Neuroscience Letters*. 2013;543:105–9.
90. Schapira AH V, Jenner P, and Chaudhuri KR. Non-motor features of Parkinson disease. *Neuroscience*. 2017;18:435–50.
91. Joksimovic J, Selakovic D, Jovicic N, Mitrovic S, Mihailovic V, Katanic J, Milovanovic D, and Rosic G. Exercise attenuates anabolic steroids-induced anxiety via hippocampal NPY and MC4 receptor in rats. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13.
92. Campos AC, Fogaça M V., Aguiar DC, and Guimarães FS. Animal models of

- anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2013;35:101–11.
93. Himanshu, Dharmila, Sarkar D, and Nutan. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. 2020;18:341–51.
 94. Kraeuter AK, Guest PC, and Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1916:69–74.
 95. Shin KS, Zhao TT, Choi HS, Hwang BY, Lee CK, and Lee MK. Effects of gypenosides on anxiety disorders in MPTP-lesioned mouse model of Parkinsons disease. *Brain Research [Internet]*. 2014;1567:57–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.04.015>
 96. Liu P, and Du J. Oridonin is an antidepressant molecule working through the PPAR- γ /AMPA receptor signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*. 2020;180.
 97. Chen YC, Wu JS, Tsai H Da, Huang CY, Chen JJ, Sun GY, and Lin TN. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*. 2012;46:114–24.
 98. Kraeuter AK, Guest PC, and Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1916:99–103.
 99. Jiang PE, Lang QH, Yu QY, Tang XY, Liu QQ, Li XY, and Feng XZ. Behavioral assessments of spontaneous locomotion in a murine MPTP induced parkinson's disease model. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;2019:1–7.
 100. Wang XH, Lu G, Hu X, Tsang KS, Kwong WH, Wu FX, Meng HW, Jiang S, Liu SW, Ng HK, and Poon WS. Quantitative assessment of gait and neurochemical correlation in a classical murine model of Parkinson's disease. *BMC Neuroscience*. 2012;13.
 101. Chen Y, Zhang Y, Li L, and Hölscher C. Neuroprotective effects of geniposide in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology [Internet]*. 2015;768:21–27. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.029>

102. Li C, Zhu Y, Wu Y, Fu M, Wu Y, Wu Y, Qiu Y, Zhang H, and Ding M. Oridonin Alleviates LPS-Induced Depression by Inhibiting NLRP3 Inflammasome via Activation of Autophagy. *Frontiers in Medicine*. 2022;8:1–16.
103. Walia V, Chaudhary SK, and Kumar Sethiya N. Therapeutic potential of mangiferin in the treatment of various neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Neurochemistry International* [Internet]. 2021;143:104939. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104939>
104. Zheng XC, Wu QJ, Song ZH, Zhang H, Zhang JF, Zhang LL, Zhang TY, Wang C, and Wang T. Effects of Oridonin on growth performance and oxidative stress in broilers challenged with lipopolysaccharide. *Poultry Science*. 2016;95:2281–89.
105. Del Rio D, Stewart AJ, and Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2005;15:316–28.
106. Shen LI. Neuroprotective Effect of Kaempferol against a 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011;34:1291–96.
107. Bi Y, Qu PC, Wang QS, Zheng L, Liu HL, Luo R, Chen XQ, Ba YY, Wu X, and Yang H. Neuroprotective effects of alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Pharmaceutical Biology* [Internet]. 2015;53:1516–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.991835>
108. Ralf D. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* [Internet]. 2000;62:649–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030100829900060X>
109. Guo Z, Xu S, Du N, Liu J, Huang Y, and Han M. Neuroprotective effects of stemazole in the MPTP-induced acute model of Parkinson's disease: Involvement of the dopamine system. *Neuroscience Letters*. 2016;616:152–59.
110. Li L, Cheng SQ, Guo W, Cai ZY, Sun YQ, Huang XX, Yang J, Ji J, Chen YY, Dong YF, Cheng H, and Sun XL. Oridonin prevents oxidative stress-induced

- endothelial injury via promoting Nrf-2 pathway in ischaemic stroke. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021;
111. Li T, and Le W. Biomarkers for Parkinson's Disease: How Good Are They? Vol. 36, *Neuroscience Bulletin*. Springer; 2020. p. 183–94.
 112. Lotankar S, Prabhavalkar KS, and Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. Vol. 33, *Neuroscience Bulletin*. Springer Singapore; 2017. p. 585–97.
 113. Yang H-M, Wang Y-L, Liu C-Y, Zhou Y-T, and Zhang X-F. A time-course study of microglial activation and dopaminergic neuron loss in the substantia nigra of mice with paraquat-induced Parkinson's disease. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;164.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra Yiğit, lise eğitimini Gaziantep Ayten Kemal Akınal Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2015 yılında SANKO Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2019 senesinde lisans eğitimini tamamladı. 2020 yılının güz döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.



EKLER



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI



TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	TOPLANTI YERİ
09.11.2021	11	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmacının Başlığı (Türkçe ve İngilizce)	Deneyel Parkinson fare modelinde oridoninin oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi Effect of oridonin on oxidative stress parameters in experimental Parkinson's mouse model
	Başvuru Tarihi	04.11.2021
	Protokol no	226
	Kullanılacak deney hayvanı (tür/ırk/cinsiyet/sayı)	Fare/CS7BL/6/Erkek/18

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2021/56
	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Red Dr. Öğr. Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU'nun yürütücüsü olduğu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, başvurunun Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesince "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Yürütücü	Dr. Öğr. Üyesi Nadide ÖZKUL DOĞRU Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı
Araştırmacılar	Prof. Dr. Seyithan TAYSI, Yüksek Lisans Öğrencisi Kübra YİĞİT

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım	İmza
Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRÜREK (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Emine Elçin EMRE (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	H	E	
Prof. Dr. Can DEMİREL (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	H	E	
Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E	
Doç. Dr. Merve GÖYMEN (Üye)	GAÜN Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti AD.	H	E	
Dr. Öğr. Üyesi Özgür ALTINBAŞ (Üye)	GAÜN Sağlık Hizmetleri MYO, GAÜNDAM Müdürü	H	E	
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Gülbin KAVAK (Üye)	GAÜN Tıp F. Radyasyon Onkolojisi AD., GAÜNDAM Müdür Yrd.	H	E	
Veteriner Hekim Filiz BİÇİCİ (Üye)	GAÜN Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (GAÜNDAM)	H	E	
Veteriner Hekim Celal ÖZSÖYLER (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	E	
Avukat Orhan BEYAZ (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır