



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**6-OHDA İLE OLUŞTURULAN PARKİNSON SIÇAN
MODELİNDE BİR KALSİYUM KANAL BLOKERİ OLAN
İSRADİPİN TEDAVİSİNİN STRİATUMDAKİ NÖRONLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

HATİCE BORACI
DOKTORA TEZİ

ANATOMİ ANABİLİM DALI

PROF.DR. ÜMİT S. ŞEHİRLİ

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş 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.

Hatice BORACI



TEŞEKKÜR

Hayatımda birçok dönüm noktasını yaşadığım doktora sürecim boyunca öncelikle tez hazırlığı sürecim boyunca hiçbir zaman beni geri çevirmeyip, yoğun zamanlarında bile değerli zamanımı ayıran başta Anatomi Anabilim dalı başkanımız, danışman hocam Sayın Prof.Dr. Ümit S. Şehirli`ye şükranlarımı sunarım. Tecrübeleriyle örnek aldığım Prof.Dr. Ömer Özdoğmuş`a, bize departmanında çalışma imkânı sunan ve her daim bilgi danışabilme sıcaklığını gösteren Sayın hocam Prof.Dr. Rezzan Gülhan`a ve anatomideki tüm konuları kolay ve etkili şekilde anlatma yeteneğine hayran olduğum Sayın hocam Dr. Öğr.Üyesi Ural Verimli`ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Anatomi ailesine dahil olduğum ilk günden itibaren öğrenmiş olduğum birçok laboratuvar deneyimi ve bilgiyi bana öğreten, büyük şansım, varlığıyla desteğini hep yanımda hissettiğim, öz ablamdan asla ayıramayacağım, her daim örnek alacağım kıymetli ablam Dr. Öğr.Üyesi Özlem Kirazlı`ya teşekkürlerimi sunarım. Anatomiye geldiğim ilk günden beri her zaman bilgi danışabildiğim, bir abi sıcaklığıyla, yanımda olan abim Sercan Doğukan Yıldız`a, doktora sürecim boyunca birçok paylaşım yapabildiğim, oda arkadaşım sevgili Abdulveli İsmailoğlu`na, bölümümüze geldikleri ilk günden beri sıcacık kalpleri ve öğrenme heyecanı ile dolu dünya tatlısı Sevdener Yazı ve Büşra Sancaklı`ya, kısa dönemli oda arkadaşım sevgili Özlem Güler`e, aramızda hep mesafeler olsa da iyi ki tanışmışım dediğim ve yanımda hissettiğim güzel arkadaşım Elif Zeren ve ablam Sinem Gergin`e teşekkürlerimi sunarım. Destek olan diğer tüm arkadaşlarıma ve aileme çok teşekkür ederim. Sevgimize asla mesafelerin engel olmadığı hayattaki en iyi arkadaşım, canımdan öte, annemin babamın en büyük hediyesi kıymetlim Zehra Boracı`ya, çocukları olmaktan gurur duyduğum ilk öğretmenlerim, nefeslerini her zaman omzumda hissettiğim, idolüm canım annem Nuray Boracı`ya ve eşsiz insan canım babam Ahmet Boracı`ya teşekkürü bir borç bilirim. Hayatıma girdiği günden itibaren tüm sorunlarımda ve mutluluğumda iyi ki hep yanımda dedirten can eşim, hayat arkadaşım Mert Efekan`a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Tezimi en büyük hazinem olan, birçok zorluğun aslında sayelerinde zorluk olmadığını her daim bana hissettiren beni ben yapan canım aileme armağan ediyorum.

Hatice BORACI

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMALAR VE SEMBOLLER LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
3.1 Amaç ve Kapsam	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Parkinson Hastalığı	5
4.1.1 Patolojisi ve Patofizyolojisi.....	6
4.1.2. Etiyolojisi ve Sınıflandırılması.....	8
4.1.3 Teşhis ve Tedavisi	9
4.2 Bazal Çekirdekler ve Anatomisi	11
4.2.1 Bazal Çekirdekler ve Parkinson	19
4.2.2 Bazal Çekirdekler ve Nöron Çeşitleri.....	22
4.3 Parkinson ve Dopaminerjik Nöronlar	25
4.3.1 Parkinson ve Striatal Nöronlar	29
4.3.2 Kalsiyum, Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler ve Kalsiyum Kanalları.....	32
4.3.3 Parkinson ve kalsiyum.....	37
4.3.4 Parkinson ve Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler.....	40
4.3.5 Kalbindin	42
4.3.6 Parkinson Hastalığı ve Kalbindin.....	47

4.3.7 Parkinson Hastalığı ve Kalsiyum Kanalları	49
4.3.8 Parkinson hastalığı ve kalsiyum kanal blokerleri	53
4.3.9 Parkinson Hastalığı ve İsradipin.....	55
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	58
5.1.Kullanılan Deney Hayvanlarının Temini.....	58
5.2 Doku Hazırlama	64
5.3 Parkinson Modeli Oluşturulması.....	64
5.3.1 6-OHDA'nın Hazırlanması	65
5.4 Rotasyon Testi	65
5.5 İsradipin Enjeksiyonu.....	65
5.6 Kan alımı.....	66
5.7 Sakrifikasyon.....	66
5.8 İmmunohistokimya Prosedürleri.....	66
5.8.1 Tirozin Hidroksilaz İşaretleme Protokolü	66
5.8.2 Kalbindin İşaretleme Protokolü.....	67
5.9 Kanda kalbindin düzey tayini için ELISA Prosedürü.....	67
5.10 Mikroskop altında nöron sayımı	68
5.11 Görüntüleme ve Sayım	68
5.12 İstatistik ve Analiz.....	69
6. BULGULAR	70
7. TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	90

KISALTMALAR VE SEMBOLLER LİSTESİ

GABA	Gamma-Aminobütirik Asit
6 -OHDA	6 hidroksi-dopamin
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SNc	Substantia nigra pars compacta
GPI	Globus pallidus pars internus
GPe	Globus pallidus pars externus
STN	Nucleus subthalamicus
ATP	Adenozin trifosfat
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GAD	Glutamik asit dekarboksilaz
VTA	Area tegmentalis ventralis
DOPA	Dihidroksifenilalanin
TH	Tirozin hidroksilaz
PheH	Fenilalanin hidroksilaz
TrpH	Triptofan hidroksilaz
GDNF	Glia kaynaklı nörotrofik faktör
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
DOPAC	3, 4- Dihidroksifenilasetik asit
MSN	Orta dikenli nöron

NMDA-R	N-metil-D-aspartat reseptör
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
P13K/Akt	Fosfatidil-inozitol 3-kinaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
ELİSA	Enzyme-linked immunosorbent assay
TRPC1	Transient Reseptör 1
STIM	Stromal etkileşim moleküller
SOCE	Depo adaklı kalsiyum girişi
DAB	Diaminobenzidin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Bazal Çekirdekler Anatomisi (*TRENDS in Neurosciences Vol.27 No.8 August 2004*)

Şekil 2: Corpus Striatum, (Textbook of Clinical Neuroanatomy, 2.basım, 13.bölüm, Basal Nuclei (Basal Ganglia)'dan alınmıştır.)

Şekil 3: Bazal Çekirdekler ve Thalamus (Sung Joo Lim ve ark., 2014).

Şekil 4: Bazal çekirdekler anatomisi (horizontal kesit) (Netter Atlas'tan alınmıştır.)

Şekil 5: Bazal çekirdekler bağlantıları (İnhibitör ve Eksitator yolaklar) (Mohsin H.K. Roshan ve ark., 2016)

Şekil 6: Bazal çekirdekler, talamokortikal döngü (sağlıklı bir beyin ve Parkinson teşhisi almış olan beyinde inhibitör ve eksitator yolaklar), (Thomas ve Mahlon, 2003)

Şekil 7: Dorsal Striatum (Striozom ve Matriks) ve bağlantıları ('Handbook of Behavioral Neuroscience'), 2016 isimli kitap bölümünden alınmıştır.

Şekil 8: Bazal çekirdekler döngüsünün şematik gösterimi. (Beck ve ark., 2018).

Şekil 9: EF-el motif yapısı (Current Alzheimer Research, 2016)

Şekil 10: Kalsiyum bağlayıcı proteinler ve kalsiyum kanalları ilişkisi (Nejatbakhsh ve Feng, 2011).

Şekil 11: Depo odaklı kalsiyum girişi ve Parkinson hastalığı (Secondo ve ark., 2018)

Şekil 12: Kalbindinin kalsiyum sensör ve kalsiyum tamponlayıcı fonksiyonu 'Calbindin-D28k and its role in apoptosis' isimli kitap bölümünden alınmıştır (Lohmeier Johannes, 2018).

Şekil 13: L tipi kalsiyum kanalları ve Parkinson hastalığında görülen dopaminerjik nöronların dejenerasyonundaki rolü (Gerald W. Zamponi ve ark., 2015).

Şekil 14: Parkinson erken dönem ve geç döneme ait olan sıçanların 5. ve 10. haftalara ait rotasyon testi analizi

Şekil 15: Beyindeki kalbindin düzeyinin kontrol ve lezyon gruplarındaki analizi

Şekil:16: Lezyon öncesi ve sonrasında kandaki kalbindin değerleri

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Kontrol grubuna ait sıçan beyinde striatum bölgesine ait kalbindin pozitif nöronlar (X10)

Resim 2: Parkinsonlu DMSO grubuna ait sıçan beyinde striatum bölgesine ait kalbindin pozitif nöronlar (X10)

Resim 3: Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu alan gruba ait sıçan beyinde substantia nigra pars compacta'daki TH boyanması sonucunda görülen dopaminerjik nöronlar (X40).



1. ÖZET

6-OHDA ile oluşturulan Parkinson sıçan modelinde bir kalsiyum kanal blokeri olan isradipin tedavisinin striatumdaki nöronlar üzerindeki etkisinin incelenmesi

Öğrenci Adı: Hatice BORACI, Danışman Adı: Prof.Dr. Ümit S. ŞEHİRLİ
Program Adı: Anatomi Anabilim Dalı

Amaç: Parkinson hastalığı, başta substantia nigra pars compacta olmak üzere bazal çekirdeklerdeki dopaminerjik nöron kaybıyla karakterize ikinci en sık nörodejeneratif hastalıktır. Etiyolojinde mitokondrial disfonksiyon, oksidatif stres ve intraselüler kalsiyum artışı gibi faktörler öne çıkmaktadır. Kalbindin, kalsiyum kanallarını regüle etmektedir. Bu çalışma, lezyon öncesi ve sonrası kan ve beyindeki kalbindin düzeyi değişimi ve kalsiyum kanal blokeri olan isradipinin, kalbindin üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve yöntem: 6-OHDA, intrakranial stereotaksik yöntemle enjekte edilmiştir. Deneyin birinci kısmında, süreç takibi yapılarak kalbindinin kandaki düzeylerinin değişimi lezyon öncesi, sonrası, 2.,5. ve 10.haftalarda kontrol (sağlıklı) ve lezyonlu gruplarda dekapite edilen beyinlerde, ELİSA yöntemiyle ölçülmüştür. 5. ve 10.haftada ise beyinde kalbindin düzeyi western blot yöntemiyle ölçülmüştür. İkinci kısımda ise, lezyonlu ve kontrol grubuna isradipin (2mg/kg) subkutenöz olarak 4 hafta süresince verilmiştir. 21.günde apomorfin (0.05mg/kg) rotasyon testi uygulanmıştır. Beyin kesitlerine sırasıyla tirozin hidroksilaz ve kalbindin immunohistokimya prosedürleri uygulanmıştır. Veriler, two-way ANOVA post-hoc Tukey test in Graph-Pad PRISM 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: 5.haftadaki beyinlerde kalbindin düzeyinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Parkinsonlu isradipin grubuna ait sıçanlarda kalbindin kan düzeyinde Parkinsonlu olup herhangi bir enjeksiyon yapılmayan gruba kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p=0.04$), rotasyon sayısı anlamlı azalmıştır ($p=0,02$). 6-OHDA grubunda lezyon öncesi 2.saat ve 2.hafta arasındaki kan kalbindin düzeyinde ise anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p=0.028$)

Sonuç: Kalbindinin lezyon sonrası kanda ve beyinde azalışı klinik çalışmalara teşhis için ışık tutmaktadır. Ayrıca, isradipinin ise kanda kalbindin düzeyine etki edebildiğini yaptığımız bu çalışma ile ortaya koymaktayız.

Anahtar kelimeler: Parkinson, kalbindin, isradipin, striatum

2. SUMMARY

The effect of a calcium channel blocker, isradipine, on calbindin blood levels and calbindin positive neurons in the striatum of Parkinsonian rats lesioned with 6-OHDA

Student Name: Hatice BORACI, Name of Supervisor: Prof. Dr. Ümit S. ŞEHİRLİ
Program Name: Anatomy Department

Objective: Parkinson's disease (PD) is characterized by loss of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. In the pathology, imbalance of the intracellular calcium level may appear as a consequence of abnormality related to calcium-binding proteins like calbindin. We examined the time-dependent change of calbindin and the effect of a calcium channel blocker, isradipine, on the blood level of calbindin and neurons.

Material and method: 6-OHDA was injected into the rat brains. For the first part of experiment, control and lesioned groups were inspected during the 2nd, 5th, and 10th weeks. Calbindin blood level was assessed by the ELISA method. The calbindin level in the brain was measured by western blot method. For the second part, the rats were treated with isradipine(2mg/kg). Brains were immunohistochemically stained by tyrosine-hydroxylase and calbindin. The results were analyzed by Graph-Pad PRISM 6.0.

Results: The calbindin level in the brain of 6-OHDA group decreased compared to the control group in the 5th week ($p<0.05$). The number of rotations was significantly lower ($p=0,02$) in the treatment group. The calbindin blood level of the treatment group was also ($p=0.04$). The calbindin blood level of the lesioned groups between the periods (2 hours before and 2 weeks after the lesion) showed a significant decrease ($p=0.028$).

Conclusion: To summarize, this study put forth that the amount of calbindin in the brain and blood calbindin level may show a decrease in the early stage of PD. The mechanism of action of isradipine upsurges the calbindin levels which in turn may improve the pathology of PD.

Keywords: Parkinson, calbindin, isradipine, striatum

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3.1 Amaç ve Kapsam

Parkinson hastalığı, dopaminerjik nöronların özellikle nigro-striatal sistemde progresif dejenerasyonu ve dopamin eksikliğiyle karakterize nörolojik bir hastalıktır. Nigro-striatal sistemde etkilenen yapılar substantia nigra pars compacta (SNc) ve striatum başta olmak üzere bazal çekirdeklerdir (Kabuto ve Yamanushi, 2011).

Parkinson hastalığının semptomlarının görülebilmesi için substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöron kaybının en az %60-80 civarında olması gerekmektedir. Bu tablo da bize hastalığın belirti göstermeden çok daha önce ortaya çıktığını göstermektedir (de Lau LM ve ark., 2006). Parkinson hastalığının teşhisi ancak motor belirti ve bulgular ortaya çıktıktan sonra konulabilmekte ve MR görüntüleme ile hastalığın beyinde yaptığı hasara yönelik bulgular elde edilebilmektedir.

Literatürde, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin nörodejeneratif hastalıklardaki nöroprotektif rolleri hakkında birçok araştırma mevcut olmasına karşın, konu halen netlik kazanmamıştır. Kalsiyum bağlayıcı proteinler arasında yer alan *kalbindin ve kalretininin* eksprese oldukları nöronları nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdikleri yönünde bilgiler mevcuttur (Choi ve ark., 2005).

Çalışmalar genel olarak nöronlar üzerine odaklanmıştır ve bu proteinlerin hayvan deneyleri çalışmalarında kan düzeyleri ile ilgili çalışmalar çok azdır. Nöronlarda önemli koruyuculuğu olduğu düşünülen bu kalsiyum bağlayıcı proteinlerin kandaki düzeylerinin de değişim gösterebileceği düşüncesindeyiz. İsradipinin etki mekanizması net olarak tanımlanamamakla birlikte, kanalları bloke ederek kalsiyumun hücre içine girişini inhibe ettiği ve dopaminerjik nöron dejenerasyonu için nöroprotektif olabileceği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Guzmann ve ark., 2018).

Son yıllarda, Parkinson hastalığının patolojisinde yer alan L tipi kalsiyum kanallarının regülasyon bozukluğu ve bu kalsiyum kanallarını bloke edici ajanların nöroprotektif etkiye sahip olabileceği deneysel çalışmalarda gösterilmiş fakat faz 3 çalışmasında

isradipin isimli kalsiyum kanal blokerinin motor bulgular üzerinde hastalarda koruyucu bir etkisi gösterilmediği de ortaya koyulmuştur. Bu başarısız şekilde sonuçlanan faz 3 çalışması sonrasında, takip edilen hastalarda isradipin kullanan hasta grubunda levo-dopa kullanım dozunu bir miktar azalttığı gösterilmiştir. Doz ve yaşa bağımlı olarak değişim gösterebileceği savunulmuştur (Venuto ve ark., 2021).

Kalsiyum bağlayıcı proteinler arasında yer alan kalbindinin de kalsiyum kanallarının regülasyonunda etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur (Xu ve ark., 2014). Bu bilgiler doğrultusunda isradipin kullanarak L tipi kalsiyum kanalları ve kalbindin arasındaki etki mekanizmasını da gözlemlemek amacıyla bu çalışmamızı planladık. Literatürdeki çalışmalar, dopaminerjik nöron ateşlenme mekanizmasında, özellikle Cav 1.3 ve Cav 1.2 isimli kalsiyum kanalların ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda çalışmamızda, bu kanalları bloke eden isradipin isimli ajanı kullanmayı amaçlamış bulunmaktayız.

Çalışmamızda, Parkinson hastalığının seyri süresince kalbindin kan düzeylerinin dejenerasyon sürecinin takibi için klinikte bir belirteç olarak kullanılabilmesi ve teşhis için yardımcı bir parametre olabileceği amacındayız. Kalbindin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin hücre düzeyinde ekspresyonu nörodejeneratif hastalıklarda çalışılmış olsa da kan serum düzeyi ile ilgili çalışmalar literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, hücresel düzeyde oluşan bu belirgin değişikliklerin kan serum seviyesinde tespit edilebilir bir değişikliğe neden olup olmadığını araştırmak ve kalbindin isimli kalsiyum bağlayıcı proteinin kalsiyum kanallarıyla bağlantısını ortaya koyarak, literatüre Parkinson hastalığına yönelik deneysel ve klinik çalışmalara ışık tutabilecek bir bakış açısı kazandırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, 1817 yılında ilk kez bir nörolojik sendrom olarak James Parkinson tarafından tıbbi olarak tanımlanmıştır (Tyler., 1992). Erkeklerde, kadınlara oranla daha sık görülmekle beraber, 65 yaş üstündeki prevalansı 100,000 kişide 1680 kişi şeklindedir (Rielde ve ark., 2016).

Parkinson hastalığının teşhisinde esas olarak rijidite, tremor, bradikinezi ve postüral instabilite ön plana çıkmaktadır (Cacabelos ve ark., 2012). Parkinson hastalığı'nın tedavisinde 1960'lerde başlanarak kullanılan levodopa (L-DOPA), günümüzde de klinikte tercih edilen en etkili ilaçtır (Katzenschlager ve ark., 2002).

Dopaminerjik nöronların özellikle nigro-striatal sistemde progresif dejenerasyonu ve dopamin salınımının azalmasıyla karakterize nörolojik bir hastalıktır. Parkinson hastalığı dünya genelinde ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalık olmakla beraber prevalansında yaklaşık olarak %0,3 olup, yaşla birlikte artış göstererek, 80 yaş üstünde %3 olabilmektedir (Pringsheim, T ve ark.,2014).

Parkinson hastalığı, dünyanın en hızlı şekilde ilerleyen nörodejeneratif hastalığı olup, araştırmalar ve tahminler doğrultusunda 2040'a kadar dünya çapında yaklaşık toplam olarak 12 milyon kişiyi etkileyecektir (Dorsey ve ark., 2018).

Deneysel Parkinson hayvan modellerinde genellikle 6-ohda ve MPTP kullanılmaktadır. Parkinson sıçan modellerinde yaygın olarak kullanılan 6-hidroksi dopamin (6-OHDA) lezyonu sonrasında, yaklaşık 8. haftada hücresel seviyede kompensatuar mekanizmalar gelişirken, 10. hafta sonrasında nöron kaybı gözlemlenen bölgelerde iyileşme görülebildiği de gösterilmiştir. 6-OHDA, süreç takibi yapılan deneylerde tercih edilen önemli bir ajandır (Grandi ve ark., 2018).

4.1.1 Patolojisi ve Patofizyolojisi

Parkinson patogenezinde, dopaminerjik nöronların hasarlanmasında etkili birçok mekanizmadan bahsedilir. Mitokondrial disfonksiyon, oksidatif stres ve intraselüler kalsiyum artışı bu mekanizmalar içerisinde öne çıkmaktadır. Endoplazmik retikulumdaki stres ve proteazom sistemindeki değişiklikler de Parkinson patogenezinde rol oynamaktadır (Michel ve ark, 2016; Ottolini ve ark, 2013).

Substantia nigra pars compacta'da görülen dopaminerjik nöron kaybı ve Lewy cisimciklerinin varlığı bu hastalığın ana patolojik özellikleri arasında yer almaktadır (Wakabayshi ve ark., 2013). Lewy cisimcikleri, nöronlarda bulunan yuvarlak özonofilik inklüzyonlardır ve 90 çeşit protein içermektedirler. Ana komponentleri alfa synüklein ve ubikitindir.

Alfa synüklein yanlış katlanmalar oluşturabilir ve çözünemeyebilir, bundan dolayı intraselüler inklüzyonlar oluşturabilir (Spillantini ve ark., 1997). Lewy cisimcikleri ve nöritleri, alfa synuclein, parkin ve synphilin-1 proteinlerinin birikimi sonucudur. Alfa synuclein striatum ve thalamus'taki nöronların mitokondria'larında eksprese olmaktadır.

Mitokondria, endoplazmik retikulumla birlikte, somoto-dendritik kalsiyum seviyesini kontrol eder (Kornmann ve ark., 2009). Ayrıca, sinir iletimini düzenleyebilmek için, presinaptik terminallerde kalsiyum tamponlama fonksiyonunu da regüle etmektedir (Vaccaro ve ark., 2017). Mitokondri'nin düzgün şekilde çalışmasının devamlılığı büyük bir önem taşımaktadır ve etkili kontrol mekanizmalarına ihtiyaç duymaktadır ki bu mekanizmalar kompleks nöron morfolojisiyle ilişkilendirilir (Rugarli ve Langer, 2012).

Mitokondrial disfonksiyon bazen esas neden olarak karşımıza çıkmasa da nöron ölümü görülen klinik tablolarda nedenler arasında sayılabilmektedir. Oksidatif fosforilasyonla sonuçlanabilen respiratuar zincir kompleks yapısının aktivite bozukluğu ve ATP üretimindeki problemler mitokondrial disfonksiyon olarak ortaya çıkabilmektedir.

Respiratuar zincirdeki eksiklik Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Amiyotropik Lateral Skleroz gibi hastalıkların tanısını almış kişilerde görülmektedir (Golpich ve ark., 2017). Apoptozun rolü, Parkinson hastalarındaki post mortem beyinlerdeki çalışmalarda ve deneysel Parkinson modellerinde (gen mutasyonları ve nörotoksik ajanlarıyla lezyon oluşumu) araştırılmıştır ve öne çıkmaktadır (Erekat ve ark., 2018). Nekroz, nekroptoz ve partanatoz gibi hücre ölümlerinde kanıt olarak ortaya koyulmuştur (Yuan ve ark., 2019).

Parkinson hastalığı olan post-mortem beyinlerde otofajik yollarda düzensizlik gözlemlenmiştir (Venderova ve ark., 2012). Bazı çalışmalar alfa synuclein birikiminin bağırsaklarda başlayabileceğini ve sonrasında mikrobiyata'dan etkilenebileceği gösterilmiştir (Klingelhoefer ve ark., 2015).

Parkinson hastalığında özellikle Lewy cisimciklerinde bulunan alfa synuclein ile ilgili mutasyonların görülmesi üzerine, genetik mutasyonlar üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. PARK olarak isimlendirilen kromozomal bölge, lokus tanımlanmıştır. Bir kısmı otozomal dominant kalıtımda (SNCA (PARK1 ve 4), LRRK2 (PARK8)); bir kısmı da otozomal resesif kalıtımda PINK1 (PARK6), DJ-1 (PARK7), ATPaz tipi 13A2 (ATP13A2/PARK9) sorumludur (Klein C ve ark., 2012).

Parkinson hastalığı patolojisinde, genomik faktörler, epigenetik değişimler, toksik faktörler, oksidatif stres anomalileri, nöroinflamatuvar reaksiyonlar, hipoksik iskemik durumlar, metabolik eksiklikler ve ubiquitin proteazom disfonksiyonları nöropatolojik fenotipler olarak sayılabilir (Cacabelos ve ark., 2017).

Parkinson hastalığı, globus pallidus externa'daki nöronların aktivitesi azalması kaynaklı hastalığa özgü belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Buna etki eden nucleus subthalamicus'taki nöronların artmış deşarjıdır. Rijidite ise substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöron kaybı ile kortiko-spinal motor sistemin striatum tarafından aşırı uyarılması sonrasında karşımıza çıkmaktadır (Schiffmann ve ark., 2007). Mitokondrinin fonksiyonlarındaki değişimler ve bozuklukların substantia nigra pars compacta'da görülen dopaminerjik nöron kaybıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu doğrultuda, spinocerebellar ataksi görülen vakalarda, mitokondrial disfonksiyonuna karşı hassasiyetleri ve Parkinson'a özgü belirtileri rapor edilmiştir (Tzoulis ve ark., 2013).

4.1.2. Etiyolojisi ve Sınıflandırılması

Parkinson hastalığının erken safhasında, teşhisinde belirleyici motor bulgular bulunmamaktadır. Literatürdeki çalışmalar, hastalıktaki biyobelirteç geliştirme girişimleri için beyin omurilik sıvısı, kan, idrar testleri, tükürük analizleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Parnetti L ve ark., 2013). Birkaç çalışmada, Alzheimer ve Parkinson hastalarında, serumda düşük vitamin D seviyeleri gözlemlendiğinden ve biyobelirteç olabileceği savunulmuştur fakat sonrasındaki çalışmalarda bu şekilde kesin sonuçlara varılamamıştır (Giulia Bivonaa ve ark., 2019).

Beyin omurilik sıvısında, Alzheimer hastalarında T-tau (neurodegeneration), P-tau (tau hiperfosforilasyon) ve amyloid metabolizmasında bulunan Ab42 ise hem Parkinson hem Alzheimer'da biyobelirteç olabilmektedir (Santos ve ark., 2012). 1970'li yıllarda 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 1-methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidine (MPPP) maruziyeti sonrasında dopaminerjik nöron kaybı ve Parkinsonizm tablosuyla karşılaşmıştır (Langston ve ark., 1983).

İlerleyen çalışmalarda, kompleks 1 denilen oksidatif fosforilasyonun komponentini inhibe ederek nörodejenerasyon oluşturduğu gösterilmiştir (Javitch ve ark., 1985; Nicklas ve ark., 1985; Ramsay ve Singer, 1986). Kompleks 1 eksikliği Parkinson'lu hastaların beyin ve iskelet kaslarında gözlemlenmiştir (Schapira ve ark., 1990;).

Parkinson hastalığının etiyolojisinde birçok faktörden bahsedilmektedir. Genetik özellikler, çevresel ajanlar ve yaş faktörleri nörodejeneratif hastalıkların progresyonu ve oluşumuyla ilişkili olabilmektedir. Bu faktörler arasında en büyük risk faktörü yaşlanma olarak ortaya koyulmuştur çünkü yaşlılıkla birlikte hastalığın prevalansında keskin bir artış gözlemlenmiştir (Collier ve ark., 2011).

Yaşlılık birçok dopaminerjik sistemin nörokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Dopamin sentezindeki değişiklikler, reseptör duyarlılığındaki değişiklikler kaynaklı santral sinir sistemindeki diğer nöronlara kıyasla nigrostriatal yolak üzerindeki nöronların hasarlanmaya karşı daha hassas olması ve metabolik değişimler şeklinde sayılabilmektedir. Yaşlanmayla bağlantılı değişiklikler dopaminerjik sistemin nörotoksik ajanlara karşı direncini azaltmaktadır (Lotti ve ark., 2002).

Parkinsonlu hastalarda, DJ-1(oksidatif stress), lizozomal enzimler ve NF-L (aksonal hasar göstergesi) de belirteç olarak teşhiste kullanılabilir. Parkinson hastalarında, beyin omurilik sıvısındaki toplam α -synucleindeki artışın, kognitif fonksiyondaki azalmayla korele olduğu gösterilmiştir (Hall S ve ark.,2015).

Dejeneratif hastalıklarda karşımıza çıkan Lewy cisimcikleri ve alfa synuclein birikimi gibi bulguların patogenezindeki artmış kalsiyumun esas etkenlerinden biri olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Nöronlardaki kalsiyumun tamponlanmasını sağlayan, kalsiyum dengesini düzenleyen kalsiyum bağlayıcı proteinleri, nöroprotektif rol oynamaktadır. Nigro-striatal yolak üzerindeki kalbindin pozitif dopaminerjik nöronların incelendiği bir çalışmada, lezyon oluşumu sonrası sağlam kalan dopaminerjik nöronların kalbindin eksprese ettiğini ve kalbindinin nöronların hasara karşı direncini artırdığı ortaya koyulmuştur (Yamada ve ark, 1990).

4.1.3 Teşhis ve Tedavisi

Birçok alternatif tedavi girişimleri ve hastalığın seyrini modifiye edici terapatik yaklaşımlar geliştirilmesine karşın, Parkinson hastalığının semptomlarına yönelik klinikte herhangi bir tedavi bulunamamıştır. Bu amaçla kliniğe yönelik yapılan Parkinson modeli oluşturulan hayvan deneyi modelleri bu şekilde tedavi edici yaklaşımlar geliştirebilmek için çok önemli basamak oluşturmaktadır. Kullanılan hayvan modelleri sentetik ajanlar veya kimyasalların verilmesiyle, Parkinson'la ilişkili mutasyonlar veya alfa synuclein gibi protein birikintilerinin oluşturulmasıyla genetik modeller oluşturularak kullanılmaktadır (Dawson ve ark., 2018).

Parkinson hastalığının tedavisindeki farmakolojik girişimler içerisinde striatum'da dopamin replasmanı, terapinin en önemli komponentini oluştururken, hastalığın progresif seyri süresince motor ve motor olmayan semptomlar yoğunlaşarak yaşam kalitesini azaltmaktadır. Progresyonu yavaşlatacak bir tedavi bulunamamıştır (Kalia ve ark., 2015).

Parkinson hastalığında görülen psikomotor disfonksiyonlarda semptomlara yönelik klasik terapi yaklaşımları arasında farmakoterapi, derin beyin stimülasyonu ve fizyoterapi bulunmaktadır (Katzenschlager ve ark., 2002).

Dopamin prekürsörüne (L-DOPA) ilaveten Parkinson hastalığı için diğer semptomatik tedaviler dopamin agonistleri (amantadine, apomorphine, bromocriptine, cabergoline, lisuride, pergolide, pramipexole, ropinirole, rotigotine), monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri (selegiline, rasagiline) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) inhibitörleri (entacapone, tolcapone) de kullanılmaktadır (Oertel ve Schulz., 2016).

L-DOPA'nın uzun süreli kullanımın başlıca komplikasyonu doz sonunda yaşanan kötüleşme, motor dalgalanmalar ve diskinezi (L-dopa ve dopamin agonistlerinin birlikte kullanımındaki gibi) şeklinde görülebilmektedir (Carrera ve ark., 2016).

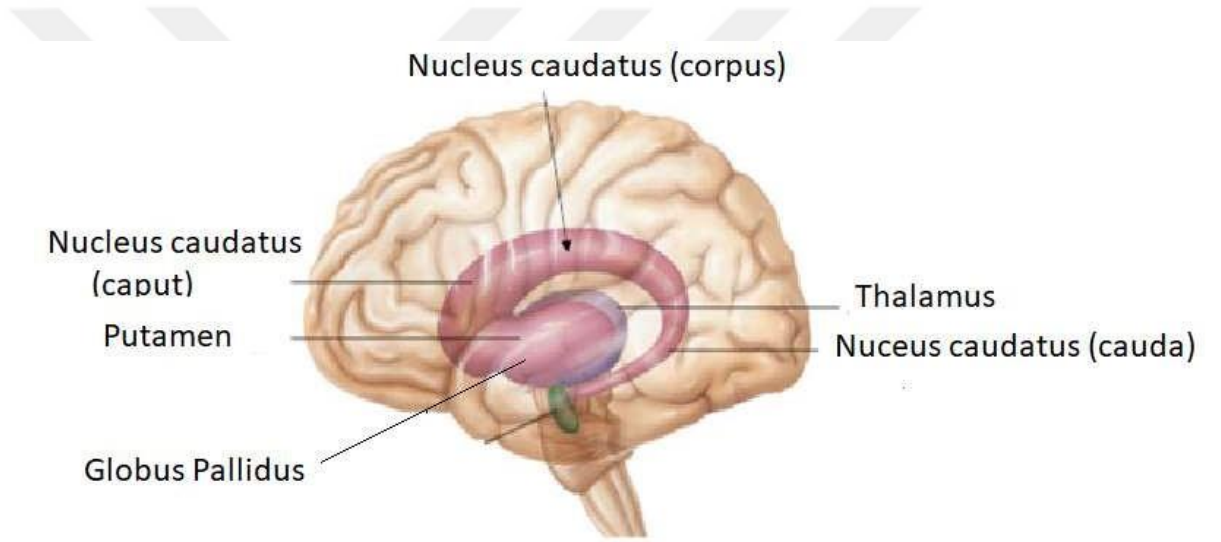
Dopaminerjik olmayan farmakolojik yaklaşımlar bu şekilde görülen komplikasyonlara karşı geliştirilmiştir ve yeni L-dopa formülasyonları, COMT inhibitörleri, adenozin A2A antagonistleri, glutamaterjik NMDA antagonistleri, serotonerjik ajanlar (eltoprazin) ve metabotropik glutamat reseptör 5 modülatörleri ise tam ters etki yaratabilmektedir (Cacabelos ve ark., 2012).

Antidepresanlar, antipsikotikler, ürolojik ilaçlar, analjezikler, antihistaminikler ve kolinesteraz inhibitörleri Parkinson hastalığındaki antikolinergik yüklenmeyle birlikte ciddi komplikasyonlar oluşturabilmektedir (Lertxundi ve ark., 2015).

Günümüzde, çeşitli farmakoterapiler, Parkinson hastalığının tedavisine yönelik araştırmalarda karşımıza çıkmaktadır. Bunlar kalsiyum kanal inhibitörleri (isradipin), protein fosfataz modülatörleri ve demir şelasyon terapileri (deferipron) gibi farklı ajanlardır (Guzman ve ark., 2018). Ancak bu girişimlerden hiçbiri klinik kısımda tedavi protokolleri içerisinde dahil edilememiştir (Martin ve Bastida ve ark., 2017).

4.2 Bazal Çekirdekler ve Anatomisi

Motor hareketlerin başlatılması ve planlanmasında görevli olan bazal çekirdekler düzgün hareketin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Telencephalon'da yer alan bazal çekirdekler içinde yer alan yapılar nucleus caudatus ve nucleus lentiformis (putamen ve globus pallidus)'tir. Limbik sistem içinde ele alınan bölgeler ise nucleus accumbens, amygdala, nucleus septales ve nucleus basalis Meynert ve tam olarak fonksiyonu bilinmeyen claustrum bazal çekirdeklere dahil olabilmektedir (Arash ve Jori, 2018).

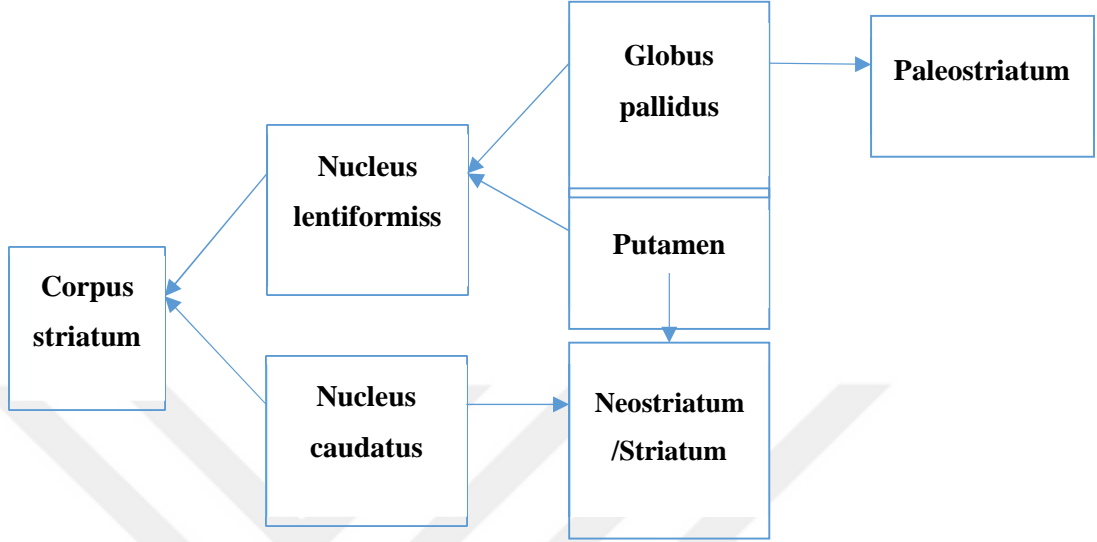


Sekil 1: Bazal Çekirdekler Anatomisi (TRENDS in Neurosciences, 2004'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Bazal çekirdekler, kaba motor hareketlerin koordinasyonunda, postür kontrolünün sağlanmasında, iskelet kas hareketlerinin başlatılması ve planlanmasında önemli fonksiyona sahiptir. Medulla spinalis ile birlikte direk bağlantısı olmadığından, etkisini thalamo-kortikal yol aracılığıyla yapmaktadır.

Klasik nöroanatomi eğitiminde bazal çekirdekler 2 çekirdek olarak sınıflanmaktadır fakat klinik ve fonksiyonel yönden 5 temel çekirdekten oluşur. Globus pallidus,

putamen, nucleus caudatus, substantia nigra ve nucleus subthalamicus olarak sayılabilmektedirler. Son yıllarda limbik sisteme dahil olan corpus amygdala ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen claustrum dahil edilebilmektedir (Şekil 2).



Sekil 2: Corpus Striatum, Textbook of Clinical Neuroanatomy, 2004'ten değiştirilerek kullanılmıştır

Bazal çekirdeklere ait kısımlar, telencephalon, mesencephalon ve diencephalon olmak üzere 3 kısımda incelenebilir. Filogenetik olarak ise bu bölgeler paleostriatum, neostriatum ve archistriatum'dur.

*Paleostriatum (Globus pallidus): telencephalon'da yer alır.

*Substantia nigra (mesencephalon'da yer alır.)

*Neostriatum (Nucleus caudatus + putamen): telencephalon içerisinde yer alır.

Bazal çekirdeklere bilginin girişi striatum aracılığıyla sağlanırken, bilgi çıkışı ise globus pallidus pars interna ve substantia nigra pars reticulata aracılığıyla sağlanmaktadır. Corpus striatum'a dahil edilen nucleus caudatus C şekilli bir gri madde kitlesidir ve bazal çekirdeklerin en büyüğü olup caput, corpus ve cauda olarak

3 kısımda incelenir. Caput nuclei caudati, lateral ventrikül'ün cornu frontale'sinin lateral duvarını oluşturup, ventrikül içine doğru çıkıntı yapmaktadır (Arifoğlu, 2021).

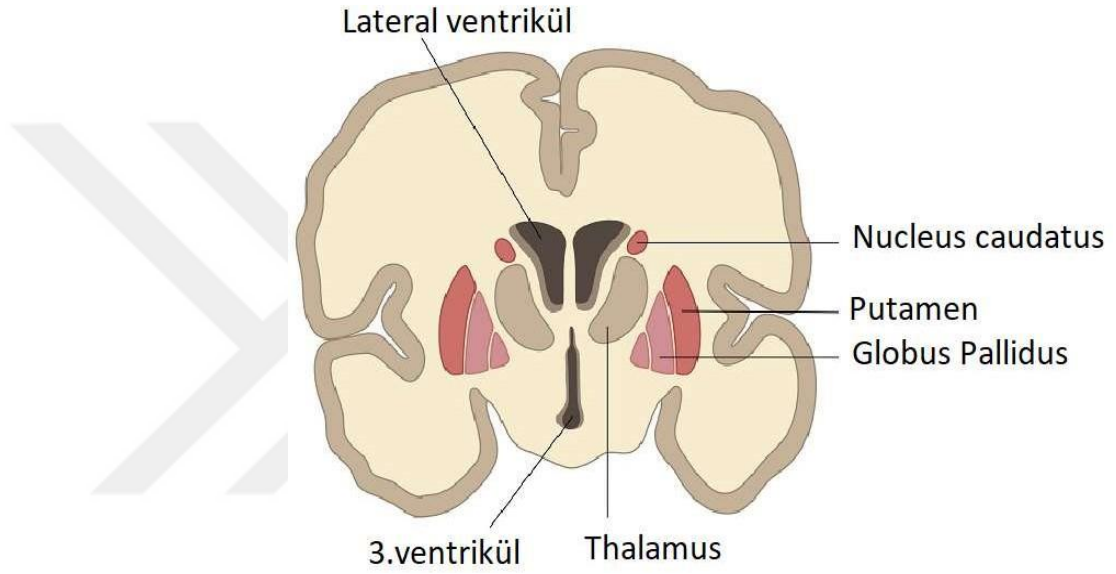
Arkada foramen interventriculare hizasında, corpus kısmı ile uzanır. Thalamus ve nucleus caudatus'un corpus kısmı arasında bir oluk oluşur. Bu olukta v. thalamostriata ile stria terminalis yer alır. Cauda isimli kısmı ise corpus amygdaloideum'a bağlanır. Bu fonksiyonel bir bağlantı değildir. Nuc.lentiformis, insula'nın derininde yer alır ve thalamus'un lateralinde bir gri madde kitesidir. Thalamus ve nucleus caudatus'tan capsula interna aracılığıyla ayrılmaktadır (M. Yıldırım, 2016).

Lamina medullaris lateralis isimli beyaz cevher tabakası ile birlikte içte daha soluk renkte olan globus pallidus ve dışta koyu renkte olan putamen isimli 2 bölüme ayrılır. Putamen ve nucleus caudatus birlikte striatum (neostriatum)'u meydana getirerek bilgi girişini sağlar. Globus pallidus ise bazal çekirdeklerin esas efferent nöronlarını içerir ve thalamus'a inhibitör projeksiyonlar gönderir. Embriyolojik olarak diencephalon orijinlidir. Lamina medullaris medialis ile medial ve lateral olarak 2 bölüme ayrılır. Medialde globus pallidus medialis (pars interna) ve lateralde globus pallidus lateralis (pars externa) olarak isimlendirilirler (Fazl ve Fleisher, 2018).

Pallidus'un önünde ve yakın komşuluğunda nucleus basalis meynert isimli çekirdek mevcuttur ve bu çekirdek içerisinde esasen asetilkolinergik nöronlar bulunmaktadır. Alzheimer hastalığında en çok nöron kaybının görüldüğü yerlerden biridir. Nucleus accumbens, nucleus caudatus ve putamen'in ön tarafında septum pellucidum'un tabanında birleşmesiyle oluşan, striatum'un ventral kısmına dahil edilebilen bir yapıdır. Bazal çekirdekler ve limbik sisteme ait yapılar arasında bağlantı kurar ve psikomotor olayların oluşmasını sağlar.

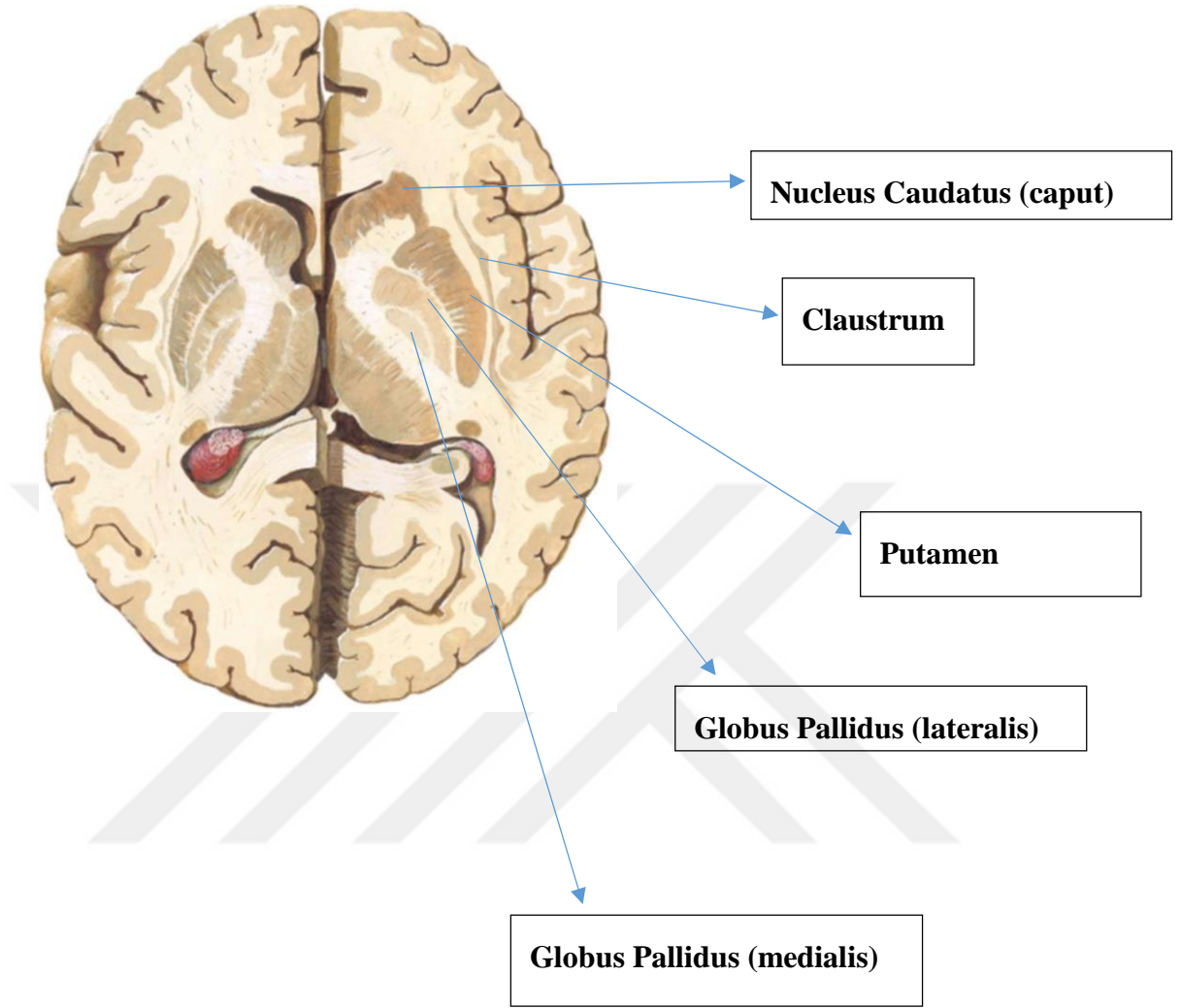
Psikiyatrik hastalıkların oluşumunda etkili olduğu söylenen nucleus accumbens, area tegmentalis ventralis (mezolimbik dopamin sistemi) ile birlikte özellikle bağımlılığın oluşumuna katıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (M. Yıldırım, 2016). Corpus amygdaloideum (amygdala), temporal lob'ta hippocampus'un ön ucunda bulunmaktadır ve tüm ana çıkış istasyonu nucleus centralis'tir. Bazolateral çekirdek grubu, karşılıklı olarak birçok sensoriyel assosiasyon alanları ve nucleus centralis aracılığıyla hippocampus ve thalamus ile bağlantı halindedir.

Bazolateral çekirdek grubundan çıkan efferent lifler, striatum'a ulaşmaktadır. Area septalis, septum pellucidum, stria diagonalis ve nucleus septales'ten oluşmaktadır. Commissura anterior'un önünde ve septum pellucidum'un altında çok sayıda çekirdek gruplarından oluşmaktadır. Limbik sistemin bir yapısı olduğundan dolayı hippocampus, thalamus, hypothalamus ve beyin sapı ile karşılıklı bağlantılara sahiptir (Şekil 4).



Sekil 3: Bazal Çekirdekler ve Thalamus, koronal kesit. (Sung Joo Lim ve ark., 2014'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Nucleus subthalamicus, subthalamus'un en büyük gri madde kütleli olup, ön kısımda bulunur. Cortex cerebri ve bazal çekirdeklerden afferent lifler alır. Glutamaterjik (eksitator) projeksiyonlarını globus pallidus ve substantia nigra'ya göndermektedir. Bazal çekirdeklerin bağlantısında kilit ve merkezi bir rolde olup, substantia nigra'nın rostral bir uzantısı olarak kabul edilir. Hasarında kontralateral tarafta hemiballismus meydana gelebilmektedir (Sung Joo Lim ve ark., 2014)



Sekil 4: Bazal çekirdekler anatomisi (horizontal kesit). (Netter Atlas, 2014'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Substantia nigra, mesencephalon'da bulunan en büyük gri madde kitlesidir. SN'nin pars compacta ve pars reticularis isimli iki önemli bölümü vardır. Pars compacta dorsal kısım olup, dopaminerjik nöronlardan meydana gelir. Pars reticulata ise ventral kısmı olup, GABAerjik nöronlardan oluşur.

GABA bilindiği üzere inhibitör nörotransmitter özelliğine sahiptir fakat D1 ve D2 reseptörlerine bağlandığı zaman ise eksitator etki de gösterebilmektedir.

Direkt yolda striatal nöronlar üzerine eksitasyon etki oluştururken, indirekt yolda inhibituar etki oluşturmaktadır (M. Yıldırım, 2016).

Bazal çekirdekler, fonksiyonel olarak 3 kısımda incelenmektedir. Bilgi girişinin olduğu bölgeler, striatum, nucleus accumbens ve tuberculum olfactorium'dur. Cortex cerebri, thalamus ve substantia nigra pars compacta'dan afferent lifler almaktadırlar. Bilgi çıkışının olduğu bölgeler ise globus pallidus pars interna ve substantia nigra pars reticulata'dır. Bu çekirdekler, thalamus üzerinden kortekse lifler göndermektedir. Bu iletim kortiko-bazal çekirdekler-thalamo-kortikal döngü şeklinde tanımlanmaktadır. Diğer grup ise bilgi girişi ve çıkışının olduğu bölgeler arasındaki kısımda olan globus pallidus pars externa, nucleus subthalamicus ve substantia nigra pars compacta'dır (Fazl ve Fleisher, 2018).

Bazal çekirdeklere gelen bilgi girişi striatum (nucleus caudatus ve putamen) aracılığıyla meydana gelirken, bilgi çıkışı ise globus pallidus'un internal bölümü ve substantia nigra tarafından sağlanır. Striatum'a farklı kortikal ve subkortikal bölgelerden impuls gelmektedir. Globus pallidus'un internal bölümü ise thalamus'a (VA ve VL) inhibitör impuls gönderir ve talamo-kortikal yol aracılığıyla premotor veya motor alana ulaşır. Bunun sonucunda, iskelet kaslarının aktivasyonu piramidal sistem yoluyla gerçekleşir. Bazal çekirdekler, hareketlerin başlama kararının alınması ve hareketin büyüklüğü, duyguların motor hareketle dışa vurumu gibi fonksiyonların yerine getirilmesinde etkindir. Striatum ile substantia nigra arasında nigrostriatal ve striato-nigral olarak karşılıklı bağlantı bulunur. Globus pallidus ve nucleus subthalamicus arasında da karşılıklı bağlantı fasciculus subthalamicus aracılığıyla yapılmaktadır.

Ayrıca striato-pallidal bağlantılar ile korteksten gelen bilgilerin indirekt yol aracılığıyla globus pallidus'a aktarılmasını sağlayan kortiko-striato-pallidal isimli bir yol bulunur (Arash ve Jori, 2018).

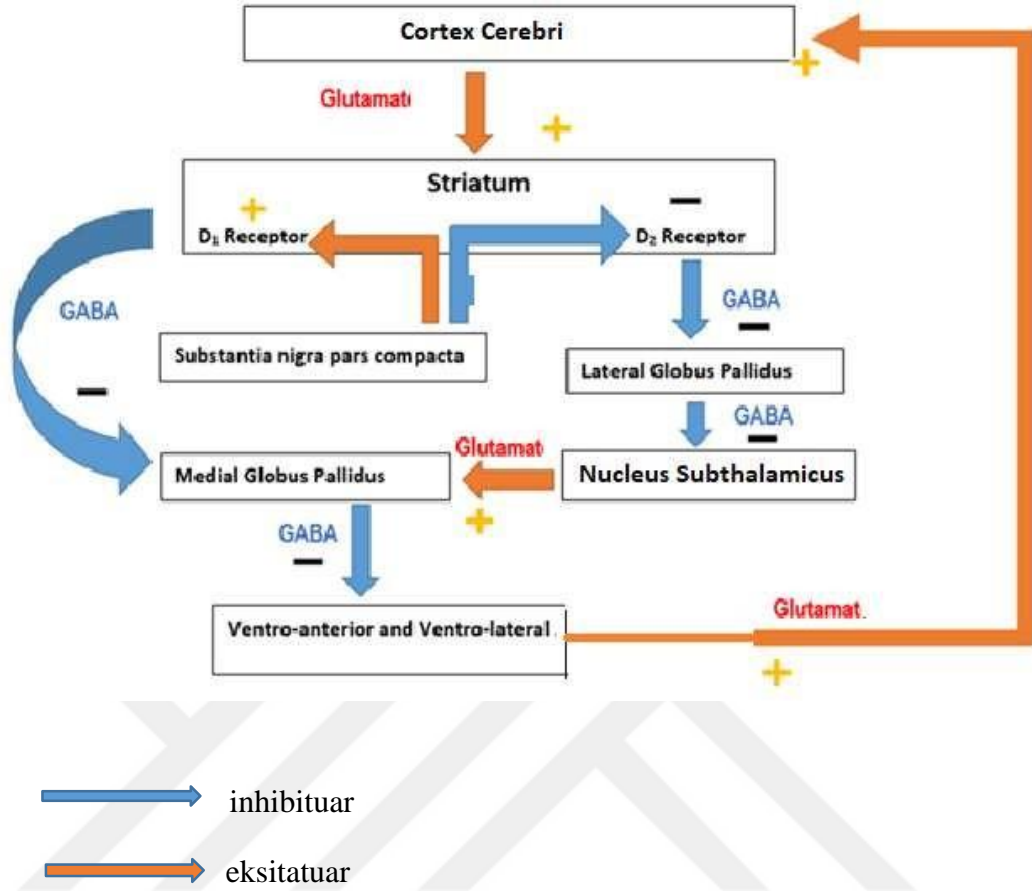
Direkt yol üzerinde korteks'ten striatum'a gelen uyarılar, striatum'daki inhibitör nöronların uyarılmasına neden olur ve sonrasında globus pallidus pars interna'ya artmış inhibituar bir etki yaratır.

GPI'den thalamus'a azalmış inhibituar bir etki yaratarak, premotor korteks'e eksituar bir projeksiyon göndermektedir (Wichmann ve ark., 2003).

Direkt yol, premotor korteksteeki tonusu uyacak eksitasyonu oluşturur ve hareketin planlanması ve başlanması için uyarı oluşturur. İndirekt yol, korteksten gelen eksituar etkiye inhibisyon oluşturur ve böylelikle GPe'deki inhibitör projeksiyonu fasilite eder. Striatum'daki inhibitör nöronlar, globus pallidus'un eksternal bölümündeki ek GABA nöronlarına projekte olur ve onları inhibe eder. Globus pallidus'un GABA aksonları nucleus subthalamicus'a projekte olmaktadır (Wichmann ve ark., 2003).

Bu oluşan disinhibisyon aracılığıyla, nucleus subthalamicus globus pallidus pars interna inhibitör etkiye sahip nöronlarını uyarır ve buradan thalamus'u inhibe edecek impulslar korteksin eksitasyonunu düşürür. Motor hareket yavaşlar ve kortikal uyarı düzeyi azalmış olur (Wichman ve ark.,2003). (Şekil 6).

Striatum'a gelen ve striatum'dan çıkan bilgiler dorso-lateral ve ventro-medial olarak incelendiğinde dorsal ve ventral striatum'un bağlantılarıyla benzer organizasyona sahiptir. Dorsal ve ventral striatum'daki orta dikenli nöronlara gelen hızlı eksituar etki, glutamat reseptörleri ile istirahat membran potansiyelindeki kâinat reseptörleri ve AMPA reseptörleri, depolarize membran potansiyelinde NMDA reseptörleri ile ortaya çıkmaktadır (Wilson ve ark., 1996). Dopaminerjik nigrostriatal afferent yol, yavaş ve modulatör etki yaratırken korteks thalamus ve amygdala tarafından gelen hızlı glumaterjik etki striatum fonksiyonunu dengeleyecektir (Surmeier ve ark., 2014).



Sekil 5: Bazal çekirdekler bağlantıları (İnhibitör ve Eksitator yolaklar) (Mohsin H.K. Roshan ve ark., 2016'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)

Lokomotor sistemde görevli olan spinal seviyenin üzerinde yer alan yapılar, pontomedüler retiküler formasyon, mesencephalon'daki lokomotor bölgesi, bazal çekirdekler, cerebellum ve korteks'tir. Mesencephalon, bazal çekirdekler ve korteks'teki nöronlardan bilgiyi alır ve pontomedüler retiküler formasyon'a gönderir. Postür ve yürüyüşü kontrol eden spinal nöral döngüyü modüle etmektedir (Nutt ve ark., 2011).

Mesencephalon'da lokomotor bölgedeki pedunculopontin isimli nucleus özellikle yürüyüş için kilit rol oynamaktadır. Bazal çekirdekler cerebral cortex'ten bilgi alır ve

GABAerjik projeksiyonları beynin diğer bölgelerine göndererek, istemli motor hareketlerini kontrol etmektedir (Brooks ve ark., 1971).

4.2.1 Bazal Çekirdekler ve Parkinson

Parkinson hastalığında, dopaminerjik nöron kaybı sonrasında, globus pallidus pars lateralis-nucleus subthalamicus-globus pallidus pars medialis arasındaki bağlantı hiperaktif olup, normal modülatör etkisini kaybetmektedir. Bu durum bazal çekirdeklerin efferent liflerinde normal olmayan aktivite ve disfonksiyona yol açmaktadır (Obeso ve ark, 2008).

Direkt yolak üzerindeki nöronlarda tip1 dopaminerjik reseptörler (D1) bulunur. Direkt yolağa ait nöronlar SNr'ya ve globus pallidus pars medialis'e akson gönderirken, indirekt yolak üzerindeki nöronlar tip 2 dopaminerjik reseptörleri (D2) eksprese ederler ve globus pallidus pars lateralis'e akson göndermektedirler (Zheng X ve ark., 2018).

Direkt yol olarak isimlendirilen nigro-striatal yolun aktivitesinin azalması ve indirekt yol olarak isimlendirilen striato-pallidal yolaktaki aşırı aktivite, klinikte Parkinson bulgularını ortaya çıkarmaktadır (Doğan, 2012), (Şekil 5). Nucleus subthalamicus 'un aşırı uyarılması sonucunda klinikte gözlemediğimiz tremor tablosu karşımıza çıkmaktadır.

Parkinson hastalığının mekanizması ve tedavisine yönelik yapılan deneysel çalışmalarda en sık kullanılan hayvan modellerinden birisi 6-hidroksi dopamin (6-OHDA) isimli nörotoksik ajandır. Kan beyin bariyerini geçemeyen bir madde olması kaynaklı, stereotaksik yöntemle nigro-striatal yolağa, striatuma ya da SN'ya intrakranial yöntemle enjekte edilerek, lezyon oluşturulmaktadır (Ungerstedt, 1968; Mendez ve ark, 1975).

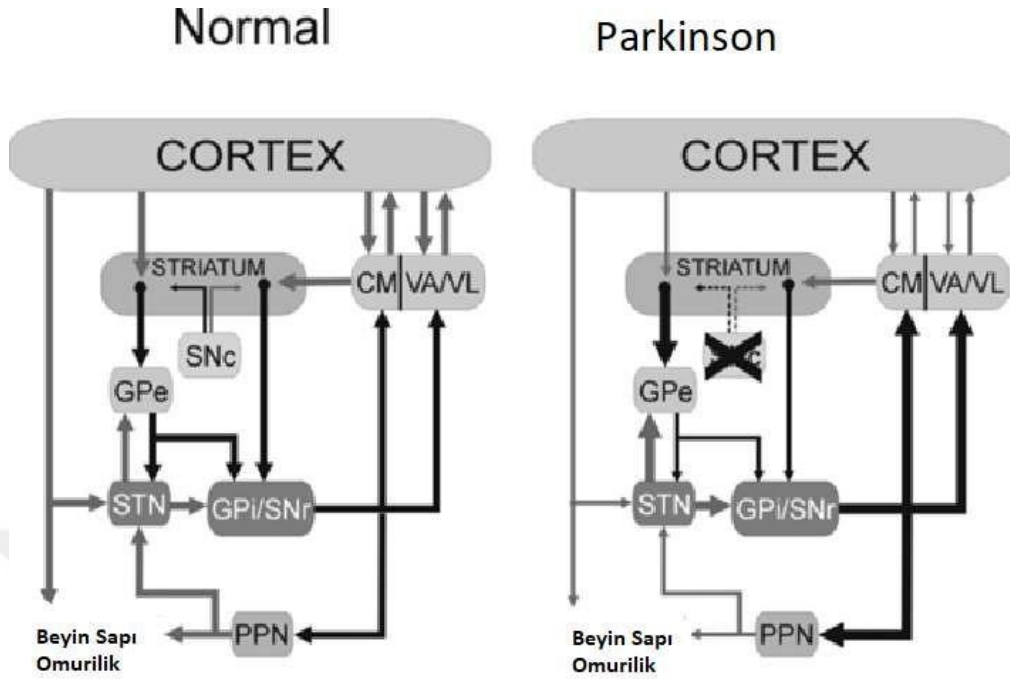
6-OHDA, katekolaminerjik nöronları seçici olarak hasarlayan bir nörotoksin ajandır ve nigral dopaminerjik nöronların progresif olarak kaybına neden olur (Kienzl ve ark, 1995). 6-OHDA uygulaması sonrasında apomorfin rotasyon testi ve immunohistokimyasal prosedürler ile hayvanlardaki lezyonun oluşumu ve derecesi kontrol edilebilmektedir (Lin ve ark, 2018).

6-OHDA, hidrojen peroksit, süperoksit radikaller, kuinonlar ve hidoksil radikaller üretmektedir ve enjeksiyonu sonrasında Lewy cisimciği oluşumu gözlemlenmemektedir. Striatum'a enjekte edildiği zaman buradaki akson terminallerini yok etmektedir. Retrograd şekilde de substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronları hasarlamaktadır. Sonrasında ise, semptomlar yavaş ve progresif bir seyir izlemektedir (Blandini ve ark., 2007).

Öte yandan, substantia nigra ve fasciculus medialis telencephali bölgesine yapılan 6-OHDA enjeksiyonlarında, masif ve hızlı bir dopaminerjik nöron kaybı yaratmaktadır. Semptomlar oldukça ağır ve ciddi bir tablo oluşturmaktadır. Bu nedenler kaynaklı, deneysel hayvan modeli planlanması yapılırken bölgesel enjeksiyonların oluşturduğu farklılıklara dikkat edilmektedir. Tek taraflı enjeksiyonlar, çok daha fazla tercih edilmekle beraber, amfetamin ve apomorfin rotasyon testleri gibi hayvanlardaki motor kaybı kontrol etmek için kullanılan yöntemler öncesinde rahatlıkla kullanılabilir. Diğer yandan, bilateral enjeksiyon bazen hayatı tehdit edici şekilde ciddi tablolar oluşturabilmektedir (Sasaki ve ark., 2016).

Deneysel Parkinson çalışmalarında sıklıkla kullanılan diğer ajan ise methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) isimli kan beyin bariyerini geçebilen lipofilik bir ajandır. Sistemik olarak verildiği zaman, monoamine oksidaz B aracılığıyla, astrositlerde MPDP+'ye çevrilmektedir. Daha sonra ise toksik bir madde olan MPP+'ye okside olmaktadır (Meredith ve Rademacher, 2011).

MPP+, dopamin taşıyıcıları tarafından dopaminerjik nöronlara absorbe olmaktadır. Oluşan oksidatif stres, dopaminerjik nöronları hasarlamaktadır. 6-OHDA'dan farklı olarak, alfa synüklein gözlemlenmektedir. Pestisit maruziyeti de Parkinson lezyonunu oluşturmaktadır. Rotenon isimli madde de kan beyin bariyerini geçebilen lipofilik bir ajan olduğundan dolayı, hızlı bir dopaminerjik nöron kaybı yaratabilmektedir. Yapılan rotenon Parkinson modellerinde aşırı yüksek bir mortalite oranı rapor edilmiştir (Betarbet ve ark., 2000).



Sekil 6: Bazal çekirdekler, talamokortikal döngü (sağlıklı bir beyin ve Parkinson teşhisi almış olan beyinde inhibitör ve eksitator yolaklar, (Thomas ve Mahlon, 2003'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Post-mortem insan beyinlerinde, 6-OHDA lezyonu oluşturulan sıçan ve MPTP modeli maymun beyinlerinde, nigrostriatal sistemdeki dejenerasyon ve striatuma gelen dopaminerjik inervasyon azalmasına bağlı olarak, putamen-nucleus caudatus'ta 20%'lik dendritik diken kaybı meydana gelmektedir.

MPTP modeli maymunlarda, 50%'lik diken kaybı post-commissural (sensorimotor) bölgedeki orta dikenli nöronlarda olurken, nucleus accumbens'teki orta dikenli nöronların dikenlerinde 20-25%'lik etkilenim oluşmuştur. Bu çalışmada dendritik diken kaybının hastalığın erken fazında oluşan bir patoloji olduğunu, hastalığın ilerleyişi hakkında bilgi vermediğini vurgulamışlardır (Villalba ve ark, 2009).

Yapılan bir çalışmada, Parkinson modeli oluşturulan sıçanlara tedavi amaçlı levo-dopa verilerek orta dikenli nöronlarda dendritik dikenler incelenmiştir. İndirekt yolak

üzerindeki nöronlara ait diken yoğunluğunda, tedavi grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede artış meydana gelirken, direkt yol üzerinde kontrol ve tedavi grubu arasında diken yoğunluğunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir. LID (levo-dopa induced dyskinesia) modelinde ise, direkt yol üzerindeki nöronlarda kontrol grubunda azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla birlikte, L-dopa tedavisinin diken yoğunluğu üzerinde farklılık yaratmadığını ve dopaminerjik nöron kaybının indirekt yolak üzerinde diken yoğunluğunda azalmaya neden olduğunu fakat kronik L-dopa kullanımının ise bu etkiye ilaveten direkt yol üzerinde de diken yoğunluğunda azalmaya neden olduğunu vurgulamıştır (Nishijima ve ark, 2014).

4.2.2 Bazal Çekirdekler ve Nöron Çeşitleri

Striatum'daki internöronlar ise histolojik olarak 4 alt tipte incelenebilmektedir. Bunların bir tanesi kolinerjik (kolin asetiltransferaz) +, diğer üç tanesi ise GABAerjik (parvalbumin +, kalretinin +, nöropeptit Y +) internöronlardır (Blandini ve ark, 2000). Bu internöronlar, kalsiyum bağlayıcı protein içermeleri dolayısıyla Ca²⁺ için tampon görevi de görmektedirler (Kawaguchi ve ark, 1995).

Kawaguchi ve ark, 1995 yapmış oldukları sınıflandırmada, GABA-erjik internöronların alt tiplerini, parvalbumin, kalbindin ve kalretinin olarak tanımlamışlardır (Kawaguchi ve ark., 1995).

Parvalbumin içeren nöronlar orta dikenli nöronlardan daha geniş çapa sahip olabilmektedirler. Kalretinin içeren hücreler ise daha küçük çapta dikensiz nöronlardır. Bennet ve Bolam (1993) yaptıkları çalışmada kalretinin pozitif nöronların orta büyüklükte internöronlar olduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerde bulunan kalretinin, kalbindin D28k ile homolog yapıda olup, intraselüler kalsiyum dengesinde önemli rol oynarlar. Kalbindin pozitif nöronlar da orta dikenli görünümde olabilmekte ve internöron alt tiplerine dahil edilebilmektedir (Bennet ve Bottam, 1993).

Nöropeptit Y pozitif nöronlar, dikensiz tipte ve diğer internöronlara kıyasla daha az sayıda dendrit uzantılarına sahiptirler. Diğer grup kalbindin pozitif nöronların ise dikensiz görünümde dendritleri olan striatal internöronlarda eksprese olabileceğini

göstermişlerdir. Kompansatuar mekanizmalara bakıldığı zaman, striatum bölgesindeki nöron tiplerinde ve büyüklüklerinde, dendritik yapılarında morfolojik değişimler, sinaps değişimler görülmüştür (Smith ve ark, 2009; Villalar ve Smith, 2017).

Dendritik dikenler (spine) ilk kez Ramon Y Cajal tarafından tanımlanmıştır. Omurgalıların çoğu kısmında, merkezi sinir sisteminde bol miktarda bulunan dendritik dikenler, küçük uzantılar şeklinde, boyut ve şekil olarak heterojenik yapıda görülmektedirler. Kalsiyum kompartmanı olarak da isimlendirilerek, kalsiyum birikimini de düzenlerler (Yuste ve ark, 2000).

Dendritik çıkıntılar, dendrit gövdesinden ayrılıp baş ve boyun olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmı, presinaptik terminal ve postsinaptik dansite (PSD)'den oluşan sinaps içermektedir (Yuste ve Denk, 1995).

Dendritik dikenlerle ilgili en çok kabul edilen sınıflamaya göre 3 ana sınıf mevcuttur (Peters ve Kaiserman-Abramof, 1970). Bunlar; ince (thin), mantar (mushroom) ve güdük (stubby) tip olarak isimlendirilmektedir. İnce tip; sıklıkla görülen tip olup, ince ve uzun boyun bölgesi ile küçük bombeli olan baş kısmından oluşmaktadır. Mantar tipinde geniş bir baş kısmı bulunmaktadır. Diğer yandan, güdük tip ise, boyun kısmından yoksundur (Jones ve Powell, 1969; Peters ve Kaiserman-Abramof, 1970; Benavides-Piccione ve ark, 2002). Striatum, projeksiyon nöronları ve internöronlar olmak üzere 2 tip nörona sahiptir. Projeksiyon nöronları, nöronların 90%'lık kısmını oluştururken, geriye kalan 10%'luk bölümde ise internöronlar bulunmaktadır. Projeksiyon nöronları dikenli görünümde olup, globus pallidus ve SN'ya aksonlar gönderirken, internöronlar dikensiz görünümde olup projeksiyon nöronlarının aktivitesini kontrol etmektedirler. Projeksiyon nöronlarının soma çapları yaklaşık 20 µm'ye kadar çıkabilmektedir ve orta dikenli nöronlar (medium spiny neuron, MSN) olarak isimlendirilmektedirler. Bunlar GABAerjik inhibitör nöronlardır. SNc ve globus pallidus pars lateralis ile striatum arasındaki bağlantıyı sağlarlar. Belirteç proteine göre direkt ve indirekt yolaklar üzerinde duran iki tip nöron olarak sınıflandırılırlar. Direkt yolak üzerindeki nöronlarda tip 1 dopaminerjik reseptörler (D1) bulunur. Direkt yolakta bulunan nöronlar SNr'ye ve globus pallidus pars medialis akson gönderirken, indirekt yolak üzerindeki nöronlar tip 2 dopaminerjik

reseptörleri (D2) eksprese ederler ve globus pallidus pars lateralis akson göndermektedirler (Zheng X ve ark, 2018).

Kalbindin pozitif nöronlar, striatumun histokimyasal organizasyonunda çoğunlukla matriks kısmında yer almasının yanında ve kalbindin boyanmasında belirteç olarak kullanılabilir. Bennett ve Bolam, (1993) yapmış oldukları çalışmada 2 tip kalbindin tanımlamışlardır. Bunlardan bir tek çekirdeğe sahip orta dikenli nöronlardır (Bennett ve Bolam, 1993).

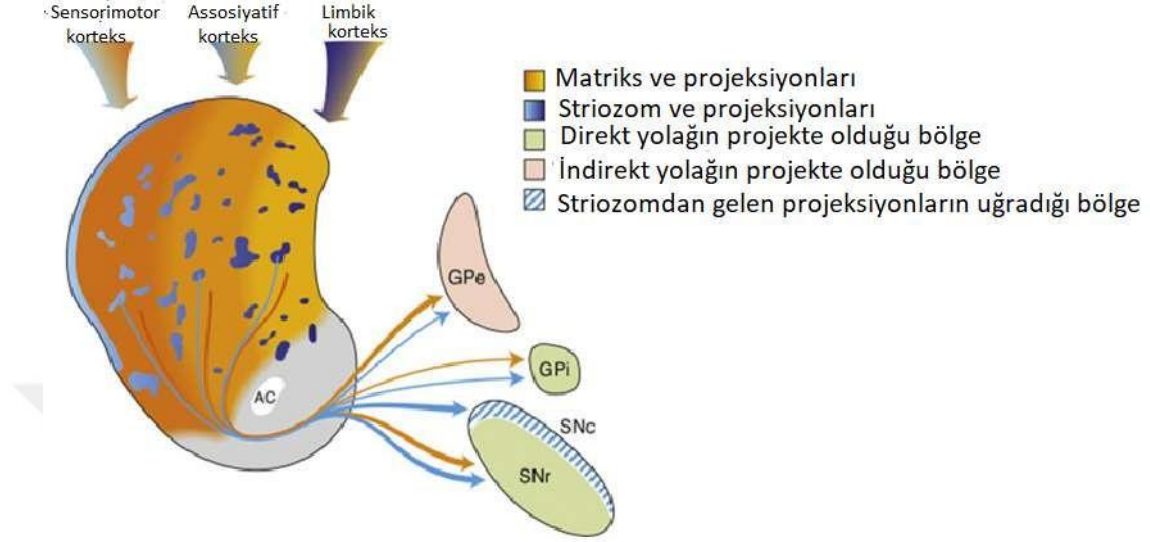
Diğer grup kalbindin pozitif nöronların ise dikensiz görünümde dendritler olan striatal internöronlarda eksprese olabileceğini göstermişlerdir. Kalretinin eksprese eden internöronların %60'nın kalbindin eksprese edebileceği gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada, kalretinin pozitif nöronların NADPH-diaforaz eksprese etmediğini fakat kalbindin pozitif nöronların bir kısmının eksprese ettiği gösterilmiştir (Bennett ve ark, 1993; Celio ve ark, 1990; Cowan ve ark, 1990).

Yapılan bir çalışmada, insan beyinde kalbindinin inozitol monophosphatazı aktifleştirdiği gösterilmiştir. Post-mortem olarak incelenen bipolar hastalara ait beyinlerde, temporal bölgede kalbindin seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir (Shamir A ve ark, 2005). Kalbindin pozitif nöronların incelendiği bir başka çalışmada, orta beyin bölgesinde bulunan kalbindin pozitif nöronların dejenerasyonda hasarlanmaya direnç gösterdiği açıklanmıştır (Yuan ve ark, 2013).

Bu çalışmada CaBP-28 k transgenik fareler kullanılmıştır. CaBP-28 k, kalsiyum-ATP enzimlerini aktive ederek, kalsiyum konsantrasyonu ve aşırı kalsiyum birikimini düzenlemektedir. Böylece, nöronları eksito-toksik hasara karşı dirençli hale getirmektedir. Ventral tegmental alan, substantia nigra'nın dorsali ve retrorubral alandan gelen dopaminerjik aksonlar striozom'u inerve ederken, matriks kısmı ise substantia nigra'nın ventral kısmından gelen dopaminerjik aksonlarla inerve olurlar, (Şekil 7).

Striozom'da, μ -opioid receptor (MOR), substans P (SP), dopamin (DA)₁-receptor (D₁R), met-enkephalin (met-ENK), kalretinin, Nr4a1, pro-dynorphin, GAD-2, and EGR-1 gibi proteinler bulunurken, labirent görünümüdür. Matriks ise kalbindin,

somatostatin (SST), enkephalin (ENK), DA2-receptor (D2R), ve kolinerjik belirteç olarak asetilkolin esterase (AChE) and kolin asetil transferaz (ChAT) içermektedir (Chen ve ark, 2001).



Sekil 7: Dorsal Striatum (Striozom ve Matriks) ve bağlantıları, ('Handbook of Behavioral Neuroscience, 2016'tan değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.3 Parkinson ve Dopaminerjik Nöronlar

Parkinson hastalığında görülen ana klinik belirtiler SNc'deki dopaminerjik nöron kaybı sonrasında gözlemlenmektedir. Dopaminerjik nöronların seçici olarak hasarlanması, kalsiyum bağımlı şekilde gerçekleşen reaktif oksijen yükselmesine yol açan mitokondrial respirasyon ve sitoplazmadaki kalsiyum yükselişi gibi faktörlere bağlanabilmektedir (D. James Surmeier ve ark., 2018).

Parkinson hastalığının patolojisinde görülen ciddi ve seçici şekildeki dopaminerjik nöron kaybı, hastalığın belirteci haline gelmiştir. Koyu pigmentasyon, substantia nigra pars compacta'yı simgelemektedir ve dopaminerjik nöronlardaki nöromelanin ekspresyonu ile ilişkilidir (Shima ve ark., 1997).

Nöromelanin dopamin oksidasyonundan derive olan nöroprotektif bir pigmenttir (Vial ve ark., 2019). Bu pigment demiri bağlamaktadır ve redoks döngüsü üzerinden demirin sitotoksitesini önleyici bir role sahiptir (Zecca ve ark., 1996). Demir depolayan protein olan ferritin ayrıca nöronlarda oluşan demirin tetiklediği redoks stresinde önleyici bir role sahiptir (Dexter ve ark., 1991).

Dopaminerjik nöronlar, SNc'de gözlemlenebilen Lewy patolojisi kaynaklı hasarlanmaya açık hale gelmektedir (Iljina ve ark., 2016). Alfa synuclein birikimine neden olan SNCA genindeki mutasyonlar, PD gelişimi için risk oluşumunu artırmaktadır (Goedert ve ark., 2013).

Substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların hasarlanmaya açık olmasının nedenlerinden bir diğeri ise dopaminerjik nöronların aksiyon potansiyelinin yavaş ve geniş olması ve maksimum kalsiyum geçişine izin vererek yavaş ritmik harekete neden olabilmesidir. Nöronlardaki yavaş ve ritmik hareketlerle birlikte, endoplazmik retikulum'dan kalsiyum geçişi plazma membranındaki Cav1 isimli kalsiyum kanalları aracılığıyla sağlanmaktadır (Guzman ve ark., 2010). Kalbindin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin miktarı azaldıkça, sitoplazmadaki kalsiyum serbestçe diğer proteinlerle tepkimeye girebilmektedir.

Geniş dalgalanmalar, düşük kalsiyum tamponlanma ve sitoplazmadaki kalsiyum seviyesindeki değişimler, dopaminerjik nöronları diğer bölgelerdeki nöronlardan ayırtmaktadır. Örneğin VTA'daki dopaminerjik nöronların daha dirençli olmasının sebebi daha küçük Cav1 kalsiyum akımına sahip olması ve kalbindin ile birlikte güçlü kalsiyum tamponlanma özelliğine sahip olmasıdır (Foehring ve ark., 2009).

A9 dopaminerjik nöronlar, orta beyinde SNc'de bulunmaktadır ve Parkinson hastalığında lezyonu görülmektedir. Bu bölgedeki dopaminerjik nöronların aksonları esas olarak dorso-lateral striatum'a uzanmaktadır (Bjorklund ve Dunnett, 2007).

Nigro-striatal yolağın motor fonksiyonda görevli olması kaynaklı, dorso-lateral striatum'un inerve olmaması, klinikte ortaya çıkan motor disfonksiyonla bağlantılıdır. Diğer dopaminerjik nöronlar ise A8 olarak adlandırılan Retrorubral alan ve A10 olarak adlandırılan Ventral tegmental alan'da bulunan nöronlardır. A8 ve A10'dan gelen

dopaminerjik aksonlar, mezokortikolimbik sistem üzerinden ventral striatum ve prefrontal korteks'i inerve etmektedirler. Duygu durum ve ödül mekanizmasında yer almaktadırlar (Smidt ve ark., 2000).

Substantia nigra'nın dorsal kompartmanında bulunan dopaminerjik nöronlar, ventral tegmental alan ve retro-rubral alandaki dopaminerjik nöron tipine daha fazla benzetilmektedir. Elektrofizyolojik özellikleri, sitoplazmalarında bulunan kalbindin-d28k isimli kalsiyum bağlayıcı protein ekspresyonu ve DCC isimli reseptörün yokluğu, lezyona ve Parkinson hastalığında görülen hücre ölümüne karşı daha az duyarlı oluşu benzer özellikleri arasındadır (Lammel ve ark., 2008).

Orta beyinde bulunan ve dopamin salınımı yapan katekolaminerjik nöronlar bazal çekirdeklerin volünter, amaç odaklı hareketler, motivasyon, kognitif, ödül, öğrenme ve karar verme gibi fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadırlar (Pignatelli ve Bonci, 2015). Disfonksiyonları ve kaybında şizofreni ve Parkinson hastalığı gibi hastalıklar karşımıza çıkmaktadır (Kalia ve Lang, 2015).

Substantia nigra pars compacta, pars reticulata'ya kıyasla önemli bir demir yüküne sahiptir ve bu durum kalsiyum kanalları ekspresyonu ve fonksiyonlarıyla ilişkilidir. Parkinson hastalığının patogenezinde demir birikimi son yıllardaki çalışmalarda öne çıkmıştır. MR görüntülerinin incelendiği bir çalışmada, demir birikiminin hastalığın progresif bir biyobelirteç olduğu vurgulanmıştır (Sulzer ve ark., 2018).

Substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronlar kendilerine özgü bir ateşleme mekanizmasına sahip olup striatumda dopamin salınımındaki seviyeyi sürdürmeye çalışmaktadır. Sinaptik bir input olmaksızın spontane şekilde ateşlenme mekanizmasına devam etmektedirler. Nöronların ateşlenmesi yüksek voltajlı, uzun süreli (L-tipi) kalsiyum kanalları ve yüksek polarizasyonu aktive edici sıklık nükleotid kapılı (HCN kanalları) gibi çeşitli kanalların aktivasyonu aracılığıyla sürdürülmektedir (J.N. Guzman ve ark., 2010).

Bu kanallardan herhangi birinin aktivasyonunun inhibisyonu nöronal aktivitede bir sorun oluşturmazken, her iki kanalın da inhibisyonu nöronların fonksiyonunu direk olarak etkileyebilmektedir. Kalsiyum girişi için uzun süreli açık kalabilme yeteneğine

sahip olan kalsiyum kanallarıyla aktive olan dopaminerjik nöronlar, düşük frekansa sahip bir ateşlenme mekanizmasına sahiptir (J.N. Guzman ve ark., 2018).

Dopaminerjik nöronların hasarlanmaya karşı hassas olmasının en önemli nedenlerinden birisi kullandıkları nörotransmitterlerdir. Dopamin metabolizması, çeşitli metabolitlerin üretimi ve Parkinson hastalığının hücrese seviyedeki patofizyolojisinde görülen oksidatif stresi tetikleyen ROS'un üretimiyle ilişkilidir (Meiser ve ark., 2016).

Ayrıca, dopamin metabolizması, mtDNA delesyonlarının birikimini uyarmaktadır ve mitokondrial disfonksiyona etki etmektedir (Neuhaus ve ark.,2017).

Substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların hasarlanmasına etki eden bir diğer faktör ise bu nöronların morfolojik özellikleridir. Ventral tegmental alan veya bulbus olfactorius'ın tam tersi şekilde, substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronlar uzun ve çok sayıda sinir hücreleriyle bağlantı kuracak dallanmalar yapmış aksonlara sahiptir (Pacelli ve ark., 2015).

İnsan beyinde, SNc'deki dopaminerjik nöronların tek aksonunun toplam uzunluğu 4,5m'dir. Ayrıca 2,4 milyon sinaps oluşumuna katılmaktadır (Bolam ve Pissadaki, 2012). Miyelinleşmemiş akson terminallerinin kendine özgü yapısı ile mitokondrideki biyoenerji değişimine de etki etmektedir ve yüksek yoğunluktaki aksonal mitokondrilere sahiptir (Braak ve ark., 2004).

Dopamin sentezindeki yaşa bağımlı değişimler, dopamin metabolizmasında, reseptör duyarlılığında ve mitokondri'deki işlevsel değişiklikler, kalsiyum dinamiğindeki farklılıklar, demir konsantrasyonu, proteaz disfonksiyonu, telomer kısalması gibi gözlemlenen tablolar nigrostriatal isimli yolakta nöronların hasara karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olur (Zucca ve ark., 2017).

Deneyse hayvan modellerinde kullanılan 6-OHDA isimli nörotoksik ajan, kan beyin bariyerini geçemediği için, beyinde intrakranial olarak stereotaksik yöntem kullanılarak lezyon oluşturabilir. Bu çalışmalarda, Parkinson modeli oluşturulması için striatum, substantia nigra pars compacta ve fasciculus medialis telencaphali bölgelerine 6-ohda enjeksiyonu yapılabilmektedir (Venero ve ark., 1997).

İntra-striatal ve substantia nigra pars compacta'ya kıyasla, 6-OHDA'nın fasciculus medialis telencephali bölgesine uygulandığı deneysel çalışmalarda hastalığın uzun dönemli etkisini çok daha detaylı ve sorunsuz şekilde inceleyebilme fırsatı oluşmaktadır. Fasciculus medialis telencephali bölgesine yapılan enjeksiyonlarda, direkt olarak mekanik bir hasar oluşmadığından dolayı, süreç takibi yapılan çalışmalarda, görüntülemelerin alınarak incelendiği bazı çalışmalarda, herhangi bir ilaç tedavi şeklinin araştırıldığı çalışmalarda kullanabilen önemli bir Parkinson modellemesi yöntemidir (Sandra ve ark., 2019).

4.3.1 Parkinson ve Striatal Nöronlar

Dopamin sadece kortiko-striatal sinapslarının gücünü değil, dikenli projeksiyon nöronların sinaptik akımlarının da integrasyonunu modüle ederler. Dopamin, glutamaterjik iletimi ve direkt yolda etkili olan projeksiyon nöronlarının eksitabilitesini artırmaktadır (Surmeier ve ark., 2014).

Parkinson'lu deney hayvanlarında, dopamin modülasyonunun kontrolünün kaybı, hücreye spesifik değişimleri ve sinaptik bağlantıları tetiklemektedir. İndirekt yolda etkili olan projeksiyon nöronların aktivitesi baskılanırken, diğer yandan hipoaktiviteyi sağlamaktadır (Mallet ve ark., 2006).

Dopamin kaybına cevaben, projeksiyon nöronları homeostatik adaptasyonlar kaynaklı değişim geçirmektedirler ve dengeyi restore etmektedirler. İndirekt yolda, D2 reseptör iletim kaybı ve hiperaktivitesi, intrinsik eksitabilitesindeki kompensatuar azalışa neden olmaktadır. Direkt yolda, D1 reseptör iletimi kaybı ve intrinsik eksitabilitedeki hipoaktivite elevasyona neden olmaktadır. İntrinsik eksitabilitedeki homeostatik değişimlere ek olarak, sinapsın homeostatik plastisitesi de görülmüştür. Dopamin azalışını takiben indirekt yolaktaki striatal projeksiyon nöronlarının dendritik dikenlerinde ciddi bir azalma gözlemlenir (Fieblinger ve ark., 2014).

Sağlıklı hayvanların beyinlerinde striatum'da bulunan projeksiyon nöronları incelenmiştir. Nöronların spontan aktivitesinin frekansının 2 Hz'den düşük olduğu ve istirahat durumunda uzun süreli sessizlik oluşabildiği de gözlemlenmiştir. Hareket

ortaya çıktığı anında, tipik dalgalanmalarla artışa geçtiği gösterilmiştir (DeLong ve ark., 1984).

Dopaminin azalmasıyla birlikte, projeksiyon nöronlarındaki aktivite tetiklenmektedir ve 6-OHDA enjeksiyonu sonrasında projeksiyon nöronlarında ortalama 5-12Hz arasında seyreden aktivitede bir artış oluşmaktadır. Bu değişim ise dopamin azalması ve kortiko-striatal yolaktaki glutamaterjik etkinin azalması sonrasında gerçekleşmektedir (Picconi ve ark., 2004).

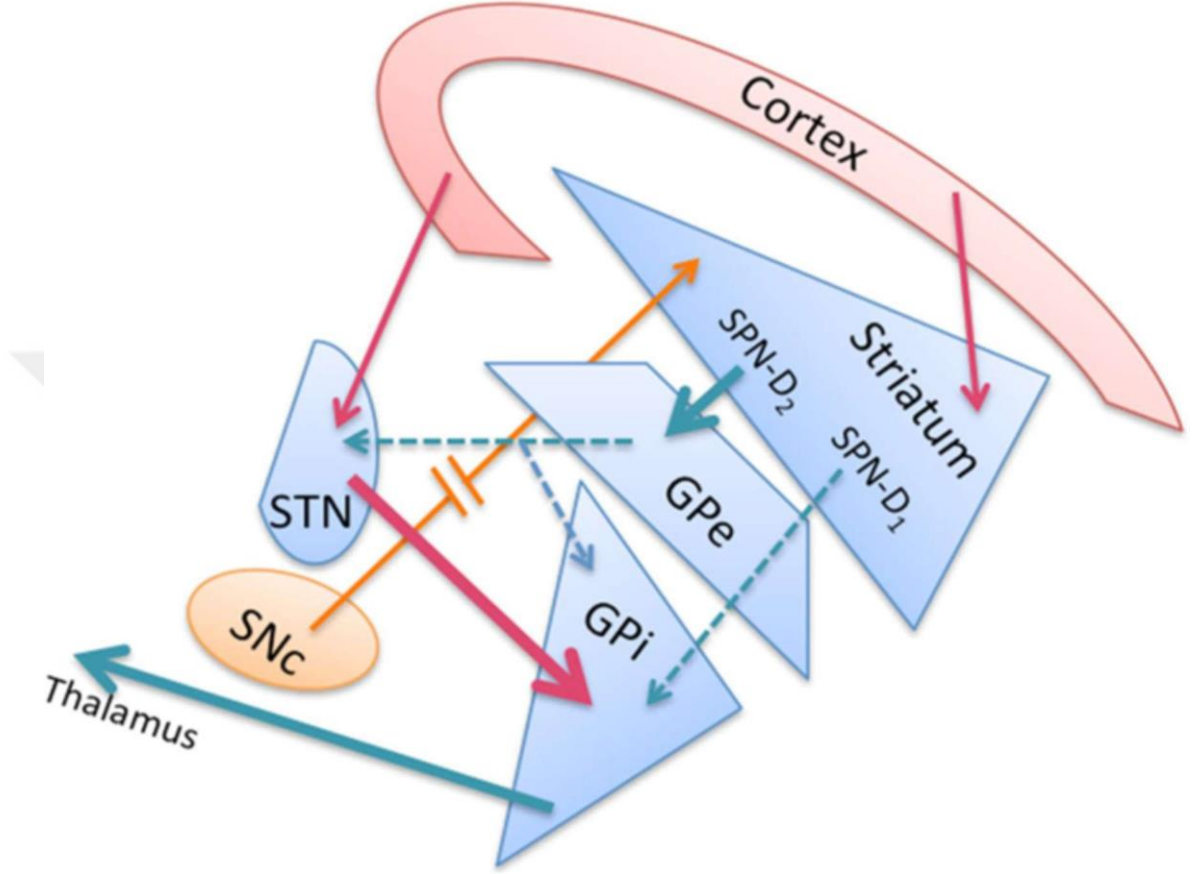
İn vitro intraselüler olarak alınan kayıtlar doğrultusunda, dopamin kaybı sonrasında, glutamaterjik spontan eksituar postsinaptik akımın genişliği ve frekansı arttığı gözlemlenmiştir (Gubellini ve ark., 2002). Dopamin kaybının sonrasında, bazal çekirdeklerin klasik modelinde D2 reseptörlerinin aktivasyonunun inhibisyonu sonrasında, indirekt yolda projeksiyon nöronlarının hiperaktif olduğu gösterilmiştir (DeLong MR ve ark., 1990).

Direkt ve indirekt yolların aktivitelerindeki dengesizlik, hızlı ve güçlü bir şekilde nigrostriatal yolaktaki projeksiyon nöronlarının kaybıyla birlikte, Parkinson hastalığına özgü hipokinetik tabloyu karşımıza çıkarmaktadır (Kravitz ve ark., 2010).

Süreç takibi yapılan bir çalışmada, fasciculus medialis telencephali bölgesine 6-ohda enjeksiyonu yapılan fare beyninde, striatum bölgesindeki TH pozitif aksonların kaybı, lezyonu takip eden 1 haftada görülmüştür. Bu kayıp devam eden süreçte artış göstermemiştir. Substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöron kaybı ise striatum'daki duruma tam ters şekilde progresif şekilde deney süresinde ilerlemeye devam etmiştir (Rentsch ve ark., 2019).

Striatum'da bulunan projeksiyon nöronlarının aktivitesi, korteks, thalamus ve substantia nigra'dan gelen inputlarla değişebilmektedir. Bu heterojen hücresel bağlantı, dopamin, GABA, asetilkolin, nitrik oksit ve adenosin kullanılan birçok farklı mekanizma üzerinden etkileyebilmektedir (Calabresi ve ark., 2000). Parkinson hastalığında, dopamin kaybı sonrasında görülen direkt yol projeksiyon nöronları üzerinde azalmış D1 reseptörü eksituar modülasyon ve indirekt yol projeksiyon

nöronları üzerinde azalmış D2 reseptörü inhibitör modülasyon, hipoaktivite gibi tabloları karşımıza çıkarmaktadır (Obeso ve ark., 2008).



Sekil 8: Bazal çekirdekler döngüsünün şematik gösterimi. Direkt ve indirekt striatal output yolları sırasıyla D1R veya D2R reseptör düzenlenmesinin kaybına göre hipoaktif ve hiperaktiftir. Kırmızı ve yeşil oklar sırasıyla glutamaterjik ve GABAerjik bağlantılardır. Artış ve azalma durumu sırasıyla kalın, katı veya ince, kırık oklarla temsil edilmektedir. GPe ve GPi, globus pallidus eksternal ve internal, STN subtalamik çekirdek, SNc substantia nigra pars compacta (Beck ve ark., 2018).

Striatum'daki projeksiyon nöronlarının hiperaktivitesinin disregülasyon durumu, dopamin azalmasına karşı anormal bir cevap olarak gösterilmektedir.

D1R ve D2R'nin ikili şekilde aktif olması farklı nöronal yanıtlarla sonuçlanmaktadır: (1) azaltılmış ateşlenme/duraklama modeliyle daha yüksek frekans (daha fazla regülasyon); ve (2) daha yüksek düzensizlik/duraklama ile azaltılmış frekans şeklinde görülebilmektedir (Beck ve ark., 2018).

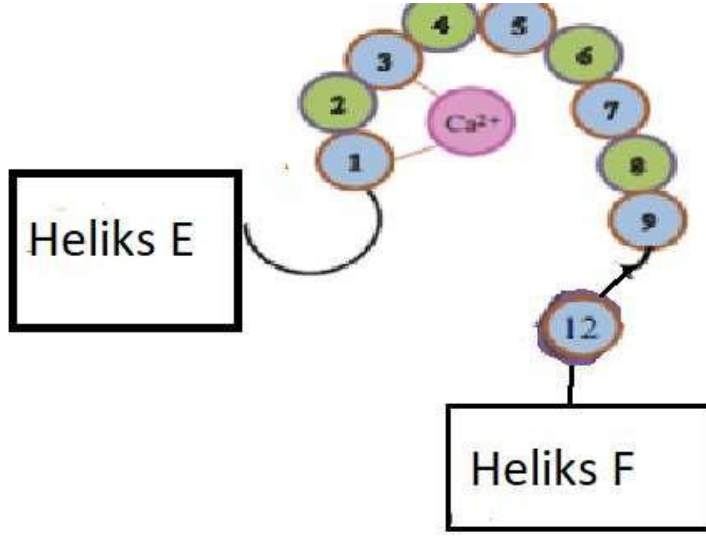
4.3.2 Kalsiyum, Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler ve Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum, sitoplazmada ve nükleus'taki hücre içi enzimlerin inhibitör veya eksitatör rolünde, düzenleyici etkisini göstermektedir. Sitoplazmadaki kalsiyum artışı hücre döngüsündeki fonksiyonların ilerleyişiyle ilgilidir. Kalsiyum bağlayıcı proteinler ise kalsiyuma farklı afinite özellikleriyle bağlanıp kalsiyum tamponlayıcı rolde hareket ederek kalsiyumun difüzyonunu sınırlamaktadır (Kahl ve ark., 2003).

Kalsiyum bağlayıcı proteinler, nöronal işlev ve nörogenezde önemli rol oynamaktadır. Yaşla birlikte striatumda azalabilen kalbindin ve kalretinin, ileri yaşlardaki motor fonksiyonda oluşacak kayıplardan sorumlu tutulabilmektedir (Grillner ve ark, 2005).

Yapılan bir çalışmada, striatumdaki dikenli nöronların ve diğer tipteki nöronların da kalbindin eksprese ettiği gösterilmiştir (Bennett ve ark, 1993). Kalsiyum bağlayıcı proteinler sinyal iletiminde aracı bir rol üstlenerek, hücre fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kalsiyum bağlayıcı proteinler EF-el motifine sahip proteinler içermektedirler ve heliks-halka-heliks yapısı, 1973 yılında tanımlanmıştır (Şekil 7), (Kretsinger ve ark., 1973).

Tipik bir EF-el modeline sahip kalsiyum bağlayıcı proteinde, 2 heliks birbirine dik şekildedir ve bir halka oluşturan birkaç amino asitle birbirlerine bağlıdır (Gifford ve ark., 2007). Halkanın uzunluğu ve bazı noktalarda kalıntıların korunmasına bağlı olarak, kanonik ya da kanonik olmayan proteinler olarak isimlendirilirler (Şekil 7).



Sekil 9: EF-el motif yapısı (Current Alzheimer Research, 2016'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)

Kalsiyum bağlayıcı proteinler ayrıca protein sentezi ve salınımı sırasında gerek duyulan önemli moleküllerdir. Bu proteinler kalsiyumun tamponlanması başta olmak üzere kalsiyum iyonlarının taşınımı ve çeşitli enzim aktivitelerinin kontrolünde rol oynarlar. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin büyük bir kısmı EF-el motifi yapısındadır. EF-el motifi yapısında olan bu proteinler, kalmodulin, kalsinörin, kalsiyum bağlayıcı proteinler ve nöronal kalsiyum sensörleri olarak isimlendirilirler. Bunlar 2 ila 4 kalsiyum bağlanma alanına sahiptirler (Schaub ve ark, 2008; Yap ve ark, 1999). Bu motif yapısına sahip ailedeki proteinlerde farklı kalsiyum afiniteleri ve hücrel yerleşimler gözlemlenmektedir.

EF-el kalsiyum bağlanmasını içeren kalsiyum bağlayıcı protein motifleri, çoğunlukla yüksek voltajla aktive olan VGCC'leri düzenlemektedirler. Her EF-el proteini, farklı kalsiyum bağlanma afinitesine ve hücrel lokalizasyona sahiptir. EF-el kalsiyum bağlayıcı proteinler, hücrel etkilerini kalsiyum bağımlı veya kalsiyumdan bağımsız sinyal mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirebilmektedir.

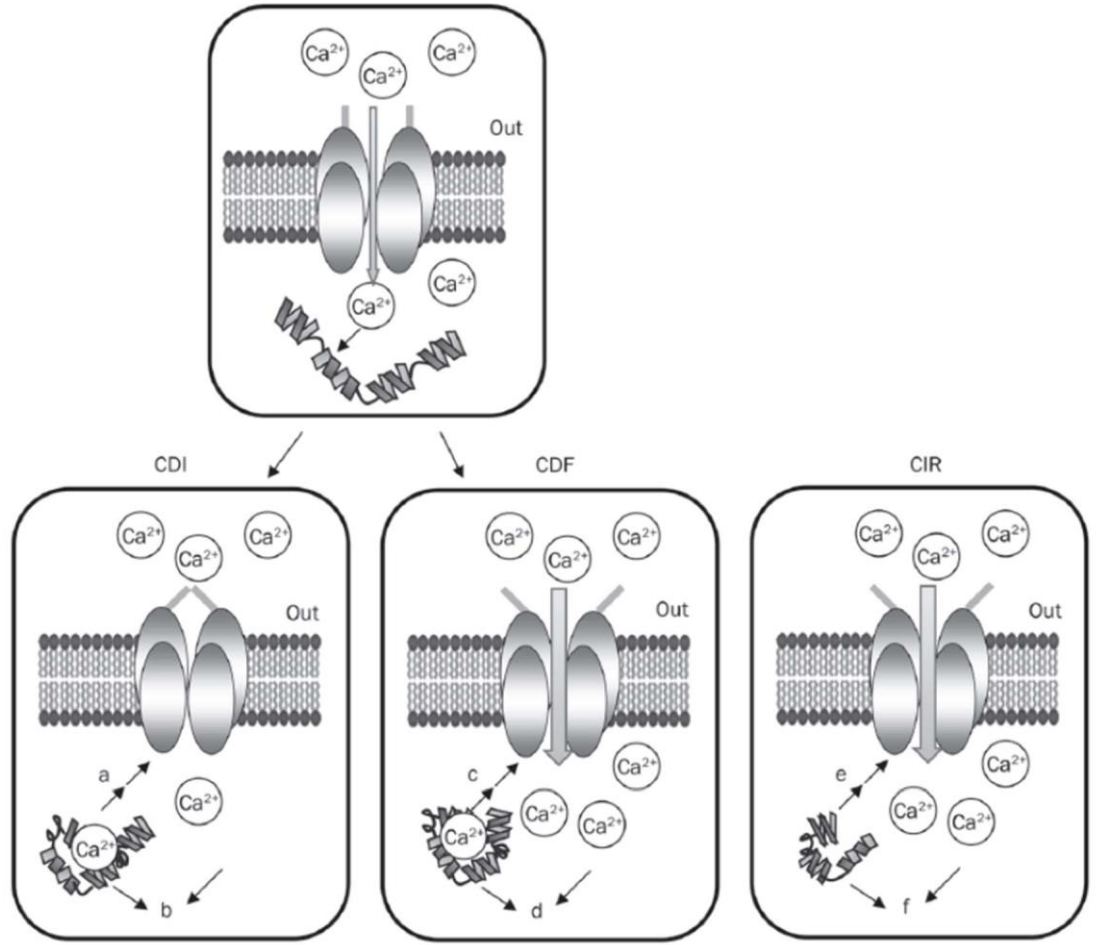
Birçok EF-el kalsiyum bağlayıcı protein, kalsiyum kinetiklerini doğrudan kalsiyum kanallarının özelliklerinin düzenlenmesi yoluyla değiştirebilmektedir (Burgoyne ve ark., 2001).

Kalsiyum bağlayıcı proteinler, yaklaşık 240 üyesi olan ve kalbindin, parvalbümin ve kalretinin de içine alan büyük bir protein ailesidir. Bunlardan kalretinin, sıçan beyinde ilk defa Western blot yöntemi ile 29kDa bir protein olarak ile bulunmuştur.

Kalretinin, kalsiyum bağlanmasında etkili rolü olan ve EF ailesinden kalbindin-D28k ve kalmoduline çok benzemektedir (Arendt O ve ark, 2013). Kalretinin ve parvalbumin cerebellumda Purkinje hücrelerinde görülmüştür (Rogers, 1989).

Yapılan çalışmalarda, kalretinin, parvalbumin ve kalbindin pozitif nöronlarda somato-sensoryel kortekste yaşla birlikte yoğunluklarında değişim olduğu gözlemlenmiştir. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin farklı kinetik ve tamponlanma özellikleri, eksprese oldukları nöronların özelliklerine bağlıdır.

Kalbindin ve kalretinin gen ekspresyonlarının birlikte incelendiği çalışmalarda, bu iki kalsiyum bağlayıcı proteinin birbirlerine bezer fonksiyonlar gösterebileceği ve herhangi birinin konsantrasyonunun azalması sonrasında, diğerinin kompanse edebileceği gösterilmiştir (Bhoyar ve ark., 2019)



Sekil 10: Kalsiyum bağlayıcı proteinler ve kalsiyum kanalları ilişkisi (Nejatbakhsh ve Feng, 2011).

Kalsiyum bağlayıcı proteinler, 3 farklı mekanizma üzerinden kalsiyum kanallarını regüle etmektedir. Bunlar *kalsiyum bağımlı fasilitasyon (CDF)*, *kalsiyum bağımlı inaktivasyon (CDI)* ve *kalsiyumdan bağımsız regülasyon (CIR)* şeklinde tanımlanmaktadır. Kalsiyum bağımlı inaktivasyon (CDI) mekanizmasında, kalsiyum, kalsiyum bağlayıcı proteine bağlanarak negatif geribildirim yol açar ve kalsiyumun hücre içine girmesini engeller (Şekil 10).

Böylece, kalsiyum artışıyla karakterize olan hastalıkların oluşma riskini azaltır. Kalsiyum bağımlı fasilitasyon (CDF), kalsiyumun kalsiyum bağlayıcı proteinlere bağlanması pozitif geribildirimle kalsiyumun hücre içine daha fazla geçişin sağlanmasıdır. Kalsiyumdan bağımsız çalışan CDI mekanizması ise kalsiyum bağlayıcı protein azaldığı zaman aktifleşerek yine kalsiyum kanalları aracılığıyla kalsiyum girişini dengelemeye çalışmaktadır (Nejatbakhsh ve Feng, 2011).

Kalbindin ve kalretinin aynı familyaya ait yüksek kapasiteye sahip kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir. Her ikisinin kapasitesi farklıdır. Örneğin kalbindin, Kd olarak 393 nM, kalretinin ise 1.5 nM'dır. Böylelikle, kalretinin kalsiyum modülatörü olarak görev alırken, kalbindin ise klasik kalsiyum tamponlayıcı olarak rol almaktadır (Fairless ve ark., 2019).

Kalbindin ekspresyonunda, yaşla birlikte görülen azalma kalbindinin yaşlanmış nöronları apoptozdan koruyabileceği ya da nöronlardaki ölüm sürecini artırabileceği sorusunu karşımıza çıkarmaktadır. Deneysel araştırmalar sonucunda, kalbindin ve kalretinin ekspresyon artışının, aşırı nöronal aktivite sonucunda yüksek miktarda kalsiyumun hücre içine alınması sonrasında nöronlar için nöroprotektif etki gösterdiği ortaya koyulmuştur (Schwaller ve ark., 2002).

Kalbindin ekspresyonu nörodejeneratif hastalığa sahip insan beyinlerinde değişime uğramıştır (Riascos ve ark., 2011). Tavşan retinasının incelendiği bir çalışmada, kalbindin pozitif nöronlar, kalretinin ve parvalbumin pozitif nöronlara kıyasla iskemi durumunda daha çok korunaklı olduğu gösterilmiştir (Kwon ve ark., 2005).

Sitoplazmadaki bazal kalsiyum seviyesi, güçlü kalsiyum bağlayıcı ve kalsiyum tamponlayan proteinler (kalbindin, parvalbumin gibi) aracılığıyla veya kalsiyumun hücre içindeki depolara aktif alımını sağlayan endoplazmik retikulum üzerinde bulunan Sarco/ER kalsiyum ATP- azın (SERCA) aktivasyonu ile sürdürülmektedir (Brini ve ark., 2014).

Intraselüler kalsiyum homeostazında kalsiyum bağlayıcı proteinler dışında, endoplazmik retikulumda bulunan SOCE (store-operated Ca²⁺ entry, depo odaklı kalsiyum girişi) denilen kalsiyum depoları da rol oynar (Brini ve ark, 2014).

Glutamat ve büyüme faktörleri, kalbindin ekspresyonunu direkt olarak artırabilmektedir. Bununla birlikte, AMPA reseptör aktivasyonu ve kâinat glutamat reseptör aktivasyonu da hippocampus ve cerebellum'daki kalbindin ekspresyonunu artırmaktadır (Batini ve ark., 1997).

Tüm EF-el içeren proteinler 2 gruba ayrılmaktadır. Kalsiyum sensörleri ve kalsiyum tamponlayıcı olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Kalmodulin, rekovertin gibi kalsiyum sensörleri ve EF-el proteinleri, kalsiyum konsantrasyonundaki değişime cevaben fonksiyon gösterirler. Kalsiyum tamponlayıcı olarak isimlendirilen proteinler (parvalbumin, kalbindin-D9k, kalbindin D28k ve kalretinin) ise, kalsiyum iletimini serbest kalsiyuma bağlayarak modüle ederler.

EF-el adı verilen kalsiyum bağlayıcı motive sahip kalsiyum bağlayıcı proteinler, ökaryotik hücre iletiminde önemli rol oynamaktadır. Heliks-halka-heliks yapısıyla kalsiyum iyonun bağlanarak aktive olabilmektedir. Kanonik olarak isimlendirilen EF-el adı verilen kalsiyum bağlayıcı proteinler, 12 kalıntıya sahip kanonik EF-el halkası mevcuttur ve kalsiyumu genellikle karboksilat veya karboniller aracılığıyla bağlamaktadır (Gifford ve ark., 2007).

Parvalbumin ve kalretinin-D9k, sadece saf olarak kalsiyum tamponlayıcı özelliğe sahipken, diğer yandan kalbindin-D28k ve kalretininin ise kalsiyum tamponlayıcı özellikleri yanında, kalsiyum sensörü olarak da görev almaktadırlar. Kalsiyum sensörlerinin kendine özgü belirleyici özelliği ise kalsiyum bağımlı şekilde konformasyonel değişim geçirerek ve çoğunlukla hidrofobik yüzeylerinin hedef proteinle etkileşime girebilecek duruma gelmesidir (Ikura, 1996).

4.3.3 Parkinson ve kalsiyum

Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda izlenen nöronal kalsiyum miktarındaki dengesizlik, kalsiyum tampon mekanizmasındaki yetersizlik, kalsiyum kanallarının regülasyonundaki değişim veya eksositoz kaynaklı görülebilmektedir. Substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronlarda

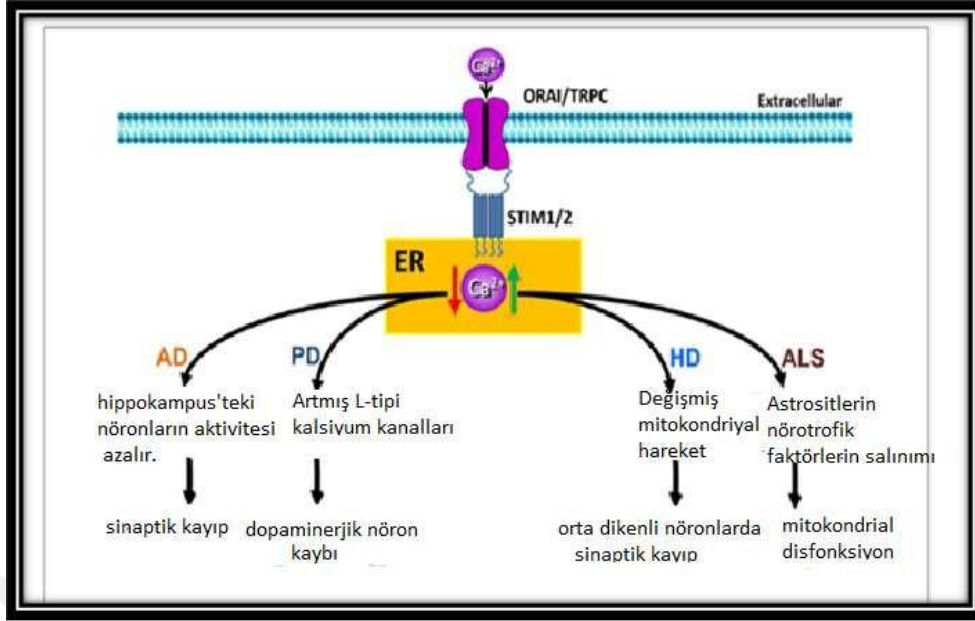
somato-dendritik ve pre-sinaptik dopamin salınımı, kalsiyum bağımlı olarak gerçekleşmektedir.

Kalsiyumun nöronlardaki hücre sel fizyolojideki esas rolü farklı dinamik yapılarla bağlantı kuran hücre içi sinyal iletimindeki önemli araçlar arasındadır.

İntrasellüler kalsiyumu esas depolayan yer olan endoplazmik retikulum, sitoplazma içerisine kalsiyumun salınımını inozitol 3 fosfat (InsP3Rs) ve rianodin (RyRs) isimli reseptörler aracılığıyla sağlamaktadır (Berridge MJ ve ark, 2003).

STIM (Stromal interacting molecules) denilen moleküller kalsiyuma duyarlı olup, endoplazmik retikulum lümende EF-el kalsiyum bağlayan bölgelere sahiptir. Endoplazmik retikulumdaki kalsiyum depoları azaldığı zaman, STIM'ler kalsiyum kanallarını aktifleştirerek kalsiyumun içeriye alınmasını ve tekrar depolanmasını sağlamaktadır. Bu işleme SOCE (depo adaklı kalsiyum girişi) denilmektedir.

Kalsiyum iyonları, sitoplazmadan endoplazmik retikuluma SERCA aracılığıyla geçmektedir. Orai 1 ailesine ait yüksek kalsiyum geçirgen kanallar veya Transient Receptor Potential (TRPC)'ye ait kanallarla, SOCE mekanizması yoluyla kalsiyum geçişleri sağlanmaktadır (Williams ve ark, 2001; Brandman ve ark, 2007; Kraft ve ark, 2015; Soboloff ve ark, 2012).



Sekil 11: Depo odaklı kalsiyum girişi ve Parkinson hastalığı, (Secondo ve ark., 2018'ten değiştirilerek kullanılmıştır.)

Normal sağlıklı bir beyinde, dopaminerjik nöronların ateşlenme aktivitesi, TRPC1-STIM1 kompleksi ile inhibe olmaktadır. Buna bağlı olarak, artmış L-tipi kalsiyum kanalı aktivitesi Stim1 veya TRPC1'in aktif olmaması sonucunda karşımıza çıkmaktadır. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) isimli nörotoksik ajan Parkinson hastalığı tablosunu oluştururken, TRPC1 seviyesindeki azalışı ve STIM1 ile tepkimeye girmesini beraberinde getirmektedir. Bu durum da nöron kaybına zemin hazırlamaktadır (Selvaraj ve ark., 2012). Moleküler düzeyde incelendiği zaman, TRCP1 ekspresyonundaki azalış, Cav1.3 isimli kalsiyum kanalının aktivitesini anormal şekilde artırarak dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna sebebiyet vermektedir (Sun ve ark., 2017), (Şekil 11).

Kalsiyum kanalının aktivasyonunun anormal artışına rağmen, TRCP1'in azalışı SOCE mekanizması üzerinden kalsiyum girişini baskılamaktadır ve böylelikle endoplazmik retikulum stresini tetikleyerek dopaminerjik nöronlarda görülen katlanmamış protein oluşumunu artırmaktadır.

Yapılan bu çalışmalar sonucunda, ilerleyen çalışmalarda dopaminerjik nöronların hasarlanması üzerinde SOCE mekanizmasının önemli bir role sahip olduğu ve klinikte Parkinson hastalığındaki farmakolojik tedavi için hedef mekanizmalardan olabileceği ileri sürülmüştür (Pchitskaya ve ark., 2018).

Nöronal kalsiyum iletiminin organizasyonu karmaşıktır. Çeşitli kalsiyum ileten kanallar ve kalsiyum bağımlı proteinler (kinaz, fosfataz, transkripsiyon faktörleri, enzimler, sinaptik vezikül füzyonunu tetikleyen proteinler), nöronal kalsiyum iletiminde önemli rol almaktadır (Brini ve ark., 2014).

Literatürde, Parkinson hastalığında striatumda bulunan kalsiyum bağlayıcı protein pozitif internöronların önemli bir rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Kalsiyum bağlayıcı protein eksprese eden dopaminerjik nöronların hasara karşı daha dirençli olduğu ve kalsiyum bağlayıcı proteinlerin nöroprotektif etkileri olabileceği vurgulanmıştır (Inoue ve ark., 2019).

Birçok çalışma yapılmasına karşın literatürde kalsiyum bağlayıcı proteinlerle ilgili farklı bulgular ortaya konmuş, hastalıklardaki rolleriyle ilişkili tam bir görüş birliği oluşmamıştır. Kyoko Tsuboi ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, 6-OHDA enjekte edilen sıçanlarda, kalbindin ve kalretinin eksprese eden nigro-striatal yolak üzerinde bulunan dopaminerjik nöronları incelemişler ve çalışmanın sonunda sağlam kalan dopaminerjik nöronların kalretinin eksprese ettiğini gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar sonrasında, kalretininin nöroprotektif etkisinden dolayı dopaminerjik nöronları koruyabildiği ileri sürülmüştür (Tsuboi ve ark., 2000).

4.3.4 Parkinson ve Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler

Kalsiyum bağlayıcı protein eksprese eden nöronların hasarlara karşı daha dirençli ya da hassas olması literatürde tartışılan konular arasında yer almaktadır. Son çalışmalarda, parvalbumin pozitif nöronların dejenerasyona karşı daha duyarlı olabileceği, kalretinin ve kalbindin pozitif nöronların ise hasara karşı daha dirençli olabileceği gösterilmiştir (Goodman, J.H ve ark, 1993).

Kafa travması ve nörotoksik ajanların enjekte edilmesini takiben nöroproteksiyon mekanizması kaynaklı protein ekspresyonunda artış gözlemlenebilmektedir. Bununla birlikte nöron sayısında kayıp gözlemlenmeyebilir fakat nöronların kalsiyum bağlayıcı protein ekspresyonunu değişme kapasitesi olabileceği de unutulmamalıdır.

Hücre hasarında koruyucu bir mekanizma oluşturabilmesi yaşla da değişebilmektedir. Örneğin; kalbindin seviyesi yaşla birlikte striatum, cerebellum, hippocampus gibi bölgelerde azalmaktadır. Bu da Alzheimer gibi hastalıklara zemin hazırlamaktadır (Ng, M.C. ve ark, 1996).

BDNF aktivasyonu üzerinden de kalsiyum bağlayıcı protein regülasyonu düzenlenmektedir. Korteks ve hippocampuse BDNF verilmesi, c-fos transkripsiyon faktörünü etkileyerek, kalbindin ekspresyonunu regüle etmektedir. Diğer bir çalışmada, BDNF artışı kalretinin ekspresyonunu azaltmıştır (Fiumelli, H ve ark, 2000).

Son çalışmalarda, kalsiyum tamponlama mekanizması yanında kalretinin ve kalbindinin kalsiyum sensörü olarak rol alabileceği öne sürülmüştür (Schwaller ve ark, 2014). Sonuç olarak kalsiyum bağlayıcı protein ekspresyonu hasarın derecesi, dejenerasyonun tipi, yaş faktörü gibi etkenlerle değişebilmektedir (Richard ve ark, 2019).

Yapılan bir diğer çalışmada ise nigro-striatal yolağa yapılan enjeksiyon sonucu lezyon oluşturulan Parkinson modeli sıçanlarda nigro-striatal yolaktaki dopaminerjik nöron kaybı sonrası striatumda bulunan kalretinin pozitif internöronlarda azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Bu azalışa glutamat reseptörlerindeki aşırı aktivite ve dopaminin eksikliğinin neden olduğu iddia edilmiştir (Yuxin Ma ve ark, 2014).

Bu çalışmada, lezyon sonrasında parvalbumin pozitif internöron sayısında herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Yine kalsiyum bağlayıcı pozitif nöronlarla ilgili başka bir çalışmada, 6-OHDA lezyonu oluşturulan sıçan modelinde globus pallidusta bulunan parvalbumin pozitif nöronlarda azalma görüldüğü gösterilmiştir (Fernández-Suárez ve ark, 2012). Bunun sonucunda çalışmaya ilişkin yapılan değerlendirmede, azalan bu GABAerjik nöronların nucleus subthalamicus hiperaktivitesini yeterince

baskılayamamasının hastalıkla ilgili semptomların ortaya çıkmasına yol açtığını vurgulamışlardır.

Nörodejeneratif hastalıklarda, bazı nöron popülasyonlarının hasarlanmasının kalbindin, kalmodulin ve parvalbumin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerindeki azalma kaynaklı olduğu söylenmektedir. Kalbindin-D28K ve parvalbumin'in erken hasar gören motor nöronlarda bulunmadığından dolayı amiyotrofik lateral sklerozun erken fazında, hastalarda motor kayıp gözlemlendiği ileri sürülmektedir (Alexianu ve ark., 1994).

4.3.5 Kalbindin

Kalbindin-d28k ilk olarak tavuktaki bağırsak mukozasında, 1966 yılında keşfedilmiştir ve yaklaşık 200 kalsiyum bağlayıcı protein içeren EF-el motif yapısındaki aileye aittir (Feher ve ark., 1992). Genetik kodlanması CALB1 olarak söylenmektedir. Kalbindin-d28k, beyinde çözünebilen tüm proteinlerin yaklaşık %1,5'ünü oluşturmaktadır (Berggård ve ark., 2002).

Kalbindin, cerebellum'daki Purkinje liflerinde, hippocampus'te ve neokorteks'teki internöronlarda yüksek oranda görülebilir (Barski ve ark., 2003). Ayrıca kalbindinin, kemik, böbrek ve pankreas'ta da eksprese edildiği rapor edilmiştir (Christakos ve ark., 1989).

CaBP-28k, kalsiyum-ATPaz enzimlerini aktive ederek, kalsiyum konsantrasyonu ve aşırı kalsiyum birikimini düzenlemektedir. Böylece, nöronları eksitotoksik hasara karşı dirençli hale getirmektedir. Kalbindin, apoptoz ve nekrotik hücre ölümüne karşı koruyucu etkisini kaspaz aktivitesini inhibe ederek göstermektedir (Choi ve ark., 2008).

Kalbindin-D28k, insanda ve sıçanlarda %80 oranında böbrekte distal tübülde eksprese olmaktadır (Roth ve ark., 1982). Dört tane yüksek afiniteye sahip kalsiyum bağlanma bölgesine sahiptir ve böbrek, pankreas ve beyinde yüksek oranda bulunmaktadır. Hücrede kalsiyum taşınması, iletimi ve böbrekteki kalsiyum reabsorbsiyonunu

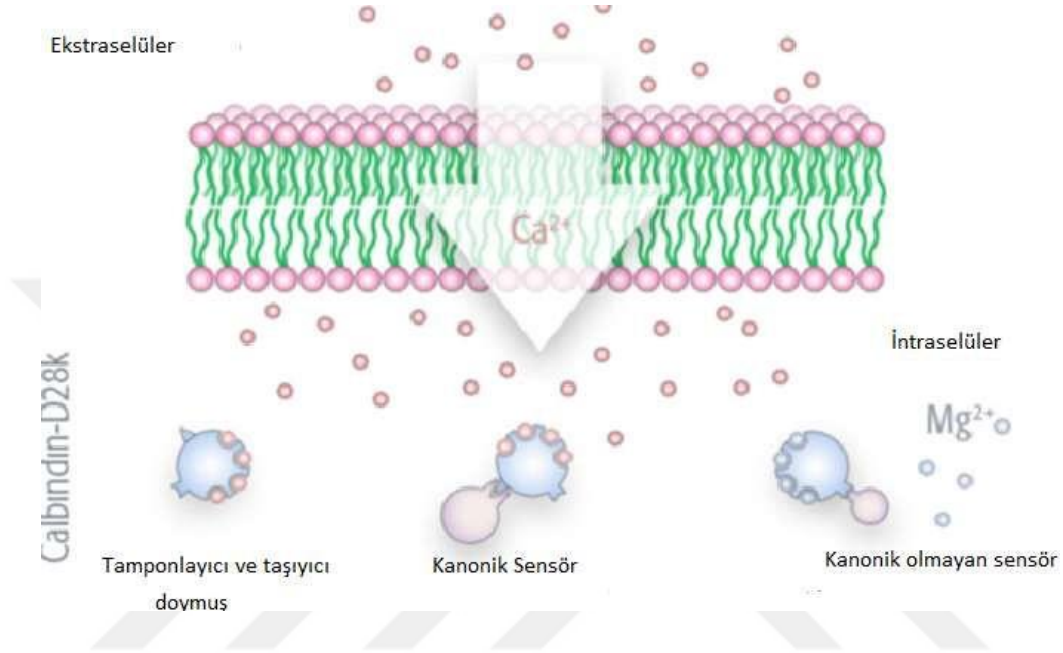
etkileyen intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun modülatörü olarak görev almaktadır (Sooy ve ark., 2000).

Anti-apoptotik etkisi sadece kalsiyum tamponlayıcı özelliği kaynaklı değil, kaspaz-3 aktivitesini inhibe etmesi nedeniyle de öne çıkmıştır (Bellido ve ark., 2000). Kalsiyum bağlayıcı proteinler, yaklaşık 240 üyesi olan ve kalbindin, parvalbümin ve kalretinini de içine alan büyük bir protein ailesidir. Bunlardan kalretinin, sıçan beyninde ilk defa Westernblot yöntemi ile 29 kDa bir protein olarak ile bulunmuştur. Kalretinin, kalsiyum bağlanması etkili rolü olan ve EF ailesinden kalbindin -D28k ve kalmoduline çok benzemektedir (Arendt O ve ark., 2013).

EF-el motifine sahip kalsiyum bağlayıcı proteinler, 2 gruba ayrılmaktadır. Bu gruplardan biri kalmodulin ve kalretinin gibi proteinleri içeren kanonik EF-el proteinler, diğeri ise S-100 benzeri proteinlerin N-terminal kısmında bulunan proteinlerdir. Her iki grupta da kalsiyum bağımlı aktivasyon gerçekleşmektedir. Her iki yapısal grupta da bir çift EF-el motifi veya sözde EF-el motifleri yapısal bir alan oluşturur ve bu alanlar Ca^{2+} 'ya bağlı aktivasyon için minimum gereksinim olarak bilinmektedir. Genel olarak, EF-el motiflerinden biri diğerdinden daha yüksek Ca^{2+} bağlama afinitesine sahiptir (Gifford ve ark., 2007). Kalbindin sadece beyin dokusunda değil farklı dokularda da eksprese olmaktadır. Böbrekte, distal tubulus kalbindin artışı cisplatin kemoterapisi sonrasında tedavi etkinliğinin böbrekler üzerindeki etkisini gözlemlemek için ürolojik patolojisi olan hastalarda belirteç (marker) olarak kullanılmıştır. Böbrekte, distal tubulus'te kalbindin artışı cisplatin kemoterapisi sonrasında tedavi etkinliğinin böbrekler üzerindeki etkisini gözlemlemek için ürolojik patolojisi olan hastalarda marker olarak kullanılmıştır. Kalbindin, böbrekteki kalsiyumun taşınmasını sağlar. Sitoplazmadaki kalsiyum değişikliğine cevaben, kalsiyum tamponlama görevi yapmaktadır (Tim T Lambers ve ark., 2006).

Kalbindin-D28k, 261 kalıntıya sahiptir. Bunlar 3 çift EF-el modeli içermektedir ve en çok bilinen EF-el proteini olarak kabul edilmektedir. Sadece 1,3,4 ve 5. el kısımları kalsiyuma, yüksek afiniteyle bağlanmaktadır. 2. ve 6. EF-el fonksiyonel değildir (Kojetin ve ark., 2006).

Kanonik Ca^{2+} -bağlama halkası, 12 amino asit kalıntısı dizisi ile karakterize edilmektedir. Bir EF-el döngüsünde, kalsiyum iyonu beşgen bir çift piramidal konfigürasyonda koordine edilir. Bağlanmaya dahil olan altı kalıntı 1, 3, 5, 7, 9 ve 12 konumlarındadır; bu kalıntılar X, Y, Z, -Y, -X ve -Z ile gösterilmektedir (Gifford ve ark., 2007).



Sekil 12: Kalbindinin kalsiyum sensör ve kalsiyum tamponlayıcı fonksiyonu (Lohmeier Johannes, 2018'ten değiştirilerek kullanılmıştır).

Kalbindinin doymuş ve doymamış şekilde bulunabildiği gösterilmiştir. Kalsiyuma bağlanarak, doymuş şekilde tamponlayıcı rolde veya yine kalsiyuma bağlı doymuş formda, kanonik sensör protein olarak aktive olabilmektedir. Doymamış olarak ise kalsiyumdan bağımsız şekilde, kanonik olmayan formda bulunmaktadır (Lohmeier, Johannes, 2018), (Şekil 12).

Kalbindin, tamponlayıcı, transporter ve sensör olarak görev alabilen özel bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Kalsiyum bağlanmasıyla kalbindin yapısal değişikliğe uğrar ve bundan dolayı nöronal bir sensör olarak görevi olduğu söylenmektedir. Kalbindin, kalsiyumdan bağımsız şekilde bağlanmayı sağlayan hidrofobik bir bölge içermektedir. Hidrofobik bölgeler, proteinlere bağlanmayı kolaylaştırır (Berg ve ark., 2012).

Kalbindin, en yüksek miktarda bağırsak, böbrek (distal toplayıcı kanal), pankreas ve beyinde bulunmaktadır. Vitamin D tarafından regüle edilip, böbrek, bağırsakta kalsiyum difüzyonunu kolaylaştıran proteindir. Beyinde, kalbindin nöron gruplarında bulunmakta ve intraselüler kalsiyum iletimi ve artmış kalsiyumda tamponlayıcı görevde bulunmaktadır.

Sinir sisteminde, kalbindin, fizyolojik uyarılara karşı intraselüler cevaplar verir ve kalsiyumdan dolayı oluşan nörotoksositeye karşı nöronları korumaktadır. Sinir sisteminde, sadece apoptoz nedenli koruyuculuk değil, böbrek, pankreatik ve ostoblastlarda da koruyucu görevde bulunmaktadır (David Lee ve ark., 2006).

Kalbindin, kalsiyum tamponlayıcı, iletici ve sensör fonksiyonlarında bulunmaktadır. Kalsiyumun bağlanmasıyla kalbindin yapısal değişikliğe uğramaktadır. Kalbindin, kalsiyumdan bağımsız şekilde bağlanmayı sağlayan hidrofobik bir bölge içermektedir. Hidrofobik bölgeler, proteinlere bağlanmayı kolaylaştırmaktadır. EF-el motifi yapısında olan proteinler, kalsiyum tamponlama (kalsiyum sinyali mekanizması) ve kalsiyum sensörü (kalsiyum konsantrasyon değişikliğine duyarlı olup özel sinyallere çevirebilirler) fonksiyonlarına sahiptirler.

İstirahat sırasında, kalbindinin kalsiyuma bağlanma miktarı diğer kalsiyum bağlayıcı proteinlere oranla daha azdır. İntraselüler kalsiyum konsantrasyon değişimine karşı, heliks yapısı ve bağlanma döngüsünde değişiklikler oluşmaktadır çünkü kalsiyum sensör özelliğine sahiptir (Tord Berggård ve ark., 2002). Kalsiyum bağımlı inaktivasyon (CDI) üzerinden kalsiyum kanalları üzerinde etkilidir (Kreiner ve Lee, 2006).

Kalbindin, beyinde, çözünebilir proteinin 0.1 ve 1.5%'ini oluştururken, sesle ilgili nöronlardaki kalbindinin protein seviyesi, 2 mM civarındaki konsantrasyona ulaşabilmektedir. 261 amino asit içermektedir ve kalmodulin ailesine ait bir proteindir. Bu ailedekilerin bir kısmı kalsiyum sensörleri olarak rol alıp, kalsiyum kaynaklı olarak hidrofobik bölgeleri yapısal değişikliğe uğrayabilmektedir. Diğer kısmı ise, kalsiyum tamponlayıcı ve sinyal düzenleyicisi olarak rol alabilmektedir.

Parvalbumin ve kalbindin-9k, kalsiyum tamponlama fonksiyonuyla öne çıkarken, kalsiyum sensör proteinlerden farklı olarak hidrofobik bölgeler içermemektedirler. Bu hidrofobik bölgelerin olması durumunda, kalsiyum afinite yeteneği ve stabiliteleri limitlenmektedir. Böylelikle, kalbindin yüksek afinite özelliğine sahiptir. Kalbindin sadece beyin dokusunda değil farklı dokularda da eksprese olmaktadır (Kawasaki ve ark, 1998).

Kalbindin, klasik kalsiyum sensörlerinden farklı olarak, içermiş olduğu hidrofobik bölgeler aracılığıyla kalsiyumdan bağımsız konformasyonu sağlamaktadır yani termodinamik olarak kalsiyumdan bağımsız şekilde hedef proteinlerle etkileşim gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, kalbindinin düşük bir kalsiyum afinitesiyle miyo-inozitol monofosfataz-1 (IP3 sekonder iletilici yoldaki anahtar enzim rolünde) ile tepkimeye girebileceği de gösterilmiştir ve bu özelliği sayesinde, bipolar bozukluğu olan hastalarda lityum terapisi amaçlı kullanılmıştır (Noble ve ark., 2018).

Sıçanların enterik sinir sisteminde, kalbindin immunoreaktif nöronların büyük bir kısmında kalretinin ve kalbindin eksprese olmaktadır (Masliukov ve ark, 2017). Kalbindin-9K (vitamin D bağımlı intestinal kalsiyum bağlayıcı protein) seviyesinin çocuklarda yaşla birlikte azaldığı gözlemlenmiştir (Michael Staun ve ark., 1991).

Kronik üremisi olan sıçanlarda kalbindin-D28K değerinin böbrek dokusunda artmış seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir, plazma üre seviyesi ile renal dokudaki kalbindin-D28K değerleri arasında korelasyon olduğu savunulmuştur ($p < 0.05$) (Michael Staun ve ark., 1991). Yaşlanan nöronlarda intraselüler kalsiyum seviyelerini düzenleyen moleküler mekanizmada bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Verkhatsky & Toescu, 1998).

Kalbindin ve kalretinin ekspresyonunun yaşla birlikte düştüğü yönünde çalışmalar mevcut olmasına karşın zıt sonuçlar alan çalışmalar da mevcuttur. Korteks'in incelendiği bir çalışmada, kalbindinin kortekste yaşla birlikte azalırken, kalretininin artış gösterdiği ortaya koyulmuştur (Ahn ve ark., 2017). Diğer bir çalışmada, kalretinin ve kalbindin yaşla birlikte hippocampus'te azaldığı fakat korteks'te önemli bir değişim göstermediği vurgulanmıştır (Zallo ve ark., 2018).

Kalbindin-D28k, böbrekte distal tubulus'ta kalsiyum reabsorbsiyonunda önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada, diyabetli farelerin böbreğinde kalbindin miktarında artış olduğu gösterilmiştir. Diyabetik nöropatide kalbindinin rolü bir netlik kazanmamakla birlikte, yapılan çalışma sonucunda, proksimal tübülde de kalbindin eksprese edilebildiği düşünülmüştür (Kuo-How Huang ve ark., 2019).

4.3.6 Parkinson Hastalığı ve Kalbindin

Parkinson hastalığında, substantia nigra (pars compacta) bölgesinde görülen dopaminerjik nöron kaybı, bu bölgenin çoğunlukla ventro-lateral kısmında meydana gelmiştir. Dorso-medial ve ventral tegmental bölgede ise nöronlar daha çok direnç göstermektedirler. Bu bölgedeki dopaminerjik nöronların kalbindin pozitif kaynaklı olması nedeniyle hasara karşı daha dirençli etki oldukları gösterilmiştir (Rintoul ve ark, 2001). MPTP modeli maymunlar üzerinde yapılan çalışmada, viral vektör yoluyla substantia nigra ve striatum bölgesine kalbindin enjekte edilmiştir. Motor bulgulara düzelmeler gözlemlenirken, nigrostriatal yolak üzerinde de TH pozitif nöron sayısında artış gözlemlenmiştir (Inoue ve ark, 2018).

Yapılan çalışmalarda kalsiyum regülasyon bozukluğunun yaşlanma ve nörodejenerasyonda önemli bir rol oynadığı vurgulanmaktadır (Kumar ve ark, 2009). Kalbindin-D28k (kalbindin1, calb1) hızlı intraselüler bir kalsiyum tamponlayıcı olarak görev almaktadır.

Ventral tegmental alan'daki dopaminerjik nöronlarda substantia nigra pars compacta'ya kıyasla daha fazla miktarda kalbindin eksprese olmaktadır. Bu oran yaklaşık 2-3 kat daha fazladır (Poulin ve ark., 2014). Kalbindin, ventral tegmental alandaki nöronlarda kalsiyum bağımlı salınımı limitlemektedir. Bu durumda, buradan gelen aksonlar özellikle ventral striatum'a aksonlarını gönderdiği için, striatum'daki dopamin salınımı etkilenmektedir (Pan ve ark., 2012).

VTA'da bulunan kalbindin pozitif nöronların üçte biri kalbindin ile birlikte vesicular glutamat transporter 2 (vGluT2) da eksprese etmektedirler. Bir kısmı nucleus

accumbens'i inerve ederken, aynı bölgedeki dopaminerjik nöronları da regüle etmektedirler (Mongia ve ark., 2019).

Ayrıca kalbindin pozitif nöronlar, A11 olarak isimlendirilen ve dopaminerjik nöron içeren posterior hypothalamus'ta da bulunmaktadır. Bu nöronlar, omuriliğe de aksonlar gönderebilmektedir (Yamaguchi ve ark., 2021).

Nucleus accumbens'teki L tipi kalsiyum kanallarının fonksiyonu kalsiyum artışını takiben baskılanmaktadır. Kalbindin ise kalsiyum artışında, kalsiyumu bağlayarak, L tipi kalsiyum kanallarının nucleus accumbens'teki dopamin salınımına etkisini sınırlandırmaktadır. Ayrıca kalbindin, beyinde başka bölgelerdeki kalsiyum kanallarının da fonksiyonunu limitleyebilmektedir (Katherine ve ark., 2015).

Yüksek kalsiyum afinitesi sayesinde, kalbindin kalsiyumu bağlar ve fazla kalsiyum alımıyla doymuş forma geçer. Kalbindin, kalretinin ve parvalbumin ekspresyonunun Parkinson hastalığında nöroprotektif etki oluşturabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (rs1805874) olarak kalbindin-1 geninde Japon popülasyonunda PD için yeni bir duyarlılık odağı olabileceği ortaya koyulmuştur.

Ayrıca, Parkinson hastalığında, alfa synuclein birikimi gözlemlenen nöron gövdesinde bulunan kalsiyum bağlayıcı protein miktarının azaldığını vurgulamışlardır (Mizuta ve ark., 2008).

Devamında yapılan başka bir çalışmada ise bu kez beyaz ırka ait bir grup hasta üzerinde incelenme alınmıştır. Parkinson hastalığı olan bir grup hasta ile sağlıklı gruplar kıyaslanmıştır ve bu grup hastada rs1805874 calbindin-1 geni ile Parkinson hastalığı arasında herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir (Ortolozza ve ark., 2010). Parkinson hastalığının oluşmasında etkin olan mekanizmaların araştırılması sonucunda, kalsiyum seviyelerindeki değişimin hastalığın oluşma riskini ciddi şekilde artırdığı ortaya çıkmıştır.

Sitoplazma kalsiyum seviyesi, dopamin ve alfa synuclein seviyelerinin birbiriyle entegre şekilde çalışması, substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların hasarlanmasında etkili bir rol oynamaktadır (Mosharov ve ark., 2009).

Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı gibi hastalıkların patogeneğinde IMPaz inhibisyonunun otofajı artırdığı ve peptidlerin kleransı gözlemlenmektedir. Kalbindinin inhibitör etkisi, terapötik bir etki oluşturabilmektedir (Sarkar ve ark., 2005). Kalbindinin düşük seviyeleri, apoptoza karşı direnç gösteren nöronlar olan kalbindin pozitif nöronları veya kalbindinin ekspresyonu azalması Alzheimer hastalığında karşımıza çıkmaktadır. Yaşa ve hastalığın ilerleyişine göre de değişebilmektedir (Palop ve ark., 2003).

Mikroglial Cav 2.2 kalsiyum kanallarının artmış aktivitesi yaşlı farelerde inflamasyona sebep olmuştur. Bundan dolayı bu kanalı bloke etmek yaşlı bir beyinde iyileştirici bir etki oluşturmaktadır (Huntula ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada, striatumu esasen inerve eden aksonların Girk2 pozitif olup, substantia nigra pars compacta'da yer alan dopaminerjik nöronların aksonları olduğu, VTA'da yer alan kalbindin pozitif dopaminerjik nöronların ise frontal korteks ve ön beyin'de yer alan yapılara projekte olduğu gösterilmiştir (Thompson ve ark., 2005).

Kalsiyum bağlayıcı proteinler arasında yer alan kalbindin, kalsiyum alınımları, L tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalları üzerinden modüle etmektedir ve nöronal intraselüler kalsiyum homestazını korumaktadır (Xu ve ark.,2014, David Lee ve ark.,2006).

4.3.7 Parkinson Hastalığı ve Kalsiyum Kanalları

SNe'deki dopaminerjik nöronlar selektif şekilde hasarlanmaya daha duyarlıdır çünkü düşük ritmik aktivite ve yüksek miktarda dendritik dallanmaya sahiptir. Cav1.3 kaynaklı kalsiyum alınımları, dopamin salınımları için gerekli çünkü bu fonksiyonu yerine getirebilmesi ve akson ile dendritler için gerekli olan ATP'nin sağlanması için yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duymaktadır (Cristina Catoni ve ark., 2019).

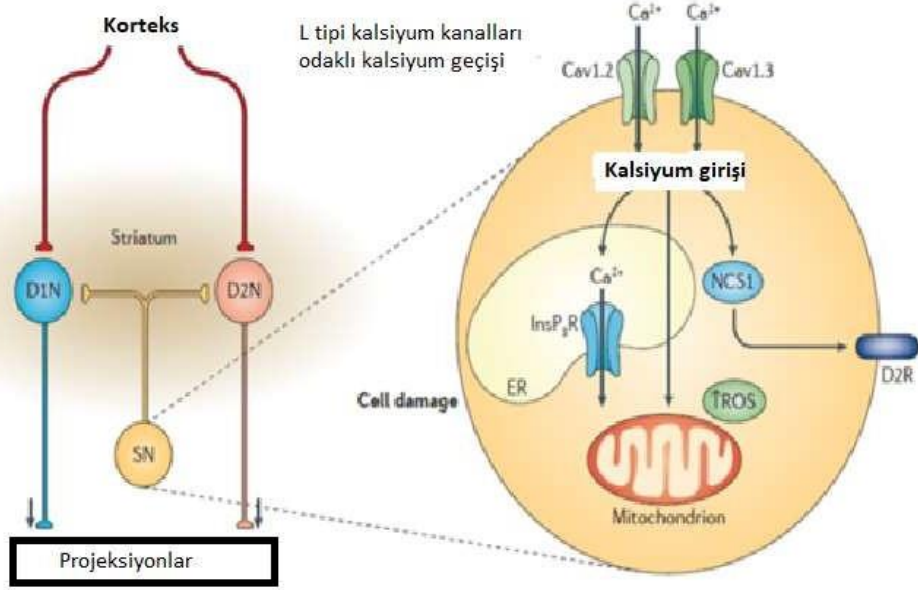
Endoplazmik retikulum membranında bulunan STIM denilen moleküller kalsiyuma duyarlı olduğundan, buradaki kalsiyum homestazındaki dengesizlik, seçici olarak SNe'deki dopaminerjik nöron kaybına yol açmaktadır (Stefani ve ark.,2012).

Ateşlenen nöronlarda kalsiyumun hücre içine alınması, hücre gövdesi, sinir terminalleri ve dendritlerde bulunan voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VGCCs), NMDA (N-methyl-D aspartate) ve AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) gibi glutamat ionotropik reseptör kanalları aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Membrandaki depolarizasyon aracılığıyla, kalsiyum-seçici porları açılmaktadır ve içeriye kalsiyum girişi başlamaktadır. Bu kalsiyum iyonları haberci olarak görev alırken, hücre içi sinyal mekanizmasını etkileyebilmektedir. Kalsiyum kanalları, nöronlar gibi hücrelerde dışarıdan içeriye doğru olan kalsiyum akışında başrolde (Petegem ve ark., 2006).

Hücre içine kalsiyum girişinde rol oynayan 3 tip voltaj kapılı L tipi kalsiyum kanalı tanımlanmıştır. Bunlar CaV1, CaV2 ve CaV3 olarak adlandırılmıştır. CaV1 kanalları 4 alt tipten oluşur: CaV1.1, CaV1.2, CaV1.3 ve CaV1.4. Bu kanallardan CaV1.2 ve CaV1.3 nöronlarda ve esasen somato-dendritik bölgelerde bulunur. CaV1.2 merkezi sinir sistemindeki kalsiyum kanallarının 90%'nı oluşturmaktadır (Liss ve ark, 2019).

L-tipi kalsiyum kanalları mitokondrial oksidatif strese sorumludur. Son zamanlardaki çalışmalarda, L-tipi kalsiyum kanallarının, özellikle CaV1.3 kalsiyum kanallarının seçici olarak substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Putzier ve ark, 2009; Poetschke ve ark, 2015), (Şekil 13).



Sekil 13: L tipi kalsiyum kanalları ve Parkinson hastalığında görülen dopaminerjik nöronların dejenerasyonundaki rolü (Gerald W. Zamponi ve ark., 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır).

SNc'deki dopaminerjik nöronlar, striatum'da bulunan D1 reseptör ekspres eden nöronları ve dopamin D2 reseptör ekspres eden nöronları inerve etmektedir. SNc'deki nöronların ateşlenme aktivitesi esasen Cav1.3, bir miktar da Cav1.2 isimli kalsiyum kanalları tarafından modüle edilmektedir. Cav1.3 kanalının tekrarlı şekilde aktif olması kalsiyumun içeriye alınmasını sağlar ve ER'den kalsiyum bağımlı kalsiyum salınımını sağlayarak mitokondria'da kalsiyum seviyesinin yükselmesini ve ROS üretimini artırır.

Bunun sonucunda hücre hasarı ve dopaminerjik nöron kaybı gerçekleştiğinden, striatum'un dopaminerjik inervasyonu azaltmaktadır. Bunun yanında, Cav1.3 kanalının aktivitesi neuronal calcium sensor 1 (NCS1)'in aktivasyonu yoluyla D2 reseptör ekspresyonu artışına bağlı olarak düzenlenmektedir (Gerald W. Zamponi ve ark., 2015).

Sıçan beyininde, substantia nigra pars compacta'da bulunan nöronların %70'i dopaminerjik, %29'u GABAerjik ve yaklaşık %1-2 oranındaki kısmı ise glutamaterjik tipte nöronlardır (Nair- Roberts ve ark., 2008). MPTP enjeksiyonu ve meydana gelen dopaminerjik nöron kaybı sonrasında artmış Cav1.342 ve Cav1.342A mRNA ekspresyonuyla birlikte gözlemlenmiştir. Kalsiyum kanalları mRNA'sı diğer nöron çeşitlerindeki değişimlerden etkilenmemiştir.

L-tipi kalsiyum kanalları (Cav1) normal endokrin, beyin, duyu ve kas fonksiyonları için gerekli komponentler arasındadır (Hoffmann ve ark., 2014). Cav1.2 ve Cav1.3 kalsiyum kanalları substantia nigra pars compacta'daki nöronlar tarafından eksprese olmaktadır (Sun ve ark., 2017).

Cav1 alt tiplerinin önemli fonksiyonlarından birisi aksiyon potansiyelinin başlatılmasının kontrol edilebilmesi için dendrit kalsiyum girişine izin vermektir. Eğer kalsiyum kanallarının ekspresyonu artmışsa, çoğunlukla nöronal döngüdeki değişen aktivitenin kompanse edilmesi kaynaklı olmaktadır.

Parkinson hastalığında striatum denervasyonu bu aktiviteyi bozduğundan kanalların ekspresyon artışı, Parkinson hastalığında karşımıza çıkmaktadır (Higley and Sabatini, 2012). İntraselüler kalsiyum regülasyonu substantia nigra ve VTA'da bulunan nöronlar arasında farklı şekilde gerçekleşmektedir (Thompson ve ark., 2005).

Kalsiyum kanallarının alt tipleri nöronlarda farklı fonksiyonlarla ilişkili olabilmektedirler. Özellikle Cav1.2 ve Cav2.2 isimli kalsiyum kanalları çok net olarak farklı fonksiyona sahiptirler. Cav1.2 isimli kalsiyum kanalı esasen nöronda hücre gövdesinde gen ekspresyonundan sorumludur. Cav2.2 isimli kalsiyum kanalı ise, akson terminallerinde yer almaktadır ve nörotransmitterlerin salınımını kontrol etmektedir (McDonough, 2004).

4.3.8 Parkinson hastalığı ve kalsiyum kanal blokerleri

Antihipertansif ilaçlara, özellikle kalsiyum kanal blokerlerine olan ilgi, nitrik oksit, tümör nekroz faktörü-alfa ve interlökin-1 beta sentezini inhibe eden ilaçların oksidatif stresi ve nöroprotektif olabilen inflamatuvar yanıtı azalttığına gösterilmesi üzerine daha da artmıştır. Hayvan deneyi modellerinde voltaj kapılı kalsiyum kanallarının alt tipi olan Ca(V)1.3 isimli kanal dopaminerjik nöronları hasara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Hurley ve ark., 2013).

Hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesine ek olarak, oksidatif stres artışı da α -sinüklein agregasyonunu oluşumuna etki eder. Kalsiyum kanal blokerleri, kalsiyum akışını bloke ederek PD'nin ilerlemesini önleyebilmektedir veya durdurabilmektedir (Vekrellis ve Stefanis, 2012).

Substantia nigra'daki dopaminerjik nöronlar, kalp pili aktiviteleri için (CaV1.3) isimli L tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarına sahiptir. Kang ve ark (2012), Ca (V) 1.3 L tipi kanalları seçici olarak antagonize ederek, Parkinson hastalığında dopaminerjik nöron kaybını minimum yan etkilerle azaltmak için bir çözüm sağlanabileceğini vurgulamışlardır. (Kang ve ark., 2012).

Bu sonuçlar da hücredeki serbest Ca²⁺ miktarını modüle eden ilaçlar kullanarak potansiyel bir terapötik hedef sağlanabileceğini ortaya koymuştur. Bazı spekülatif mekanizmalar, iskemik serebrovasküler lezyonlara, artan oksidatif strese ve Parkinson hastalığına yol açan ve sıvı-elektrolit dengesini düzenleyen merkezi renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) modülasyonuna yol açabilen tedavi edilmemiş kronik hipertansiyonu içerir (Qiu ve ark., 2011).

Parkinson hastalığı ile kalsiyum kanalları arasındaki bağlantı epidemiyolojik çalışmalarda antihipertansif ilaçlar olan L-tipi kalsiyum kanal blokeri dihidropridinleri kullanan hastalarda Parkinson hastalığına yakalanma riskinin azaldığını gösteren sonuçlarla güçlenmiştir (Cheng ve ark, 2007; Wang ve ark, 2012; Branch ve ark, 2014).

Lipofilik bir ajan olan isradipinin, transgenik Alzheimer modeli farelerde, 60 gün boyunca subkütan tedavi uygulanması sonrasında beta amiloidin yaptığı etkileri

azalttığını gözlemlemişlerdir ve ilerleyen klinik çalışmalar için hastalığın tedavisinde terapötik bir yaklaşım olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Anekonda ve ark, 2011).

En sık görülen nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığına ilişkin literatürde birçok çalışma mevcuttur. İntrasellüler kalsiyum artışı gözlemlenen bu hastalık üzerine de kalsiyum kanal blokerlerinin etkisinin araştırıldığı çalışmalar yer almaktadır. Son yıllarda, yapılan birkaç çalışmada, kalsiyum kanal blokerleri ve kalsiyum bağlayıcı proteinler arasındaki ilişki de araştırılmıştır. MPTP modeli farelerde, striatumdaki kalbindin seviyesinde azalma olduğu görülmüştür. Nimodipin enjeksiyonu sonrasında ise kalbindin seviyesinin normale döndüğünü vurgulamışlardır (Singh ve ark, 2017).

Kan beyin bariyerini geçebilen dihidropridin kalsiyum kanal blokerleri, Parkinson hastalığı oluşturan hayvan deneyi modellerinde, nörotoksik ajanlara karşı nöroprotektif etki göstermiştir ve hastalığın gelişme riskini de azalttığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir (Mullapudi ve ark., 2016). Klinik çalışmalar ve meta analiz sonuçları, kan-beyin bariyerini geçebilen voltaj kapılı kalsiyum kanal blokerlerinin kullanımının Parkinson hastalığına yakalanma riskini yaklaşık %30 oranında düşürdüğünü göstermektedir (Lang ve ark, 2015).

Kalsiyum ile aktive olan nötral proteaz seviyelerindeki artış, ölüm sonrası incelenen Parkinson beyinlerinde bulunan dopaminerjik nöronlardaki kalpain aktivitesindeki ve ekspresyonundaki artışla korelasyon göstermektedir (Mouatt-Prigent ve ark., 2000). Bu nedenle, nimodipin isimli kalsiyum kanal blokeri, dopaminerjik nöronlardaki MPP+ ve MPTP-enjeksiyonunun yaratmış olduğu kalpain artışını etkili bir şekilde bloke etmektedir. Ayrıca, hücrelerdeki düzensiz kalsiyum artışını sınırlayarak kaspaz-3 aktivitesini bloke etmektedir. Bu sonuçlar da nimodipin enjeksiyonunun kalpain seviyesini azaltarak, dejenerasyona karşı nöroprotektif bir etki oluşturabileceğini göstermektedir.

4.3.9 Parkinson Hastalığı ve İsradipin

İsradipin, yüksek kan basıncı tedavisinde kullanılan dihidropridin grubuna ait bir kalsiyum kanal blokeridir. Deneysel Parkinson modellerinde yapılan çalışmalarda, konsantrasyona bağlı koruyucu bir etki göstermiştir. 2019 yılında sonuçlanan faz 3 klinik çalışmada, isradipin tedavisi UPDRS olarak bilinen Parkinson hastalarını değerlendirme skalasında ve genel semptomlarda anlamlı bir etki göstermemiştir. Bunun devamında, 36 aylık bir süreç takibi yapılarak, doza bağımlı değişim analizi hedeflenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda ise yüksek miktarda isradipin kullanımının, hastalık tedavisine ihtiyaç duyma riskini azalttığı ortaya koyulmuştur fakat hastalığın ciddi seyirinde ve semptomlarında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir (Charles ve ark., 2021).

İsradipin dihidropridin grubunda yer alan bir kalsiyum kanal blokleri olup, kan beyin bariyerini geçebilmektedir. İsradipinin, Parkinson hastalığı üzerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı Faz 3 klinik çalışmada, hasta grup ve plasebo grup arasında yapılan motor ve kognitif testlerde, klinik progresif seyirde anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir. Farmako-kinetik çalışmalarda, 3.faz'daki dozun ayarlanmasıyla ilgili farklı çalışmalar yapılabileceği ve bu veriler doğrultusunda pre-klinik olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

L tipi kalsiyum kanalları, kardiyovasküler, muskuloskeletal ve sinir sisteminde yaygın şekilde bulunmaktadır ve alt tip olarak Cav1.2 formuyla bulunmaktadır (Liss ve ark., 2019). Chan ve ark (2007), farelerde 1methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) ile oluşturulan Parkinson modelinde L-tipi Cav1.3 kalsiyum kanal blokleri olan isradipin'in dopaminerjik nöron aktivitesinde de iyileşmeye neden olduğu yönünde bir sonuca varmıştır.

Geçmiş yıllarda yapılan bir çalışmada, 6-OHDA enjekte edilen intra-striatal enjeksiyon sonrasında sistemik olarak verilen isradipinin, substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronlara karşı koruyucu bir etki göstermediği ortaya koyulmuştur (Ortner ve ark., 2017).

İlerleyen çalışmalarda ise nimodipin isimli kalsiyum kanal blokleri, TH pozitif nöronlardaki kaybı azaltmış ve striatumdaki mitokondride ROS üretiminde azalmaya neden olmuştur (Singh ve ark, 2016).

Dihidropridin grubuna ait ajanların çoğu kısmı özellikle Cav1.2 isimli kalsiyum kanalının aktivasyonunu inhibe etmektedir. İsradipin ise diğer grup üyelerinden farklı olarak, Cav1.2 ve Cav1.3 isimli kalsiyum kanallarının her ikisine de aynı afiniteye sahiptir (Sinnegger-Brauns ve ark., 2009).

İsradipinin yarılanma ömrünün eliminasyonunu uzatan faktörler arasında yer alan yaş alma süreciyle oluşan anatomik ve fizyolojik değişimler önemli rol oynamaktadır. İsradipin, yüksek oranda lipofilik ve kan beyin bariyerini geçebilen bir ajan olduğundan dolayı, plazmadaki konsantrasyonu aşmaktadır ve beyinde de plazma konsantrasyonu ile benzer değerlerde olduğu gösterilmiştir (Anekonda ve ark., 2011).

İsradipin, kan beyin bariyerini geçebilen ve yüksek kan basıncı tedavisinde kullanılan dihidropridin grubuna ait bir kalsiyum kanal blokleri olup, yukarıda da bahsedilen deneysel Parkinson modelleri çalışmalarında, konsantrasyona bağlı koruyucu bir etki gösterdiği ortaya koyulmuştur. Bu bulgular sonrasında, klinik fazda kullanmaya yönelik 2019 yılında gerçekleştirilen faz 3 klinik çalışması yapılmış ve sonuçlar bir rapor olarak yayınlanmıştır. Hasta gruplarına uygulanan isradipin tedavisi sonrasında UPDRS olarak bilinen Parkinson hastalarını değerlendirme skalasında ve genel olarak motor ve kognitif semptomlarda klinik seyirde anlamlı bir iyileştirici etkisi gösterilmemiştir.

2019 yılı sonrasında, isradipinin Parkinson hastalığı üzerine etkisi farmakokinetik çalışmalarda araştırılmaya devam etmiştir. Bu bağlamda, Faz 3 çalışmasını takiben yapılan yeni bir çalışmada, daha yüksek isradipin dozu alan grupta parkinson tedavisine ihtiyaç duyma riskinde azalma gözlemlendiği belirtilmiştir.

İsradipin tedavisi alan gruptaki klinik değerlendirmede parkinson hastalığının seyriyle ilgili bir değişime neden olmadığı fakat ihtiyaç duyulan levodopa dozununun azaldığı ve parkinson tedavisinin başlanmasına ihtiyaç duyulan süreyi uzattığı sonuçlarla gösterilmiştir (Venuto ve ark., 2021).

Bu çalışmayı takiben, detaylı bir analiz yapılan 2022 yılına ait yeni bir çalışmada, 52 hafta boyunca süreç takibi yapılan 10mg/gün isradipin uygulaması sonrasında, UPDRS skorlarında anlamlı şekilde farklılık görülmüştür. Çalışma sonucunda, isradipin tedavisi maruziyetinin erken fazda hastalığın progresyonunu yavaşlattığını ileri sürmüşlerdir (D James Surmeier ve ark., 2022).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1.Kullanılan Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmada kullanılacak Wistar albino sıçanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (DEHAMER) temin edilmiştir. Çalışma, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay almıştır (protokol no: 22.2021.mar). Deney için ortalama 250-300 gram ağırlığındaki Wistar erkek albino sıçanlar kullanılmıştır. Tüm hayvanlar uygun kafesler içinde, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, standart sıçan yemi ile beslenip musluk suyu içmektedirler.

Deney prosedürümüz 2 ayrı çerçevede oluşturulmuştur. 1. aşamasında hayvanlarda 6-OHDA lezyon öncesi ve sonrası süreç takibi yaparak beyinde ve kandaki kalbindin analizini yapabilmek amacıyla 1002 TÜBİTAK projesine başvurulmuştur ve kabul alınmıştır. 6-OHDA gruplarında ve kontrol grupları 10 hafta süresince belirlenen aralıklarla kandaki ve beyindeki kalbindin miktarı ölçülmüştür. Lezyon öncesinde, lezyondan 2 saat sonrasında ve 2., 5. ve 10. haftalarda kandaki kalbindin düzeyi gözlemlenmiştir. Beyindeki kalbindin düzeyi ise 5. ve 10. haftalarda sıçanlar dekapite edilerek bakılmıştır.

DENEY PROSEDÜRÜNÜN 1.KISMI

Çalışmamızda, nigro-striatal yolağa 6-OHDA enjekte edilerek bazal çekirdeklerde (substantia nigra başta olmak üzere) dopamin eksikliğine bağlı Parkinson modeli oluşturulmuştur. Kontrol ve lezyon gruplarına ait olan sıçanlardan, lezyon öncesi ve sonrasındaki 2. saatte ve devamında 2., 5. ve 10.haftalarda kuyruk kanı alınmış ve kandaki kalbindin düzeylerine bakılmıştır. Sıçanlar literatürdeki bilgiler ışığında 2. saat, 2. hafta ve 5. hafta erken dönem 10. hafta geç dönem Parkinson modeli olarak kabul edilmiştir.

Erken dönem olanlar kontrol, 6-OHDA ve yalancı opere grup olarak, geç dönem olanlar da yine kontrol, 6-OHDA ve yalancı opere grup olarak isimlendirilmişlerdir. Erken döneme ait sıçan grubunda 5.haftada, geç dönem grubuna ait sıçan grubunda ise 10.haftada dekapitasyon ve perfüzyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3. ve 5.haftalarda lezyon oluşumunu gözlemlemek için 6-OHDA grupları için rotasyon testi uygulanmıştır. Sonrasında ise 5. ve 10.haftada beyinler çıkartılarak, SNC 'de dopaminerjik nöronların gözlemlenmesi için TH immunohistokimya prosedürleri ve beyindeki kalbindin seviyesini analiz etmek için western blot teknikleri uygulanmıştır. Alınan kanlara, ELISA prosedürü uygulanarak, kalbindin seviyeleri değerlendirilmiştir.

Tüm beyinde kalbindin seviyesini gözlemlemek için ise 6-OHDA lezyonu oluşturulan gruptaki sıçanlardan 3'er hayvan perfüzyon yapılmadan dekapite edilmiş, beyinleri çıkartılarak, western blot yöntemiyle ile protein düzeyi tayini yapılmıştır. Bu gruplardan birer hayvan ise kardiyak perfüzyon yapılarak, beyinler çıkartılmış ve TH immunohistomkimya prosedürü uygulanmıştır. Tüm gruplardan ise kan alımı sonrasında, kanda kalbindin düzeyi tespiti için ELİSA prosedürü uygulanmıştır.

Deney Grupları

Erken Dönem (5 hafta)

1. Kontrol grubu (n=4)
2. Yalancı opere grubu (n=4)
3. 6-OHDA enjeksiyonu alan grup (n=5)

Geç dönem (10 hafta)

4. Kontrol grubu (n=4)
5. Yalancı opere grubu (n=4)
6. 6-OHDA enjeksiyonu alan grup (n=5)

Rotasyon Testi:

6-OHDA enjeksiyonunu takip eden 3.haftada, 5.haftada ve 10. hafta sonunda apomorfin (0,05 mg/kg, subkütan) rotasyon testi uygulanmıştır. Tek taraflı 6-OHDA enjeksiyonu yapılan sıçanlara, apomorfin gibi dopaminerjik bir ilaç uygulandığında, lezyonlu ve lezyonsuz taraf arasındaki dengesizliğe bağlı olarak, asimetric dönme hareketi gözlenmektedir. Bu dönme hareketi, substantia nigra pars compacta'daki lezyonun derecesi ile ilgili sağlıklı bilgi vermektedir. Test öncesi apomorfin; 5 mg/ml stok olarak hazırlanıp, içerisine 1 mg askorbik asit konulmuştur. Teste başlarken sıçanlara 0,05 mg/kg/ml apomorfin subkütan olarak uygulanmıştır.

Pleksiden yapılmış şeffaf daire şeklindeki düzenekler içerisine yerleştirilen sıçanlar, 30 dakika boyunca gözlemlenmiştir ve bazal hareket durumlarıyla birlikte kontralateral tarafa dönüşleri not edilmiştir. Tüm testler aynı saat dilimleri arasında yapılarak sadece belirgin rotasyon hareketleri not edilerek analiz edilmiştir (Chagniel ve ark., 2012).

Kan alımı:

Sıçanlar eter isimli anestezi madde ile uyutulmuştur. Sıçanın lateral kuyruk veninden iğne ile 20-30 derecelik açıyla girilerek 0.5 ml kadar kan alınmıştır. Eğer, damar görünür değilse, kuyruk ılık suya (40 °C) daldırılarak damarın görünür hale gelmesi sağlanmış ve akabinde de vazodilatasyonu arttırmak için kuyruk 5-8 dakika 37 °C'de bekletilmiştir (Parasuraman ve ark., 2010).

Sakrifikasyon:

6-OHDA gruplarından birer hayvan, anestezi altında %4'lük paraformaldehit içeren 0.05 M fosfat tamponlu salin (PBS) ile transkardiyak perfüzyon yapılmıştır. Perfüzyon işlemi sonrası beyinler çıkartılarak bir gece boyunca %4'lük formaldehit solüsyonunda +4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra, beyinler %30'luk sükröz içeren solüsyona alınmıştır. Sonrasında ise TH immunohistokimya prosedürü uygulanmıştır. Diğer gruplardaki hayvanların beyinler ise dekapitasyon yöntemiyle çıkartılmış ve bu beyinlerde kalbindin tayini için western protokolü uygulanmıştır.

Western Blot Protokolü

Western emdiriminde kullanılan antikorlar:

- Alkalen fosfotaz eşlenik tavşan monoklonal Ig
- Anti-Kalbindin
- Anti-Beta actin poliklonal antikor, invitrogen, PA1-16889
- Anti β aktin antikor

Western emdirimi gereçleri:

- Transfer membranları Invitrogen
- Invitrogen jel elektroforez düzeneği (dikey) Invitrogen
- I-Blot2 transfer cihazı Invitrogen

Protein homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler:

Ripa tamponu

Proteaz inhibitörler

Hücre lizatlarının kazırlanması

Gerekli koşulda hazırlanıp -80 °C'de saklanan dokular RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer, Ripa-100, ECO-TECH) tamponunda proteaz inhibitörleri varlığında bıçaklı homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Protein örnekleri Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

Protein Miktar Tayini

Protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlenmiştir (Lowry, Rosebrough, Farr, Randall 1951). Pierce™ Modified Lowry Protein Assay Kit protokolüne uygun olarak ölçümler yapılmıştır (Synergy H1 spektrofotometrede yapılmıştır).

Elektroforez

4x örnek tamponu ile karıştırılan protein örnekleri (30 µg) 100 °C'de 3-5 dakika denature edilmiştir. Örnekler, %12'lik SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi) jeline yüklenerek elektroforez sıvısı içinde, 150 Volt'da 1,5 saat yürütülmüştür. Elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer işlemi yapılmıştır.

Elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer

Deneylemizde Iblot2 transfer cihazına uygun (#IB301002) transfer membranları kullanılacaktır. Transfer IBlot2 cihazında 7 dakikada yapılacaktır. Membranlar ponceau S boyası ile boyanıp transferin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir.

Western emdirimi analizi

Membranlar BSA içeren TBS-T blok tamponunda oda sıcaklığında 4 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Blok solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membranlar belirlenen konsantrasyonlarda anti-calbindin ve β aktin (markaları) proteini antikorları ile gece boyu etkileştirilmiştir. β aktin içsel kontrol olarak kullanılacaktır. Ardından TBS-T tamponuyla 3 kez 10'ar dakika yıkanmıştır.

Membranlar alkalen fosfataz eşlenik tavşan anti-keçi IgG (markası) ile 1 saat etkileştirildikten sonra TBS-T tamponuyla 3 kez de 10'ar dakika yıkanmıştır. Primer antikor ve sekonder antikor ile etkileştirilen membran BCIP/NBT renk geliştirici tampon ile renklendirilecektir.

Densitometrik analizler ImageJ programı kullanılarak yapılacaktır (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). GraphPad programında istatistiksel analizler yapılacaktır.

Tirozin Hidroksilaz İşaretleme Protokolü

6-OHDA gruplarından alınan iki adet fikse edilen beyinlerden kayar mikrotomda 40 µm'lik koronal kesitler alınmıştır. Substantia nigra bölgesini içeren kesitler PBS'te

5'er dakika 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra, %3'lük H₂O₂ ve 80 ml metanol içeren solüsyonda 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve sonrasında PBS'te yıkanma işlemi yapılmıştır. Kesitler bloke edici serum solüsyonunda (10 ml PBS, 1ml normal keçi serumu, 0,1 g sığır serum albumin (BSA) ve 30 µl Triton™ X-100 (Merck, Darmstadt, Almanya) solüsyonunda inkübe edilmiştir.

Gece boyunca anti-tirozin hidroksilaz antikoru ile (Pel freez /cat no: P40101, in 1:500 10 ml taşıyıcı solüsyonda inkübe edilmiştir. Daha sonra, 150 µl biotinlenmiş anti-rabbit IgG sekonder antikor (Vector lab) içerisinde 2 saat tutularak sonrasında PBS ile yıkanmıştır. 1 saat boyunca avidin-biotin kompleks (Vector lab) ABC kitinde bekletilmiştir. İmmünoreaktivitenin görüntülenmesi için kesitler DAB (10 ml PBS, 5 mg DAB, 100 µl %3 H₂O₂) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Kesitler lamlara alınarak kurutulmuş ve kapatılmıştır. TH pozitif nöronlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Deneyin ikinci aşaması

Çalışmada kullanılan Wistar albino sıçanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (DEHAMER) temin edilmiştir. Çalışma, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay almıştır (protokol no: 10.2019.mar). Deney için ortalama 250-300 gram ağırlığındaki, Wistar erkek albino sıçanlar kullanılmıştır. Tüm hayvanlar uygun kafesler içinde, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, standart sıçan yemi ile beslenip musluk suyu içmektedirler.

Deneyimizin ikinci aşamasında, ilk çalışmamızın sonucundan yola çıkarak, literatürde de Parkinson hastalığının patolojisinde son dönemde öne çıkan kalbindin ve yine son deneysel ve faz 3 çalışmaları sonuçlanan isradipin isimli kalsiyum kanal blokerinin 4 hafta boyunca subkütan enjeksiyonu yapılarak kandaki kalbindin düzeyi ve striatumdaki kalbindin pozitif nöronlara etkisi araştırılmıştır.

Çalışma grupları:

- 1.İntakt, naif grup- (cerrahi yapılmayan, tedavi uygulanmayan kontrol grubu), (n=4)
- 2.Parkinson + DMSO- (6-OHDA enjeksiyonu yapılan ve isradipinin çözücüsü olan DMSO uygulanan grup), (n=4)
- 3.Parkinson + isradipin- (6-OHDA enjeksiyonu yapılan ve isradipin uygulanan grup), (n=4)
- 4.Parkinson (6-OHDA enjeksiyonu yapılan grup), (n=4)

5.2 Doku Hazırlama

Kullanılan sıçanlar 250-300gr ağırlığında sıçanlar olarak seçilmiştir. Kontrol (n=4) grubundaki sıçanlar, hiçbir lezyon yaratmadan sağlıklı grup olarak perfüzyonları, derin ketamin anestezisi (100mg/kg) altında trans-kardiyak yöntemle sırası ile 500ml %0,9 Serum Fizyolojik (SF) ve 500 ml 0.1 M PBS içerisinde %4 Paraformaldehit solüsyonları kullanılarak perfüzyon yapılmış ve beyinler bütün halde çıkartıldıktan sonra 1 gecelik post-fiksasyon sonrasında, %30'luk sükröz solüsyonu içerisinde dokunun osmolaritesini ayarlamak için çökene kadar saklanmıştır.

5.3 Parkinson Modeli Oluşturulması

Parkinson hastalığının mekanizması ve tedavisine yönelik yapılan deneysel çalışmalarda en sık kullanılan hayvan modellerinden birisi 6-hidroksi dopamin (6-OHDA) isimli nörotoksik ajanın stereotaksik yöntemle nigro-striatal yolağa, striatum'a ya da SNc'ye intrakranial enjeksiyonu ile oluşturulur (Ungerstedt, 1968; Mendez ve ark.,1975). 6-OHDA, katekolaminerjik nöronları seçici olarak hasarlayan bir nörotoksindir ve nigral dopaminerjik nöronların progresif olarak kaybına neden olur (Kienzl ve ark., 1995).

6-OHDA uygulaması sonrasında apomorfın rotasyon testi ve immunohistokimyasal prosedürler ile hayvanlardaki lezyonun oluşumu ve derecesi kontrol edilebilmektedir (Lin ve ark., 2018).

5.3.1 6-OHDA'nın Hazırlanması

5 mg 6-OHDA %0,2 askorbik asit içeren 2,5 ml steril salin içinde çözündürülmüş ve hızla bozulan bir madde olması nedeniyle alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunma sağlanmıştır. Enjeksiyon öncesinde buz ile dolu bir kutu içinde saklanmış ve Parkinson hastalığı modeli oluşturulacak wistar sıçanlara cerrahi öncesinde ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (50mg/kg) intraperitoneal olarak verilmiştir. Her sıçan için kafa tıraşı yapılarak motorize stereotaksi (Neurostar) cihazına yerleştirilmiştir ve stereotaksik çerçeveye yerleştirilen hayvanların kafa kısmındaki deri ve derialtı yapılar ile periosteum bistüri yardımıyla sağ-sol yanlara doğru uzaklaştırılmıştır.

Neurostar motorize stereotaksi aleti ile sağ fasciculus medialis telencephali ön (AP: -2.1; L: 2.0; V: -7.8) ve arka (AP: -4.3, L: 1.5, V: 7.8) bölgesine sırasıyla 4'er µl, toplam 8µl olmak üzere 6 -OHDA (2 µg/µl; %0.9 NaCl, %0,2 askorbik asit solüsyonu içerisinde çözülmüş) ön ve arka koordinatlara 1µl/dk hızla enjekte edilmiştir ve işlemin bitimine yakın, 5 ml serum fizyolojik (%0,9 NaCl) subkütan enjeksiyon ile sıvı takviyesi yapılmıştır. Sonrasında kafa derisi 2/0'luk ipek ile suture edilip, sıçanlarda işaretleme işlemleri yapılarak gruplara ayrılmıştır.

5.4 Rotasyon Testi:

Deneyimizin ikinci kısmında Parkinsonlu olup DMSO, isradipin ve hiçbir enjeksiyon almayan sıçanlara 6-OHDA enjeksiyonunu takiben 21. ve 28.günlerde apomorfın (0,05 mg/kg, subkütan) rotasyon testi uygulanmıştır.

5.5 İsradipin Enjeksiyonu:

6-OHDA enjeksiyonu takiben ilgili gruplara, isradipin (2mg/kg, subkütan) (Schuster, 2009) enjeksiyonu yapılmaya başlanmıştır. İsradipin, DMSO içerisinde çözündürülerek enjekte edilmiştir. Bu nedenle Parkinson modeli oluşturulan kontrol gruplarına da aynı hacimde DMSO enjeksiyonu yapılmaktadır. İsradipin enjeksiyonu 1 ay süresince uygulanmıştır.

5.6 Kan alımı:

Sıçanlar uygun anestetik madde ile uyutulmuştur. Sıçanların lateral kuyruk veninden iğne ile 20-30 derecelik açıyla girilerek 0.5 ml kadar kan alınmıştır. Damar görünür değilse, kuyruk ılık suya (40 °C) daldırılarak damarın görünür hale gelmesi sağlanarak, akabinde de vazodilatasyonu arttırmak için kuyruk 5-8 dakika 37 °C’de bekletilmiştir (Parasuraman ve ark., 2010).

5.7 Sakrifikasyon:

4. haftanın sonunda ise sıçanlara anestezi altında %4’lük paraformaldehit içeren 0.05M fosfat tamponlu salin (PBS) ile transkardiyak perfüzyon yapılmıştır. Perfüzyon işlemi sonrası beyinler çıkartılarak bir gece boyunca %4’ lük formaldehit solüsyonunda +4°C’de bekletilmiştir. Daha sonra, beyinler %30’luk sükröz içeren solüsyona alınmıştır.

Bu kesitlere, TH ve CB immunohistokimya prosedürleri uygulanmıştır. Elisa prosedürü uygulanarak, kanda kalbindin düzeyi ölçülmüştür. Floresan mikroskop altında, kalbindin pozitif nöronlar sayılmıştır ve fotoğraflar alınmıştır. Sonuçlar ise istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Diğer 6-OHDA lezyonu oluşturulan gruba ise isradipin’in çözücüsü olan DMSO enjeksiyonu yapılmıştır.

5.8 İmmunohistokimya Prosedürleri

6-OHDA enjeksiyonu yapılan sıçan beyinlerinde substantia nigra (pars compacta) bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronları gözlemleyerek lezyon oluşumunu gözlemleyebilmek için tirozin hidroksilaz immunohistokimya prosedürü uygulanmıştır. Kayar mikrotom kullanılarak ardışık alınan 40 µm’lik kesitlerde sırasıyla tirozin hidroksilaz ve kalbindin boyaması uygulanmıştır. Bregma 2.52 ve-3.24 seviyeleri arasındaki bu kesitler, stereolojik prensiplere uygun olarak alınmıştır.

5.8.1 Tirozin Hidroksilaz İşaretleme Protokolü

Fikse edilen beyinlerden kayar mikrotomda 40 µm’lik koronal kesitler alınmıştır. Substantia nigra bölgesini içeren kesitler PBS’te 5’er dakika 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra, %3’lük H₂O₂ ve 80 ml metanol içeren solüsyonda 20 dakika boyunca oda

sıcaklığında inkübe edilmiş ve sonrasında PBS'te yıkanma işlemi yapılmıştır. Kesitler bloke edici serum solüsyonunda (10 ml PBS, 1ml normal keçi serumu, 0,1 g sığır serum albumin (BSA) ve 30 µl Triton™ X-100 (Merck, Darmstadt, Almanya) solüsyonunda inkübe edilmiştir.

Gece boyunca anti-tirozin hidroksilaz antikoru ile (Pel freez /cat no: P40101, in 1:500 10 ml taşıyıcı solüsyonda inkübe edilmiştir. Daha sonra, 150 µl biotinlenmiş anti-rabbit IgG sekonder antikor (Vector lab) içerisinde 2 saat tutularak sonrasında PBS ile yıkanmıştır. 1 saat boyunca avidin-biotin kompleks (Vector lab) ABC kitinde bekletilmiştir. İmmünoaktivitenin görüntülenmesi için kesitler DAB (10 ml PBS, 5 mg DAB, 100 µl %3 H₂O₂) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Kesitler lamlara alınarak kurutulmuş ve kapatılmıştır. TH pozitif nöronlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

5.8.2 Kalbindin İşaretleme Protokolü

40 µ'luk serbest yüzen kesitler Salin Fosfat Tamponu (PBS) tamponu içerisinde alınarak 3x10 dakika yıkanır. 1/500 oranında kalbindin D-28K (Santa- Cruz Biotechnology CB955) primer antikor ile donkey serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün, 3x10 dakika PBS ile yıkanmıştır. 10 mg/ml Alexa Fluor 488 Donkey anti-mouse IgG (Invitrogen A21202) sekonder antikor ile oda ısısında 2 saat bekletilmiştir. 3x10 dakika PBS ile yıkandıktan sonra, distile su içerisinde jelatinli lamlara alınıp kapatılmıştır.

5.9 Kanda kalbindin düzey tayini için ELISA Prosedürü:

Kullanılacak kitin talimatları doğrultusunda prosedür uygulanmıştır. Plaka üzerinde örnekler için boş kuyucuklar belirlenmiş ve standart için 7 kuyu hazırlanmıştır. Standart dilüsyonların her birine 100 µL eklenmiştir. Plaka sealer ile kaplanarak, 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Her kuyucuğun sıvısı aspire edilip, yıkanmıştır.

Her kuyucuğa 100 µL Detection Reagent A çalışma çözeltisi eklenmiştir ve plaka kapatici ile kaplama sonrası 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Solüsyonu aspire edilerek ve bir fişkırtma şişesi kullanarak her kuyucuk 350µL 1 × yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.

Çok kanallı pipet, manifold dağıtıcı veya otomatik yıkama makinesi ile 1 -2 dakika bekletilmiştir. Kalanları kaldırıp, plaka emici kâğıda geçirerek tüm kuyucuklardan sıvı tamamen alınmıştır. 3 kez yıkanmış ve sonra son yıkamada, kalan yıkama tamponu aspire edilerek çıkartılmıştır. Plaka ters çevirilmiş ve her kuyucuğa 100 µL Detection Reagent B çalışma çözeltisi eklenmiştir. Sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve plaka mühürleyici ile kaplanmıştır. Aspirasyon / yıkama işlemi, 4. adımda yapıldığı gibi toplam 5 kez tekrarlanmıştır. Her kuyucuğa 90 µL Substrat Solüsyonu eklenmiştir. Yeni bir plaka kapatici ile örtülerek, 15-25 dakika boyunca inkübe edilmiştir (37 °C).

Işıktan korunarak, sıvı, substrat ilave edildiğinde maviye dönmesi beklenmiştir. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiş ve durdurma çözeltisi eklendiğinde sıvı sararmıştır. Ardından, mikroparka okunarak, hemen 450 nm'de ölçüm yapılmıştır.

5.10 Mikroskop altında nöron sayımı:

Striatum (Bregma 2.52 ve-3.24 seviyeleri arası) bölgesinden alınan kesitlerdeki kalbindin pozitif nöronlar floresan mikroskobu altında incelenmiştir ve nöron sayımı yapılmıştır. Sonuçlar (GraphPad PRISM 5.0 Software Inc., San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.11 Görüntüleme ve Sayım

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan kesitler floresan mikroskop altında (Olympus BX51) kodlu filtre ile Parkinson isradipin ve DMSO grubuna ait beyin kesitlerinde striatum bölgesindeki kalretinin pozitif nöronlar görüntülenerek, (Paxinos ve Watson, 2007) sıçan beyin atlası referansıyla sayılmıştır.

Işık mikroskopu kullanılarak ise bu gruplardaki sıçanların beyin kesitleri striatum ve substantia nigra bölgesindeki TH pozitif dopaminerjik nöronlar görüntülenmiş.

Kesitler, görüntülenerek, X10, X20 ve X40'lık objektif altında fotoğraflanarak bilgisayara kaydedilmiştir.

5.12 İstatistik ve Analiz

Kullanılan Parkinson ve kontrol gruplarına ait sıçan beyinlerinde bazal çekirdeklere ait striatum bölgesinde kalbindin pozitif nöron sayıları ve rotasyon sayıları, kalbindin düzeyinin ölçüldüğü Elisa sonuçları ve western sonuçları Graph-Pad Analiz yöntemi kullanılarak, Tukey multiple comparisons ve Bonferroni testleri uygulanarak karşılaştırılmıştır (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

6. BULGULAR

Çalışmamızın ilk kısmında, 5. ve 10. haftada dekapite edilen gruplara ait sıçanların beyinlerinde ve kanlarında kalbindin düzeyi ölçülmüştür. Erken ve geç döneme ait gruplarda 5. ve 10. haftalarda rotasyon testi uygulanmış ve GraphPad Prism 8 one-way ANOVA analiz yöntemi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. 10.haftadaki geç döneme ait grupta 5.haftada dekapite edilen erken dönem Parkinson grubuna ait sıçanlardaki rotasyon sayısına kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p=0,0068$), (Şekil 14).

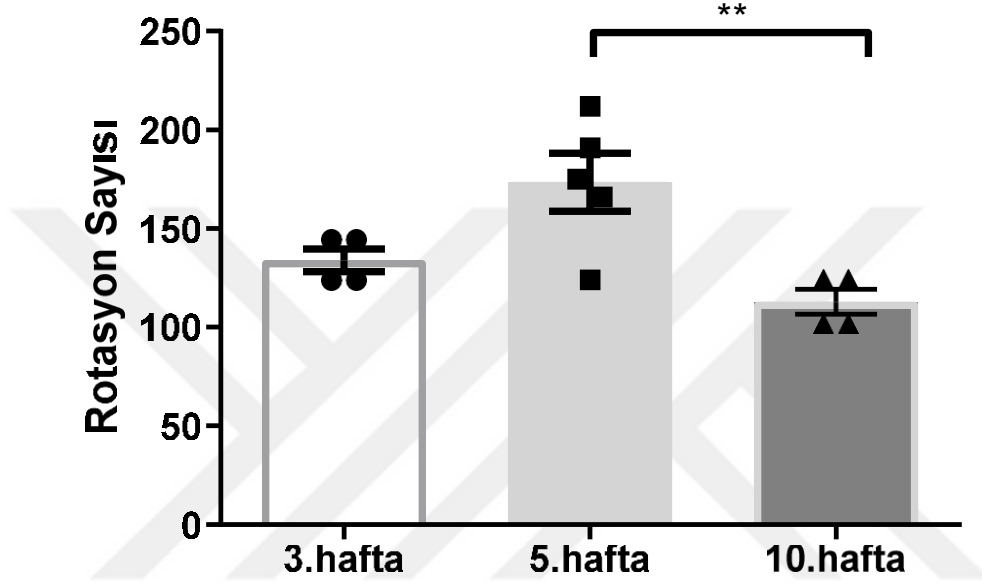
Dekapite edilen sıçan beyinlerinde, western blot yöntemiyle kalbindin düzeyi ölçülmüştür ve alınan sonuçlar GraphPad Prism 8 Tukey's multiple comparison yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. 5.haftada dekapite edilen Parkinsonlu beyinlerdeki kalbindin düzeyi, yine 5.haftada dekapite edilen kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$), (Şekil 15).

Kalbindinin kandaki düzeyleri, ELİSA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür ve GraphPad Prism 8 Dunnett's multiple comparisons yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Parkinsonlu gruba ait sıçanlarda lezyondan önce alınan kanlar ve 2. haftada alınan kanlar arasında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p=0.0268$), (Şekil 16).

Çalışmamızın ikinci kısmında, 6-OHDA ile Parkinson oluşturulan 3 gruba rotasyon testi uygulanmıştır. 2 gruba isradipin ve DMSO enjeksiyonu uygulanmıştır. 4.haftaya ait Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu yapılan sıçan grubuna ait olan rotasyon sayıları, Parkinsonlu olup DMSO enjeksiyonu alan gruba kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0.02$). Sonuçlar GraphPad Prism 8 one way ANOVA kullanılarak analiz edilmiştir, (Şekil 17).

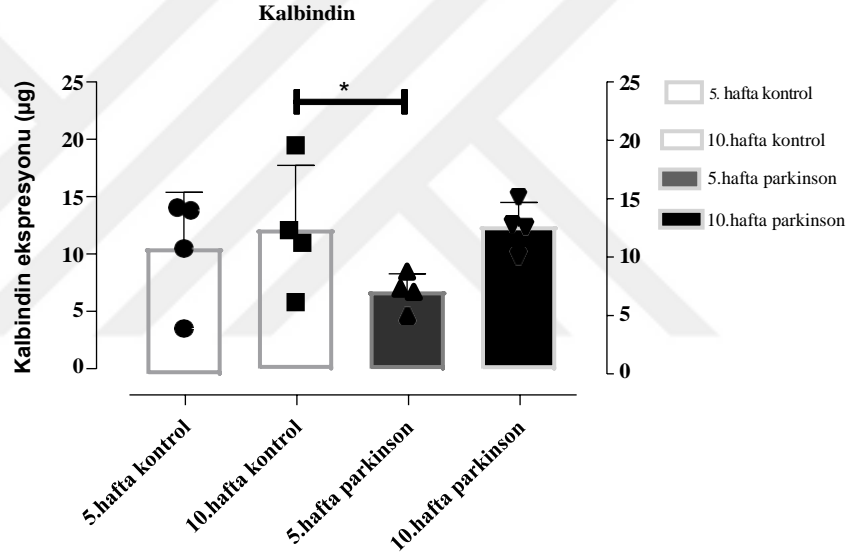
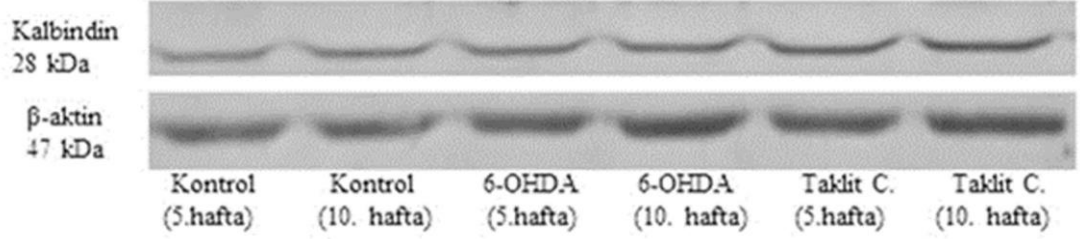
Parkinsonlu grup, isradipin ve DMSO enjeksiyonu yapılan ve hiçbir enjeksiyon yapılmayan Parkinsonlu gruplarda kanda kalbindin düzeyi ELİSA yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar, GraphPad Prism 8 Tukey multiple comparison yöntemiyle analiz edilmiştir. Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu alan sıçanlarda kalbindin kan düzeyinde, Parkinsonlu DMSO grubuna kıyasla artış göstermiştir ($p<0.05$).

Parkinsonlu isradipin grubuna ait sıçanlarda kalbindin kan düzeyinde Parkinsonlu olup herhangi bir enjeksiyon yapılmayan gruba kıyasla kalbindin düzeyinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p=0.04$), (Şekil 18).



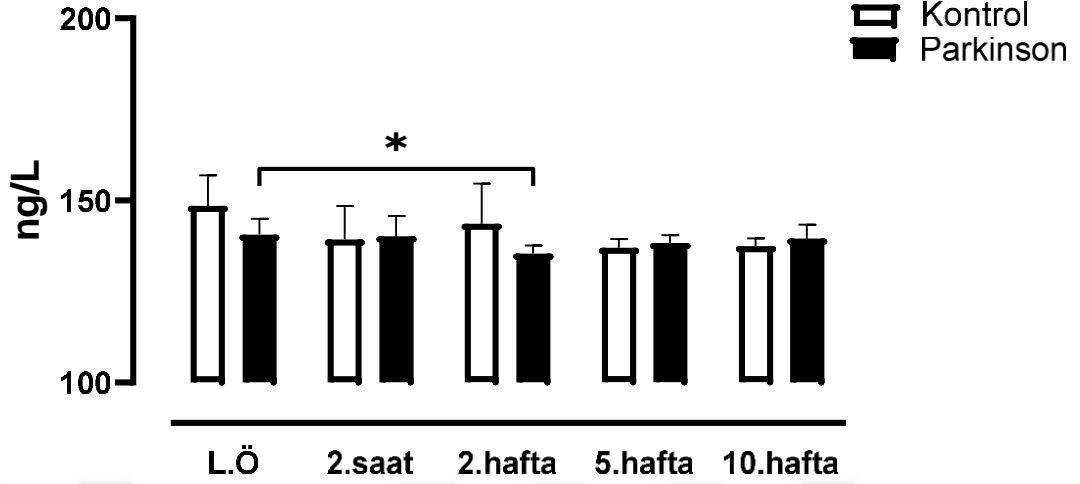
Sekil 14: Parkinson erken dönem ve geç döneme ait olan sıçanların 3. 5. ve 10. haftalara ait rotasyon testleri analizi. 10.haftada, 5.haftadaki rotasyon sayılarına kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p= 0,0068$).

Beyindeki Kalbindin Düzeyi



Sekil 15: Erken dönem ve geç döneme ait kontrol ve lezyon gruplarına ait beyinlerde, western blot prosedürü uygulanmıştır ve kalbindin düzeyindeki değişim gösterilmiştir. **5.haftada dekapite edilen Parkinsonlu beyinlerdeki kalbindin düzeyinde kontrol grubuna** kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). **EDK:** Erken Dönem Kontrol, **GDK:** Geç Dönem Kontrol, **EDP:** Erken Dönem Parkinson, **GDP:** Geç Dönem Parkinson)

Kalbindin kan değerleri

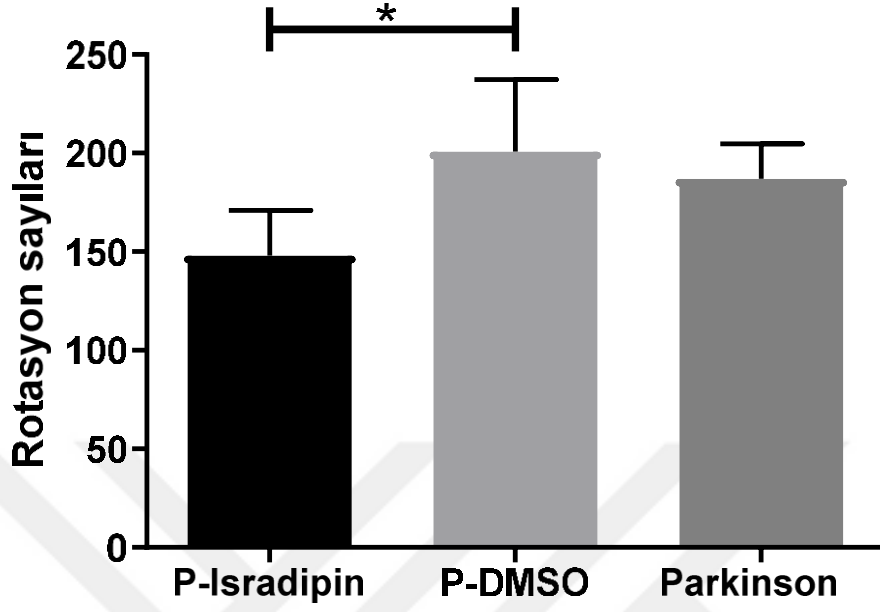


Sekil 16: Lezyon öncesi ve sonrasında 2.saatte, 2.haftalarda kontrol ve lezyonlu gruplara ait kandaki kalbindin seviyeleri (ng/L). Lezyon öncesi ve sonrasında 2.haftada alınan kanlardaki kalbindin düzeyi arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p=0.0268$) (LÖ: Lezyon öncesi, LS: Lezyon sonrası)

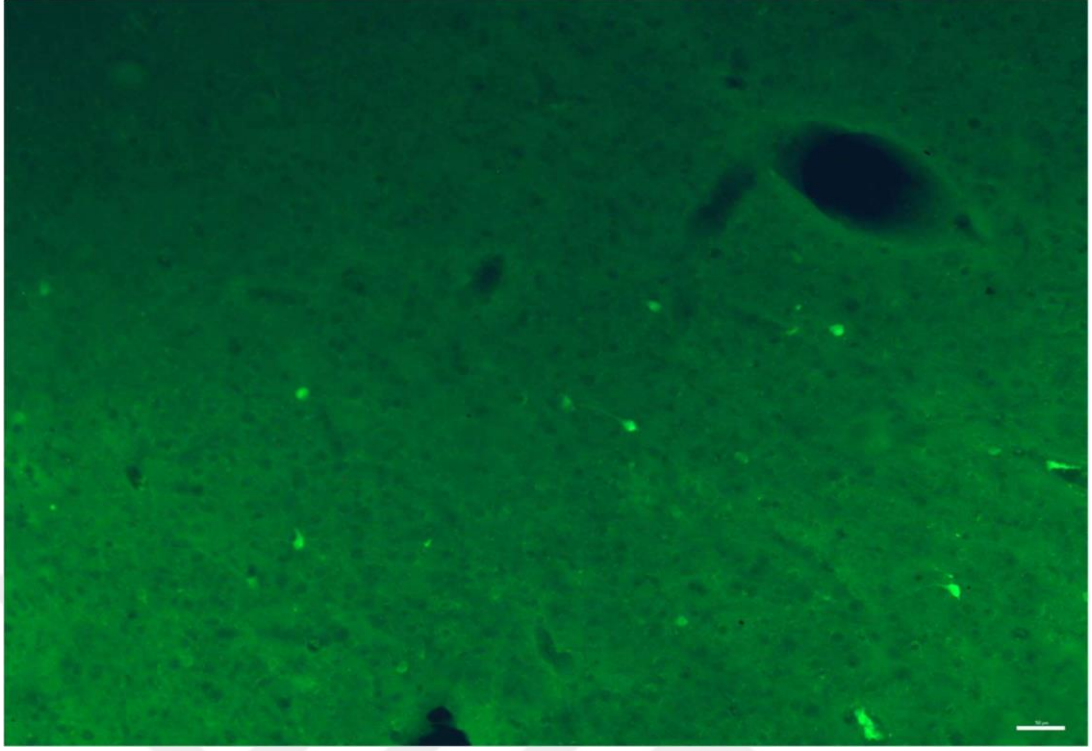
6-ohda lezyonu oluşturulan 3 gruba 21. ve 28.günlerde apomorfin rotasyon testi uygulanmıştır. 4.haftaya ait Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu yapılan sıçan grubuna ait olan rotasyon sayıları, Parkinsonlu olup DMSO enjeksiyonu alan gruba kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0.02$).

Striatum'daki kalbindin pozitif nöron sayısında anlamlı şekilde değişiklik gözlemlenmemiştir (Parkinson-isradipin, Parkinson-DMSO). Elisa sonuçlarına göre, **kandaki kalbindin seviyesi** Parkinsonlu olup isradipin tedavisi alan grupta kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p=0,01$).

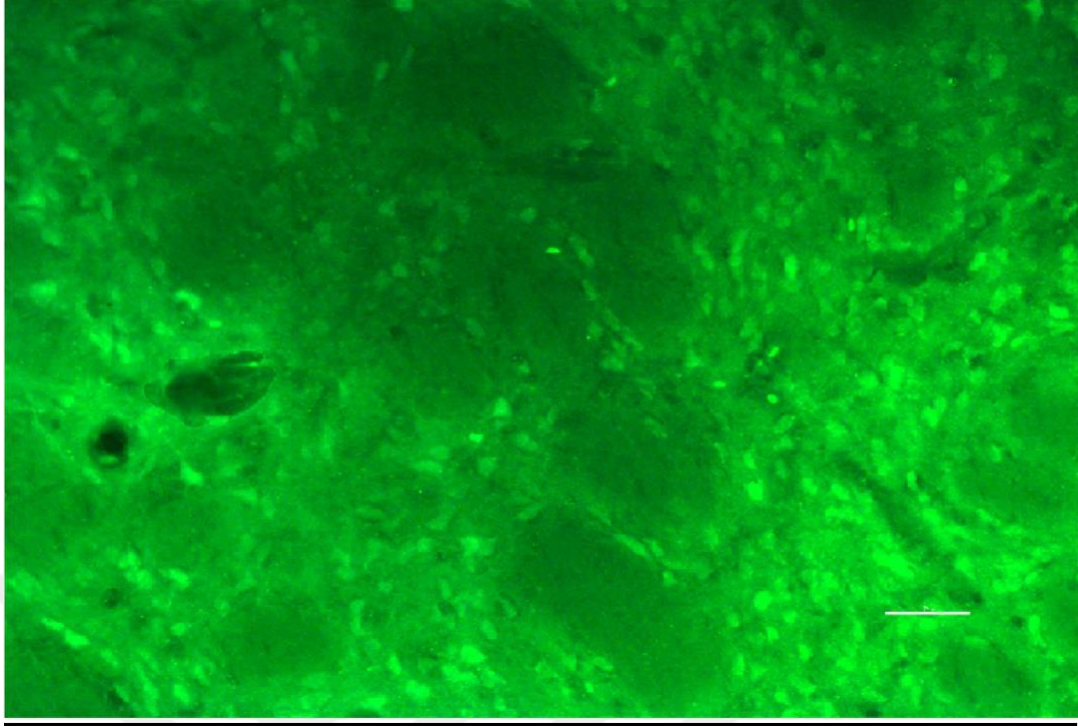
Rotasyon testi



Sekil 17: 4.haftada, Parkinsonlu olup isradipin, DMSO enjeksiyonu yapılan ve hiçbir enjeksiyon yapılmayan sıçan grubuna ait olan rotasyon sayılarının analizi. 4. haftanın sonunda, Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu yapılan gruba ait rotasyon sayıları, Parkinsonlu olup DMSO enjeksiyonu alan gruba kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0.02$).



Resim 1: Kontrol grubuna ait sıçan beyninde striatum bölgesine ait kalbindin pozitif nöronlar (X10)

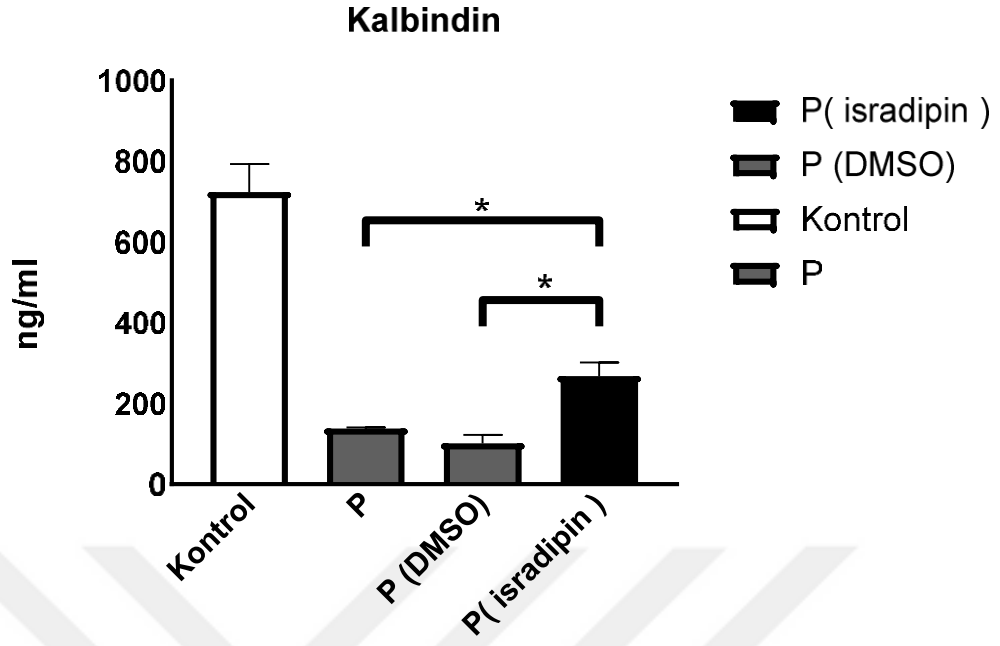


Resim 2: Parkinsonlu DMSO grubuna ait sıçan beyinde striatum bölgesine ait kalbindin pozitif nöronlar (X10)

Kontrol ve parkinson grubuna ait sıçan beyinlerinde striatum bölgesindeki kalbindin pozitif nöron sayılarında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Ayrıca, Parkinsonlu olup DMSO ve isradipin enjeksiyonu alan gruplar arasında da kalbindin pozitif nöron sayısında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.



Resim 3: Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu alan gruba ait sıçan beyinde substantia nigra pars compacta'daki TH boyanması sonucunda görülen dopaminerjik nöronlar (X40). ★ ile gösterilen kısımda lezyon oluşumunun karşısındaki (kontralateral) taraftaki dopaminerjik nöronları göstermektedir.



Sekil 18: 4. haftanın sonunda, Parkinsonlu isradipin grubuna ait sıçanlarda kalbindin kan düzeyinde, Parkinsonlu DMSO grubuna kıyasla **artış göstermiştir ($p < 0.05$)**. Parkinsonlu isradipin grubuna ait sıçanlarda kalbindin kan düzeyinde Parkinsonlu olup herhangi bir enjeksiyon yapılmayan gruba kıyasla kalbindin **düzeyinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p = 0.04$)**.

7. TARTIŞMA

Parkinson hastalığının patogenezinde ve tedavisini araştırmak üzere yapılan çalışmalar genel olarak nöronlar üzerine odaklanmıştır. Özellikle hastalığın patolojisinde öne çıkan dopaminerjik nöron kaybı ve buna bağlı olarak bazal çekirdeklerin fonksiyon kayıpları, burada bulunan nöronlarda morfolojik ve fonksiyonel olarak değişimlere neden olmaktadır (L. Milosevic ve ark., 2018; Beck ve ark., 2018, Meoni ve ark., 2020).

Bazal çekirdeklerdeki çeşitli nöronlarda sentezlenen kalretinin, kalbindin, parvalbumin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinler hem sitoplazmadaki kalsiyumu kontrol ederek hem de kalsiyum tamponlanma ve kalsiyum alınımına cevap olarak kalsiyum kanalları aracılığıyla sensör olarak aktif olup kalsiyum regülasyonunu sağlamaktadırlar. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin nöronlarda sentezlenmesiyle ilgili birçok çalışma ortaya koyulmuştur fakat kandaki değerleriyle ilgili çalışmalar çok azdır (Link ve ark., 2020; Casjens ve ark., 2021). Nöronlarda önemli koruyuculuğu olduğu düşünülen bu kalsiyum bağlayıcı proteinlerin kanda ve beyin dokusundaki düzeylerinin de değişimini değerlendirmek amacıyla çalışmamızı gerçekleştirdik.

Çalışmamızda kalsiyum bağlayıcı proteinler arasında yer alan kalbindinin, Parkinson modeli sıçanlara ait beyin dokularında ve kan düzeylerinde değişim olup olmadığı değerlendirilmiştir. Deneylerimiz iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Deneyimizin ilk aşamasında, 6-OHDA gruplarında ve kontrol grupları 10 hafta süresince belirlenen aralıklarla kandaki ve beyindeki kalbindin miktarı ölçülmüştür. Lezyon öncesinde, lezyondan 2 saat sonrasında ve 2., 5. ve 10. haftalarda kandaki kalbindin düzeyi bakılmıştır. Beyindeki kalbindin düzeyi ise 5. ve 10. haftalarda sıçanlar dekapite edilerek bakılmıştır. 10.haftada dopaminerjik nöron rejenerasyonu gerçekleşebileceğinden 10. hafta geç dönem olarak tanımlanmıştır. 6-OHDA enjeksiyonu olan gruba ait kanlarda, lezyondan 2 saat önce alınan kanlara göre 2. haftada alınan kanlarda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p=0.05$), (Şekil 16).

10. hafta grubunda kandaki kalbindin düzeyleri karşılaştırıldığında 2. haftadaki kalbindin kan düzeyi, lezyondan 2 saat sonraki kan düzeyine göre anlamlı düşüş gösterirken 5. haftada anlamlı olmayan artış gözlenmiştir. Hastalığın erken

döneminde kanda kalbindin düzeyinin azalma göstermesinin önemli bir bulgu olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda lezyon sonrası 2. hafta, erken dönem olarak kabul edilmiştir. Bu dönemde gözlemediğimiz azalışın, klinikte ilerlememiş yeni oluşmaya başlamış Parkinson hastalığının erken tanısına yönelik yapılacak olan çalışmalar için bir bakış açısı kazandırabileceği düşüncesindeyiz.

Lezyon sonrası erken dönem (5. hafta) olarak isimlendirilen sıçan grubuna ait beyinler incelenmiş ve yine erken dönem kontrol grubuna kıyasla kalbindin miktarında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p=0.05$), (Şekil 15). Geç dönem (10. hafta) Parkinsonlu gruba ait sıçan beyinlerinde ise kalbindin miktarında geç döneme ait kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar da erken dönemde kandaki kalbindin azalışıyla beyindeki azalışın korele olabileceğini göstermiştir.

Çalışmanın ilk kısımda alınan sonuçlar doğrultusunda, erken dönemde lezyonlu sıçan beyinde ve kanda erken dönemde kalbindin seviyesinde bir azalma olabileceği gözlemlendi. Bunun yanında, bir kalsiyum kanal blokleri olan isradipinin, Parkinson hastalığı üzerine nöroprotektif olarak kullanılabileceği yönünde sonuçlar bulunmaktadır (Guzman ve ark., 2018). Bu bağlamda isradipinin etki mekanizmasını ve kalsiyum bağlayıcı proteinlerle ilişkisini gözlemleyebilmek amacıyla çalışmamızı gerçekleştirdik. Bu amaçla çalışmamızda, Parkinson hastalığında nöroprotektif etkisi gözlemlenen kalbindin ile kalsiyum kanallarının ilişkisini ortaya koyabilmek amacıyla deney gruplarına 4 hafta boyunca isradipin verilmiştir.

Çalışmamızda, kanda kalbindin düzeyini ve striatum bölgesinde bulunan kalbindin pozitif nöron sayısını değerlendirdik. Bu deneyler sonucunda ise isradipin tedavisi uygulanan 6-OHDA modeli sıçanların rotasyon sayıları, Parkinsonlu DMSO grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır ($p=0.02$).

Bu sonuç ise progresif seyreden Parkinson hastalığında, isradipinin motor bulguların ortaya çıkmasında bir miktar geciktirici etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda motor bulgular üzerinde gözlenen etki TH immunohistokimyası

üzerinde tespit edilememiştir. İsradipin, substantia nigra pars compacta'da bulunan TH pozitif nöron sayısı üzerinde koruyucu bir etki göstermemiştir.

İsradipin ve kalbindin arasındaki etkiye baktığımızda ise, isradipin tedavisi uygulanan Parkinsonlu modeli sıçanlarda kandaki kalbindin seviyesinde, Parkinsonlu modeli tedavi almayan ve Parkinsonlu modeli DMSO enjeksiyonu yapılan gruplara kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p=0.04$), (Şekil 18). Ayrıca sağlıklı gruba ait kan düzeylerine en çok yaklaşan grup Parkinsonlu olup isradipin enjeksiyonu alan grup olmuştur.

Bu da isradipinin kandaki kalbindin seviyesinin sağlıklı gruptaki seviyelere yaklaştırdığını göstermektedir. Bu etkiyi ise isradipinin kalsiyum kanallarını inhibe etme özelliğine sahip olan kalbindin artışına sebebiyet vererek yaptığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kullandığımız nörotoksik ajan olan 6-OHDA, yaygın olarak deneysel çalışmalarda Parkinson oluşumunda sıçanlarda kullanılmaktadır. 6-OHDA lezyonu sonrasında, yaklaşık 8. haftada hücresel seviyede kompensatuar mekanizmalar gelişirken, 10. hafta sonrasında nöron kaybı gözlemlenen bölgelerde iyileşme görülebildiği gösterilmiştir (Grandia ve ark., 2018). Bu bilgiler ışığında, süreç takibi yapılan deney çalışmamızın ilk aşamasında, deney süresi 10. hafta olarak belirlenmiştir. Deney sonuçları incelendiğinde, 10. haftanın sonunda literatürdeki bilgiyi doğrular nitelikte olduğu görülmektedir. Geç döneme ait beyinlerde dopaminerjik nöronlarda iyileşme başlanabileceği düşünüldüğünden, kalbindin düzeyinde sağlıklı gruptaki seviyeye yaklaşacak şekilde bir miktar artış gözlemlenmiştir. Erken dönemde ise dopaminerjik nöron kaybına paralel olarak kalbindin ekspresyonunda azalma görülmüştür. Bunu destekler şekilde, lezyon oluşumunu takiben erken dönem Parkinsonlu sıçanlarda da kandaki kalbindin seviyesi 2. haftada anlamlı bir azalma göstermiştir.

Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin nöroprotektif etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, SNc'de kalbindin ve kalretinin eksprese eden dopaminerjik nöronların hasarlanmaya karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Nöroprotektif etki yarattığı gösterilen kalbindin ve kalretinin intraselüler kalsiyum birikimini azaltırlar ve intrakranial olarak enjekte

edilen 6-OHDA'nın sitotoksik etkisini inhibe ederek, glutamat toksisitesini önlemektedirler (Doble ve ark., 2003).

Parkinson hastalığında, substantia nigra par compacta bölgesinde görülen dopaminerjik nöron kaybı, bu bölgenin çoğunlukla ventrolateral kısmında meydana gelmiştir. Dorso-medial ve ventral tegmental bölgede ise nöronlar daha çok direnç göstermektedirler. Bu bölgedeki dopaminerjik nöronların kalbindin pozitif olması nedeniyle hasara karşı daha dirençli oldukları gösterilmiştir (Rintoul ve ark., 2001).

Parkinson hastalığının patolojisinde, substantia nigra par compacta bölgesinde dopaminerjik nöronlar selektif şekilde hasarlanmaya daha duyarlıdır. Bunun nedeni düşük ritmik aktivite ve yüksek miktarda dendritik dallanmaya sahip olması olarak da açıklanmaktadır.

Dopamin salınımı için Cav1.3 kaynaklı kalsiyum alınımlı gerekli olmakla birlikte, bu fonksiyonu yerine getirebilmesi ve akson ile dendritler için gerekli olan ATP'nin sağlanması için de yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duymaktadır (Cristina Catoni ve ark., 2019).

L-tipi kalsiyum kanalları ayrıca hastalığın patolojisinde öne çıkan mitokondrial oksidatif strese de sorumludur. L-tipi kalsiyum kanallarının, özellikle CaV1.3 kalsiyum kanallarının seçici olarak substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Putzier ve ark, 2009; Poetschke ve ark, 2015).

Deneysel çalışmalarda, bu bilgiler doğrultusunda, kalsiyum kanallarını bloke ederek, kalsiyum girişini inhibe edip kalsiyum artışını engellemek amacıyla isradipin, nimodipin gibi ajanlar kullanılarak dopaminerjik nöron kaybının bir miktar azaldığı gösterilmiştir. Klinik faza kadar ilerleyen çalışmaların sonunda, faz 3 çalışmasında Parkinson hastalarında isradipin tedavisi uygulanmış fakat sonuçtaki değerlendirmelerde motor bulgular üzerinde herhangi bir iyileştirici etkisi gösterilmemiştir (Bowser ve ark., 2019).

2019 yılı sonrasında da isradipinin Parkinson hastalığı üzerine etkisi farmako-kinetik çalışmalarda araştırılmaya devam edilmiştir. Bu bağlamda, Faz 3 çalışmasını takiben

yapılan yeni bir çalışmada, daha yüksek isradipin dozu alan grupta Parkinson tedavisine ihtiyaç riskinde azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (Simuni ve ark., 2020).

İsradipin tedavisi alan gruptaki klinik değerlendirmede Parkinson hastalığının seyriyle ilgili bir değişime neden olmadığı fakat ihtiyaç duyulan levodopa dozunun azaldığı ve Parkinson'un semptomatik tedavisinin başlanmasına ihtiyaç duyulan süreyi uzattığı sonuçlarla gösterilmiştir (Venuto ve ark., 2021).

Alınan bu sonuç doğrultusunda ise, detaylı bir analiz yapılan 2022 yılına ait yeni bir çalışmada, 52 haftalık bir süreç takibi yapılan 10mg/gün uygulaması sonrasında, UPDRS skorlarında anlamlı şekilde farklılık görülmüştür. Çalışma sonucunda, isradipin tedavisi maruziyetinin erken fazda hastalığın progresyonunu yavaşlattığını ileri sürmüşlerdir (D James Surmeier ve ark., 2022). Bizim çalışmamızda ise isradipinin rotasyon testi üzerinde etkili olması motor bulguların ortaya çıkmasında geciktirici bir etki ortaya koyabileceğini düşündürmektedir.

Yine bizim çalışmamıza benzer şekilde, kalsiyum kanal blokerlerinin kalsiyum bağlayıcı proteinlerin etki mekanizmasındaki bağlantısının araştırıldığı bir çalışmada, MPTP modeli farelerde, nimodipin isimli kalsiyum kanal blokeri enjekte edilmiş ve fare beyinleri incelenmiştir (Alpana ve ark., 2018).

Striatumdaki kalbindin seviyesinde %40'lık azalma olduğu görülmüştür. Nimodipin enjeksiyonu sonrasında ise kalbindin seviyesinin normale döndüğü vurgulanmıştır (Alpana ve ark., 2018). Bu çalışma da çalışmamızla korele şekilde, kalbindin ve L tipi kalsiyum kanallarının arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur.

Nimodipin, çalışmamızda kullandığımız isradipine benzer şekilde dihidropridin grubuna ait bir ajandır. (Singh ve ark., 2019). Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin Parkinson hastalığındaki rolü literatürde son dönemde önem kazanmıştır. Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin hücre düzeyinde ekspresyonu nörodejeneratif hastalıklarda çalışılmış olsa da kan serum düzeyi ile ilgili çalışmalar literatürde çok daha az sayıdadır. Bu çalışmanın amaçlarından biri, kalsiyum kanal blokeri olan isradipin ile kalbindin arasındaki mekanizmaya açıklık getirmektir. Parkinson hastalığının mekanizmasına yeni bir bakış açısı kazandırarak kalsiyum bağlayıcı protein

kalbindinin hem hücresel düzeyde hem de kan serum seviyesinde tespit edilebilir bir değişikliğe neden olup olmadığını da araştırmaktır. Substantia nigra par compacta bölgesindeki dopaminerjik nöronların yaşlanması, kalsiyum bağlayıcı protein ekspresyonunun azalması ve intraselüler kalsiyum artışı, Parkinson hastalığında mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki stresle ilişkilidir. Kalbindin ekspresyon artışı olan fareler, MPTP toksisitesine ve alfa synuclein birikimine karşı dirençli hale gelmektedir (Rcom-H'cheo-Gauthier ve ark., 2016; Yuan ve ark., 2013).

Area preoptica'da erkeklerde dişilere göre kalbindin immunoreaktivitesi yaklaşık iki üç kat daha fazladır (Bogus- Nowakowska, 2019). Genç, yetişkin ve yaşlı sırasıyla 1, 6 ve 24 aylık sıçan beyinlerinin incelendiği çalışmada, yaşlı sıçan beyninde genç beyine kıyasla, kortekste kalbindin ekspresyonunun azalışı ve kalretinin ekspresyonunun artışı görülmüştür. 6 aylık yetişkin beyinde 1 aylık genç beyine göre kalretinin ve kalbindin artışı gösterirken, 24 aylık yaşlı beyinde ise genç beyine kıyasla, kalbindin azalmış fakat kalretinin artmıştır (Ahn ve ark., 2017).

Kalbindin-D28k ve kalretinin hem kalsiyum tamponlayıcı hem de kalsiyum sensör fonksiyonlarına sahiptir (Schwaller ve ark., 2020). Kalbindin-D28k, birçok apoptotik yolağın inhibisyonunda rol oynamaktadır ve sinir sisteminde kalsiyumu tamponlanmaktadır. Yapılan birkaç çalışmada, hücresel düzeyde özellikle kalbindinin kalsiyum kanallarının regülasyonunda rol oynadığı ve kalsiyum metabolizmasına etki edebildiği üzerinde durulmuştur. Ayrıca, kalsiyum bağlayıcı proteinlerin kalsiyum kanalları üzerinden farklı mekanizmalarla etkili olabildiği de gösterilmiştir. Parvalbumin ve kalbindin tamponlayıcı proteinler olarak aktif olurken, intraselüler kalsiyum konsantrasyon değişim eğrisini sürekli olarak kontrol etmektedirler (Celio, 1990).

Kalbindin, korteks, amygdala ve ventral tegmental alan gibi beyin bölgelerinde nöronlarda eksprese olmasının yanında, böbrek ve bağırsak emici epitelinde de eksprese olmaktadır. Kalbindin, majör bir sitoplazmik kalsiyum bağlayıcı proteindir ve nöroprotektif olarak rol aldığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Yuan ve ark., 2013; Spruill ve Kuncl, 2015).

Maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada, kalbindin, unilateral şekilde viral vektör yoluyla substantia nigra pars compacta'nın ventral kısmına enjekte edilmiştir. Bu bölgenin tercih edilmesinin sebebi ise substantia nigra pars compacta'nın dorsal kısmındaki dopaminerjik nöronların kalbindin eksprese etmesi ve ventral kısımındaki ise kalbindin eksprese etmemeleridir. Sonrasında ise MPTP enjeksiyonu uygulanarak, Parkinson modeli oluşturulmuştur. Kalbindin enjeksiyonu yapılan tarafa ait uzuvlarda, yapılmayan tarafa kıyasla rijidite ve akinezi tabloları daha şiddetli şekilde gözlemlenmiştir. Ayrıca, enjeksiyon yapılan taraftaki dopaminerjik nöron kaybı anlamlı şekilde daha az olarak gözlemlenmiştir (Inoue ve ark., 2019).

Kalbindin, özellikle nöronlarda farklı mekanizmalar üzerinden nöroprotektif etki gösterebilmektedir (Tang ve ark., 2020). Nöronlardaki kalbindin ekspresyonunu büyüme faktörleri ve glutamat da artırabilmektedir (Lee ve ark., 1997).

Ayrıca yapılan bir çalışmada, kalbindinin kaspaz-3 aktivitesini inhibe ettiği ve nöroprotektif etki gösterdiği yönünde sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bunun yanında membran ATPaz, IMPaz, RANBPM ve TRPV5 gibi bazı hedef proteinlerine de bağlanarak regüle etmektedir. Kalbindin, kanonik EF- el motifine sahip kalsiyum sensör özelliğinden farklı olarak, kalsiyumdan bağımlı veya bağımsız şekilde de hedef proteinlerle etkileşim gösterebilmektedir (Denessiouk ve ark., 2014).

Kalretinin dopaminerjik nöronlar üzerinde nöroprotektif etkisinin görüldüğü çalışmalar mevcuttur (Petryszyn ve ark., 2021). Hastalıklar üzerinde kalretininin kandaki tayiniyle ilgili pek çok çalışma yapılmamasıyla birlikte, mezotelyoma hastalarında kalretinin kandaki seviyesinin araştırıldığı bir çalışmada, kalretinin seviyesinde sağlıklı gruba kıyasla bir artış gösterilmiştir.

Bu sonuç doğrultusunda, kalretininin, ilerleyen çalışmalarla birlikte mezotelyoma hastalarında klinikte teşhis sırasında bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır (Raiko ve ark, 2010). Kalretinin ve kalbindin-D28k hem tamponlayıcı hem sensör görevinde olabildiğini bazı çalışmalar ortaya koyulmuştur (Fairless ve ark., 2019). Birkaç çalışmada, Alzheimer ve Parkinson hastalarında, serumda düşük vitamin D seviyeleri gözlemlendiğinden ve bunun bir biyobelirteç olabileceği savunulmuştur fakat

sonrasındaki çalışmalarda kesin sonuçlara varılamamıştır (Giulia Bivonaa ve ark., 2019).

Fareler üzerinde Alzheimer modeli oluşturulan bir deneysel çalışmada, hippocampus'teki kalbindin ekspresyonunda azalma gözlemlendiği ortaya koyulmuştur ve bunun da görülen kognitif fonksiyondaki azalmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Palop ve ark., 2003). Kalsiyum bağlayıcı proteinler tarafından kalsiyum tamponlanmanın hücre ölümüne karşı koruyucu etki oluşturduğu gösterilmiştir.

Bu sonuçlara tam ters şekilde bir teori ortaya koyan diğer bir çalışma ise kalbindinin Japon popülasyonunda Parkinson hastalığı için bir risk faktörü olduğunu vurgulayan bir çalışmadır (Mizuta ve ark., 2008).

Literatürde genel olarak bu çalışmaya zıt şekilde, kalbindin ekspresyonunun nöroprotektif olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Substantia nigra par compacta'nın ventral kompartmanındaki dopaminerjik nöronlar az miktarda kalbindin eksprese ettiklerinden dolayı lezyona karşı savunmasız kalabiliyorken, VTA'dakilerin çoğunluğu kalbindin eksprese ettiğinden dolayı lezyona karşı dirençli olabilmektedirler. Bu da kalbindinin nöroprotektif etkisini ortaya koymaktadır (Takada ve ark., 2001).

Kalbindin'in IMPaz'ı aktive ettiği bilinmektedir. Saflaştırılmış kalbindin, saflaştırılmış IMPaz'da bulunan spesifik bir amino asite tutunur ve aktivitesini artırır, fizyolojik aktivatörü olarak isimlendirilir (Beggard ve ark., 2002). Bipolar hastalık teşhisi almış kişilerin ölüm sonrası temporal kortekslerinin incelendiği bir çalışmada, kalbindinin seviyesinin değişmediği gösterilmiştir. Lityum tedavisinin araştırılarak, ilerleyen çalışmalarda mekanizmayı aydınlatacak sonuçlar alınacağı ileri sürülmüştür (Shamir ve ark., 2005).

Derin beyin stimülasyonu yapılan Parkinsonlu beyinlerde motor fonksiyon ve bölgesel kan akışının artışı gösterilmiştir. 6-OHDA'nın tek taraflı enjeksiyonu sonrasında sıçan beynine ait striatum'da kan beyin bariyerinin artmış geçirgenliği gözlemlenmiştir (Huang ve ark., 2016).

Kan beyin bariyeri, Parkinson hastalığının progresyonunda önemli rol oynamaktadır. Oksidatif stres ve lezyon, kan beyin bariyerini bozan etkenler arasındadır. Parkinson hastalığında korteksteeki membranda kalınlaşma olduğu ve beyin mikrovaskülaritesinde dejenerasyon görüldüğü rapor edilmiştir. 6-OHDA etki mekanizmasında, intraselüler kalsiyum homeostazında bozulmalar yarattığı ve böylelikle kalpain inaktivasyonun ve mitokondrial hasarlanmaya da etki ettiği gösterilmiştir (Gray ve Woulfe, 2015). Bizim çalışmamızda da 6-OHDA enjeksiyonu sonrasında, oluşan intraselüler kalsiyum dengesizliği ve bozulmuş kan beyin bariyeri sonrasında kalbindinin kan ve beyindeki düzeylerinde değişimler gözlemlenmektedir.

Ayrıca, isradipin gibi kalsiyum kanal blokajı etkisi yaratan bir ajan verilmesi ve süreç takibi yapılarak yaş faktörleri etkisinin de incelendiği bu çalışmamızda, kalbindin düzeylerinde farklılık görülmesi çalışmamızdaki hipotezimizle aynı doğrultuda bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Parkinson hastalarında, DJ-1 (oksidatif stress), lizozomal enzimler ve NF-L (aksonal hasar göstergesi) de belirteç olarak teşhiste kullanılabilir. Parkinson hastalarında, beyin omurilik sıvısında alfa synucleindeki artışın, kognitif fonksiyondaki azalmayla korele olduğu gösterilmiştir (Hall S ve ark., 2015). Nörodejeneratif hastalıklarla ilgili olan deneysel çalışmalarda, beyin omurilik sıvısı son zamanlarda yaygın şekilde incelenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, Alzheimer hastalarında T-tau (nörodejenerasyon), P-tau (tau hiper fosforilasyon) ve amiloid metabolizmasında bulunan Ab42 ise hem Parkinson hem Alzheimer'da biyobelirteç olabildiği gösterilmiştir (Santos ve ark., 2012). Bir başka çalışmada, kronik üremisi olan sıçanlarda kalbindin-D28K değerinin böbrek dokusunda artmış seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir, plazma üre seviyesi ile böbrek dokusundaki kalbindin değerleri arasında korelasyon olduğu savunulmuştur ($p < 0.05$) (Michael Staun ve ark, 1991).

Serum kalretinin düzeyi, yumurtalık kanserinde sıvı biyopsi belirteci olarak güçlü bir potansiyele sahip olmakla birlikte, yumurtalık kanseri olan hastalar üzerinde yapılan çalışmada, birincil tanıda serum kalretinin düzeyi yüksek seviyede bulunmuştur. Sonrasında ise, cerrahi ve platin odaklı kemoterapinin başlatılmasının ardından serum

kalretinin seviyeleri düşerken, hastalığın tekrarlaması üzerine başlangıç seviyeleri yeniden belirlenmiştir (Link ve ark., 2020). Ayrıca, kalretinin mezotelyomaları adenokarsinomlardan ayırt etmek için bir immünohistokimyasal belirteç olarak kullanılmaktadır (Gotzos ve ark., 1996). Birçok deneysel çalışmada uzun süreli yüksek nöronal aktivite sırasında yüksek kalsiyum alımının hasarlayıcı etkisine karşı kalbindin ve kalretininin yüksek miktardaki ekspresyonunun koruyucu bir faktör olabileceği de gösterilmiştir (Jung ve ark., 2019).

Yapılan çoğu çalışmada, kalbindin ekspresyonunun nörodejeneratif hastalığa sahip beyinlerde değişik seviyelerde seyredildiğini gösterilmiştir (Riascos ve ark., 2011). Bizim çalışmamızdaki anlamlı sonuçlara bakıldığında 6-OHDA lezyonu yaratılan beyinlerde kalbindin ekspresyonunun 5. haftada kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir.

Tavşan retinasının incelendiği bir çalışmada, kalretinin ve parvalbumin pozitif nöronlara kıyasla, kalbindin pozitif nöronların iskemiye karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Kwon, Kim, Kim, & Jeon, 2005). Hippocampus'te bulunan kalretinin içeren nöronlar, glutamat reseptör aktivasyonuna kıyasla kalsiyum artışına karşı daha hassas olabilmektedirler ve glutamat NMDA reseptörleriyle kolokalize olabilmektedirler (Möckel & Fischer, 1994).

Bizim çalışmamızda, lezyon sonrası 5. haftada beyinde kalbindin ekspresyonunun sağlıklı gruba kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Lezyon oluşumunu takiben kalbindinin azalışının, intraselüler kalsiyum regülasyon bozukluğunu tetikleyici bir diğer faktör olabileceğini ve muhtemelen kalbindin azalışının da literatürdeki bilgiye dayanarak lezyon oluşumunu daha fazla artırabileceğini öngörmekteyiz.

Kalbindin azalışı, L tipi kalsiyum kanallarının regülasyon bozukluğuna sebebiyet vererek dopaminerjik nöronların ateşlenme mekanizmasını bozabilmektedir. Böylece lezyon oluşumuna zemin hazırlayabilmektedir Kalbindin, Parkinsonlu beyinde anlamlı azalış gösterirken, kandaki kalbindin düzeyinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Geç dönemdeki Parkinsonlu beyinlerde ise yeniden yükselişe geçen kalbindin ekspresyonu, 10. haftada lezyonun iyileşmesiyle ilişkilendirilmiştir.

Bizim çalışmamızda, dört hafta süresince uygulanan isradipin tedavisi kandaki kalbindin seviyesini artırırken, striatum'daki kalbindin pozitif nöronlar üzerinde bir değişime neden olmamıştır. İsradipin'in kalsiyum kanalları üzerinden kalbindin düzeyine etki edebileceği bu çalışmada ortaya konmuştur.

Bu çalışma, nöroprotektif olarak etkisi deneysel çalışmalarla öne çıkan kalsiyum kanal blokerleri ile nöroprotektif etkisi olduğu gösterilen kalsiyum bağlayıcı proteinler arasındaki ilişkiye Parkinson hastalığı açısından yeni bir bakış açısıyla yaklaşmıştır. Klinikte ise Parkinson hastalığının teşhisi ve takibinde kalsiyum bağlayıcı proteinlerin rolünün olabileceği ancak daha detaylı çalışmalar gerektiği kanaatine varılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Arifoğlu Y, Her Yönuyle Anatomi. 3. Baskı, İstanbul Medikal Sağlık Ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti. İstanbul; 2021.
2. A. Martin-Bastida, R.J. Ward, R. Newbould, P. Piccini, D. Sharp, C. Kabba, M. C. Patel, M. Spino, J. Connelly, F. Tricta, R.R. Crichton, D.T. Dexter, Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1398.
3. Ahn, J. H., Hong, S., Park, J. H., Kim, I. H., Cho, J. H., Lee, T. K., Choi, S. Y. (2017). Immunoreactivities of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the somatosensory cortex of rodents during normal aging. *Molecular Medicine Reports*, 16, 7191–7198.
4. Amanda C. Burton, Kae Nakamura, Matthew R. Roesch. 2015. 'From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making.' *Neurobiol Learn Mem.* 117: 51-9.
5. Anekonda TS, Quinn JF, Harris C. L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2011; 41:62–70
6. Arash Fazl, Jori Fleisher. Anatomy, Physiology, and Clinical Syndromes of the Basal Ganglia: A Brief Review. *Semin Pediatr Neurol* 2018 Apr; 25:2-9. doi: 10.1016/j.spen.2017.12.005
7. Batini, C., Guegan, M., Palestini, M., Thomasset, M., & Vigot, R. (1997). Upregulation of calbindin-D28k immunoreactivity by excitatory amino acids. *Archives Italiennes de Biologie*, 135, 385–397.
8. Blandini, F.; Levandis, G.; Bazzini, E.; Nappi, G.; Armentero, M.T. Time-course of nigrostriatal damage, basal metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur. J. Neurosci.* 2007, 25, 397–405

9. Benoît Kornmann I, Erin Currie, Sean R Collins, Maya Schuldiner, Jodi Nunnari, Jonathan S Weissman, Peter Walter. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 2009 Jul 24;325(5939):477-81. doi: 10.1126/science.1175088. Epub 2009 Jun 25.
10. Berggård T, Miron S, Onnerfjord P, Thulin E, Akerfeldt KS, Enghild JJ, Akke M, Linse S. Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca²⁺ sensor. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):16662-72. doi: 10.1074/jbc.M200415200. Epub 2002 Feb 28. PMID: 11872749
11. Berggård T, Szczepankiewicz O, Thulin E, Linse S. Myo-inositol monophosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J Biol Chem* 2002; 277: 41954–41959
12. Bhoyar, R. C., Jadhao, A. G., Sabharwal, A., Ranjan, G., Sivasubbu, S., & Pinelli, C. (2019). Knockdown of calcium binding calb2a and calb2b genes indicates the key regulator of the early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Brain Structure & Function*, 224, 627–642.
13. Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: An update. *Trends Neurosci* 30, 194-202.
14. Burgoyne RD, Weiss JL. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺ binding proteins. *Biochem J* 2001; 353: 1–12
15. Cacabelos, R. *World Guide for Drug Use and Pharmacogenomics*; EuroEspes Publishing: Corunna, Spain, 2012.
16. Cacabelos, R.; Carrera, I.; Fernández-Novoa, L.; Alejo, R.; Corzo, L.; Rodríguez, S.; Alcaraz, M.; Nebriil, L. Casas, A.; Fraile, C.; et al. Parkinson's Disease: New solutions to old problems. *EuroEspes J*. 2017, 11, 74–96.
17. Carrera, I.; Carril, J.C. E-PodoFavalin-15999 (Atremorine®)-induced dopamine response in Parkinson's disease: Pharmacogenetics-related effects. *J. Genom. Med. Pharmacogenom*. 2016, 1, 1–26.

18. Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375–475
19. Chagniel L, Robitaille C, Lebel M, Cyr M. Striatal inhibition of calpains prevents levodopa-induced neurochemical changes and abnormal involuntary movements in the hemiparkinsonian rat model. *Neurobiol Dis.* 2012 Jan;45(1):645-55. doi: 10.1016/j.nbd.2011.10.011. Epub 2011 Oct 19
20. Charalampos Tzoulis 1, Gia Tuong Tran, Thomas Schwarzmüller, Karsten Specht, Kristoffer Haugarvoll, Novin Balafkan, Peer K Lilleng, Hrvoje Miletic, Martin Biermann, Laurence A Bindoff. Severe nigrostriatal degeneration without clinical parkinsonism in patients with polymerase gamma mutations. *Brain* 2013 Aug;136(Pt 8):2393-404. doi: 10.1093/brain/awt103. Epub 2013 Apr 26
21. Charles S. Venuto, Luoying Yang, Monica Javidnia1, David Oakes, D. James Surmeier, Tanya Simuni, *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2021; 8(3): 603–612
22. Charles J. Wilson' and Yasuo Kawaguchi. The Origins of Two-State Spontaneous Membrane Potential Fluctuations of Neostriatal Spiny Neurons. *The Journal of Neuroscience*, April 1, 1996, 16(7):2397-2410
23. Chen JF, Moratalla R, Impagnatiello F, et al. The role of the D (2) dopamine receptor (D (2)R) in A (2A) adenosine receptor (A (2A) R)- mediated behavioral and cellular responses as revealed by A (2A) and D (2) receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(4): 1970-5. [<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.4.1970>] [PMID: 11172060]
24. Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131: 1047–1058
25. Collier, T.J.; Kanaan, N.M.; Kordower, J.H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: Evidence from studies of non-human primates. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011, 12, 359–366.

26. C. Qiu, G. Hu, M. Kivipelto et al., “Association of blood pressure and hypertension with the risk of parkinson disease: the national FINRISK study,” *Hypertension*, vol. 57, no. 6, pp. 1094–1100, 2011
27. David Sulzer, Clifford Cassidy, Guillermo Horga, Un Jung Kang, Stanley Fahn, Luigi Casella, Gianni Pezzoli, Jason Langley. Neuromelanin detection by magnetic resonance imaging (MRI) and its promise as a biomarker for Parkinson’s disease. *npj Parkinson’s Disease* (2018) 4:11 ; doi:10.1038/s41531-018-0047-3
28. Dawson, T.M.; Golde, T.E.; Lagier-Tourenne, C. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 2018, 21, 1370–1379.)
29. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 1990 Jul;13(7):281-5. doi: 10.1016/0166-2236(90)90110-v. PMID: 1695404
30. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis* 2018;8(s1): S3–S8.
31. Double KL, Gerlach M, Schunemann V, Trautwein AX, ZeccaL, Gallorini M, et al. Iron-binding characteristics of neurome-lanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol.*2003;66:489—94.
32. Erekat, N. S. Apoptosis and its Role in Parkinson’s Disease, in *Parkinson’s Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects.* (eds. T. B. Stoker & J. C. Greenland) (Codon Publications Copyright: The Authors., Brisbane, 2018).
33. Elkouzi A, Vedam-Mai V, Eisinger RS, Okun MS. Emerging therapies in Parkinson disease- repurposed drugs and new approaches. *Nat Rev Neurol.* 2019 Apr;15(4):204-223. doi: 10.1038/s41582-019-0155-7
34. Fairless, R., Williams, S. K., & Diem, R. (2019). Calcium-binding proteins as determinants of central nervous system neuronal vulnerability to disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, E2146.

35. Feher JJ, Fullmer CS, Wasserman RH. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol.* 1992 Feb;262(2 Pt 1):C517-26. doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.2.C517. PMID: 1539638
36. Fieblinger T Graves SM, Sebel LE, Alcacer C, Plotkin JL, Gertler TS, Chan CS, Heiman M, Greengard P, Cenci MA, Surmeier DJ. (2014) Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia *Nature communications* 5:5316 doi:10.1038/ncomms6316
37. Foehring RC, Zhang XF, Lee JC & Callaway JC (2009) Endogenous calcium buffering capacity of substantia nigral dopamine neurons, *J Neurophysiol* 102, 2326–33. [PubMed: 19675297]
38. Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin-bound ferric iron as an experimental model of dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14Suppl. 2:S185—8.52
39. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺ binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405:199–221.
40. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K & Braak H (2013) 100 years of Lewy pathology, *Nat Rev Neurol* 9, 13–24. [PubMed: 23183883]
41. Goichi Beck, Arun Singh, Stella M. Papa. Dysregulation of striatal projection neurons in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018 March 125(3): 449–460. doi:10.1007/s00702-017-1744-5.
42. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment *CNS Neurosci Ther* 2017 Jan;23(1):5-22. doi: 10.1111/cns.12655. Epub 2016 Nov 22

43. Gotzos V, Vogt P, Celio MR. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. *Pathol Res Pract* 1996; 192:13747
44. Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci* 2002 Aug 15;22(16):6900-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-16-06900.2002
45. Hartmut Schmidt. Three functional facets of calbindin D-28k. 15March2012 doi: 10.3389/fnmol.2012.00025
46. Heiko Braak, Estifanos Ghebremedhin, Udo Rüb, Hansjürgen Bratzke, Kelly Del Tredici. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* (2004) 318: 121–134 DOI 10.1007/s00441-004-0956-9
47. Heizmann, C. W., & Braun, K. (1992). Changes in Ca (2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, 15, 259–264
48. Hitoshi Kita, Takako Kita. Role of Striatum in the Pause and Burst Generation in the Globus Pallidus of 6-OHDA-Treated Rats. *Front Syst Neurosci* 2011 Jun 8;5: 42. doi: 10.3389/fnsys.2011.00042. eCollection 2011
49. Hobbs CA, Deterding LJ, Perera L, Bobay BG, Thompson RJ, Darden TA, et al. Structural Characterization of the Conformational Change in Calbindin-D28k upon Calcium Binding using Differential Surface Modification Analyzed by Mass Spectrometry. *Biochemistry* 48(36): 8603-8614 (2009).
50. Hoffmann EK, Holm NB, Lambert IH. Functions of volume-sensitive and calcium-activated chloride channels. *IUBMB Life*. 2014 Apr;66(4):257-67. doi: 10.1002/iub.1266. Epub 2014 Apr 28

51. Huang, L.; Deng, M.; He, Y.; Lu, S.; Ma, R.; Fang, Y. β -asarone and levodopa co-administration increase striatal dopamine level in 6-hydroxydopamine induced rats by modulating P-glycoprotein and tight junction proteins at the blood-brain barrier and promoting levodopa into the brain. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 2016, 43, 634–643
52. Huntula S, Saegusa H, Wang X, Zong S and Tanabe T (2019) Involvement of N-type Ca^{2+} channel in microglial activation and its implications to aging-induced exaggerated cytokine response. *Cell Calcium* 82, 102059.
53. Ilijic E, Guzman JN, Surmeier DJ. The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2011;43: 364–371
54. Iljina M, Garcia GA, Horrocks MH, Tosatto L, Choi ML, Ganzinger KA, Abramov AY, Gandhi S, Wood NW, Cremades N, Dobson CM, Knowles TP & Klenerman D (2016) Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E1206–15. [PubMed: 26884195]
55. Ikura M (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 1: 14–17.
56. Inoue KI, Miyachi S, Nishi K, Okado H, Nagai Y, Minamimoto T, Nambu A, Takada M Recruitment of calbindin into nigral dopamine neurons protects against MPTP-Induced parkinsonism. *Mov Disord.* 2019 Feb;34(2):200-209. doi: 10.1002/mds.107. Epub 2018 Aug 30.
57. J.N. Guzman, J. Sanchez-Padilla, D. Wokosin, J. Kondapalli, E. Ilijic, P. T. Schumacker, D.J. Surmeier, Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1, *Nature* 468 (7324) (2010) 696–700.

58. J.N. Guzman, J. Sanchez-Padilla, C.S. Chan, D.J. Surmeier, Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons, *J. Neurosci.* 29 (35) (2009) 11011–11019
59. J.N. Guzman, E. Ilijic, B. Yang, J. Sanchez-Padilla, D. Wokosin, D. Galtieri, J. Kondapalli, P.T. Schumacker, D.J. Surmeier, Systemic isradipine treatment diminishes calcium-dependent mitochondrial oxidant stress, *J. Clin. Invest.* 128 (6) (2018) 2266–2280.
60. Johannes Friedrich Georg Neuhaus, Olivier Richard Baris, Anne Kittelmann, Katrin Becker, Markus Alexander Rothschild, Rudolf Josef Wiesner. Catecholamine Metabolism Induces Mitochondrial DNA Deletions and Leads to Severe Adrenal Degeneration during Aging. *Neuroendocrinology* 2017;104(1):72-84. doi: 10.1159/000444680. Epub 2016 Feb 20
61. J.R. Crittenden A. M. Graybiel, *Handbook of Behavioral Neuroscience*, Volume 24, 2016, Pages 783-802
62. J Meiser, S Delcambre, A Wegner, C Jäger, J Ghelfi, A Fouquier d'Herouel, X Dong 1, D Weindl, C Stautner, Y Nonnenmacher, A Michelucci, O Popp, F Giesert, S Schildknecht, L Krämer, J G Schneider, D Woitalla, W Wurst, A Skupin, D M Vogt Weisenhorn, R Krüger, M Leist, K Hiller. Loss of DJ-1 impairs antioxidant response by altered glutamine and serine metabolism. *Neurobiol Dis* 2016 May; 89:112-25. doi:10.1016/j. nbd.2016.01.019. Epub 2016 Feb 1
63. Kahl C. R., Means A. R., Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways, *Endocr. Rev.*, 24:719-736, 2003
64. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet* 2015; 386:896–912.
65. Katzenschlager, R.; Lees, A.J. Treatment of Parkinson's disease: Levodopa as the first choice. *J. Neurol.* 2002, 249, II19–II24.

66. Katzenschlager, R.; Lees, A.J. Treatment of Parkinson's disease: Levodopa as the first choice. *J. Neurol.* 2002,249, II19–II24. [CrossRef] [PubMed]
67. Kawasaki, H., Nakayama, S., and Kretsinger, R. H. Classification and evolution of EF-hand proteins (1998) *Biometals* 11, 277–295.
68. Klingelhofer L, Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease – the gut–brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 625
69. Kojetin DJ, Venters RA, Kordys DR, Thompson RJ, Kumar R, Cavanagh J. Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded CB-D28K. *Nature Struct Mol Biol* 13(7): 641-647 (2006).
70. Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp Muscle Calcium-Binding Protein. II. Structure Determination and General Description. *J Biol Chem* 248(9): 3313-3326 (1973).
71. K. Vekrellis and L. Stefanis, “Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson’s disease and other synucleinopathies,” *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 16, no. 4, pp. 421–432, 2012.
72. Kwon, O. J., Kim, J. Y., Kim, S. Y., & Jeon, C. J. (2005). Alterations in the localization of calbindin D28K-, calretinin-, and parvalbumin-immunoreactive neurons of rabbit retinal ganglion cell layer from ischemia and reperfusion. *Molecules and Cells*, 19, 382–390.
73. Lachlan Thompson 1, Perrine Barraud, Elin Andersson, Deniz Kirik, Anders Björklund. Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci* 2005 Jul 6;25(27):6467-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1676-05.2005

74. Lachlan Thompson, Perrine Barraud, Elin Andersson, Deniz Kirik, and Anders Bjōrklund. Identification of Dopaminergic Neurons of Nigral and Ventral Tegmental Area Subtypes in Grafts of Fetal Ventral Mesencephalon Based on Cell Morphology, Protein Expression, and Efferent Projections. *The Journal of Neuroscience*, July 6, 2005 • 25(27):6467– 6477 • 6467
75. Laura Clara Grandia, Giuseppe Di Giovannib, Salvatore Galatia. 2018. ‘Animal models of early-stage Parkinson’s disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms’ *Journal of Neuroscience Methods* 308 205–218
76. Lertxundi, U.; Isla, A.; Solinis, M.A.; Domingo-Echaburu, S.; Hernandez, R.; Peral-Aguirregoitia, J.; Medrano, J. Anticholinergic burden in Parkinson’s disease inpatients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2015, 71, 1271–1277.
77. Liss B, Striessnig J. The potential of L-type calcium channels as a drug target for neuroprotective therapy in Parkinson’s disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019;59: 263–289.
78. L. ZECCA, T. SHIMA, A. STROPPOLO, C. GOJ G. A. BATTISTON, II R. GERBASI T. SARNA and H. M. SWARTZ. Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. *Neuroscience* Vol. 73, No. 2, pp. 407-415, 1996
79. Lorraine V Kalia, Anthony E Lang. Parkinson's disease. *Lancet* 2015 Aug 29;386(9996):896-912. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-
80. Ma, Y.; Zhan, M.; OuYang, L.; Li, Y.; Chen, S;Wu, J.; Chen, J.; Luo, C.; Lei,W. The effects of unilateral 6-OHDA lesion in medial forebrain bundle on the motor, cognitive dysfunctions and vulnerability of different striatal interneuron types in rats. *Behav. Brain Res.* 2014, 266, 37–45

81. Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26:3875–3884 doi:10.1523/JNEUROSCI.4439-05.2006 [PubMed: 16597742]
82. Mangoni AA, Jackson SH. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57: 6–14.
83. Marco Pignatelli, Antonello Bonc. Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective *Neuron* 2015 Jun 3;86(5): 1145-57. doi: 10.1016/j.neuron.2015.04.015
84. Masliukov, P. M., Moiseev, K., Budnik, A. F., Nozdrachev, A. D., & Timmermans, J. P. (2017). Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37, 1257–1267.
85. Meoni S, Cury RG, Moro E. New players in basal ganglia dysfunction in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2020;252: 307-327. doi: 10.1016/bs.pbr.2020.01.001.
86. 85. 84. 81. McDonough SI (2004) *Calcium Channel Pharmacology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
87. Michael J Higley 1, Bernardo L Sabatini. Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 Apr 1;4(4): a 005686. doi: 10.1101/cshperspect. a005686
88. Mitsuhiro Ikura. Calcium binding and conformational response in EF hand proteins. *Tibs* 21 - January 1996
89. Mizuta I, Tsunoda T, Satake W, et al. Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and alpha-synuclein in sporadic Parkinsons disease. *Hum Genet* 2008; 124: 89–94.

90. Mohsin H.K. Roshan*, Amos Tambo and Nikolai P. Pace. Potential Role of Caffeine in the Treatment of Parkinson's Disease. *The Open Neurology Journal*, 2016, 10, 42-58
91. Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. Share Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*. 2009 Apr 30;62(2):218-29. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.033
92. Mongia S, Yamaguchi T, Liu B, Zhang S, Wang H, Morales M (2019) The ventral tegmental area has calbindin neurons with the capability to co-release glutamate and dopamine into the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 50:3968–3984
93. Mori S. Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and in awake, freely moving cats. *Prog Neurobiol*. 1987;28(2):161–95.
94. Mouatt-Prigent, A., Karlsson, J.O., Yelnik, J., Agid, Y., Hirsch, E.C., 2000. Calpastatin immunoreactivity in the monkey and human brain of control subjects and patients with Parkinson's disease. *J. Comp. Neurol.* 419 (2), 175–192.
95. Mullapudi A, Gudala 37. K, Boya CS, Bansal D. Risk of Parkinson's disease in the users of antihypertensive agents: evidence from the meta-analysis of observational studies. *J Neurodegener Dis* 2016; 2016:5780809
96. M. J. Hurley, B. Brandon, S. M. Gentleman, and D. T. Dexter, "Parkinson's disease is associated with altered expression of CaV1 channels and calcium-binding proteins," *Brain*, vol. 136, no. 7, pp. 2077–2097, 2013
97. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*

98. 2008 Apr 9;152(4):1024-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.046. Epub 2008 Feb 7
99. Nasrin NEJATBAKHS, Zhong-ping FENG. Calcium binding protein-mediated regulation of voltage-gated calcium channels linked to human diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* (2011) 32: 741–748
100. Noble JW, Almalki R, Roe SM, Wagner A, Duman R, Atack JR. Share The X-ray structure of human calbindin-D28K: an improved model. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2018 Oct 1;74(Pt 10):1008-1014. doi: 10.1107/S2059798318011610. Epub 2018 Oct 2
101. Nutt JG, Bloem BR, Giladi N, Hallett M, Horak FB, Nieuwboer A. Freezing of gait: moving forward on a mysterious clinical phenomenon. *Lancet Neurol.* 2011;10(8):734–44.
102. Oertel, W; Schulz, J.B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J. Neurochem.* 2016, 139, 325–337.
103. Parkinson Study Group STEADY-PD III Investigators. Isradipine versus placebo in early Parkinson disease: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2020; 172:591–598.
104. Pacelli C, Giguère N, Bourque MJ, Lévesque M, Slack RS, Trudeau LÉ. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* 2015 Sep 21;25(18):2349-60. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.050. Epub 2015 Aug 27
105. Palop, J. J., Jones, B., Kekonius, L., Chin, J., Yu, G.-Q., Raber, J., Masliah, E. and Mucke, L. (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer’s disease-related cognitive deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9572-9577.
106. Pan, P.-Y., and Ryan, T. A. (2012) Calbindin Controls Release Probability in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 813

107. Palop JJ, Jones B, Kekoni L, Chin J, Yu GQ, et al. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(16): 9572-9577 (2003).
108. Petegem V and Minor DL Jr. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(5):887–893.
109. Picconi B, Centonze D, Rossi S, Bernardi G, Calabresi P. Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain.* 2004 Jul;127 (Pt 7):1661-9. doi: 10.1093/brain/awh190. Epub 2004 May 20. PMID: 15155524
110. Jean-Francois Poulin, Jian Zou, Janelle Drouin-Ouellet, Kwang-Youn A Kim, Francesca Cicchetti, and Rajeshwar B Awatramani. Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene profiling. *Cell Rep.* 2014 November 6; 9(3): 930–943. doi: 10.1016/j.cel rep.2014.10.008.
111. Rentsch P, Stayte S, Morris GP, Vissel B. Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on L-Dopa induced dyskinesia
112. Riascos D, de Leon D, Baker-Nigh A, Nicholas A, Yukhananov R, Bu J, Wu CK, Geula C. Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2011 Nov;122(5):565-76. doi: 10.1007/s00401-011-0865-4. Epub 2011 Aug 27. PMID: 21874328
113. Riedel, O.; Bitters, D.; Amann, U.; Garbe, E.; Langner, I. Estimating the prevalence of Parkinson's disease (PD) and proportions of patients with associated dementia and depression among the older adults based on secondary claims data. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 2016, 31, 938–943.
114. Roger L. Albin, Anne B. Young, and John B. Penney, 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS*, Vol. 12, No. 10

115. Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L. J. & Rubinsztein, D. C. (2005). *J. Cell Biol.* 170, 1101–1111.
116. Sasaki, T.; Liu, K.; Agari, T.; Yasuhara, T.; Morimoto, J.; Okazaki, M.; Takeuchi, H.; Toyoshima, A.; Sasada, S.; Shinko, A.; et al. Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2016, 275, 220–231.
117. S.P. Braithwaite, M. Voronkov, J.B. Stock, M.M. Mouradian, Targeting phosphatases as the next generation of disease-modifying therapeutics for Parkinson's disease, *Neurochem. Int.* 61 (6) (2012) 899–906.
118. S. Kang, G. Cooper, S. F. Dunne et al., "CaV1.3-selective L-type calcium channel antagonists as potential new therapeutics for Parkinson's disease," *Nature Communications*, vol. 3, p. 1146, 2012.
119. Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S. 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum.* 2002 Dec;1(4):241-58. doi: 10.1080/147342202320883551. PMID: 12879963
120. Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 2007; 83(5)
121. Shamir A, Elhadad (Rosolio) N, Belmaker RH, Agam G. Interaction of calbindin D28k and inositol monophosphatase in human postmortem cortex: possible implications for bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2005; 7: 42–48. ^a Blackwell Munksgaard, 2005
122. Shen Tang, Xiaonan Deng, Jie Jiang, Michael Kirberger and Jenny J. Yang. Design of Calcium-Binding Proteins to Sense Calcium. *Molecules* 2020, 25, 2148.

123. Singh A, Verma P, Raju A, Mohanakumar KP. Nimodipine attenuates the parkinsonian neurotoxin, MPTP-induced changes in the calcium binding proteins, calpain and calbindin. *J Chem Neuroanat.* 2019 Jan;95:89-94. doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.02.001. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29427747
124. Soto-Ortolaza AI, Behrouz B, Wider C, Vilariño-Güell C, Heckman MG, Aasly JO, Mark Gibson J, Lynch T, Jasinska-Myga B, Krygowska-Wajs A, Opala G, Barcikowska M, Czyzewski K, Uitti RJ, Wszolek ZK, Farrer MJ, Ross OA. Calbindin-1 association and Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2010 Feb;17(2):208-11. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02769.x. Epub 2009 Aug 5
125. Sooy, K.; Kohut, J.; Christakos, S. The role of calbindin and 1,25dihydroxyvitamin D3 in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2000, 9, 341–347
126. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388: 839–40. *J Neurosci Res.* 2015 Aug;93(8):1184-91. doi: 10.1002/jnr.23562. Epub 2015 Ap
127. Spruill MM, Kuncel RW. Calbindin-D28K is increased in the ventral horn of spinal cord by neuroprotective factors for motor neurons.
128. Sun, Y., Zhang, H., Selvaraj, S., Sukumaran, P., Lei, S., Birnbaumer, L., et al. (2017). Inhibition of L-Type Ca²⁺ channels by TRPC1-STIM1 complex is essential for the protection of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 37, 3364–3377. doi: 10.1523/jneurosci.3010-16.2017
129. Surmeier DJ, Graves SM, Shen W (2014) Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease *Current opinion in neurobiology* 29:109–117 doi:10.1016/j.conb.2014.07.008 [PubMed: 25058111]

130. Surmeier DJ, Nguyen JT, Lancki N, Venuto CS, Oakes D, Simuni T, Wyse RK. Re-Analysis of the STEADY-PD II Trial-Evidence for Slowing the Progression of Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2022 Feb;37(2):334-342. doi: 10.1002/mds.28850. Epub 2021 Nov 12
131. Tanya Simuni, David Oakes, Kevin Biglan, Wendy R. Galpern, Robert Hauser, Karen Hodgeman, Elise Kayson Isradipine Versus Placebo in Early Parkinson Disease: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2020 May 5;172(9):591-598. doi: 10.7326/M19-2534. Epub 2020 Mar 31
132. T.H. Murphy, R.L. Schnaar, J.T. Coyle, Immature cortical neurons in cultured cortical neurons using a HSV-1 vector system enhances uptake, *Faseb J.* 4 (1990)
133. Theresa Link, Simon Passek, Pauline Wimberger, Kerstin Frank, Yana Damyanova Vassileva, Michael Kramer and Jan Dominik Kuhlmann. Serum calretinin as an independent predictor for platinum resistance and prognosis in ovarian cancer. *Int. J. Cancer:* 146, 2608–2618 (2020)
134. Thomas Wichmann and Mahlon R. DeLong. Pathophysiology of parkinson's disease: The MPTP Primate Model of the Human Disorder. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 991: 199-213 (2003) New York Academy of Sciences
135. Tord Berggard, Olga Szczepankiewicz, Eva Thulin, Sara Linse. Myo-inositol monophosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J Biol Chem* 2002 Nov 1;277(44):41954-9. doi: 10.1074/jbc.M203492200. Epub 2002 Aug 9
136. Tsuboi K, Kimber TA, Shults CW. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res.* 2000; 866:55—64.54.

137. Tsuyoshi Yamaguchi, Hidechika Ozawa, Shigeki Yamaguchi, Shinsuke Hamaguchi, Shuichi Ueda. Calbindin-Positive Neurons Co-express Functional Markers in a Location-Dependent Manner Within the A11 Region of the Rat Brain. *Neurochemical Research* (2021) 46:853–865
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03217-6>
138. Tyler K. 1992. A history of Parkinson's disease. In *Handbook of Parkinson's disease* (ed. Koller WC), pp. 1–34. Marcel Dekker, New York.
139. Ungerstedt U, 1968. '6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. Dec;5(1):107-10
140. Venderova, K. & Park, D. S. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009365 (2012)
141. Verkhratsky A, Toescu EC. Calcium and neuronal aging. *Trends Neurosci.* 1998 Jan;21(1):2-7. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01156-9
142. Vishnyakova PA, Moiseev KY, Spirichev AA, Emanuilov AI, Nozdrachev AD, Masliukov PM. Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. *Anat Rec.* 2021;304: 1094–1104.
143. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, et al. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 2013; 47: 495–508.
144. Wichmann T, DeLong MR. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 199-213.
145. Wilson, C.J. and Kawaguchi, Y. (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 2397–2410

146. Won-Seok Choi, Eunhee Lee, Junghyun Lim, Young J. Oh. 2008. 'Calbindin-D28K prevents drug-induced dopaminergic neuronal death by inhibiting caspase and calpain activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, P127-131
147. Venero JL, Revuelta M, Cano J, Machado A. Time-course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J Neurochem*.1997;68:2458—68.19
148. Victoria Vaccaro, † Michael J Devine, Nathalie F Higgs, and Josef T Kittler. Miro1-dependent mitochondrial positioning drives the rescaling of presynaptic Ca²⁺ signals during homeostatic plasticity. *EMBO Rep*. 2017 Feb; 18(2): 231–240 doi: 10.15252/embr.201642710
149. Yuan, J., Amin, P. & Ofengeim, D. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nat. Rev. Neurosci*. 20, 19–33 (2019).
150. Zallo F, Gardenal E, Verkhatsky A, Rodríguez JJ. Loss of calretinin and parvalbumin-positive interneurons in the hippocampal CA1 of aged Alzheimer's disease mice. *Neurosci Lett*. 2018 Aug 10; 681:19-25. doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.027. Epub 2018 May 18

21.Ulusal Anatomi Kongresi Katılım Belgesi



CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

is to certify that

Hatice Boraci

presented a poster entitled

**The effect of a calcium channel blocker, isradipine, on
calbindin blood levels and calbindin positive neurons in the
striatum of Parkinsonian rats lesioned with 6-OHDA**

at the

12 FENS
Forum of Neuroscience

11-15 July 2020





Neuroprotective effect of regular swimming exercise on calretinin-positive striatal neurons of Parkinsonian rats

H. Boracı¹ · Ö. Kirazlı¹ · R. Gülhan² · D. Yıldız Sercan¹ · Ü. S. Şehirli¹

Received: 15 September 2019 / Accepted: 8 March 2020 / Published online: 21 March 2020
© Japanese Association of Anatomists 2020

Abstract

In Parkinson's disease (PD), physical therapy is one of the mainstays of supportive treatment modalities. This study focused on the neuroprotective effect of regular exercise on striatal calretinin positive interneurons in a rat model of PD. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was injected unilaterally into the medial forebrain bundle of Wistar rats. 6-OHDA lesioned (Parkinsonian) and unlesioned (control) rats were divided into sedentary and exercise groups. Exercise groups had daily swimming sessions for 30 min for 6 weeks. After 6-OHDA injections, an apomorphine-induced rotation test was performed (0.05 mg/kg, subcutaneous) at the 3rd and 6th weeks. At the end of the 6th week, brains were removed following transcardiac perfusion. The brain sections were stained immunohistochemically for tyrosine hydroxylase and calretinin reactivity. The number of rotations was significantly lower in Parkinsonian exercise group compared to Parkinsonian sedentary group at the 6th week ($p=0.024$) and there was significant difference between Parkinsonian sedentary groups at the 3rd and 6th weeks ($p<0.002$). The calretinin positive interneurons significantly increased in the Parkinsonian exercise group compared to Parkinsonian sedentary group ($p=0.0003$) and control exercise group ($p<0.0001$). To conclude, the swimming exercise led to a striking increment of calretinin positive interneurons in the striatum of Parkinsonian rat. These findings indicated that the neuroprotective mechanism of exercise increased the number of striatal calretinin positive interneurons that might generate new approaches for the mechanism of neuroprotection. We concluded that striatal calretinin positive interneurons have an important role in the neuroprotective mechanisms of exercise in PD.

Keywords Calretinin · Parkinson's disease · Rat · Striatum · Swimming exercise

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative movement disorder. The approaches for the treatment focused on the symptoms due to the fact that there is no cure for the disease (Balestrino and Schapira 2020). A variety of treatment modalities are being in use, including drug therapy, deep brain stimulation and supportive treatments. The physical exercise is the clinically approved component of these supportive treatments. The efficacy of physical exercise, especially on motor functions, is variable and based upon the

frequency, intensity, time and type of exercise (Ammann et al. 2014).

By demonstrating an improved physical capacity and increased oxidative capacity of the major muscle groups with no sign of stress, swimming exercise is accepted as a well-liked treatment of PD among experiments in recent years (Haobam et al. 2005; Contarteze et al. 2008). The swimming is a natural ability of rats, and therefore, it is also preferred in experimental rat models (Souza et al. 2009).

Several studies in PD animal models claim neuroprotective effects of exercise on dopaminergic neurons and increase in neurotrophic factors (Garza et al. 2004; Nepper et al. 1995; Gomez-Pinilla et al. 1998). It is mentioned that treadmill exercise increases cell proliferation as well as receptors for neurotrophic factors BDNF (brain derived neurotrophic factor) and GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) in the striatum after brain damage (Yi et al. 2009). Both vigorous and voluntary exercises lead to an increase in neurotrophic factors. These neurotrophic

✉ Ü. S. Şehirli
usehirli@marmara.edu.tr

¹ Department of Anatomy, School of Medicine, Marmara University, Başbüyük Yolu No: 9/2 Başbüyük, Maltepe, Istanbul, Turkey

² Department of Medical Pharmacology, School of Medicine, Marmara University, Istanbul, Turkey