

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

ROTENON İLE OLUŞTURULMUŞ PARKİNSON
HASTALIĞI MODELİNDE VORTİOKSETİNİN
NÖRODEJENERASYON VE BİLİŞSEL DİSFONKSİYON
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİVO OLARAK
İNCELENMESİ

Dilara NEMUTLU SAMUR

DOKTORA TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

ROTENON İLE OLUŞTURULMUŞ PARKİNSON
HASTALIĞI MODELİNDE VORTİOKSETİNİN
NÖRODEJENERASYON VE BİLİŞSEL DİSFONKSİYON
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİVO OLARAK
İNCELENMESİ

Dilara NEMUTLU SAMUR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Gül ÖZBEY

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-4412 proje numarası ile ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından 2019S253 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca sinirbilim çalışmalarına duyduğum heyecanı daima canlı tutan danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Gül ÖZBEY'e, değerli hocalarım Prof.Dr. Sadi ÖZDEM ve Prof.Dr. Coşkun USTA'ya, Anabilim dalımızın değerli öğretim üyelerine ve destekleriyle beni motive eden sevgili yol arkadaşlarım Ayşe Gül GÖNEN, Ayşe BARUTCUGİL, Melike Nur AKBAŞ ve Z. Şevval AKSOYALP'e... Akademik hayatıma başlarken olduğu gibi hiçbir dönüm noktasında beni yalnız bırakmayan değerli hocalarım Prof.Dr. Rana ARSLAN'a ve Doç.Dr. Nurcan BEKTAŞ TÜRKMEN'e... Projede yer alan hammaddenin temininde yardımcı olan Dr.Öğr. Üyesi Devrim DEMİR DORA'ya ve hammaddeyi karşılıksız hibe eden Lundbeck İlaç Tic. Ltd. Şti.'ye teşekkür borçluyum.

Bu doktora tezi, gece yarılarna uzayan mesailere katlanan, ayağı kırıldığı halde laboratuvara girip çalışan, sahip olduğu vizyonu ile kısıtlı imkanları genişleten, hayalleri doğrultusunda yorulmadan emek harcayan heyecanlı bir ekibin ortak ürünüdür. Bu ekipte yer alan sevgili çalışma arkadaşlarım Güven AKÇAY, Sendegül YILDIRIM, Ayşe ÖZKAN ve Tuğçe ÇEKER'e...Bu proje henüz küçük bir fikir filiziyken kapısını çalarak destek aldığım değerli hocalarım Prof.Dr. Aysel AĞAR'a, Prof.Dr. Narin DERİN'e, Prof.Dr. Mutay ASLAN'a ve Prof.Dr. Gamze TANRIÖVER'e,

Alanya'daki çalışma ortamımı güzelleştiren arkadaşlarım Rumeysa ve Murat ile değerli hocam Dr.Öğr.Üyesi Erkan MAYTALMAN'a... Tüm heyecanlarıma ortak olan sevgili arkadaşlarım Büşra, Hatice, Seda, Nazire ve Nurdan'a verdikleri destek ve motivasyon için teşekkür ederim.

Elbetteki en büyük teşekkürü hayatım boyunca verdiğim tüm kararlarda ıslıl ıslıl gözlerle beni destekleyen değerli annem ve babam Serpil-Selahattin NEMUTLU ile canım ablam Dilek ve eşi İbrahim ŞAHİN'e borçluyum.

Son olarak; ders çalışırken, sınava hazırlanırken, deney yaparken ve sabahlara kadar tez yazarken size saygı duyan ve sabırla sizi bekleyen birinin olması paha biçilemez. Fedakarlık gerektiren bu süreci tamamlarken hissettirdikleri için değerli eşim Ömer Faruk SAMUR'a çok teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Parkinson hastalığı (PH), dopaminerjik hasarın yanı sıra dopaminerjik olmayan disfonksiyon ile ilişkili motor ve motor olmayan semptomlarla karakterizedir. Vortiksetin, potansiyel prokognitif etkileri olan multimodal serotonerjik bir antidepresandır. Bu çalışmada, rotenon ile indüklenen PH sıçan modelinde vortiksetinin motor fonksiyonlar, uzaysal öğrenme ve bellek ile depresyon-benzeri davranışlar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Erkek Sprague-Dawley sıçanlara 28 gün boyunca rotenon (2 mg/kg/gün, s.c.) ve/veya vortiksetin (10 mg/kg/gün, s.c.) uygulandı. Motor fonksiyonlar (rotarod, katalepsi, açık alan), anhedoni (sükroz tercihi), anksiyete (yükseltilmiş artı labirent) ve uzaysal öğrenme ve bellek yetenekleri (yeni nesne tanıma, Morris'in su tankı) değerlendirildi. Striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında immünohistokimyasal (TH, α -sinüklein, pS129- α -sinüklein, *cleaved* kaspaz-3, TLR-2), nörokimyasal (dopamin, noradrenalin, serotonin, glutamin, L-glutamik asit) ve biyokimyasal (TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF κ B-p65) analizler gerçekleştirildi.

Bulgular: Rotenon uygulaması, anksiyete hariç, motor ve bilişsel disfonksiyonlar ile anhedoniye indükledi, immünohistokimyasal analizlerle gösterildiği gibi nöronal hasara neden oldu. Ayrıca, beyin dokularında inflamatuvar yanıtı bozdu ve nörotransmitter seviyelerini değiştirdi. Vortiksetin ile tedavi, bu parametrelerde bölge-spesifik etkiler aracılığıyla anlamlı bir iyileşme sağladı. İlginç bir şekilde, vortiksetin ile kontrol grubuna kıyasla sadece SNpc'de artmış TLR-2 ve azalmış TH immünoreaktivitesi ile gösterildiği gibi, bazal gangliyonlarda bir tür disfonksiyonun tetiklendiği düşünülmektedir.

Sonuç: Bu çalışma, vortiksetinin rotenon ile indüklenen PH modelinde nörodejenerasyonla ilişkili motor ve bilişsel bozukluklar üzerinde faydalı etkileri olduğunu göstermektedir. Bu yararlı etkilerin altında yatan olası mekanizmalar, TLR-2 inhibisyonunu ve vortiksetinin nörokimyasal restorasyonunu kapsamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, Toll-benzeri reseptörler, Nörodejenerasyon, Vortiksetin.

ABSTRACT

Objective: Parkinson's disease (PD) is characterized by motor and non-motor symptoms associated with non-dopaminergic dysfunction as well as dopaminergic injury. Vortioxetine is a multimodal serotonergic antidepressant with potential procognitive effects. This study aimed to explore the effects of vortioxetine on motor functions, spatial learning and memory, and depressive-like behavior in the rotenone-induced rat model of PD.

Method: Male Sprague-Dawley rats were daily administered with the rotenone (2 mg/kg/day, s.c.) and/or vortioxetine (10 mg/kg/day, s.c.) for 28 days. Motor functions (rotarod, catalepsy, open-field), anhedonia (sucrose preference), anxiety (elevated plus maze), and spatial learning and memory abilities (novel object recognition and Morris water maze) were evaluated. Immunohistochemical (TH, α -synuclein, pS129- α -synuclein, cleaved caspase-3, TLR-2), neurochemical (dopamine, noradrenaline, serotonin, glutamine, L-glutamic acid), and biochemical (TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF κ B-p65) analysis are performed in the striatum, prefrontal cortex, and hippocampus tissues.

Results: Rotenone administration significantly induced motor and cognitive dysfunction as well as depression-like behavior but not anxiety, caused neuronal damage as evidenced by immunohistochemical analysis. It also impaired inflammatory response and affected neurotransmitter levels in brain tissues. Treatment with vortioxetine produced a significant improvement in these parameters through region-specific effects. Interestingly, vortioxetine is thought to trigger a sort of dysfunction in basal ganglia as evidenced by increased TLR-2 and decreased TH immunoreactivity only in SNpc compared to the control group.

Conclusion: The present study indicates that vortioxetine has beneficial effects on motor dysfunction as well as cognitive impairment associated with neurodegeneration in the rotenone-induced PD model. Possible mechanisms underlying these beneficial effects cover TLR-2 inhibition and neurochemical restoration of vortioxetine.

Keywords: Parkinson's disease, Toll-like receptors, Neurodegeneration, Vortioxetine.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
TABLolar DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı	3
2.1.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi	3
2.1.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi ve Klinik Özellikleri	4
2.1.3. Parkinson Hastalığının Nörobiyolojisi	5
2.2. Parkinson Hastalığında Motor Olmayan Semptomlar	7
2.2.1. Depresyon	9
2.2.2. Bilişsel Disfonksiyon	10
2.3. Öğrenme ve Bellek	12
2.3.1. Hipokampus	13

2.3.2. Prefrontal Korteks	15
2.4. Parkinson Hastalığında Nörotransmitter Sistemlerinin Rolü	17
2.4.1. Parkinson Hastalığında Dopaminerjik Sistem	17
2.4.2. Parkinson Hastalığında Kolinergik Sistem	18
2.4.3. Parkinson Hastalığında Noradrenergik Sistem	19
2.4.4. Parkinson Hastalığında Serotonergik Sistem	19
2.4.5. Parkinson Hastalığında GABAergik ve Glutamaterjik Sistemler	23
2.5. Santral Sinir Sistemi İmmün Sistemi	23
2.5.1. Mikroglia ve Nörodejenerasyon: Parkinson Patogenezindeki Rolü	25
2.5.2. Patern Tanıma Reseptörleri	26
2.5.3. Bir DAMP Molekülü Olarak α -Sinüklein	30
2.5.4. Toll-Benzeri Reseptör-2 Sinyal Yolağının Parkinson Patogenezindeki Rolü	31
2.6. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri	32
2.6.1. Rotenonla İndüklenen Parkinson Hastalığı Hayvan Modeli	34
2.7. Parkinson Hastalığının Tedavisi	35
2.7.1. Motor Semptomlar için Güncel Farmakolojik Tedavi Stratejileri	36
2.7.2. Motor Olmayan Semptomlar için Güncel Farmakolojik Tedavi Stratejileri	39
2.7.3. Hastalığı Modifiye Eden Tedavi Seçenekleri	41

3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Kullanılan Kimyasallar	49
3.1.1. Deneysel Tedaviler	49
3.1.2. Davranış Testleri	49
3.1.3. İmmünohistokimyasal Analizler	50
3.1.4. Biyokimyasal Analizler	51
3.2. Kullanılan Cihazlar	52
3.3. Deney Hayvanları	53
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları	53
3.5. Davranış Deneyleri	55
3.5.1. Rotarod Testi	56
3.5.2. Katatoni Testi	56
3.5.3. Açık Alan (Open Field) Testi	57
3.5.4. Morris'in Su Tankı (Morris Water Maze) Testi	58
3.5.5. Yeni Obje Tanıma Testi	59
3.5.6. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	61
3.5.7. Sükroz Tercihi Testi	61
3.6. İmmünohistokimyasal Analizler	62
3.6.1. Dokuların Hazırlanması	62
3.6.2. Tirozin Hidroksilaz Ekspresyonunun Belirlenmesi	66

3.6.3. α -Sinüklein Ekspresyonunun Belirlenmesi	67
3.6.4. Serin-129 Bölgesinde Fosforile Olmuş α -Sinüklein Ekspresyonunun Belirlenmesi	67
3.6.5. <i>Cleaved</i> Kaspaz-3 Ekspresyonunun Belirlenmesi	67
3.6.6. Toll-Benzeri Reseptör-2 Ekspresyonunun Belirlenmesi	67
3.6.7. Image-J analizi	68
3.7. Biyokimyasal Analizler	68
3.7.1. Dokuların Homojenize Edilmesi	68
3.7.2. Dokularda Total Protein Tayini	69
3.7.2. Dopamin, Serotonin, Noradrenalin Glutamin ve L-Glutamik Asitin Kantitatif Kütle Spektrometrik Ölçümü	70
3.7.3. Proinflamatuvar Sitokinlerin Tayini	71
3.7.4. Nükleer Faktör Kappa-B-p65 Aktivitesinin Belirlenmesi	73
3.7.3. İstatiksel Analiz	75
4. BULGULAR	76
4.1. İlaç Uygulamalarının Sağkalım Üzerine Etkisi	76
4.2. İlaç Uygulamalarının Vücut Ağırlığı Üzerine Etkisi	76
4.3. Vortioksetin Uygulamasının Rotenon ile İndüklenen Motor Bozukluklar Üzerine Etkisi	78
4.3.1. Vortioksetin Uygulaması Rotarod Performansında İyileşme Sağladı	78
4.3.2. Vortioksetin Uygulaması Katatoni Skorlarında Düşüş Meydana Getirdi	79

4.3.3. Vortioksetin Uygulaması Lokomotor Aktivite Skorlarında İyileşme Sağladı	80
4.4. Vortioksetin Uygulamasının Rotenon ile İndüklenen Bilişsel Bozukluklar Üzerine Etkisi	82
4.4.1. Vortioksetin Uygulaması Yeni Obje Tanıma Testindeki Bilişsel Performans Skorlarında İyileşme Sağladı	82
4.4.2. Vortioksetin Uygulaması Morris'in Su Tankı Testindeki Bilişsel Performans Skorlarında İyileşme Sağladı	84
4.5. Vortioksetin Uygulamasının Emosyonel Parametreler Üzerine Etkisi	90
4.5.1. Vortioksetin Uygulaması Yükseltilmiş Artı Labirent Testi ile Değerlendirilen Anksiyete Parametreleri Üzerine Etki Göstermedi	90
4.5.2. Vortioksetin Uygulaması Sükroz Tercihi Testinde Anhedoni Davranışlarını Hafifletti	92
4.6. İmmünohistokimyasal Analizler	93
4.6.1. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında Tirozin Hidroksilaz Ekpresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	93
4.6.2. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında α -Sinüklein Ekpresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	95
4.6.3. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında Serin-129'da Fosforile Olmuş α -Sinüklein Ekpresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	98

4.6.4. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında <i>Cleaved</i> Kaspaz-3 Ekpresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	102
4.6.5. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında Toll-Benzeri Reseptör-2 Ekpresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	105
4.7. Vortioksetin Uygulamasının Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi	107
4.7.1. Vortioksetin Uygulamasının Hipokampus, Prefrontal Korteks ve Striatum Dokularında Nörotransmitter Seviyeleri Üzerine Etkisi	107
4.7.2. Vortioksetin Uygulamasının Hipokampus, Prefrontal Korteks ve Striatum Dokularında Proinflamatuvar Sitokinler ve NFκB-p65 Seviyeleri Üzerine Etkisi	111
5. TARTIŞMA	116
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	132
KAYNAKLAR	134
EKLER	163
EK-1 Etik Kurul Onay Belgeleri	
ÖZGEÇMİŞ	165

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Nörotoksin modellerin etki mekanizmaları, avantajları ve dezavantajları.	33
Tablo 2.2.	Parkinson Hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar.	37
Tablo 3.1.	<i>İn vivo</i> tedavilerde ve dokuların diseksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler.	49
Tablo 3.2.	Davranış deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler.	50
Tablo 3.3.	Dokuların immünohistokimyasal analizler için hazırlanması sırasında kullanılan kimyasal maddeler.	50
Tablo 3.4.	Boyamalar sırasında kullanılan antikorlar ve kimyasal reaktifler.	51
Tablo 3.5.	LC/MSMS reaktifleri.	51
Tablo 3.6	ELISA analizleri sırasında kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler.	52
Tablo 3.7.	Çalışmada kullanılan cihazlar.	52
Tablo 3.8.	<i>İn vivo</i> deneyler için belirlenen deney grupları ve uygulanan tedaviler.	54
Tablo 3.9.	Morris'in su tankı testinde deneme periyotlarında ve test periyodunda kullanılan başlangıç pozisyonları.	59
Tablo 3.10.	İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan antikorlar.	65

Tablo 3.11.	LC/MSMS Ölçüm Parametreleri.	71
Tablo 4.1.	Öğrenme periyotları boyunca platforma ulaşmak için harcanan sürelerin gruplar arası karşılaştırılması.	86
Tablo 4.2.	Öğrenme periyotları boyunca alınan toplam yol miktarının gruplar arası karşılaştırılması.	86
Tablo 4.3.	Vortiksetin uygulamasının hipokampus, prefrontal korteks ve striatumda nörotransmitter seviyeleri üzerine etkisi.	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Bazal gangliyonlar.	6
Şekil 2.2.	Bazal gangliyonların sağlıklı ve parkinsonlu bireylerdeki şematik diyagramı.	7
Şekil 2.3.	Parkinson hastalığında en sık görülen motor olmayan bulguların dağılımı.	8
Şekil 2.4.	Parkinson hastalığında Braak evrelemesi.	9
Şekil 2.5.	Bellek sınıflandırması ve Parkinson hastalığında ana olarak bozulan bellek türleri.	13
Şekil 2.6.	Hipokampal trisinaptik devre.	14
Şekil 2.7.	Prefrontal korteks ve hipokampus arasındaki direkt ve indirekt bağlantılar.	17
Şekil 2.8.	Beyindeki dopaminerjik yollar.	18
Şekil 2.9.	Beyindeki serotonerjik yollar.	20
Şekil 2.10.	Periferde ve santral sinir sisteminde doğal immünite.	24
Şekil 2.11.	Toll-benzeri reseptörün kısımları.	28
Şekil 2.12.	Toll-benzeri reseptör sinyalizasyon kaskadı.	29
Şekil 2.13.	Parkinson hastalığının tedavi algoritması.	38

Şekil 2.14.	Parkinson hastalığında nörodejenerasyon mekanizmalarını hedef alan hastalığı modifiye edici stratejilere yönelik ilaç hedefleri.	43
Şekil 2.15.	Vortioksetinin kimyasal yapısı ve etki mekanizmaları.	46
Şekil 3.1.	Deney protokolü.	55
Şekil 3.2.	Rotarod cihazı (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy).	56
Şekil 3.3.	Dikey tel testi.	57
Şekil 3.4.	Açık alan testi.	57
Şekil 3.5.	Morris'in su tankı testinin şematize hali.	58
Şekil 3.6.	Deneylerde kullanılan Morris'in su tankı.	59
Şekil 3.7.	Yeni obje tanıma testi.	60
Şekil 3.8.	Yükseltilmiş artı labirent testi.	61
Şekil 3.9.	Transkardiyak perfüzyonun basamakları.	63
Şekil 3.10.	Beyin dokusunun diseksiyonu.	63
Şekil 3.11.	Dopamin biyosentezi.	66
Şekil 3.12.	Protein standart eğrisi.	70
Şekil 4.1.	Kaplan-Meier sağkalım analizi.	76

Şekil 4.2.	4 haftalık deney süresince deney gruplarındaki vücut ağırlığı değişimi.	77
Şekil 4.3.	Vortioksetin uygulamasının rotenon uygulanan sıçanlarda meydana gelen motor bozukluklar üzerine etkisi.	78
Şekil 4.4.	Vortioksetin uygulamasının rotenon uygulanan sıçanlarda meydana gelen katatoni davranışı üzerine etkisi.	79
Şekil 4.5.	Vortioksetin uygulamasının lokomotor aktivite üzerine etkisi.	81
Şekil 4.6.	Vortioksetin uygulamasının yeni obje tanıma testi performansı üzerine etkisi.	83
Şekil 4.7.	Vortioksetin uygulamasının Morris'in su tankı testinde değerlendirilen bilişsel performanslar üzerine etkisi.	88
Şekil 4. 8.	Yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirilen anksiyete-benzeri davranış parametreleri.	91
Şekil 4.9.	Vortioksetin uygulamasının sükroz tercihi üzerine etkileri.	92
Şekil 4.10.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen tirozin hidroksilaz ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı.	94
Şekil 4.11.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında tirozin hidroksilaz immünoreaktivitesinin kantitatif analizi.	95

Şekil 4.12.	Substansiya nigra pars kompakta dokusunda gözlenen α -sinüklein ekspresyon şiddetinin gruplara göre dağılımı.	97
Şekil 4.13.	Substansiya nigra pars kompakta dokusunda α -sinüklein immünoreaktivitesinin kantitatif analizi.	98
Şekil 4.14.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen pS129- α -sinüklein ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı.	100
Şekil 4.15.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında pS129- α -sinüklein immünoreaktivitesinin kantitatif analizi	101
Şekil 4.16.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen <i>cleaved</i> kaspaz-3 ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı.	103
Şekil 4.17.	Substansiya nigra pars kompakta striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında <i>cleaved</i> kaspaz-3 immünoreaktivitesinin kantitatif analizi.	104
Şekil 4.18.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen Toll-benzeri reseptör-2 ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı.	106
Şekil 4.19.	Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokusunda Toll-benzeri reseptör-2 immünoreaktivitesinin kantitatif analizi.	107

Şekil 4.20. Vortioksetin uygulamasının hipokampus dokusunda 112
proinflamatuvar sitokinler ve NFκB-p65 seviyeleri üzerine
etkisi.

Şekil 4.21. Vortioksetin uygulamasının prefrontal korteks dokusunda 114
proinflamatuvar sitokinler ve NFκB-p65 seviyeleri üzerine
etkisi.

Şekil 4.22. Vortioksetin uygulamasının striatum dokusunda 115
proinflamatuvar sitokinler ve NFκB-p65 seviyeleri üzerine
etkisi

SİMGELER ve KISALTMALAR

5-HT	: Serotonin
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
AChR	: Asetilkolin reseptörü
ANOVA	: Varyans analizi
AP-1	: Aktivatör protein-1
BG	: Bazal gangliyonlar
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum
CA	: Cornu ammonis
COMT	: Katekol-O-metiltransferaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DAMP	: Hasarla ilişkili moleküler motif
DG	: Dentat girus
DJ-1	: Protein deglikaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent test
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
GP	: Globus pallidus
GPe	: Globus pallidus eksternal
Gpi	: Globus pallidus internal
HRP	: Avidin-yabanturpu peroksidaz
IFN	: İnterferon

IKK_ε	: Nükleer faktör kappa-B kinaz inhibitörü epsilon alt birimi
IL	: İnterlökin
IRAK	: İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz
LC	: Lokus seruleus
LC/MSMS	: Sıvı kromatografi/kütle spektrometresi
L-DOPA	: Levodopa
LEK	: Lateral entorinal korteks
LPS	: Lipopolisakkarit
LRRK2	: Lösün açısından zengin tekrarlı kinaz 2
MAO-B	: Monoamin oksidaz-B
MAPK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
MDB	: Majör depresif bozukluk
MEK	: Medial entorinal korteks
MHC II	: Major histo-uyumluluk kompleksi II
mPFK	: Medial prefrontal korteks
MPTP	: 1-metil-4-fenil1,2,3,6 tetrahidropiridin
MRM	: Çoklu reaksiyon izleme
MS/MS	: Kütle spektrometrisi
MyD88	: Miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini 88
Na⁺	: Sodyum
NAC	: Amiloid olmayan-β merkez
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
NMDA	: N-metil D-aspartat
NRI	: Noradrenalin geri alım inhibitörü

NSAİİ	: Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler motif
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PFK	: Prefrontal korteks
PH	: Parkinson hastalığı
PINK1	: Putatif kinaz 1
PRR	: Patern tanıma reseptörü
RIP-1	: Reseptörle etkileşen protein-1
RNA	: Ribonükleik asit
SERT	: Serotonin taşıyıcısı
SN	: Substansiya nigra
SNpc	: Substansiya nigra pars kompakta
SNpr	: Substansiya nigra pars reticulata
SNRI	: Serotonin noradrenalin geri alım inhibitörü
SSRI	: Selektif serotonin geri alım inhibitörü
SSS	: Santal sinir sistemi
TAK	: TGF- β ile aktive olan kinaz
TBK 1	: TRAF aile üyesi-ilişkili NF κ B aktivatörü bağlayan kinaz 1
TCA	: Trikarboksilik asit
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
TH	: Tirozin hidroksilaz
TIR	: Toll-benzeri/interlökin 1
TIRAP	: Toll/interlökin-1 reseptör bölgesi içeren adaptör protein
TLR	: Toll-benzeri reseptör

TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TRAM	: TRIF ilişkili adaptör molekül
TRIF	: TIR bölgesi içeren interferon- β salıverilimini indükleyen adaptör
UCH-L1	: Ubikitin karboksi terminal hidrolaz L1
UFLC	: Ultra hızlı sıvı kromatografisi
VTA	: Ventral tegmental alan



1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH); istirahat tremoru, rijidite ve bradikinezi gibi dopamin eksikliğinin klinik etkilerini yansıtan klasik üçlü motor belirti ile karakterize nörodejeneratif bir hareket hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Schapira ve ark., 2017). Ancak, motor olmayan belirtilerin prevalansındaki artışın fark edilmesi ile PH'deki nörodejeneratif ilerleyişten serotonerjik, kolinerjik ve noradrenerjik sistemler gibi diğer nörotransmitter sistemlerin de etkilendiği görüşü gündeme gelmiştir (Poewe ve ark., 2017). En sık görülen motor olmayan belirtiler arasında yer alan bilişsel disfonksiyon, demans riskini ve mortaliteyi artırması nedeniyle PH'deki tedavisi, artan bir ilgi alanı haline gelmiştir (Biundo ve ark., 2016).

Son yıllarda yapılan araştırmalar α -sinüklein patolojisinin, nöroinflamasyon ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir (Gustot ve ark., 2015). Çalışmalar, α -sinükleine maruz kalan mikrogial hücrelerin aktif hale geldiğini ve proinflamatuvar sitokinler salgılayarak nöroinflamasyonu tetiklediğini göstermektedir (La Vitola ve ark., 2018). Mikrogial aktivasyona aracılık eden Toll-benzeri reseptör (TLR)'ler α -sinüklein tarafından aktive edilerek inflamatuvar cevapları tetikleyebilir (Kim ve ark., 2018). PH hastalarının substansiya nigra (SN) ve hipokampus dokularında α -sinüklein patolojisi ile ilişkili reaktif mikroglianin varlığının yanı sıra TLR-2 ekspresyonunda da kontrol gruplarına kıyasla artış olması TLR-2'nin hastalığın progresyonunda önemli bir role sahip olduğu düşündürmektedir (Doorn ve ark., 2014). Dolayısıyla, TLR-2-spesifik yollara etki eden ilaçların bulunması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması, bu yolağı bloke edebilecek terapötik yaklaşımları gündeme getirebilir.

PH'deki bilişsel bozukluğun tedavisini spesifik olarak hedefleyen farmakolojik tedavi seçeneğinin bulunmaması, PH'deki bilişsel disfonksiyonu aktif bir araştırma alanı haline getirmiştir (Weil ve ark., 2018). Bu konuda yapılan çalışmaların çoğu, farklı nörotransmitter sistemlerini etkileyen farmakolojik ilaçlara odaklanmış durumdadır (Sauerbier ve ark., 2017). İlginç bir şekilde, Deneysel PH modellerinde antidepresanların nörodejenerasyonu azalttığı, motor fonksiyonlarda iyileşme sağladığı, striatal dopamin seviyelerini artırdığının gösterilmesi, PH tedavisinde kullanılan antidepresanların yararlı

etkileri olabileceğini göstermektedir (Kandil ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2016; Shadfar ve ark., 2018).

Vortioksetin, serotonin (5-HT) 5-HT₃, 5-HT₇ ve 5-HT_{1D} reseptörü antagonisti, 5-HT_{1B} reseptörü parsiyel agonisti, 5-HT_{1A} reseptörü agonisti, aynı zamanda serotonin taşıyıcısı (SERT) inhibitörü multimodal bir antidepresandır (Sanchez ve ark., 2015). Vortioksetinin bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkisinin altında yatan kesin mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olsa da nörotransmitter sistemleri üzerindeki etkilerinin yanı sıra olası antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin bu etkilerine aracılık ettiğini ileri süren hipotezler bulunmaktadır (Mork ve ark., 2013; Pehrson ve ark., 2013; Talmon ve ark., 2018). Ancak, literatürde vortioksetinin PH'deki depresyonda kullanımı sırasında hem motor belirtiler hem de depresyon ve bilişsel disfonksiyon gibi motor olmayan belirtiler üzerindeki etkinliği ve etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu tez projesinde, rotenon (2 mg/kg/gün, s.c., 28 gün) ile Sprague Dawley sıçanlarda indüklenen PH modelinde vortioksetin tedavisinin (10 mg/kg, s.c., 28 gün) nörodejenerasyon, motor fonksiyonlar, bilişsel fonksiyonlar ve depresyon-benzeri davranışlar üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda (1) davranış testleriyle motor fonksiyonlar (rotarod, katalepsi ve açık alan testi), bilişsel fonksiyonlar (yeni obje tanıma testi ve Morris'in su tankı), antidepresan-benzeri etki (sükroz tercihi testi) ve anksiyete (yükseltilmiş artı labirent testi) davranışları, (2) SN, striatum, prefrontal korteks (PFK) ve hipokampus dokularında patolojiyi değerlendirebilmek için immünohistokimyasal analizlerle tirozin hidroksilaz (TH), α -sinüklein, serin 129 bölgesinde fosforile olmuş α -sinüklein (pS129- α -sinüklein), *cleaved* kaspaz-3 ve TLR-2 ekspresyonları, (3) biyokimyasal analizlerle striatum, PFK ve hipokampus dokularında nörotransmitter seviyeleri (dopamin, serotonin, noradrenalin, glutamin ve L-glutamik asit) ve inflamasyon belirteçleri (TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF κ B-p65) analiz edilmiştir. Bu çalışma ile deneysel bir PH modelinde vortioksetinin nörodejenerasyon, motor fonksiyonlar, bilişsel fonksiyonlar ve depresyon üzerindeki etkileri ilk kez *in vivo* olarak araştırılmış ve vortioksetinin, PH'de görülen en önemli non-motor bulgulardan olan bilişsel disfonksiyon ve depresyonun tedavisindeki terapötik potansiyeli ile ilgili önemli prelinik veriler literatüre kazandırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi

PH, batı tıp literatürüne MS 175 yılında Galen'in "titremeli felç" tanımlaması ile girmiştir (Kalita ve Misra, 2018). 17. ve 18. yy'larda, Sylvius de la Boe, Boissier de Sauvages ve Juncker gibi bilim adamlarının tremor ile ilgili tanımlamaları James Parkinson'a ışık tutmuş ve PH, 1817 yılında, İngiliz Doktor James William Keys Parkinson tarafından yazılan "*An Essay on the Shaking Palsy* (Titremeli Felç Üzerine Bir Deneme)" adlı eserle birlikte modern halini alıp klinik olarak farklı bir hareket hastalığı olarak tanımlanmıştır (Raudino, 2012).

James Parkinson'un modern tanımlamasından yaklaşık altmış yıl sonra, Fransız nörolog Jean Martin Charcot, PH'deki titremeyi, multipl skleroz hastalarında yalnızca aktivite esnasında görülen kinetik titremeden ayırıp bu hastalığı "Parkinson" hastalığı olarak isimlendirmiştir (Lewis, 2012). 1899 yılında Eduoard Brissaud, substantia nigra pars kompakta (SNpc)'nin PH'den etkilenen bölge olabileceğini ileri sürmüş, bundan 20 yıl sonra, Trétiakof, SNpc'de nöromelanin pigmenti içeren nöronlarda büyük bir kayıp olduğunu ve sitoplazmada ileride Friedrich Lewy tarafından "Lewy cisimcikleri" olarak adlandırılacak inklüzyon cisimlerinin varlığını gözlemlemiştir (Del Rey ve ark., 2018). 1957 yılında Arvid Carlsson, kendisine fizyoloji ve tıp alanında nobel ödülü kazandıran keşfiyle, dopaminin yalnızca noradrenalinin prekürsörü değil, bir nörotransmitter olduğunu ve rezerpin kullanılarak dopamin depoları boşaltılmış hayvanlarda levodopa (L-DOPA) tedavisinin PH belirtilerini hafiflettiğini göstermiştir (Yeragani ve ark., 2010). 1959 yılında Oleh Hornykiewicz ve Herbert Ehringer, yaptıkları çalışmalarla PH'nin patofizyolojisinde striatum ve SNpc'de dopamin eksikliğinin yer aldığını ortaya çıkarmıştır (Hornykiewicz, 2006). Bu sonuçlar 1960 yılında yayımlandıktan sonra PH'nin mekanizmaları, nedenleri ve tedavilerine yönelik daha ileri araştırmaların önü açılmış ve o zamandan beri 'altın standart' olan L-DOPA, 1967 yılında semptomların tedavisi için ilk etkin ilaç tedavisi olarak yerini almıştır (Hornykiewicz, 2017).

1983 yılında Langston ark., 1-metil-4-fenil1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) maruziyetinden sonra akut parkinsonizm geliştiğini bildirmesiyle *in vitro* ve *in vivo* PH modellerinin önü açılmıştır (Langston, 2017). 1998 yılında genetik analiz tekniklerindeki ilerlemelerle birlikte PH'nin genetik bileşenleri saptanmış ve α -sinüklein proteininin Lewy cisimciklerinin ana bileşeni olduğu ortaya çıkmıştır (Baba ve ark., 1998). 2003 yılında Heiko Braak, hastalığın beyin sapından başlayıp kortekse yayıldığına dair altı basamaklı patolojik bir evreleme teorisi geliştirmiştir (Braak ve ark., 2003). Günümüzde, genetik temelli hayvan modelleri ve hücrel modeller, hastalığı modüle edebilecek terapötik stratejilerin geliştirilmesi için benzersiz fırsatlar sunmaktadır (Del Rey ve ark., 2018). Ayrıca bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerle hastalığın patofizyolojisi arasında kurulan yeni bağlantılar, PH etiyolojisini aydınlatabilmek için yeni araştırma alanları açmaktadır (Scheperjans ve ark., 2018).

2.1.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi ve Klinik Özellikleri

PH'nin prevalansının genellikle 100.000 kişide 100 ile 200 arasında değiştiği kabul edilmektedir ve yıllık insidansın 15/100.000 olduğu düşünülmektedir (Tysnes ve Storstein, 2017). PH'nin sıklığı ileri yaşlarda, erkeklerde, düşük sosyoekonomik duruma sahip popülasyonlarda ve Avrupa popülasyonlarında daha fazladır (Van Den Eeden ve ark., 2003; Lix ve ark., 2010). Türkiye'de yapılan küçük ölçekli çalışmalar, PH prevalansını 111-149/100.000 arasında tahmin ederken (Torun ve ark., 1995; Bolayır ve ark., 2002; Özbek ve ark., 2009), Durmuş ve ark.'ları tarafından yapılan Türkiye'de PH prevalansını belirlemeye yönelik ilk büyük popülasyon tabanlı çalışmada, PH prevalansı Avrupa ülkelerinden biraz daha düşük, 202/100.000, bulunmuştur (Durmuş ve ark., 2015).

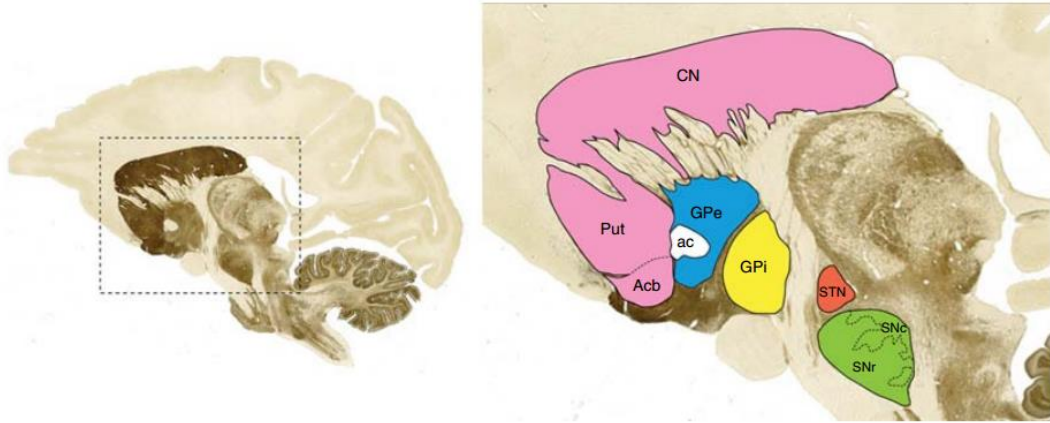
PH; istirahat tremoru, rijidite (kaslarda sertlik), bradikinezi (hareketlerde yavaşlama) ve postural instabilite (vücudun duruş şeklinde bozukluk) gibi dopamin eksikliğinin klinik etkilerini yansıtan dört ana motor belirti ile karakterize nörodejeneratif bir hareket hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Jankovic, 2008). Bununla birlikte, hastalığın erken evrelerinde ortaya çıkan ve hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde bozan motor olmayan semptomlar da hastalığa eşlik etmekte ve spesifik tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Massano ve Bhatia, 2012). Hastalığın teşhisi dopamin eksikliğinin klinik etkilerine dayanmasına rağmen, PH günümüzde artık yalnızca motor sistem ile ilişkili bir

hastalıktan ziyade serotonerjik, noradrenerjik ve kolinergik devreler gibi diğer nörotransmitter sistemlerini içeren heterojen bir multisistem bozukluğu olarak kabul edilmektedir (Aarsland ve ark., 2017). Ayrıca Lewy cisimciklerinin de SNpc'nin yanı sıra lokus seruleus (LC), beyin sapının retiküler çekirdekleri ve vagusun dorsal motor çekirdeği ve ayrıca Meynert'in bazal çekirdeği, amigdala ve hipokampusun *cornu ammonis* (CA) 2 alanı gibi diğer çekirdeklerde bulunduğu da gösterilmiştir (Ferrer, 2011).

2.1.3. Parkinson Hastalığının Nörobiyolojisi

PH'nin karakteristik özellikleri, SNpc'de nöromelanin pigmenti içeren nöronlarda meydana gelen nöron kaybı ve yaygın hücre içi protein (α -sinüklein) birikimi ile meydana gelen yuvarlak, hyalin nöronal sitoplazmik inklüzyonların (Lewy cisimcikleri) varlığıdır (Ferrer, 2011; Poewe ve ark., 2017). Her ne kadar SNpc'deki dopaminerjik nöron kaybı veya nöronlarda α -sinüklein birikimi sadece PH'ye özgü olmasa da, bu iki ana nöropatolojinin birlikte görülmesi idiyopatik PH'nin kesin teşhisinin konulmasını sağlar (Poewe ve ark., 2017).

PH'nin motor semptomları bazal gangliyonlar (BG) olarak adlandırılan beyin bölgesindeki nöronların dejenerasyonu ile ilişkilidir (Cha ve ark., 2015). Buradaki nöronlar yürüme gibi istemli motor hareketlerden ve çeşitli emosyonel ve bilişsel fonksiyonlardan sorumludur (Cha ve ark., 2015). BG, bazal telensefalonda bulunur ve birbirine bağlı beş çekirdekten oluşur (Şekil 2.1): Kaudat çekirdek, putamen, globus pallidus (GP), SN ve subtalamik çekirdek (Blandini ve ark., 2000). Kaudat çekirdek ve putamen internal kapsülle kısmen ayrılmış olsa da anatomik ve fonksiyonel özellikler açısından benzer hücre köprüleri bu iki çekirdeği birbirine bağlar ve bu iki yapı birlikte genel olarak striatum olarak adlandırılır (Blandini ve ark., 2000). Striatum, kortikal ve talamik inputlar için BG'nin ana girişidir ve ana olarak kortikal, talamik ve nigral kaynaklardan gelen bilgiler bu input çekirdekten output çekirdeklere (Gpi ve SNpr) taşınır. Output çekirdekler de bu bilgileri talamusa iletir (Galvan ve Wichmann, 2008).

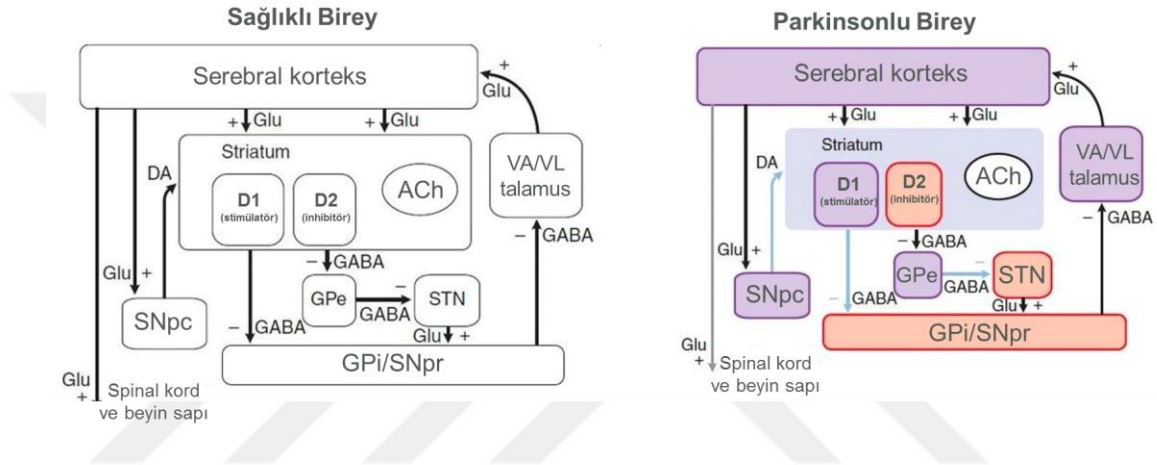


Şekil 2.1. Bazal gangliyonlar.

Maymun beyninin parasagittal kesiti. Ac: Anterior komissür, Acb: Akumbens nükleus, CN: Kaudat nükleus, GPe: Globus pallidus eksternal, GPi: Globus pallidus internal, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, SNpr: Substansiya nigra pars retikülata, STN: Subtalamik çekirdek, Put: Putamen. (Lanciego ve ark., 2012).

Motor korteks ve BG arasında direkt ve indirekt olmak üzere iki ana yolak vardır (Bartels ve Leenders, 2009) (Şekil 2.2). Direkt yolak, hareketin oluşmasında önemli bir rol üstlenirken, indirekt yolak ise istenmeyen hareketin engellenmesinde görevlidir (Bartels ve Leenders, 2009). Striatumdan kalkan direkt yolaktaki Gama aminobütirik asit (GABA)-erjik nöronlar, Globus pallidus internal (GPi) ile inhibitör projeksiyonlar yapar ve GPi aktivitesini inhibe ederek GPi'nin talamus üzerindeki inhibitör etkisinin ortadan kalkmasına yol açarak talamusu daha aktif hale getirir (Blandini ve ark., 2000; Bartels ve Leenders, 2009). Aktifleşmiş talamus ise motor kortekse sürekli olarak gönderdiği eksitatör sinyaller aracılığıyla kaslara 'harekete geç' mesajını göndermiş olur (Bartels ve Leenders, 2009). Striatumdan kalkan indirekt yolak ise subtalamik çekirdeğe GABAerjik projeksiyonlar gönderen globus pallidus eksternal (GPe) ile inhibitör projeksiyonlar yapar ve onun aktivitesini inhibe eder; böylece GPe, subtalamik çekirdek ile iletişim kuramaz ve subtalamik çekirdek daha aktif hale gelir (Blandini ve ark., 2000; Bartels ve Leenders, 2009). Aktif hale gelmiş subtalamik çekirdek, GPi'ye eksitatör sinyaller gönderir ve bunun neticesinde GPi'nin talamus üzerindeki inhibitör etkisi daha da artarak hareketi baskılar (Bartels ve Leenders, 2009). PH'de SNpc kısmında striatuma projeksiyon yapan (nigrostriatal) ve istemli motor hareketleri düzenleyen dopaminerjik nöronlarda ilerleyici bir dejenerasyon meydana gelir (Andersen ve ark., 2017). PH belirtilerinin en hafif olduğu hastalarda bile SNpc'deki dopaminerjik nöronların kaybı %60 civarındadır, bu nedenle

nörodejenarasyonun erken döneminde PH tanısı koymak mümkün olmamaktadır (Andersen ve ark., 2017). Dopamin, direkt yolaktaki striatal nöronlar üzerinde D₁ reseptörleri aracılı eksitator etkiler gösterirken indirekt yolaktaki striatal hücreler üzerinde D₂ reseptörleri aracılı inhibitör etkiye sahiptir. Başka bir deyişle, motor aktiviteyi artıran direkt yolak dopamin tarafından ateşlenirken, motor aktiviteyi azaltan indirekt yolak ise yine dopamin tarafından inhibe edilir (Obeso ve ark., 2002).



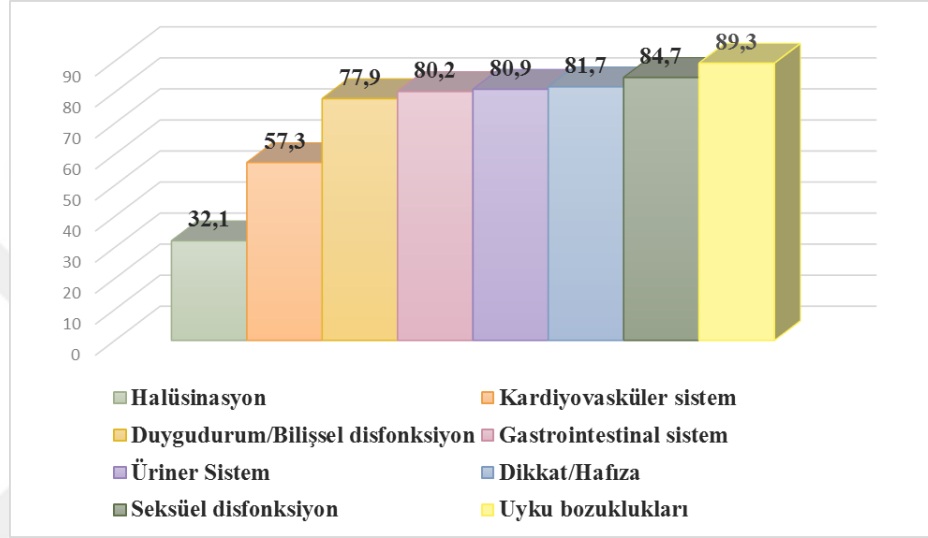
Şekil 2.2. Bazal gangliyonların sağlıklı ve Parkinsonlu bireylerdeki şematik diyagramı.

Striatum ve GPi arasındaki direkt yolak inhibitör GABA nörotransmitterini kullanırken GPe ve subtalamik çekirdek aracılı inhibitör yolakta iki tane GABAerjik ve bir tane glutamaterjik projeksiyon bulunmaktadır. Parkinson hastalığında direkt ve indirekt yollar arasındaki denge indirekt yolak lehine kaymakta ve kırmızı ile gösterilen indirekt yolağa ait yapılar aktif hale geçmektedir. ACh: Asetilkolin, Glu: Glutamat, GPe: Globus pallidus eksternal, GPi: Globus pallidus internal, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, SNpr: Substansiya nigra pars retikülata, STN: Subtalamik çekirdek, VA: Ventral anterior, VL: Ventral lateral. (Standaert ve Roberson, 2018)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.2. Parkinson Hastalığında Motor Olmayan Semptomlar

PH'de klasik olarak dopaminerjik nöronların %60-70'i apoptozise uğradıktan sonra ortaya çıkan motor belirtiler ile teşhis konulmasına rağmen, "premotor dönem" kavramı giderek daha fazla kullanılmaktadır. Koku alma bozukluğu, uyku anormallikleri, kardiyak sempatik denervasyon, kabızlık, depresyon, ağrı ve bilişsel bozuklukların PH'nin motor belirtilerinin başlangıcından önce gelebileceğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır (Poewe, 2008; Obeso ve ark., 2010). Bu motor olmayan bulgular, hastalık ilerledikçe baskın hale gelebilir ve hastalık yükünü motor bulgulardan daha fazla artırabilir (Marinus ve ark., 2018). Her ne kadar, PH'nin bir parçası olarak motor olmayan bulguların son birkaç on yılda keşfedildiği düşünülüyorsa da bundan 200 yıl önce James Parkinson'un klasik tezi '*An Essay on Shaking Palsy*'de uyku bozuklukları, otonomik disfonksiyon,

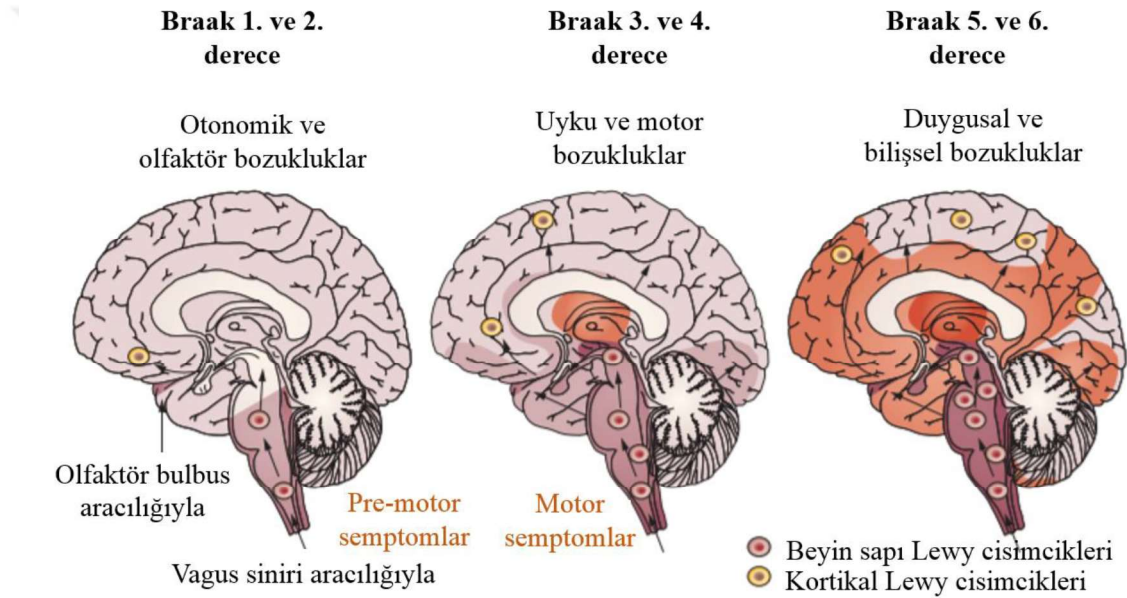
bilişsel ve nöropsikiyatrik sorunlar gibi temel motor olmayan semptomların zaten tanımlanmış olduğu görülmektedir (Todorova ve ark., 2014; Pfeiffer, 2016). Motor olmayan bulgular, PH hastalarında oldukça yaygındır. PH tanısı alan hastaların hemen hepsinde en az bir motor olmayan semptom bildirildiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2013b). PH’de en sık görülen motor olmayan bulgular Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Parkinson hastalığında en sık görülen motor olmayan bulguların dağılımı. Veriler (Kim ve ark., 2013)’ten uyarlanarak % olarak gösterilmiştir.

PH'nin altında yatan nöropatolojinin, LC, dorsal vagal çekirdek, rafe çekirdeği, hipotalamus, olfaktör tüberkül ve limbik korteks ile neokorteks gibi motor kontrolde doğrudan yer almayan alanlar dahil olmak üzere dopaminerjik nigrostriatal sistemin dışındaki birçok beyin alanına yayıldığı bilinmektedir (Poewe, 2008). Dejeneratif süreçlerin nigrostriatal sisteme ve diğer beyin bölgelerine nasıl zarar verdiği tam olarak bilinmemekle birlikte Braak ve ark.’ları, yapmış oldukları kategorilendirme ile dejeneratif sürecin beyin sapından başladığını varsaymıştır (Şekil 2.4) (Braak ve ark., 2003). Bu kategorilendirmeye göre ilk etkilenen yapı olfaktör bulbustur. Ardından otonom fonksiyonları ve uykuyu etkileyen alt beyin sapı etkilenir. Daha sonra, orta beyindeki SN ve diğer çekirdekler etkilenir, böylece PH'nin tipik motor semptomları ortaya çıkar. En sonunda, limbik sistem ve frontal neokorteks dejenerasyonu, ileri PH aşamalarında görülen bilişsel ve psikiyatrik semptomlarla sonuçlanır (Hou ve Lai, 2007).

Günümüzde PH'nin artık yalnızca dopaminerjik bir hastalık olmadığı, özellikle serotonerjik sistem gibi diğer nörotransmitter sistemlerindeki dejenerasyonu da kapsayan daha yaygın bir patoloji olduğu bilinmektedir (Politis ve Loane, 2011). Dorsal rafe çekirdeklerinde yer alan ve psiko-duygusal ve bilişsel işlevlerin kontrolünde yer aldığı bilinen serotonerjik nöronlardan esas olarak striatuma, aynı zamanda frontal kortekse ve limbik sisteme giden projeksiyonlarda meydana gelen dejenerasyonun, PH'li hastalarda duygudurum bozuklukları (depresyon ve anksiyete) ve bilişsel bozukluklar gibi motor olmayan semptomlarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Politis ve Loane, 2011; Ohno ve ark., 2015).



Şekil 2.4. Parkinson hastalığında Braak evrelemesi
Şekil, (Halliday ve ark.2011)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.2.1. Depresyon

PH hastalarının depresyon geliştirme olasılığı, sağlıklı kontrollere kıyasla iki kat daha fazladır ve depresyon semptomlarının PH teşhisi konmadan yıllar önce ortaya çıkabildiği bilinmektedir (Marinus ve ark., 2018). 2016 yılında yapılan bir meta-analizde, PH hastalarında majör depresyon prevalansının ortalama %23 olduğu bildirilmiştir (Goodarzi ve ark., 2016). PH hastalarında depresyon tanısı koymak özellikle zordur, çünkü kilo kaybı, uykusuzluk, psikomotor gerileme ve yorgunluk gibi depresyonun bazı belirtileri, PH'nin birincil semptomlarıyla veya PH tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkileriyle

karışabilmektedir (Marinus ve ark., 2018). Premotor dönemde oluşan depresyona ek olarak, motor semptomların yaşam kalitesini azaltması, hastalarda depresif duygudurumun daha da artmasına neden olmaktadır (Muller, 2012). Depresyonun apati, anksiyete ve panik atak gibi semptomları PH'nin sadece erken evrelerinde değil, aynı zamanda ilerleyen dönemlerinde de sıklıkla görülmektedir (Muller, 2012).

PH'de lezyonların SNpc'deki dopaminerjik sistemin yanı sıra duygudurum ve ödül sistemlerinin düzenlenmesinden sorumlu olan noradrenerjik ve serotonerjik sistemlere kadar ulaştığı bilinmektedir (Marsh, 2013). Braak'ın evrelemesine göre PH'de bazal orta beyindeki dopaminerjik nöronların tutulumundan önce serotonerjik rafe çekirdeği ve noradrenerjik LC gibi depresyonda rol oynayan beyin sapı bölgelerinde Lewy cisimciklerinin birikmesi, PH'de presemptomatik evrelerde meydana gelen depresyon ve anksiyete oluşumunu açıklayabilir (Gallagher ve Schrag, 2012; Politis ve Niccolini, 2015). PH'de motor semptomların başlangıcından önce dopaminerjik nöronların %50-80'inin kaybolduğu iyi bilinmektedir. Hakim olan görüşe göre, motor sistemde semptomların ortaya çıkış süresini geciktiren kompensatuvar mekanizmalar afektif sistemlerde olmadığı için, depresyon ve anksiyete gibi semptomlar motor semptomlardan önce ortaya çıkmaktadır (Ryan ve ark., 2019).

Yüksek proinflatuvar sitokin düzeylerinin daha ciddi depresyon belirtileri ile ilişkili bulunması (Lindqvist ve ark., 2012), depresif bozuklukların PH hastalarında yüksek prevalansa sahip olması (Reijnders ve ark., 2008) ve aşırı α -sinüklein ekspresyonu ile indüklenen PH hayvan modellerinde depresyon belirtilerinin de hastalığa eşlik etmesi (Caudal ve ark., 2015), PH'deki depresyonun, motor ve bilişsel bozukluklar ile ortak bir immün-aracılı nörodejeneratif süreçten kaynaklanabileceği hipotezini ortaya koymaktadır (Rocha ve ark., 2015).

2.2.2. Bilişsel Disfonksiyon

PH hastalarında, hastalığın erken aşamalarından itibaren görülen hafif düzeydeki bilişsel bozuklukların %36'lara ulaşabildiği, PH tanısından 20 yıl sonra ise hastaların %80'inden fazlasında demans geliştiği gösterilmiştir (Hely ve ark., 2008). Hastalığın tipik seyri, hafif bilişsel bozukluk evresi boyunca bilişsel becerilerin kademeli olarak bozulması ve

sonunda PH demansına ilerlemesidir (Marinus ve ark., 2018). PH hastalarının demans geliştirme olasılığının, sağlıklı kontrollere göre 2-6 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Aarsland ve Kurz, 2010).

PH hastalarında bilişsel bozukluklar sıklıkla depresyon gibi diğer motor olmayan semptomlarla birlikte görülmekte, depresyon bilişsel bozukluğu artırırken aynı zamanda bilişsel bozukluk da depresyon bulgularını artırmaktadır (Ohno ve ark., 2015). Hafif, genellikle de klinik olarak asemptomatik olan bilişsel bozukluk, erken PH'nin yaygın, ancak yeterince tanınmayan bir bileşenidir ve dopamin bağımlı frontostriatal bir bozukluk olarak kabul edilir (Schapira ve ark., 2017). Ancak, PH'de ortak bir nöropatogenezi paylaştığı düşünülen depresyon ve bilişsel disfonksiyonda, klasik nigrostriatal α -sinüklein patolojisine ve dopaminerjik nöron kaybına ek olarak, farklı nörotransmitter sistemlerinde değişiklikler meydana geldiği bilinmektedir (Simuni ve Sethi, 2008; Aarsland ve ark., 2017). Braak'ın evrelendirmesinde yer alan entorinal korteks ve hipokampusta meydana gelen nörodejenerasyonun, prefrontal korteks (PFK)'e gelen veri akışının bozulmasına neden olarak bellek performansında azalmaya ve bilişsel disfonksiyona yol açtığı da bilinmektedir (Braak ve ark., 2004). Öğrenme ve bellek ile ilişkili fonksiyonların ana olarak kolinerjik veya glutamaterjik sistemler tarafından kontrol edildiği kabul görse de 5-HT'nin ve 5-HT reseptörlerinin de dopamin ve glutamat gibi farklı nörotransmitter sistemleriyle etkileşerek öğrenme ve bellekte önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Meneses, 2015).

PH'de yapılan postmortem çalışmalarda serotonerjik nöronların dejenere olduğu, hipotalamus, korteks ve kaudat çekirdekte dopamin kadar olmasa da 5-HT içeriğinin de azaldığı, 5-HT taşıyıcıları ve çeşitli 5-HT reseptör alt tiplerinin aktivitelerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Kerenyi ve ark., 2003; Fox ve ark., 2009; Schapira ve ark., 2017). Her ne kadar serotonerjik disfonksiyonun genel popülasyonda depresyon ile ilişkili olduğu biliniyor olsa da 5-HT nörotransmitter sisteminde meydana gelen değişikliklerin PH'deki rolüne ilişkin bulgular henüz net değildir (Schapira ve ark., 2017).

PH'deki bilişsel bozukluklar ana olarak frontal lob hastalarınıninkine benzeyen bir fenotiple sonuçlanan, ana olarak yürütücü işlev bozuklukları, görsel uzamsal yetilerin bozulması ve

bellekte meydana gelen bozulmalarla karakterizedir (Solari ve ark., 2013). Fonksiyonel görüntüleme teknikleri baz alınarak yapılan klinik çalışmalar, bilişsel semptomların yalnızca SNpc'deki dopaminerjik nöronların ölümü ile değil, aynı zamanda PFK, hipokampus ve amigdala gibi diğer beyin bölgeleriyle de ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Solari ve ark., 2013). Ayrıca, PH'de bu beyin bölgelerinde proinflatuvar tipte aktif olan mikroglianin artış gösterdiğinin kanıtlanması, tıpkı depresyonda olduğu gibi, nöroinflatuvar sürecin PH'deki bilişsel disfonksiyon için de önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Imamura ve ark., 2003).

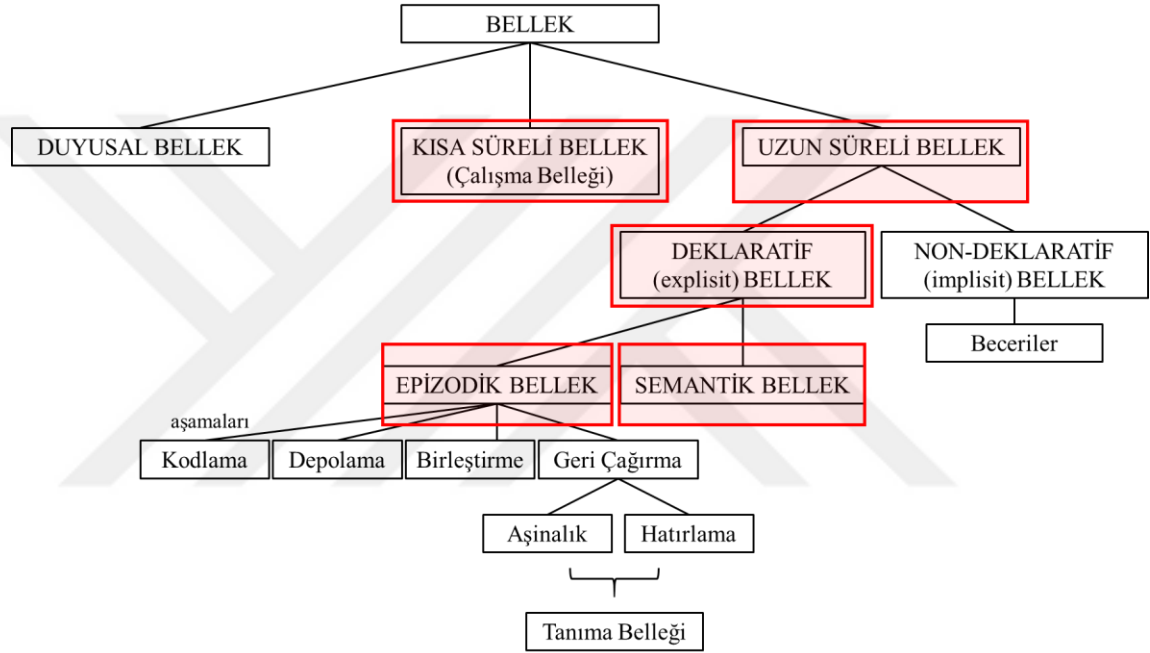
2.3. Öğrenme ve Bellek

Geçmiş deneyimi bilinçli ve kasıtlı olarak hatırlama yeteneğimiz olarak tanımlanabilen ‘‘bellek’’ (Mulligan, 2003), üç ana başlık altında ele alınabilir (Şekil 2.5) (Camina ve Güell, 2017):

1. Duyusal bellek: Çevremizdeki dünyadan gelen bilgiler duyusal bellek tarafından depolanmaya başlar ve bu bilginin gelecekte erişilebilir olmasını mümkün kılar.
2. Kısa süreli bellek: Bireyin kısa sürede işlediği bilgileri ifade eder. Çalışma belleği bu işlemi gerçekleştirir.
3. Uzun süreli bellek: Bilgileri uzun süre saklamamıza izin verir. Bu bilgiler bilinçli olarak (eksplisit) veya bilinçsiz olarak (implisit) alınabilir.

Önceki deneyimlerin bilinçli olarak hatırlanması deklaratif (eksplisit) bellek olarak, bilinçsiz olarak hatırlanması refleksif veya non-deklaratif (implisit) bellek olarak ifade edilir (Spataro ve ark., 2017). Eksplisit bellek, canlı, kolay erişilebilir, duygusal olarak etiketlenmiş bilgileri kodlamak için amigdala, hipokampus ve diğer beyin yapıları ile; implisit bellek, BG, motor korteks ve serebellum ile ilişkilidir (Watson ve Leverenz, 2010). Semantik (anlamsal) bellek, kişinin öğrendiği genel bilgileri ifade ederken deklaratif belleğin alt bileşenlerinden epizodik bellek, bilgi ve gerçeklerin hatırlanması ile ilgilenir (Das ve ark., 2019). Epizodik bellek, bir olayın mekansal ve zamansal yönlerinin ayrıntılarını içerir, yani bir olayın ‘‘nerede’’ olduğu ve olayın ‘‘ne’’ olduğu hatırlamamızı sağlar (Das ve ark., 2019).

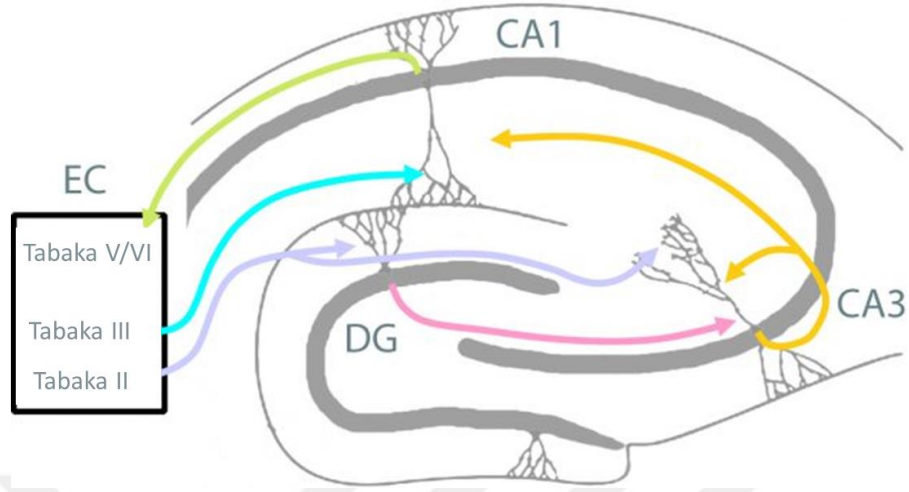
Öğrenme ve bellek sürecinde gerekli dört aşama vardır: kodlama (bilginin ilk defa öğrenilmesi), depolama (bilgilerin zaman içinde korunması), birleştirme (oluşturulduktan sonra belleğin korunması) ve bilginin geri çağırılması (gerektiğinde bilgiye erişme yeteneği, hatırlama) (Markowitsch, 2013). PH'li kişilerin bu epizodik bellek aşamalarının her birinin (kodlama, konsolidasyon, depolama ve geri alma) yanı sıra çalışma belleği gibi diğer bellek biçimlerinde de eksiklikler yaşayabileceği gösterilmiştir (Das ve ark., 2019).



Şekil 2.5. Bellek sınıflandırması ve Parkinson hastalığında ana olarak bozulan bellek türleri (kırmızı). (Das ve ark., 2019) kaynak alınarak uyarlanmıştır.

2.3.1. Hipokampus

Karmaşık epizodik bellek süreçleri, medial temporal lobda yer alan hipokampus adı verilen küçük bir denizati şeklindeki beyin yapısında gerçekleşir (Das ve ark., 2019). Hipokampus, CA1, CA2, CA3 ve CA4, dentat girus (DG) ve subikulum adı verilen alt alanlardan oluşur (Das ve ark., 2019). Entorinal korteksten veya CA3 bölgesinden bilgileri alan ve işleyen CA1 bölgesi nöronları, uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarında rol alır. CA3 bölgesi, Schaffer kollateral lifleri aracılığı ile CA1 bölgesiyle bağlantılıdır. CA1 bölgesi ise subikulum, entorinal korteks ve PFK'ye projeksiyonlar yapar (İzci ve Erbaş, 2015) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hipokampal trisinaptik devre. Entorinal korteks (EK)’ten gelen uyarılar glutamaterjik eksitator sinaptik bağlantılarla Dentat girus (DG) granüler hücreleri dendritlerine yayılır (perforan yol). Trisinaptik halkanın ikinci yolu DG’nin CA3 ile yaptığı sinaptik bağlantıdır. DG granüler hücrelerinin aksonları, CA3’teki piramidal hücrelerle yosunsu lifler aracılığıyla seyrek fakat güçlü bağlantılar yapar. CA3 piramidal nöronlarından Schaffer kollateralleri ile CA1 piramidal nöronlarının dendritlerine yayılım ile trisinaptik yol tamamlanır. Şekil, (Brandalise, 2016)’dan alınarak Türkçeleştirilmiştir.

Hipokampus; yer, ızgara, sınır ve zaman hücreleri gibi fonksiyonel olarak özelleşmiş hücre tipleri sayesinde büyük miktarlardaki uzaysal bilginin hızlı bir şekilde işlenmesini sağlar (Moser ve ark., 2015). Genellikle CA3 ve CA1 bölgelerinde bulunan konum hücreleri, spesifik konumlara gelindiğinde aktive olur. Izgara hücreler, beyinde bir koordinat sistemi oluşturarak eksiksiz bir yol bulma ve konumlandırma sağlar. Sınır hücreleri, çevreye ait bölgede bir sınıra (duvar veya eşik gibi) gelince aktive olur. Zaman hücreleri ise geçmiş olayların zamanlaması hakkındaki bilgileri taşır (İzci ve Erbaş, 2015). Hipokampusun görsel uyarıları kaydetmesi ve uzaysal konumlamayı sağlayabilmesi için konum hücreleri ve zaman hücrelerinin uyumlu çalışması gerekir (İzci ve Erbaş, 2015). Hayvanlarda epizodik-benzeri bellek, ‘ne’, ‘nerede’ ve ‘ne zaman’ bileşenlerinin entegrasyonunu gerektirir (Deshmukh ve Knierim, 2011). Hipokampusun medial entorinal korteks (MEK) ve lateral entorinal korteks (LEK) olmak üzere iki ana kortikal girdisi vardır (Deshmukh ve Knierim, 2011). Izgara ve sınır hücreleri ile MEK, hipokampusa spesifik uzamsal bilgileri iletir, LEK’deki nöronlar ise anatomik olarak, nesneleri tanımadan sorumlu bölgelerle iletişim halindedir (Deshmukh ve Knierim, 2011). Başka bir deyişle, MEK, "nerede" sousuna cevap verir ve uzaysal bellek ile ilişkilidir, LEK ise "ne" sorusuna yanıt verir ve uzaysal olmayan bellek ile ilişkilidir (Deshmukh ve Knierim, 2011). Tanıma belleği (*recognition memory*), epizodik belleğin bir alt türüdür

ve bilginin hatırlanmasında (*retrieval*) tanıma belleğinin iki biçimi deneyimlenir: aşinalık (*familiarity*) ve hatırlama (*recollection*) (Cohen ve Stackman, 2015). Aşinalık, bir olayın, bireyin veya ögenin daha önce karşılaştığı hissidir. Hatırlama ise deneyimin bağlamsal ayrıntılarının bilinçli bir şekilde hatırlanmasını sağlayan daha yavaş bir süreci ifade eder, yani bu deneyimin nerede ve ne zaman gerçekleştiğine dair bilgiler verir (Cohen ve Stackman, 2015).

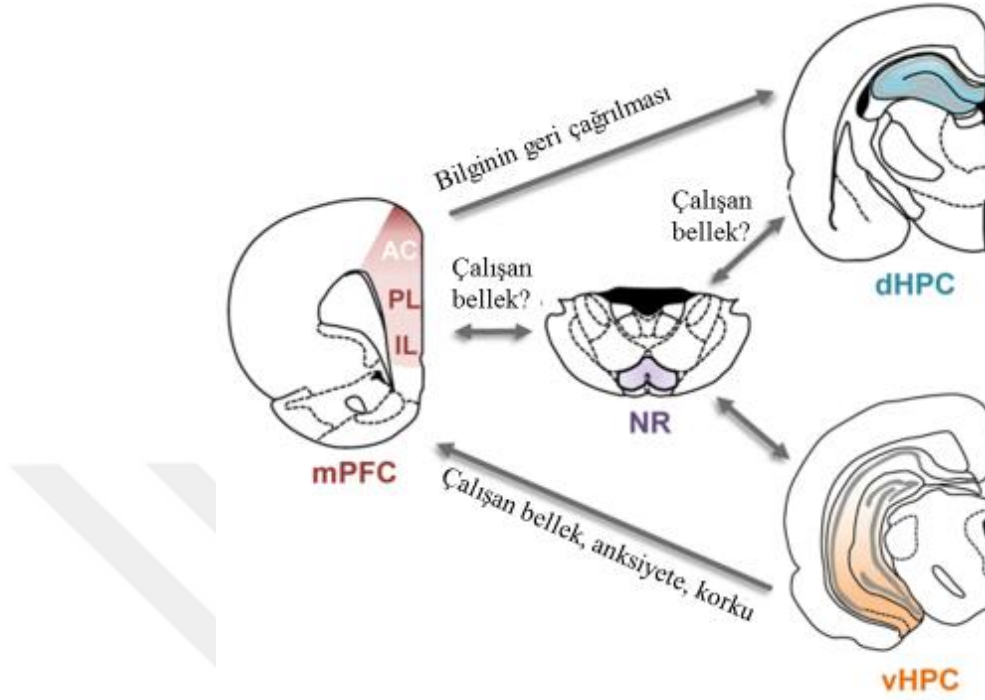
Görüntüleme çalışmaları, PH'de hipokampal atrofi olduğunu ve bunun uzaysal öğrenme fonksiyonlarını bozduğunu göstermiştir (Schneider ve ark., 2017). Hipokampal sinaptik plastisite üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinen kolinesteraz inhibitörü rivastigmin ve glutamat N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti memantin ile yapılan çalışmalarda, demanslı PH hastalarında veya Lewy cisimcikli demans hastalarında bilişsel fonksiyonlar üzerine yararlı etkiler görülmesi, PH'de bilişsel disfonksiyonda hipokampusun da rolü olduğunu kanıtlamaktadır (Calabresi ve ark., 2013). Son nörobiyolojik çalışmalar, monoamin hipotezine ek olarak, depresyon ve bozulmuş nöroenez arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir ve bu bozulmuş hipokampal nöroenezin, PH hayvan modellerinde erken dönemdeki serotonerjik eksiklikle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lim ve ark., 2018). Hipokampus-bağımlı testler aracılığıyla PH hastalarındaki öğrenme ve bellek fonksiyonlarındaki kayıplar hayvan modellerinde de değerlendirilebilmektedir (Schneider ve ark., 2017).

2.3.2. Prefrontal Korteks

Dikkat, çalışma belleği, planlama, akıl yürütme, karar verme ve zamanlama gibi temel yürütücü işlevler, kortikal ve subkortikal girdileri birleştirmekten sorumlu olan PFK'nin kontrolü altındadır (Puig ve ark., 2014). Bu devrelerin işlevi büyük ölçüde dopaminerjik nöromodülasyona bağlıdır (Puig ve ark., 2014). İnsan beyinde, PFK, korteksin büyük bir kısmını işgal eder ve çoğu beyin bölgesi ile geniş bağlantılara sahiptir (Watson ve Leverenz, 2010). Striatumun dorsolateral bölgesi, yani putamen, sensorimotor fonksiyonlarla; dorsomedial kısmı, yani kaudat, asosyatif fonksiyonlarla ve ventral striatum, yani nükleus akumbens ise motivasyonel ve duygusal fonksiyonlarla ilişkilidir. Başka bir deyişle, putamen ana olarak duyuşal ve motor devrelerle; kaudat, frontal ve paryetal bağlantı devreleriyle ve nükleus akumbens ise amigdala ve hipokampus gibi

limbik yapılar ve ventromediyal PFK ile bağlantılıdır (O'Callaghan ve ark., 2014). Dorsolateral PFK'ye projeksiyon yapan BG devrelerinin patolojisinin de yönetici işlevlerdeki bozukluklara katkıda bulunabileceği bilinmektedir (Hausdorff ve ark., 2015). PFK'nin kısa süreli çalışma belleğinin yanı sıra belirli bilgilerin daha uzun zaman ölçeklerini kapsayacak şekilde kodlanmasını ve hatırlanmasını sağladığını gösteren kanıtlar da vardır (Ghazizadeh ve ark., 2018). PFK ve hipokampusun çeşitli direkt ve indirekt anatomik yollarla birbirine bağlı olması, bu beyin alanları arasındaki iletişimin epizodik bellek süreçleri için gerekli olduğunu göstermektedir (Jin ve Maren, 2015; Sigurdsson ve Duvarci, 2016). Hem kemirgenlerde hem de primatlarda PFK, hipokampustan monosinaptik projeksiyonlar alır (Sigurdsson ve Duvarci, 2016). Bu projeksiyonlar, medial prefrontal korteks (mPFK) içindeki ana nöronlarda veya GABAerjik ara nöronlarda sonlanan uyarıcı glutamaterjik piramidal nöronları kapsar (Jin ve Maren, 2015). PFK'nin yanı sıra hipokampusun da çalışma belleğinde rol aldığı ve bu iki yapı arasındaki iletişimin bu süreç için kritik olduğu bilinmektedir (Yoon ve ark., 2008). Nitekim PFK, anatomik olarak, doğrudan ventral hipokampus ile (uzaysal bilgi ve belleği işleyen kısım) ve talamus yoluyla da dolaylı olarak dorsal hipokampus (duygusal ve motivasyonel davranışlar ile ilgili kısım) ile bağlantılıdır (Yoon ve ark., 2008; Sigurdsson ve Duvarci, 2016) (Şekil 2.7).

Prefrontal bölgelere dopaminerjik projeksiyonlar yapan ventral tegmental alan (VTA) ve medial nigral bölgeler, bazı PH hastalarında dejenerasyona uğrar (Narayanan ve ark., 2013). PFK'ye mezokortikal dopamin girdilerinin çalışma belleği fonksiyonunu, planlamayı ve dikkati düzenliyor olması, dopamin değişikliklerinin PH'deki yönetici işlev bozukluklarından kısmen sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (Hausdorff ve ark., 2015). Braak'ın evrelendirmesinde yer alan entorinal korteks ve hipokampusta meydana gelen nörodejenerasyonun, PFK'ye gelen veri akışının bozulmasına neden olarak bellek performansında azalmaya ve bilişsel disfonksiyona yol açtığı da bilinmektedir (Braak ve ark., 2004). Öğrenme ve bellek ile ilişkili fonksiyonların ana olarak kolinerjik veya glutamaterjik sistemler tarafından kontrol edildiği kabul görse de 5-HT'nin ve 5-HT reseptörlerinin de dopamin ve glutamat gibi farklı nörotransmitter sistemleriyle etkileşerek öğrenme ve bellekte önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Meneses, 2015).



Şekil 2.7. Prefrontal korteks ve hipokampus arasındaki direkt ve indirekt bağlantılar. Oklar, projeksiyonların yönünü işaret etmektedir. AC: *Anterior cingulate cortex*, ön singulat korteks, PL: *Prelimbic cortex*, IL: *Infralimbic cortex*, mPFC: *Medial prefrontal cortex*, orta prefrontal korteks, dHPC: *Dorsal hippocampus*, vHPC: *Ventral hippocampus*. NR: *Nucleus reuniens*. Şekil, (Sigurdsson ve Duvarci, 2016)'dan alınarak Türkçeleştirilmiştir.

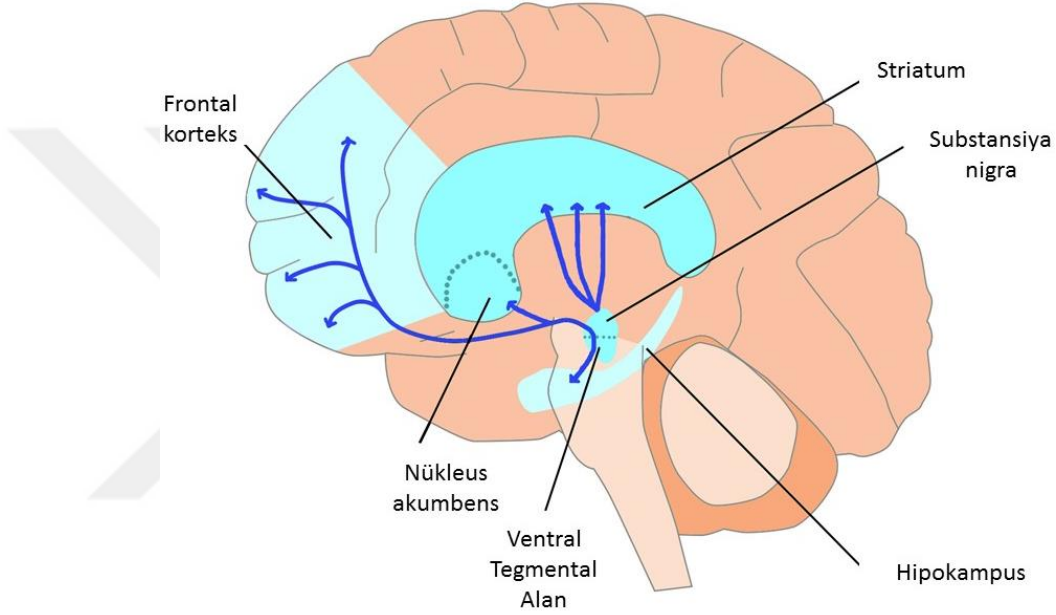
2.4. Parkinson Hastalığında Nörotransmitter Sistemlerinin Rolü

PH'de, çoklu nörotransmitter eksikliklerinin varlığı uzun süredir çalışılmaktadır (Halliday ve ark., 2014). PH'de L-DOPA'ya yanıt vermeyen depresyon, bilişsel bozukluk veya demans gibi motor olmayan bulgular, bu semptomların gelişmesinde diğer nörotransmitter sistemlerinin rol oynadığını göstermektedir (Perez-Lloret ve Barrantes, 2016).

2.4.1. Parkinson Hastalığında Dopaminerjik Sistem

Beyindeki dopaminerjik nöronların çoğu, BG'ye (nigrostriatal sistem), limbik bölgelere (mezolimbik sistem) ve kortikal bölgelere (mezokortikal sistem) projeksiyonlar yapan üç ana orta beyin dopamin bölgesinde bulunur (Halliday ve ark., 2014) (Şekil 2.8). PH'deki dopaminerjik kayıp, indirekt yolağın aşırı aktivitesi ve direkt yolağın hipoaktivitesine yol açarak kortikostriatal disfonksiyona neden olur (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Dopaminerjik mezolimbik yolak, duygudurumu kontrol eden VTA'ya ve nükleus

akumbensin limbik bölgelerine bağlanır. Bu yolaktaki patoloji, PH'de nigrostriatal dejenerasyondan önce ortaya çıkar (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Hastalığın erken evresinde mevcut olan ve dopamin ile modüle edilen frontal-striatal disfonksiyon, çalışma belleğinde, dikkatte, planlamada eksikliğe yol açarken hastalık ilerledikçe kolinerjik kayıp ile ilişkili olan ve demansa yol açan posterior kortikal dejenerasyon meydana gelir (Biundo ve ark., 2016).



Şekil 2.8. Beyindeki dopaminerjik yollar. 1. Substantia nigra → Dorsal striatum (Nigrostriatal yolak) 2. Ventral tegmental alan → Ventral striatum (Mizolimbik yolak) 3. Ventral tegmental alan → Prefrontal korteks (Mezokortikal yolak). Şekil, Okinawa Bilim ve Teknoloji Enstitüsü web sayfasından alınarak Türkçeleştirilmiştir (<https://www.oist.jp/news-center/photos/dopamine-pathways>, Erişim tarihi:20 Ağustos 2020).

2.4.2. Parkinson Hastalığında Kolinerjik Sistem

Beyindeki üç ana asetilkolin kaynağı; striatal ara nöronlar, nükleus bazalisteki kortikal projeksiyon yapan kolinerjik nöronlar ve pedinkülopontin çekirdekte talamik projeksiyon yapan kolinerjik nöronlardır (Halliday ve ark., 2014). Neostriatumda hem nikotinik hem de muskarinik asetilkolin reseptörleri (AChR'ler) bulunmaktadır; nikotinik AChR'ler nigrostriatal dopamin salıverilmesini aktive ederken muskarinik AChR'ler dopaminerjik nöronların inhibisyonuna neden olur (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). PH'deki dopaminerjik eksiklikler, striatal kolinerjik ara nöronların aşırı aktivasyonuna yol açar ve bu hiperaktivasyon, muskarinik aktivasyon yoluyla dopamin salıverilmesinde düşüşe neden olur (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Nükleus bazalisteki kolinerjik

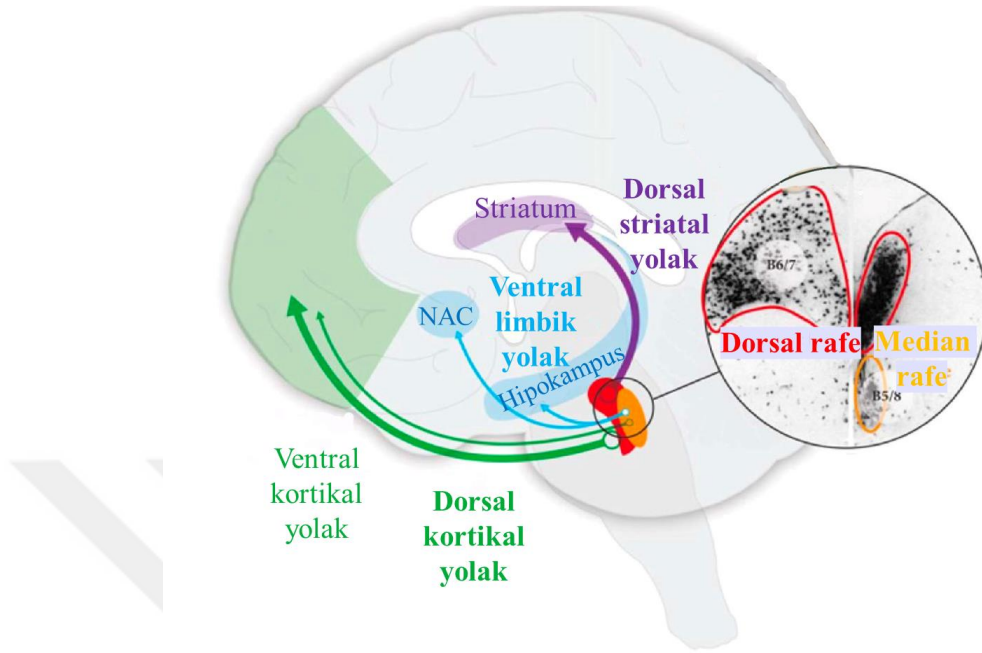
nöronlarının dejenerasyonu, PH'nin son dönem vakalarının çoğunda gözlenir, ancak PH demansında en şiddetlidir (Halliday ve ark., 2014).

2.4.3. Parkinson Hastalığında Noradrenerjik Sistem

LC; neokorteks, hipokampus, talamus, subtalamik çekirdek ve SN gibi çeşitli beyin alanlarına noradrenalin salgınmasını sağlayarak santral işlevleri modüle eder (Delaville ve ark., 2011). LC'den köken alan noradrenerjik nöronların PH hastalarında ciddi bir hasara uğradığı bilinmektedir (Bhide ve Bishop, 2011). Ayrıca kaudat çekirdek ve putamen gibi çeşitli beyin bölgelerinde hem noradrenerjik nöronların hem de noradrenalin içeriğinin kaybolduğu gösterilmiştir (Ehringer ve Hornykiewicz, 1960). Tüm ön beyni innerve eden LC'de şiddetli noradrenerjik nöron kaybı, PH demansında sık görülür ve bu anlamlı kayıp nükleus bazalisteki kolinerjik nöron kaybı ile de ilişkilidir (Halliday ve ark., 2014). Limbik sistemin dopaminerjik ve noradrenerjik innervasyon kaybı, PH'deki bilişsel disfonksiyon, depresyon ve anksiyete gibi nörodavranışsal problemlerle ilişkilidir (Delaville ve ark., 2011).

2.4.4. Parkinson Hastalığında Serotonerjik Sistem

Ön beyne projeksiyonlar yapan iki ana serotonerjik hücre grubu dorsal ve median rafe çekirdeğinde bulunur. Dorsal rafe çekirdeğindeki nöronlar striatum ve kortekse, median rafe çekirdeğindeki nöronlar ise kortekse ve hipokampusa projeksiyon yapar (Halliday ve ark., 2014) (Şekil 2.9). Görüntüleme çalışmaları, erken dönem PH hastalarında kaudat, talamus, hipotalamus ve ön singulat kortekste; ileri dönem PH hastalarında putamen, insula, posterior singulat korteks ve PFK'de SERT'in önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). PH'deki 5-HT disfonksiyonu, noradrenerjik disfonksiyon ile birlikte depresyon, kilo kaybı, yorgunluk ve uyku bozuklukları gibi motor olmayan semptomların gelişmesinde rol oynar (Muñoz ve ark., 2020). Serotonerjik sistemde meydana gelen dejenerasyonun bilişsel bozukluğun görülmesi ile ilgili olup olmadığı henüz değerlendirilmemiş olsa da PH'deki demansta kortikal 5-HT yıkımında bir artış ve 5-HT innervasyonunda azalmanın meydana gelmesi median rafe çekirdeğindeki 5-HT nöronlarının geç-dönem kaybıyla tutarlıdır (Halliday ve ark., 2014).



Şekil 2.9. Beyindeki serotonerjik yollar. Dorsal rafe çekirdeğindeki nöronlar striatum ve kortekse (dorsal striatal yolak ve dorsal kortikal yolak), median rafe çekirdeğindeki nöronlar ise kortekse ve hipokampusa (ventral kortikal yolak ve ventral limbik yolak) projeksiyon yapar. Şekil, (Halliday ve ark., 2014)'ten uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

Serotonin Reseptörlerinin Parkinson Hastalığında Olası Terapötik Roller

Serotonerjik nörotransmisyon, yedi 5-HT reseptör ailesi (5-HT₁-5-HT₇) aracılığıyla sağlanmaktadır (Athar, 2010). Bu reseptörlerden, iyonotropik özellikte olan 5-HT₃ reseptörleri hariç diğer hepsi G-proteini kaplı reseptörler ailesi içinde yer alır (Athar, 2010). Post-sinaptik reseptörlerin yanı sıra, 5-HT nöronlarında iki tip presinaptik otoreseptör bulunur. 5-HT_{1A} reseptörleri, serotonerjik nöronların hücre gövdelerinde bulunur ve kendi ateşlemelerini negatif olarak kontrol ederken 5-HT_{1B/1D} reseptörleri serotonerjik sinir uçlarında bulunur ve 5-HT'nin salıverilmesini veya sentezini bir geri besleme mekanizması olarak inhibe eder (Ohno ve ark., 2015). 5-HT reseptörlerinin 14 alt tipi olmasına rağmen PH'de henüz hepsiyle ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmamıştır.

5-HT_{1A} reseptörü esas olarak hipokampusta, septumda, rafe çekirdeğinde ve daha az ölçüde kortikal bölgelerde yoğunlaşmaktadır. 5-HT_{1B/1D} reseptörü SN, hipokampus, dorsal subikulumda ve daha az oranda striatumda bulunur (Buhot ve ark., 2000). Çeşitli çalışmalarda, PH hastalarında ve PH'li hayvanların rafe çekirdeklerinde, hipokampal

formasyon ve PFK'de 5-HT_{1A} bağlanma bölgelerinin azaldığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2014). Tersine, şiddetli lezyonlu striatal nükleuslarda 5-HT_{1A} reseptör yoğunluğu, özellikle putamende artış göstermiştir. Bu sonuçlar, daha yüksek nöronal hücre ölümüne sahip beyin bölgelerinde 5-HT_{1A} reseptörlerinin sentezinde artış meydana geldiğini desteklemektedir (Frechilla ve ark., 2001). PH'de 5-HT taşıyıcı aktivasyonunun azaldığı bölgelerde ve depresyonda ventral striatumda 5-HT_{1B} reseptör bağlanmasının da azaldığı orta dereceli bir azalma rapor edilmiştir (Varrone ve ark., 2015). Klinik çalışmalarda 5-HT_{1A/B} reseptör agonisti eltoprazinin, küçük bir PH hastası grubunda L-DOPA'nın motor yararlarını değiştirmeden diskinezi semptomlarını hafiflettiği gösterilmiştir (Paolone ve ark., 2015; Svenningsson ve ark., 2015) ancak 5-HT_{1A/B} reseptörlerinin PH'de rolünü aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5-HT₂ reseptörlerinden 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} serebral korteks, limbik bölgeler ve BG'de yaygındır (Ohno ve ark., 2015). 5-HT₂ reseptörlerinin blokajının, antipsikotik (D₂ antagonisti) tedavi ile ilişkili ekstrapiramidal motor bozuklukları iyileştirdiği iyi bilinmektedir (Shimizu ve ark., 2013). Ayrıca 5-HT₂ antagonistlerinin PH hayvan modellerinde ve PH hastalarında motor bozuklukları iyileştirdiği gösterilmiştir (Henderson ve ark., 1992; Ferguson ve ark., 2010). 5-HT₂ reseptörlerinin bilişsel disfonksiyon ve duygudurum bozukluklarındaki patolojik süreçlerde rolünün olduğunun gösterilmesi, 5-HT₂ reseptörlerinin modülasyonunun PH gibi başka hastalık koşullarında meydana gelen bilişsel bozukluğun veya depresyonun tedavisi için yararlar sağlayabileceğini düşündürmektedir (Ohno ve ark., 2015).

Na⁺ ve Ca²⁺ iyonlarına geçirgen bir katyon kanalı görevi gören 5-HT₃ reseptörleri, post-sinaptik membran depolarizasyonu yaparak hedef nöronları uyarır. Ayrıca, kolinerjik ve glutamaterjik nöronların sinir terminallerinde bulunur ve nörotransmitter salıverilmesini düzenler (Barnes ve Sharp, 1999). Ondansetron ve granisetron gibi 5-HT₃ reseptör antagonistlerinin antipsikotiklerle indüklenen ekstrapiramidal bozuklukları hafiflettiğinin gösterilmesi, 5HT₃ reseptör antagonistlerinin PH tedavisi için potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır (Ohno ve ark., 2015). Ayrıca, 5-HT₃ antagonistlerinin çeşitli hayvan modellerinde bilişsel işlevleri iyileştirdiği gösterilmiştir (Barnes ve ark., 1990; Hodges ve ark., 1996). Ondansetron, ayrıca şizofreni hastalarında hem bilişsel bozuklukları hem de

antipsikotik kaynaklı ekstrapiramidal yan etkileri anlamlı bir şekilde iyileştirmiştir (Zhang ve ark., 2007; Akhondzadeh ve ark., 2009). Bu yararlı etkilerin altında yatan mekanizmanın serebral kortekste asetilkolinin artışı olabileceği düşünülmektedir (Ohno ve ark., 2015). Dolayısıyla, 5-HT₃ reseptör antagonistleri, PH'de motor olmayan semptomları (duygudurum bozuklukları, psikoz ve bilişsel disfonksiyon) iyileştirme potansiyeline de sahip olabilir (Ohno ve ark., 2015).

5-HT₆ reseptörleri de striatumda yaygın olarak bulunduğu için ekstrapiramidal motor fonksiyonu modüle ettikleri düşünülmektedir (Ohno ve ark., 2015). Elektrofizyolojik çalışmalarda, striatal kolinerjik ara nöronlarda bulunan ve onların ateşlenmesini pozitif yönde regüle eden 5-HT₆ antagonistlerinin antiparkinson etkisinin gösterilmesi ile 5-HT₆ reseptör blokajının PH tedavisinde fayda sağlayabileceği desteklenmiştir (Bonsi ve ark., 2007). 5-HT₆ reseptörünü aşırı eksprese eden transgenik hayvan modellerinde öğrenme bozukluklarının 5-HT₆ antagonistleri ile geri çevrilmesi, 5-HT₆ blokajının PH'de hem ekstrapiramidal etkiler üzerinde hem de bilişsel disfonksiyon gibi motor olmayan semptomlar üzerinde yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Mitchell ve ark., 2007; Ohno ve ark., 2015).

5-HT₇ reseptörleri esas olarak talamus, hipotalamus, frontal korteks, hipokampus ve amigdalada ekspresedir (Du ve ark., 2018). Serotonerjik nöronlarda veya GABAerjik ara nöronlarda bulunan 5-HT₇ reseptörlerinin PH'de disfonksiyonel veya downregüle olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Ayrıca mPFC aktivitesinin de doğrudan veya dolaylı olarak 5-HT₇ aracılı olduğu düşünülmektedir (Fan ve ark., 2016). 5-HT₇ reseptör antagonizmasının serotonerjik modülasyon veya D₂ reseptör blokajıyla indüklenen bradikinezi veya katalepsi bulgularına etki etmediği gösterilmiştir (Ohno ve ark., 2015). Ancak, yapılan hayvan çalışmalarında, hemiparkinson hayvanların prelibik korteksine uygulanan 5-HT₇ agonistinin anksiyete-benzeri davranışları azalttığı gösterilmiştir (Du ve ark., 2018). Median rafe çekirdeğinden projeksiyonlar alan lateral habenüler çekirdekteki 5-HT₇ reseptörleri, hemiparkinson sıçanlarda depresyon-benzeri davranışları azaltmıştır (Han ve ark., 2016). 5-HT₇ reseptörlerinin de bilişsel işlevlerin kontrolünde rol oynadığını öne süren çalışmalar olsa da bu bilgi halen çok sınırlıdır (Ohno ve ark., 2015).

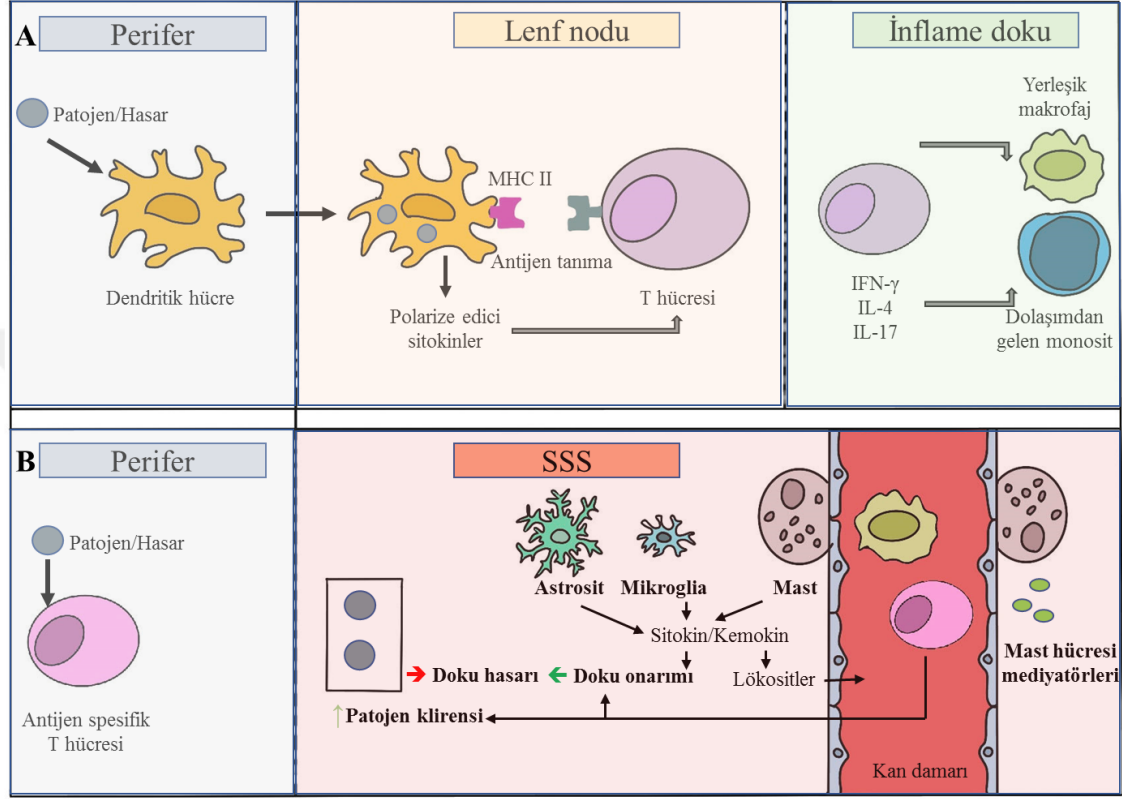
2.4.5. Parkinson Hastalığında GABAerjik ve Glutamaterjik Sistemler

Striatum, BG'nin tüm motor devrelerinin merkezidir. Korteks ve talamustan gelen glutamaterjik afferentler ve SN'den gelen dopaminerjik afferentler striatuma projeksiyon yapar (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). GPe ve GPi, striatumdan inhibitör GABAerjik afferentler ve subtalamik çekirdekten eksitator glutamaterjik afferentler alır. BG'nin öğrenme, planlama, çalışma belleği, duygular ve hareket kontrolünde rolü olduğu bilinmektedir. Bu işlevler PH'de farklı şekillerde bozulur (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Glutamat, çeşitli beyin bölgelerinde NMDA reseptörleri ve glutamatla aktive olan voltaj kapılı kalsiyum kanalları aracılı eksitotoksisteden sorumludur (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Glutamat aracılı eksitotoksiste için olası bir diğer mekanizma, PH için de kabul edilen patolojik bir mekanizma olan ağırlıklı olarak kaspaz 9 ve 3'ün aktivasyonuna yol açan hücre içi kaskad tarafından kontrol edilen apoptoz ve otofaji yollarının indüklenmesidir (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Striatumun orta dikenli nöronlarında dopamin tükenmesini takiben değişen glutamaterjik reseptör düzeni ve glutamat depolanması, eksitotoksiste hasarını ve nörodejenerasyonu artırır (Sanjari Moghaddam ve ark., 2017). Görüntüleme çalışmaları, PH hastalarında, pons, BG ve talamusta artmış GABA, azalmış kortikal glutamat ve SN'de artmış GABA/glutamat oranı bildirmiştir (O'Gorman Tuura ve ark., 2018). GABA ve glutamat seviyeleri, bilişsel bozukluk ve depresyon dahil olmak üzere PH'deki mevcut semptomlarla ilişkilendirilmektedir (O'Gorman Tuura ve ark., 2018).

2.5. Santral Sinir Sistemi İmmün Sistemi

Periferde, dendritik hücreler, protein antijenleri yakalar, onları küçük peptitler halinde işler ve daha sonra bu peptitleri hücre yüzeyindeki major histo-uyumluluk kompleksi II (MHC II) molekülleri ile bağlayarak T-hücreleri tarafından tanınmasını sağlar (ten Broeke ve ark., 2013). Antijeni tanıyan T-hücreleri tarafından sitokinlerin salıverilmesi ile, dokuda yerleşik olan veya lenfatik sistemden sızan immün hücreler, patojene karşı saldırıyı koordine etmek için sinyale yanıt verir (Turvey ve Broide, 2010). Beyin parankiminde, beynin yerleşik immün hücresi olan mikrogliya, periferdeki dendritik hücrelere atfedilen birçok fonksiyonel özelliği yerine getirir (Ghosh, 2010). Bu hücreler tarafından salgılanan proinflamatuvar moleküller, patojen klirensine yardımcı olmak için

dolaşımdaki lenfositlerin ve miyeloid hücrelerin beyin parenkimine infiltrasyonunu teşvik eder (Lehnardt, 2010) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Periferde ve santral sinir sisteminde doğal immünite. (A) Periferik bir hasar karşısında, dendritik hücreler antijeni tanıyarak peptidler halinde işler ve lenf nodlarına geçerek yüzeylerindeki MHC sınıf II molekülleri ile aracılığıyla T lenfositlerinin bu antijenleri tanımasını sağlayarak onları harekete geçirir. T hücrelerinin salgıladıkları düzenleyici sitokinler, yerleşik veya dolaşımdan gelen immün hücreler ile birlikte inflamatuvar yanıtı yönetir. (B) Periferde dendritik hücrelerin yaptığı işlevi yerleşik mikrogliya ve astrositler yapar. Patojen veya hasar varlığında, yerleşik santral sinir sistemi (SSS) hücreleri tarafından eksprese edilen ve doku onarımında görev alan sitokinler ve kemokinler patojen temizlenmesine yardımcı olmak için periferden dolaşımdaki lenfositlerin ve miyeloid hücrelerin toplanmasını destekler. MHC: Major histouyumluluk kompleksi. Şekil, (Ransohoff ve Brown, 2012) referans alınarak yeniden çizilmiştir.

Santal sinir sistemi (SSS), son derece özelleşmiş bir yapıdır. Nöronal aktivitenin optimum işleyebilmesi için oldukça kontrollü mikroçevresel koşullara ihtiyaç vardır (Villabona-Rueda ve ark., 2019). Bu koşulları sağlayabilmek için, SSS, ana işlevi hem eksojen hem de endojen elementlerin beyin homeostazını değiştirmesini önlemek olan karmaşık yarı geçirgen bir hücresel bariyer olan kan-beyin bariyerinin varlığı ile kısmen izole edilmiştir (Louveau ve ark., 2015). Sağlıklı koşullar altında, perifer kaynaklı immün hücreler ve ilişkili inflamatuvar moleküller kan-beyin bariyerini geçip SSS'ye giremez (Ransohoff ve Brown, 2012). Sağlıklı beyin parenkiminde yerleşik dendritik hücrelerin olmaması ve

nöral dokunun kan-beyin bariyeri ve inflamatuvar supresif sitokinlerin varlığı nedeniyle nispeten antiinflamatuvar ortamı, SSS içinde doğal bağışıklık süreçlerinin sessiz sedasız işlemesine yol açar (Ransohoff ve Brown, 2012). Lenfoid organlarda alarm çalmak için SSS'deki doğal immün hücreler dışarıya göç etmez, bu da yerleşik doğal immün hücrelerinin patojenler ve doku hasarı ile doğrudan uğraşmasını gerektirir (Ransohoff ve Brown, 2012). Astrositler, mikroglia, oligodendrositler ve glial hücreler, beyin doğal immün hücreleri olarak işlev görür ve bu hücrelerin farklı koşullar altında aktivasyonu nöroinflamasyonun gelişmesine yol açar (Kumar, 2019). Proinflamatuvar moleküllerin üretimi kan-beyin bariyerini bozarak immün hücrelerinin inflamatuvar bölgeye göçüne neden olur (Kumar, 2019; Wesselingh ve ark., 2019). Hasarlı süreç kontrol edilemez veya azaltılamazsa, beyinde doku hasarına veya nöroinflamasyona neden olan kalıcı inflamasyon meydana gelebilir (Kumar, 2019).

2.5.1. Mikroglia ve Nörodejenerasyon: Parkinson Patogenezindeki Rolü

Mikroglia hücreleri ilk kez Pio del Rio Hortega tarafından, gümüş boyama yöntemi ile beyin parenkiminde gömülü, kısa çubuk şeklinde görülmüştür ve diğer glial hücrelerden daha küçük olduğu için mikroglia olarak adlandırılmıştır (Ghosh, 2010). Mikroglia hücreleri, beyin parenkiminde yerleşik makrofajlar olarak bilinmektedir (Sevenich, 2018). SSS'deki homeostazın korunmasından ve SSS parankimindeki enfeksiyöz ajanlara ve hasar ile ilişkili ürünlere karşı birinci basamak savunmadan sorumludurlar (Ousman ve Kubes, 2012). Sağlıklı koşullar altında, fenotipik olarak dallanmış mikroglia, "hareketsiz" veya "dinlenme" durumunda olarak tanımlanmaktadır (Kabba ve ark., 2018). SSS homeostazının tehlikeye girdiği bir durumda, mikroglia hücreleri fenotiplerini değiştirerek aktif hale gelir (Kabba ve ark., 2018). Mikrogliaların klasik M1 (proinflamatuvar, sitotoksik) fenotipi tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlekin (IL)-1 β , IL-6, IL-12, süperoksit ve nitrik oksit gibi sitotoksik moleküllerin ve reaktif oksijen türlerinin salıverilmesine neden olarak proinflamatuvar yanıtı tetiklerken alternatif M2 (antiinflamatuvar, sitoprotektif) fenotipi IL-4, IL-13 ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) gibi antiinflamatuvar özelliklere sahip sitokinler üreterek doku onarımını teşvik eder ve immünosupresif etkiler gösterir (Wang ve ark., 2015c; George ve ark., 2019). Nörodejeneratif süreçte bu denge proinflamatuvar fenotip yönüne kayar (Lecours ve ark., 2018).

PH'de, kronik inflamatuvar sürecin, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi ve oksidatif stres yoluyla nöronal dejenerasyona katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (Ferreira ve Romero-Ramos, 2018). Hasarlı bölgelerde aktifleşmiş mikrogliya birikimi ile tespit edilen inflamasyonun varlığı, PH hastalarının post-mortem beyinlerinde, dopaminerjik dejenerasyonun yoğun olduğu SNpc'de ve ayrıca nöron kaybının yaygın olduğu hipokampus, transentorinal korteks, singulat korteks ve temporal kortekste gösterilmiştir (Long-Smith ve ark., 2009). Ayrıca, PH'de mikrogliyanın ve yanlış katlanmış α -sinükleinin karşılıklı bir etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir. Nitekim, agregate α -sinüklein mikrogliayı aktif hale getirirken inflamatuvar mediyatörlerin de α -sinüklein agregasyonuna neden olduğu bilinmektedir (George ve ark., 2019). İnflamasyonun PH patogenezindeki kesin rolü henüz belirsiz olsa da klinik çalışmalardan ve hayvan modellerinden elde edilen kanıtlar, PH'deki nörodejeneratif süreçte mikrogliyal aktivasyonun ve inflamatuvar kaskadın önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (Long-Smith ve ark., 2009).

2.5.2. Patern Tanıma Reseptörleri

Patern Tanıma Reseptörleri (PRR'ler), patojenlerde bulunan molekülleri (patojenle ilişkili moleküler motifler, *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) veya hasarlı hücreler tarafından salgılanan molekülleri (hasarla ilişkili moleküler motifler, *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) tanıyabilen proteinlerdir (Amarante-Mendes ve ark., 2018). Memelilerde, Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), RIG-I benzeri reseptörler, Nod benzeri reseptörler, AIM2 benzeri reseptörler, C-tipi lektin reseptörleri gibi birkaç farklı PRR sınıfı vardır. Bunlar arasında, TLR'ler ilk tanımlanmış ve en karakteristik olanlardır (Kawasaki ve Kawai, 2014).

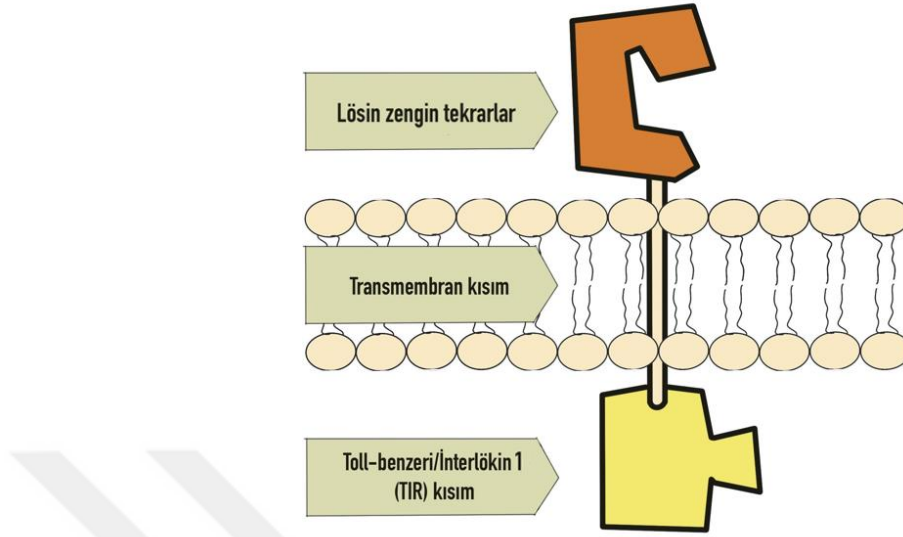
Toll-Benzeri Reseptörler

Toll, ilk olarak meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) embriyosunda tanımlanmış, mantar enfeksiyonlarına karşı immün cevapta önemli rol oynadığı gösterilmiş bir gendir (Güven ve Can, 2012). Bu genin ürettiği transmembran proteinlerin homologları daha sonradan memelilerde tespit edilmiş ve bu proteinler, TLR'ler olarak adlandırılmıştır (Güven ve Can, 2012). Toll ismi, bu geni ilk bulan ekipte olan Nüsslein-Volhard'ın meyve sineği larvasının dorsal vücut bölümüne göre az gelişmiş olan ventral bölgesini fark

ettiğinde hayretini dile getirmek için söylediği “Das ist ja toll” cümlesinden gelmektedir. Almanca’da toll “inanılmaz” veya “harika” demektir (Kundakci ve Pirat, 2012).

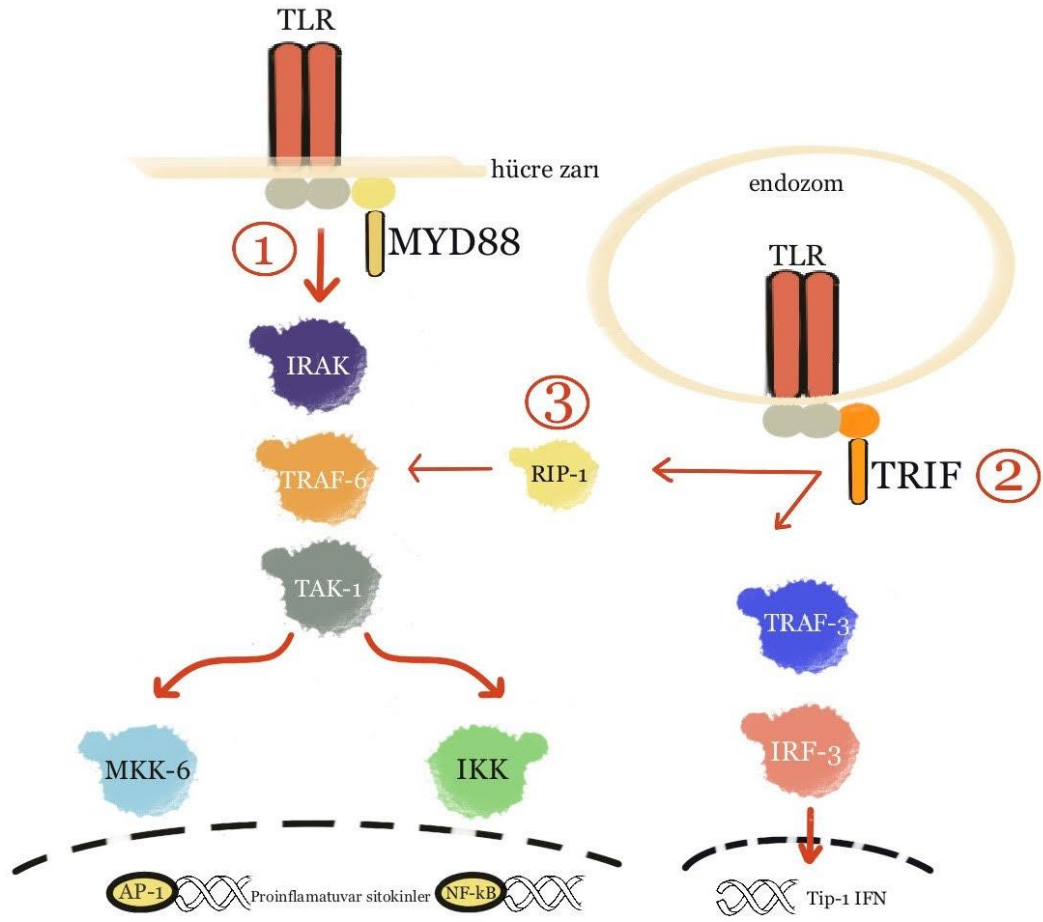
TLR’ler, PAMP ve DAMP moleküllerini tanıyan ve doğal immün yanıtı başlatan at nalı biçimindeki proteinlerdir (Nie,2018). Toll proteininin keşfinden bu yana, insanda 10 adet TLR (TLR1 – TLR10) ve farede 13 adet TLR (TLR1 – TLR13) belirlenmiştir (Nie ve ark., 2018). TLR 1, 2, 4, 5 ve 6 hücre zarında eksprese edilerek hücre dışı kompartmanı algımlarken, TLR 3, 7, 8 ve 9 hücre içinde, esas olarak endozomlarda bulunur ve RNA/DNA gibi viral bileşenler için iç mikroçevreyi algılar (Zolezzi ve ark., 2019).

Farklı tip TLR'ler farklı moleküler paternleri tanımasına rağmen, tüm TLR'lerin genel yapısı ortaktır (Suresh ve Mosser, 2013). Her birinde, patojen tanınmasından sorumlu, sarmal şeklinde ekstraselüler lözün zengin tekrarlar, bu yapının bağlı olduğu bir transmembran alan ve sinyal transdüksiyonundan sorumlu sitoplazmik toll-benzeri/İnterlökin 1 (TIR) alanı bulunmaktadır (Suresh ve Mosser, 2013) (Şekil 2.11). Ligand bağlanmasından sonra, TLR'ler dimerize olur ve sinyal moleküllerinin bağlanması için gereken konformasyonel değişikliğe uğrar (Akira ve Takeda, 2004). Bunlar moleküller arasında MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*, Miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini 88), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*, TIR bölgesi içeren interferon-β salıverilimini indükleyen adaptör), TIRAP (*Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein*, Toll/interlökin-1 reseptör bölgesi içeren adaptör protein) ve TRAM (*TRIF related adaptor molecule*, TRIF ilişkili adaptör molekül) gibi adaptör proteinler bulunur (Kawasaki ve Kawai, 2014). Tüm TLR sinyal yolları, TRIF adaptörü aracılığıyla sinyallemeyi başlatan TLR-3 dışında, MyD88'e bağlıdır (Kawasaki ve Kawai, 2014) (Şekil 2.12).



Şekil 2.11: Toll-benzeri reseptörün kısımları. Lösın zengin tekrarlar kısmı ligandı tanır, Toll-benzeri/İnterlökin 1 (TIR) kısmı adaptör proteinler ile etkileşime girerek sinyalizasyon kaskadını başlatır.

MyD88-bağımlı sinyal yolağında, TLR, ligand ile aktive olduğunda MyD88'in TIR alanı reseptörün TIR alanı ile, amino (N) terminali ise IRAK-4 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*, IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 4) ile kompleks oluşturur (Akira ve Takeda, 2004). IRAK-4 aracılığıyla fosforillenen IRAK-1, TRAF-6 (*TNF receptor associated factor-6*, TNF-reseptörü ile ilişkili faktör-6) ile birleşir (Kumar, 2019). TRAF 6'nın aktivasyonu, TAK-1 (TGF- β ile aktive olan kinaz-1)'i aktive eder ve TAK-1, hem nükleer faktör kappa-B (NF κ B) hem de mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan bir dallanma noktası görevi görür (Suresh ve Mosser, 2013). Böylece NF κ B'nin çekirdeğe translokasyonuna izin vererek proinflamatuvar gen ekspresyona veya AP-1 (aktivatör protein-1) ailesi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar yanıtları düzenler (Suresh ve Mosser, 2013).



Şekil 2.12. Toll-benzeri reseptör sinyalizasyon kaskadı. (1) MyD88-bağımlı yolak. TLR'ye ligand bağlandığında TIR bölgesi dimerizasyona uğrayarak MyD88'in bağlanması için gerekli konformasyonel değişiklikler meydana gelir. MyD88'in TIR bölgesi TLR'nin TIR bölgesi ile etkileşerek sinyalizasyon kaskadını tetikler. Bu etkileşim sonucu fosforile olan IRAK, TRAF-6'yı aktive eder. TRAF-6'nın TAK-1'i aktive etmesi ile MKK-6 ve İκK aktive olur ve AP-1 ve NFκB gibi transkripsiyon faktörlerinin çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir. (2) Endozomlarda yer alan TLR'ler tarafından kullanılan MyD88 bağımsız yolakta ise adaptör protein olarak TRIF yer alır ve sırasıyla TRAF-3 ve IRF-3 aktivasyonu gerçekleşir. Bu aktivasyon sonucu çekirdekte anti-inflamatuar özellikteki Tip-I IFN'ların sentezi tetiklenir. (3) Bu yolakta ayrıca RIP-1 aktivasyonu aracılığıyla proinflamatuar sitokinlerin sentezi de tetiklenebilir. AP-1: Aktivatör protein 1, İκK: İnhibitör kappa-B kinaz; IRAK: İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz; IRF-3: İnterferon düzenleyici faktör 3; MKK-6: MAP kinaz kinaz-6; MyD88: Miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini 88; NFκB: Nükleer faktör kappa-B; RIP-1: Reseptörle etkileşen protein-1; TAK-1: Transforme edici büyüme faktörü beta ile aktive olan kinaz-1; Tip-1 IFN: Tip-1 interferon; TIR: Toll-like/İnterlökin1, TLR: Toll-benzeri reseptör; TRAF-3: TNF-reseptör ilişkili faktör 3; TRAF-6: TNF-reseptör ilişkili faktör 6; TRIF: TIR bölgesi içeren interferon-β salıverilmesini indükleyen adaptör.

MyD88 bağımlı olarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik ederken, MyD88-bağımsız olarak interferon (IFN) ile indüklenebilir genlerin indüksiyonu ve dendritik hücrelerin olgunlaşması ile ilişkilidir (Fiebich ve ark., 2018). MyD88 bağımsız sinyal yolağında (TRIF-TRAM yolağı), TLR, ligand ile aktive olduğunda, TRIF veya TRAM molekülünü bağlayarak TRAF-3 ve TRAF-6 ile etkileşime girer (Fiebich ve ark., 2018). TRAF-6, RIP-1 (*receptor-interacting protein-1*, reseptörle etkileşen protein-1) kinaz ile etkileşime girer ve RIP-1 kinaz, TAK-1 kompleksi ile birleşerek onu aktive eder ve NF- κ B ve MAPK'lerin aktivasyonuna ve inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuna yol açar (Kawasaki ve Kawai, 2014). Bunun aksine, TRAF-3, TBK-1 (*TRAF family member-associated activator-binding kinase-1*, TRAF aile üyesi-ilişkili NF κ B aktivatörü bağlayan kinaz-1) ve I κ K β (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon*, Nükleer faktör kappa-B kinaz inhibitörü epsilon alt birimi) ile etkileşime girerek IRF-3 (*Interferon regulatory factor-3*, interferon düzenleyici faktör-3)'ü aktive eder (Kawasaki ve Kawai, 2014). Daha sonra, IRF-3 bir dimer oluşturarak sitoplazmadan çekirdeğe geçer, burada tip I IFN genlerinin ekspresyonunu indükler (Kawasaki ve Kawai, 2014).

2.5.3. Bir DAMP Molekülü Olarak α -Sinüklein

PH'nin ana patolojik bulgularından olan agregat α -sinükleinin bir DAMP molekülü olarak davrandığı ve mikrogial TLR'leri aktif hale getirdiği tahmin edilmektedir (Kouli ve ark., 2019). SNpc'de sağ kalan dopaminerjik nöronlarda bulunan ve PH için patognomonik olarak kabul edilen Lewy cisimcikleri içerisinde yanlış katlanarak toksik agregatlar oluşturan α -sinüklein, sağlıklı bireylerde sinaptik plastisite, nörotransmitter salıverilmesi ve presinaptik vezikül trafiğinde rol oynayan 140 aminoasitli bir proteindir (Rocha ve ark., 2018; Zella ve ark., 2019). Fizyolojik koşullar altında katlanmamış, çözünür monomerler veya agregasyona dirençli α -heliks tetramerler olarak belirli bir denge halinde bulunan α -sinüklein, lipid-bağlayan amfipatik bir N-terminaline, asidik bir C-terminaline ve hidrofobik bir amiloid olmayan- β merkeze (NAC, *non-amiloid- β complement*) sahiptir (Zhang ve ark., 2018).

Lewy cisimciklerinin β -levhalar şeklinde agregat olmuş α -sinüklein fibrilleri ile karakterize olması, PH'de α -sinüklein toksisitesinin β -levha katlanması aracılığıyla olduğunu düşündürmektedir (Gallegos ve ark., 2015). Agregasyon oluşumunda NAC bölgesi kritik

öneme sahip olsa da bu bölge ile etkileşim içerisinde olan ve fibril oluşumunu inhibe ederek spontan agregasyonları önleyen C terminali, bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayarak α -sinükleinin katlanma kinetiğini değiştirebilir (Ma ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2018). Özellikle serin-129 bölgesinde meydana gelen fosforilasyonun, α -sinüklein inklüzyonlarının oluşumunu hızlandırdığı ve nöronal kaybı artırdığı bildirilmiştir (Sugeno ve ark., 2008). Sağlıklı bireylerin beyinlerinde serin-129 fosforilasyonu meydana gelmiş α -sinüklein (pS129- α -sinüklein) oranı yalnızca %4 iken Lewy cisimcikleri oluşmuş PH hastalarının beyinlerinde bu oran yaklaşık %90 olarak bulunmuştur (Rocha ve ark., 2018). Ayrıca pS129- α -sinüklein izoformlarının β -katlanmalara geçişinin daha hızlı gerçekleştiği gösterilmiştir (Samuel ve ark., 2016).

Son yıllarda yapılan araştırmalar α -sinüklein patolojisinin, özellikle, SSS'de meydana gelen nöroinflamasyon ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir (Gustot ve ark., 2015; Zella ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar, α -sinükleine maruz kalan mikrogial hücrelerin aktif hale geldiğini ve proinflamatuvar sitokinler gibi nörotoksik faktörleri serbest bırakarak nöroinflamasyonu tetiklediğini göstermektedir (La Vitola ve ark., 2018). PH hastalarının beyin-omurilik sıvıları (BOS)'nda, plazma ve post-mortem beyin dokularında inflamatuvar mediyatörlerin tespiti, nöroinflamasyonun nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini hızlandırabileceği görüşünü desteklemektedir (Ransohoff, 2016; Duffy ve ark., 2018).

2.5.4. Toll-Benzeri Reseptör-2 Sinyal Yolağının Parkinson Patogenezindeki Rolü

TLR-2 MyD88-bağımlı reseptör ailesinin bir üyesidir ve ligandları ile etkileşmek için TLR-1 veya TLR-6 ile heterodimer oluşturur (Caplan ve Maguire-Zeiss, 2018). TLR-2'nin mikroglianın yanı sıra nöronlarda da eksprese olduğu ve nöronal TLR-2'nin de ekstraselüler α -sinüklein ile etkileşime girebildiği bilinmektedir (Caplan ve Maguire-Zeiss, 2018). Ayrıca nöronlardan ekstraselüler ortama salıverilen α -sinüklein, mikrogial TLR-2'leri aktif hale getirebilir ve nörodejenerasyonu tetikleyen toksik maddeler üretebilir (Kim ve ark., 2013a). α -sinüklein tarafından aktive olmuş mikrogiallarda NF κ B yolağının TLR-2 aracılı aktivasyonu, inflamatuvar cevapları tetikleyerek proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine neden olmaktadır (Kim ve ark., 2018). α -sinüklein aşırı eksprese eden veya toksinle indüklenen PH hayvan modellerinde TLR-2'nin upregüle

edildiği bildirilmiştir (Watson ve ark., 2012; Kim ve ark., 2013a; Noelker ve ark., 2013; Drouin-Ouellet ve ark., 2014). İnsan çalışmalarından elde edilen kanıtlar da bu reseptörlerin PH patogenezinde rolü olduğunu desteklemektedir (Kouli ve ark., 2019). PH hastalarının SNpc'lerinde ve hipokampuslarında α -sinüklein patolojisi ile ilişkili reaktif mikroglianin varlığının ve TLR-2 ekspresyonundaki artış, TLR-2'nin PH'de prodromal durumun bir belirtici olabileceği ve hastalığın progresyonunda önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Doom ve ark., 2014). Ayrıca, TLR-2 reseptörlerinin aktivasyonunun, protein konformasyonuna duyarlı olduğu ve β -levha bakımından zengin α -sinüklein oligomerlerinin bu reseptörleri aktive ettiği bilinmektedir (Kim ve ark., 2013a). Ancak, klinik kanıtlar, erken veya geç dönem PH'de TLR-2 ekspresyonunun bölgeye spesifik olabileceğini ve TLR-2'nin aynı anda tüm bölgelerde eksprese edilmediğini göstermektedir. Dolayısıyla TLR-2'nin PH'deki rolünün iki yönlü olabileceği düşünülmektedir (Rietdijk ve ark., 2016). Bu fonksiyonların altında yatan mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Caplan ve Maguire-Zeiss, 2018). Dolayısıyla, TLR-2 spesifik yollara etki eden ilaçların bulunması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması, PH'deki nörodejeneratif süreç hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlayacak ve bu sürecin blokajına dair farklı yaklaşımları gündeme getirecektir.

2.6. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri

Değişen başlangıç yaşı, semptomlar ve ilerleme hızına sahip heterojen bir hastalık olan PH'de, hastalığın farklı yönlerini incelemek için çeşitli hayvan modellerinin kullanılması gerekir (Konnova ve Swanberg, 2018).

PH'yi deney hayvanlarında modellemek için üç ana yaklaşım kullanılır: (i) nörotoksinler, (ii) genetik manipülasyonlar ve (iii) transkripsiyon faktörlerini hedef alan stratejiler (Konnova ve Swanberg, 2018). Nörotoksinler (6-OHDA, MPTP, rotenon, paraquat ve maneb), PH'de yer alan çevresel faktörlerden kaynaklanan dopaminerjik nörodejenerasyonu modelleyebilir (Blesa ve ark., 2016; Konnova ve Swanberg, 2018). Buna karşılık, genetik tabanlı modeller (α -sinüklein, PINK1, Parkin, DJ-1, LRRK2 ve UCH-L1) sadece değişken hücre kaybı ve motor semptomları göstermekle kalmaz, aynı zamanda spesifik modele bağlı olarak α -sinüklein patolojisini de sergileyebilir (Konnova ve Swanberg, 2018). Transkripsiyon faktörlerini hedef alan stratejiler ise dopaminerjik

nöronların gelişimi ve sağkalımı için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin eksikliğine dayanır.

Genetik modeller, insanlarda PH'ye neden olduğu bilinen potansiyel mekanizmalarla ilişkili belirlenmiş hedeflere dayalı olarak çalışırlar (Tieu, 2011), nörotoksinle indüklenen modeller ise neden olan nigrostriatal yolakta yaygın bir dejenerasyona neden olarak güçlü motor semptomlar oluşturur (Gubellini ve Kachidian, 2015). İdeal bir PH modeli hem dopaminerjik hem de dopaminerjik olmayan sistemleri kapsayan patolojik ve klinik özelliklerin yanı sıra ayrıca motor ve motor olmayan semptomları da göstermelidir (Tieu, 2011). Ancak, mevcut modellerin hiçbiri PH'yi tam olarak taklit edememekte ve hastalığa dair tüm patolojinin ve semptomların bir arada görülmesi mümkün olmamaktadır (Gubellini ve Kachidian, 2015). Bu nedenle, araştırmacılar, hipotezleri için en uygun ve en güçlü yönleri olan modeli seçmelidir. Günümüzde nörotoksin modelleri, kullanımı ve önceki çalışmalarla karşılaştırılması kolay olduğu için en sık kullanılan modellerdir (Kin ve ark., 2019) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Nörotoksin modellerin etki mekanizmaları, avantajları ve dezavantajları.

PH Modeli	Etki Mekanizması	Avantajları	Dezavantajları
6-OHDA	Mitokondriyal Kompleks I inhibisyonu ve Oksidatif Stres	• Tekrarlanabilir lezyon oluşumu • SNpc'de yaygın dopaminerjik nöron kaybı • Motor olmayan semptomlar	• Lewy cisimcikleri patolojisi ve progresif ilerleme gözlenmez • Direkt beyne enjeksiyon gerektirir
MPTP	Mitokondriyal Kompleks I inhibisyonu	• Tekrarlanabilir lezyon oluşumu • SNpc'de yaygın dopaminerjik nöron kaybı • Lewy cisimcikleri patolojisi • Motor olmayan semptomlar • Sistemik uygulama	• Sıçanlar dirençlidir • Farelerde ve insan olmayan primatlarda fonksiyonel iyileşme görülür

Tablo 2.1. (Devam) Nörotoksin modellerin etki mekanizmaları, avantajları ve dezavantajları.

Rotenon	Mitokondriyal Kompleks I inhibisyonu	• Tekrarlanabilir lezyon oluşumu • SNpc’de yaygın dopaminerjik nöron kaybı • Lewy cisimcikleri patolojisi • Sistemik uygulama • Motor olmayan semptomlar	• Yüksek mortalite • Dopaminerjik hasar değişkenlik gösterebildiği için tekrarlanabilirliği düşüktür
Paraquat ve maneb	Oksidatif stres	• SNpc’de güçlü dopaminerjik nöron kaybı • Lewy cisimcikleri patolojisi	• Düşük tekrarlanabilirlik • Dopaminerjik hücre ölümü, striatal dopamin kaybı ve davranış açısından değişken ve çelişkili sonuçlar

(Gubellini ve Kachidian, 2015; Blesa ve ark., 2016; Jagmag ve ark., 2016; Konnova ve Swanberg, 2018) kaynak alınarak düzenlenmiştir. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, MPTP: 1-metil-4-fenil1,2,3,6 tetrahidropiridin.

2.6.1. Rotenonla İndüklenen Parkinson Hastalığı Hayvan Modeli

Mitokondriyal kompleks I inhibisyonunun PH patogenezinde bir rolü olduğu bilinmektedir ve dopaminerjik nöronları yok eden nörotoksinler kompleks I’i de inhibe etmektedir (Schmidt ve Alam, 2006). Ancak, bu nörotoksinler arasında rotenon ayrı bir öneme sahiptir, çünkü MPTP ve 6-OHDA gibi nörotoksinler dopamin taşıyıcısı ile hücre içine alınıp selektif olarak dopaminerjik nöronları yok ederken yüksek oranda lipofilik olması nedeniyle rotenon, kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçer ve belirli bir taşıyıcıya bağlanmadan tüm hücrelere girebilir (Schmidt ve Alam, 2006; Tieu, 2011). Böylece PH’de yaygın nörodejenerasyondan sorumlu mekanizmaların aydınlatılmasını sağlayabilir (Schmidt ve Alam, 2006). 2000 yılında, farelerde kronik sistemik rotenon maruziyetinin, MPTP uygulamasının etkilerine benzer PH özelliklerini gösterdiği ilk kez Betarbet ve ark. tarafından bildirildi (Betarbet ve ark., 2000).

Rotenon, *Pachyrhizus erosus* ve *Derris* cinsinin bazı baklagil bitkilerinde doğal olarak buluna rotenoid nörotoksin ailesinden bir pestisid ve insektisittir (Gubellini ve Kachidian,

2015). Kan-beyin bariyerini kolayca geçen rotenon, nöronlara girdikten sonra mitokondriyal kompleks I'i bloke eder, reaktif oksijen türlerini artırır, proteazom aktivitesini inhibe eder ve dopamin ve glutatyon düzeylerini düşürerek oksidatif hasara neden olur (Gubellini ve Kachidian, 2015). Bu modelin, Lewy cisimciklerine benzeyen hücre içi inklüzyonların oluşumu da dahil olmak üzere PH'nin neredeyse tüm özelliklerini yeniden ürettiği gösterilmiştir (Jagmag ve ark., 2016). Hatta, rotenona maruziyetin, insan PH'sine benzer motor olmayan bozuklukları da indüklediği bilinmektedir (Zhang ve ark., 2017a). Olumlu özelliklerine rağmen, rotenon infüzyon modeli ile ilgili, özellikle hayvan duyarlılığındaki değişkenlik ve yüksek mortalite oranları nedeniyle endişeler bulunmaktadır (Tieu, 2011; Zhang ve ark., 2017a). Cannon ve ark. tarafından bu endişeleri gidermek için revize edilmiş bir rotenon modeli geliştirilmiştir (Cannon ve ark., 2009). Bu protokol ile orta zincirli yağ asidi taşıyıcısı kullanılarak yapılan günlük i.p. enjeksiyon ile rotenonun nigrostriatal yolda daha tutarlı bir lezyon ürettiği, bununla birlikte α -sinüklein ve ubikitin-pozitif inklüzyonlar ve motor bozukluklar meydana geldiği bildirilmiştir (Cannon ve ark., 2009). Karmaşık genetik manipülasyonları ve daha uzun yaşam ve nesil süreleri nedeniyle, sıçan modelleri patogeneze veya terapötik çalışmalar için daha uygunken, fare modelleri moleküler genetik araştırmada daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Xiong ve ark., 2012). Rotenon, subkutan, intravenöz ve intraperitoneal dahil olmak üzere çeşitli yollarla sıçanlara sistemik olarak uygulanmaktadır (Zhang ve ark., 2017b). Subkutan rotenon enjeksiyonu, kullanışlılığı ve basitliği nedeniyle PH modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır ancak doz seçimi konusunda farklılıklar bulunmaktadır (1.25–5 mg/kg/gün) (Zhang ve ark., 2017a). Zhang ve ark., sıçanlara günlük 2 mg/kg rotenon enjeksiyonunun, α -sinüklein oluşumunu kolaylaştırdığını ve PH'nin tipik özelliklerini indüklerken mortaliteyi düşük tuttuğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2017a).

2.7. Parkinson Hastalığının Tedavisi

PH, kişiselleştirilmiş terapötik yaklaşım gerektiren geniş bir motor ve motor olmayan bulgular spektrumuna sahip karmaşık bir nörodejeneratif bozukluktur (Jankovic ve Tan, 2020). PH tedavisinde birincil amaç, motor ve motor olmayan bulguları tedavi ederek hastanın yaşam kalitesini artırmaktır (DeMaagd ve Philip, 2015).

Dopaminerjik nörotransmisyonun artırılmasına yönelik ilaçlarla sadece palyatif tedavinin mümkün olması, PH’de nöroprotektif etkiye sahip potansiyel ilaç adayları ile ilgili çalışmaları kaçınılmaz kılmaktadır (Blandini, 2005).

2.7.1. Motor Semptomlar için Güncel Farmakolojik Tedavi Stratejileri

PH için yaygın olarak kullanılan ilaçlar, dopaminerjik aktiviteye sahip bileşikler (L-DOPA, dopamin agonistleri), endojen dopamin metabolizmasını inhibe eden bileşikler (COMT, MAO-B inhibitörleri) ve dopaminerjik olmayan ilaçlar (antikolinerjikler ve amantadin gibi)’dır (Jankovic, 2008) (Tablo 2.2). Her hasta semptomlarının ciddiyeti, yaşadıkları yan etkiler ve kişisel öncelikleri dikkate alınarak özel bir yaklaşımla tedavi edilmelidir (Şekil 2.13) (Zahoor ve ark., 2018).

L-DOPA, PH için en etkili farmakolojik ajandır ve semptomatik hastalar için altın standart tedavi olmaya devam etmektedir (Goetz ve ark., 2005). L-DOPA her zaman karbidopa ile kombine edilir, çünkü karbidopa, dopa dekarboksilazı bloke ederek L-DOPA’nın periferik olarak dopamine dönüşümünü önler (Miyasaki ve ark., 2002). Karbidopa, serebral L-DOPA biyoyararlanımını da artırmakta ve dopaminin mide bulantısı ve hipotansiyon gibi periferik yan etkilerini de azaltmaktadır (Miyasaki ve ark., 2002).

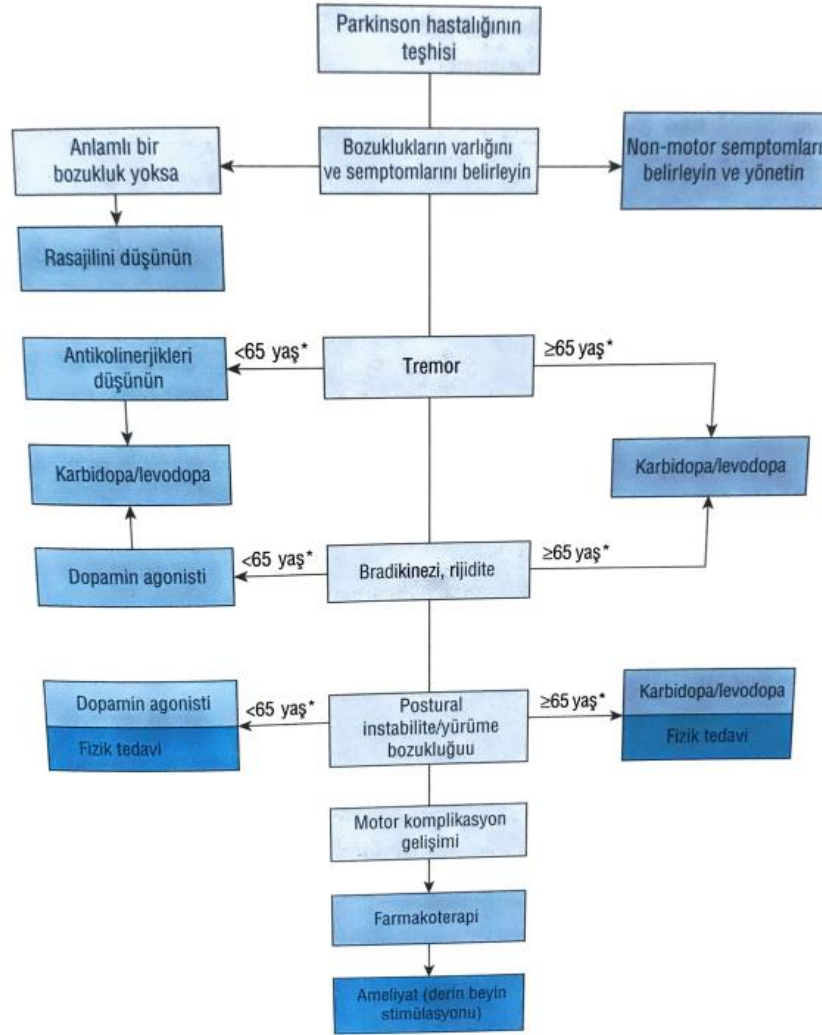
Dopamin reseptör agonistleri, PH tedavisinin erken safhalarında uygulandığında L-DOPA ile indüklenen motor dalgalanmalar ve diskineziler gibi ilişkili komplikasyonların ortaya çıkmasını geciktirir (Jankovic ve Tan, 2020). Dopamin agonistleri, motor semptomlar için monoterapi olarak veya semptomlar L-DOPA tarafından yeterince kontrol edilmediğinde veya motor dalgalanmalar mevcut olduğunda yardımcı tedavi olarak kullanılabilir (Jankovic ve Tan, 2020).

Monoamin oksidaz-B (MAO-B), dopaminin parçalanmasında rol oynayan ana enzimlerden biridir ve bu enzimin aktivitesini azaltan ilaçlar, striatum içinde endojen dopaminin aracılık ettiği dopaminerjik aktivitenin artmasına neden olur (Zahoor ve ark., 2018). Dopamin degradasyonunda rol oynayan diğer bir enzim olan katekol-O-metiltransferaz (COMT)’ı inhibe eden ilaçlar da yine dopaminin parçalanmasını azaltarak endojen dopamin seviyelerinin korunmasını sağlar (Zahoor ve ark., 2018).

Tablo 2.2. Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar.

PARKİNSON HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR		
İLAÇ SINIFI	İLAÇ	DOZ ARALIĞI
DOPAMİN PREKÜRSÖRÜ	KARBİDOPA/LEVODOPA	300-1000 mg
	KARBİDOPA/LEVODOPA (ER)	855-2205 mg
	LEVODOPA JEL (instestinal infüzyon)	600-1800 mg
	LEVODOPA İNHALASYON TOZU	48-84 mg
DOPAMİN AGONİSTİ	PRAMİPEKSOL	0.125-4.5 mg
	PRAMİPEKSOL (ER)	0.375-4.5 mg
	ROPİNİROL	0.25-12 mg
	ROPİNİROL (ER)	2-24 mg
	ROTİGOTİN (yama)	2-8 mg
	APOMORFİN (sublingual)	10-100 mg
	LİZURİD	0.2 – 3 mg
	PERGOLİD	0.5 – 6 mg
	BROMOKRİPTİN	10 – 50 mg
	PİRİBEDİL	50 – 250 mg
	ENTAKAPON	600-1600 mg
	TOLKAPON	300-600 mg
COMT İNHİBİTÖRÜ	OPİKAPON	50 mg
	RASAJİLİN	1 mg
	SELEJİLİN	5 mg
	SAFİNAMİD	50-100 mg
DİĞER	TRİHEKSİFENİDİL	2-8 mg
	AMANTADİN	100-300 mg
	AMANTADİN (ER)	68.5-274 mg
	BENZTROPİN	0.5-2 mg

(Muller, 2012; Jankovic ve Tan, 2020) kaynak alınarak hazırlanmıştır.



Şekil 2.13. Parkinson hastalığının tedavi algoritması. (Wells ve ark., 2019).

L-DOPA'nın keşfinden önce, muskarinik AChR antagonistleri PH'yi tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Goldenberg, 2008). Dopaminerjik nöronların kaybı, beyindeki dopamin ve asetilkolin arasındaki normal dengenin bozulmasına neden olur ve antikolinerjik ilaçlar bu iki nörotransmitter arasındaki normal dengenin restorasyonunu sağlayabilir (Zahoor ve ark., 2018). Günümüzde PH tedavisinde kullanılan antikolinerjik ilaçların (triheksifenidil ve benztropin gibi) orta düzeyde antiparkinson aktivitesi vardır (Goldenberg, 2008). Antikolinerjik ilaçlar genç hastalarda daha iyi tolere edilir ve bu alt grupta tremorun kontrolü için faydalıdır, ancak bilişsel bozukluk, konfüzyon, halüsinasyon, bulanık görme, ağız kuruluğu, kabızlık ve üriner retansiyon gibi çeşitli yan

etkilerle ilişkili olduğu için PH tedavisinde antikolinerjiklerin etkinliği sınırlıdır (Goldenberg, 2008; Jankovic ve Tan, 2020).

Antiviral bir ilaç olarak geliştirilen amantadinin, NMDA reseptör antagonisti olarak antiglutamaterjik etkisinin yanı sıra endojen dopamin salıverilmesini uyardığı, sinaptik aralıktan dopaminin geri alımını bloke ettiği ve antikolinerjik özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (Jankovic ve Tan, 2020).

2.7.2. Motor Olmayan Semptomlar için Güncel Farmakolojik Tedavi Stratejileri

PH'nin seyri, motor ve motor olmayan bulguların hastada ortaya çıkış şekli, terapötik müdahalelerin etkinliği ve hasta tarafından tolere edilebilirliği klinik uygulamada bir hastadan diğerine değişir. Dolayısıyla, hekim tarafından hasta ile yakın iş birliği içinde, tekrarlı kontroller ve uygun doz seçimi ile kişiye özgü bir tedavi rejimi gerekir (Muller, 2012). PH'deki yaygın ve sorun yaratan motor olmayan semptomların tedavisi dopaminerjik olmayan, farklı nörotransmitter sistemlerini hedef alan stratejileri kapsar (Poewe ve ark., 2017).

Parkinson Hastalığındaki Depresyonun Tedavisi

PH'deki depresyonun dopaminerjik, serotonerjik ve noradrenerjik sistemlerin de etkilendiği yaygın beyin sapı ve kortikal patolojisi, PH-olmayan hastalarda görülen depresyondan farklı olduğu için genel psikiyatride kullanılan tedavilerin PH'deki etkisi istenen düzeyde olmayabilir (Seppi ve ark., 2019). Depresyon dopaminerjik ilaçların etkisini yitirdiği ve semptomların yeniden ortaya çıktığı "off periyotlar"da gelişebilir, bu nedenle öncelikle dopaminerjik tedaviyi optimize etmek gerekir (Ryan ve ark., 2019). Antidepresan ilaç seçimi, ilacın depresyon üzerindeki etkinliğini, motor sistem üzerindeki uzun vadeli etkisini, eşlik eden PH ilaçlarıyla etkileşim potansiyelini ve diğer motor olmayan semptomlara göre spesifik ve spesifik olmayan ilaç yan etkilerini dikkate alarak yapılmalıdır (Muller, 2012). Her ne kadar PH'deki depresyonun tedavisi için antidepresan seçimi konusunda net bir fikir birliği olmasa da seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar), daha olumlu yan etki profilleri nedeniyle en yaygın olarak reçete edilen antidepresan grubudur (Frenklach, 2016; Starkstein ve Brockman, 2017). SSRI'ların yanı sıra, serotonin noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI'lar)'nin de tolerabilite açısından

hiçbir fark olmaksızın SSRI'lara benzer şekilde etkili olduğu düşünülmektedir (Connolly ve Fox, 2014). SNRI'lar da olumlu güvenlik profilleri, tolere edilebilirlikleri ve hem mental sağlık hem de ağrı gibi fiziksel durumlarda kullanımları nedeniyle depresif bozukluğun tedavisinde birinci basamak tedaviler olarak kabul edilebilir (Ryan ve ark., 2019). Trisiklik antidepresanlar, yan etki profillerinden dolayı ilk tercih edilen ilaç grubu olmasalar da antikolinergik özellikleri salya akması, aşırı aktif mesane ve insomnisi olan PH hastalarında yardımcı olabilir (Jankovic, 2008). Mezolimbik sistemdeki dopaminerjik nörotransmisyon disfonksiyonunun depresyon semptomlarına katkıda bulunabileceği gerçeği, PH'deki depresyonda dopamin agonistlerinin kullanımını desteklemektedir (Ryan ve ark., 2019). Pramipeksol ve pergolid gibi dopamin agonistlerinin antidepresan etkileri olabileceğine dair çalışmalar vardır (Connolly ve Fox, 2014; Seppi ve ark., 2019). Benzer şekilde, rasajilin ve selejilin gibi irreversibl MAO-B inhibitörlerinin de PH'deki depresyonda kullanımları araştırılmaktadır (Seppi ve ark., 2019).

Parkinson Hastalığındaki Bilişsel Disfonksiyonun Tedavisi

PH ile ilişkili bilişsel bozuklukların tedavisi, Alzheimer hastalığı ve diğer demansların tedavisi kadar zordur (Jankovic, 2008). Hastaların tedavisine yönelik genel yaklaşım, enfeksiyon, kabızlık, uyku bozukluğu, deliryum ve depresyon gibi bilişsel işlev bozukluğuna katkıda bulunabilme potansiyeli olan durumların dışlanmasıyla başlamalıdır (Cosgrove ve ark., 2015). PH'de reçete edilen antikolinergik ilaçlar ve dopamin agonistleri, bilişsel fonksiyonlar üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceği için, hastaya reçete edilen tüm ilaçlar gözden geçirilmelidir (Cosgrove ve ark., 2015). Son yıllardaki önemli ilerlemelere rağmen, PH'deki bilişsel bozukluğun mevcut farmakolojik tedavisi oldukça yetersizdir (Seppi ve ark., 2019). Yalnızca orijinal olarak Alzheimer hastalığında kullanılmak üzere tasarlanmış ilaçlar PH'deki bilişsel bozukluklar için ruhsat almıştır ve etkinlikleri istenen düzeyde değildir (Cosgrove ve Alty, 2018). Kolinesteraz inhibitörlerinin, MAO-B inhibitörlerinin ve SNRI'ların PH'deki bilişsel bozukluklarda kullanımıyla ilgili araştırmalar devam etmektedir (Connolly ve Fox, 2014; Seppi ve ark., 2019).

Kolinesteraz inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin ve NMDA reseptör antagonisti memantin ile yapılan açık etiketli küçük çalışmalar, her üç ilacın da genel

değerlendirmede bir etki gösterdiğini ancak yalnızca donepezil ve rivastigminin bilişsel işlevi, davranışsal semptomları ve günlük yaşam aktivitelerini önemli ölçüde iyileştirdiğini ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2015a). Her üç ilaç da güvenli sayılmasına rağmen rivastigminin advers olay geliştirme riski daha yüksek bulunmuştur ancak bu olaylar genellikle hafif veya orta şiddette olmuş ve ciddi advers olay riskinin olmadığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2015a). Her ne kadar klinik önemi değerlendirilmemiş olsa da seçici noradrenalin geri alım inhibitörü (NRI) atomoksetinin, pilot bir çalışmada, depresyonu olan PH hastalarında yürütücü disfonksiyonu ve global bilişsel performansı iyileştirdiği gösterilmiştir (Connolly ve Fox, 2014).

PH'deki bilişsel bozuklukları ve demansı tedavi etmeye yönelik mevcut farmakolojik yaklaşımın en önemli dezavantajı, semptomlar ortaya çıkıp da kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaya başlanana kadar hedeflenen nörotransmitter sistemlerindeki hasarın çoktan meydana gelmiş olmasıdır. Bu nedenle, demans geliştirme olasılığı en yüksek olan hastaların erken ve doğru tahmin edilmesi gelecekteki çalışmalar için büyük önem arz etmektedir (Cosgrove ve ark., 2015).

2.7.3. Hastalığı Modifiye Eden Tedavi Seçenekleri

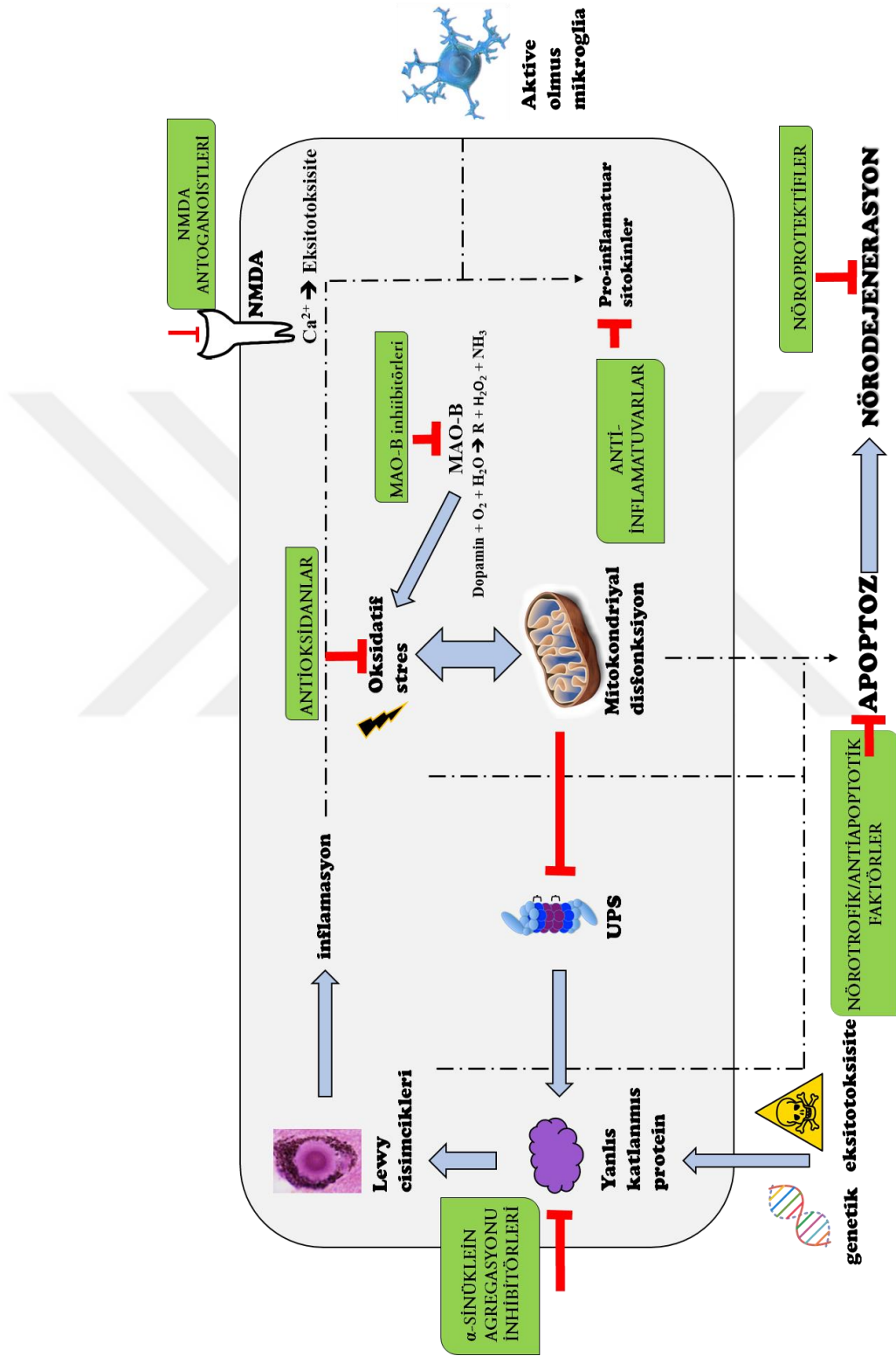
Klinik kullanıma gireli kırk yılı aşkın bir süre geçmiş olmasına rağmen, eksik olan dopamini yerine koyan L-DOPA, PH tedavisinde halen en etkili ve en yaygın reçete edilen ilaçtır (Blandini, 2005). Ancak uzun dönem L-DOPA kullanımının sebep olduğu motor komplikasyonlar (on-off dalgalanmalar, donakalım epizodları, doz sonu fenomeni, kontrol edilemeyen hareketler) ve dopaminerjik olmayan semptomlar hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir (Blandini, 2005; AlDakheel ve ark., 2014). PH için uygulanan tedaviler, ana olarak motor semptomların giderilmesini amaçlamakta, hastalığın patojenik mekanizmalarına etki etmemektedir (Blandini, 2005). PH için nöroprotektif veya hastalığı modifiye eden tedavi stratejileri geliştirmek için birçok potansiyel tedavi prelinik çalışmalarda başarı göstermesine rağmen, PH'de nöroprotektif olarak ruhsat almış bir ilaç bulunmamaktadır (Athauda ve Foltynie, 2015). PH'de, genetik mutasyonlar, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, eksitotoksisite, inflamasyon ve glial aktivasyon, trofik faktörlerin eksikliği, apoptoz, yanlış katlanmış α -sinüklein birikimi gibi farklı mekanizmaları içeren patogenezinin tam olarak anlaşılmaması, doğru hayvan

modellerinin ve doğrulanmış biyobelirteçlerin eksikliği ve klinik çalışma tasarımındaki sınırlamalar, etkili nöroprotektif tedavilerin geliştirilmesini engellemektedir (Athauda ve Foltynie, 2015; Park ve Stacy, 2015). Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicines Agency*, EMA), klinik olarak hastalığın ilerlemesini geciktiren ve altta yatan patofizyolojik süreç üzerinde bir etkisi olan ilaçları ‘‘nöroprotektif ‘‘ olarak tanımlamaktadır (Jankovic ve Poewe, 2012). Bugün, nöroprotektif ilaçlar sayesinde hastalığın ilerlemesinin önlenmesi veya yavaşlatılması (*hastalık modifikasyonu*), motor komplikasyonlar meydana gelmeden semptomların güçlü bir şekilde hafifletilmesi ve motor olmayan semptomların tedavi edilmesi amaçlanmaktadır (Charvin ve ark., 2018). Bu alanda, nörodejeneratif mekanizmalar üzerinde etkisi olan antioksidanlar, mitokondri güçlendiriciler, dopamin agonistleri, glutamat antagonistleri, nörotrofik faktörler ve antiinflamatuvar ilaçlar gibi farklı ilaç sınıflarındaki bileşikler dikkat çekmektedir (Şekil 2.14).

Antiinflamatuvar İlaçlar

Nöroinflamasyon, PH patogenezinde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. PH hayvan modellerinde ve PH hastalarının beyinlerinde BG’de ve frontal ve temporal kortikal bölgelerde artmış mikrogial aktivasyon tespit edilmiştir (Sherer ve ark., 2003a; Gerhard ve ark., 2006; Marinova-Mutafchieva ve ark., 2009). Ayrıca, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler PH hastalarının BOS’unda, serumlarında ve BG’de yüksek bulunmuştur (Mogi ve ark., 1996; Brodacki ve ark., 2008; Rocha ve ark., 2015). Nörotoksin enjeksiyonu ile indüklenen hastalık modellerinde de striatumda proinflamatuvar sitokinlerin artıp antiinflamatuvar sitokinlerin azaldığı gösterilmiştir (Lofrumento ve ark., 2011; Goes ve ark., 2018). İnflamatuvar yanıtları tetikleyen okside olmuş α -sinüklein formlarının PH hastalarının ve MPTP ile intoksike olmuş farelerin beyinlerinde oldukça yoğun bir şekilde bulunduğu gösterilmiştir (Reynolds ve ark., 2009).

Nöroinflamasyonun PH patogenezindeki rolü tam olarak aydınlatılamamış olsa da antiinflamatuvar ilaçların PH tedavisinde nöroprotektif amaçlı kullanılmaları gündemdedir (AlDakheel ve ark., 2014).



Şekil 2.14. Parkinson hastalığında nörodejenerasyon mekanizmalarını hedef alan hastalığı modifiye edici stratejilere yönelik ilaç hedefleri.

Aspirin, salisilik asit, ibuprofen ve selekoksib gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler)'in hem siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibisyonu (prostaglandin sentezinin inhibisyonu) ile hem de COX-2 inhibisyonundan bağımsız mekanizmalar (NFκB aktivasyonunun blokajı) aracılığıyla nöroprotektif etkiler oluşturduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (Mohanakumar ve ark., 2000; Sanchez-Pernaute ve ark., 2004; Di Matteo ve ark., 2006; Swiatkiewicz ve ark., 2013). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda da uzun süreli NSAİİ kullanımının PH riskini %21 oranında düşürdüğü bildirilmiştir (Wang ve ark., 2015b).

Kolesterol sentezini inhibe eden statinlerin aynı zamanda mikroglia tarafından üretilen TNF-α, nitrik oksit ve süperoksit oluşumunu azaltarak antiinflamatuvar etkiler gösterdiği, serbest radikalleri süpürdüğü bilinmektedir (AlDakheel ve ark., 2014). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda simvastatinin dopaminerjik nöronlar üzerindeki koruyucu etkileri olduğu ve bu etkilerin oksidatif stresin azaltılması, nöronal onarım ve rejenerasyonun indüklenmesi (Tan ve ark., 2016), α-sinüklein agregasyonunun azaltılması (Bar-On ve ark., 2008), dopamin reseptör ekspresyonunun artırılması (Wang ve ark., 2005), inflamatuvar sürecin inhibisyonu (Hernandez-Romero ve ark., 2008) ve NMDA reseptörü modülasyonu aracılı (Yan ve ark., 2014) olabileceği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, yakın zamanda yapılan bir meta-analizde, statin kullanımının PH riskini azalttığı bildirilmiştir (Bai ve ark., 2016).

Glukokortikoidlerin, mikroglia üzerinde eksprese edilen glukokortikoid reseptörü aracılığıyla, NFκB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenlediği (Wang ve ark., 2015b) ve sentetik bir steroid olan deksametazon uygulamasının dopaminerjik nöronlarda glial aktivasyonu azaltarak koruyucu bir etki gösterdiği *in vivo* modellerde gösterilmiştir (Scheinman ve ark., 1995; Kurkowska-Jastrzebska ve ark., 2004).

Antidepresanlar

Motor fonksiyonlarda daha ciddi bozulmalar, düşük yaşam kalitesi ve mortalitede artış riski nedeniyle PH hastalarının çoğu antidepresan tedavi almaktadır (Kandil ve ark., 2016). Literatürde, farklı etki mekanizmalarına sahip çok sayıda antidepresanın PH'deki motor belirtiler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (Kandil ve ark.,

2016; Sharma ve ark., 2016; Shadfar ve ark., 2018). Trisiklik antidepresanların antikolinergik etkileri ile tremorjenik aktiviteyi azalttıkları (Rehavi ve ark., 1977) ve sedatif etkileri ile de PH'de yaygın olarak karşılaşılan uyku problemlerini hafifletebilecekleri gösterilmiştir (Peña ve ark., 2018).

Rotenonla indüklenen PH hayvan modelinde yapılan çalışmalar, trisiklik antidepresanların bu yararlı etkilerinin monoamin ve nörotrofin seviyelerinin modülasyonunun yanı sıra antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklanabileceğini göstermiştir (Kandil ve ark., 2016). Venlafaksin ve sertralin gibi farklı gruplarda yer alan antidepresanların da nörotransmitter seviyelerini düzenleyerek PH benzeri semptomları azalttığı yine *in vivo* olarak rotenon modelinde gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2016). Ayrıca nöronal hayatta kalma, plastisite ve gelişme için gerekli olan nörotrofik faktörlerin upregülasyonunun, farklı gruplarda yer alan antidepresanların PH'deki yararlı etkilerinin altında yatan mekanizmalardan biri olduğu bildirilmiştir (Shadfar ve ark., 2018).

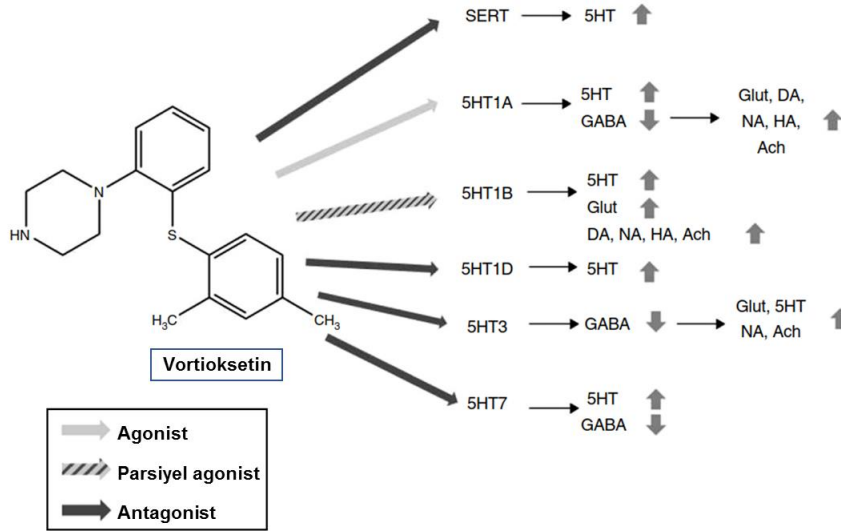
Depresyonun ve inflamasyonun birbirlerini etkiledikleri, aynı zamanda birbirlerinin gelişimine katkıda bulundukları için çift yönlü bir bağlantıya sahip oldukları bilinmektedir (Miller ve ark., 2009; Burke ve ark., 2015). Bazı antidepresanların NSAİİ'ler ile benzer kimyasal yapıya sahip olduklarının (Bayram ve ark., 2018) ve bazı NSAİİ'lerin de 5-HT aracılı antidepresan-benzeri etkilerinin olduğunu gösterilmesi (Sandrini ve ark., 2002; Hochstrasser ve ark., 2013) PH tedavisinde antiinflamatuvar ilaçların yararlı olabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca, monoterapi veya antidepresanlara ek olarak kullanılan antiinflamatuvar ilaçların plaseboya kıyasla daha iyi antidepresan etkinlik gösterdikleri klinik çalışmalar da bu hipotezi desteklemektedir (Kohler ve ark., 2016).

Vortioksetin

Vortioksetin, 5-HT reseptör aktivitesinin modülasyonunu SERT inhibisyonu ile birleştiren multimodal etki mekanizmasına sahip bir antidepresandır (Pehrson ve ark., 2018) (Şekil 2.15). Vortioksetin, 5-HT₃, 5-HT₇ ve 5-HT_{1D} reseptör antagonisti, 5-HT_{1B} reseptörü parsiyel agonisti ve 5-HT_{1A} reseptörü agonisti, aynı zamanda da SERT inhibitörüdür (Pehrson ve ark., 2018). Vortioksetin Ekim 2013'te FDA tarafından ve majör depresif bozukluğun (MDB) tedavisi için EMA tarafından onaylanmıştır (Sanchez ve ark.,

2015; Pehrson ve ark., 2018). Vortioksetin, ciddi depresif epizod tanısı konan erişkinlerde, afektif sferi iyileştirici potansiyeli ne olursa olsun, bilişsel işlevi etkin bir şekilde artıran ilk ilaçtır (Dziwota ve Olajosy, 2016).

Vortioksetinin bağımsız prokognitif özelliklerini doğrulamak için çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; randomize, çift-kör, plasebo kontrollü bir klinik çalışmada (NCT01422213) vortioksetinin (10 veya 20 mg/kg) tekrarlayan MDB'si olan yetişkinlerde bilişsel işlevlerin öznel ve nesnel ölçülerinde iyileşme meydana getirdiği ve bu etkilerin depresif belirtilerin iyileştirilmesindeki etkisinden büyük ölçüde bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır (McIntyre ve ark., 2014). Çok merkezli, randomize, çift-kör, plasebo kontrollü, aktif referanslı (duloksetin 60 mg) bir paralel grup çalışmasında, bilişsel işlev bozukluğu bildiren MDB'si olan erişkinlerde (18-65 yaş), vortioksetinin (10-20 mg/kg) bilişsel fonksiyonlara kısa süreli etkisi ve güvenliliği değerlendirilmiş ve vortioksetinin, bilişsel fonksiyon, depresyon ve işlevsellikte önemli ölçüde iyileşme meydana getirdiği ve genellikle iyi tolere edilebilir olduğu gösterilmiştir (Mahableshwarkar ve ark., 2015).



Şekil 2.15. Vortioksetinin kimyasal yapısı ve etki mekanizmaları. Şekil, (Salagre ve ark., 2018)'den alınarak Türkçeleştirilmiştir.

18-65 yaş arasında MDB tanısı konmuş 602 hasta ile yapılan çift-kör, randomize, ayarlanmış dozlu (*fixed-dose*), plasebo kontrollü 8 haftalık bir başka çalışmada, vortioksetinin (10-20 mg/kg) bilişsel performans üzerinde yürütücü fonksiyon, dikkat/işlem hızı ve bellek fonksiyonlarında meydana gelen iyileşmelerle ölçülen çok alanlı yarara sahip olduğu bildirilmiştir (Harrison ve ark., 2016). Yakın zamanda MDB hastalarında (n=152) yapılan randomize, çift-kör, plasebo kontrollü bir çalışmada da vortioksetin (10mg / gün)'in, paroksetin (20 mg/gün) ve plaseboyla karşılaştırıldığında bilişsel performansı ve işlevselliği önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (Baune ve ark., 2018). MDB'de, mevcut antidepresanlara yetersiz yanıt veren hastalarla essitaloprama karşı yapılan başka bir randomize, çift-kör keşif çalışmasında ise vortioksetin (10-20 mg/gün) etkin ve iyi tolere edilir bir antidepresan değişim tedavisi olarak bulunmuştur (Vieta ve ark., 2018). Prospektif, randomize, 12 ay süreli, paralel-gruplu bir çalışmada, vortioksetin (15 mg/gün) alan grup, depresyonu olan Alzheimer hastalarına kıyasla bilişsel testlerde daha iyi sonuçlar elde etmiştir (Cumbo ve ark., 2019).

Vortioksetin ile yapılan hayvan çalışmaları da vortioksetinin 5-HT reseptörleri üzerindeki direkt etkileriyle veya farklı nörotransmitter sistemlerinin üzerindeki modülatör etkileriyle farklı hayvan modellerinde öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerinde yararlı etkileri olduğunu göstermektedir (Wallace ve ark., 2014; Westrich ve ark., 2015; Pehrson ve ark., 2016; Smagin ve ark., 2016; Torrisi ve ark., 2019). Dale ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada, vortioksetinin sıçan hipokampusunda piramidal hücre fonksiyonunu dissinhibe ettiği ve sinaptik plastisiteyi artırdığı gösterilmiş ve vortioksetinin bilişsel fonksiyonları iyileştirdiğini gösteren klinik veya prelinik çalışmalara hücresel temel sağlanmıştır (Dale ve ark., 2014). Pehrson ve ark., akut vortioksetinin, sıçanlarda sosyal bellekte ve nesne tanıma belleğinde skopolamin ile indüklenen bozuklukların tersine döndüğünü, ancak dikkat ile ilişkili bozuklukların değişmediğini göstermiştir. Akut vortioksetin ayrıca hipokampal asetilkolin düzeylerinde orta ve kısa süreli bir artışa neden olmuştur, ancak bu kısa vadeli etki, vortioksetinin beyindeki kısmen uzun yarılanma ömrü (5,1 saat) ile değişiklik gösterebilir (Pehrson ve ark., 2016). İlginç bir şekilde, subkronik vortioksetin tedavisinin skopolamine bağlı sosyal tanıma belleği bozukluklarını tersine çevirememiş ve bazal hipokampal asetilkolin seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Bu veriler, vortioksetin, bellek üzerinde kolinerjik nörotransmisyon aracılı bazı etkilere

sahip olduğunu göstermektedir, ancak bu etkiler orta derecelidir ve sadece akut dozlama koşulları altında görülmektedir (Pehrson ve ark., 2016).

Smagin ve ark., vortioksetinin akut ve kronik uygulanmasının, sıçan PFK'sinden ve ventral hipokampustan toplanan mikrodializatlardaki histamin konsantrasyonlarında değişikliklere neden olduğunu ileri sürmüştür (Smagin ve ark., 2016). Vortioksetinin, oreksijenik sisteminin aktivasyonu yoluyla, trombositamerik çekirdeği uyardığını ve histaminerjik nörotransmisyonu artırdığını ve bu durumun, vortioksetinin bilişsel fonksiyon üzerindeki olumlu etkilerine katkıda bulunduğunu savunmuşlardır (Smagin ve ark., 2016). Pehrson ve ark. başka bir çalışmada, vortioksetinin GABA nörotransmisyonunu baskılayıp glutamaterjik aktivasyonu artırdığı yönündeki hipotezi test etmek için GABAerjik ve glutamaterjik transmisyonu da değiştiren subkronik fensiklidin modelinde akut veya subkronik vortioksetin uygulamasının fensiklidin ile indüklenen bilişsel bozuklukları azalttığını ve selektif 5HT₃ antagonisti ondansetron veya 5HT geri alım inhibitörü essitalopramın bu etkiyi taklit edebildiğini göstermiştir (Pehrson ve ark., 2018). Dolayısıyla vortioksetinin bilişsel fonksiyonlar ile ilişkisinde GABAerjik ve glutamaterjik etkilerin de olabileceği gündemdedir.

Vortioksetinin yapısal olarak NSAİİ ilaçlarla benzerlik göstermesi, vortioksetinin antiinflamatuvar etkisinin olabileceğini gündeme getirmiştir (Bayram ve ark., 2018). İnsan monosit/makrofajları üzerinde yapılan bir çalışmada, vortioksetinin makrofajların alternatif fenotiplerine (M2) doğru polarizasyonunu sağlayan antioksidan aktiviteye ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Talmon ve ark., 2018). Ayrıca antiinflamatuvar bir ilaç olan selekoksib ile vortioksetin kombinasyonunun antidepresan etkiyi artırdığı gösterilmiş ve sekonder analizlerde vortioksetinin olası immünomodülatör etkilerinin araştırılmasının yeni bir yaklaşım olabileceği ileri sürülmüştür (Fourrier ve ark., 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

3.1.1. Deneyisel Tedaviler

Deney hayvanlarında PH'yi indüklemek için ve hastalığın motor ve motor olmayan semptomlarını tedavi edebilmek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler ile dokuların diseksiyonu sırasında gerekli maddelere ilişkin detaylar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. *İn vivo* tedavilerde ve dokuların diseksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal İsmi	Marka, Katalog Numarası
Rotenon	Sigma-Aldrich, R8875
Ayçiçek Yağı	Yudum Gıda, İstanbul
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, 276855
2-Hidroksipropil- β -siklodekstrin	Sigma-Aldrich, H107
Vortiksetin	Lundbeck, Kopenhag, Danimarka
Dietil eter	Tekkim, TK.150130.01000
Formaldehit (%10)	Sigma-Aldrich, 11-0735
Tinzaparin sodyum	Abdi İbrahim, 8699514950035*
Serum fizyolojik	Koçak Farma, 8699828691693*

* Tıbbi müstahzarlar için barkod numarası paylaşılmıştır.

3.1.2. Davranış Testleri

Sükroz tercihi testi sırasında sükroz %1 ağırlık/hacim olacak şekilde kullanıldı. Deneyler arasında sıçanların koku duyusuna göre hareketlerini engellemek için %70'lik etanol kullanılarak davranış deneyleri sırasında kullanılan cihazlar temizlendi. Davranış testleri gerçekleştirilirken kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Davranış deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal İsmi	Marka, Katalog Numarası
Sükroz ($\geq$ %99.5)	Sigma-Aldrich, SLBR6029V
Etanol (%70)	Isolab, 920.026.2500

3.1.3. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler sırasında dokuların hazırlanması sırasında kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.3'te, boyamalar sırasında kullanılan antikorlar ve kimyasal reaktifler Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Dokuların immünohistokimyasal analizler için hazırlanması sırasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal İsmi	Marka, Katalog Numarası
Etanol (Absolute)	Isolab, 920.026.2500
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi	Sigma, P3813
Di-sodyum hidrojen fosfat	Isolab, 969.086.1000
Hidrojen peroksit 35% Emprove	Isolab, 932.122.2500
Sodyum klorür	Isolab, 969.033.1000
Mayer's hematoxylin	Atom Scientific, RRSP60-E
UltraVision polyvalent	Thermo Scientific, TP-060-HL
Ksilen	Isolab, 990.019.2501
Parafin boncuk	Moslab, BKBP00001
Entellan	Merck, M107961.0500
Sitrik asit monohidrat	Isolab, 910.046.1000
Di-hidrojen potasyum fosfat	Isolab, 960.066.100

Tablo 3.4. Boyamalar sırasında kullanılan antikorlar ve kimyasal reaktifler.

Kimyasal İsmi	Marka, Katalog Numarası
Anti-tirozin hidroksilaz antikor	Abcam, ab112
Biyotinli anti-rabbit IgG antikor	Vectorlab, BA-1000
<i>Cleaved</i> kaspaz 3 antikor	Cellsignaling, 9661
Anti- α -sinüklein antikor	Cellsignaling, 4179S
Anti-TLR2 antikor	Abcam, ab213676
Anti- α -sinüklein (fosfo S129) antikor	Abcam, ab51253
HRP ile işaretli streptavidin molekülü içeren enzim solüsyonu (SensiTek HRP)	Scy Tek, ABG125
3,3'-Diaminobenzidine (DAB) tablet	Sigma Fast, D9167
Üre hidrojen peroksit tablet	Sigma Fast, U5005

3.1.4. Biyokimyasal Analizler

Sıvı kromatografi/kütle spektrometresi (LC/MSMS) ile nörotransmitter tayini sırasında kullanılan reaktifler Tablo 3.5'te, enzim bağlı immunosorbent testleri (ELISA) sırasında kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. LC/MSMS reaktifleri.

Kimyasal İsmi	Marka, Katalog Numarası
Serotonin	Sigma-Aldrich, 14927
Noradrenalin	Sigma-Aldrich, A7257
Dopamin HCl	Sigma-Aldrich, H8502
Glutamik asit	Sigma-Aldrich, G1251
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, G3126
HPLC grade metanol	Sigma-Aldrich, 34860
HPLC grade su	Sigma-Aldrich, 270733
Asetonitril	Merck, M100030
Formik asit	Merck, 1.00264.1000

Tablo 3.6. ELISA analizleri sırasında kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler.

Kimyasal İsmi	Marka, Katalog Numarası
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich, P9541
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, 10812846001
Sodyum klorür	Merck, M106404.1000
Albumin standard	Thermo Scientific, 23209
Coomasie Plus TM (Bradford)	Thermo Scientific, 1856210
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi	Sigma-Aldrich, P4417-100TAB
Sıçan IL-6 ELISA Kiti	Elabscience, E-EL-R0015
Sıçan IL-1 β ELISA Kiti	Elabscience, E-EL-R0012
Sıçan TNF- α ELISA Kiti	Elabscience, E-EL-R0019
Rat NF κ B p65 ELISA Kiti	Elabscience, E-EL-R0674

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Marka, Ülke
Hayvan Tartım Terazisi	Techfit, Türkiye
Hassas Terazi (AX-200)	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya
Ultrasonik banyo (Sonorex)	Bandelin, Berlin, Almanya
Dikey tel aparatı	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı
Rotarod cihazı	Ugo Basile, Varese, İtalya
Açık alan aparatı	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı
Yükseltilmiş artı labirent	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı
Morris’in su tankı	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

Tablo 3.7. (Devam) Çalışmada kullanılan cihazlar.

Yeni obje tanıma alanları	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı
Video takip sistemi	Ethovision XT, Noldus, Hollanda
Mikrotom	Leica, Almanya
Mikroskop (Zeiss-Axioplan)	Zeiss, Oberkochen, Almanya
Işık mikroskobu (Olympus CX41)	Olympus, Tokyo, Japonya
Mikrosantrifüj (Mikro 200R)	Hettich®, Tuttlingen, Almanya
Sonikatör (Sonopuls HD2070)	Bandelin, Almanya
Vortex cihazı	IKA, Staufen, Almanya
Doku homojenizatörü (Miccra D-1)	Miccra, Almanya
Laboratuvar tipi derin dondurucu (-86 °C)	Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri
Triple quadrupole kütle spektrometresi (LCMS-8040)	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya
UFLC sistemi (LC-20 AD UFLC XR)	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya
ODS-4 Kolon	GL Sciences, Tokyo, Japonya

3.3. Deney Hayvanları

250-300 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsüne ayarlanmış 22 ± 1 °C sıcaklığındaki iyi havalandırılan odalarda barındırılan hayvanlar deneylerden birkaç gün önce deney yapılacak laboratuvara alınarak deney ortamına alışmaları sağlandı. Beslenmeleri amacıyla standart yem pelletleri ve çeşme suyu verildi. Hayvan deneyleri için Akdeniz Üniversitesi Yerel Etik Komitesi (Karar No:104) tarafından Etik Kurulu Onayı alınmıştır.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları

Bu çalışma kapsamında, insanlardaki PH'nin nöropatolojik özelliklerini taklit edebilmek için PH hayvan modellerinde sıklıkla kullanılan bir pestisid, aynı zamanda iyi bir nörotoksin olan rotenon kullanılarak PH'nin motor ve motor olmayan belirtilerinin indüklenmesi ve kronik bir inflamasyon durumunun tetiklenmesi sağlandı.

Sıçanlar rastgele olarak dağıtılarak Tablo 3.8’de yer alan *in vivo* çalışma grupları oluşturuldu:

Tablo 3.8. *In vivo* deneyler için belirlenen deney grupları ve uygulanan tedaviler.

Deney Grupları	İlaç/Toksin Uygulamaları
Kontrol	Ayçiçek yağı (s.c.) içinde dimetil sülfoksit (DMSO) ve %10 β -hidroksipropil siklodekstrin, (s.c.)
Rotenon	2 mg/kg (s.c.)
Vortioksetin	10 mg/kg (s.c.)
Rotenon+Vortioksetin	2 mg/kg (s.c.) ve 10 mg/kg (s.c.)

%10 β -hidroksipropil siklodekstrin, vortioksetinin çözücüsü olarak kullanıldı (Mork ve ark., 2012). Rotenon ise ilk olarak 1:50 dimetil sülfoksit:ayçiçek yağı stok çözeltisinde içinde çözülüp dozu 2 mg/kg olacak şekilde ayçiçek yağında seyreltildi (Ojha ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2017b). Rotenon dozunun 2 mg/kg seçilmesi ile rotenon uygulamasının kısıtlamalarından olan anlamlı kilo kaybı ve sistemik toksisite sonucu görülen yüksek mortalite oranlarının önüne geçilmiş oldu. Rotenon uygulaması ile birlikte vortioksetin (10 mg/kg, s.c.,) uygulaması aynı anda başladı ve 28 gün boyunca devam etti. 15. günde antidepresan-benzeri etkilerin tespiti için sükröz tercihi testi, 21. günde motor fonksiyonların değerlendirilmesi için katatoni ve ratorod testleri ile lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için açık alan testi, 22. günde anksiyete davranışlarının değerlendirilmesi için yükseltilmiş artı labirent testi ile uzaysal hafızayı değerlendiren 24 saatlik yeni obje tanıma testi ve 28. günde de yine uzaysal hafıza fonksiyonlarını değerlendiren Morris’in su tankı (MWM) testi yapıldı. Beyin dokularında biyokimyasal ve immünohistokimyasal analiz yapılacak olan hayvanlar MWM testini tamamlandıktan hemen sonra sakrifiye edilerek beyin dokuları alındı (Şekil 3.1).



EPM: Elevated Plus Maze (Yükseltilmiş Artı Labirent Testi)
MWM: Morris Water Maze (Morris'in Su Tankı)
NOR: Novel Object Recognition (Yeni Objeye Tanıma Testi)
STT: Sükroz Tercihi Testi

Şekil 3.1. Deney protokolü.

İmmünohistokimyasal analizler (n=5) için tüm beyin dokuları çıkarılarak formaldehid çözeltisinde saklandı. Nörotransmitter seviyelerinin LC/MSMS ile ve sitokin ve NF κ B-p65 düzeylerinin ELISA ile belirlenmesi için striatum, PFK ve hipokampus dokuları (n=10) çıkarılarak -80 °C’de muhafaza edildi.

3.5. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri her gün 10.00-16.00 saatleri arasında gerçekleştirildi. Hayvanlarda stres oluşumunu önlemek için hiçbir test ardışık olarak gerçekleştirilmedi ve testlerden 30 dakika önce hayvanlar deneylerin yapılacağı ortama alınarak çevreye alışmaları sağlandı, böylece anksiyetenin ve korkunun olası etkileri minimize edildi. Hayvanların sağlık durumlarını değerlendirmek için vücut ağırlıkları her hafta düzenli olarak kaydedildi ve hayvanlar motor veya motor olmayan bozukluk belirtisi açısından çalışma boyunca takip edildi. Beklenmedik bir belirtisi olan (enfeksiyon gibi) sıçanlar ve hipokinezi veya rijidite gösteren çok zayıf motor kabiliyete sahip sıçanlar deneylere dahil edilmedi.

Motor fonksiyonları değerlendirmek için katatoni ve rotarod testleri, lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için açık alan testi, öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değerlendirmek için yeni obje tanıma ve MWM testleri, anksiyete-benzeri davranışları değerlendirmek için yükseltilmiş artı labirent testi ve anhedoni davranışının değerlendirilmesi için sükroz tercihi testi yapıldı.

3.5.1. Rotarod Testi

Rotarod testi sıçanların motor performans ve koordinasyonunu tespit etmek için kullanıldı (Şekil 3.2). Deneye alınacak hayvanlar 3 ardışık gün boyunca rotarod aletine (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy) alıştıdırıldı. Bu süre zarfında, sıçanlar, maksimum 2 dakika boyunca 12 rpm sabit hızında dönen bir çubuğun üzerinde yürümek üzere eğitildi (Abada ve ark., 2013). Test gününde, deneylere başlamadan 30 dakika önce, hayvanlar laboratuvara alınarak çevreye adapte olmaları sağlandı. Rotarod cihazı üzerindeki bireysel bölmelerine alınan hayvanlar, 5 dakikalık bir süre zarfında 4 ile 40 rpm arasında düzgün bir şekilde hızlanarak dönen çubuğun (7,3 cm çapta) tersi yönünde yerleştirildikten sonra çubuk üzerinde kalma süreleri otomatik olarak kaydedildi (Monville ve ark., 2006). Kayıt alma süresi 300s olarak belirlendi ve 5 dakikalık dinlenme periyotları uygulanarak ardışık 3 ölçüm yapıldı ve her denemeden sonra cihaz %70'lik etanol çözeltisi ile silinerek kurutuldu (Abada ve ark., 2013).

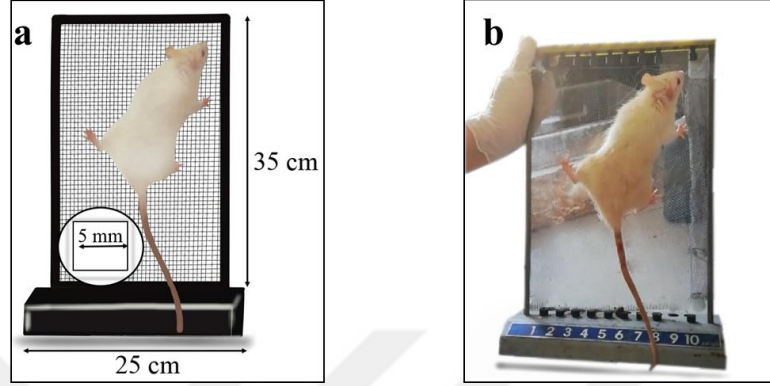


Şekil 3.2. Rotarod cihazı (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy).

3.5.2. Katatoni Testi

Hayvanlarda “donup kalma” olarak tanımlanan bir postür bozukluğu olan katatoni davranışının analizi için sık kullanılan, basit ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan “vertical wire” (dikey tel) testi uygulandı (Bülbül ve ark., 2019). Bunun için hayvanlar yavaş bir şekilde 25x35 cm boyutlarında dikey (5 mm aralıklı) bir tel ızgara üzerine yerleştirildi (Şekil 3.3). Hayvanların ızgara üzerinde tamamen hareketsiz kaldığı süre

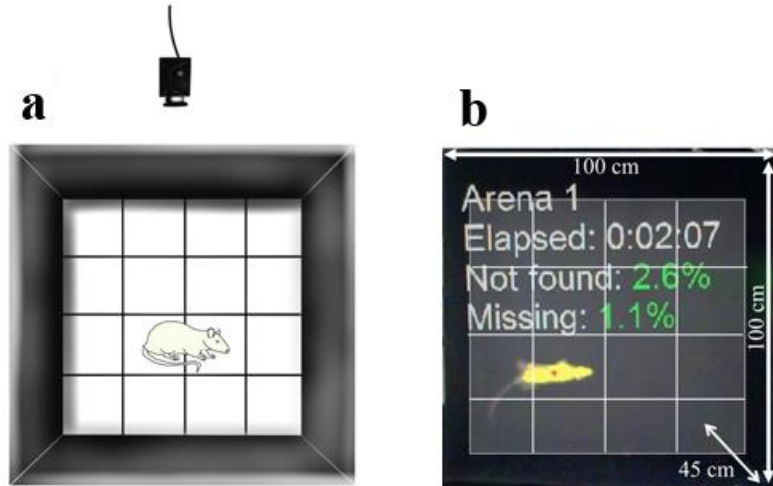
kronometre yardımı ile ölçülerek kaydedildi. Kataleptik davranışın şiddeti, 2 dakikalık bir gözlem süresi içinde hareketsiz geçen en uzun zaman dilimi ölçülerek değerlendirildi.



Şekil 3.3. Dikey tel testi. (a) Şematize hali ve (b) Deneylerde kullanılan dikey tel aparatı.

3.5.3. Açık Alan (Open Field) Testi

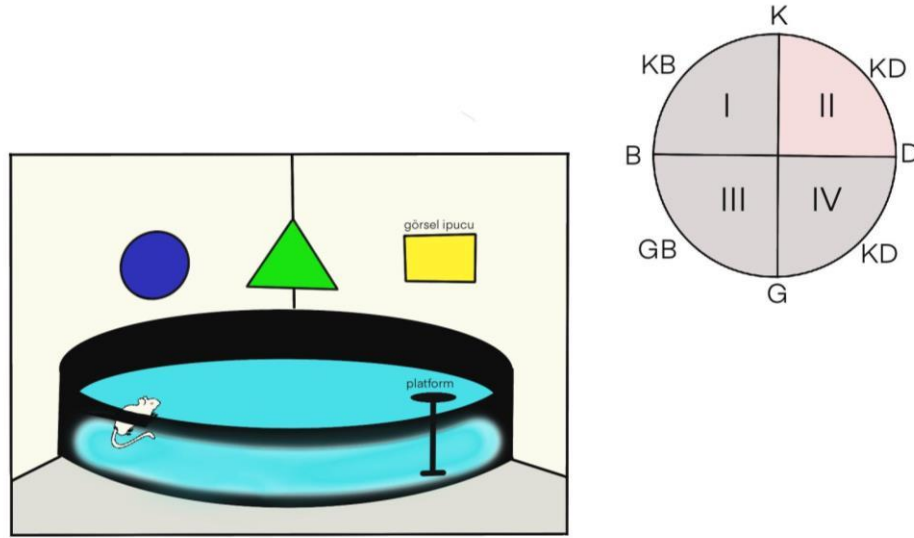
Açık alan deneyleri duvar yüksekliği 45 cm olan, tabanı 100x100 cm ebatlarında kare şeklinde siyah mat tabanlı bir düzenekte yapıldı (Şekil 3.4). Alan, birbirine eşit 16 küçük kareye bölündü. Deneyin başlangıcında sıçanlar tek tek bu alanın merkezine bırakıldı ve 5 dakika boyunca hareketleri Noldus Ethovision XT System (the Netherlands) kullanılarak kaydedildi. Her sıçan için girdiği kare sayısı, katettiği toplam mesafe, ortalama hız ve dış/iç kadranda geçirilen süreler ölçüldü (Basaranlar ve ark., 2019).



Şekil 3.4. Açık alan testi. (a) Şematize hali (üstten bakış) ve (b) Deneyler sırasında kullanılan açık alan aparatının Noldus Ethovision XT sistemi ile kayıt yapılırken alınmış görüntüsü ve cihazın boyutları (100x100x45 cm).

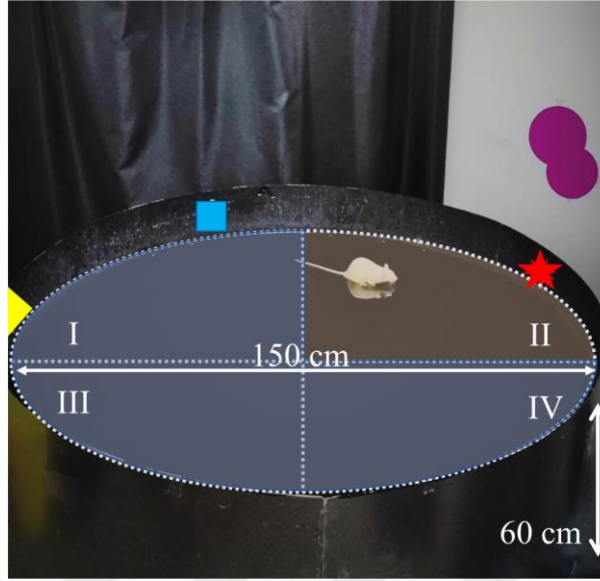
3.5.4. Morris'in Su Tankı (Morris Water Maze) Testi

MWM, çapı 150 cm, yüksekliği 60 cm olan daire şeklindeki su dolu öğrenme tankında yapıldı (Şekil 3.5 ve 3.6). Tank 4 kadrana bölündü ve kuzey-doğu kadrana platform yerleştirildi. Sıçanların her gün 120 saniye tankta yüzmelerine izin verildi. Bu süre içinde platformu bulan hayvanların 15 sn süreyle platform üzerinde kalarak uzaysal ipuçlarını keşfetmelerine izin verildi. 120 sn içinde platformu bulamayan sıçanlar yavaşça platforma yönlendirildi ve 15 sn platformun üzerinde durmaları sağlandı. 5 gün süreyle 5 dakika aralıklarla, farklı başlangıç pozisyonları belirlenerek günde 4 deneme uygulandı ve 6. gün platform kaldırıldı (Tablo 3.9). 6. gün, deney süresince öğrenmenin gerçekleşip gerçekleşmediği platformsuz su tankında yapılan 30 saniyelik yüzdürme denemesi (*probe*) ile değerlendirildi. Bu sırada sıçanların daha önce platform bulunan kadranda geçirdikleri süre, tankta kat ettikleri yol ve yüzmeye hızları Noldus Ethovision XT System (the Netherlands) kullanılarak kaydedildi (Vorhees ve Williams, 2006).



Şekil 3.5. Morris'in su tankı testinin şematize hali.

B: Batı, D: Doğu, G: Güney, GB: Güney-batı, GD: Güney-doğu, K: Kuzey, KB: Kuzey-batı, KD: Kuzey-doğu.



Şekil 3.6. Deneylerde kullanılan Morris'in su tankı. Çap: 150 cm, yükseklik 60 cm. Noldus Ethovision XT sisteminde 4 eşit kadrana bölünmüş ve kuzey doğu kadrana (II numaralı alan) yerleştirilmiş platform üzerine çıkmış sıçan ile birlikte şematize gösterimi.

Tablo 3.9. Morris'in su tankı testinde deneme periyotlarında ve test periyodunda kullanılan başlangıç pozisyonları.

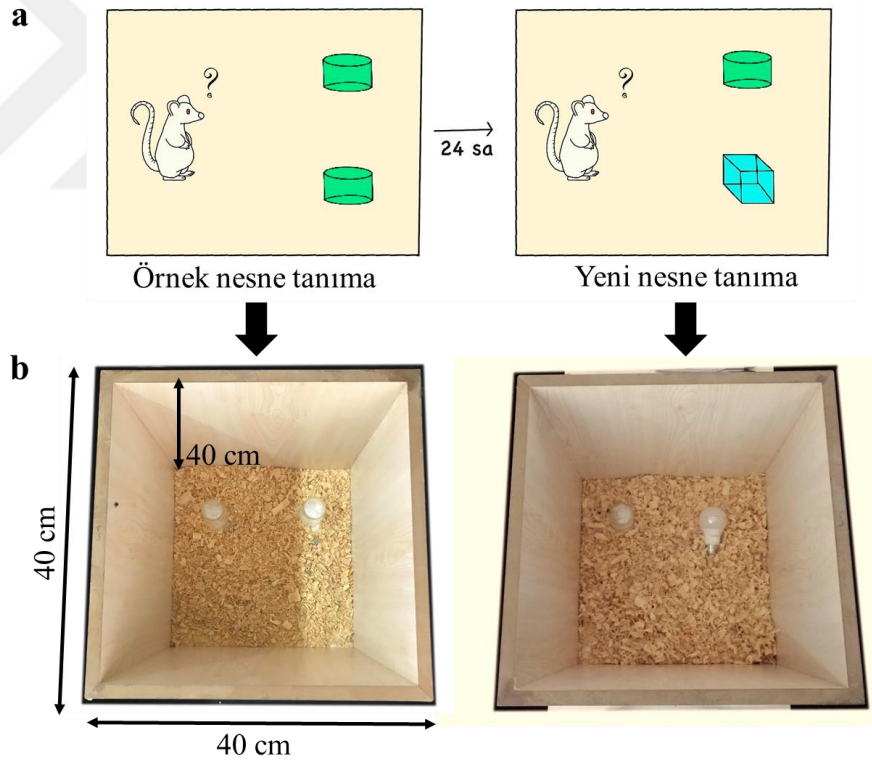
Günler	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme	4. Deneme
1. Gün	K	D	GD	KB
2. Gün	GD	K	KB	D
3. Gün	KB	GD	G	K
4. Gün	D	KB	K	GD
5. Gün	K	GD	D	KB
Test Günü	GB			

B: Batı, D: Doğu, G: Güney, GB: Güney-batı, GD: Güney-doğu, K: Kuzey, KB: Kuzey-batı. KD: Kuzey-doğu.

3.5.5. Yeni Obje Tanıma Testi

Yeni obje tanıma testi özellikle dikkat, kısa ve uzun süreli bellek çalışmalarında kullanılmakta ve üç aşamadan oluşmaktadır: Alıştırma (*habituation*), tanıma (*familiarization*) ve hatırlama (*test period*) (Antunes ve Biala, 2012). Alıştırma aşamasında sıçanlar 40 cm yüksekliğinde, 40x40 cm ebatlarında ki ortamın merkezine konuldu ve ortamda herhangi bir obje yokken 5 dakika süreyle ortamı keşfetmelerine izin

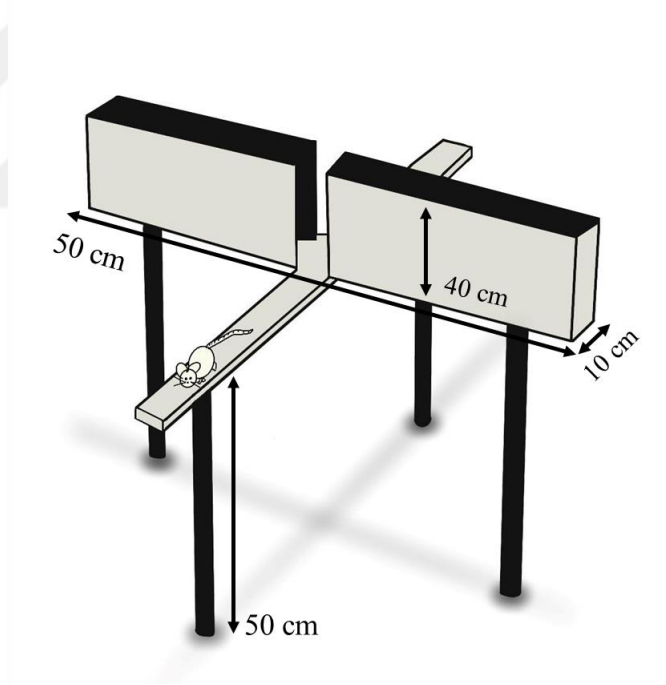
verildi. Eğitim aşamasında, sıçanlar merkezden alana bırakıldı ve ortama konan iki objeyi incelemesi için 5 dakika verildi. Bu süre boyunca her bir objeyi incelemek için harcanan zaman kaydedildi (Şekil 3.7) (Bevins ve Besheer, 2006). Deneyler arasında sıçanların koku duyusuna göre hareketlerini engellemek için düzenek %70'lik etanol ile temizlendi. Hatırlama aşamasında ise objelerden biri yeni obje ile değiştirildi ve 5 dakika boyunca her bir objeyi incelemek için harcanan zaman Noldus Ethovision XT System (the Netherlands) kullanılarak kaydedildi. Ayırıcılık indeksi şu formül kullanılarak hesaplandı; (yeni objede geçirilen süre- eski objede geçirilen süre)/(yeni objede geçirilen süre + eski objede geçirilen süre) (Antunes ve Biala, 2012). Ayırıcılık indeksinin yanı sıra, yeni objede geçirilen sürenin yüzdesi, yeni objeye temas yüzdesi ve toplam keşif süreleri hesaplanarak gruplar arasında kıyaslamalar yapıldı.



Şekil 3.7. Yeni obje tanıma testi. (a) Şematize hali ve (b) Deneylerde kullanılan yeni obje testi aparatı (40x40x40) ile objeler.

3.5.6. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Anksiyete-benzeri davranışların analizinde kullanılan yükseltilmiş artı labirent testi için, kol genişliği 10 cm, kol uzunluğu 50 cm, duvar yüksekliği 40 cm, yerden yüksekliği ise 50 cm olan artı şeklinde, iki kolun duvarlarla çevrili, diğer iki kolun ise çevresinin tamamen açık olduğu siyah mat zeminli bir düzenek kullanıldı (Şekil 3.8) (Contreras ve ark., 2014). Her hayvan kolların çakışma noktası olan merkeze bırakıldı ve 5 dakika boyunca açık ve kapalı kollarda geçirilen zamanlar kaydedildi. Tüm gruplar için açık ve kapalı kollarda geçirilen sürelerin yüzdesi, açık ve kapalı kollara giriş frekanslarının yüzdesi ve anksiyete indeksi hesaplandı. Anksiyete indeksi şu formül kullanılarak hesaplandı; $1 - \frac{[(\text{Açık kolda geçirilen süre/Test süresi}) + (\text{Açık kola giriş frekansı/Kollara toplam giriş frekansı})]/2}{1}$. (Contreras ve ark., 2014).



Şekil 3.8. Yükseltilmiş artı labirent testinin şematize hali.

3.5.7. Sükroz Tercihi Testi

Anhedoni davranışını değerlendirmek için 48 saatlik sükroz tercihi testi uygulandı. Adaptasyon sürecinde (ilk 24 saat) sıçanlar, biri sükroz (%1 ağırlık/hacim) biri musluk suyu (normal su) içeren ve ağırlıkları önceden bilinen, aynı özelliklere sahip iki şişeye 48 saat maruz bırakıldı. Bu süre zarfında tüm hayvanlar standart yemle *ad libitum* beslendi

ve sürecin yarısında şişelerin yerleri değiştirildi. Testten önce ya da sonra yiyecek veya su kısıtlaması yapılmadı. 48 saat sonra şişeler tekrar tartıldı ve tüketilen sıvı miktarı belirlendi. Sükroz tercihi aşağıdaki şekilde hesaplandı (Coelho vd. 2014).

Sükroz Tercihi= [Tüketilen sükroz miktarı (g) / (Tüketilen sükroz miktarı (g) + Tüketilen su miktarı)] x 100

3.6. İmmünohistokimyasal Analizler

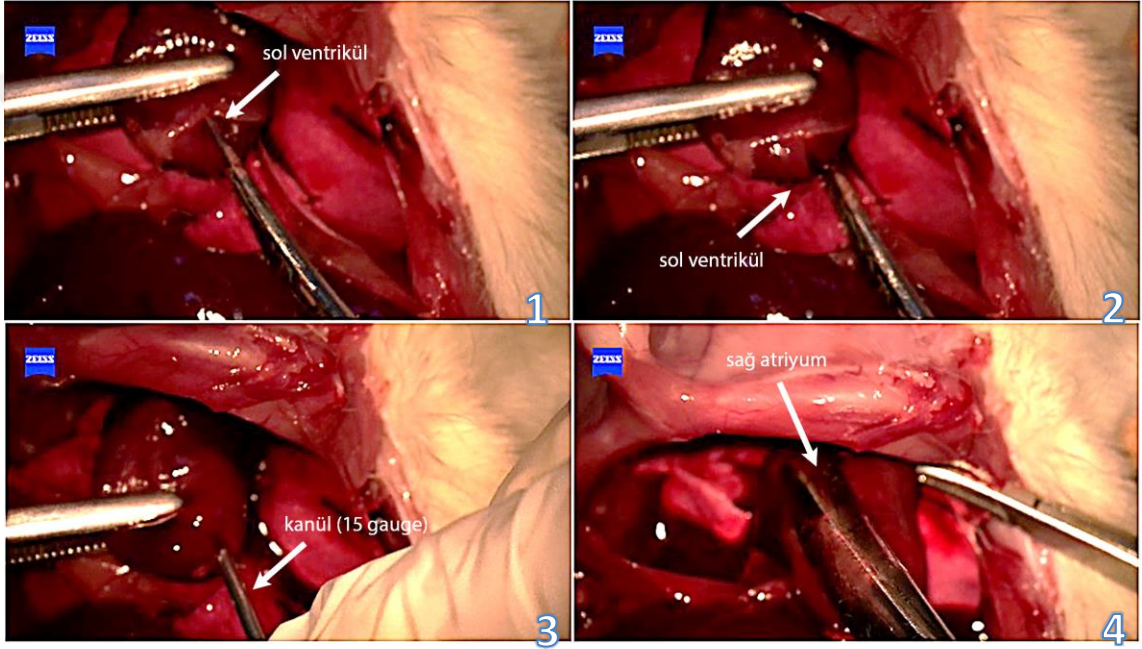
Bu yöntemle SNpc (-4,92 mm ve -5,28 mm; Paxinos ve Watson'dan alınan koordinatlar) (Fagotti ve ark., 2019), striatum, PFK (singulat korteks 1. ve 2. alanlar Cg1 ve Cg2 ile sekonder motor korteks M2 dahil) (Laubach ve ark., 2018) ve hipokampus dokularında TH, α -sinüklein, pS129- α -sinüklein, *cleaved* kaspaz-3 ve TLR-2 ekspresyonları değerlendirildi ve gruplar arasındaki fark bu ekspresyon şiddetlerine göre yorumlandı. Sakrifiye edilen hayvanların total beyin dokuları çıkarıldıktan sonra parafin takibe alındı.

3.6.1. Dokuların Hazırlanması

Davranış testleri tamamlandıktan sonra immünohistokimya için sakrifiye edilecek hayvanlara eter ile derin anestezi uygulanarak diseksiyon tepsisine alındı. Ksifoid çıkıntının hemen altından klavikulaya kadar torasik orta hat boyunca cerrahi makasla bir kesi yapıldı (Şekil 3.9). Plevral boşluğu ortaya çıkarmak için göğüs kafesi boyunca kavisli, künt makas kullanılarak diyaframda kesi yapıldı. Atmakta olan kalbi açığa çıkarmak için göğüs kafesinin her iki tarafındaki kaburgalar dikkatlice kesilerek göğüs boşluğu açıldı. Cildin iki kanadı rostral ve lateral olarak katlanarak torasik alan tamamen açığa çıkarıldı. İris makası kullanılarak sol ventrikülün arka ucuna küçük bir kesi yapıldı. Kesik ventrikülden çıkan aortaya 15 gauge'lik künt uçlu perfüzyon iğnesi geçirilerek iğneyi sabitlemek ve sızıntıyı önlemek için klemp atıldı. Yine iris makası kullanılarak inen aortaya zarar vermeden kan çıkışını sağlayabilmek için sağ atriyumuna bir kesi yapılarak hayvan perfüze edilmeye hazırlandı.

1U/ml heparin içeren serum fizyolojik ile transkardiyak perfüzyon başlatıldı ve sağ atriyumdan çıkan sıvı tamamen berrak olana kadar işlem devam etti. İmmünohistokimyasal analizler için %10'luk formalin fiksatif kullanılarak perfüzyon tamamlandı. Beyin dokusunu çıkarmak için bir makas aracılığıyla boyundan buruna

kadar bir orta hat kesisi yapıldı ve kafatası ortaya çıkarıldı. Kafatasını çevreleyen boyun kasları kesilerek kafatasının tabanı görünür hale getirildi. İris makasın keskin ucu bir taraftaki foramen magnuma yerleştirilerek arka kafatası yüzeyinin uzak kenarına kadar uzanan bir kesim yapıldı. Kontralateral tarafta aynı kesim tekrarlandı. Ronjur kullanarak kafatasının dorsal yüzeyi beyinden ayrıldı ve kafatasının yanları kesilerek beyin rahatça görünür hale getirildi. Bir spatula kullanarak, olfaktör bulbus ve beyinin ventral yüzeyi boyunca görülen sinir bağlantıları ayrılarak doku çıkarıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Transkardiyak perfüzyonun basamakları.

1: Tamamen açığa çıkan torasik alan ve atmakta olan kalbin sabitlenmesi, 2: İris makası kullanılarak sol ventrikülün arka ucuna atılan küçük kesi, 3: Çıkan aortaya 15 gauge'lik künt uçlu perfüzyon iğnesi geçirilmesi, 4: İnlen aortaya zarar vermeden kan çıkışını sağlayabilmek için sağ atriya atılan küçük kesi.



Şekil 3.10. Beyin dokusunun diseksiyonu.

1: Boyundan buruna kadar yapılan orta hat kesisi, 2: Kafatası kaldırılarak rahatça görünür hale gelen beyin dokusu, 3: Perfüze edilmiş beyin dokusu.

Beyin dokuları %10'luk formalin fiksatifinde fiks edildi ve fiksasyon sonrası dokular yarım gün akar suda yıkanarak yükselen alkol serilerinde yarım gün bekletildi. Ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafin içerisine gömüldü. Mikrotomda parafin bloklardan Poly-

L lizinle kaplı lamalar üzerine 5µm kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitler ertesi gün yapılacak immünohistokimyasal boyamalar için 60 °C'deki etüvde bir gece bekletildi.

İşlem Basamakları

1. Alınan kesitler, parafini slaytların üzerinden uzaklaştırmak için 15 dk temiz ksilolde bekletildi ve takiben %100'lük, 90'luk, 80'lik ve 70'lik alkollerden 3'er dakika sürelerle geçirdikten sonra 3 dakika distile suda bekletilerek rehidrate edildi.
2. Ardından kesitler, dokudaki antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak amacıyla, sitrik asit çözeltisinde mikrodalga fırının “*med-high*” ayarında 2x5 dakika kaynatılarak oda sıcaklığında 20 dakika soğutuldu.
3. Kesitler daha sonra fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisine alınarak 3x5 dakika yıkandı.
4. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük H₂O₂ içerisinde 20 dakika inkübe edildi.
5. Tekrar PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra hidrofobik kalem ile kesitlerin çevresi çizildi.
6. Ortaya çıkabilecek non-spesifik reaksiyonların bloklanması için kesitler Ultra V blok ile 7 dakika muamele edildi.
7. Bu işlem sonrasında herhangi bir yıkama basamağı yapılmadan kesitler, Tablo 3.10'da gösterilen oranlarda dilüe edilmiş primer antikorlar ile muamele edildi. Negatif gruplara ise aynı oranda IgG içeren immunglobulinler damlatılarak kesitler +4°C'de gece boyu inkübe edildi.
8. İnkübasyon sona erdikten sonra kesitler 3x5 dakika PBS çözeltisinde yıkanarak biyotinli anti-rabbit sekonder antikor (Vectorlab, BA-1000, 1:400) ile muamele edildi ve oda sıcaklığında 45 dk inkübe edildi.
9. İnkübasyondan sonra 3x5 dakika PBS çözeltisinde yıkandı ve HRP-konjuge Streptavidin damlatılarak 40 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
10. Takip eden yıkama işlemi sonrasında, kesitler önerilen şekilde hazırlanan DAB enzim solüsyonunda 3 dakika inkübe edilerek gelişen reaksiyon mikroskop altında değerlendirildi.

Tablo 3.10. İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan antikorlar

Antikor	Marka	Katalog No	Kaynak	Dilüsyon
Tirozin hidroksilaz	Abcam	ab112	Tavşan poliklonal	1:100
α -sinüklein	Cell Signaling	4179S	Tavşan monoklonal	1:200
pS129- α -sinüklein	Abcam	ab51253	Tavşan monoklonal	1:500
<i>Cleaved</i> kaspaz-3	Cell Signaling	9661	Tavşan poliklonal	1:100
TLR-2	Abcam	ab213676	Tavşan poliklonal	1:200

Kullanılan Solüsyonlar:

PBS solüsyonu (pH 7,4)

Hazırlanışı:

- 2,85 gr Na_2HPO_4 (Sodyum fosfat dibasik)
- 16 gr NaCl (Sodyum klorür)
- 0,8 gr $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$ (Potasyum dihidrojen fosfat)
- 2000 ml distile su

Sitrik Asit Solüsyonu (pH 6)

Hazırlanışı:

- 2,1 gr sitrik asit
- 900 ml distile su

Hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu (%3):

Hazırlanışı:

- 63ml metanol
- 7ml hidrojen peroksit

NaOH çözeltisi (2M) (pH ayarı için)

Hazırlanışı:

- 8 g NaOH (Sodyum hidroksit)
- 100 ml distile su

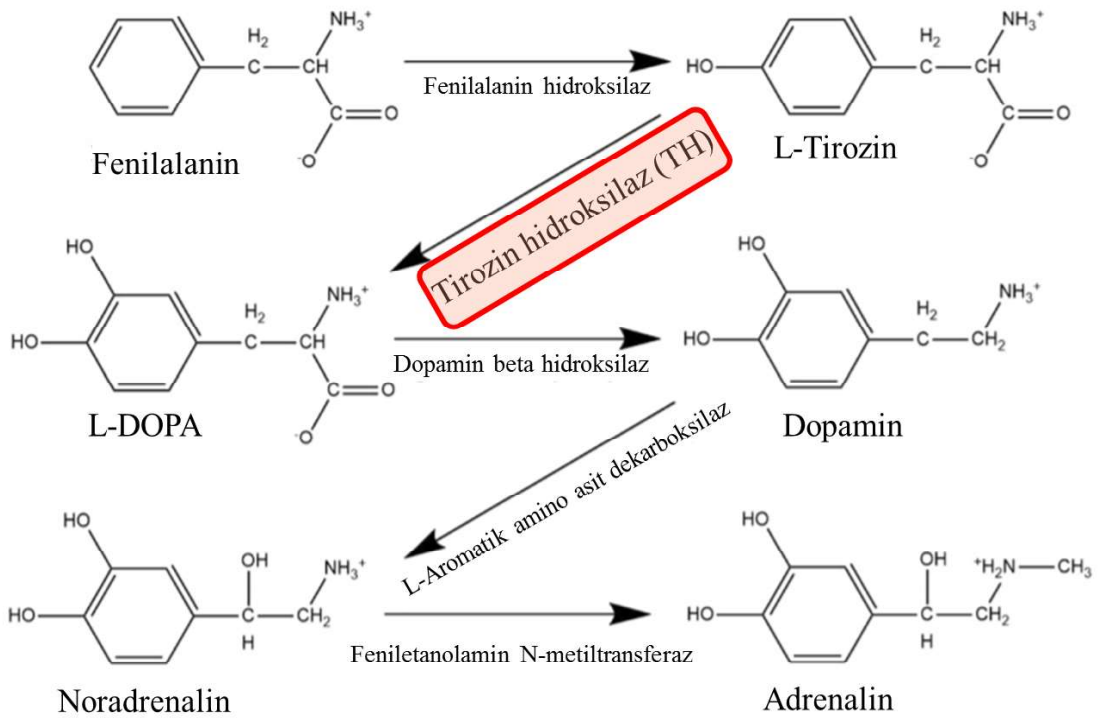
DAB Solüsyonu (pH ayarı için)

Hazırlanışı:

- 1 adet DAB tablet, 1 adet üre hidrojen peroksit tableti
- 1 ml distile su

3.6.2. Tirozin Hidroksilaz Ekspresyonunun Belirlenmesi

TH; dopamin, noradrenalin ve adrenalin gibi katekolaminlerin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamakta yer alan, L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonunu katalize eden bir monooksijenazdır (Şekil 3.10) (Weinberg ve ark., 2019). TH işaretlenmesi SNpc, striatum, PFK ve hipokampustaki sağ kalan dopaminerjik nöronların varlığını belirlemek için yapıldı.



Şekil 3.10. Dopamin biyosentezi. Şekil, (Weinberg ve ark., 2019) kaynak alınarak Türkçeleştirilmiştir.

3.6.3. α -Sinüklein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Sağ kalan nöronlarda α -sinüklein'den zengin Lewy cisimcikleri ve nöritlerin varlığı, PH'nin karakteristik patolojik özelliğidir (Phan ve ark., 2017). α -sinüklein işaretlemesi, ilgili beyin bölgelerinde α -sinüklein birikimini ve PH patolojisini belirlemek için yapıldı.

3.6.4. Serin-129 Bölgesinde Fosforile Olmuş α -Sinüklein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Serin-129 bölgesinde meydana gelen fosforilasyonun α -sinüklein inklüzyonlarının oluşumunu hızlandırdığı ve nöronal kaybı artırdığı bildirilmiştir (Sugeno ve ark., 2008). Ayrıca pS129- α -sinüklein izoformlarının β -katlanmalara geçişinin daha hızlı gerçekleştiği gösterilmiştir (Samuel ve ark., 2016). Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalardan sonra α -sinüklein patolojisinin, SSS'de meydana gelen nöroinflamasyon ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğu ve α -sinüklein fibrillerinin inflamatuvar özelliklerinin de yine β -yapı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gustot ve ark., 2015; Zella ve ark., 2019). pS129- α -sinüklein işaretlemesi, α -sinüklein agregatlarının toksisitesini ve inflamatuvar kaskadı tetikleyici rolünü aydınlatmak için yapıldı.

3.6.5. Cleaved Kaspaz-3 Ekspresyonunun Belirlenmesi

Kaspaz-3, kaspaz kaskad sürecinin aktivasyonu için kritik öneme sahip, apoptozla ilişkili sistein peptidazdır. Kaspaz-3, proteolitik ayrılma (*cleavage*) yoluyla aktive edilir (Yuan ve ark., 2016). Kaspaz-3'ün aktivasyonu, PH'de de önemli bir işarettir. Mikroglia aracılı inflamasyon ve apoptoz aracılığıyla nöron ölümüne neden olabilir (Liu ve ark., 2013). *Cleaved* kaspaz-3 işaretlemesi; SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında apoptoz belirteci olarak kullanıldı.

3.6.6. Toll-Benzeri Reseptör-2 Ekspresyonunun Belirlenmesi

TLR-2, hem hücre yüzeyindeki hem de mikroglia içindeki organeller ile ilişkili olup gen transkripsiyonunda değişikliklere yol açan hücre içi yolakları değiştirerek spesifik ligandlara cevap veren patern tanıma reseptörleridir (Dzamko ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018). α -sinüklein tarafından aktive olmuş mikroglialarda NF κ B sinyal yolağının TLR-2 aracılı aktivasyonu, inflamatuvar cevapları tetikleyerek proinflamatuvar

sitokinlerin salıverilmesine neden olmaktadır (Kim ve ark., 2018). TLR-2 ekspresyonu, inflamatuvar sürecin bir belirteci olarak kullanıldı.

3.6.7. Image-J analizi

Image-J programı kullanılarak dokularda ekspresyon görülen yerler işaretlendi ve bu alan program ile hesaplanarak total alana oranlandı. Farklı gruplardaki immünoreaktiviteler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirildi p değerinin 0,05'ten küçük olduğu değerler anlamlı olarak kabul edildi.

3.7. Biyokimyasal Analizler

Çalışma gruplarındaki hayvanlar davranış testlerini tamamladıktan sonra biyokimyasal analizler için kullanılacak beyin dokularından striatum, PFK ve hipokampus bölgeleri çıkarılarak bu bölgelerde LC/MSMS metodu ile dopamin, serotonin, noradrenalin, glutamik asit ve L-glutamin nörotransmitterlerinin miktar tayini gerçekleştirildi. Yine aynı dokuların kontralateral bölgeleri kullanılarak ELISA yöntemi ile proinflamatuvar sitokin ve NF κ B-p65 düzeyleri belirlendi. İnsanlarda, uzaysal lokasyonların allosentrik işlenmesini gerektiren bellek görevlerinde özellikle sağ hipokampusun görev aldığı, sol hipokampusun ise epizodik/otobiyografik bellekte rol aldığı bilinmektedir (Burgess,2002). Yapılan çalışmalarda eğitimsiz kontrol grubuna kıyasla, gizli platform konumunu öğrenmiş sıçanlarda sol hipokampusta 74 gene karşı sağ hipokampusta 623 genin farklı şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir (Klur,2009). Bu nedenle sağ taraftaki dokular nörotransmitter tayini için, sol taraftaki dokular ise sitokin ve NF κ B-p65 düzeylerinin tespiti için kullanıldı. Hayvanların sakrifikasyonu ve beyin dokusunun diseksiyonu, immünohistokimyasal analizler için dokuların hazırlanması (Bkz: 3.6.1. Dokuların hazırlanması) kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Ancak transkardiyak perfüzyon sırasında yalnızca 1U/ml heparin içeren serum fizyolojik kullanıldı.

3.7.1. Dokuların Homojenize Edilmesi

Formik Asit Tamponu ile Homojenizasyon Yöntemi

Her gruptaki hayvanın hipokampus, PFK ve striatum dokuları çıkarılarak tartıldı ve tartılan örneklerle LC/MSMS yöntemi ile nörotransmitter tayini için 1:10 (ağırlık/hacim) olacak şekilde 0,1 M formik asit çözeltisi eklenerek dokular buz üzerinde homojenize

edildi. Her bir örnekten elde edilen doku homojenatları, nörotransmitter tayini için postmitokondri süpernatantı elde etmek için 4 °C'de 18000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz eppendorflara bölünerek analize yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Santrifüjlemeden sonra, süpernatantlar 200 µL'lik viallere alınarak analiz edildi.

PBS Tamponu ile Homojenizasyon Yöntemi

Her gruptaki hayvanın hipokampus, PFK ve striatum dokuları çıkarılarak tartıldı ve tartılan örneklerle ELISA testleri için 1:9 (ağırlık/hacim) olacak şekilde fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenerek dokular buz üzerinde homojenize edildi. Her bir örnekten elde edilen doku homojenatları, proinflamatuvar sitokinlerin ve NFκB-p65 aktivitesinin analizi için postmitokondri süpernatantı elde etmek için 4 °C'de 5000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz eppendorflara bölünerek analiz yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.7.2. Dokularda Total Protein Tayini

Nörotransmitter tayini ve ELISA testleri için yapılan tüm protein tayinleri Bradford Yöntemi (1976) kullanılarak yapıldı (Bradford, 1976).

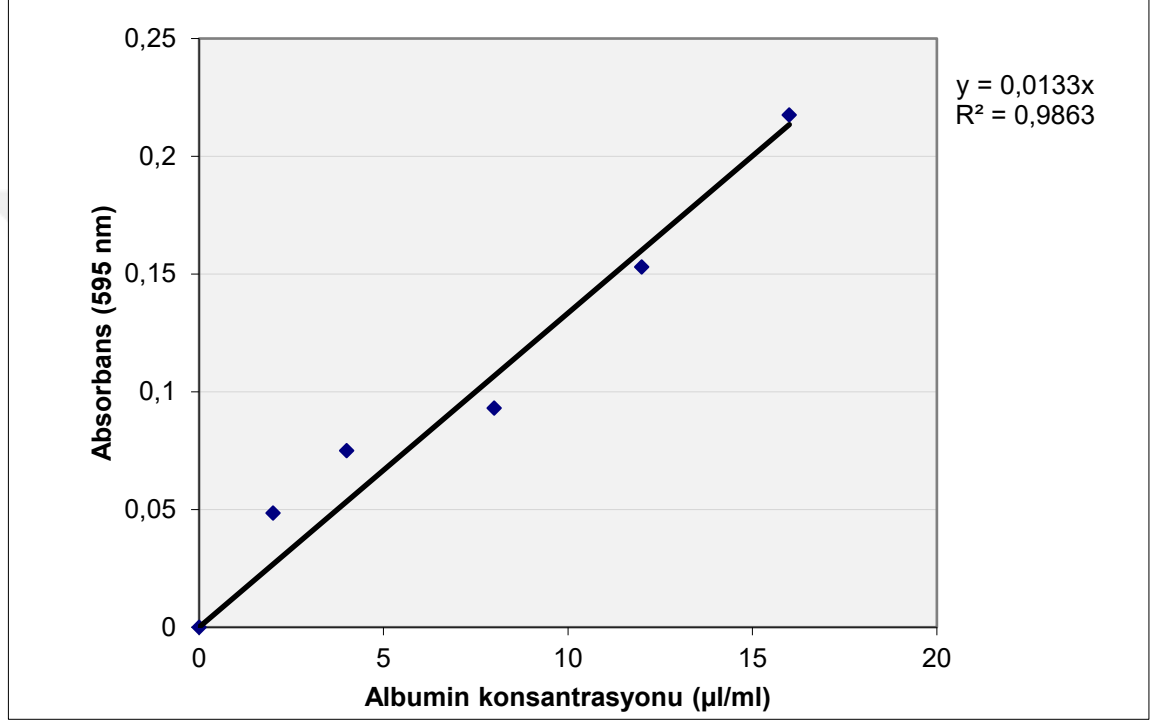
Yöntemin Esası: Bu yöntemde bir organik boyar madde olan Commassie brilliant blue G-250'nin proteindeki renklendirme özelliğinden yararlanılır. Commassie brilliant blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boyadır. Boya, kırmızı ($A_{\max}=465$ nm) ve mavi ($A_{\max}=595$ nm) formlarda bulunur. Kırmızı form çözeltideki haldir. Boya, proteinlere bağlandığında mavi renk oluşur. Rengin şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılıdır (Robyt ve White, 1987).

İşlem Basamakları:

1. Doku homojenatları distile su ile 1:250 oranında seyreltildi.
2. Bovin serum albuminden 2, 4, 8, 12, 16 ve 20 µl/ml'lik standartlar hazırlandı.
3. 100 µl örnek, standart veya kör (distile su) çözeltilerine 100 µl Bradford belirteci eklenerek vortekslendi ve bu numuneler 96 kuyucuklu plakaya, her kuyucukta 200 µl örnek bulunacak şekilde pipetlendi.

4. Örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede ile 595 nm’de 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

5. Standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri ile elde edilen standart eğriden (Şekil 3.12) hareketle protein miktarları hesaplandı. Sonuçlar µg/ml olarak verildi.



Şekil 3.12. Protein standart eğrisi.

3.7.2. Dopamin, Serotonin, Noradrenalin Glutamin ve L-Glutamik Asitin Kantitatif Kütle Spektrometrik Ölçümü

Ölçümler için, tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile birleştirilmiş ultra hızlı sıvı kromatografi (UFLC) kullanılarak optimize edilmiş bir çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi kullanıldı (Bülbül ve ark., 2019). Bu teknikte, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektöründe kütle/yük (m/z) oranlarına göre parçalandı. Birinci kuadrupol filtrede m/z oranına göre ayrılan moleküller, ikinci kuadrupol filtrede yüksek saflıktaki gaz ile parçalanarak iyonlarına dönüştürüldü ve oluşan iyonların üzerinden teşhis ve miktar tayini yapıldı.

Dopamin, serotonin, noradrenalin, glutamin ve L-glutamik asit standartları, 0,01 g madde 10 ml LC-sınıf su:formik asit (0,1 M) karışımında (9:1) çözülerek hazırlandı (5 ng/ml). Standart çözelti, stok çözeltiden distile su kullanılarak seyreltildi ve optimizasyon için 1000, 500 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı.

Kontrol, rotenon, vortiksetin ve rotenon+vortiksetin gruplarındaki hayvanlardan elde edilen hipokampus, PFK ve striatum doku örnekleri, ağırlıklarına göre 0,1 M formik asit içeren soğuk ekstraksiyon çözücüsü kullanılarak buz üzerinde homojenize edildi (doku ağırlığı:formik asit; 1:10). Doku homojenatları daha sonra 18.000 g'de +4 °C'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra, süpernatantlar 200 µL'lik viallere alınarak LCMS-8040 triple quadrupole kütle spektrometresiyle (Shimadzu Corporation, Japan) birleştirilmiş bir UFLC sistemi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan) üzerinde, 25 °C'de tutulan bir HPLC kolonu (Inertsil ODS-4, 3 x 100 mm, 2 µm, GL Sciences Inc. Tokyo, Japonya) kullanılarak analiz edildi. Elde edilen değerler doku ağırlığına normalize edilerek sonuçlar [nmol/mg] cinsinden verildi.

Tablo 3.11. LC/MSMS Ölçüm Parametreleri.

Kolon	Inertsil ODS-4, 3 x 100 mm, 2 µm, GL Sciences Inc. Tokyo, Japonya
Mobil faz	A: % 0,1 formik asit ve %1 asetonitrilin sudaki çözeltisi. B: %0,1 formik asitin asetonitrildeki çözeltisi
Sıcaklık	25°C
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Akış hızı	0,4 mL/dak
Dereceli elüsyon	Faz B, %5–50 (0–1 dakika), %50–95 (1–2 dakika), %95 (2–3 dakika) ve %5 (3–4 dakika)

3.7.3. Proinflamatuvar Sitokinlerin Tayini

Hipokampus, PFK ve striatum dokularında TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri katı faz sandviç ELISA testi TNF- α , IL-1 β ve IL-6 kitleri (Elabscience) kullanılarak yapıldı.

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plaklar sıçan TNF- α , IL-1 β ve IL-6'ya özgü bir monoklonal

antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Daha sonra sıçan TNF- α , IL-1 β veya IL-6 ve avidin-yabanturpu peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru, her mikro plaka kuyusuna art arda ilave edilir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Her kuyucuğa substrat çözeltisi ilave edilir. Sadece sıçan TNF- α , IL-1 β veya IL-6, biyotinli tespit antikoru ve avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sararır. Optik yoğunluk 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Optik yoğunluk değeri, sıçan IL-1 β , IL-6 veya TNF- α konsantrasyonları ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluğu standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki TNF- α , IL-1 β veya IL-6 konsantrasyonları hesaplanır.

Test Prosedürü

1. Standart çalışma çözeltisi ilk iki kolona eklendi: Çözeltinin her konsantrasyonu, her bir kuyucuğa, yan yana (her kuyucuk için 100 uL) çift olarak eklendi. Örnekler diğer kuyucuklara eklendi (her kuyucuk için 100 uL). Plaka, kitte verilen sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. 37 ° C'de 90 dakika inkübe edildi.
2. Sıvılar kuyucuklardan yıkama yapmadan uzaklaştırıldı. 100 μ L Biyotinli tespit antikoru çalışma solüsyonu eklendi. Plaka sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. Yavaşça karıştırıldı. 37 ° C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Sıvılar kuyucuklardan aspire edildi, 350 uL yıkama tamponu eklendi. 1 ~ 2 dakika bekletildi ve her kuyudan solüsyon aspire edildi ve temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurulandı. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlandı.
4. Her kuyucuğa 100 μ L HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Sıvılar kuyucuklardan aspire edildi, yıkama işlemi adım 3'te gösterildiği gibi beş kez tekrarlandı.
6. Her kuyucuğa 90 μ L substrat reaktifi eklendi. Yeni bir plaka sızdırmazlık filmi ile kaplandı. 37 ° C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi. Plaka ışıktan korundu. Reaksiyon

süresi gerçek renk değişikliğine göre kısaltıldı veya uzatıldı, ancak 30 dakikadan fazla beklenmedi.

7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma çözeltisinin eklenmesi, substrat çözeltisindeki aynı sırayla yapıldı.

8. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu, dalga boyu 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile bir kerede belirlendi.

Sonuçların Hesaplanması

Her standart ve numune için yinelenen okumaların ortalamasını alındı, ardından ortalama sıfır standart optik yoğunluğu çıkarıldı. Microsoft Excel'de bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edildi. Sonuçlar pg/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.4. Nükleer Faktör Kappa-B-p65 Aktivitesinin Belirlenmesi

Hipokampus, PFK ve striatum dokularında NFκB-p65 ölçümleri, katı faz sandviç ELISA testi NFκB-p65 kiti (Elabscience) kullanılarak yapıldı.

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak sıçan NFκB-p65'e özgü bir monoklonal antikorla kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Daha sonra sıçan NFκB-p65 ve avidin-yabanturpu peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru, her mikro plaka kuyusuna art arda ilave edilir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Her kuyucuğa substrat çözeltisi ilave edilir. Sadece sıçan NFκB-p65, biyotinli tespit antikoru ve avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sararır. Optik yoğunluk, 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Optik yoğunluk değeri, NFκB-p65 konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluğu, standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki NFκB-p65 konsantrasyonu hesaplanır.

Test Prosedürü

1. Standart çalışma çözeltisi ilk iki kolona eklendi: Çözeltinin her konsantrasyonu, her bir kuyucuğa, yan yana (her kuyucuk için 100 uL) çift olarak eklendi. Örnekler diğer kuyucuklara eklendi (her kuyucuk için 100 uL). Plaka, kitte verilen sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. 37 ° C'de 90 dakika inkübe edildi.
2. Sıvılar kuyucuklardan yıkama yapmadan uzaklaştırıldı. 100 µL Biyotinli tespit antikorlu çalışma solüsyonu eklendi. Plaka sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. Yavaşça karıştırıldı. 37 ° C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Sıvılar kuyucuklardan aspire edildi, 350 uL yıkama tamponu eklendi. 1 ~ 2 dakika bekletildi ve her kuyudan solüsyon aspire edildi ve temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurulandı. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlandı.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Sıvılar kuyucuklardan aspire edildi, yıkama işlemi adım 3'te gösterildiği gibi beş kez tekrarlandı.
6. Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklendi. Yeni bir plaka sızdırmazlık filmi ile kaplandı. 37 ° C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi. Plaka ışıktan korundu. Reaksiyon süresi gerçek renk değişikliğine göre kısaltıldı veya uzatıldı, ancak 30 dakikadan fazla beklenmedi.
7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma çözeltisinin eklenmesi, substrat çözeltisindeki aynı sırayla yapıldı.
8. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu, dalga boyu 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile bir kerede belirlendi.

Sonuçların Hesaplanması

Her standart ve numune için yinelenen okumaların ortalamasını alındı, ardından ortalama sıfır standart optik yoğunluğu çıkarıldı. Microsoft Excel’de bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edildi. Sonuçlar pg/mg protein olarak ifade edildi.

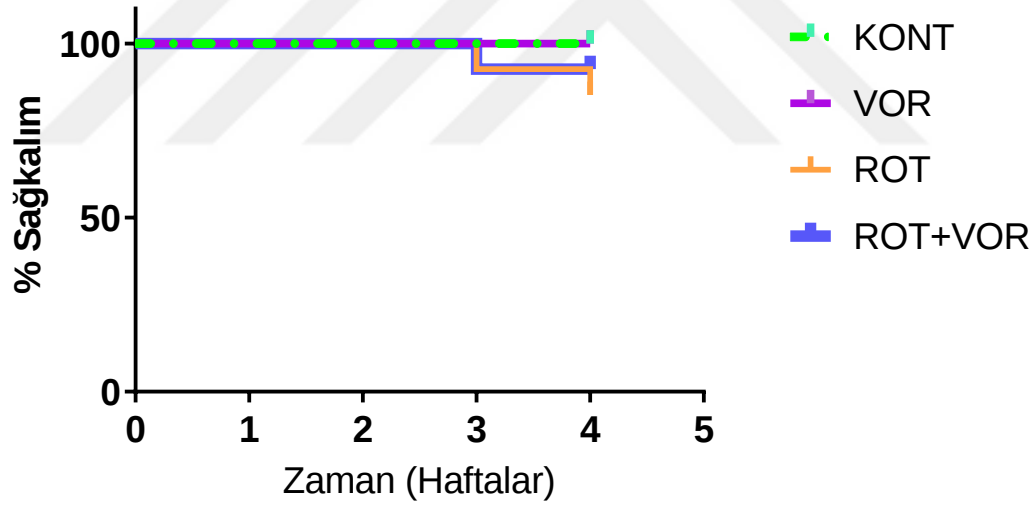
3.7.3. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler Graphpad Prism 7.0 yazılımı kullanılarak yapıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Davranış deneylerinde gruplar arasındaki farklar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma post-hoc testi kullanılarak değerlendirildi. Morris’in su tankı testinde alıştırma periyotlarında platforma ulaşmak için harcanan sürenin ve alınan toplam yolun analizinde iki yönlü tekrarlı ölçüm ANOVA ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma post-hoc testi kullanıldı. Biyokimyasal (nörotransmitter seviyeleri, proinflamatuvar sitokinler ve NFκB-p65 seviyeleri) ve immünohistokimyasal bulgulara, normal dağılıma uyan değerlerin analizinde tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma post-hoc testi kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov testinde normal dağılıma uymayan değerlerin analizinde ise Kruskal-Wallis ve ardından Dunn’s çoklu karşılaştırma post-hoc testi kullanıldı. *p* değerinin 0.05’ten küçük olduğu değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İlaç Uygulamalarının Sağkalım Üzerine Etkisi

Kontrol ve vortiooksetin gruplarında 4 haftalık deney süresince mortalite görülmedi (sağkalım oranları %100). Rotenon grubunda, deneye dahil edilen 27 hayvandan 2'si üçüncü haftada, 2'si dördüncü haftada olmak üzere toplam dört sıçan deneyler tamamlanmadan kaybedildi. Rotenon grubunda sağkalım oranı %85,2 idi. Rotenon ile birlikte vortiooksetin uygulaması yapılan kombinasyon grubunda da deneye dahil edilen 27 hayvandan üçüncü haftada iki sıçan deneyler tamamlanmadan kaybedildi. Rotenon+vortiooksetin grubunda sağkalım oranı %92,6 idi. Sağkalım eğrileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi (Log-rank (Mantel-Cox) testi, $p=0,0707$) (Şekil 4.1).

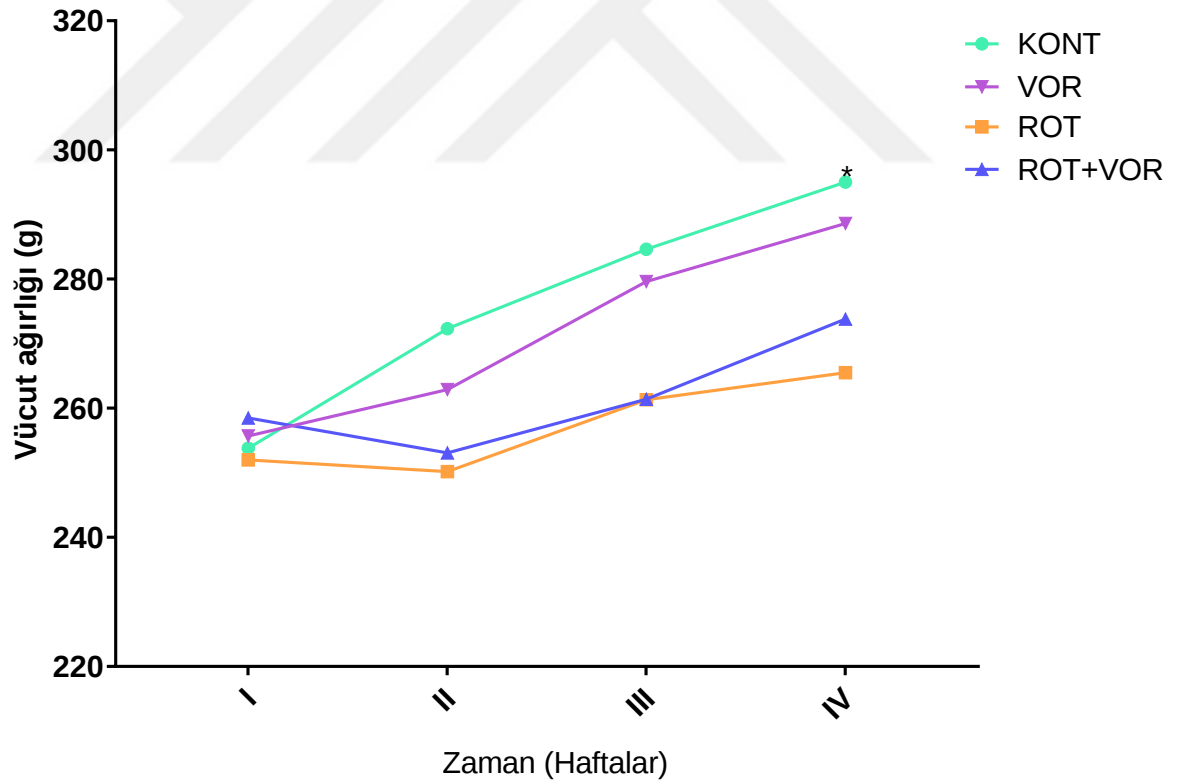


Şekil 4.1. Kaplan-Meier sağkalım analizi. Değerler, Log-rank (Mantel-Cox) testine göre her grupta hayatta kalan sıçanların yüzdesi olarak hesaplanmıştır. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, VOR: Vortiooksetin.

4.2. İlaç Uygulamalarının Vücut Ağırlığı Üzerine Etkisi

Kontrol, vortiooksetin, rotenon ve rotenon+vortiooksetin gruplarında yer alan sıçanların 4 haftalık periyod boyunca vücut ağırlıklarında görülen değişimler karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu (grup etkisi, $F(3,311) = 5,82$, $p=0,0007$; zaman etkisi, $F(3,311) = 3,329$, $p=0,0199$) ancak; tedavi grupları ile haftalar arasında bir etkileşim olmadığı görüldü (deney grubu x zaman etkileşimi F

(9,311) = 0,4497, $p=0,9070$) (Şekil 4.2). Kontrol ve vortioksetin grubunda yer alan sıçanların kiloları 4 haftalık periyod boyunca sırasıyla %18,4 ve %12,8'lik bir artış gösterdi. Kontrol grubundaki kilo artışı I. ve IV. haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermesine rağmen (Tukey post-hoc, $p=0,0092$) vortioksetin grubundaki kilo artışı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında ilk hafta hafif düzeyde (sırasıyla %0,9 ve %2,1) bir kilo kaybı meydana gelmesine rağmen ikinci haftadan itibaren kilo artışı görüldü. 4 haftanın sonunda rotenon grubundaki sıçanlar ilk hafta ölçülen kilolarıyla karşılaştırıldığında toplamda %5,5, rotenon+vortioksetin grubundaki sıçanlar %5,9 kilo artışı gösterdi, ancak bu veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi (her iki grup için $p>0,05$).



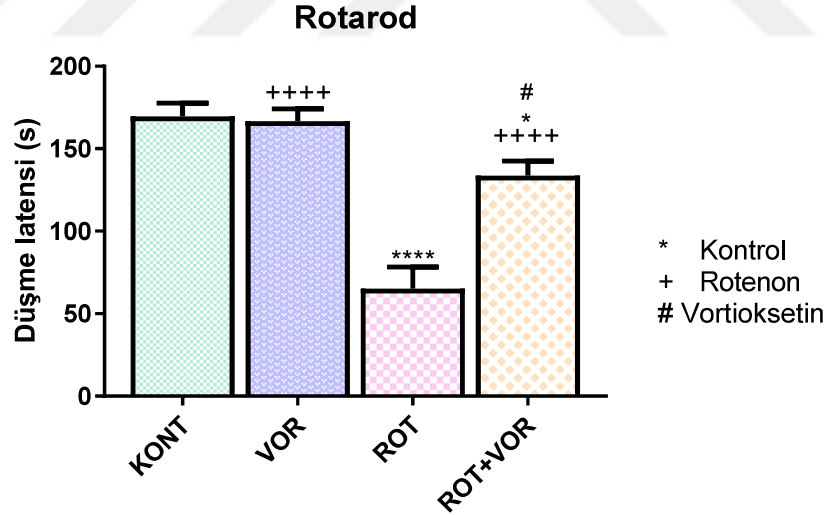
Şekil 4.2. 4 haftalık deney süresince deney gruplarındaki vücut ağırlığı değişimi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=25). * $p<0,05$; Kontrol grubunda I. haftaya göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, VOR: Vortioksetin.

4.3. Vortioksetin Uygulamasının Rotenon ile İndüklenen Motor Bozukluklar Üzerine Etkisi

4.3.1. Vortioksetin Uygulaması Rotarod Performansında İyileşme Sağladı

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların 4 ile 40 rpm arasında düzgün bir şekilde hızlanarak dönen çubuğun üzerinde düşmeden kalma süreleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların dönen çubuk üzerinde düşmeden kalma süreleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, $F(3,66) = 22,37$, $p < 0,0001$). Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizde, rotenon uygulaması yapılan sıçanların dönen çubuk üzerinde kalma süreleri kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüş gösterdi ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$; sırasıyla). Rotenon+Vortioksetin grubunda sıçanların dönen çubuk üzerinde kalma süreleri kontrol ve vortioksetin grubuna kıyasla daha kısa olmasına karşın ($p < 0,05$, $p < 0,05$; sırasıyla), rotenon grubuna kıyasla daha uzundu ($p < 0,0001$).

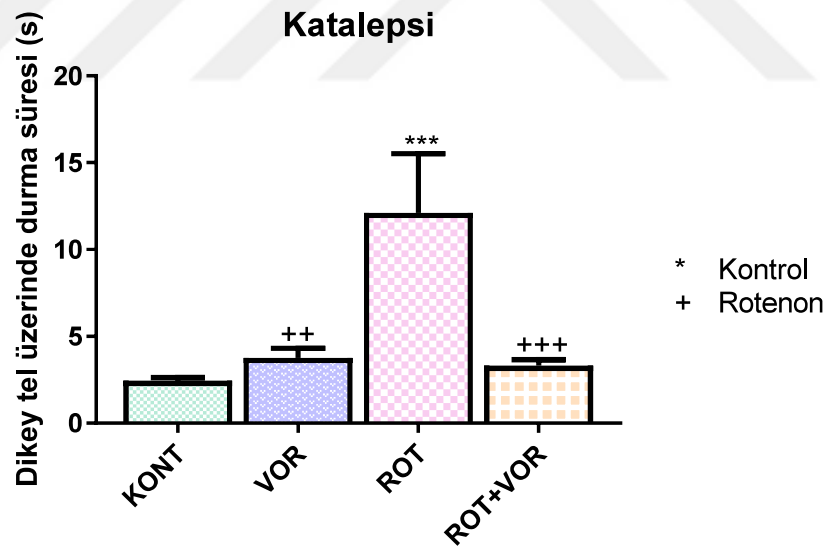


Şekil 4.3. Vortioksetin uygulamasının rotenon uygulanan sıçanlarda meydana gelen motor bozukluklar üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir ($n=15$). * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, **** $p < 0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık, # $p < 0,05$; Vortioksetin grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, VOR: Vortioksetin.

4.3.2. Vortiooksetin Uygulaması Katatonik Skorlarında Düşüş Meydana Getirdi

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların dikey tel ızgara üzerinde hareketsiz olarak kaldıkları süreler Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Kontrol, vortiooksetin, rotenon ve rotenon+vortiooksetin gruplarında yer alan sıçanların dikey tel ızgara üzerinde hareketsiz kaldıkları süreler karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, $F(3,81) = 8,34$, $p < 0,0001$). Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizde, rotenon uygulaması yapılan sıçanların dikey tel ızgara üzerinde tamamen hareketsiz kaldıkları süreler kontrol ve vortiooksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde arttı ($p < 0,001$, $p < 0,01$; sırasıyla). Hem vortiooksetin hem de rotenon tedavisi uygulanan grupta, rotenon grubuna kıyasla katatonik geçen süre anlamlı bir şekilde azaldı ($p < 0,001$). Rotenon+vortiooksetin grubu ile kontrol ve vortiooksetin grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (her iki grup için $p > 0,05$).

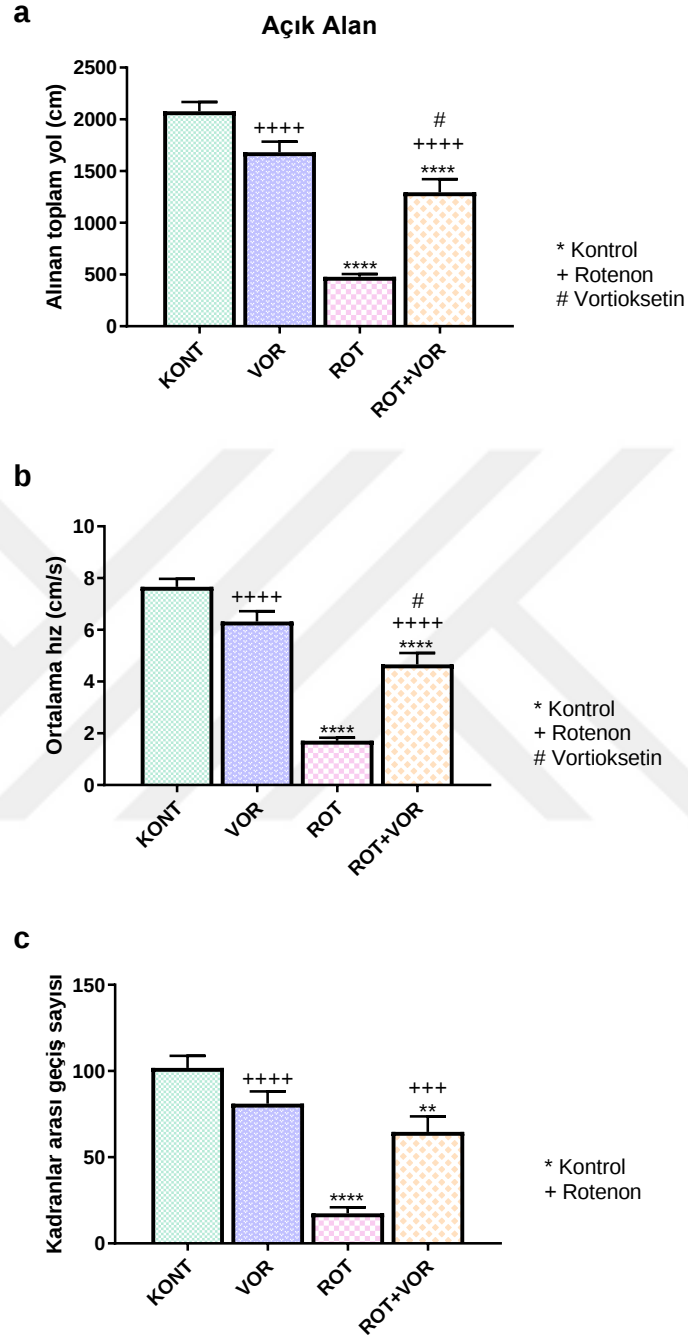


Şekil 4.4. Vortiooksetin uygulamasının rotenon uygulanan sıçanlarda meydana gelen katatonik davranışı üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir ($n=15$). *** $p < 0,001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, VOR: Vortiooksetin.

4.3.3. Vortioksetin Uygulaması Lokomotor Aktivite Skorlarında İyileşme Sağladı

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların açık alan testinde aldıkları toplam yol (cm), ortalama hızları (cm/s) ve kadranslar arası geçiş sayıları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların açık alan testinde aldıkları toplam yol, ortalama hız ve kadranslar arası geçiş sayıları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA; toplam yol, $F(3, 50) = 37,97, p < 0,0001$; ortalama hız, $F(3, 49) = 41,67, p < 0,0001$; kadranslar arası geçiş sayısı $F(3, 44) = 21,52, p < 0,0001$). Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizde, rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda alınan toplam yolun, ortalama hızın ve kadranslar arası geçiş sayısının kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlendi ($p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,0001$; sırasıyla). Rotenon+vortioksetin grubunda, rotenon grubuna kıyasla alınan toplam yol, ortalama hız ve kadranslar arası geçiş sayısının anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,001$, sırasıyla) ancak kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,01$; sırasıyla). Benzer şekilde, vortioksetin grubuyla rotenon+vortioksetin grubu karşılaştırıldığında da toplam yol ve ortalama hız parametrelerinin rotenon+vortioksetin grubunda anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05, p < 0,05$; sırasıyla). Tek başına vortioksetin uygulanan grupta ise kontrol grubuna kıyasla herhangi bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



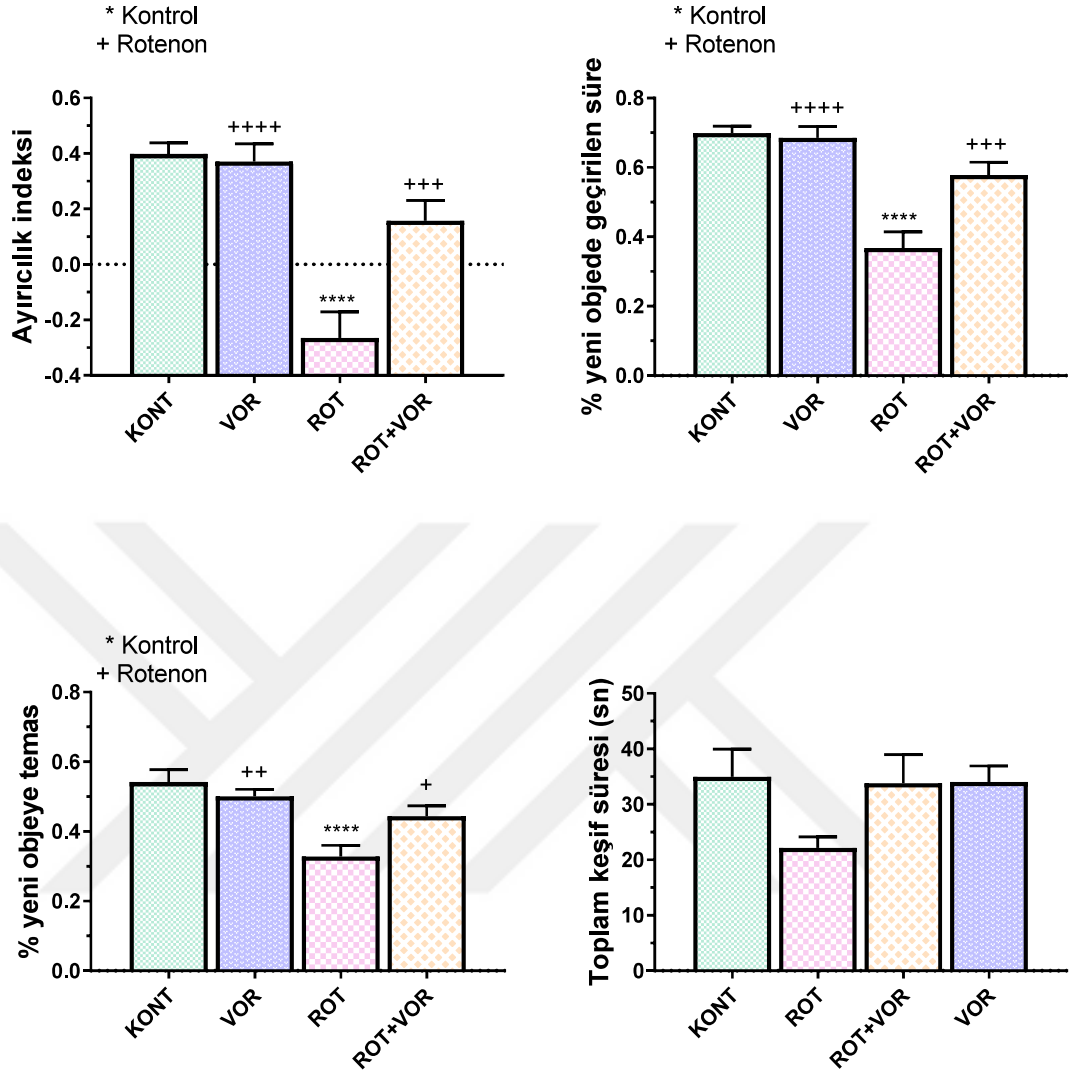
Şekil 4.5. Vortioksetin uygulamasının lokomotor aktivite üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=15). ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık # $p<0,05$; Vortioksetin grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, VOR: Vortioksetin.

4.4. Vortioksetin Uygulamasının Rotenon ile İndüklenen Bilişsel Bozukluklar Üzerine Etkisi

4.4.1. Vortioksetin Uygulaması Yeni Obje Tanıma Testindeki Bilişsel Performans Skorlarında İyileşme Sağladı

Çalışma gruplarında yer alan sıçanlar için yeni obje testindeki ayıricılık indeksi, yeni objede geçirilen sürenin yüzdesi, yeni objeye temas yüzdesi ve toplam keşif süreleri Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların ayıricılık indeksi, yeni objede geçirilen sürenin yüzdesi ve yeni objeye temas yüzdesi karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, “deney grubu” değişkeninin ayıricılık indeksi üzerine etkisi $F(3,44) = 19,11, p < 0,0001$; “deney grubu” değişkeninin yeni objede geçirilen sürenin yüzdesi üzerine etkisi $F(3,44) = 19,11, p < 0,0001$; “deney grubu” değişkeninin yeni objeye temas yüzdesi üzerine etkisi $F(3,49) = 8,648, p = 0,0001$). Hesaplanan toplam keşif süresi ise rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda kısmi bir düşüşe yol açmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Tek yönlü ANOVA, $F(3,42) = 2,684, p = 0,0588$). Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizde, rotenon uygulaması yapılan sıçanların ayıricılık indeksinin, yeni objede geçirilen sürenin yüzdesinin ve yeni objeye temas yüzdesinin kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde düştüğü ve sıçanların eski obje ile yeni obje arasında ayırım yapamadığı görüldü (Tukey post-hoc, $p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,0001$, kontrol grubu için sırasıyla; $p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,01$, vortioksetin grubu için sırasıyla). Vortioksetin tedavisiyle birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda ayıricılık indeksi, yeni objede geçirilen sürenin yüzdesi ve yeni objeye temas yüzdesi rotenon grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttı ($p < 0,001, p < 0,001, p < 0,05$; sırasıyla).



Şekil 4.6. Vortiooksetin uygulamasının yeni obje tanıma testi performansı üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=15). **** p <0,0001; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, + p <0,05, ++ p <0,01, +++ p <0,001, **** p <0,0001; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KTRL: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, VOR: Vortiooksetin.

4.4.2. Vortioksetin Uygulaması Morris'in Su Tankı Testindeki Bilişsel Performans Skorlarında İyileşme Sağladı

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların öğrenme periyotları boyunca platforma ulaşmak için harcadıkları süre ve alınan toplam yol uzunlukları, test periyodunda platformun kaldırıldığı hedef kadranda geçirdikleri süre, ortalama hızları ve yüzme yörüngelerinin temsili Şekil 4.7'de (a-e) gösterilmiştir.

MWM, uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değerlendirmek için 23. günden 28. güne kadar, 6 gün süreyle uygulandı. Sıçanların öğrenme yeteneklerinin değerlendirildiği 5 günlük öğrenme periyotları boyunca platforma ulaşmak için harcanan süre ve alınan toplam yol uzunlukları hesaplandı (Tablo 4.1, Şekil 4.7 a-b). Uzaysal hafızayı değerlendirmek için 6. gün yapılan test periyodunda ise platformun kaldırıldığı hedef kadranda geçirilen süre ve sıçanların bu süre zarfındaki ortalama hızları hesaplandı (Şekil 4.7 c-d).

Deneye alınan tüm hayvanlar platformu bulma görevini öğrenebildi, çünkü platforma ulaşmak için harcanan süreler (kaçış gecikmeleri) ve alınan toplam yol her grupta, beş gün süren öğrenme periyotları boyunca azaldı (iki yönlü tekrarlı ölçüm ANOVA, "gün" değişkeninin platformu bulma süresi ve alınan toplam yol üzerine etkisi ($F(4,378) = 142,5, p < 0,0001$ ve $F(4,366) = 140,5, p < 0,0001$; sırasıyla). Hem platforma ulaşmak için harcanan sürelerde hem de alınan toplam yol miktarlarındaki gün x deney grubu etkileşimi olduğu görüldü ($F(12,378) = 4,107, p < 0,0001$ ve $F(12,366) = 3,732, p < 0,0001$; sırasıyla).

Platforma ulaşmak için harcanan süreler değerlendirildiğinde, kontrol ve vortioksetin grubundaki hayvanlar arasında öğrenme periyodunun hiçbir gününde anlamlı bir fark bulunmazken rotenon uygulanan sıçanların kontrol, vortioksetin ve rotenon+vortioksetin grubu ile kıyaslandığında platformu bulmak için daha fazla zaman harcadıkları gösterildi (iki yönlü tekrarlı ölçüm ANOVA, "deney grubu" değişkeninin platformu bulma süresi üzerine etkisi $F(3,378) = 47,29, p < 0,0001$; gün x deney grubu etkileşimi $F(12,378) = 4,107, p < 0,0001$). Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizde, öğrenme periyodunun ilk üç gününde rotenon grubundaki sıçanların kontrol grubuna (Şekil 1a; $p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,001$, günlere göre sırasıyla) ve vortioksetin grubuna

kıyasla platforma ulaşmak için anlamlı olarak daha fazla zaman harcadıkları gösterildi (Şekil 1a; $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, günlere göre sırasıyla). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubundaki sıçanların platforma ulaşmak için harcadıkları sürenin, öğrenme periyodunun ikinci ve üçüncü günlerinde rotenon grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı gösterildi (Şekil 1a; $p<0,001$, $p<0,05$, günlere göre sırasıyla). Öğrenme periyodunun dördüncü gününde rotenon ve vortioksetin grupları hariç (Şekil 1a; $p<0,001$) diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 1a; $p>0,05$). Öğrenme periyodu boyunca azalma eğilimi gösteren kaçış gecikmeleri, öğrenme periyodunun son günü olan beşinci gününde gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi (Şekil 1a; $p>0,05$).

Platforma ulaşmak için harcanan sürelerle uyumlu olarak, kontrol ve tek başına vortioksetin uygulanan hayvanlar arasında öğrenme periyodunun hiçbir gününde anlamlı bir fark bulunmazken rotenon uygulanan sıçanların kontrol, vortioksetin ve rotenon+vortioksetin grubu ile kıyaslandığında platformu bulmak için daha fazla yol aldığı gösterildi (iki yönlü tekrarlı ölçüm ANOVA, “deney grubu” değişkeninin alınan toplam yol üzerine etkisi $F(3,366) = 39,1$, $p<0,0001$; gün x deney grubu etkileşimi $F(12,366) = 3,732$, $p<0,0001$). Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizde, öğrenme periyodunun ilk üç gününde rotenon grubundaki sıçanların kontrol grubuna (Şekil 1b; $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, günlere göre sırasıyla) ve vortioksetin grubuna kıyasla platforma ulaşmak için anlamlı olarak daha fazla yol aldıkları gösterildi (Şekil 1b; $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, günlere göre sırasıyla). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte rotenon+vortioksetin grubundaki sıçanların platforma ulaşmak için aldıkları toplam yolun, öğrenme periyodunun ikinci gününde rotenon grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı gösterildi (Şekil 1b; $p<0,001$). Öğrenme periyodu boyunca, tıpkı kaçış gecikmeleri gibi azalma eğilimi gösteren toplam yol miktarları, öğrenme periyodunun dördüncü ve beşinci gününde gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi (Şekil 1b; $p>0,05$).

Tablo 4.1. Öğrenme periyotları boyunca platforma ulaşmak için harcanan sürelerin gruplar arası karşılaştırılması.

Öğrenme Periyodu	KONTROL (Mean $\pm$ S.E.M.)	ROTENON (Mean $\pm$ S.E.M.)	ROTENON+ VORTİOKSETİN (Mean $\pm$ S.E.M.)	VORTİOKSETİN (Mean $\pm$ S.E.M.)
I. Gün	52,74 $\pm$ 3,5	85,92 $\pm$ 5,19 ****	84,67 $\pm$ 4,90 ****, ####	57,09 $\pm$ 4,66 ****
II. Gün	38,36 $\pm$ 3,73	77,78 $\pm$ 6,84 ****	60,28 $\pm$ 4,96 ***, ++, ####	35,04 $\pm$ 3,62 ****
III. Gün	21,17 $\pm$ 2,17	49,04 $\pm$ 4,97 ****	33,5 $\pm$ 3,88 +	22,06 $\pm$ 2,48 ****
IV. Gün	18,82 $\pm$ 1,83	32,48 $\pm$ 4,54	20,61 $\pm$ 2,48	11,73 $\pm$ 1,24 ++
V.Gün	11,26 $\pm$ 1,09	17,39 $\pm$ 2,03	15,08 $\pm$ 2,12	13,17 $\pm$ 1,48

*** p <0,001, **** p <0,0001; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, + p <0,05, ++ p <0,01, +++ p <0,0001; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık, #### p <0,0001; Vortiksetin grubuna göre anlamlı farklılık.

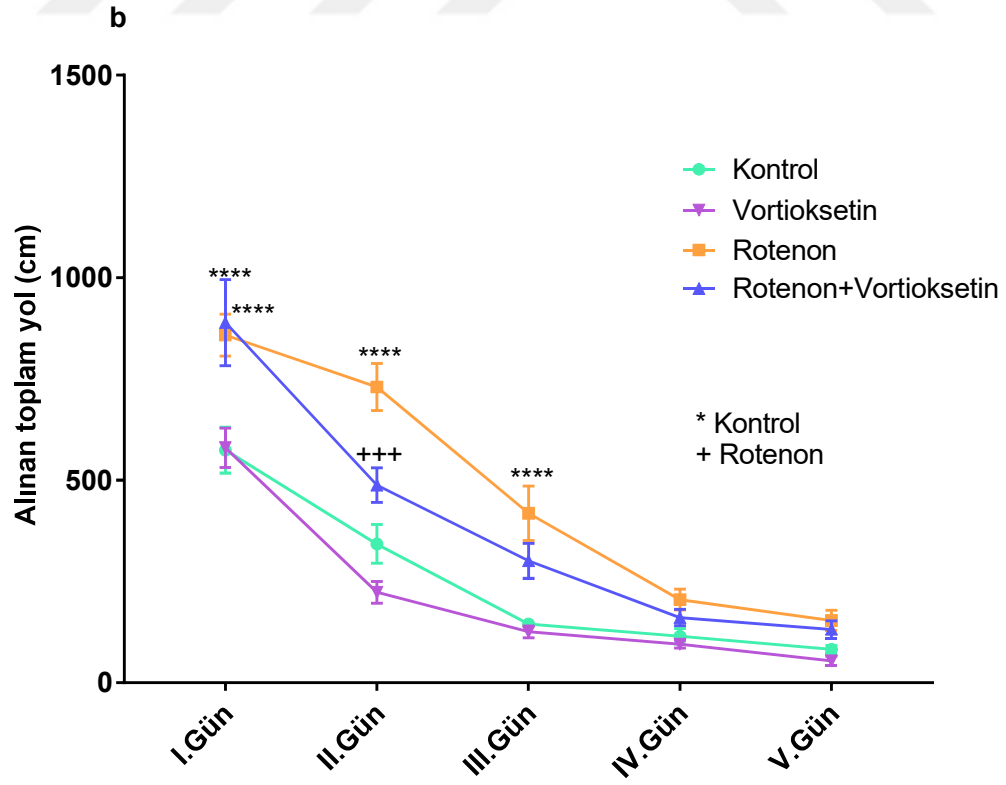
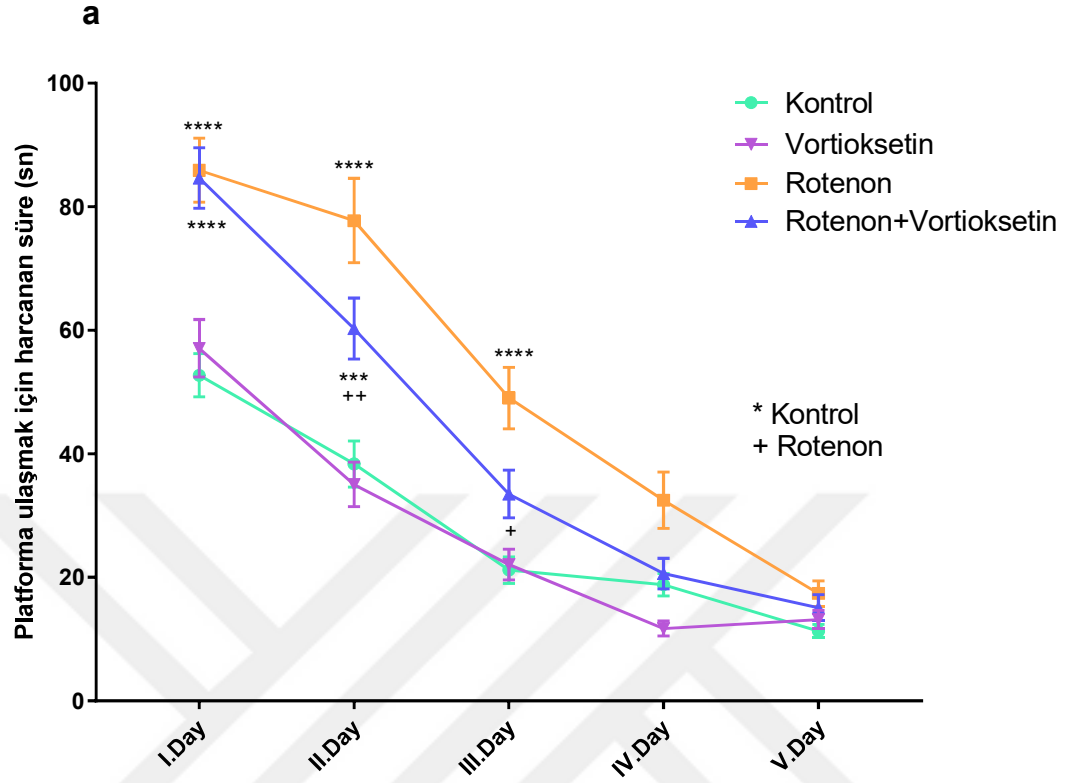
Tablo 4.2. Öğrenme periyotları boyunca alınan toplam yol miktarının gruplar arası karşılaştırılması.

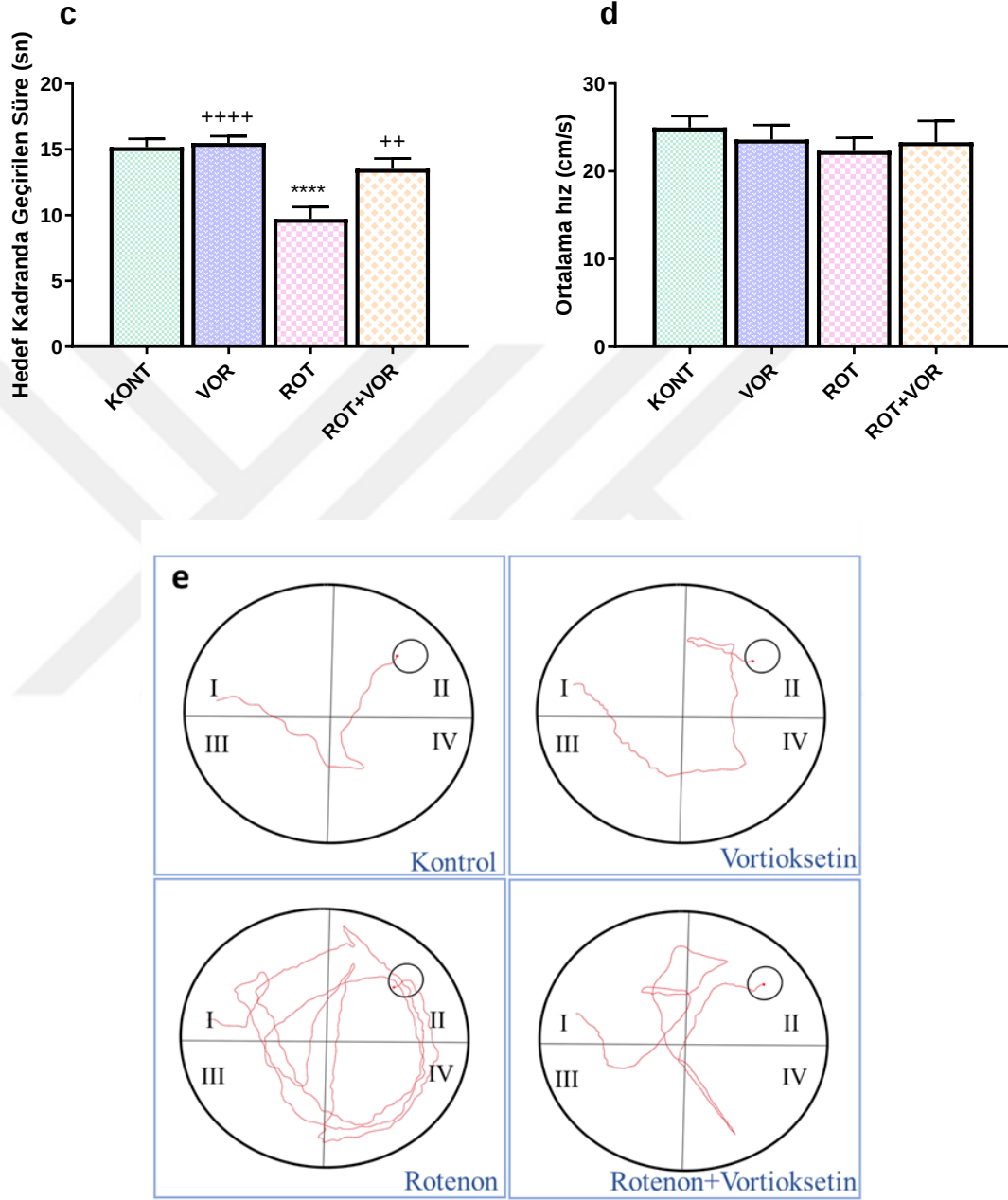
Öğrenme Periyodu	KONTROL (Mean $\pm$ S.E.M.)	ROTENON (Mean $\pm$ S.E.M.)	ROTENON+ VORTİOKSETİN (Mean $\pm$ S.E.M.)	VORTİOKSETİN (Mean $\pm$ S.E.M.)
I. Gün	574,1 $\pm$ 56,55	858,2 $\pm$ 51,76 ****	889,2 $\pm$ 106,3 ****, ####	580,1 $\pm$ 48,81 ****
II. Gün	342,4 $\pm$ 47,95	729,6 $\pm$ 58,25 ****	487,9 $\pm$ 42,6 ***, ####	222,9 $\pm$ 26,74 ****
III. Gün	144,7 $\pm$ 10,77	418,2 $\pm$ 6 ****	300,6 $\pm$ 43,46 #	125,3 $\pm$ 14,85 ****,
IV. Gün	114,6 $\pm$ 18,8	205,1 $\pm$ 25,67	160,7 $\pm$ 20,38	94,79 $\pm$ 9,572
V.Gün	82,06 $\pm$ 9,513	153,1 $\pm$ 25,28	131,3 $\pm$ 21,51	54,08 $\pm$ 10,42

**** p <0,0001; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, +++ p <0,001; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık, # p <0,05, #### p <0,0001; Rotenon+Vortiksetin grubuna göre anlamlı farklılık.

Sıçanlardaki uzaysal hafıza fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukları doğrulamak için, önceden platformun bulunduğu hedef kadranda harcanan sürenin ölçüldüğü test periyodunda, hedef kadranda geçirilen sürenin tüm gruplar arasında anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi (tek yönlü ANOVA, “deney grubu” değişkeninin hedef kadranda geçirilen süre üzerine etkisi $F(3, 58) = 13.13, p < 0.0001$). Yapılan Tukey çoklu karşılaştırma testi, rotenon uygulanan sıçanların kontrol grubu sıçanlara (Şekil 1c; $p < 0.0001$) ve vortiksetin grubu sıçanlara (Şekil 1c; $p < 0.0001$) kıyasla hedef kadranda geçirdikleri sürenin anlamlı olarak azaldığını ve hedef kadrana tercihinin kaybolduğunu gösterdi. Vortiksetin uygulaması, rotenon grubuna kıyasla hedef kadranda geçirilen sürede meydana gelen anlamlı artış ile (Şekil 1c; $p < 0.001$) gösterildiği gibi rotenon+vortiksetin grubundaki sıçanların bellek fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukları hafifletti.

Rotenon uygulamasıyla motor performans testlerinde oluşturulan MWM’deki öğrenme ve bellek bileşenlerini etkileyip etkilemeyeceğini anlamak için sıçanların test periyodundaki ortalama hızları hesaplanarak karşılaştırıldı. Tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan analizlerde, gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gösterildi (Şekil 1d; tek yönlü ANOVA, “deney grubu” değişkeninin ortalama hız üzerine etkisi $F(3, 68) = 0.4109; p = 0.7457$).



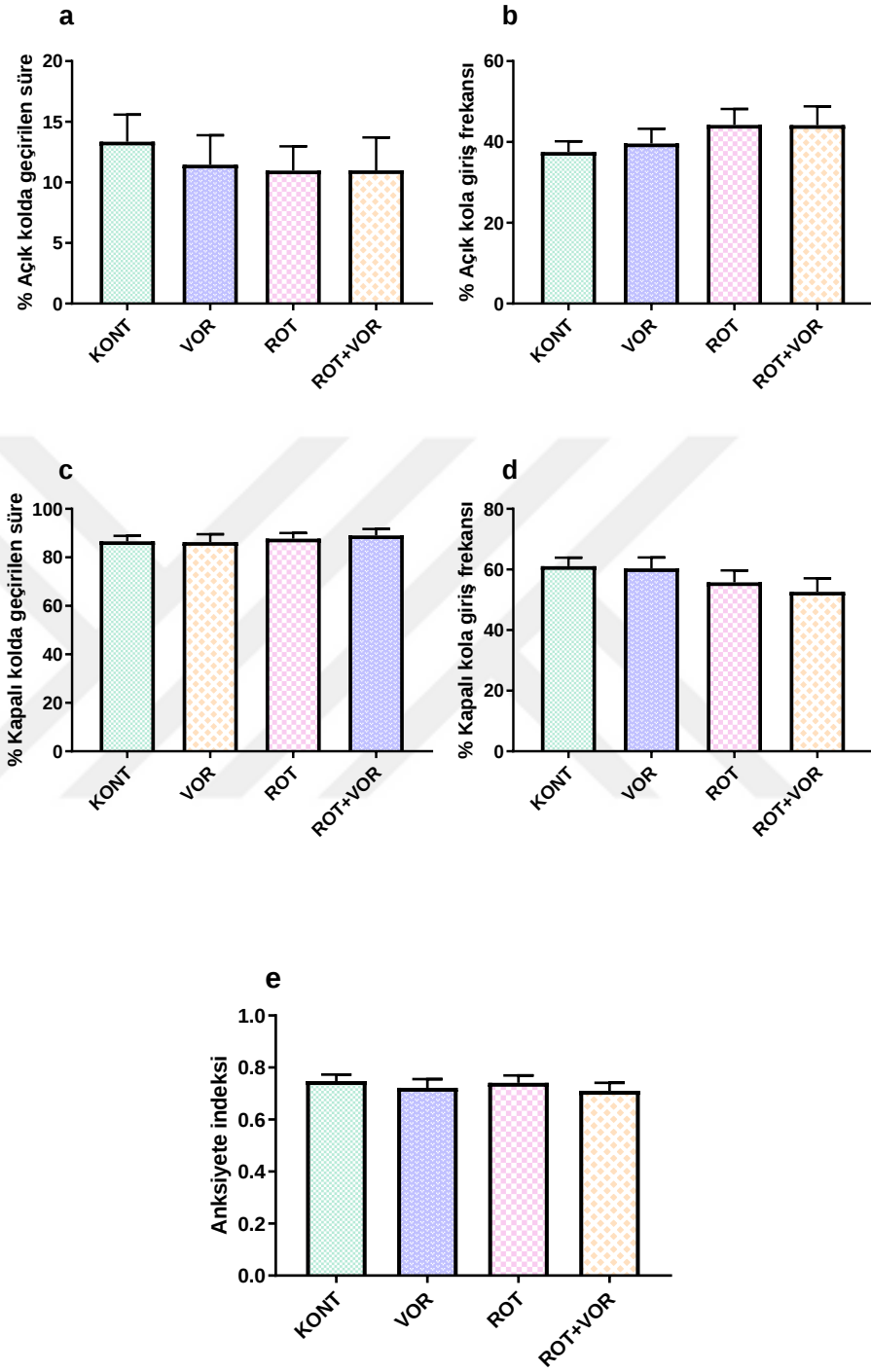


Şekil 4.7. Vortiooksetin uygulamasının Morris'in su tankı testinde değerlendirilen bilişsel performanslar üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. (a) Öğrenme periyotları boyunca platforma ulaşmak için harcanan süre (kaçış gecikmeleri) ve (b) alınan toplam yol, iki yönlü tekrarlı ölçüm ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=15). Test gününde (c) hedef kadranda geçirilen süre ve (d) ortalama hızlar ise tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir. (e) Sıçanların öğrenme periyotlarında gizli platformu aramak için izledikleri yolun temsili (3. gün). (n=15). *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, VOR: Vortiooksetin.

4.5. Vortioksetin Uygulamasının Emosyonel Parametreler Üzerine Etkisi

4.5.1. Vortioksetin Uygulaması Yükseltmiş Artı Labirent Testi ile Değerlendirilen Anksiyete Parametreleri Üzerine Etki Göstermedi

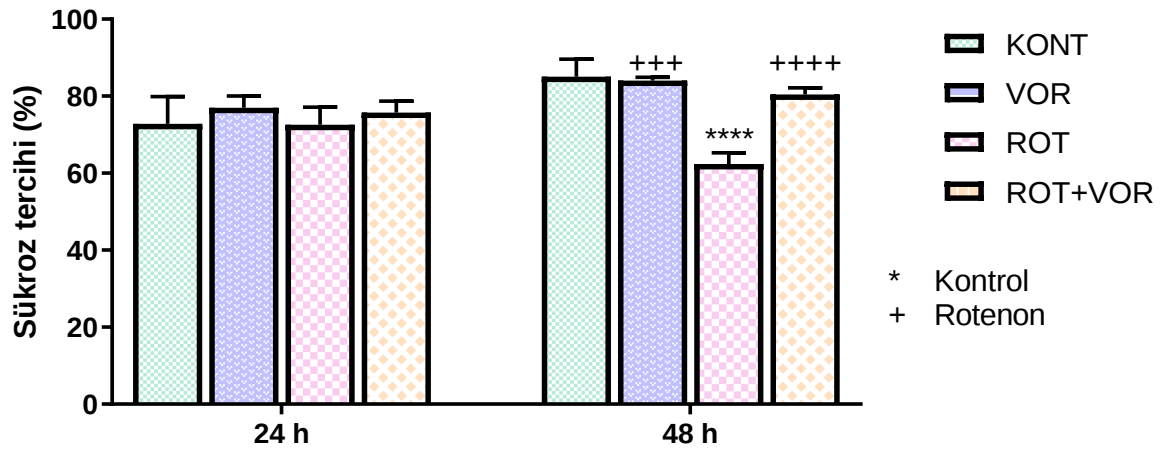
Yükseltilmiş artı labirent testi, anksiyete-benzeri davranışları değerlendirmek için yapıldı. Tüm gruplar için açık ve kapalı kollarda geçirilen sürelerin yüzdesi, açık ve kapalı kollara giriş frekanslarının yüzdesi ve anksiyete indeksi hesaplandı (Şekil 4.8 a-d). Rotenon uygulanan sıçanlar ile kontrol grubu, vortioksetin grubu ve kombinasyon grubu (rotenon+vortioksetin) kıyaslandığında açık ve kapalı kollarda geçirilen sürelerin yüzdesinin ve frekansının yanı sıra hesaplanan anksiyete indeksi değerlerinin de birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. Tek yönlü ANOVA ile yapılan analizler, kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanlar için açık ve kapalı kollarda geçirilen sürelerin yüzdesi, açık ve kapalı kollara giriş frekanslarının yüzdesi ve anksiyete indeksi karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını gösterdi (açık kolda geçirilen sürenin yüzdesi, açık kola giriş frekansının yüzdesi, kapalı kolda geçirilen sürenin yüzdesi, kapalı kola giriş frekansının yüzdesi ve anksiyete indeksi için tek yönlü ANOVA değerleri sırasıyla; $F(3,70) = 0,2503, p=0,8609$; $F(3,67) = 0,7655, p=0,5174$; $F(3,72) = 0,2176, p=0,8839$; $F(3,68) = 1,169, p=0,3279$; $F(3,77) = 0,3455, p=0,7925$).



Şekil 4.8. Yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirilen anksiyete-benzeri davranış parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=15). (a) Açık kolda geçirilen sürenin yüzdesi, (b) açık kola giriş frekansının yüzdesi, (c) kapalı kolda geçirilen sürenin yüzdesi, (d) kapalı kola giriş frekansının yüzdesi, (e) anksiyete indeksi. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioxetin, VOR: Vortioxetin.

4.5.2. Vortioksetin Uygulamasý Sükroz Tercihi Testinde Anhedoni Davranýþlarını Hafifletti

Sükroz tercihi testi, insanlarda ödüllendirici veya eğlenceli aktivitelerden zevk alma deneyiminin azalması olarak tanımlanan ve depresyonun temel belirteci olan anhedoni davranışının sıçanlardaki değerlendirilmesi için yapıldı (Şekil 4.9). 48 saatlik sükroz tercihi testinin adaptasyon sürecinde (ilk 24 saat) gruplar arasında sükroz tercihi açısından anlamlı bir farklılık gösterilmedi (Tek yönlü ANOVA, $F(3,14) = 0,3014$, $p=0,8239$) ancak, 48 saat sonunda grupların sükroz tercihlerinin anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi (Tek yönlü ANOVA, $F(3,8) = 13,79$, $p=0,0016$). 48 saatin sonunda, rotenon uygulaması ile birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda sükroz tercihinin kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu (Tukey post-hoc, $p<0,0001$, $p<0,0001$; sırasıyla). Vortioksetin uygulaması ile birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda, sükroz tercihinin rotenon grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı (Tukey post-hoc $p<0,001$) yani anhedoni davranışının hafiflediği gösterildi. Kontrol, vortioksetin ve rotenon+vortioksetin grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farkın olmadığı gösterildi ($p>0,05$).



Şekil 4.9. Vortioksetin uygulamasının sükroz tercihi üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir ($n=15$). **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, *** $p<0,001$, +++ $p<0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, VOR: Vortioksetin.

4.6. İmmünohistokimyasal Analizler

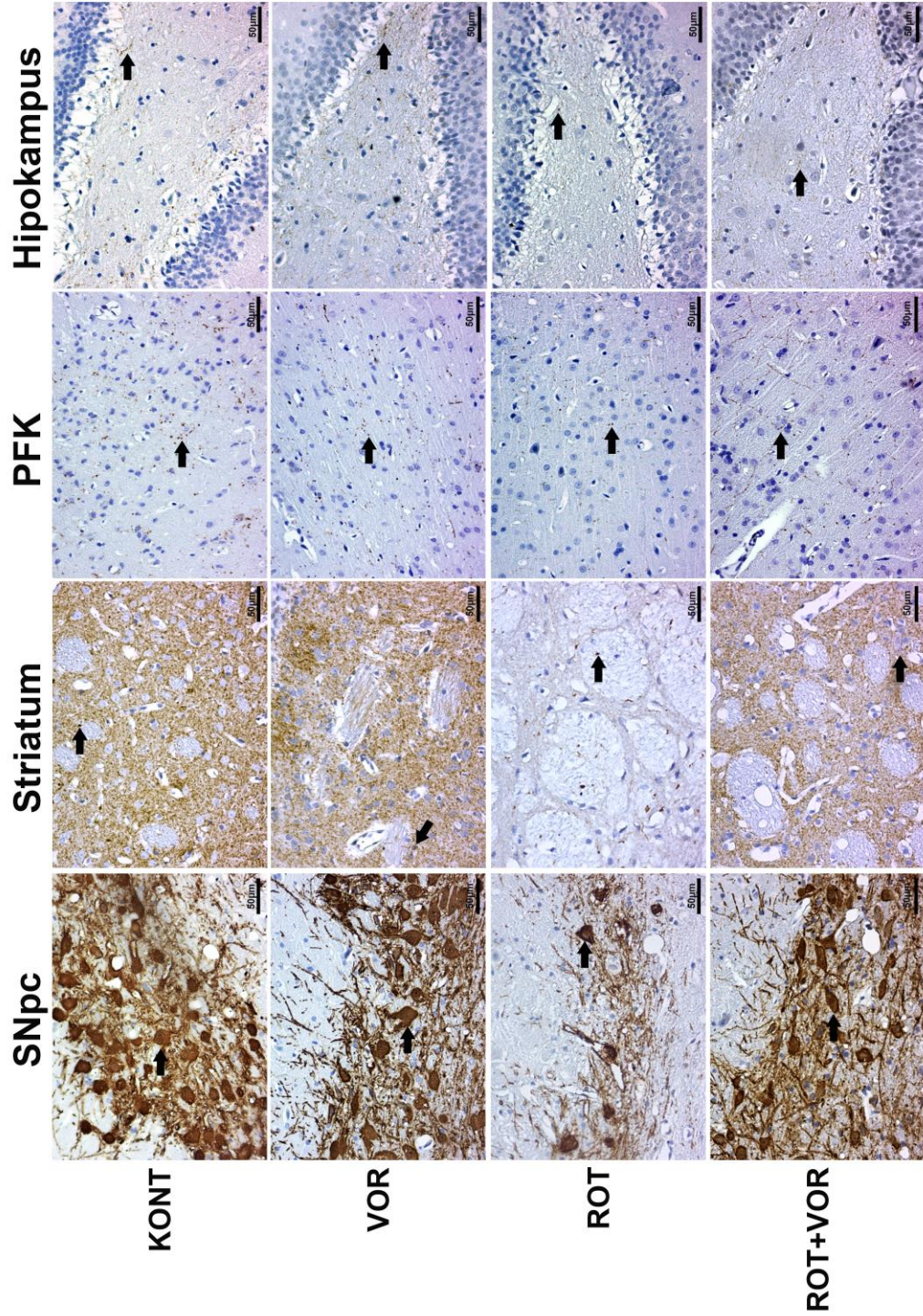
4.6.1. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında Tirozin Hidroksilaz Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların beyin dokularında dopaminerjik nöron belirteci olan TH enziminin SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında gözlenen ekspresyon şiddetleri (Şekil 4.10) analiz edilerek gruplar arası farklılıklar değerlendirildi (Şekil 4.11).

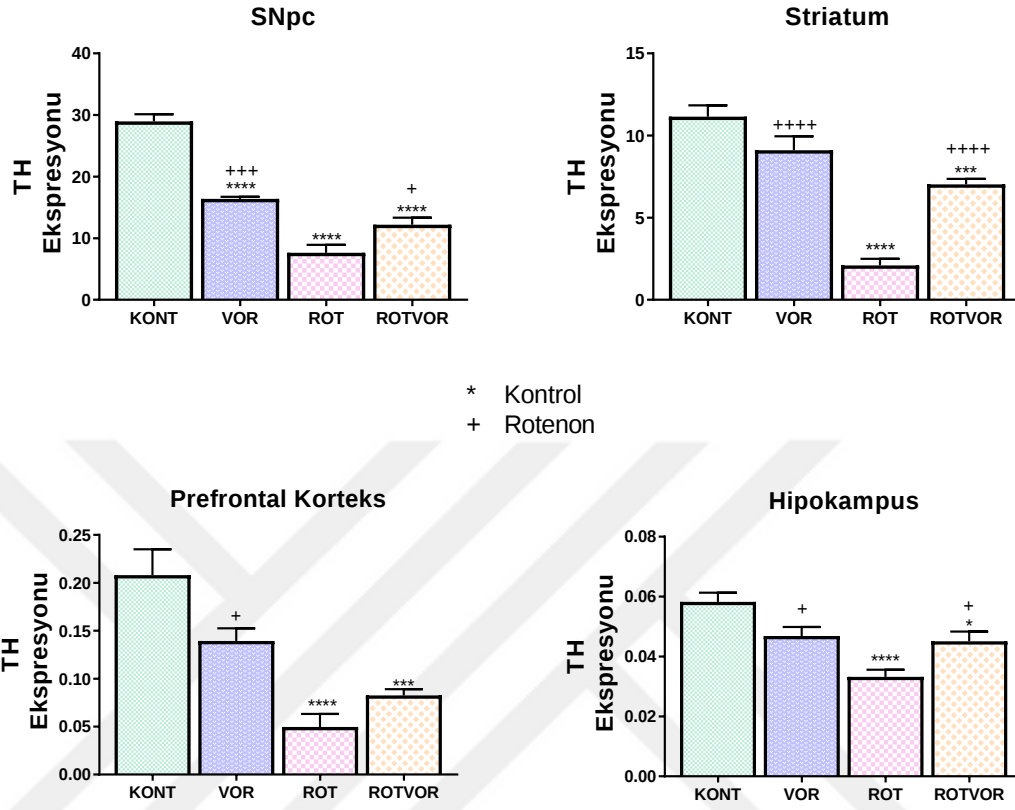
Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların TH ekspresyonları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, $F(3, 16) = 75,23, p < 0,0001$; $F(3, 15) = 46,61, p < 0,0001$; $F(3, 20) = 13,69, p < 0,0001$; $F(3, 16) = 12,19, p = 0,0002$; SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla).

Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizlerde, rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda TH ekspresyon düzeyleri kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüş gösterdi ($p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,0001$ kontrol grubuna göre kıyasla sırasıyla SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için; $p < 0,001, p < 0,0001, p < 0,05, p < 0,05$ vortioksetin grubuna göre kıyasla sırasıyla SNpc, striatum PFK ve hipokampus için). Rotenon+vortioksetin grubunda TH ekspresyon düzeyleri SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük olmasına karşın ($p < 0,0001, p < 0,001, p < 0,001, p < 0,05$; sırasıyla), rotenon grubuna kıyasla, SNpc, striatum, ve hipokampus dokularındaki TH ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0,05, p < 0,0001, p < 0,05$; SNpc, striatum, ve hipokampus için sırasıyla). PFK dokusunda ise rotenon grubu ile rotenon+vortioksetin grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p = 0,6738$). Kontrol ve vortioksetin grupları arasında striatum, PFK ve hipokampus dokularında TH ekspresyon düzeyleri açısından hiçbir dokuda anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen (tüm dokular için $p > 0,05$) SNpc dokusunda yalnızca vortioksetin uygulanan grupta TH ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,001$).

a



Şekil 4.10. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen tirozin hidroksilaz ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı. Oklar, tirozin hidroksilaz+ nöronları göstermektedir. Büyütme oranı 20X, skala bar 50µm'dir.



Şekil 4.11. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında tirozin hidroksilaz immünoaktivitesinin kantitatif analizi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, Image J analizi sonrası tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=5). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, + $p<0,05$, +++ $p<0,001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, VOR: Vortioksetin.

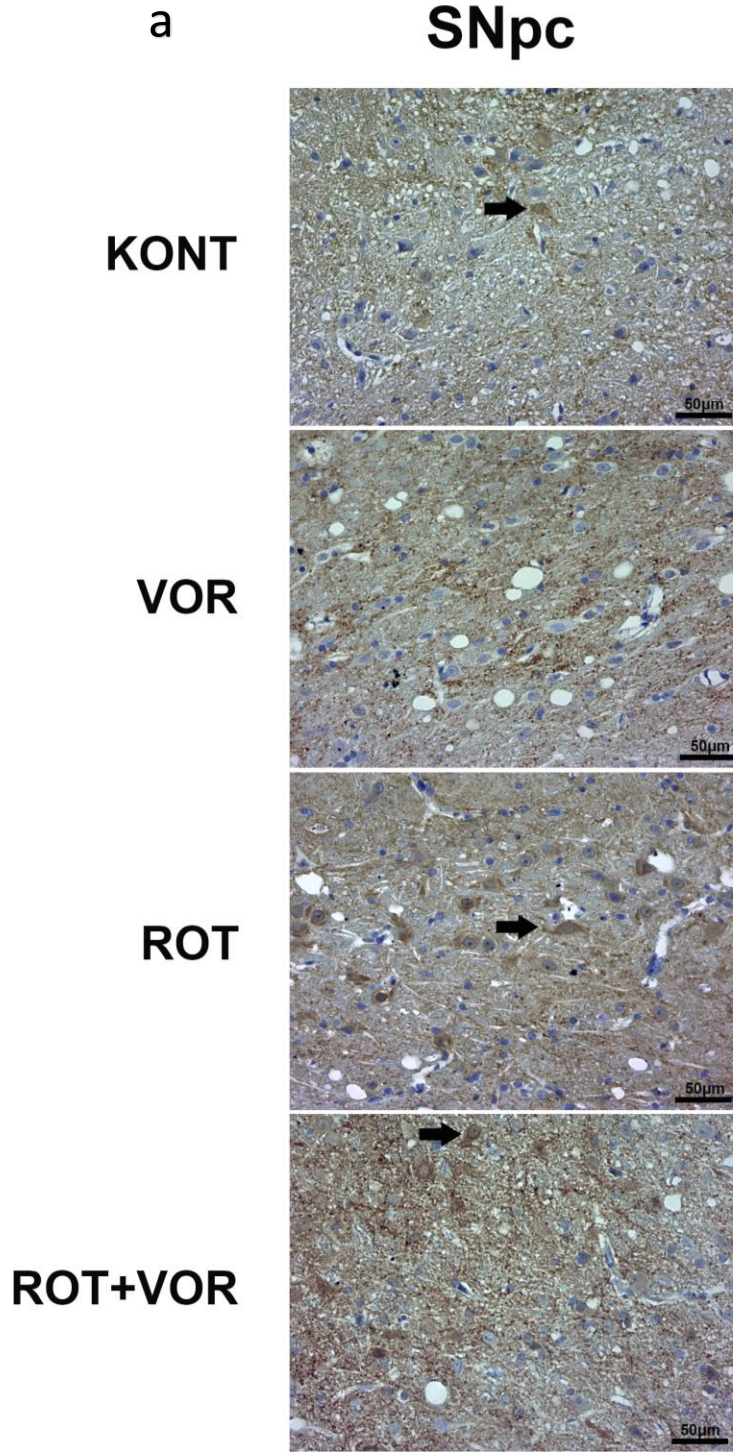
4.6.2. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında α -Sinüklein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların beyin dokularında Lewy cisimciklerinin ana bileşeni olan agrege α -sinükleinin SNpc dokusunda gözlenen ekspresyon şiddetleri (Şekil 4.12) analiz edilerek gruplar arası farklılıklar değerlendirildi (Şekil 4.13).

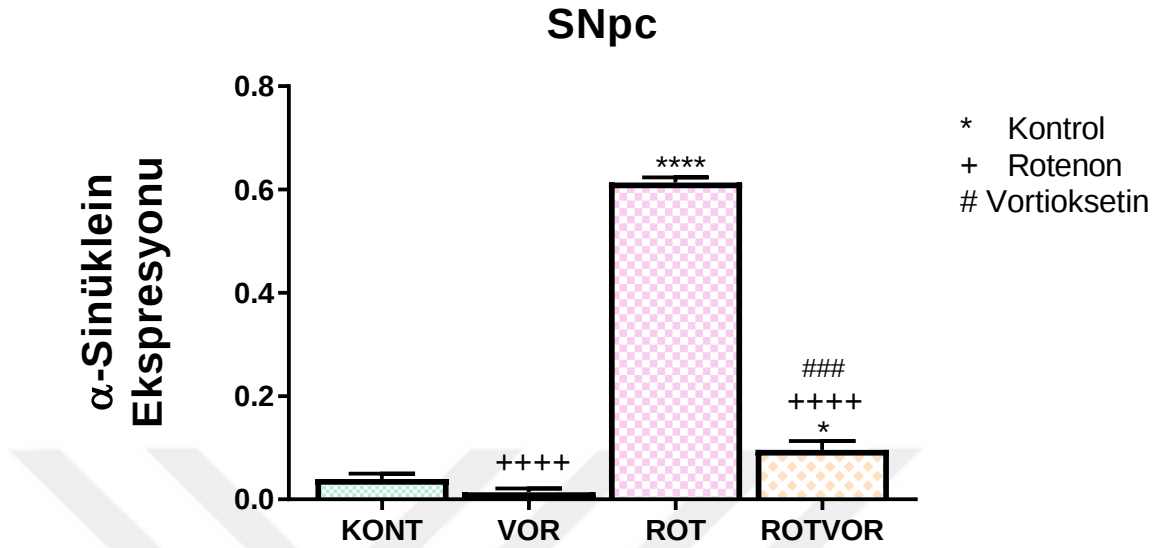
Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların α -sinüklein ekspresyonları karşılaştırıldığında, yalnızca SNpc dokusunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, $F(3, 16) =$

580,7, $p<0,0001$). Striatum, PFK ve hipokampus dokularında agrege olmuş α -sinüklein reaksiyonu gözlenmedi.

Tukey  oklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizlerde, rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda, SNpc dokusunda α -sinüklein ekspresyon düzeyleri kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş gösterdi (her iki grup için $p<0,0001$). Rotenon+vortioksetin grubunda SNpc, dokusunda α -sinüklein ekspresyon düzeyleri, kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olmasına karşın ($p<0,05$ ve $p<0,001$; sırasıyla), rotenon grubuna kıyasla, SNpc dokusunda α -sinüklein ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0,0001$). Kontrol ve vortioksetin grupları arasında α -sinüklein ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$).



Şekil 4.12. Substansiya nigra pars kompakta dokusunda gözlenen α -sinüklein ekspresyon şiddetinin gruplara göre dağılımı. Oklar α -sinüklein ekspresyonu olan nöronları göstermektedir. Büyütme oranı 20X, skala bar 50µm'dir.



Şekil 4.13. Substansiya nigra pars kompakta dokusunda α -sinüklein immünoaktivitesinin kantitatif analizi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, Image J analizi sonrası tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=5). * $p<0,05$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, **** $p<0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık, ### $p<0,001$; Vortiooksetin grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, VOR: Vortiooksetin.

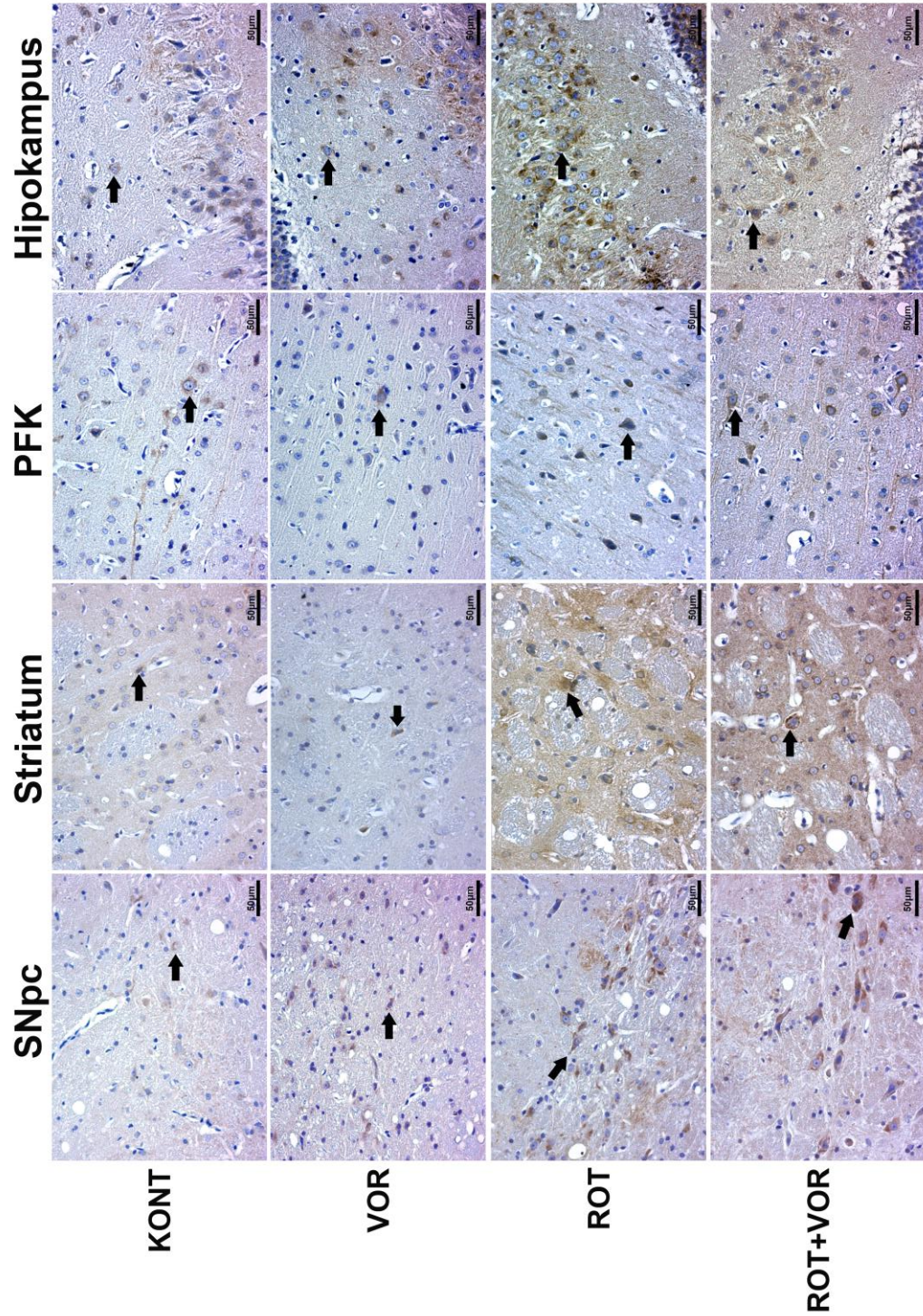
4.6.3. Vortiooksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında Serin-129'da Fosforile Olmuş α -Sinüklein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışma gruplarında yer alan sıçanların beyin dokularında pS129- α -sinükleinin SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında gözlenen ekspresyon şiddetleri (Şekil 4.14) analiz edilerek gruplar arası farklılıklar değerlendirildi (Şekil 4.15).

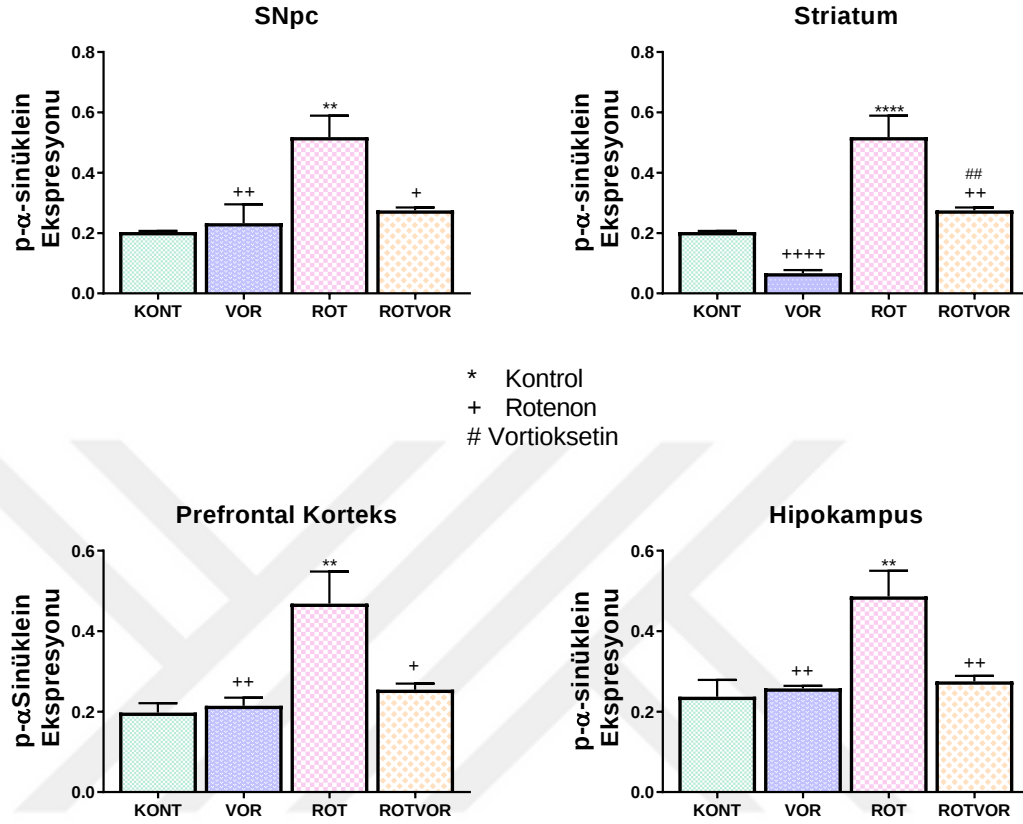
Kontrol, vortiooksetin, rotenon ve rotenon+vortiooksetin gruplarında yer alan sıçanların pS129- α -sinüklein ekspresyonları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($F(3, 16) = 9,096$, $p=0,0010$; $F(3, 16) = 27,15$, $p<0,0001$; $F(3, 16) = 8,351$, $p=0,0014$; $F(3, 16) = 8,8$, $p=0,0011$; SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla).

Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizlerde, rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda fosforile olmuş α -sinüklein ekspresyon düzeyleri kontrol ve vortiooksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,01$, $p<0,0001$, $p<0,01$,

$p<0,01$ kontrol grubuna göre kıyasla sırasıyla SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için; $p<0,01$, $p<0,0001$, $p<0,01$, $p<0,01$ vortioksetin grubuna göre kıyasla sırasıyla SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda, pS129- α -sinüklein ekspresyon düzeyleri rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$, $p<0,01$; SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla). Striatum dokusunda rotenon+vortioksetin grubunda pS129- α -sinüklein ekspresyon düzeyi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak farklılık göstermedi ($p>0,05$) ancak, vortioksetin grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldi ($p<0,01$). Kontrol ve vortioksetin grupları arasında ise pS129- α -sinüklein ekspresyon düzeyleri açısından hiçbir dokuda anlamlı bir farklılık bulunmadı (tüm dokular için $p>0,05$).



Şekil 4.14. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen pS129- α -sinüklein ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı. Oklar, pS129- α -sinüklein ekspresyonu olan nöronları göstermektedir. Büyütme oranı 20X, skala bar 50 μ m'dir.



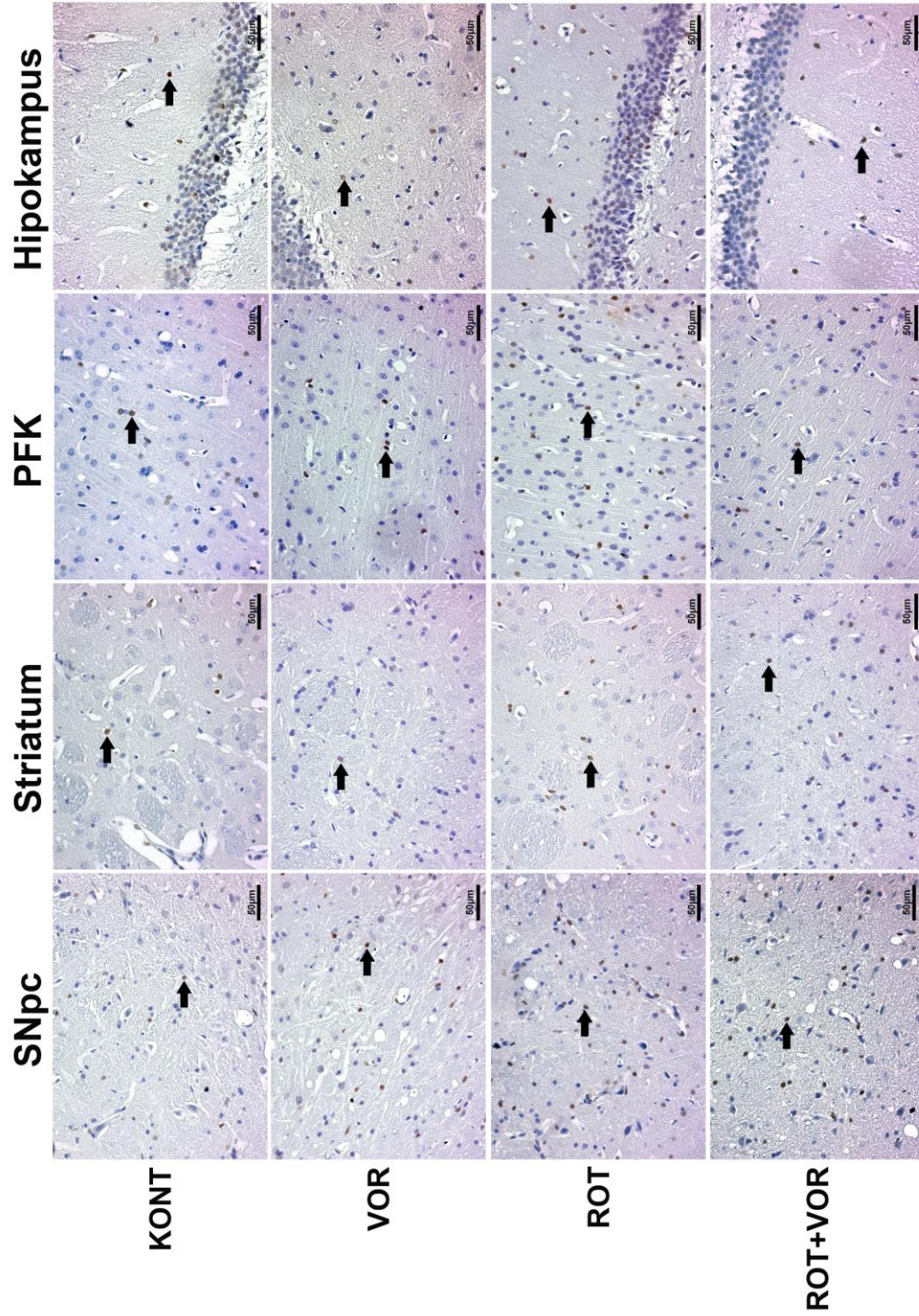
Şekil 4.15. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında pS129-α-sinüklein immünoreaktivitesinin kantitatif analizi Veriler ortalama ± SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, Image J analizi sonrası tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=5). ^{**} $p<0,01$, ^{****} $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, ⁺ $p<0,05$, ⁺⁺ $p<0,01$, ⁺⁺⁺⁺ $p<0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. ^{##} $p<0,01$; Vortioksetin grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, VOR: Vortioksetin.

4.6.4. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında *Cleaved* Kaspaz-3 Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

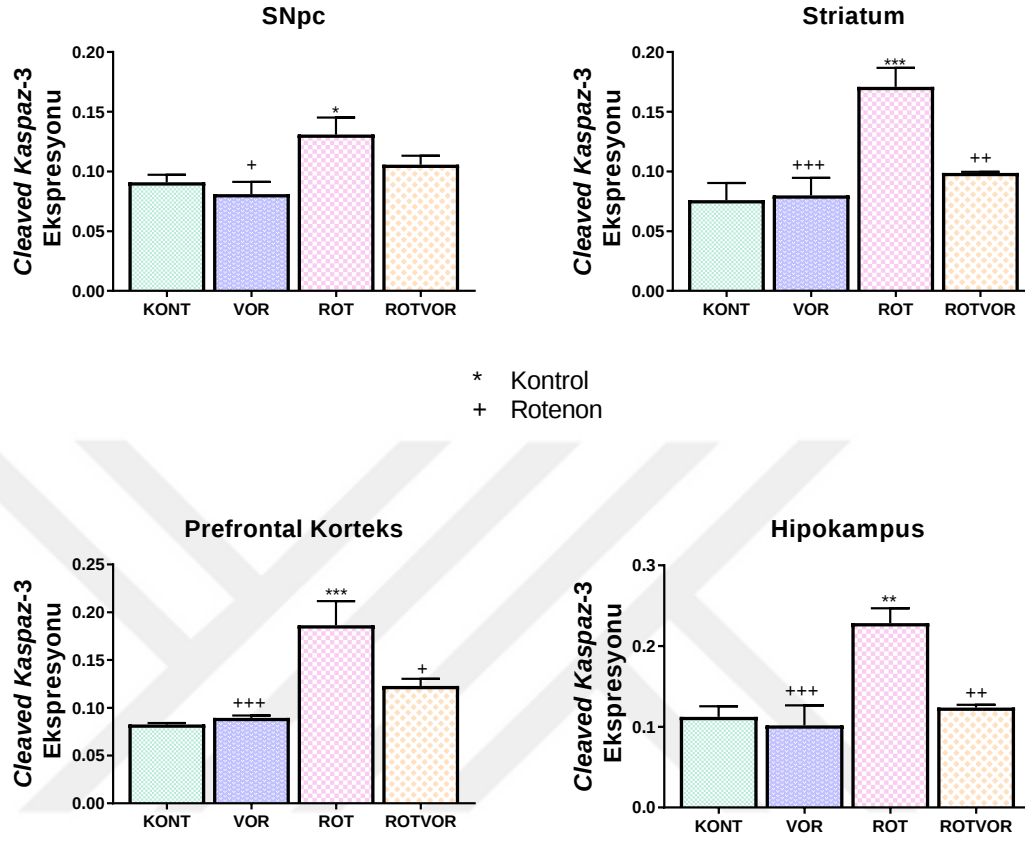
Çalışma gruplarında yer alan sıçanların beyin dokularında, apoptotik süreçte geri dönüşü olmayan yolağı işaret eden *cleaved* kaspaz-3 enziminin SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında gözlenen ekspresyon şiddetleri (Şekil 4.16) analiz edilerek gruplar arası farklılıklar değerlendirildi (Şekil 4.17).

Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularındaki *cleaved* kaspaz-3 ekspresyonları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, $F(3, 21) = 4,731, p=0,0113$; $F(3, 16) = 11,46, p=0,0003$; $F(3, 20) = 12,9, p<0,0001$; $F(3, 16) = 12,15, p=0,0002$; SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla).

Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizlerde, rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda *cleaved* kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri, SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,05, p<0,001, p<0,001, p<0,001$; kontrol grubuna göre kıyasla sırasıyla SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için; $p<0,05, p<0,001, p<0,001, p<0,001$; vortioksetin grubuna göre kıyasla sırasıyla SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda striatum, PFK ve hipokampus dokularındaki *cleaved* kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ($p<0,01, p<0,05, p<0,01$; striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla), SNpc dokusunda ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ($p=0,3129$). Kontrol ve vortioksetin grupları arasında *cleaved* kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri açısından hiçbir dokuda anlamlı bir farklılık bulunmadı (tüm dokular için $p>0,05$).



Şekil 4.16. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen *cleaved* kaspaz-3 ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı. Oklar, *cleaved* kaspaz-3 ekspresyonu olan nöronları göstermektedir. Büyütme oranı 20X, skala bar 50µm'dir.



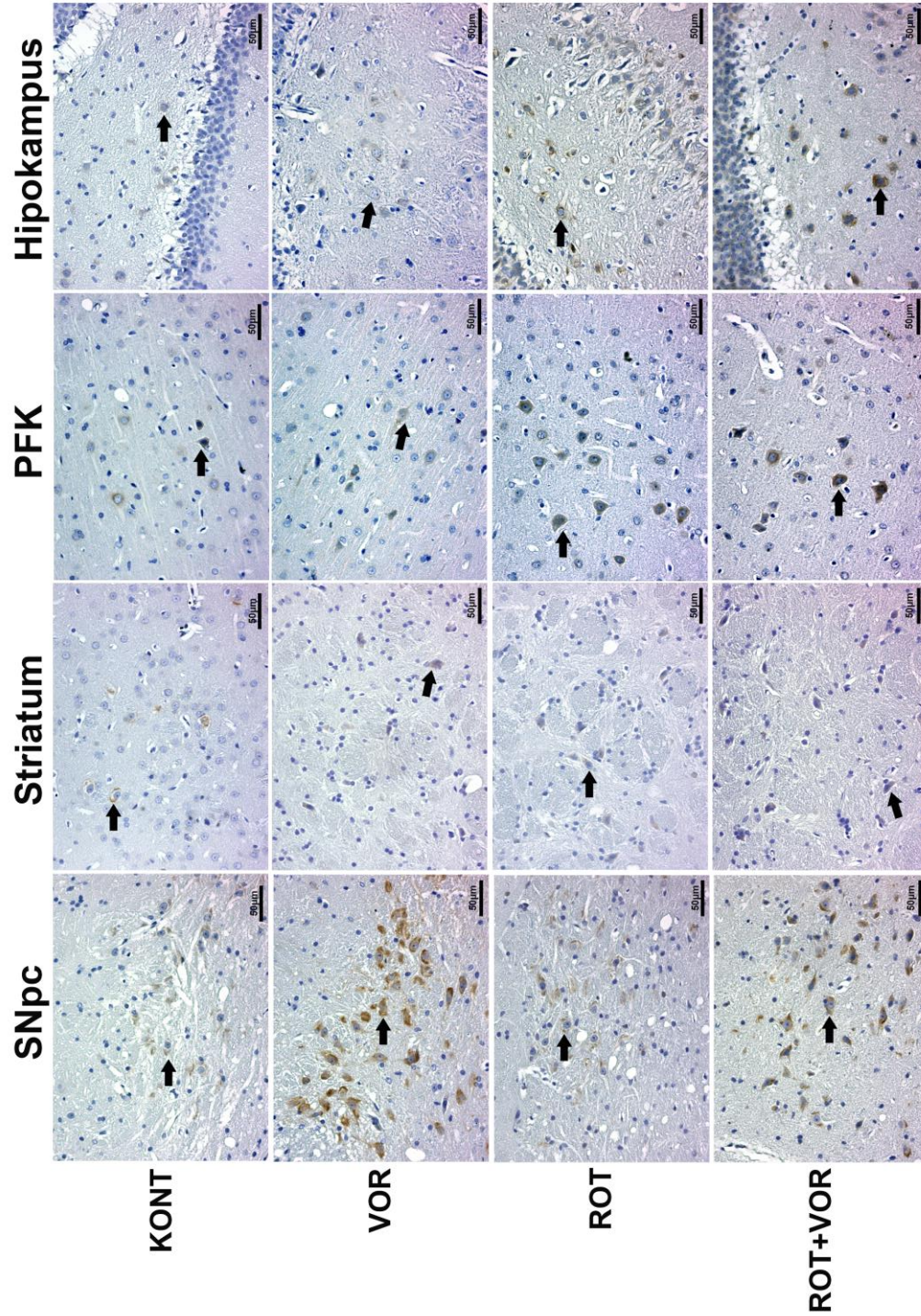
Şekil 4.17. Substansiya nigra pars kompakta striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında *cleaved* kaspaz-3 immünoreaktivitesinin kantitatif analizi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, Image J analizi sonrası tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=5). ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, VOR: Vortiooksetin.

4.6.5. Vortioksetin Uygulamasının Substansiya Nigra Pars Kompakta, Striatum, Prefrontal Korteks ve Hipokampus Dokularında Toll-Benzeri Reseptör-2 Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

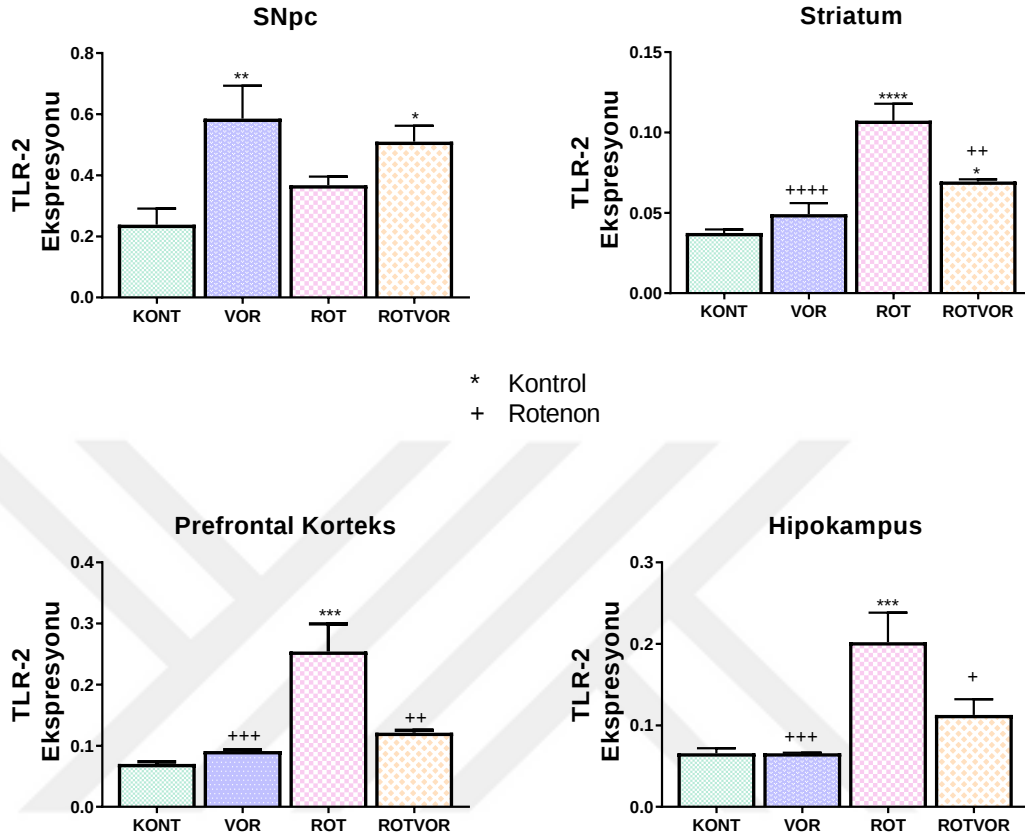
Çalışma gruplarında yer alan sıçanların beyin dokularında TLR-2 reseptörünün SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında gözlenen ekspresyon şiddetleri (Şekil 4.18) analiz edilerek gruplar arası farklılıklar değerlendirildi (Şekil 4.19).

Kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanların TLR-2 ekspresyonları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (Tek yönlü ANOVA, $F(3, 21) = 5,336, p=0,0068$; $F(3, 16) = 22,57, p<0,0001$; $F(3, 16) = 13,09, p=0,0001$; $F(3, 24) = 9,579, p=0,0002$; SNpc, striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla).

Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analizlerde, rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda TLR-2 ekspresyon düzeyleri, striatum, PFK ve hipokampus dokularında kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,0001, p<0,001, p<0,001$; kontrol grubuna göre kıyasla sırasıyla striatum, PFK ve hipokampus için; $p<0,0001, p<0,001, p<0,001$; vortioksetin grubuna göre kıyasla sırasıyla striatum, PFK ve hipokampus için). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda, bu dokulardaki TLR-2 ekspresyon düzeyleri rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ($p<0,01, p<0,01, p<0,05$; striatum, PFK ve hipokampus için sırasıyla). Striatum dokusunda TLR-2 ekspresyon düzeyi, rotenon+vortioksetin grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti ($p<0,05$). İlginç bir şekilde, SNpc dokusunda, TLR-2 ekspresyonu, vortioksetin ve rotenon+vortioksetin gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,01$ ve $p<0,05$; sırasıyla).



Şekil 4.18. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokularında gözlenen Toll-benzeri reseptör-2 ekspresyon şiddetlerinin gruplara göre dağılımı. Oklar Toll-benzeri reseptör-2 ekspresyonu olan nöronları göstermektedir. Büyütme oranı 20X, skala bar 50µm'dir.



Şekil 4.19. Substansiya nigra pars kompakta, striatum, prefrontal korteks ve hipokampus dokusunda Toll-benzeri reseptör-2 immünoreaktivitesinin kantitatif analizi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, Image J analizi sonrası tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=5). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, & $p<0,05$, && $p<0,001$, &&& $p<0,0001$; Vortioksetin grubuna göre anlamlı farklılık. + $p<0,05$, ++ $p<0,01$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortioksetin, SNpc: Substansiya nigra pars kompakta, VOR: Vortioksetin.

4.7. Vortioksetin Uygulamasının Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi

4.7.1. Vortioksetin Uygulamasının Hipokampus, Prefrontal Korteks ve Striatum Dokularında Nörotransmitter Seviyeleri Üzerine Etkisi

Çalışma gruplarına ait hipokampus, PFK ve striatum dokularındaki dopamin, serotonin, noradrenalin, glutamin ve L-glutamik asit düzeyleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılan analizler, kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanlar için hipokampus dokusunda dopamin, serotonin, noradenalin, glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

olduğunu gösterdi (Tek yönlü ANOVA, dopamin, serotonin, glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri için sırasıyla, $F(3, 40) = 50,05, p < 0,0001$; $F(3, 38) = 18,53, p < 0,0001$; $F(3, 40) = 34,47, p < 0,0001$; $F(3, 42) = 24,6, p < 0,0001$; Kruskal Wallis, noradrenalin seviyeleri için, $p = 0,0029$).

Rotenon uygulamasıyla hipokampus dokusunda dopamin, serotonin, glutamin ve L-glutamik asit düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalırken (Tukey post-hoc, $p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,01, p > 0,05$, sırasıyla), noradrenalin seviyeleri değişmedi (Dunn's post-hoc, $p > 0,05$). Dopamin, serotonin, glutamin ve L-glutamik asit seviyelerinde meydana gelen düşüşler vortiksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortiksetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir değişiklik göstermedi (Tukey post-hoc, $p > 0,05$). Yalnızca, noradrenalin seviyelerinde hem kontrol hem de rotenon grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi (Dunn's post-hoc, $p < 0,05$ ve $p < 0,01$, sırasıyla). Sadece vortiksetin uygulaması yapılan sıçan grubunda, kontrol grubuna kıyasla dopamin seviyeleri azaldı (Tukey post-hoc, $p < 0,05$), glutamin ve L-glutamik asit miktarı anlamlı olarak arttı (Tukey post-hoc, $p < 0,01$ ve $p < 0,05$, sırasıyla).

Tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılan analizler, kontrol, vortiksetin, rotenon ve rotenon+vortiksetin gruplarında yer alan sıçanlar için PFK dokusunda dopamin, serotonin, noradrenalin, glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi (Tek yönlü ANOVA, glutamin, L-glutamik asit ve noradrenalin seviyeleri için sırasıyla, $F(3, 39) = 24,98, p < 0,0001$; $F(3, 41) = 24,54, p < 0,0001$; $F(3, 41) = 6,299, p = 0,0013$; Kruskal Wallis, dopamin ve serotonin seviyeleri için, $p < 0,0001$ ve $p = 0,0075$, sırasıyla).

Rotenon uygulamasıyla PFK dokusunda dopamin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı (Dunn's post-hoc, $p < 0,01$), glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri anlamlı olarak arttı (Tukey post-hoc, $p < 0,001$ ve $p < 0,0001$, sırasıyla), noradrenalin ve serotonin seviyeleri ise değişmedi (Tukey post-hoc $p > 0,05$ ve Dunn's post-hoc $p > 0,05$, sırasıyla). Dopamin seviyelerinde meydana gelen düşüşler vortiksetin uygulamasıyla birlikte rotenon+vortiksetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir

değişiklik göstermedi (Tukey veya Dunn's post-hoc, $p>0,05$). Artmış olan glutamin ve L-glutamik asit miktarı rotenon grubuna kıyasla rotenon+vortioksetin grubunda anlamlı olarak azaldı (Tukey post-hoc, $p<0,0001$). Noradrenalin seviyelerinde hem kontrol hem vortioksetin hem de rotenon grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi (Tukey post-hoc, $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,01$, sırasıyla). Serotonin seviyeleri ise rotenon ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak yükseldi (Dunn's post-hoc, $p<0,05$, $p<0,01$, sırasıyla).

Tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılan analizler, kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanlar için striatum dokusunda dopamin, serotonin, glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi (Tek yönlü ANOVA, dopamin, glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri için sırasıyla, $F(3, 38) = 76,02$, $p<0,0001$; $F(3, 40) = 27,71$, $p<0,0001$; $F(3, 39) = 27,99$, $p<0,0001$; Kruskal Wallis, serotonin seviyeleri için, $p<0,0001$). Striatumdaki noradrenalin düzeyleri için kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (Kruskal Wallis, $p= 0,3132$).

Rotenon uygulamasıyla striatum dokusunda dopamin, serotonin, glutamin ve L-glutamik asit düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı (Tukey veya Dunn's post-hoc, $p<0,0001$, $p<0,001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, sırasıyla), noradrenalin seviyeleri ise değişmedi (Dunn's post-hoc, $p>0,05$). Dopamin ve glutamin seviyelerinde meydana gelen düşüşler vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir değişiklik göstermedi (Tukey post-hoc, $p>0,05$). Düşmüş olan serotonin ve L-glutamik asit miktarı, rotenon grubuna kıyasla rotenon+vortioksetin grubunda anlamlı olarak arttı (Tukey veya Dunn's post-hoc, $p<0,01$, $p<0,05$, sırasıyla). Noradrenalin seviyelerinde vortioksetin uygulamasıyla birlikte hiçbir grupta anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi (Dunn's post-hoc, $p>0,05$). Sadece vortioksetin uygulaması yapılan sıçan grubunda, kontrol grubuna kıyasla serotonin seviyeleri azaldı (Dunn's post-hoc, $p<0,05$).

Tablo 4.3. Vortioksetin uygulamasının hipokampus, prefrontal korteks ve striatumda nörotransmitter seviyeleri üzerine etkisi.

	Kontrol	Vortioksetin	Rotenon	Rotenon + Vortioksetin
HİPOKAMPUS				
Dopamin	2,451 ± 0,255	1,745 ± 0,220 ^{++++ *}	0,0620 ± 0,012 ^{****}	0,0878 ± 0,011 ^{****, ###}
Serotonin	0,204 ± 0,036	0,155 ± 0,199 ⁺⁺	0,0482 ± 0,006 ^{****}	0,0325 ± 0,004 ^{****, ##}
Noradrenalin	1,563 ± 0,012	1,294 ± 0,074	1,554 ± 0,011	0,988 ± 0,103 ^{*, ++}
Glutamin	2,035 ± 0,060	2,399 ± 0,065 ^{**, +++++}	1,638 ± 0,037 ^{**}	1,6 ± 0,083 ^{***, ####}
L- Glutamik asit	5,498 ± 0,023	6,28 ± 0,017 ^{*, +++++}	4,651 ± 0,136 [*]	4,211 ± 0,193 ^{****, ####}
PREFRONTAL KORTEKS				
Dopamin	0,77 ± 0,14	0,853 ± 0,153 ⁺⁺	0,064 ± 0,006 ^{**}	0,047 ± 0,006 ^{****, ####}
Serotonin	0,054 ± 0,019	0,021 ± 0,010	0,023 ± 0,008	0,068 ± 0,005 ^{+, ##}
Noradrenalin	0,466 ± 0,095	0,555 ± 0,07	0,493 ± 0,069	0,136 ± 0,013 ^{*, ++, ##}
Glutamin	1,126 ± 0,041	0,908 ± 0,040 ^{*, +++++}	1,495 ± 0,08 ^{***}	0,925 ± 0,047 ⁺⁺⁺⁺
L- Glutamik asit	3,094 ± 0,182	2,693 ± 0,131 ⁺⁺⁺⁺	4,429 ± 0,224 ^{****}	2,562 ± 0,121 ⁺⁺⁺⁺
STRIATUM				
Dopamin	3,074 ± 0,284	2,647 ± 0,208 ⁺⁺⁺⁺	0,0877 ± 0,014 ^{****}	0,0815 ± 0,009 ^{****, ####}
Serotonin	0,2427 ± 0,039	0,1026 ± 0,008 [*]	0,0770 ± 0,0167 ^{***}	0,1803 ± 0,023 ⁺⁺
Noradrenalin	0,516 ± 0,072	0,636 ± 0,129	0,706 ± 0,051	0,645 ± 0,078
Glutamin	1,409 ± 0,026	1,314 ± 0,061 ⁺⁺⁺⁺	0,899 ± 0,044 ^{****}	1,016 ± 0,04 ^{****, ##}
L- Glutamik asit	3,153 ± 0,052	3,213 ± 0,134 ⁺⁺⁺⁺	2,071 ± 0,082 ^{****}	2,552 ± 0,113 ^{**, +, ##}

Veriler ortalama ± SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, tek yönlü ANOVA veya Kruskal-Wallis ve ardından Tukey veya Dunn's post-hoc kullanılarak değerlendirilmiştir (n=10). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, #### $p<0,0001$; Vortioksetin grubuna göre anlamlı farklılık + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,0001$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık.

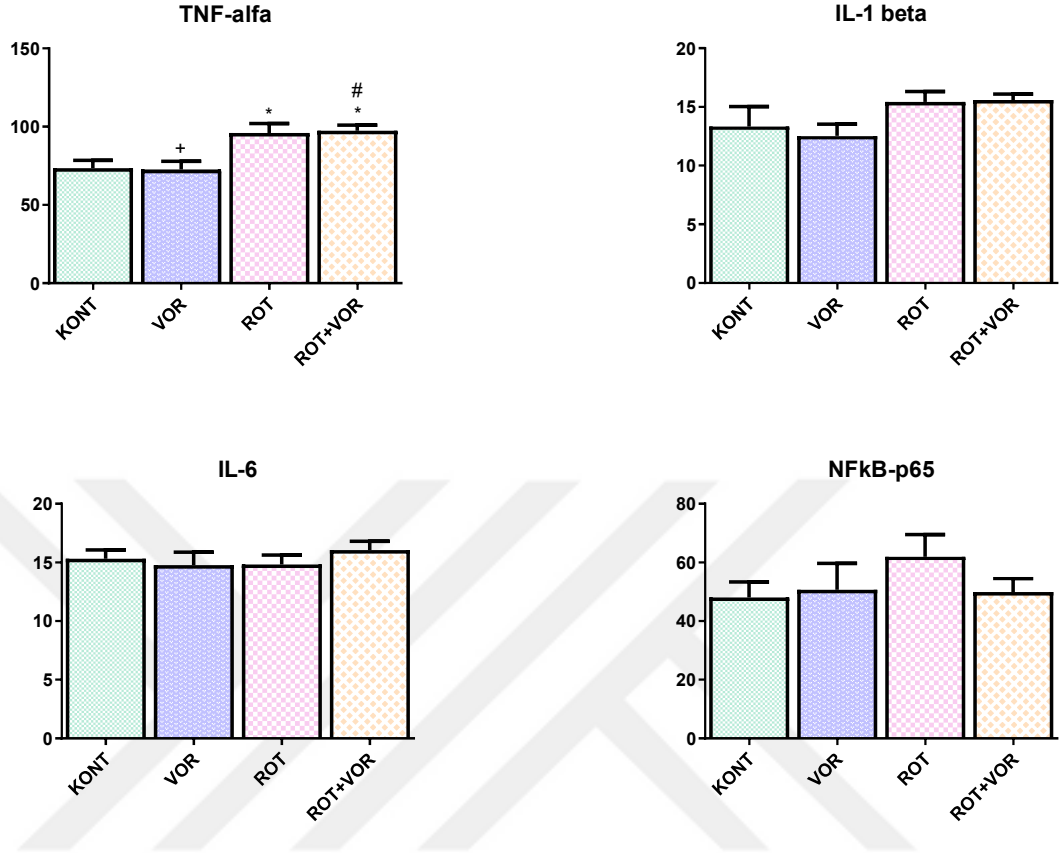
4.7.2. Vortioksetin Uygulamasının Hipokampus, Prefrontal Korteks ve Striatum Dokularında Proinflamatuvar Sitokinler ve NFκB-p65 Seviyeleri Üzerine Etkisi

Çalışma gruplarına ait hipokampus, PFK ve striatum dokularında proinflamatuvar sitokin ve NFκB-p65 seviyelerinde meydana gelen değişimler sırasıyla Şekil 4.20, 4.21, 4.22’de gösterilmiştir.

Tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılan analizler kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanlar için hipokampus dokusunda TNF-α ve IL-1β seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi (Şekil 4.10, Tek yönlü ANOVA, TNF-α ve NFκB-p65 seviyeleri için sırasıyla; $F(3, 29) = 6,422, p=0,0018$; Kruskal Wallis, IL-1β seviyeleri için, $p=0,0470$). Hipokampustaki IL-6 ve NFκB-p65 seviyeleri için kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.10, Kruskal Wallis, $p=0,1754$; Tek yönlü ANOVA, NFκB-p65 için $F(3, 34) = 2,325, p=0,0922$).

Rotenon uygulamasıyla hipokampus dokusunda kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla yalnızca TNF-α seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi (Tukey post-hoc, her iki grup için $p<0,05$). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, TNF-α seviyelerindeki bu artışta rotenon+vortioksetin grubunda, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi (Tukey post-hoc, $p>0,05$). Hipokampustaki IL-β düzeylerinin, rotenon+vortioksetin grubunda, yalnızca vortioksetin uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (Dunn’s post-hoc, $p<0,05$). IL-6 ve NFκB-p65 seviyelerinde ise hiçbir grup arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Dunn’s veya Tukey post-hoc, tümü için $p>0,05$).

Hipokampus



Şekil 4.20. Vortiooksetin uygulamasının hipokampus dokusunda proinflatuvar sitokinler ve NFkB-p65 seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA veya Kruskal-Wallis ve ardından Tukey veya Dunn's post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=10). * $p < 0,05$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # $p < 0,05$; Vortiooksetin grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, VOR: Vortiooksetin.

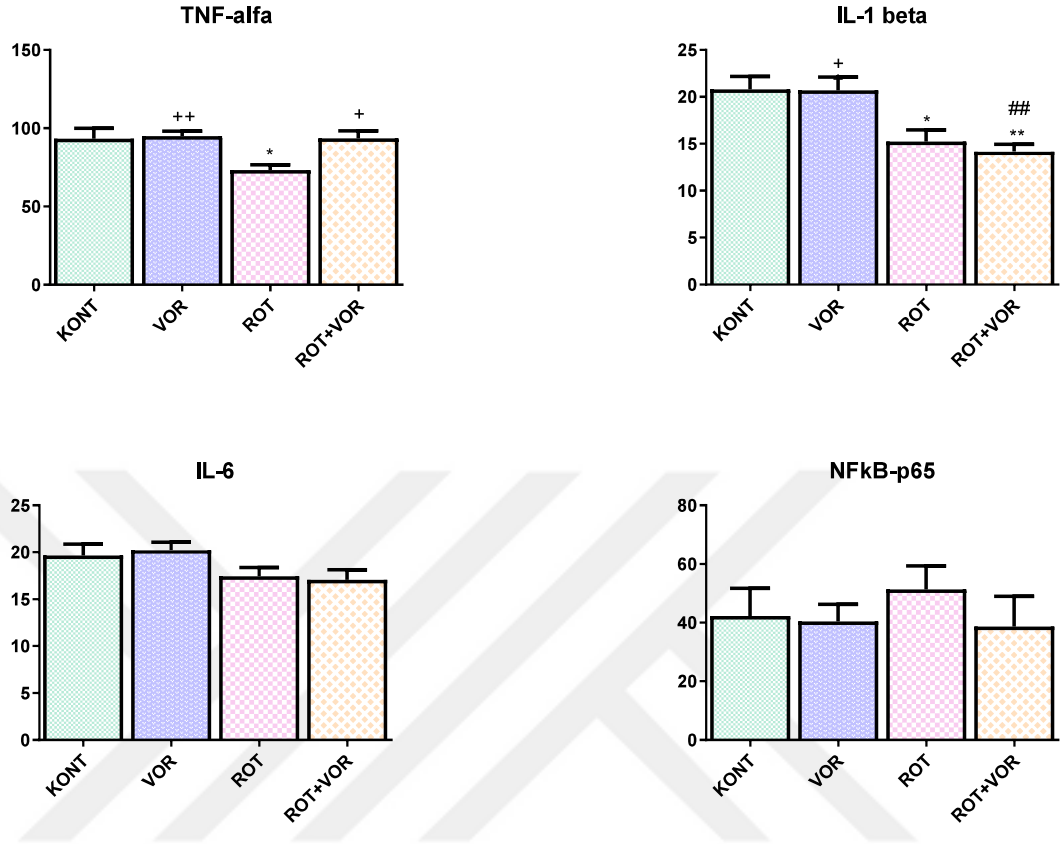
Tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılan analizler kontrol, vortiooksetin, rotenon ve rotenon+vortiooksetin gruplarında yer alan sıçanlar için PFK dokusunda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi (Şekil 4.11, Tek yönlü ANOVA, IL-1 β ve IL-6, seviyeleri için sırasıyla; $F(3, 39) = 10,66$, $p < 0,0001$ ve $F(3, 40) = 5,252$, $p = 0,0038$; Kruskal Wallis, TNF- α seviyeleri için, $p = 0,0030$). PFK'deki NFkB-p65 seviyeleri için kontrol, vortiooksetin, rotenon ve rotenon+vortiooksetin grupları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (Şekil 4.11, Tek yönlü ANOVA, $F(3, 29) = 1,736$, $p = 0,1816$).

Rotenon uygulamasıyla PFK dokusunda kontrol ve/veya vortioksetin gruplarına kıyasla TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi (TNF- α için, Dunn's post-hoc, $p<0,01$ ve $p<0,05$, sırasıyla; IL-1 β için, Tukey post-hoc, $p<0,001$ ve $p<0,05$, sırasıyla; IL-6 için, Tukey post-hoc, kontrol vs rotenon $p<0,05$). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinde meydana gelen bu düşüşlerde, rotenon+vortioksetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi (tümü için $p>0,05$). PFK'deki IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin rotenon+vortioksetin grubunda, vortioksetin grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü (Tukey post-hoc, $p<0,01$ ve $p<0,05$, sırasıyla). PFK'deki NF κ B-p65 seviyelerinde ise hiçbir grup arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tukey post-hoc, tüm gruplar için $p>0,05$).

Tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılan analizler kontrol, vortioksetin, rotenon ve rotenon+vortioksetin gruplarında yer alan sıçanlar için striatum dokusunda TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve NF κ B-p65 seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi (Şekil 4.12, Tek yönlü ANOVA, TNF- α ve NF κ B-p65 seviyeleri için sırasıyla; $F(3, 36) = 4,835$, $p=0,0063$ ve $F(3, 31) = 6,098$, $p=0,0022$; Kruskal Wallis, IL-1 β ve IL-6 seviyeleri için sırasıyla, $p=0,0083$ ve $p=0,0099$).

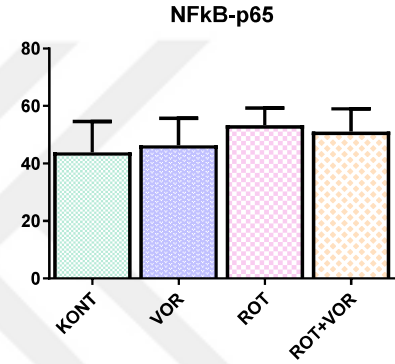
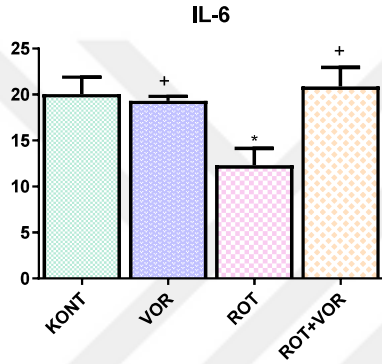
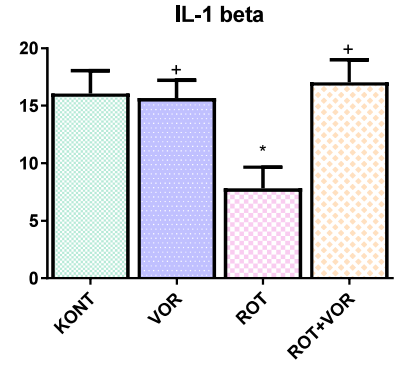
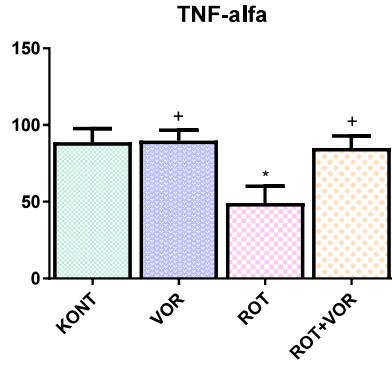
Rotenon uygulamasıyla striatum dokusunda kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinde anlamlı bir düşüş (TNF- α için, Tukey post-hoc, $p<0,01$ ve $p<0,05$ sırasıyla; IL-1 β için, Dunn's post-hoc, her iki grup için de $p<0,05$; IL-6 için, Dunn's post-hoc, her iki grup için de $p<0,05$), NF κ B-p65 seviyelerinde ise anlamlı bir artış gözlemlendi (Tukey-post-hoc, $p<0,01$ ve $p<0,05$ sırasıyla). Vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinde rotenon grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş (TNF- α için, Tukey post-hoc, $p<0,05$; IL-1 β için, Dunn's post-hoc, $p<0,05$; IL-6 için, Dunn's post-hoc, $p<0,05$), NF κ B-p65 seviyelerinde ise anlamlı bir düşüş gözlemlendi (Tukey-post-hoc, $p<0,05$).

Prefrontal korteks



Şekil 4.21. Vortiooksetin uygulamasının prefrontal korteks dokusunda proinflamatuvar sitokinler ve NFkB-p65 seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, tek yönlü ANOVA veya Kruskal-Wallis ve ardından Tukey veya Dunn's post-hoc kullanılarak değerlendirilmiştir (n=10). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # $p<0,05$, ## $p<0,01$; Vortiooksetin grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiooksetin, VOR: Vortiooksetin.

Striatum



Şekil 4.22. Vortiksetin uygulamasının striatum dokusunda proinflatuvar sitokinler ve NFκB-p65 seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama ± SEM olarak gösterilmiştir. İstatiksel analizler, tek yönlü ANOVA veya Kruskal-Wallis ve ardından Tukey veya Dunn's post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (n=10). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, ⁺ $p < 0,05$; Rotenon grubuna göre anlamlı farklılık. KONT: Kontrol, ROT: Rotenon, ROT+VOR: Rotenon+Vortiksetin, VOR: Vortiksetin.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, serotonerjik bir modölatör olan vortiksetinin rotenon ile indüklenen PH sıçan modelinde motor fonksiyonlar, depresyon-benzeri davranışlar ve bilişsel disfonksiyon üzerine olan etkilerini ve bu etkilerin moleküler mekanizmalarını aydınlatabilmek amacıyla planlandı. Çalışmadan elde edilen veriler, vortiksetinin rotenon ile indüklenen PH sıçan modelinde TLR-2 ekspresyon seviyeleri üzerindeki inhibitör etkileri, bölgeye-özü immunomodölatör yanıtlar ve nörotransmitter seviyelerinde meydana gelen değişiklikler aracılığıyla nöroprotektif ve prokognitif etkiler göstererek PH'nin motor ve motor olmayan bulgularını iyileştirdiğini göstermektedir. Bu çalışma, vortiksetinin deneysel PH modelinde antiparkinson, antidepresan ve prokognitif etkilerini bildiren ilk araştırmadır.

Doğru bir deneysel PH modeli, hastalıkta görülen yavaş, ilerleyici ve seçici nigrostriatal dopaminerjik dejenerasyonu taklit edebilmelidir (Zhang ve ark., 2017b). Bu tez çalışmasında, son derece lipofilik bir molekül olması sayesinde dopamin taşıyıcı proteini kullanarak hücre içine giren diğer nörotoksinlerden farklı olarak kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen rotenon sistemik olarak uygulanarak deneysel PH modeli oluşturulmuştur (Peshattiwar ve ark., 2020). Hücre içine kolayca geçebilen rotenon, mitokondriyal kompleks I'i inhibe ederek oksidatif strese yol açar ve hücre ölümünü indükler. Deneysel PH modeli oluşturmak için uygulanan rotenonun bir diğer avantajı, SNpc'de α -sinüklein fibrillerinin oluşumunu indüklemesidir (Cannon ve ark., 2009). Rotenon uygulamasının neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon ve ilişkili oksidatif stres, glial hücreleri aktif hale getirerek nöroinflamasyonu tetikler. Ayrıca, α -sinükleinin oksidatif modifikasyonları ve agregasyonu da nöroinflamasyon için güçlü bir uyarıcıdır (Thakur ve Nehru, 2015). Bu çalışmada, sıçanlara 28 gün boyunca sistemik olarak uygulanan rotenon, PH semptomlarını başarılı bir şekilde taklit ederek lokomotor aktivitede (açık alan testi) ve motor koordinasyonda (rotarod testi) azalmaya, katelepsi performansında ise (dikey tel testi) artışa yol açtı. Rotenonun subkütan uygulaması, kolay, basit ve etkili bir tekniktir. Ancak, literatürde bildirilen geniş doz aralığı (1.25–5 mg/kg/gün), bu teknikte optimum doz seçimini zorlaştırmaktadır. Çalışmada, Zhang ve

ark.'nın önceki çalışmasına dayanarak (Zhang ve ark., 2017b) rotenon dozunun 2 mg/kg seçilmesi ile hem deney hayvanlarında PH semptomları başarılı bir şekilde taklit edildi hem de rotenon uygulamasının kısıtlamalarından olan anlamlı kilo kaybı ve sistemik toksisite sonucu görülen yüksek mortalite oranlarının önüne geçildi.

Deneyssel modellerde, davranış testleri uygulanan hayvanların PH patogenezi ile uyumlu olarak, verdikleri yanıtların bozulduğu veya değiştiği bilinmektedir (Asakawa ve ark., 2016). Bu çalışmada rotenon, önceki çalışmalara benzer şekilde motor ve motor olmayan fonksiyonları değerlendiren davranış testlerinde önemli bozukluklara yol açtı (Medeiros-Linard ve ark., 2018; Haider ve ark., 2020). Rotarod testinde, rotenon uygulamasıyla sıçanların dönen çubuk üzerinde kalma süresi kontrol ve vortiksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak azaldı. Kronik vortiksetin uygulamasıyla birlikte sıçanların dönen çubuk üzerinde kalma süreleri rotenon grubuna göre anlamlı olarak arttı. Ancak, rotenon+vortiksetin grubunda gözlemlenen bu motor iyileşme, kontrol ve tek başına vortiksetin uygulanan gruptaki sıçanlara göre anlamlı olarak daha zayıftı. “Donup kalma” olarak tanımlanan katatoni davranışını değerlendiren dikey tel testinde de rotenon grubundaki sıçanlar, kontrol ve vortiksetin gruplarına kıyasla daha uzun süre hareketsiz kaldı. Bu süreler, kronik vortiksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortiksetin grubunda, rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu. Lokomotor aktivitenin değerlendirildiği açık alan testinde, alınan toplam yol, ortalama hız ve kadranslar arası geçiş sayısı değerlendirildi. Kronik rotenon uygulamasıyla, her üç skorda da kontrol ve vortiksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma meydana geldi. Bu hipokinetik davranışlar, kronik vortiksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortiksetin grubunda anlamlı olarak azaldı ve değerlendirilen skorlarda artış gösterildi. Rotarod testinde olduğu gibi açık alan testinde de vortiksetin uygulamasıyla elde edilen iyileşmeler, kontrol ve sadece vortiksetin uygulanan gruplara kıyasla anlamlı olarak daha zayıf bulundu. Bu sonuçlardan hareketle, kronik vortiksetin uygulamasının PH’de rotenon ile indüklenen nörodejenerasyon üzerinde olumlu etkiler göstererek motor fonksiyonlarda iyileşme sağladığı ancak, nörodejeneratif süreci tamamen geri çeviremediği söylenebilir. Bu bulgular, rotenon uygulanan sıçanların striatum dokusundaki dopamin seviyeleri ile uyumlu olmakla birlikte, rotenon+vortiksetin grubunda dopamin düzeylerinin rotenon grubundan farklı olmadığı görüldü. Çalışma

gruplarında, rotenon uygulaması ile striatumdaki dopamin seviyeleri kontrol ve vortiooksetin gruplarına kıyasla dramatik olarak düştü ve kronik vortiooksetin uygulaması ile rotenon+vortiooksetin grubundaki dopamin düzeyleri ile rotenon grubundaki sıçanların striatum dokularındaki dopamin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

PH, motor semptomların yanı sıra, hastalığın erken evrelerinde bile gözlemlenebilen motor olmayan semptomlarla karakterizedir (Schapira ve ark., 2017). Dopaminerjik, serotonerjik ve noradrenerjik sistemlerde meydana gelen hasarların PH'deki depresyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kano ve ark., 2011). PH'de SNpc'de meydana gelen dopaminerjik nörodejenerasyon sonucu ödül ve motivasyonla ilgili bölge olan ventral striatum daha az uyarılmaya başlar (Borgonovo ve ark., 2017). Limbik kortikal alanlar ile ventral striatum arasındaki bu döngüde meydana gelen dopaminerjik disfonksiyon, depresyon gibi motivasyonel bozukluklarla; PFK gibi assosiasyon korteksi alanları ile kaudat çekirdek arasındaki döngüde meydana gelen dopaminerjik disfonksiyon ise bilişsel semptomlarla ilişkilidir (Borgonovo ve ark., 2017). PH'de dopamin kaybına ek olarak, noradrenalin seviyelerinde de LC'nin dejenerasyona uğraması ile ilişkili olarak azalma meydana geldiği bilinmektedir (Remy ve ark., 2005). Daha önceki çalışmalarda, rotenon uygulaması ile striatum ve/veya hipokampus dokularında dopaminin yanı sıra 5-HT ve noradrenalin düzeylerinde de azalma rapor edilmiştir (Moraes ve ark., 2012; Khurana ve Gajbhiye, 2013; Kandil ve ark., 2016; Motawi ve ark., 2020). İlginç bir şekilde, rotenon uygulaması ile striatum dokusunda noradrenalin miktarında artış gösterilen çalışmalar da mevcuttur (Abdel-Salam ve ark., 2014a; Abdel-Salam ve ark., 2014b). Sükroz tercihi testi, kemirgenlerde depresyon-benzeri bulgulardan biri olan anhedoni davranışını tespit edebilmek için sıklıkla kullanılan bir modeldir (Liu ve ark., 2018). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulaması, sükroz tercihi testinde azalmış sükroz tüketimi skorlarıyla ilişkili olarak depresyon-benzeri davranışları artırdı. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak dopamin düzeyleri striatum, PFK ve hipokampus dokularında; 5-HT düzeyleri striatum ve hipokampus dokularında anlamlı olarak azaldı ancak noradrenalin seviyelerinde striatum, PFK ve hipokampus dokularında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Kronik vortiooksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortiooksetin grubunda PFK ve striatum dokusunda 5-HT seviyeleri rotenon grubuna kıyasla anlamlı artış gösterdi. Bu sonuçlara göre, vortiooksetinin rotenonla indüklenen PH modelinde antidepresan-benzeri

etkilerinden PFK ve striatumda artmış olan 5-HT seviyelerinin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca PH'de meydana gelen nörokimyasal değişikliklerin anksiyete gelişimine neden olabileceği de bilinmektedir (Prediger ve ark., 2012). Rotenonla indüklenen PH hayvan modellerinde anksiyete bulgularının da patolojiye eşlik ettiği gösteren çalışmalara rağmen (Shallie ve ark., 2017; Rao ve ark., 2019), Nosedo ve ark., rotenonun anksiyojenik benzeri bir etkiye neden olmadığını bildirmiştir (Nosedo ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında, anksiyete benzeri davranışlar, yükseltilmiş artı labirent testi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen bulgular, kronik rotenon ve/veya vortiksetin uygulamasının açık ve kapalı kolları geçiren sürelerin yüzdesi, açık ve kapalı kolları giriş frekanslarının yüzdesi ve anksiyete indeksi değerlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Farklı sıçan türlerinin ve farklı deney koşullarının, anksiyete testinin sonucu üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Rex ve ark., 2004). Rex ve ark., Sprague Dawley sıçanların yeni çevreye daha iyi uyum sağladıklarını ve Wistar sıçanlardan daha az anksiyeteye sahip olduklarını bildirmiştir (Rex ve ark., 2004). Dolayısıyla, bu çalışmada uygulanan protokole veya kullanılan deney hayvanlarının türüne bağlı olarak rotenon uygulaması ile anksiyete-benzeri davranışlarda anlamlı bir farklılığın görülmediği düşünülmektedir.

Depresyon hem PH için hem de PH'deki bilişsel bozukluklar ve demans gibi diğer motor olmayan bulgular için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Marinus ve ark., 2018). PH'de depresyonla ortak bir nöropatogenezi paylaştığı düşünülen bilişsel bozukluk, tanı sırasında belirsiz olmasına rağmen, PH'nin sonraki aşamalarında hastalığın en önemli motor olmayan semptomlarından biri olarak kendini göstermektedir (Peshattiar ve ark., 2020). Kronik rotenon uygulamasıyla, dopaminerjik olmayan sistemlerde meydana gelen nörodejenerasyon aracılığıyla PH'deki motor olmayan semptomların da taklit edilebildiği ve bilişsel fonksiyonlarda bozulmaların meydana geldiği *in vivo* modellerde gösterilmiştir (Perez-Pardo ve ark., 2017; Parkhe ve ark., 2020). Bu çalışmada, rotenonun neden olduğu bilişsel disfonksiyon, MWM ve yeni obje tanıma testleri kullanılarak değerlendirildi. Vortiksetinin rotenonla birlikte uygulanması, alıştırma denemelerinde rotenon grubuna kıyasla azalan kaçış gecikmeleri, alınan toplam yol ve test gününde hedef kadranda geçirilen sürede artış ile gösterildiği üzere öğrenme ve bellek fonksiyonlarını anlamlı ölçüde iyileştirdi. Motor fonksiyonlardaki bozuklukların MWM testini etkileyip

etkilemediğine dair şüpheler, test günü tüm gruplardaki hayvanların ortalama hızları değerlendirilerek giderildi. Ortalama hızlar karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, dolayısıyla harcanan sürelerin sıçanların motor fonksiyonları ile değil, bilişsel performansları ile ilişkili olduğu belirlendi. Yeni obje tanıma testinde ise rotenon uygulaması ile azalan ayırıcılık indeksi, yeni objede geçirilen sürenin yüzdesi ve yeni objeye temasın yüzdesi, kronik vortioksetin uygulamasıyla birlikte rotenon+vortioksetin grubunda, rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak arttı. Skorların motor disfonksiyona bağlı olarak düşmediği, hayvanların toplam keşif süreleri değerlendirilerek tespit edildi. Toplam keşif süresi gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Daha önceki deneysel PH modeli çalışmalarında, 5-HT depleasyonu ile indüklenen bilişsel bozukluklarda, akut, subkronik ve kronik vortioksetin uygulamasının, nesne tanıma belleği ve görsel-uzamsal bellek fonksiyonlarında olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (du Jardin ve ark., 2014; Jensen ve ark., 2014). Bu etkilerin 5-HT₃ antagonizması, 5-HT_{1A} agonizması, hipokampal hücre proliferasyonundaki artış, piramidal hücre çıkışında (*output*) artış ve hipokampusta nöroplastisite ile ilişkili gen ekspresyonunun artması aracılı olabileceği gösterilmiştir (Dale ve ark., 2014; du Jardin ve ark., 2014; Betry ve ark., 2015; Li ve ark., 2015b). Ayrıca vortioksetin uygulamasının nörotransmitter seviyeleri üzerine etkileri de bulunmaktadır. Pehrson ve ark.'nın yaptığı çalışmada, akut vortioksetin uygulaması hipokampal asetilkolin düzeylerinde artış ve skopolaminle bozulan sosyal bellek ve nesne tanıma belleğinde iyileşme sağlamıştır. Ancak subkronik uygulama ile bazal hipokampal asetilkolin seviyeleri üzerinde hiçbir değişiklik meydana gelmemiş ve skopolamine bağlı sosyal tanıma belleği bozuklukları geri çevrilememiştir (Pehrson ve ark., 2016). Dolayısıyla, vortioksetinin kolinerjik nörotransmisyon aracılı prokognitif etkilerinin sadece akut dozlama koşulları altında görüldüğü düşünülmektedir (Pehrson ve ark., 2016). Vortioksetinin, 5-HT reseptörleri aracılığıyla dört prokognitif nörotransmitterin (dopamin, asetilkolin, noradrenalin, histamin) salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir (Stahl, 2015). Bu çalışmada, rotenon uygulamasıyla hipokampus dokusunda dopamin, 5-HT, glutamin ve L-glutamik asit seviyeleri kontrol ve vortioksetin grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ancak, kronik vortioksetin uygulamasıyla bu nörotransmitter seviyelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi. PFK dokusunda ise rotenon uygulamasıyla birlikte dopamin

seviyelerinde anlamlı, serotonin seviyelerinde kısmi bir azalma görülürken glutamin ve L-glutamik asit düzeylerinde anlamlı bir artış meydana geldi. Kronik vortiksetin uygulamasıyla birlikte rotenon+vortiksetin grubunda, dopamin düzeyleri rotenon grubuna kıyasla değişmedi, serotonin düzeyleri anlamlı bir şekilde arttı, glutamin ve L-glutamik asit düzeyleri ise anlamlı bir şekilde azaldı. Bu verilere göre, çalışmamızda vortiksetinin MWM ve yeni obje tanıma testlerinde gösterilen prokognitif etkilerinde özellikle hipokampus dokusunda nörotransmitter sistemlerinin baskın rolünden ziyade hipokampal nörojeniz ve plastisitede artış veya TLR-2 modülasyonu aracılı nöroinflamatuvar yanıtlardaki inhibisyonun rol aldığı düşünülmektedir. PFK dokusunda ise serotonerjik modülasyonda meydana gelen artış ve yine TLR-2 sinyal yolağının inhibisyonunun bu yararlı etkilerde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Dopamin ve glutamat, BG'de ve PFK'de etkileşime girerek birbirlerinin işlevini ve salıverilmesini yakından düzenlemektedir (Caravaggio ve ark., 2016). Bu dopaminerjik ve glutamaterjik sistemlerdeki anormallikler, PH (Griffith ve ark., 2008) ve depresyon (Musazzi ve ark., 2013) dahil olmak üzere çok sayıda nöropsikiyatrik bozuklukta gözlenmektedir (Caravaggio ve ark., 2016). 1980'lerde geliştirilen klasik BG modeli (Obeso ve Lanciego, 2011), striatal dopamin kaybının indirekt yolda aktivasyon ve direkt yolda inhibisyon aracılığıyla striatum ve korteksteki ekstraselüler glutamat seviyelerini azaltacağını öngörmektedir (Caravaggio ve ark., 2016). Özellikle, kronik dopamin depleksiyonunun, striatal glutamat seviyelerinde klasik model ile tutarlı olarak azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Meshul ve ark., 1999; Holmer ve ark., 2005). Bu çalışmada, klasik BG modeli ile uyumlu olarak rotenon ile striatumda azalan dopamin seviyeleri neticesinde L-glutamik asit ve glutamin düzeylerinin de anlamlı olarak azaldığı gösterildi. Kronik vortiksetin tedavisiyle birlikte, rotenon+vortiksetin grubunda dopamin seviyeleri değişmemesine rağmen L-glutamik asit seviyeleri rotenon grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gösterdi ancak kontrol grubu ile aralarındaki anlamlı fark korundu. Striatal dopamin aktivitesi, uyarıcı ve inhibitör glutamaterjik girdiler ile dengeli bir şekilde yönetilmektedir (Gleich ve ark., 2015). PFK'deki glutamaterjik nörotransmisyonun striatal dopaminerjik aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Del Arco ve ark., 2008; Balla ve ark., 2009; Usun ve ark., 2013). Çalışmamızda, kronik rotenon uygulamasıyla PFK'de glutamin ve L-glutamik asit

düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttı. Bu artış, striatal dopamin üzerindeki inhibitör etkinin bir kısmından sorumlu olabilir. Nitekim striatum dokusunda rotenon ve rotenon+vortioksetin grubunda dopamin seviyeleri kontrol ve vortioksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu.

Tirozinin L-DOPA'ya dönüşümünü katalize eden ve dopamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan TH, tüm dopaminerjik hücrelerde bulunur (Daubner ve ark., 2011). TH inhibisyonu ve TH pozitif nöronlarda meydana gelen düşüş, nigrostriatal yolda dopamin sentezini azaltır ve PH'nin motor bulgularının ortaya çıkmasına yol açar (Salvatore ve ark., 2019). Ayrıca, pS129- α -sinüklein miktarlarında meydana gelen artışın, TH regülasyonunu bozarak nöronal sağkalımı olumsuz etkileyebileceğini de gösterilmiştir (Sato ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda, rotenon uygulaması ile SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında TH pozitif nöronların ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Sherer ve ark., 2003c; Feng ve ark., 2006; Luo ve ark., 2007). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulamasının SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında TH ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterildi. Kronik vortioksetin uygulamasıyla birlikte, rotenon+vortioksetin grubunda, rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olan TH ekspresyon düzeyleri, vortioksetin uygulamasının dopaminerjik nöronları koruduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, SNpc dokusunda yalnızca vortioksetin uygulanan grupta TH immünoaktivitesi rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. SNpc dokusunda TH ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olması BG'de vortioksetin aracılı bir disregülasyondan kaynaklanabilir. Literatürde, bazı antidepresanların parkinsonizm dahil olmak üzere ekstrapiramidal semptomlara neden olduğu bildirilmiştir (Govoni ve ark., 2001). Melatonin-1 ve melatonin-2 reseptör agonisti ve 5-HT_{2C} reseptör antagonisti olan agomelatinin rotenon ile indüklenen PH sıçan modelinde özellikle striatumda rotenon kaynaklı toksisiteyi şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Gunaydin ve ark., 2019). Demireva ve ark., SSRI'ların etki mekanizmalarından olan kronik SERT blokajının BG'ye bağlı motor performansı bozduğunu, SNpr aktivitesini artırdığını ve SNpc'deki dopaminerjik aktiviteyi azalttığını göstermiştir (Demireva ve ark., 2018). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, kronik vortioksetin uygulaması ile SNpc dokusunda TH immünoaktivitesinin düşmesi ve motor fonksiyonlarda meydana gelen iyileşmeye

rağmen striatum dokusunda rotenon uygulaması ile azalan dopamin düzeylerinin vortiooksetin uygulamasıyla artış göstermemesi, vortiooksetinin henüz açıklanamayan mekanizmalar aracılığıyla BG’de meydana getirdiği disfonksiyon ile açıklanabilir.

PH'nin ana patolojik özelliği, membranla ilişkili bir protein olan α -sinükleinin ana bileşen olduğu intrasitoplazmik Lewy cisimciklerinin varlığıdır. PH hastalarında α -sinüklein patolojisi SN dışında hipokampus ve PFK gibi dokularda da gösterilmesine rağmen (Doorn ve ark., 2014) bizim çalışmamızda α -sinüklein immünoaktivitesi yalnızca SNpc dokusunda tespit edildi. α -sinüklein ekspresyonu, kronik rotenon uygulaması ile kontrol ve vortiooksetin gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde artarken kronik vortiooksetin uygulaması, SNpc'deki α -sinüklein ekspresyon düzeylerini rotenon+vortiooksetin grubunda, rotenon grubuna kıyasla azalttı. Yapılan çalışmalarda, sinükleinopati lezyonlarında α -sinükleinin serin-129 bölgesinde fosforilasyonun meydana geldiği (Fujiwara ve ark., 2002) ve bu fosforilasyonun, α -sinüklein izoformlarının daha toksik agregatlar oluşturan β -katlanmalara geçişini (Samuel vd., 2016) ve α -sinüklein inklüzyonlarının oluşumunu hızlandırdığı ve nöronal kaybı artırdığı bildirilmiştir (Sugeno vd., 2008). Çalışmalar, pS129- α -sinükleinin artan oranının, TH regülasyon mekanizmalarını bozarak nöronal sağkalımı olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir (Lou ve ark., 2010). Daha önce bildirildiği gibi, SNpc'deki dopaminerjik nöronların TH ekspresyonu, rotenon uygulanan hayvanlarda önemli ölçüde düşmüştür (Sato ve ark., 2011). Ayrıca, sağlıklı bireylerin beyin dokularında pS129- α -sinüklein oranı yalnızca %4 iken Lewy cisimcikleri oluşmuş PH hastalarının beyin dokularında bu oran yaklaşık %90 olarak bulunmuştur (Rocha vd., 2018). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulamasının SNpc'de pS129- α -sinükleinin ekspresyon düzeylerini kontrol ve vortiooksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak artırdığı, SNpc'nin yanı sıra striatum, PFK ve hipokampus dokularında da pS129- α -sinüklein ekspresyonlarında anlamlı bir artışa neden olduğu gösterildi. Rotenon ile birlikte vortiooksetin uygulanan sıçanlarda, rotenon grubuna kıyasla pS129- α -sinüklein ekspresyonunda anlamlı bir azalma meydana geldi. Bu sayede vortiooksetinin SNpc'de ve striatumda agregate α -sinüklein ve pS129- α -sinüklein ekspresyon düzeylerini azaltarak dopaminerjik nöronları koruduğu ve motor fonksiyonları iyileştirdiği düşünülmektedir. Ayrıca PFK ve hipokampus gibi öğrenme ve bellek fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde yürütülmesinden sorumlu olan bölgelerde de pS129-

α -sinüklein ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azalmasının, yeni obje tanıma ve MWM testlerinde rotenon+vortiooksetin grubunda, rotenon grubuna göre elde edilen daha başarılı skorlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

PH, programlanmış hücre ölümünün neden olduğu ilerleyici dopaminerjik nöron kaybı ile karakterize edilir (Venderova ve Park, 2012). Apoptotik hücre ölümünün önemli bileşenlerinden olan kaspaz aktivasyonu, BG’de dopaminerjik nöronların kaybı ve PH’nin gelişmesi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Sherer ve ark., 2003b). Rotenon uygulamasının apoptoza yol açan kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2002; Ahmadi ve ark., 2003; Yuan ve ark., 2016; Gunaydin ve ark., 2019). Kaspaz aracılı apoptotik yolağın inhibisyonunun nöroprotektif etki g sterdiğı *in vitro* ve *in vivo* rotenon modellerinde bildirilmiştir (Li ve ark., 2015a; Tong ve ark., 2016). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulamasıyla aktif kaspaz-3 formu olan *cleaved* kaspaz-3 immünoreaktivitesi SNpc, striatum, PFK ve hipokampus dokularında anlamlı olarak arttı. Kronik vortiooksetin uygulamasıyla birlikte striatum, PFK ve hipokampus dokularında *cleaved* kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı, SNpc dokusunda ise bir değişiklik meydana gelmedi. Bu durum, SNpc’de vortiooksetinle indüklenen BG disfonksiyonunun bir diğer belirtici olabilir.

Nörodejeneratif bozuklukların patogenezinde inflamatuvar mediyatörlerin rol oynadığı bilinmektedir. Mikroglial aktivasyon ve inflamatuvar mediyatörlerin salgılanması, PH patogenezinde anahtar bileşenlerden biridir (Nagarajan ve Marathe, 2018). Antiinflamatuvar ilaçların antidepresan etkiler g sterebileceğı fikri, çeşitli kanıtlarla desteklenmektedir (Iyengar ve ark., 2013; Fourrier ve ark., 2018). NSA  ilaçlar, statinler ve glukokortikoidler gibi inflamatuvar kaskadı çeşitli mekanizmalarla bloke eden ilaçların nöroprotektif özellikler g sterebileceğı düşünülmektedir (Mohanakumar ve ark., 2000; Kurkowska-Jastrzebska ve ark., 2004; Sanchez-Pernaute ve ark., 2004; Tan ve ark., 2016). Vortiooksetin yapısal olarak NSA  ilaçlarla benzerlik gösteren bir moleküldür (Bayram ve ark., 2018). Talmon ve ark., 2018 yılında yaptıkları çalışmada, vortiooksetinin insan monosit/makrofajlarında alternatif fenotipe (M2) doğru polarizasyonunu sağlayan antioksidan aktiviteye ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Talmon ve ark., 2018). Ayrıca, Fourrier ve ark., NSA  selekoksib ile vortiooksetin

kombinasyonunun antidepresan etkinliği artırdığını göstermiştir (Fourrier ve ark., 2018). Bu çalışmada, vortiksetinin immunomodlasyon üzerindeki olası etkileri TLR-2 ekspresyonu ve proinflatuvar sitokinlerin tayini ile değerlendirildi.

İnsanlarda yapılan nörogörüntüleme çalışmalarının yanı sıra (Ouchi ve ark., 2005; Gerhard ve ark., 2006) MPTP (Sugama ve ark., 2003), 6-OHDA (He ve ark., 2001) ve rotenon (Sherer ve ark., 2003a) gibi farklı PH hayvan modellerinde de aktive edilmiş mikrogliya hücrelerinin varlığı ispat edilmiştir. alışmalar, birçok sitokinin PH patogeneze katıldığını doğrulamıştır (Nagatsu ve Sawada, 2005). PH hastalarında ve deneysel hayvan modellerinde SN ve striatum dokularında TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerinin artmış olduğu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Joers ve ark., 2017). Proinflatuvar sitokinlerin oksidatif stres indüksiyonu ve apoptotik faktörlerin uyarılmasıyla ilişkili mekanizmalar yoluyla nöronal hücre ölümüne yol açtıkları bildirilmiştir (Azmy ve ark., 2018).

Doorn ve ark., yapmış oldukları çalışmada, PH hastalarının SN'lerinde ve hipokampuslarında α -sinüklein patolojisi ile ilişkili reaktif mikrogliyanın varlığının yanı sıra TLR-2 ekspresyonunda da kontrol gruplarına kıyasla artış olduğunu göstermiştir (Doorn ve ark., 2014). Benzer şekilde, PH hastalarının dolaşımdaki monosit hücrelerinde TLR-2 ekspresyonunun arttığının gösterilmesi, PH'de TLR-2 kaynaklı inflamasyonun rolü olduğuuna dair görüşleri güçlendirmiştir (Drouin-Ouellet ve ark., 2014). Aynı çalışmada, α -sinkleini aşırı aktive eden farelerde de TLR-2 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Drouin-Ouellet ve ark., 2014). Ayrıca, α -sinüklein oligomerlerinin (intraserebroventriküler, i.c.v.) mikrogliyal aktivasyon ve TLR-2 aracılı sinyaller aracılığıyla farelerde bellek fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir (La Vitola ve ark., 2018). α -sinüklein transgenik fare PH/Lewy cisimcikli demans modelinde TLR-2 blokajının nöronal ve astroglial hücrelerde α -sinüklein birikimini, nöroinflamasyonu, nörodejenerasyonu ve davranış bozukluklarını hafiflettiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2018). Yanlış katlanmış α -sinükleinin, mikrogliya zerindeki TLR-2 reseptörünü aktive edebileceği ve MyD88-bağımlı yolak aracılığıyla inflamatuvar sitokin üretimini tetikleyebileceği gösterilmiştir (Daniele ve ark., 2015). Ayrıca, yakın zamanda, gen delesyonu veya siRNA aracılı yıkım (knock down) yoluyla TLR-2'nin inhibisyonunun,

hücrel modellerde ve transgenik farelerde α -sinüklein birikimi ile bağlantılı patolojiyi kurtardığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2015).

PH'nin transgenik hayvan modellerinde TLR-2 ekspresyonunda artış olduğu, kortikal ve subkortikal bölgelerde α -sinüklein akümülyasyonunun, nöroinflamasyonun arttığı ve davranış bozukluklarının meydana geldiği gösterilmiştir (Letiembre ve ark., 2009). Kim ve ark., α -sinükleini aşırı eksprede eden SH-SY5Y hücrelerinin oligomerik α -sinüklein salgıladığı, SH-SY5Y koşullu ortamın mikrogliya'yı aktif hale getirdiği ve bu aktivasyon için mikrogliyalarda TLR-2 ekspresyonunun gerekli olduğunu göstermiştir (Kim ve ark., 2018). α -sinüklein ile ön tedavi görmüş mikrogliyalarda, TLR-2'ye özgü bir agonistin uygulanması sitokin gen ekspresyonunu artırırken diğer TLR agonistlerinin böyle bir etkiye yol açmadığı bildirilmiştir (Roodveldt ve ark., 2013). Ayrıca, TLR-2 reseptörlerinin aktivasyonunun, protein konformasyonuna duyarlı olduğu, tamamen monomerik ve fibriler α -sinükleinin TLR-2'yi aktive edemediği ve yalnızca β -levha bakımından zengin α -sinüklein oligomerlerinin bu reseptörleri aktive ettiği bilinmektedir (Kim ve ark., 2013a). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulaması ile striatum, PFK ve hipokampus dokularında TLR-2 ekspresyon seviyelerinde kontrol ve vortiksetin gruplarına kıyasla meydana gelen artış ve yine bu dokularda pS129- α -sinüklein ekspresyonunda da anlamlı bir artışın olması bu hipotezi destekler niteliktedir, çünkü pS129- α -sinüklein miktarındaki artışın β -levha bakımından zengin α -sinüklein oligomerlerinin oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir (Sugeno ve ark., 2008).

Hipokampus dokusunda meydana gelen mikrogliyal aktivasyon, TLR-2 ekspresyonu ve TNF- α ve IL-1 β upregülasyonu, dopaminerjik nöronal inflamatuvar hasar ile uyumlu ana bileşenler olarak düşünülmektedir (Li ve ark., 2012a). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulaması ile hipokampus, PFK ve striatum dokularında TLR-2 ekspresyonunun kontrol ve vortiksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak artış göstermesi inflamatuvar kaskadın tetiklenmesi ile ilişkilendirildi. Kronik vortiksetin uygulamasıyla birlikte hipokampus, PFK ve striatum dokularındaki artmış TLR-2 ekspresyonu, rotenon grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı. Bu çalışmada gözlemlendiği gibi, TLR-2 ekspresyonunun vortiksetin aracılı inhibisyonu, vortiksetinin diğer çalışmalarda bildirilen olası antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitesiyle ilişkili olabilir (Talmon ve ark., 2018). İlginç bir şekilde SNpc dokusunda ise yalnızca vortiksetin uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla TLR-2

ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. TH ve *cleaved* kaspaz-3 bulguları ile uyumlu bu sonuçlar, kronik vortiksetin uygulamasının BG üzerindeki farklı etkileri ile veya Doorn ve ark.'nın gösterdiği gibi TLR-2 ekspresyonunun, bölgeler arasında ve hastalık aşamasına bağlı bir şekilde değişiklik göstermesi ile ilişkili olabilir (Doorn ve ark., 2014).

Mikroglia aracılı nöroinflamatuvar süreçte önemli bir inflamatuvar sinyal yolağı olarak bilinen NFκB yolağının TLR-2 aracılı aktivasyonu sırasında IκB fosforile olur ve NFκB'nin p65 alt birimi çekirdeğe translokasyon yaparak spesifik inflamatuvar hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu indükler (Yuan ve ark., 2013; Caplan ve Maguire-Zeiss, 2018). Bu çalışmada, kronik rotenon uygulaması ile hipokampus dokusunda sitokin seviyelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi, benzer şekilde NFκB-p65 seviyelerinde de rotenon uygulaması ile diğer deney gruplarına kıyasla bir artış eğilimi olmasına rağmen anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bu durum, hipokampus dokusunda nöroinflamasyona karşı bir çeşit direnç olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, Mitra ve ark., rotenon uygulamasıyla erkek ve dişi fare beyinlerinde frontal korteks ve SN dokularının aksine hipokampus dokusunda TNF-α seviyelerinde herhangi bir değişikliğin meydana gelmediğini göstermiştir (Mitra ve ark., 2015). Kronik inflamasyon varlığında, genç yetişkin sıçan beyninde hipokampusta glutamat etkisinde azalmaya neden olabilecek doğal değişikliklerin kompensatuvar bir süreci işaret ettiği düşünülmektedir (Brothers ve ark., 2013). Çalışmada, hipokampus dokusunda proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde gruplar arasında bir farklılık olmaması, rotenon ile indüklenen kronik inflamatuvar çevreye karşı hipokampus dokusunda meydana gelen kompensasyon aracılı olabilir. Ayrıca, rotenon uygulaması ile glutamat seviyelerinde meydana gelen düşüş de bu hipotezi desteklemektedir.

Kronik rotenon uygulaması ile striatum ve PFK dokularında TNF-α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerinde bir artış öngülmesine rağmen (Zaitone ve ark., 2012; Alabi ve ark., 2019), bu çalışmada, rotenon uygulamasıyla striatum ve PFK dokusunda TNF-α, IL-1β ve/veya IL-6 düzeylerinin kontrol ve vortiksetin gruplarına kıyasla anlamlı olarak azalmış olması dikkat çekicidir. Bu sonuçlar, farklı beyin bölgelerindeki mitokondrilerin strese farklı tepki verdiğini gösteren kanıtlarla açıklanabilir. Örneğin, Oliveira ve Gonçalves, primer kültürlerde striatal kökenli nöronların ve astrositlerin

mitokondriyal strese karşı serebral korteks kökenli hücelere kıyasla daha hassas olduğunu göstermiştir (Oliveira ve Goncalves, 2009). Benzer şekilde, Brustotovsky ve ark., sıçanlardan izole edilen striatal mitokondrinin kalsiyuma yanıtlarında kortikal mitokondriden daha hassas olduğunu bildirmiştir (Brustovetsky ve ark., 2003). Ayrıca, rotenon aracılı kompleks I inhibisyonu ve oksidatif fosforilasyon, hücresel enerji beslemesinin sürdürülmesi için ikinci büyük mitokondriyal yol olan trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün oranında bir artışa neden olabilir. Bu artış, aynı zamanda α -ketoglutaratın (TCA döngüsünün bir ara maddesi) glutamata dönüştürülmesi yoluyla glutamat seviyelerinde artışa neden olarak eksitotoksikite ve hücre ölümüne yol açabilir (Moussa ve ark., 2008). Striatum dokusu gibi PFK dokusunun da oksidatif strese karşı hipokampustan daha duyarlı olduğu farklı patolojik koşullar taklit edilerek gösterilmiştir (Fowler ve ark., 2014; Zlatkovic ve ark., 2014). Bu bağlamda, çalışmada striatum ve PFK dokularında rotenon ile proinflatuvar sitokin seviyelerinde meydana gelen düşüşler, striatum ve PFK'nin mitokondriyal strese daha duyarlı olması ile ve her gün tekrarlanan rotenon uygulaması ile hasar gören hücre sayısında bir artış görülmesi ve bu hasar gören hücrelerdeki mitokondriyal solunum zincirinin blokajı ile açıklanabilir. Nitekim daha önceki çalışmalarda rotenonun hasarlı hücrelerde mitokondriyal kompleks I'ı inhibe etmesi sonucu inflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Sun ve ark., 2014). Striatum ve PFK dokularında da hipokampus dokusunda olduğu gibi kronik rotenon uygulaması ile NF κ B-p65 düzeyleri gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Buna ek olarak, McCabe ve ark., intrastriatal rotenon uygulaması yapılan sıçanlarda inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin büyüklüğünün ve zaman akışının farklılık gösterdiğini rapor etmiştir. Örneğin, kullandıkları modelde TNF- α ekspresyonu 28. günde en yüksek iken IL-6 seviyeleri 14.günde en yüksek olup diğer günler gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir (McCabe ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda, proinflatuvar sitokin düzeyleri yalnızca 28. günde, davranış testlerini takiben alınan dokulardan tayin edildi. Dolayısıyla, proinflatuvar sitokin seviyeleri McCabe ve ark.'nın çalışmasında gösterildiği gibi zamana bağlı olarak değişiyor olabilir. Rotenonun mikrogial aktivasyon aracılı toksik etkisi hem *in vivo* (Sherer ve ark., 2003a; Li ve ark., 2012b) hem de *in vitro* (Gao ve ark., 2002; Zhou ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2013) yaklaşımlar kullanılarak geniş çapta açıklanmış olmasına rağmen, glial hücreler

üzerindeki doğrudan etkilerine dair raporlar kısıtlıdır (Rabaneda-Lombarte ve ark., 2019). Bir nörotoksin olan rotenonun mikrogliya hücrelerinde proinflamatuvar yanıtı bozarak sitokin seviyelerinde düşüş meydana getirdiğini gösteren *in vitro* kanıtlar bulunmaktadır (Rabaneda-Lombarte ve ark., 2019). Örneğin, Klinworth ve ark., rotenon uygulamasının mikrogliyal aktivasyon ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi üzerinde direkt bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Klintworth ve ark., 2009). Benzer şekilde Ferger ve ark., mitokondriyal toksinlerin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen sitokin üretimini değiştirmedikçe göstermiştir (Feger ve ark., 2010). Bu kanıtlar, glial hücrelerin bir pro-inflamatuvar tehdide tepkisinin, rotenon gibi mitokondriyal solunum zinciri aktivitesini inhibe eden toksinlerin varlığında değiştiğini gösterir, bu da glial immün yanıtların bu tür maddeler tarafından bozulduğunu göstermektedir (Rabaneda-Lombarte ve ark., 2019). Dolayısıyla, bu çalışmada hipokampus, striatum ve PFK dokularında kronik rotenon uygulamasıyla inflamatuvar süreçten sorumlu TLR-2 ekspresyonlarında artış meydana gelmesine rağmen inflamatuvar sitokin yanıtlarında elde edilen farklı yanıtlar ışığında, striatum ve PFK dokularında kronik rotenon uygulamasının immün yanıtları bozarak hasara yol açtığı söylenebilir. Kronik vortiksetin uygulamasıyla, rotenon+vortiksetin grubunda, azalmış sitokin düzeylerinin tekrar kontrol ve vortiksetin grubundaki seviyelere ulaşması, onarılmış inflamatuvar yanıt ve bölgedeki hasarın geri çevrilmesine işaret ediyor olabilir. Nörodejeneratif süreçte nöronlar tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin nöronların ölümüne yol açan kilit faktörler olarak bildirilmesine ve PH hastalarında SSS’de ve periferik immün sistemde proinflamatuvar sitokin seviyelerinde artış olduğu gösterilmesine rağmen (Kim ve ark., 2015; Rocha ve ark., 2015) PH patofizyolojisindeki heterojenliğinin sitokin düzeylerinin değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesine neden olduğu düşünülmektedir (Rocha ve ark., 2015). Örneğin Alfariah ve ark., PH hastalarının serumlarında TNF- α ve IL-6 seviyeleri açısından kontrol bireylerine kıyasla bir farklılık bulunmadığını göstermiştir (Alfariah ve ark., 2019). Ayrıca, α -sinüklein aracılı TLR2/1 sinyal yolağının aktive edilmesinin ana etkisinin proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasından ziyade otofaji yolağının inhibisyonu olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır (Kim ve ark., 2015). Dolayısıyla, TLR-2 sinyali ile indüklenen inflamatuvar kaskadın nörodejenerasyon mekanizmaları ve 5-HT reseptörlerinin bu kaskaddaki rolü yeni bir araştırma konusudur.

Bu tez çalışmasının sahip olduğu bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Öncelikle, bu çalışmada, yalnızca multimodal özelliklere sahip vortiksetinin PH'deki motor ve motor olmayan bulgular üzerindeki etkisi araştırıldı. Vortiksetinin etkileri, SSRI'lar veya 5-HT reseptör agonistleri/antagonistleri gibi PH'de yararlı olabileceği gösterilen farklı sınıf antidepresanların, bu çalışmada kullanılan PH modelindeki davranış testleri ve nörokimyasal parametreler üzerindeki etkileri ile karşılaştırılmadı. İkinci olarak, nörotransmitter tayini, davranış deneyleri tamamlandıktan hemen sonra kurban edilen hayvanların uygun şekilde çıkarılan beyin dokuları kullanılarak gerçekleştirilmesine rağmen mikrodializ gibi serbest, bağlanmamış ekstraselüler doku konsantrasyonlarını anlık olarak tayin edebilen bir tekniğin kullanılması farmakolojik olarak aktif konsantrasyonlara yakın sonuçlar verebilirdi (Krebs-Kraft ve ark., 2007). Ancak, mikrodializ tekniği için hayvanlara yerleştirilecek prob, MWM testinde sıçanların yönlendirilmesine engel olacağından dokulardan nörotransmitter tayini yapılmasına karar verildi. Üçüncü olarak, proinflatuvar sitokin düzeyleri ve NFκB-p65 seviyeleri davranış testlerini takiben alınan dokulardan 28. günde tayin edildi. Proinflatuvar sitokin seviyeleri zamana bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bu nedenle, taklit edilen PH progresyonu boyunca farklı zaman aralıklarında alınan ölçümler daha farklı sonuçlar ortaya koyabilir. Benzer şekilde, nörotransmitter tayinleri de 28. günde alınan dokulardan yapıldı. Ancak davranış deneyleri farklı zaman dilimlerinde planlanarak uygulandı. Örneğin motor testler 21. günde tamamlandıktan sonra 7 gün daha rotenon uygulaması devam etti. Bu nedenle, nörotransmitter düzeylerini motor bulgular veya antidepresan-benzeri davranışlar ile birlikte yorumlarken arada geçen bu süre zarfında nörodejenerasyon ilerleyeceği için nörotransmitter seviyelerinde değişikliklerin meydana gelebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Son olarak, bu çalışmada, vortiksetin belirlenen tek dozda (10 mg/kg) uygulandı, farklı bir doz seçilerek dozlar arasında karşılaştırma yapılmadı. Vortiksetinin 5-HT₃, 5HT_{1B} ve SERT işgali için belirlenen ED50 değerleri 10 mg/kg'dan daha düşük dozları işaret etmektedir ancak vortiksetinin sıçanlardaki serotonin 5-HT_{1A} ve 5HT₇ reseptörlerine afinitesi insanlardakinden daha düşüktür. Bu nedenle sıçanlarda yapılan çalışmalarda 5-HT_{1A} ve 5HT₇ reseptörlerinin de işgali için vortiksetinin belirlenen ED50 değeri 10 mg/kg (s.c.) olarak bulunmuştur

(Sanchez ve ark., 2015). Ek olarak, Pehrson ve ark.'nın sıçanlarda vortioksetinin çeşitli dozları ile yapmış oldukları mikrodializ çalışmasında, vortioksetinin 10 mg/kg (s.c.) dozu ile, 5-HT, noradrenalin ve dopamin gibi nörotransmitter miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir (Pehrson ve ark., 2013). Benzer şekilde vortioksetinin sıçanlardaki depresyon modellerinde antidepresan etkisini göstermek için de 10 mg/kg/gün (p.o.) dozu tercih edilmiştir (Li ve ark., 2013). Vortioksetinin sıçanlarda öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmalarda da kullanılan dozun 10 mg/kg (s.c., i.p.) olduğu görülmüştür (Mork ve ark., 2013; Jensen ve ark., 2014; Wallace ve ark., 2014). Yukarıdaki literatür bulguları esas alınarak bu tez çalışmasında vortioksetin dozu 10 mg/kg (s.c.) olarak belirlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

PH; istirahat tremoru, rijidite ve bradikinezi gibi dopamin eksikliğinin klinik etkilerini yansıtan klasik üçlü motor belirti ile birlikte dopaminerjik olmayan sistemlerde meydana gelen hasarla ortaya çıkan motor olmayan bulgularla karakterize nörodejeneratif bir hareket hastalığı olarak tanımlanmaktadır. En sık görülen motor olmayan belirtiler arasında yer alan bilişsel disfonksiyon, demans riskini ve mortaliteyi artırması nedeniyle PH'deki tedavisi, artan bir ilgi alanı haline gelmiştir.

Bu çalışma ile serotonerjik modülasyon üzerinden antidepresan etkiler gösteren vortioksetinin PH'deki en önemli motor olmayan belirtilerden bilişsel disfonksiyon ve depresyon üzerindeki etkileri, ilk defa deneysel bir PH modelinde, sistemik rotenon uygulaması ile oluşturulan sıçan modelinde incelenmiştir. Elde edilen bulgular, multimodal bir antidepresan olan vortioksetinin rotenon ile indüklenen PH sıçan modelinde nöroprotektif ve prokognitif etkileri aracılığıyla motor ve motor olmayan semptomlar üzerinde yarar gösterdiğini belirtmektedir. Rotenon ile bozulan motor ve bilişsel fonksiyonların yanı sıra tetiklenen depresyon-benzeri etkiler, vortioksetin uygulamasıyla birlikte anlamlı olarak iyileşmiştir. Bu yararlı etkiler SNpc, striatum, hipokampus ve PFK dokularında TH pozitif nöronların korunması, *cleaved* kaspaz-3, α -sinüklein, pS129- α -sinüklein ve TLR-2 ekspresyon seviyelerinin azalması ile ilişkili hasarın önlenmesi ve bunun sonucu olarak gözlemlenen nörodavranışsal iyileşmeler ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca nörotransmitter seviyelerinde ve proinflamatuvar sitokin düzeylerinde bölge-spesifik değişiklikler de vortioksetinin etkilerine aracılık etmektedir. İlginç bir şekilde diğer dokulardan farklı olarak SNpc'de TH ekspresyonunda azalma ve TLR-2 ekspresyonunda artış meydana getirmesi ile gözlemlendiği gibi vortioksetinin BG'de mekanizması tam olarak belli olmayan bir disfonksiyona yol açabileceği düşünülmektedir. Ancak bu disfonksiyon, motor parametreleri bozacak kadar güçlü değildir.

Vortioksetinin PH patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülen inflamatuvar sürecin basamakları üzerindeki etkileri de ilk defa bu proje kapsamında değerlendirilmiştir. Literatürde antiinflamatuvar potansiyeline dair yalnızca kısıtlı bir çalışma yayınlanmış

olan vortioksetinin, inflamasyon sürecine ilişkin etki mekanizmalarını aydınlatmak amacıyla TLR-2 reseptör aktivasyonuna yönelik immünohistokimyasal analizler yapılmış ve vortioksetinin olası immünomodulator etkileri olabileceği bulunmuştur. Vortioksetinin sistemik rotenon ile indüklenen deneysel PH modelinde nörodejenerasyon üzerindeki etkileri aydınlatılarak, depresyon ve/veya bilişsel disfonksiyonun görüldüğü PH hastalarında etkinliği ve yararı ile ilgili elde edilen bu preklinik verilerin ileri çalışmalarla desteklenmesi, yalnızca PH için değil, nöroinflamatuvar süreçle şekillenen başta Alzheimer hastalığı olmak üzere diğer nörodejeneratif hastalıklara ilişkin yaklaşımlar açısından oldukça önemlidir.

Bilinmektedir ki PH'de motor olmayan belirtiler, hastalığın motor belirtilerinden daha önce ortaya çıkmaktadır. Daha önceki çalışmalarda, prokognitif özellikleri gösterilmiş olan ve PH'de de bilişsel bozuklukları düzeltmesi muhtemel bir ilaç olan vortioksetinin aynı zamanda nörodejenerasyonu da önleyebilir olabileceği ihtimali hem hastanın yaşam kalitesini artırmak hem de mortaliteyi azaltabilmek açısından oldukça yararlı gözükmektedir. Vortioksetinin PH'deki olası prokognitif etkilerinin ileride klinik çalışmalarla da desteklenmesi durumunda, PH tanısı almış bilişsel disfonksiyonu olan hastalarda adjuvan tedavi olarak kullanılması, yeni bir çözüm önerisini tartışmaya açabilecektir. Ancak, bu çözüm önerileri tartışılmadan önce, çalışmada vortioksetin uygulaması ile SNpc'de meydana geldiği düşünülen olası disfonksiyonun mekanizması tam olarak aydınlatılarak vortioksetinin motor fonksiyonlar üzerindeki etkileri hakkında şüpheler giderilmelidir. Bu sayede, motor olmayan belirtilerin eşlik ettiği PH hastalarının yaşam kalitesini artırmaya ve sağlık maliyetlerini azaltmaya yardımcı olacak stratejiler geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Aarsland, D., Creese, B., Politis, M., Chaudhuri, K. R., Ffytche, D. H., Weintraub, D., & Ballard, C. Cognitive decline in parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2017; 13 (4): 217-231.
- Aarsland, D., & Kurz, M. W. The epidemiology of dementia associated with parkinson disease. *J Neurol Sci*. 2010; 289 (1-2): 18-22.
- Abada, Y. S., Nguyen, H. P., Schreiber, R., & Ellenbroek, B. Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel bachd transgenic rat model for huntington disease. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e68584.
- Abdel-Salam, O. M. E., Khadrawy, Y. A., Youness, E. R., Mohammed, N. A., Abdel-Rahman, R. F., Hussein, J. S., & Shafee, N. Effect of a single intrastriatal rotenone injection on oxidative stress and neurodegeneration in the rat brain. *Comparative Clinical Pathology*. 2014a; 23 (5): 1457-1467.
- Abdel-Salam, O. M. E., Omara, E. A., El-Shamarka, M. E.-S., & Hussein, J. S. Nigrostriatal damage after systemic rotenone and/or lipopolysaccharide and the effect of cannabis. *Comparative Clinical Pathology*. 2014b; 23 (5): 1343-1358.
- Ahmadi, F. A., Linseman, D. A., Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Bouchard, R. J., Freed, C. R., Heidenreich, K. A., & Zawada, W. M. The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurochem*. 2003; 87 (4): 914-921.
- Akhondzadeh, S., Mohammadi, N., Noroozian, M., Karamghadiri, N., Ghoreishi, A., Jamshidi, A. H., & Forghani, S. Added ondansetron for stable schizophrenia: A double blind, placebo controlled trial. *Schizophr Res*. 2009; 107 (2-3): 206-212.
- Akira, S., & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4 (7): 499-511.
- Alabi, A. O., Ajayi, A. M., Ben-Azu, B., Bakre, A. G., & Umukoro, S. Methyl jasmonate abrogates rotenone-induced parkinsonian-like symptoms through inhibition of oxidative stress, release of pro-inflammatory cytokines, and down-regulation of immunopositive cells of nf-kappab and alpha-synuclein expressions in mice. *Neurotoxicology*. 2019; 74: 172-183.
- AlDakheel, A., Kalia, L. V., & Lang, A. E. Pathogenesis-targeted, disease-modifying therapies in parkinson disease. *Neurotherapeutics*. 2014; 11 (1): 6-23.
- Alrafiah, A., Al-Ofi, E., Obaid, M. T., & Alsomali, N. Assessment of the levels of level of biomarkers of bone matrix glycoproteins and inflammatory cytokines from saudi parkinson patients. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 2690205.

Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol.* 2018; 9: 2379.

Andersen, A. D., Binzer, M., Stenager, E., & Gramsbergen, J. B. Cerebrospinal fluid biomarkers for parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol Scand.* 2017; 135 (1): 34-56.

Antunes, M., & Biala, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012; 13 (2): 93-110.

Asakawa, T., Fang, H., Sugiyama, K., Nozaki, T., Hong, Z., Yang, Y., Hua, F., Ding, G., Chao, D., Fenoy, A. J., Villarreal, S. J., Onoe, H., Suzuki, K., Mori, N., Namba, H., & Xia, Y. Animal behavioral assessments in current research of parkinson's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2016; 65: 63-94.

Athar, S. (2010). Serotonin and tryptophan. In K. Kompoliti & L. V. Metman (Eds.), *Encyclopedia of movement disorders* (pp. 104-108). Oxford: Academic Press.

Athauda, D., & Foltynie, T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11 (1): 25-40.

Azmy, M. S., Menze, E. T., El-Naga, R. N., & Tadros, M. G. Neuroprotective effects of filgrastim in rotenone-induced parkinson's disease in rats: Insights into its anti-inflammatory, neurotrophic, and antiapoptotic effects. *Molecular Neurobiology.* 2018; 55 (8): 6572-6588.

Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., & Iwatsubo, T. Aggregation of alpha-synuclein in lewy bodies of sporadic parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol.* 1998; 152 (4): 879-884.

Bai, S., Song, Y., Huang, X., Peng, L., Jia, J., Liu, Y., & Lu, H. Statin use and the risk of parkinson's disease: An updated meta-analysis. *PLoS One.* 2016; 11 (3): e0152564.

Balla, A., Nattini, M. E., Sershen, H., Lajtha, A., Dunlop, D. S., & Javitt, D. C. Gabab/nmda receptor interaction in the regulation of extracellular dopamine levels in rodent prefrontal cortex and striatum. *Neuropharmacology.* 2009; 56 (5): 915-921.

Bar-On, P., Crews, L., Koob, A. O., Mizuno, H., Adame, A., Spencer, B., & Masliah, E. Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of parkinson's disease. *J Neurochem.* 2008; 105 (5): 1656-1667.

Barnes, J. M., Costall, B., Coughlan, J., Domeney, A. M., Gerrard, P. A., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Onaivi, E. S., Tomkins, D. M., & Tyers, M. B. The effects of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on cognition in rodents and primates. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990; 35 (4): 955-962.

Barnes, N. M., & Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999; 38 (8): 1083-1152.

Bartels, A. L., & Leenders, K. L. Parkinson's disease: The syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex*. 2009; 45 (8): 915-921.

Basaranlar, G., Derin, N., Kencebay Manas, C., Tanriover, G., & Aslan, M. The effects of sulfite on cpla2, caspase-3, oxidative stress and locomotor activity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2019; 123: 453-458.

Baune, B. T., Sluth, L. B., & Olsen, C. K. The effects of vortioxetine on cognitive performance in working patients with major depressive disorder: A short-term, randomized, double-blind, exploratory study. *J Affect Disord*. 2018; 229: 421-428.

Bayram, F. E. O., Reis, R., Tuncer, B., & Sipahi, H. The importance of the structural similarity of drugs used for depression and inflammation, two comorbid diseases. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18 (16): 1416-1421.

Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000; 3 (12): 1301-1306.

Betry, C., Etievant, A., Pehrson, A., Sanchez, C., & Haddjeri, N. Effect of the multimodal acting antidepressant vortioxetine on rat hippocampal plasticity and recognition memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015; 58: 38-46.

Bevins, R. A., & Besheer, J. Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*. 2006; 1 (3): 1306-1311.

Bhide, N., & Bishop, C. (2011). Pathophysiology of non-dopaminergic monoamine systems in parkinson's disease: Implications for mood dysfunction. In.

Biundo, R., Weis, L., & Antonini, A. Cognitive decline in parkinson's disease: The complex picture. *NPJ Parkinsons Dis*. 2016; 2: 16018.

Blandini, F. Neuroprotection by rasagiline: A new therapeutic approach to parkinson's disease? *CNS Drug Rev*. 2005; 11 (2): 183-194.

Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., & Martignoni, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2000; 62 (1): 63-88.

Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Rey, N. (2016). Animal models of parkinson's disease. In.

Bolayır, E., Taş, A., Topalkara, K., Akyüz, A., & Topaktaş, S. Sivas İl merkezinde parkinson hastalığı prevalansı. 2002.

Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tscherter, A., Bernardi, G., Surmeier, D. J., & Pisani, A. Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonin receptors: Implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32 (8): 1840-1854.

Borgonovo, J., Allende-Castro, C., Laliena, A., Guerrero, N., Silva, H., & Concha, M. L. Changes in neural circuitry associated with depression at pre-clinical, pre-motor and early motor phases of parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017; 35: 17-24.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24 (2): 197-211.

Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. Stages in the development of parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004; 318 (1): 121-134.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Brandalise, F. The dendritic nmda spike as a fundamental mechanism initiating associative plasticity in the ca3 region of the hippocampus. 2016.

Brodacki, B., Staszewski, J., Toczyłowska, B., Kozłowska, E., Drela, N., Chalimoniuk, M., & Stepień, A. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF-α, and INF-γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*. 2008; 441 (2): 158-162.

Brothers, H. M., Bardou, I., Hopp, S. C., Marchalant, Y., Kaercher, R. M., Turner, S. M., Mitchem, M. R., Kigerl, K., & Wenk, G. L. Time-dependent compensatory responses to chronic neuroinflammation in hippocampus and brainstem: The potential role of glutamate neurotransmission. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2013; 3: 110.

Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Purl, K. J., Capano, M., Crompton, M., & Dubinsky, J. M. Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J Neurosci*. 2003; 23 (12): 4858-4867.

Buhot, M. C., Martin, S., & Segu, L. Role of serotonin in memory impairment. *Ann Med*. 2000; 32 (3): 210-221.

Burke, N. N., Finn, D. P., & Roche, M. Neuroinflammatory mechanisms linking pain and depression. *Mod Trends Pharmacopsychiatry*. 2015; 30: 36-50.

Bülbül, M., Sinen, O., Özkan, A., Aslan, M. A., & Ağar, A. Central neuropeptide-s treatment improves neurofunctions of 6-OHDA-induced parkinsonian rats. *Experimental Neurology*. 2019; 317: 78-86.

Calabresi, P., Castrioto, A., Di Filippo, M., & Picconi, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2013; 12 (8): 811-821.

Camina, E., & Güell, F. The neuroanatomical, neurophysiological and psychological basis of memory: Current models and their origins. *Frontiers in Pharmacology.* 2017; 8 (438).

Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E., & Greenamyre, J. T. A highly reproducible rotenone model of parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009; 34 (2): 279-290.

Caplan, I. F., & Maguire-Zeiss, K. A. Toll-like receptor 2 signaling and current approaches for therapeutic modulation in synucleinopathies. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 417.

Caravaggio, F., Nakajima, S., Plitman, E., Gerretsen, P., Chung, J. K., Iwata, Y., & Graff-Guerrero, A. The effect of striatal dopamine depletion on striatal and cortical glutamate: A mini-review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016; 65: 49-53.

Caudal, D., Alvarsson, A., Björklund, A., & Svenningsson, P. Depressive-like phenotype induced by aav-mediated overexpression of human α -synuclein in midbrain dopaminergic neurons. *Experimental Neurology.* 2015; 273: 243-252.

Cha, M. Y., Kim, D. K., & Mook-Jung, I. The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med.* 2015; 47: e150.

Charvin, D., Medori, R., Hauser, R. A., & Rascol, O. Therapeutic strategies for parkinson disease: Beyond dopaminergic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2018; 17 (11): 804-822.

Cohen, S. J., & Stackman, R. W., Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res.* 2015; 285: 105-117.

Connolly, B., & Fox, S. H. Treatment of cognitive, psychiatric, and affective disorders associated with parkinson's disease. *Neurotherapeutics.* 2014; 11 (1): 78-91.

Contreras, C. M., Rodriguez-Landa, J. F., Garcia-Rios, R. I., Cueto-Escobedo, J., Guillen-Ruiz, G., & Bernal-Morales, B. Myristic acid produces anxiolytic-like effects in wistar rats in the elevated plus maze. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 492141.

Cosgrove, J., & Alty, J. Cognitive deficits in parkinson's disease: Current perspectives. *Journal of Parkinsonism and Restless Legs Syndrome.* 2018; Volume 8: 1-11.

Cosgrove, J., Alty, J. E., & Jamieson, S. Cognitive impairment in parkinson's disease. *Postgrad Med J.* 2015; 91 (1074): 212-220.

- Cumbo, E., Cumbo, S., Torregrossa, S., & Migliore, D. Treatment effects of vortioxetine on cognitive functions in mild alzheimer's disease patients with depressive symptoms: A 12 month, open-label, observational study. *J Prev Alzheimers Dis.* 2019; 6 (3): 192-197.
- Dale, E., Zhang, H., Leiser, S. C., Xiao, Y., Lu, D., Yang, C. R., Plath, N., & Sanchez, C. Vortioxetine disinhibits pyramidal cell function and enhances synaptic plasticity in the rat hippocampus. *J Psychopharmacol.* 2014; 28 (10): 891-902.
- Daniele, S. G., Beraud, D., Davenport, C., Cheng, K., Yin, H., & Maguire-Zeiss, K. A. Activation of myd88-dependent tlr1/2 signaling by misfolded alpha-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal.* 2015; 8 (376): ra45.
- Das, T., Hwang, J. J., & Poston, K. L. Episodic recognition memory and the hippocampus in parkinson's disease: A review. *Cortex.* 2019; 113: 191-209.
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 508 (1): 1-12.
- Del Arco, A., Segovia, G., & Mora, F. Blockade of nmda receptors in the prefrontal cortex increases dopamine and acetylcholine release in the nucleus accumbens and motor activity. *Psychopharmacology (Berl).* 2008; 201 (3): 325-338.
- Del Rey, N. L.-G., Quiroga-Varela, A., Garbayo, E., Carballo-Carbajal, I., Fernández-Santiago, R., Monje, M. H. G., Trigo-Damas, I., Blanco-Prieto, M. J., & Blesa, J. Advances in parkinson's disease: 200 years later. *Frontiers in Neuroanatomy.* 2018; 12 (113).
- Delaville, C., Deurwaerdere, P. D., & Benazzouz, A. Noradrenaline and parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2011; 5: 31.
- DeMaagd, G., & Philip, A. Parkinson's disease and its management: Part 1: Disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *P T.* 2015; 40 (8): 504-532.
- Demireva, E. Y., Suri, D., Morelli, E., Mahadevia, D., Chuhma, N., Teixeira, C. M., Ziolkowski, A., Hersh, M., Fifer, J., Bagchi, S., Chmiakine, A., Moore, H., Gingrich, J. A., Balsam, P., Rayport, S., & Ansorge, M. S. 5-HT_{2C} receptor blockade reverses ssri-associated basal ganglia dysfunction and potentiates therapeutic efficacy. *Mol Psychiatry.* 2018.
- Deshmukh, S., & Knierim, J. Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2011; 5 (69).
- Di Matteo, V., Pierucci, M., Di Giovanni, G., Di Santo, A., Poggi, A., Benigno, A., & Esposito, E. Aspirin protects striatal dopaminergic neurons from neurotoxin-induced degeneration: An in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 2006; 1095 (1): 167-177.

Doorn, K. J., Moors, T., Drukarch, B., van de Berg, W., Lucassen, P. J., & van Dam, A. M. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental lewy body disease cases and parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 90.

Drouin-Ouellet, J., St-Amour, I., Saint-Pierre, M., Lamontagne-Proulx, J., Kriz, J., Barker, R. A., & Cicchetti, F. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 18 (6).

Du, C., Guo, Y., Zhang, Q.-J., Zhang, J., Lv, S., & Liu, J. Involvement of prefrontal 5-HT₇ receptors in the regulation of anxiety-like behaviors in hemiparkinsonian rats. *Neurological Research.* 2018; 40: 1-9.

du Jardin, K. G., Jensen, J. B., Sanchez, C., & Pehrson, A. L. Vortioxetine dose-dependently reverses 5-HT depletion-induced deficits in spatial working and object recognition memory: A potential role for 5-HT_{1A} receptor agonism and 5-HT₃ receptor antagonism. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014; 24 (1): 160-171.

Duffy, M. F., Collier, T. J., Patterson, J. R., Kemp, C. J., Luk, K. C., Tansey, M. G., Paumier, K. L., Kanaan, N. M., Fischer, D. L., Polinski, N. K., Barth, O. L., Howe, J. W., Vaikath, N. N., Majbour, N. K., El-Agnaf, O. M. A., & Sortwell, C. E. Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. *J Neuroinflammation.* 2018; 15 (1): 129.

Durmus, H., Gokalp, M. A., & Hanagasi, H. A. Prevalence of parkinson's disease in baskale, turkey: A population based study. *Neurological Sciences.* 2015; 36 (3): 411-413.

Dzamko, N., Gysbers, A., Perera, G., Bahar, A., Shankar, A., Gao, J., Fu, Y., & Halliday, G. M. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol.* 2017; 133 (2): 303-319.

Dziwota, E., & Olajossy, M. Vortioxetine - the new antidepressant agent with procognitive properties. *Acta Pol Pharm.* 2016; 73 (6): 1433-1437.

Ehringer, H., & Hornykiewicz, O. [distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr.* 1960; 38: 1236-1239.

Fagotti, J., Targa, A. D. S., Rodrigues, L. S., Nosedá, A. C. D., Dorieux, F. W. C., Scarante, F. F., Ilkiw, J. L., Louzada, F. M., Chowdhury, N. R., van der Veen, D. R., Middleton, B., Pennings, J. L. A., Swann, J. R., Skene, D. J., & Lima, M. M. S. Chronic sleep restriction in the rotenone parkinson's disease model in rats reveals peripheral early-phase biomarkers. *Scientific Reports.* 2019; 9 (1): 1898.

Fan, L. L., Deng, B., Yan, J. B., Hu, Z. H., Ren, A. H., Hu, Y. M., & Yang, D. W. [effect of 5-HT₇ receptor agonist on pyramidal neurons in the medial frontal cortex in a rat model of parkinson's disease]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2016; 36 (6): 756-762.

- Feng, Y., Liang, Z. H., Wang, T., Qiao, X., Liu, H. J., & Sun, S. G. Alpha-synuclein redistributed and aggregated in rotenone-induced parkinson's disease rats. *Neurosci Bull.* 2006; 22 (5): 288-293.
- Ferger, A. I., Campanelli, L., Reimer, V., Muth, K. N., Merdian, I., Ludolph, A. C., & Witting, A. Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia. *J Neuroinflammation.* 2010; 7: 45.
- Ferguson, M. C., Nayyar, T., Deutch, A. Y., & Ansah, T. A. 5-HT_{2A} receptor antagonists improve motor impairments in the mptp mouse model of parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2010; 59 (1-2): 31-36.
- Ferreira, S. A., & Romero-Ramos, M. Microglia response during parkinson's disease: Alpha-synuclein intervention. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2018; 12 (247).
- Ferrer, I. Neuropathology and neurochemistry of nonmotor symptoms in parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2011; 2011: 708404.
- Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., & de Oliveira, A. C. P. Role of microglia tlr's in neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 329.
- Fourrier, C., Sampson, E., Mills, N. T., & Baune, B. T. Anti-inflammatory treatment of depression: Study protocol for a randomised controlled trial of vortioxetine augmented with celecoxib or placebo. *Trials.* 2018; 19 (1): 447.
- Fowler, A.-K., Thompson, J., Chen, L., Dagda, M., Dertien, J., Dossou, K. S. S., Moaddel, R., Bergeson, S. E., & Kruman, I. I. Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity. *PLOS ONE.* 2014; 9 (9): e106945.
- Fox, S. H., Chuang, R., & Brotchie, J. M. Serotonin and parkinson's disease: On movement, mood, and madness. *Mov Disord.* 2009; 24 (9): 1255-1266.
- Frechilla, D., Cobreros, A., Saldise, L., Moratalla, R., Insausti, R., Luquin, M., & Del Río, J. Serotonin 5-HT_{1A} receptor expression is selectively enhanced in the striosomal compartment of chronic parkinsonian monkeys. *Synapse (New York, N.Y.).* 2001; 39: 288-296.
- Frenklach, A. Management of depression in parkinson's disease. *American Journal of Psychiatry Residents' Journal.* 2016; 11 (4): 8-11.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., & Iwatsubo, T. Alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 2002; 4 (2): 160-164.
- Gallagher, D. A., & Schrag, A. Psychosis, apathy, depression and anxiety in parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012; 46 (3): 581-589.

Gallegos, S., Pacheco, C., Peters, C., Opazo, C. M., & Aguayo, L. G. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of parkinson's disease. *Front Neurosci.* 2015; 9: 59.

Galvan, A., & Wichmann, T. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119 (7): 1459-1474.

Gao, H.-M., Hong, J.-S., Zhang, W., & Liu, B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience.* 2002; 22 (3): 782-790.

George, S., Hamblin, M. R., & Abrahamse, H. Differentiation of mesenchymal stem cells to neuroglia: In the context of cell signalling. *Stem Cell Rev Rep.* 2019; 15 (6): 814-826.

Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B., & Brooks, D. J. In vivo imaging of microglial activation with [11c](r)-pk11195 pet in idiopathic parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2006; 21 (2): 404-412.

Ghazizadeh, A., Hong, S., & Hikosaka, O. Prefrontal cortex represents long-term memory of object values for months. *Current Biology.* 2018; 28 (14): 2206-2217.e2205.

Ghosh, A. Brain apcs including microglia are only differential and positional polymorphs. *Ann Neurosci.* 2010; 17 (4): 191-199.

Gleich, T., Deserno, L., Lorenz, R. C., Boehme, R., Pankow, A., Buchert, R., Kuhn, S., Heinz, A., Schlagenhauf, F., & Gallinat, J. Prefrontal and striatal glutamate differently relate to striatal dopamine: Potential regulatory mechanisms of striatal presynaptic dopamine function? *J Neurosci.* 2015; 35 (26): 9615-9621.

Goes, A. T. R., Jesse, C. R., Antunes, M. S., Lobo Ladd, F. V., Lobo Ladd, A. A. B., Luchese, C., Paroul, N., & Boeira, S. P. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of parkinson's disease: Involvement of neuroinflammation and neurotrophins. *Chem Biol Interact.* 2018; 279: 111-120.

Goetz, C. G., Poewe, W., Rascol, O., & Sampaio, C. Evidence-based medical review update: Pharmacological and surgical treatments of parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov Disord.* 2005; 20 (5): 523-539.

Goldenberg, M. M. Medical management of parkinson's disease. *P T.* 2008; 33 (10): 590-606.

Goodarzi, Z., Mrklas, K. J., Roberts, D. J., Jette, N., Pringsheim, T., & Holroyd-Leduc, J. Detecting depression in parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2016; 87 (4): 426-437.

Govoni, S., Racchi, M., Masoero, E., Zamboni, M., & Ferini-Strambi, L. Extrapyrarnidal symptoms and antidepressant drugs: Neuropharmacological aspects of a frequent interaction in the elderly. *Molecular Psychiatry*. 2001; 6 (2): 134-142.

Griffith, H. R., Okonkwo, O. C., O'Brien, T., & Hollander, J. A. Reduced brain glutamate in patients with parkinson's disease. *NMR Biomed*. 2008; 21 (4): 381-387.

Gubellini, P., & Kachidian, P. Animal models of parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)*. 2015; 171 (11): 750-761.

Gunaydin, C., Avci, B., Bozkurt, A., Onger, M. E., Balci, H., & Bilge, S. S. Effects of agomelatine in rotenone-induced parkinson's disease in rats. *Neurosci Lett*. 2019; 699: 71-76.

Gustot, A., Gallea, J. I., Sarroukh, R., Celej, M. S., Ruysschaert, J. M., & Raussens, V. Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in parkinson's disease. *Biochem J*. 2015; 471 (3): 323-333.

Güven, B., & Can, M. Çeşitli hastalıklarda toll benzeri reseptörlerin rolü. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2012; 2 (1): 1-10.

Haider, S., Madiha, S., & Batool, Z. Amelioration of motor and non-motor deficits and increased striatal apoe levels highlight the beneficial role of pistachio supplementation in rotenone-induced rat model of pd. *Metab Brain Dis*. 2020; 35 (7): 1189-1200.

Halliday, G. M., Leverenz, J. B., Schneider, J. S., & Adler, C. H. The neurobiological basis of cognitive impairment in parkinson's disease. *Mov Disord*. 2014; 29 (5): 634-650.

Han, L. N., Zhang, L., Sun, Y. N., Du, C. X., Zhang, Y. M., Wang, T., Zhang, J., & Liu, J. Serotonin7 receptors in the lateral habenular nucleus regulate depressive-like behaviors in the hemiparkinsonian rats. *Brain Research*. 2016; 1644: 79-87.

Harrison, J. E., Lophaven, S., & Olsen, C. K. Which cognitive domains are improved by treatment with vortioxetine? *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016; 19 (10).

Hausdorff, J. M., Zitser, J., Mirelman, A., & Giladi, N. (2015). Interaction between cognition and gait in patients with parkinson's disease. In M. Emre (Ed.), *Cognitive impairment and dementia in parkinson's disease* (2 ed., pp. 91-110). London: Oxford University Press.

He, Y., Appel, S., & Le, W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res*. 2001; 909 (1-2): 187-193.

Hely, M. A., Reid, W. G., Adena, M. A., Halliday, G. M., & Morris, J. G. The sydney multicenter study of parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord*. 2008; 23 (6): 837-844.

Henderson, J., Yiannikas, C., & Graham, J. S. Effect of ritanserin, a highly selective 5-HT₂ receptor antagonist, on parkinson's disease. *Clin Exp Neurol*. 1992; 29: 277-282.

Hernandez-Romero, M. C., Arguelles, S., Villaran, R. F., de Pablos, R. M., Delgado-Cortes, M. J., Santiago, M., Herrera, A. J., Cano, J., & Machado, A. Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. *J Neurochem*. 2008; 105 (2): 445-459.

Hochstrasser, T., Ehrlich, D., Sperner-Unterweger, B., & Humpel, C. Antidepressants and anti-inflammatory drugs differentially reduce the release of ngf and bdnf from rat platelets. *Pharmacopsychiatry*. 2013; 46 (1): 29-34.

Hodges, H., Sowinski, P., Turner, J. J., & Fletcher, A. Comparison of the effects of the 5-HT₃ receptor antagonists WAY-100579 and ondansetron on spatial learning in the water maze in rats with excitotoxic lesions of the forebrain cholinergic projection system. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996; 125 (2): 146-161.

Holmer, H. K., Keyghobadi, M., Moore, C., & Meshul, C. K. L-dopa-induced reversal in striatal glutamate following partial depletion of nigrostriatal dopamine with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*. 2005; 136 (1): 333-341.

Hornykiewicz, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*. 2006; (70): 9-15.

Hornykiewicz, O. L-dopa. *J Parkinsons Dis*. 2017; 7 (s1): S3-S10.

Hou, J.-G. G., & Lai, E. C. Non-motor symptoms of parkinson's disease. *International Journal of Gerontology*. 2007; 1 (2): 53-64.

Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., & Hashizume, Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*. 2003; 106 (6): 518-526.

Iyengar, R. L., Gandhi, S., Aneja, A., Thorpe, K., Razzouk, L., Greenberg, J., Mosovich, S., & Farkouh, M. E. NSAIDs are associated with lower depression scores in patients with osteoarthritis. *Am J Med*. 2013; 126 (11): 1017 e1011-1018.

İzci, Y., & Erbaş, Y. C. Hipokampus: Yapısı ve fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*. 2015; 25 (3): 287-295.

Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S., & Khurana, S. Evaluation of models of parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2016; 9 (503).

Jankovic, J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79 (4): 368-376.

Jankovic, J., & Poewe, W. Therapies in parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2012; 25 (4): 433-447.

Jankovic, J., & Tan, E. K. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2020; 91 (8): 795-808.

Jensen, J. B., du Jardin, K. G., Song, D., Budac, D., Smagin, G., Sanchez, C., & Pehrson, A. L. Vortioxetine, but not escitalopram or duloxetine, reverses memory impairment induced by central 5-HT depletion in rats: Evidence for direct 5-HT receptor modulation. *European Neuropsychopharmacology*. 2014; 24 (1): 148-159.

Jin, J., & Maren, S. Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2015; 9 (170).

Joers, V., Tansey, M. G., Mulas, G., & Carta, A. R. Microglial phenotypes in parkinson's disease and animal models of the disease. *Progress in neurobiology*. 2017; 155: 57-75.

Kabba, J. A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J. M., & Pang, T. Microglia: Housekeeper of the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol*. 2018; 38 (1): 53-71.

Kalita, J., & Misra, U. K. Management of advanced parkinson disease: Still a riddle. *Neurol India*. 2018; 66 (6): 1853-1854.

Kandil, E. A., Abdelkader, N. F., El-Sayeh, B. M., & Saleh, S. Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of parkinson's disease in rats. *Neuroscience*. 2016; 332: 26-37.

Kano, O., Ikeda, K., Cridebring, D., Takazawa, T., Yoshii, Y., & Iwasaki, Y. Neurobiology of depression and anxiety in parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2011; 2011: 143547.

Kawasaki, T., & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5 (461).

Kerenyi, L., Ricaurte, G. A., Schretlen, D. J., McCann, U., Varga, J., Mathews, W. B., Ravert, H. T., Dannals, R. F., Hilton, J., Wong, D. F., & Szabo, Z. Positron emission tomography of striatal serotonin transporters in parkinson disease. *Arch Neurol*. 2003; 60 (9): 1223-1229.

Khurana, N., & Gajbhiye, A. Ameliorative effect of *Sida cordifolia* in rotenone induced oxidative stress model of parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2013; 39: 57-64.

Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., Joong Lee, S., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H. J., & Lee, S. J. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*. 2013a; 4: 1562.

Kim, C., Rockenstein, E., Spencer, B., Kim, H. K., Adame, A., Trejo, M., Stafa, K., Lee, H. J., Lee, S. J., & Masliah, E. Antagonizing neuronal toll-like receptor 2 prevents synucleinopathy by activating autophagy. *Cell Rep*. 2015; 13 (4): 771-782.

Kim, C., Spencer, B., Rockenstein, E., Yamakado, H., Mante, M., Adame, A., Fields, J. A., Masliah, D., Iba, M., Lee, H. J., Rissman, R. A., Lee, S. J., & Masliah, E. Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating α -synuclein transmission and neuroinflammation. *Mol Neurodegener.* 2018; 13 (1): 43.

Kim, H. S., Cheon, S. M., Seo, J. W., Ryu, H. J., Park, K. W., & Kim, J. W. Nonmotor symptoms more closely related to parkinson's disease: Comparison with normal elderly. *J Neurol Sci.* 2013b; 324 (1-2): 70-73.

Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. Animal models for parkinson's disease research: Trends in the 2000s. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (21).

Klintworth, H., Garden, G., & Xia, Z. Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release. *Neurosci Lett.* 2009; 462 (1): 1-5.

Kohler, O., Krogh, J., Mors, O., & Benros, M. E. Inflammation in depression and the potential for anti-inflammatory treatment. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2016; 14 (7): 732-742.

Konnova, E. A., & Swanberg, M. (2018). Animal models of parkinson's disease. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's disease: Pathogenesis and clinical aspects*. Brisbane (AU).

Kouli, A., Horne, C. B., & Williams-Gray, C. H. Toll-like receptors and their therapeutic potential in parkinson's disease and alpha-synucleinopathies. *Brain Behav Immun.* 2019; 81: 41-51.

Krebs-Kraft, D. L., Frantz, K. J., & Parent, M. B. (2007). In vivo microdialysis: A method for sampling extracellular fluid in discrete brain regions. In A. Lajtha, G. Baker, S. Dunn, & A. Holt (Eds.), *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Practical neurochemistry methods* (pp. 219-256). Boston, MA: Springer US.

Kumar, V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2019; 332: 16-30.

Kundakci, A., & Pirat, A. Toll benzeri reseptörler. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi.* 2012; 10: 63-73.

Kurkowska-Jastrzebska, I., Litwin, T., Joniec, I., Ciesielska, A., Przybylowski, A., Czlonkowski, A., & Czlonkowska, A. Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of parkinson's disease. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4 (10-11): 1307-1318.

La Vitola, P., Balducci, C., Cerovic, M., Santamaria, G., Brandi, E., Grandi, F., Caldinelli, L., Colombo, L., Morgese, M. G., Trabace, L., Pollegioni, L., Albani, D., & Forloni, G. Alpha-synuclein oligomers impair memory through glial cell activation and via toll-like receptor 2. *Brain Behav Immun.* 2018; 69: 591-602.

Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2 (12): a009621.

Langston, J. W. The mptp story. *J Parkinsons Dis.* 2017; 7 (s1): S11-S19.

Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. What, if anything, is rodent prefrontal cortex? *eNeuro.* 2018; 5 (5): ENEURO.0315-0318.2018.

Lecours, C., Bordeleau, M., Cantin, L., Parent, M., Paolo, T. D., & Tremblay, M.-È. Microglial implication in parkinson's disease: Loss of beneficial physiological roles or gain of inflammatory functions? *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2018; 12 (282).

Lehnardt, S. Innate immunity and neuroinflammation in the cns: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia.* 2010; 58 (3): 253-263.

Letiembre, M., Liu, Y., Walter, S., Hao, W., Pfander, T., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., & Fassbender, K. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. *Neurobiol Aging.* 2009; 30 (5): 759-768.

Lewis, P. A. James parkinson: The man behind the shaking palsy. *J Parkinsons Dis.* 2012; 2 (3): 181-187.

Li, C., Chen, X., Zhang, N., Song, Y., & Mu, Y. Gastrodin inhibits neuroinflammation in rotenone-induced parkinson's disease model rats. *Neural Regen Res.* 2012a; 7 (5): 325-331.

Li, C., Chen, X., Zhang, N., Song, Y., & Mu, Y. Gastrodin inhibits neuroinflammation in rotenone-induced parkinson's disease model rats. *Neural Regeneration Research.* 2012b; 7 (5): 325-331.

Li, L., Zhao, J., Liu, K., Li, G.-l., Han, Y.-q., & Liu, Y.-z. Geniposide prevents rotenone-induced apoptosis in primary cultured neurons. *Neural Regeneration Research.* 2015a; 10 (10): 1617-1621.

Li, Y., Abdourahman, A., Tamm, J. A., Pehrson, A. L., Sanchez, C., & Gulinello, M. Reversal of age-associated cognitive deficits is accompanied by increased plasticity-related gene expression after chronic antidepressant administration in middle-aged mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015b; 135: 70-82.

Li, Y., Raaby, K. F., Sanchez, C., & Gulinello, M. Serotonergic receptor mechanisms underlying antidepressant-like action in the progesterone withdrawal model of hormonally induced depression in rats. *Behav Brain Res.* 2013; 256: 520-528.

Lim, J., Bang, Y., & Choi, H. J. Abnormal hippocampal neurogenesis in parkinson's disease: Relevance to a new therapeutic target for depression with parkinson's disease. *Arch Pharm Res.* 2018; 41 (10): 943-954.

Lindqvist, D., Kaufman, E., Brundin, L., Hall, S., Surova, Y., & Hansson, O. Non-motor symptoms in patients with parkinson's disease – correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLOS ONE*. 2012; 7 (10): e47387.

Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., Chen, H., Zhu, D.-Y., & Zhou, Q.-G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*. 2018: 1.

Liu, Y., Guo, Y., An, S., Kuang, Y., He, X., Ma, H., Li, J., Lv, J., Zhang, N., & Jiang, C. Targeting caspase-3 as dual therapeutic benefits by rnaï facilitating brain-targeted nanoparticles in a rat model of parkinson's disease. *PLOS ONE*. 2013; 8 (5): e62905.

Lix, L. M., Hobson, D. E., Azimae, M., Leslie, W. D., Burchill, C., & Hobson, S. Socioeconomic variations in the prevalence and incidence of parkinson's disease: A population-based analysis. *J Epidemiol Community Health*. 2010; 64 (4): 335-340.

Lofrumento, D. D., Saponaro, C., Cianciulli, A., De Nuccio, F., Mitolo, V., Nicolardi, G., & Panaro, M. A. Mptp-induced neuroinflammation increases the expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors in mouse brain. *Neuroimmunomodulation*. 2011; 18 (2): 79-88.

Long-Smith, C. M., Sullivan, A. M., & Nolan, Y. M. The influence of microglia on the pathogenesis of parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2009; 89 (3): 277-287.

Lou, H., Montoya, S., Alerte, T., Wang, J., Wu, J., Peng, X., Hong, C.-S., Friedrich, E., Mader, S., Pedersen, C., Marcus, B., McCormack, A., Di Monte, D., Daubner, S., & Perez, R. Serine 129 phosphorylation reduces the ability of α -synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2a in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 17648-17661.

Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. Revisiting the mechanisms of cns immune privilege. *Trends Immunol*. 2015; 36 (10): 569-577.

Luo, C., Rajput, A. H., Akhtar, S., & Rajput, A. Alpha-synuclein and tyrosine hydroxylase expression in acute rotenone toxicity. *Int J Mol Med*. 2007; 19 (3): 517-521.

Ma, M. R., Hu, Z. W., Zhao, Y. F., Chen, Y. X., & Li, Y. M. Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Sci Rep*. 2016; 6: 37130.

Mahableshwarkar, A. R., Zajecka, J., Jacobson, W., Chen, Y., & Keefe, R. S. A randomized, placebo-controlled, active-reference, double-blind, flexible-dose study of the efficacy of vortioxetine on cognitive function in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2015; 40 (8): 2025-2037.

Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J. B., Medhurst, A. D., & Dexter, D. T. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: A time course study in a 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease. *J Neurochem*. 2009; 110 (3): 966-975.

Marinus, J., Zhu, K., Marras, C., Aarsland, D., & van Hilten, J. J. Risk factors for non-motor symptoms in parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2018; 17 (6): 559-568.

Markowitsch, H. J. Memory and self-neuroscientific landscapes. *ISRN Neurosci.* 2013; 2013: 176027.

Marsh, L. Depression and parkinson's disease: Current knowledge. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013; 13 (12): 409.

Massano, J., & Bhatia, K. P. Clinical approach to parkinson's disease: Features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012; 2 (6): a008870-a008870.

McCabe, K., Concannon, R. M., McKernan, D. P., & Dowd, E. Time-course of striatal toll-like receptor expression in neurotoxic, environmental and inflammatory rat models of parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2017; 310: 103-106.

McIntyre, R. S., Lophaven, S., & Olsen, C. K. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of vortioxetine on cognitive function in depressed adults. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 17 (10): 1557-1567.

Medeiros-Linard, C. F. B., Andrade-da-Costa, B., Augusto, R. L., Sereniki, A., Trevisan, M. T. S., Pereira, R. C. R., de Souza, F. T. C., Braz, G. R. F., Lagranha, C. J., de Souza, I. A., Wanderley, A. G., Smailli, S. S., & Lafayette, S. S. L. Anacardic acids from cashew nuts prevent behavioral changes and oxidative stress induced by rotenone in a rat model of parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2018; 34 (2): 250-262.

Meneses, A. Serotonin, neural markers, and memory. *Frontiers in Pharmacology.* 2015; 6 (143).

Meshul, C. K., Emre, N., Nakamura, C. M., Allen, C., Donohue, M. K., & Buckman, J. F. Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience.* 1999; 88 (1): 1-16.

Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 2009; 65 (9): 732-741.

Mitchell, E. S., Sexton, T., & Neumaier, J. F. Increased expression of 5-HT₆ receptors in the rat dorsomedial striatum impairs instrumental learning. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32 (7): 1520-1530.

Mitra, S., Chakrabarti, N., Dutta, S. S., Ray, S., Bhattacharya, P., Sinha, P., & Bhattacharyya, A. Gender-specific brain regional variation of neurons, endogenous estrogen, neuroinflammation and glial cells during rotenone-induced mouse model of parkinson's disease. *Neuroscience.* 2015; 292: 46-70.

Miyasaki, J. M., Martin, W., Suchowersky, O., Weiner, W. J., & Lang, A. E. Practice parameter: Initiation of treatment for parkinson's disease: An evidence-based review: Report of the quality standards subcommittee of the american academy of neurology. *Neurology*. 2002; 58 (1): 11-17.

Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. Interleukin (il)-1 beta, il-2, il-4, il-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996; 211 (1): 13-16.

Mohanakumar, K. P., Muralikrishnan, D., & Thomas, B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2000; 864 (2): 281-290.

Monville, C., Torres, E. M., & Dunnett, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-ohda model. *J Neurosci Methods*. 2006; 158 (2): 219-223.

Morais, L. H., Lima, M. M., Martynhak, B. J., Santiago, R., Takahashi, T. T., Ariza, D., Barbiero, J. K., Andreatini, R., & Vital, M. A. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. *Pharmacol Rep*. 2012; 64 (5): 1081-1090.

Mork, A., Montezinho, L. P., Miller, S., Trippodi-Murphy, C., Plath, N., Li, Y., Gulinello, M., & Sanchez, C. Vortioxetine (lu aa21004), a novel multimodal antidepressant, enhances memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; 105: 41-50.

Mork, A., Pehrson, A., Brennum, L. T., Nielsen, S. M., Zhong, H., Lassen, A. B., Miller, S., Westrich, L., Boyle, N. J., Sanchez, C., Fischer, C. W., Liebenberg, N., Wegener, G., Bundgaard, C., Hogg, S., Bang-Andersen, B., & Stensbol, T. B. Pharmacological effects of lu aa21004: A novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 340 (3): 666-675.

Moser, M. B., Rowland, D. C., & Moser, E. I. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 7 (2): a021808.

Motawi, T. K., Sadik, N. A. H., Hamed, M. A., Ali, S. A., Khalil, W. K. B., & Ahmed, Y. R. Potential therapeutic effects of antagonizing adenosine a2a receptor, curcumin and niacin in rotenone-induced parkinson's disease mice model. *Mol Cell Biochem*. 2020; 465 (1-2): 89-102.

Moussa, C. E., Rusnak, M., Hailu, A., Sidhu, A., & Fricke, S. T. Alterations of striatal glutamate transmission in rotenone-treated mice: Mri/mrs in vivo studies. *Exp Neurol*. 2008; 209 (1): 224-233.

Muller, T. Drug therapy in patients with parkinson's disease. *Transl Neurodegener*. 2012; 1 (1): 10.

Mulligan, N. W. (2003). Memory: Implicit versus explicit. In L. Nadel (Ed.), *Encyclopedia of cognitive science*: Nature Publishing Group.

Muñoz, A., Lopez-Lopez, A., Labandeira, C. M., & Labandeira-Garcia, J. L. Interactions between the serotonergic and other neurotransmitter systems in the basal ganglia: Role in parkinson's disease and adverse effects of l-dopa. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2020; 14 (26).

Musazzi, L., Treccani, G., Mallei, A., & Popoli, M. The action of antidepressants on the glutamate system: Regulation of glutamate release and glutamate receptors. *Biol Psychiatry*. 2013; 73 (12): 1180-1188.

Nagarajan, V. B., & Marathe, P. A. Effect of montelukast in experimental model of parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2018; 682: 100-105.

Nagatsu, T., & Sawada, M. Inflammatory process in parkinson's disease: Role for cytokines. *Curr Pharm Des*. 2005; 11 (8): 999-1016.

Narayanan, N. S., Rodnitzky, R. L., & Uc, E. Y. Prefrontal dopamine signaling and cognitive symptoms of parkinson's disease. *Rev Neurosci*. 2013; 24 (3): 267-278.

Nie, L., Cai, S.-Y., Shao, J.-Z., & Chen, J. Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9 (1523).

Noelker, C., Morel, L., Lescot, T., Osterloh, A., Alvarez-Fischer, D., Breloer, M., Henze, C., Depboylu, C., Skrzydelski, D., Michel, P. P., Dodel, R. C., Lu, L., Hirsch, E. C., Hunot, S., & Hartmann, A. Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse mptp model of parkinson disease. *Sci Rep*. 2013; 3: 1393.

Nosedá, A. C. D., Targa, A. D. S., Rodrigues, L. S., Aurich, M. F., & Lima, M. M. S. Rem sleep deprivation promotes a dopaminergic influence in the striatal m2 anxiolytic-like effects. *Sleep Science*. 2016; 9 (1): 47-54.

O'Callaghan, C., Shine, J. M., Lewis, S. J., & Hornberger, M. Neuropsychiatric symptoms in parkinson's disease: Fronto-striatal atrophy contributions. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20 (8): 867-872.

O'Gorman Tuura, R. L., Baumann, C. R., & Baumann-Vogel, H. Beyond dopamine: Gaba, glutamate, and the axial symptoms of parkinson disease. *Frontiers in Neurology*. 2018; 9 (806).

Obeso, J. A., & Lanciego, J. L. Past, present, and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Front Neuroanat*. 2011; 5: 39.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H., & Halliday, G. Missing pieces in the parkinson's disease puzzle. *Nat Med*. 2010; 16 (6): 653-661.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., Arbizu, J., & Gimenez-Amaya, J. M. The basal ganglia and disorders of movement: Pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci.* 2002; 17: 51-55.

Ohno, Y., Shimizu, S., Tokudome, K., Kunisawa, N., & Sasa, M. New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2015; 134: 104-121.

Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Abul Khair, S. B., & Haque, M. E. Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of parkinson's disease. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 5499-5510.

Oliveira, J. M., & Goncalves, J. In situ mitochondrial ca^{2+} buffering differences of intact neurons and astrocytes from cortex and striatum. *J Biol Chem.* 2009; 284 (8): 5010-5020.

Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., & Torizuka, T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2005; 57 (2): 168-175.

Ousman, S. S., & Kubes, P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci.* 2012; 15 (8): 1096-1101.

Özbek, S. E., Zarifoğlu, M., Karli, N., Özçakir, A., Yildiz, D., & Aslan, D. A population-based survey to determine the prevalence of movement disorders in orhangazi district of bursa, turkey. *Turkish Journal of Neurology/Turk Noroloji Dergisi.* 2009; 15 (3).

Paolone, G., Brugnoli, A., Arcuri, L., Mercatelli, D., & Morari, M. Eltoprazine prevents levodopa-induced dyskinesias by reducing striatal glutamate and direct pathway activity. *Mov Disord.* 2015; 30 (13): 1728-1738.

Park, A., & Stacy, M. Disease-modifying drugs in parkinson's disease. *Drugs.* 2015; 75 (18): 2065-2071.

Parkhe, A., Parekh, P., Nalla, L. V., Sharma, N., Sharma, M., Gadepalli, A., Kate, A., & Khairnar, A. Protective effect of alpha mangostin on rotenone induced toxicity in rat model of parkinson's disease. *Neuroscience Letters.* 2020; 716: 134652.

Pehrson, A. L., Cremers, T., Bétry, C., van der Hart, M. G. C., Jørgensen, L., Madsen, M., Haddjeri, N., Ebert, B., & Sanchez, C. Lu aa21004, a novel multimodal antidepressant, produces regionally selective increases of multiple neurotransmitters—a rat microdialysis and electrophysiology study. *European Neuropsychopharmacology.* 2013; 23 (2): 133-145.

Pehrson, A. L., Hillhouse, T. M., Haddjeri, N., Rovera, R., Porter, J. H., Mork, A., Smagin, G., Song, D., Budac, D., Cajina, M., & Sanchez, C. Task- and treatment length-dependent effects of vortioxetine on scopolamine-induced cognitive dysfunction and hippocampal extracellular acetylcholine in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016; 358 (3): 472-482.

Pehrson, A. L., Pedersen, C. S., Tølbøl, K. S., & Sanchez, C. Vortioxetine treatment reverses subchronic pcpr treatment-induced cognitive impairments: A potential role for serotonin receptor-mediated regulation of gaba neurotransmission. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9 (162).

Peña, E., Mata, M., López-Manzanares, L., Kurtis, M., Eimil, M., Martínez-Castrillo, J. C., Navas, I., Posada, I. J., Prieto, C., Ruíz-Huete, C., Vela, L., & Venegas, B. Antidepressants in parkinson's disease. Recommendations by the movement disorder study group of the neurological association of madrid. *Neurología (English Edition)*. 2018; 33 (6): 395-402.

Perez-Lloret, S., & Barrantes, F. J. Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2016; 2: 16001.

Perez-Pardo, P., de Jong, E. M., Broersen, L. M., van Wijk, N., Attali, A., Garssen, J., & Kraneveld, A. D. Promising effects of neurorestorative diets on motor, cognitive, and gastrointestinal dysfunction after symptom development in a mouse model of parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017; 9 (57).

Peshattiwar, V., Muke, S., Kaikini, A., Bagle, S., Dighe, V., & Sathaye, S. Mechanistic evaluation of ursolic acid against rotenone induced parkinson's disease— emphasizing the role of mitochondrial biogenesis. *Brain Research Bulletin*. 2020; 160: 150-161.

Pfeiffer, R. F. Non-motor symptoms in parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016; 22 Suppl 1: S119-122.

Phan, J. A., Stokholm, K., Zareba-Paslawska, J., Jakobsen, S., Vang, K., Gjedde, A., Landau, A. M., & Romero-Ramos, M. Early synaptic dysfunction induced by alpha-synuclein in a rat model of parkinson's disease. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 6363.

Poewe, W. Non-motor symptoms in parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2008; 15 Suppl 1: 14-20.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17013.

Politis, M., & Loane, C. Serotonergic dysfunction in parkinson's disease and its relevance to disability. *ScientificWorldJournal*. 2011; 11: 1726-1734.

Politis, M., & Niccolini, F. Serotonin in parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2015; 277: 136-145.

Prediger, R. D., Matheus, F. C., Schwarzbald, M. L., Lima, M. M., & Vital, M. A. Anxiety in parkinson's disease: A critical review of experimental and clinical studies. *Neuropharmacology*. 2012; 62 (1): 115-124.

Puig, M. V., Rose, J., Schmidt, R., & Freund, N. Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: Insights from studies in primates, rodents, and birds. *Frontiers in Neural Circuits*. 2014; 8 (93).

Rabaneda-Lombarte, N., Xicoy-Espauella, E., Serratosa, J., Saura, J., & Solà, C. Parkinsonian neurotoxins impair the pro-inflammatory response of glial cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2019; 11 (479).

Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016; 353 (6301): 777-783.

Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012; 122 (4): 1164-1171.

Rao, S. V., Hemalatha, P., Yetish, S., Muralidhara, M., & Rajini, P. S. Prophylactic neuroprotective propensity of crocin, a carotenoid against rotenone induced neurotoxicity in mice: Behavioural and biochemical evidence. *Metabolic Brain Disease*. 2019; 34 (5): 1341-1353.

Raudino, F. The parkinson disease before james parkinson. *Neurol Sci*. 2012; 33 (4): 945-948.

Rehavi, M., Maayani, S., & Sokolovsky, M. Tricyclic antidepressants as antimuscarinic drugs: In vivo and in vitro studies. *Biochemical Pharmacology*. 1977; 26 (17): 1559-1567.

Reijnders, J. S., Ehrt, U., Weber, W. E., Aarsland, D., & Leentjens, A. F. A systematic review of prevalence studies of depression in parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008; 23 (2): 183-189; quiz 313.

Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., & Brooks, D. Depression in parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*. 2005; 128 (Pt 6): 1314-1322.

Rex, A., Voigt, J. P., Gustedt, C., Beckett, S., & Fink, H. Anxiolytic-like profile in wistar, but not sprague-dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004; 177 (1-2): 23-34.

Reynolds, A. D., Stone, D. K., Mosley, R. L., & Gendelman, H. E. Nitrated {alpha}-synuclein-induced alterations in microglial immunity are regulated by cd4+ t cell subsets. *J Immunol*. 2009; 182 (7): 4137-4149.

Rietdijk, C., Wezel, R., Garssen, J., & Kraneveld, A. Neuronal toll-like receptors and neuro-immunity in parkinson's disease, alzheimer's disease and stroke. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*. 2016; 3: 27.

Robyt, J. F., & White, B. J. *Biochemical techniques : Theory and practice*: Monterey (Calif.) : Brooks/Cole; 1987, p:

Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2018; 109 (Pt B): 249-257.

Rocha, N. P., de Miranda, A. S., & Teixeira, A. L. Insights into neuroinflammation in parkinson's disease: From biomarkers to anti-inflammatory based therapies. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 628192.

Roodveldt, C., Labrador-Garrido, A., Gonzalez-Rey, E., Lachaud, C. C., Williams, T., Fernandez-Montesinos, R., Benitez-Rondan, A., Robledo, G., Hmadcha, A., Delgado, M., Dobson, C. M., & Pozo, D. Preconditioning of microglia by alpha-synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (tlr) stimulation. *PLoS One.* 2013; 8 (11): e79160.

Ryan, M., Eatmon, C. V., & Slevin, J. T. Drug treatment strategies for depression in parkinson disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2019; 20 (11): 1351-1363.

Salagre, E., Grande, I., Sole, B., Sanchez-Moreno, J., & Vieta, E. Vortioxetine: A new alternative for the treatment of major depressive disorder. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 2018; 11 (1): 48-59.

Salvatore, M. F., McInnis, T. R., Cantu, M. A., Apple, D. M., & Pruett, B. S. Tyrosine hydroxylase inhibition in substantia nigra decreases movement frequency. *Molecular neurobiology.* 2019; 56 (4): 2728-2740.

Samuel, F., Flavin, W. P., Iqbal, S., Pacelli, C., Sri Renganathan, S. D., Trudeau, L. E., Campbell, E. M., Fraser, P. E., & Tandon, A. Effects of serine 129 phosphorylation on alpha-synuclein aggregation, membrane association, and internalization. *J Biol Chem.* 2016; 291 (9): 4374-4385.

Sanchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O., Yu, M., Brownell, A. L., & Isacson, O. Selective cox-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 2004; 1 (1): 6.

Sanchez, C., Asin, K. E., & Artigas, F. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: Review of preclinical and clinical data. *Pharmacology & Therapeutics.* 2015; 145: 43-57.

Sandrini, M., Vitale, G., & Pini, L. A. Effect of rofecoxib on nociception and the serotonin system in the rat brain. *Inflamm Res.* 2002; 51 (3): 154-159.

Sanjari Moghaddam, H., Zare-Shahabadi, A., Rahmani, F., & Rezaei, N. Neurotransmission systems in parkinson's disease. *Rev Neurosci.* 2017; 28 (5): 509-536.

Sato, H., Arawaka, S., Hara, S., Fukushima, S., Koga, K., Koyama, S., & Kato, T. Authentically phosphorylated alpha-synuclein at ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial parkinson's disease. *J Neurosci.* 2011; 31 (46): 16884-16894.

Sauerbier, A., Cova, I., Rosa-Grilo, M., Taddei, R. N., Mischley, L. K., & Chaudhuri, K. R. Treatment of nonmotor symptoms in parkinson's disease. *International review of neurobiology*. 2017; 132: 361-379.

Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. Non-motor features of parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18 (7): 435-450.

Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., & Baldwin, A. S., Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of nf-kappa b by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*. 1995; 15 (2): 943-953.

Scheperjans, F., Derkinderen, P., & Borghammer, P. The gut and parkinson's disease: Hype or hope? *J Parkinsons Dis*. 2018; 8 (s1): S31-S39.

Schmidt, W. J., & Alam, M. (2006). *Controversies on new animal models of parkinson's disease pro and con: The rotenone model of parkinson's disease (pd)*, Vienna.

Schneider, C. B., Linse, K., Schonfeld, R., Brown, S., Koch, R., Reichmann, H., Leplow, B., & Storch, A. Spatial learning deficits in parkinson's disease with and without mild cognitive impairment. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017; 36: 83-88.

Seppi, K., Ray Chaudhuri, K., Coelho, M., Fox, S. H., Katzenschlager, R., Perez Lloret, S., Weintraub, D., Sampaio, C., & the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine, C. Update on treatments for nonmotor symptoms of parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord*. 2019; 34 (2): 180-198.

Sevenich, L. Brain-resident microglia and blood-borne macrophages orchestrate central nervous system inflammation in neurodegenerative disorders and brain cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 697.

Shadfar, S., Kim, Y. G., Katila, N., Neupane, S., Ojha, U., Bhurtel, S., Srivastav, S., Jeong, G. S., Park, P. H., Hong, J. T., & Choi, D. Y. Neuroprotective effects of antidepressants via upregulation of neurotrophic factors in the mptp model of parkinson's disease. *Mol Neurobiol*. 2018; 55 (1): 554-566.

Shallie, P., Babatunde, B., Olayinka, O., Talabi, D., Akpan, H., Folarin, R., Alese, O., & Shallie, D. Neurobehavioral and micro structural evaluation of the anti-anxiety potential of flaxseed oil following rotenone-induced parkinson' disease in mice. *International Neuropsychiatric Disease Journal*. 2017; 9: 1-12.

Sharma, N., Jamwal, S., & Kumar, P. Beneficial effect of antidepressants against rotenone induced parkinsonism like symptoms in rats. *Pathophysiology*. 2016; 23 (2): 123-134.

Sherer, T. B., Betarbet, R., Kim, J. H., & Greenamyre, J. T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003a; 341 (2): 87-90.

Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., & Greenamyre, J. T. Mechanism of toxicity in rotenone models of parkinson's disease. *J Neurosci.* 2003b; 23 (34): 10756-10764.

Sherer, T. B., Kim, J. H., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol.* 2003c; 179 (1): 9-16.

Shimizu, S., Mizuguchi, Y., & Ohno, Y. Improving the treatment of schizophrenia: Role of 5-HT receptors in modulating cognitive and extrapyramidal motor functions. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013; 12 (6): 861-869.

Sigurdsson, T., & Duvarci, S. Hippocampal-prefrontal interactions in cognition, behavior and psychiatric disease. *Frontiers in Systems Neuroscience.* 2016; 9 (190).

Simuni, T., & Sethi, K. Nonmotor manifestations of parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2008; 64 Suppl 2: S65-80.

Smagin, G. N., Song, D., Budac, D. P., Waller, J. A., Li, Y., Pehrson, A. L., & Sánchez, C. Histamine may contribute to vortioxetine's procognitive effects; possibly through an orexigenic mechanism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2016; 68: 25-30.

Solari, N., Bonito-Oliva, A., Fisone, G., & Brambilla, R. Understanding cognitive deficits in parkinson's disease: Lessons from preclinical animal models. *Learn Mem.* 2013; 20 (10): 592-600.

Spataro, P., Rossi-Arnaud, C., & Mulligan, N. W. (2017). 2.05 - implicit versus explicit memory. In J. H. Byrne (Ed.), *Learning and memory: A comprehensive reference (second edition)* (pp. 71-86). Oxford: Academic Press.

Stahl, S. M. Modes and nodes explain the mechanism of action of vortioxetine, a multimodal agent (mma): Actions at serotonin receptors may enhance downstream release of four pro-cognitive neurotransmitters. *CNS Spectrums.* 2015; 20 (6): 515-519.

Standaert, D. G., & Roberson, E. D. (2018). Treatment of central nervous system degenerative disorders. In L. L. Brunton, B. C. Knollmann, & R. Hilal-Dandan (Eds.), *Goodman & Gilman's : The pharmacological basis of therapeutics, 13e* (pp. 609-628). New York, N.Y.: McGraw-Hill Education LLC.

Starkstein, S. E., & Brockman, S. Management of depression in parkinson's disease: A systematic review. *Mov Disord Clin Pract.* 2017; 4 (4): 470-477.

Sugama, S., Yang, L., Cho, B. P., DeGiorgio, L. A., Lorenzl, S., Albers, D. S., Beal, M. F., Volpe, B. T., & Joh, T. H. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (mptp)-induced dopaminergic neurodegeneration in c57bl/6 mice. *Brain Res.* 2003; 964 (2): 288-294.

Sugeno, N., Takeda, A., Hasegawa, T., Kobayashi, M., Kikuchi, A., Mori, F., Wakabayashi, K., & Itoyama, Y. Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. *J Biol Chem.* 2008; 283 (34): 23179-23188.

Sun, Y., Zhang, Y., Zhao, D., Ding, G., Huang, S., Zhang, A., & Jia, Z. Rotenone remarkably attenuates oxidative stress, inflammation, and fibrosis in chronic obstructive uropathy. *Mediators of Inflammation.* 2014; 2014: 670106.

Suresh, R., & Mosser, D. M. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ.* 2013; 37 (4): 284-291.

Svenningsson, P., Rosenblad, C., Af Edholm Arvidsson, K., Wictorin, K., Keywood, C., Shankar, B., Lowe, D. A., Bjorklund, A., & Widner, H. Eltoprazine counteracts l-dopa-induced dyskinesias in parkinson's disease: A dose-finding study. *Brain.* 2015; 138 (Pt 4): 963-973.

Swiatkiewicz, M., Zaremba, M., Joniec, I., Czlonkowski, A., & Kurkowska-Jastrzebska, I. Potential neuroprotective effect of ibuprofen, insights from the mice model of parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* 2013; 65 (5): 1227-1236.

Talmon, M., Rossi, S., Pastore, A., Cattaneo, C. I., Brunelleschi, S., & Fresu, L. G. Vortioxetine exerts anti-inflammatory and immunomodulatory effects on human monocytes/macrophages. *Br J Pharmacol.* 2018; 175 (1): 113-124.

Tan, W., Xue-bin, C., Tian, Z., Xiao-wu, C., Pei-pe, H., Zhi-bin, C., & Bei-sha, T. Effects of simvastatin on the expression of inducible nitric oxide synthase and brain-derived neurotrophic factor in a lipopolysaccharide-induced rat model of parkinson disease. *International Journal of Neuroscience.* 2016; 126 (3): 278-286.

ten Broeke, T., Wubbolts, R., & Stoorvogel, W. Mhc class ii antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5 (12): a016873.

Thakur, P., & Nehru, B. Inhibition of neuroinflammation and mitochondrial dysfunctions by carbenoxolone in the rotenone model of parkinson's disease. *Molecular Neurobiology.* 2015; 51 (1): 209-219.

Tieu, K. A guide to neurotoxic animal models of parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011; 1 (1): a009316.

Todorova, A., Jenner, P., & Ray Chaudhuri, K. Non-motor parkinson's: Integral to motor parkinson's, yet often neglected. *Pract Neurol.* 2014; 14 (5): 310-322.

Tong, Q., Wu, L., Jiang, T., Ou, Z., Zhang, Y., & Zhu, D. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-activated ire1alpha-traf2-caspase-12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 2016; 776: 106-115.

Torrise, S. A., Geraci, F., Tropea, M. R., Grasso, M., Caruso, G., Fidilio, A., Musso, N., Sanfilippo, G., Tascadda, F., Palmeri, A., Salomone, S., Drago, F., Puzzo, D., Leggio, G. M., & Caraci, F. Fluoxetine and vortioxetine reverse depressive-like phenotype and memory deficits induced by abeta1-42 oligomers in mice: A key role of transforming growth factor-beta1. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 693.

Torun, Ş., Uysal, M., Gücüyener, D., & Özdemir, G. Parkinson's disease in eskişehir, turkey. *Eur J Neurol.* 1995; 2 (suppl 1): 44-45.

Turvey, S. E., & Broide, D. H. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125 (2 Suppl 2): S24-S32.

Tysnes, O. B., & Storstein, A. Epidemiology of parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2017; 124 (8): 901-905.

Usun, Y., Eybrard, S., Meyer, F., & Louilot, A. Ketamine increases striatal dopamine release and hyperlocomotion in adult rats after postnatal functional blockade of the prefrontal cortex. *Behav Brain Res.* 2013; 256: 229-237.

Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. Incidence of parkinson's disease: Variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003; 157 (11): 1015-1022.

Varrone, A., Svenningsson, P., Marklund, P., Fatouros-Bergman, H., Forsberg, A., Halldin, C., Nilsson, L. G., & Farde, L. 5-ht1b receptor imaging and cognition: A positron emission tomography study in control subjects and parkinson's disease patients. *Synapse.* 2015; 69 (7): 365-374.

Venderova, K., & Park, D. S. Programmed cell death in parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2012; 2 (8).

Vieta, E., Sluth, L. B., & Olsen, C. K. The effects of vortioxetine on cognitive dysfunction in patients with inadequate response to current antidepressants in major depressive disorder: A short-term, randomized, double-blind, exploratory study versus escitalopram. *J Affect Disord.* 2018; 227: 803-809.

Villabona-Rueda, A., Erice, C., Pardo, C. A., & Stins, M. F. The evolving concept of the blood brain barrier (bbb): From a single static barrier to a heterogeneous and dynamic relay center. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13: 405.

Vorhees, C. V., & Williams, M. T. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols.* 2006; 1 (2): 848-858.

Wallace, A., Pehrson, A. L., Sanchez, C., & Morilak, D. A. Vortioxetine restores reversal learning impaired by 5-ht depletion or chronic intermittent cold stress in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 17 (10): 1695-1706.

- Wang, H. F., Yu, J. T., Tang, S. W., Jiang, T., Tan, C. C., Meng, X. F., Wang, C., Tan, M. S., & Tan, L. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors and memantine in cognitive impairment in parkinson's disease, parkinson's disease dementia, and dementia with lewy bodies: Systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015a; 86 (2): 135-143.
- Wang, Q., Liu, Y., & Zhou, J. Neuroinflammation in parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener*. 2015b; 4: 19.
- Wang, Q., Wang, P. H., McLachlan, C., & Wong, P. T. Simvastatin reverses the downregulation of dopamine d1 and d2 receptor expression in the prefrontal cortex of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats. *Brain Res*. 2005; 1045 (1-2): 229-233.
- Wang, S., Zhao, Y., Gao, J., Guo, Y., Wang, X., Huo, J., Wei, P., & Cao, J. In vivo effect of a 5-HT₇ receptor agonist on 5-HT neurons and GABA interneurons in the dorsal raphe nuclei of sham and PD rats: An electrophysiological study. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*. 2017; 32 (2): 73-81.
- Wang, W. Y., Tan, M. S., Yu, J. T., & Tan, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*. 2015c; 3 (10): 136.
- Wang, X., Qin, Z.-H., Leng, Y., Wang, Y., Jin, X., Chase, T. N., & Bennett, M. C. Prostaglandin A₁ inhibits rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 83 (5): 1094-1102.
- Watson, G. S., & Leverenz, J. B. Profile of cognitive impairment in parkinson's disease. *Brain Pathol*. 2010; 20 (3): 640-645.
- Watson, M. B., Richter, F., Lee, S. K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R. B., & Chesselet, M. F. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol*. 2012; 237 (2): 318-334.
- Weil, R. S., Costantini, A. A., & Schrag, A. E. Mild cognitive impairment in parkinson's disease-what is it? *Current neurology and neuroscience reports*. 2018; 18 (4): 17-17.
- Weinberg, R. P., Koledova, V. V., Subramaniam, A., Schneider, K., Artamonova, A., Sambanthamurthi, R., Hayes, K. C., Sinskey, A. J., & Rha, C. Palm fruit bioactives augment expression of tyrosine hydroxylase in the Nile grass rat basal ganglia and alter the colonic microbiome. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 18625.
- Wells, B. G., Schwinghammer, T. L., DiPiro, J. T., & DiPiro, C. V. *Pharmacotherapy handbook*, tenth edition: McGraw-Hill Education; 2019, p: 587-597.
- Wesselingh, R., Butzkueven, H., Buzzard, K., Tarlinton, D., O'Brien, T. J., & Monif, M. Innate immunity in the central nervous system: A missing piece of the autoimmune encephalitis puzzle? *Frontiers in Immunology*. 2019; 10 (2066).

Westrich, L., Haddjeri, N., Dkhissi-Benyahya, O., & Sanchez, C. Involvement of 5-HT₇ receptors in vortioxetine's modulation of circadian rhythms and episodic memory in rodents. *Neuropharmacology*. 2015; 89: 382-390.

Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., & Wang, T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol*. 2012; 42 (7): 613-632.

Yan, J., Sun, J., Huang, L., Fu, Q., & Du, G. Simvastatin prevents neuroinflammation by inhibiting N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 in 6-hydroxydopamine-treated PC12 cells. *J Neurosci Res*. 2014; 92 (5): 634-640.

Yeragani, V. K., Tancer, M., Chokka, P., & Baker, G. B. Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian J Psychiatry*. 2010; 52 (1): 87-88.

Yoon, T., Okada, J., Jung, M. W., & Kim, J. J. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learn Mem*. 2008; 15 (3): 97-105.

Yuan, J., Ren, J., Wang, Y., He, X., & Zhao, Y. Acteoside binds to caspase-3 and exerts neuroprotection in the rotenone rat model of parkinson's disease. *PLoS One*. 2016; 11 (9): e0162696.

Yuan, Y. H., Sun, J. D., Wu, M. M., Hu, J. F., Peng, S. Y., & Chen, N. H. Rotenone could activate microglia through NF- κ B associated pathway. *Neurochem Res*. 2013; 38 (8): 1553-1560.

Zahoor, I., Shafi, A., & Haq, E. (2018). Pharmacological treatment of parkinson's disease. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's disease: Pathogenesis and clinical aspects*. Brisbane (AU).

Zaitone, S. A., Abo-Elmatty, D. M., & Elshazly, S. M. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced parkinsonism in rats. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44 (6): 774-779.

Zella, M. A. S., Metzdorf, J., Ostendorf, F., Maass, F., Muhlack, S., Gold, R., Haghikia, A., & Tonges, L. Novel immunotherapeutic approaches to target alpha-synuclein and related neuroinflammation in parkinson's disease. *Cells*. 2019; 8 (2).

Zhang, G., Xia, Y., Wan, F., Ma, K., Guo, X., Kou, L., Yin, S., Han, C., Liu, L., Huang, J., Xiong, N., & Wang, T. New perspectives on roles of alpha-synuclein in parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018; 10 (370).

Zhang, Q., Wang, S., Zhang, L., Zhang, H., Qiao, H., Niu, X., & Liu, J. Decreased response of interneurons in the medial prefrontal cortex to 5-HT_{1A} receptor activation in the rat 6-hydroxydopamine parkinson model. *Neurol Sci*. 2014; 35 (8): 1181-1187.

Zhang, X., Du, L., Zhang, W., Yang, Y., Zhou, Q., & Du, G. Therapeutic effects of baicalein on rotenone-induced parkinson's disease through protecting mitochondrial function and biogenesis. *Scientific Reports*. 2017a; 7 (1): 9968.

Zhang, Z.-N., Zhang, J.-S., Xiang, J., Yu, Z.-H., Zhang, W., Cai, M., Li, X.-T., Wu, T., Li, W.-W., & Cai, D.-F. Subcutaneous rotenone rat model of parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Research*. 2017b; 1655: 104-113.

Zhang, Z. J., Kang, W. H., Li, Q., Wang, X. Y., Yao, S. M., & Ma, A. Q. Beneficial effects of ondansetron as an adjunct to haloperidol for chronic, treatment-resistant schizophrenia: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Schizophrenia research*. 2007; 88: 102-110.

Zhou, F., Wu, J. Y., Sun, X. L., Yao, H. H., Ding, J. H., & Hu, G. Iptakalim alleviates rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons through inhibiting microglia-mediated neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32 (12): 2570-2580.

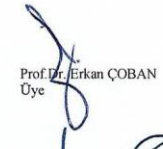
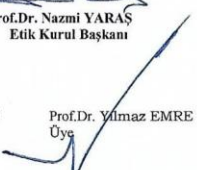
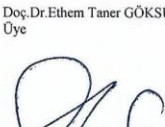
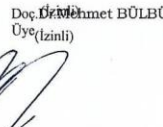
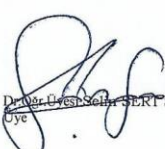
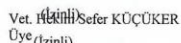
Zlatkovic, J., Todorovic, N., Boskovic, M., Pajovic, S. B., Demajo, M., & Filipovic, D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol Cell Biochem*. 2014; 393 (1-2): 43-57.

Zolezzi, J., Bastías-Candia, S., & Inestrosa, N. (2019). Toll-like receptors (tlrs) in neurodegeneration: Integrative approach to tlr cascades in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.86167

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onay Belgeleri

T.C. AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2019 KARAR			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA	
	TELEFON	0 (242) 249 69 54	
	FAKS	0 (242) 249 69 03	
	E-POSTA	akhadye@akdeniz.edu.tr	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Dr.Öğr.Üyesi Gül ÖZBEY	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Rotenon ile Oluşturulmuş Parkinson Hastalığı Modelinde Vortiksetinin Nörodejenerasyon ve Bilişsel Disfonksiyon Üzerine Etkilerinin In Vivo Olarak İncelenmesi	
BAŞVURU FORMU ID/ PROTOKOL NO		2019.01.08	
Çalışma süresi		Denek türü	Denek Sayısı
24 Ay		Sıçan/Sprague Dawley	80
		Denek Cinsiyeti	
		Erkek	
Araştırma Sonunda Deneklere Uygulanacak İşlemler		Deney protokolünün uygulanmasından sonra ötenazi yapılacaktır.	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 9		Tarih: 07.01.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru görüşülerek, ilgili projenin etik açıdan bir sakınca içermediği tespit edildiğinden, projenin 80 hayvan olarak çalışmanın başlatılması, sonuçların değerlendirildikten sonra gerekli olması durumunda denek sayısının artırılması koşulu ile 2019.01.08 protokol numarası ile UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		

 Prof.Dr. Vecihte NİMET UYSAL Başkan Yardımcısı	 Prof.Dr. Erkan ÇOBAN Üye	 Prof.Dr. Gökhan AKKOYUNLU Üye	 Prof.Dr. Yılmaz EMRE Üye
 Doç.Dr.Ethem Taner GÖKSU Üye	 Doç.Dr.M. Kerem HATİPOĞLU Üye	 Doç.Dr.Mehmet BÜLBÜL Üye (İzinli)	 Doç.Dr. Aşkın GALIÇ Üye
 Dr. Öğr. Üyesi Selma SERT SÜTÇÜ Üye	 Dr. Öğr. Üyesi Ceren KENCEBAY MANAS Üye	 Vet. Hakan Sefer KÜÇÜKER Üye (İzinli)	
 Öğr. Gör. Doğa BESNE Üye	 Aytaç İRMAN Üye (İzinli)		

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
2019
KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu		
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA		
	TELEFON	0 (242) 249 69 54		
	FAKS	0 (242) 249 69 03		
	E-POSTA	akhadye@akdeniz.edu.tr		
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dilara NEMUTLU SAMUR			
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Rotenon ile indüklenen Parkinson hastalığı sıçan modelinde vortikoksetinin prokognitif özelliklerinin incelenmesi: Toll-benzeri reseptör-2 sinyal yolunun rolü			
BASVURU FORMU ID/ PROTOKOL NO	934/2019.07.15			
Çalışma süresi	Denek türü	Denek Sayısı	Denek Cinsiyeti	
12 ay	Sıçan/Sprague	60	Erkek	
Araştırma Sonunda Deneklere Uygulanacak İşlemler	Deney protokolünün uygulanmasından sonra ötenazi yapılacaktır.			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 104	Tarih: 29.07.2019		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru görüşülerek, ilgili projenin etik açıdan bir sakınca içermediği tespit edildiğinden, çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			

Prof.Dr. Nazmi YARAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr. Vecihe NİMET UYSAL
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr. Erhan COBAN
Üye

Prof.Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Üye

Prof.Dr. Yılmaz EMRE
Üye

Doç.Dr.Ethem Taner GÖKSU
Üye - İZİNLI

Doç.Dr.Mükerrrem HATİPOĞLU
Üye

Doç.Dr.Mehmet BÜLBÜL
Üye

Doç. Dr. Aşkın GALIÇ
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Selin SERT SÜTÇÜ
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Ceren KENCEBAY MANAS
Üye - İZİNLI

Vet. Hekim Sefer KÜÇÜKER
Üye - İZİNLI

Öğr.Gör.Doga BESNE
Üye

Aytaç AKMAN
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Dilara	Uyruğu	T.C.
Soyadı	NEMUTLU SAMUR	Tel no	05545717401
Doğum tarihi	26.03.1991	e-posta	dilaranemutlu@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Konya Karatay S.D.M.P. Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Anadolu Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	2014
Yüksek Lisans	Anadolu Üniversitesi SBE / Farmakoloji AD	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araş.Gör.	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	2017-Halen

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS (2014)	96

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Rotenon ile İndüklenen Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Vortioksetinin Prokognitif Özelliklerinin incelenmesi: Toll-Benzeri Reseptör-2 Sinyal Yolağının Rolü (Yürütücü)	TÜBİTAK Hızlı Destek Programı (1002), Proje Numarası: 219S253	2019-Halen
Epidermoid Larinks Karsinom Hücre Hattı (HEP2) Üzerine Timokinon ve Propranolol Kombinasyonunun Etkisi (Araştırmacı)	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP); Proje Kodu: BAP-2019-3295970	2019-Halen
Rotenon ile Oluşturulmuş Parkinson Hastalığı Modelinde Vortioksetinin Nörodejenerasyon ve Bilişsel Disfonksiyon Üzerine Etkilerinin İn Vivo Olarak İncelenmesi (Araştırmacı)	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP); Proje Kodu: TDK-2019-4412	2019-Halen
Rotenonla İndüklenen Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde Metforminin Olası Etkileri ve Etki mekanizmaları (Araştırmacı)	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP); Proje Kodu: TSA-2017-2392	2017-2018
Ferulik asitin analjezik ve anksiyolitik etkinliklerinin araştırılması (Araştırmacı)	Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP); Proje Kodu: AUBAP-1404S129	2014-2015
Valnoktamid Nöropatik Ağrının Hafifletilmesi Üzerine Etkinliği ve Olası Mekanizmaları (Yüksek Lisans Tezi)	Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP); Proje Kodu: AUBAP-1409S395	2013-2014
In Vitro Characterization of DNA (Gözlemci Öğrenci)	University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Bioscience	Eylül 2011- Ocak 2012

Burslar-Ödüller:

Erasmus Training Scholarship, University of Valencia, Spain Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Trainee, June-September 2013.

Erasmus Scholarship, University of Helsinki, Finland Faculty of Pharmacy, Undergraduate Exchange Student, September 2011-January 2012.

Yayınlar ve Bildiriler:

Hakemli dergilerle yayımlanmış yayınlar (SCI, SCI-E)

Ozbey, G., Nemutlu-Samur, D., Parlak, H., Yildirim, S., Aslan, M., Tanrioer, G., Agar, A. (2019) Metformin Protects Rotenone-Induced Dopaminergic Neurodegeneration by Reducing Lipid Peroxidation. *Pharmacological Reports*, doi: 10.1007/s43440-020-00095-1.

Bektas N., Nemutlu D., Cam M., Okcay Y., Eken H., Arslan R. (2020). The Nicotinic Modulation of Pain. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 (1), 229-239.

Samur DN., Arslan R., Aydın S., Bektas N. (2018) Valnoctamide: The effect on relieving of neuropathic pain and possible mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 15 (827), 208-214.

Arslan, R., Aydın, S., Nemutlu Samur, D., Bektaş, N. (2018). The possible mechanisms of protocatechuic acid-induced central analgesia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(4), 541-545.

Bektaş, N., Nemutlu, D., Arslan, R. (2015). The imidazoline receptors and ligands in pain modulation. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(5), 472-478.

Hakemli dergilerle yayımlanmış yayınlar (Diğer)

Nemutlu-Samur D., Ozbey G. (2020) Mikroglyal Toll-benzeri Reseptörlerin Alzheimer ve Parkinson Hastalıklarındaki Rolü. *Akdeniz Medical Journal*, (ACCEPTED, no: ATD2671).

Guler Y., Ovey I.S., Nemutlu-Samur D., Karabulut B. (2020). Low level laser application reduces the effect of 5 fluorouracil/leucovorin combination on human breast cancer cells. *Annals of Medical Research*, 27 (5), 1315-21.

Nemutlu-Samur D., Ozbey G. (2018) Neuroinflammation modifying approaches in Parkinson's disease. *Journal of Neurobehavioral Sciences*, 5(1), 43-55.

Bektaş, N., Nemutlu, D., Ulugbay, G., Arslan, R. (2015). The role of muscarinic receptors in pain modulation. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 1 (1), 40-49.

Sözlü Sunumlar ve Poster Bildirileri

Nemutlu Samur D., Akçay G., Özkan A., Derin N., Ağar A., Özbey G. The Effects of Vortioxetine on Motor and Cognitive Dysfunction in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. Federation of European Neuroscience Societies (FENS) 2020 Virtual Forum, 11-15 July 2020.

Nemutlu Samur D., Özbey G., New Treatment Approaches for the Prevention of Neurodegeneration in Parkinson Disease. 2nd International Health Science and Life Congress (IHSLC 2019), Burdur-Turkey. 24-27 April 2019. (Sözlü sunum).

Özbey G., Nemutlu Samur D., Parlak H., Yıldırım S., Tanrıöver G., Ağar A. Metformin Reduces Rotenone-Induced Degeneration in Dopaminergic Neurons. 16. National Neuroscience Congress, Istanbul-Turkey, 20-23 May 2018.

Övey İS., Nemutlu Samur D., Maytalman E., Çelik Ö. Inhibitory Effects of Melatonin on TRPM2 Channel Activity Induced by Bevacizumab in Human Breast Cancer Cell Line. 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), Burdur-Turkey, 02-05 May 2018.

Bektas N., Arslan R., Nemutlu D., Aydin S. The Role of Opioidergic Mechanisms on the Anti Allodynic and Antihyperalgesic Effect of Valnoctamide in Rats, 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), Istanbul-Turkey, 26-30 June 2016.

Arslan R., Bektas N., Nemutlu D., Possible Involvement of Kv7 Potassium Channels in Central Antinociception Induced by Dipyrone and Ketoprofen. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Developments, Eskisehir-Turkey, 15-17 October 2015.

Bektas N., Arslan R., Nemutlu D. p-Coumaric Acid Induces Antinociception in Mice, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), Ankara-Turkey, 09-12 June 2015.

Arslan R., Bektas N., Nemutlu D. Ferulic acid possesses central analgesic activity in mice, 9th IBRO World Congress of Neuroscience (IBRO-2015), Rio de Janeiro-Brazil, 07-11 July 2015.

Bektas N., Arslan R., Nemutlu D. Protocatechuic acid is analgesic at central and peripheral levels in mice, 9th IBRO World Congress of Neuroscience (IBRO-2015), Rio de Janeiro-Brazil, 07-11 July 2015.

Nemutlu D., Bektas N., Arslan R. Central antinociception induced by luteolin, 9th IBRO World Congress of Neuroscience (IBRO-2015), Rio de Janeiro-Brazil, 07-11 July 2015.