

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

ALFA-SİNÜKLEİN FİBRİLİ İLE OLUŞTURULAN PARKINSON HASTALIĞI
SIÇAN MODELİNDE ALFA-SİNÜKLEİN PATOLOJİSİNİN ŞİDDET VE
DAĞILIMINDA GLİMFATİK SİSTEMİN ROLÜ

Dr. Ece GÖK DURSUN

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

ALFA-SİNÜKLEİN FİBRİLİ İLE OLUŞTURULAN PARKİNSON HASTALIĞI
SIÇAN MODELİNDE ALFA-SİNÜKLEİN PATOLOJİSİNİN ŞİDDET VE
DAĞILIMINDA GLİMFATİK SİSTEMİN ROLÜ

Dr. Ece GÖK DURSUN

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr.Gül YALÇIN ÇAKMAKLI

ANKARA
2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması başta olmak üzere her aşamasında yardımına koşan, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan keyif aldığım, öğretmenliği kadar iyi kalbiyle örnek aldığım Doç.Dr.Gül Yalçın Çakmaklı'ya,

Fikir ve deneyimleriyle tez çalışmama önemli katkılarda bulunan, hem bilgisi hem de nörolojiye ve hastalara yaklaşımıyla hekimlik becerilerime büyük incelik kazandırmış olan Prof.Dr.Bülent Elibol'a,

MRG çalışmaları için gece gündüz denemeden beraber çalıştığım, tezimde çok büyük emeği ve desteği olan, kendisinden çok şey öğrendiğim Dr.Meltem Karataş'a ve fikirleriyle bize destek olan Prof.Dr.Kader Karlı Oğuz'a,

Tezimin cerrahi işlemleri aşamasındaki incelikli çalışması, verdiği büyük emekler için Doç.Dr.Mehmet Alper Çetinkaya'ya,

Laboratuvar çalışmalarımız sırasında her konuda desteklerini esirgemeyen, Doç.Dr.Banu Cahide Tel, Dr.Öğr.Üyesi Elif Çınar, Hilal Akyel, Burcu Nur Akgüner, Ahmed Algali Sedahmed Musa ve teknik konulardaki yardımları ile Mesut Fırat'a,

Her daim kapılarının bize açık olduğunu bildiğim, her konuda yardımcı olan, hepsinden çok önemli şeyler öğrendiğim Nöroloji hocalarıma ve asistanlık hayatıma keyif veren, dostluklarıyla hep yanımda olan asistan arkadaşlarıma,

Bugüne kadar tüm başarılarımı destekleyen, her sıkıntıda yanı başıma koşan, bana iyi bir insan olmayı öğreten, beni sonsuz seven ve sonsuz sevdiğim canım babam Hasan Gök'e ve tüm bunların yanında kalbi sevgi dolu, güçlü ve bağımsız bir kadın olarak rol model aldığım, canım annem Birsen Gök'e,

Son olarak artık sayamadığım kadar uzun süredir hayatımın ve kalbimin en içinde olan, herşey karanlık görüldüğünde bile gülüşüyle ve sevgisiyle kalbimi ve zihnimi aydınlatıp ısıtan canım eşim Gökay Dursun'a,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

GÖK-DURSUN E., Alfa-sinüklein fibrili ile oluşturulan Parkinson hastalığı sıçan modelinde alfa-sinüklein patolojisinin şiddet ve dağılımında glimfatik sistemin rolü, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Uzmanlık Tezi. Ankara, 2022.

Parkinson hastalığı (PH), ikinci en sık nörodejeneratif hastalıktır ve yaşlı popülasyondaki artışla beraber sıklığı giderek artmaktadır. Patofizyolojisinde α -sin patolojik birikimlerinin nörotoksitesisi ve dopaminerjik hücre kaybı rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, beyinden makromoleküllerin temizlenmesinde rol oynayan bir yolak olarak önemi yakın dönemde daha iyi anlaşılan glimfatik sistemin PH patofizyolojisine katkısının araştırılmasıdır. Bu amaçla striatuma α -sinüklein pre-formed fibrilinin (α -sin PFF) enjeksiyonu ile oluşturulan PH sıçan modelinde, derin servikal lenf nodlarının (dsLN) lenfatik damarları bağlanarak glimfatik sistem disfonksiyonu oluşturulmuştur. Ardından 6. haftada lomber ponksiyon ile intratekal paramanyetik kontrast madde enjeksiyonu sonrasında aralıklı olarak üç kez kontrastlı beyin MRG görüntüleri alınarak glimfatik sistemin işleyişi incelenmiştir. Fibril enjekte edilen ve dsLN ligasyonu yapılan sıçanlarda, ligasyon yapılmayanlara göre subaraknoid aralıktan parankime kontrast geçişinde postkontrast 30 ve 60. dakikalarda belirgin azalma izlenmiştir. Ayrıca dsLN ligasyonu yapılmayan sadece fibril enjekte edilen grupta da naive kontrollere göre beyin sapı ventralinde parankime kontrast geçişinde 30. dakikada azalma izlenmiş, 1. saatte bu etki kaybolmuştur. 7. haftada uygulanan açık alan ve apomorfin ile indüklenen lokomotor aktivite testlerinde gruplar arasında fark izlenmemiştir ($p>0,05$). Silindir testinde tüm gruplarda naive kontrollere göre kontralateral ekstremite kullanımında düşüş eğilimi olsa da istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0,05$). İmmunohistokimyasal işaretlemeler ile striatumda ve substansiya nigrada dopaminerjik nöronlarda ve çevresinde α -sin ekspresyonu ve agregat benzeri oluşumlar gösterilmiştir. Sonuç olarak α -sin PFF modelinde glimfatik sistem işleyişinin özellikle de α -sin patolojisinin daha yoğun olduğu beyin bölgelerinde bozulduğu, dsLN ligasyonu ile bu bozukluğun çok daha şiddetli ve yaygın hale geldiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glimfatik sistem, Parkinson hastalığı, α -sinüklein pre-formed fibril modeli, manyetik rezonans görüntüleme

ABSTRACT

GOK-DURSUN E., The role of the glymphatic system on the severity and distribution of alpha-synuclein pathology in alpha-synuclein fibril induced rat model of Parkinson's disease. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Neurology. Ankara,2022.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease and its prevalence increases in the aging population. Neurotoxicity of α -synuclein (α -syn) pathological accumulations and dopaminergic cell loss play a key role in the pathophysiology of PD. The aim of this study is to investigate the contribution of the glymphatic system to the pathophysiology of PD. The importance of the glymphatic system has recently been better understood as an important pathway in the clearance of macromolecules from the brain. For this purpose, glymphatic system dysfunction was created by ligating lymphatic vessels of deep cervical lymph nodes (dcLN) in a PD rat model induced by injection of α -syn preformed fibrils (PFF) into the striatum. Then, at 6th week, contrast enhanced MRI was performed three times intermittently following intrathecal paramagnetic contrast agent injection by lumbar puncture, and glymphatic system function was evaluated. The transition of contrast agent from subarachnoid space to the brain parenchyma was decreased in the α -syn PFF injected and dcLN ligated group compared to the α -syn PFF group without ligation at 30th and 60th minutes. In the α -syn PFF injected but not dcLN ligated group, decrease in contrast transition was prominent especially in the ventral brainstem at 30th minute post-injection compared to the naive controls. However, this difference disappeared at 60th minute. In the open field and apomorphine-induced locomotor activity tests performed at week 7, there was no significant difference between the groups ($p>0.05$). In the cylinder test, although there was a trend towards a decrease in the use of contralateral limb in all groups compared to naive controls, no statistical significant difference was detected ($p>0.05$). Immunohistochemical staining showed α -syn expression and aggregate-like formations in the striatum and substantia nigra, both in the dopaminergic neurons as well as surrounding them. In conclusion, glymphatic system dysfunction is detected in the α -syn PFF model of PD, especially in the brain regions where α -syn pathology was more intense, and dcLN ligation aggravate the dysfunction making it more widespread.

Keywords: Glymphatic system, Parkinson disease, α -synuclein pre-formed fibril, magnetic resonance imaging

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı ve Patogenezi	3
2.1.1. Alfa-sinüklein Proteini	4
2.1.2. Ekstraselüler Alfa-sinüklein ve Prion Benzeri Yayılım	7
2.1.3. Braak Evrelemesi	9
2.1.4. Bazal Ganglionlar	10
2.2. Deneysel PH Modelleri	12
2.2.1. Toksin Temelli Parkinsonizm Modelleri	12
2.2.2. Genetik Modeller	14
2.2.3. Alfa-sinüklein Yayılım Modelleri	14
2.3. BOS Dolaşımı	17
2.4. Glimfatik Sistem	18
2.4.1. Glimfatik Sistem Anatomisi	19
2.4.2. Akuaporin 4 Su Kanalı	20
2.5. Meningeal Lenfatikler	21
2.5.1. Meningeal Lenfatikler ve Glimfatik Sistem Arasında İlişki	22
2.6. Glimfatik Sistem Görüntülemesi	23
2.6.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme	23
2.6.2. Hayvan Çalışmalarında Kullanılan Diğer Görüntüleme Yöntemleri	25
2.7. Glimfatik Sistemi Etkileyen Faktörler	26

2.8. Nörodejeneratif Hastalıklarda Glimfatik Sistem	28
2.8.1. Alzheimer Hastalığında Glimfatik Sistemin Rolü	29
2.8.2. Parkinson Hastalığında Glimfatik Sistemin Rolü	30
2.9. Olası Terapötik Yaklaşımlar	31
3.GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Deney Hayvanları	33
3.2. Deney Grupları ve Deney Planı	33
3.3. Parkinsonizm Modelinin Oluşturulması	34
3.4. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu	34
3.5. İntratekal Kontrast Enjeksiyonu ve Manyetik Rezonans Görüntüleme	35
3.6. Motor-davranışsal Deneyler	36
3.6.1. Açık Alan Motor Aktivite Testi	36
3.6.2. Apomorfinle İndüklenmiş Açık Alan Motor Aktivite Testi	37
3.6.3. Silindir Testi	37
3.6.4. Rotarod Testi	38
3.7. Beyinlerin İzole Edilmesi ve Kesit Alınması	39
3.8.İmmunfloresan Boyama, Kullanılan Antikorlar ve Çözeltiler	39
3.8.1. Primer Antikorlar	40
3.8.2 Sekonder Antikorlar	40
3.8.3. Kullanılan çözeltiler	41
3.9. MR Görüntülerin Değerlendirilmesi	42
3.10. İstatiksel Analiz	42
4.BULGULAR	43
4.1. MR Görüntüleme Ön Çalışma Bulguları	43
4.2. Bilateral Serin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve Fibril Enjeksiyonunun MRG Bulguları Üzerine Etkisi	44
4.3. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve A-sin Fibril Enjeksiyonunun Motor Öğrenme ve Koordinasyon Üzerine Etkisi	54
4.4. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve A-sin Fibril Enjeksiyonunun Ekstremitte Asimetrisi Üzerine Etkisi	54

4.5. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve A-sin Fibril Enjeksiyonunun Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi	55
4.6. İmmunofloresan Görüntüleme ile Tirozin Hidroksilaz ve Alfa-sinüklein İfadelerinin Striatum ve Sustansiya Nigrada Değerlendirilmesi	57
5.TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	67
7. ÖNERİLER	68
8. KAYNAKLAR	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
AAV	: Adeno ilişkili viral vektör
AH	: Alzheimer Hastalığı
AQP	: Akuaporin
A β	: Amiloid-beta
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
dsLN	: Derin servikal lenf nodları
DTİ	: Diffüzyon tensör görüntüleme
fMRG	: Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme
GABA	: Gama amino bütirik asit
GPe	: Globus pallidus eksterna
Gpi	: Globus pallidus interna
HH	: Huntington hastalığı
HSC70	: Isı şok proteini 70
IL	: İnterlökin
KBB	: Kan beyin bariyeri
LAMP2A	: Lizozomla ilişkili membran proteini 2
LBD	: Lewy cisimcikli demans
LC	: Lewy cisimleri
LN	: Lewy nöritleri
LRRK2	: Lösin açısından zengin tekrar kinaz 2
LV	: Lentivirus
MHC-II	: Major doku uygunluk kompleksi-II
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MSA	: Multisistem atrofi
NBH	: Normal basınçlı hidrosefali

OAP	: Ortogonal parçacık dizini
PFF	: Prefomed fibril
PH	: Parkinson Hastalığı
PINK1	: PTEN ile indüklenen kinaz 1
PVS	: Perivasküler boşluk
RUDB	: REM uyku davranış bozukluğu
SN	: Substansiya nigra
SNpc	: Substansiya nigra pars kompakta
SNr	: Substansiya nigra pars retikulata
STN	: Subtalamik nükleus
TH	: Tirozin hidroksilaz
UPS	: Ubikitin proteozom sistemi
VEBF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
α -sin	: Alfa-sinüklein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Bazal ganglion devresi	11
Şekil 2.2.	Klasik BOS dolaşım modeli	17
Şekil 2.3.	Glimfatik sistemin şematik gösterimi	19
Şekil 2.4.	BOS'un beyinden periferik drenaj yolları	20
Şekil 3.1.	Deney planı	33
Şekil 3.2.	Derin servikal lenf nodu ligasyonu ve LP basamakları	36
Şekil 3.3.	Açık alan motor aktivite kafesleri ve bilgisayar aracılı analiz sistemi	37
Şekil 3.4.	Silindir test düzeneği	38
Şekil 3.5.	Rotarod testi cihazı	39
Şekil 4.1.	Postkontrast 5.dakika sagittal plan görüntülerde naive kontrollerle fibril enjeksiyonu yapılan grubun karşılaştırılması	46
Şekil 4.2.	Postkontrast 5.dakika sagittal plan görüntülerde PFF enjeksiyonu yapılan sadece-PFF ve PFF-lig gruplarının karşılaştırılması	46
Şekil 4.3.	Postkontrast 30.dakika görüntülerde sadece-PFF ve PFF-lig gruplarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.4.	Postkontrast 30.dakika görüntülerde naive kontroller ile sadece-PFF grubunun karşılaştırılması	48
Şekil 4.5.	Postkontrast 60.dakika görüntülerde sadece-PFF ve PFF-lig gruplarının karşılaştırılması	49
Şekil 4.6.	Postkontrast 60.dakika görüntülerde naive kontroller ile sadece-PFF grubunun karşılaştırılması	50
Şekil 4.7.	Postkontrast 5.dakika görüntülerde naive kontroller ile PFF-lig grubunun karşılaştırılması	51
Şekil 4.8.	Postkontrast 30.dakika görüntülerde naive kontroller ile PFF-lig grubunun karşılaştırılması	52

Şekil 4.9.	Postkontrast 5.dakika görüntülerde naive kontroller ile PFF-lig grubunun karşılaştırılması	53
Şekil 4.10.	Rotarod testi; rod üzerine ortalama kalma süresi ve roddan düşme frekansı	54
Şekil 4.11.	Silindir testi, kontralateral ön ayak dokunma yüzdelerinin karşılaştırılması	55
Şekil 4.12.	Açık alan ve aporfin ile indüklenmiş açık alan motor aktivite testi	56
Şekil 4.13.	İmmunfloresan mikroskopide striatumda α -sin, TH boyamaları ve α -sin/TH üst üste getirildiği görüntüler	58
Şekil 4.14.	İmmunfloresan mikroskopide substansiya nigrada α -sin, TH boyamaları ve α -sin/TH üst üste getirildiği görüntüler	59

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 2.1.	DeneySEL Parkinson hastalığı hayvan modelleri	13

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından (AH) sonra ikinci sık görülen nörodejeneratif hastalıktır [1]. Hastalığın patofizyolojisinde sitozolik bir protein olan alfa-sinüklein (α -sin) proteininin anormal katlanması ve birikimi sonucu oluşan intranöral Lewy cisimciklerinin (LC) ve Lewy nöritlerinin (LN) nörotoksitesi rol oynamaktadır [2, 3]. Patolojik α -sin formlarının yalnızca hücre içinde toksisiteye yol açtığı düşünülse de çalışmalar α -sin ve agregatlarının hücre dışında da bulunabildiğini, hücreden hücreye aktararak hastalık gelişiminde rol oynadığını göstermektedir [4].

Mekanizması henüz net olarak gösterilememiş olsa da artan kanıtlar α -sin patolojik biçimlerinin kendi kendine çoğaldığını ve kademeli olarak birbirine bağlı sinir sistemi bölgelerine yayıldığını öne sürmektedir [5]. Bu hipotezi destekleyen deneysel parkinsonizm modellerinden biri de α -sin preformed-fibril (PFF) modelidir [6]. Bu modelde eksojen yolla verilen α -sin fibrilinin endojen α -sin'i patolojik, insolubl inklüzyonlara dönüştürdüğü gösterilmiştir [7].

Patolojik α -sin birikiminde altta yatan mekanizma α -sin üretimi ve beyinden temizlenmesi arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır [8]. Ekstraselüler α -sin proteolitik enzimler tarafından yıkılarak ya da mikrogliya ve astrositler tarafından alınıp lizozomlarda degrade edilerek ortamdan uzaklaştırılmaktadır [9]. Ekstraselüler ortamdan makromoleküllerin uzaklaştırılmasında bir diğer mekanizma olarak glimfatik sistem modeli öne sürülmüştür [10].

Glimfatik sistem modelinde beyin omurilik sıvısının (BOS), paraarteriyel aralıktan astrosit son ayaklarındaki Aquaporin-4 (AQP-4) su kanalları aracılığıyla interstisyuma geçtiği, interstisyel sıvı ile birleşerek paravenöz aralıktan dural lenfatiklere ve buradan da derin servikal lenf nodlarına drene olduğu gösterilmiştir [10, 11]. Derin servikal lenf nodlarının efferent lenfatik damarlarının bağlanması ile glimfatik sistem fonksiyonları ve beyinden makromoleküllerin temizlenmesi bozulmaktadır [12].

Manyetik rezonan görüntüleme (MRG) insan ve hayvan çalışmalarında glimfatik sistemin değerlendirilmesi amacıyla kullanılabilir. İntratekal yoldan verilen paramanyetik kontrast maddenin subaraknoid aralıkta dağılımı, beyin parankimine alınıp parankimden temizlenmesinin incelenmesi ile glimfatik sistem fonksiyonları hakkında bilgi edinilebilmektedir [13, 14].

Bu çalışmada glimfatik sistemin PH patofizyolojisindeki yeri ve glimfatik sistemin MRG ile değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla unilateral striatuma 2 bölgeden α -sin PFF enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel parkinsonizm sıçan modelinde bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu yapılmıştır. Derin servikal lenf nodu ligasyonu sonucu gelişen glimfatik sistem disfonksiyonunun patolojik α -sin birikim şiddeti ve motor beceriler üzerine etkileri, çift yönlü olarak da patolojik α -sin birikiminin glimfatik sistemde oluşturduğu değişiklikler kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca α -sin fibril modelinde bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonunun glimfatik sistem ve BOS dolaşımına etkileri kontrastlı MRG ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı ve Patogenezi

Parkinson hastalığı ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından titrek felç (shaking palsy) olarak tanımlanmıştır [15]. Karakteristik klinik özellikleri rijidite, istirahat tremoru, bradikinezi ve postural instabilitedir. Bu motor bulguların yanında otonomik disfonksiyon, kognitif ve psikiyatrik bozukluklar, uyku bozuklukları gibi non-motor semptomlar, motor semptomlardan çok daha önce başlamakta ve hastalık süresince motor semptomlar kadar özürülük yaratmaktadır. Motor bulgular genellikle asimetriktir ve dopaminerjik tedaviye iyi yanıt verir. Vakaların küçük bir bölümü ailesel özellik gösterse de büyük çoğunluğunda etiyoloji belirsizdir ve idiopatik Parkinson hastalığı olarak adlandırılır. Hastalık prevalansı genel popülasyonda %0.3 civarında iken 60 yaşın bu oran %1'e yükselmektedir [16]. Hastalığın patofizyolojisinde yer alan üzerinde 2 temel bulgu; Substansiya nigra pars kompaktada (SNpc) dopaminerjik nöron kaybı ve patolojik α -sin birikimleridir [17]. 1912 yılında Friederich Lewy, hastalığın patofizyolojisini oluşturan sitoplazmik inklüzyonları tanımlamıştır [3]. Tretiakoff tarafından ise Lewy cisimlerinin PH patogenezi ile ilişkisi keşfedilmiştir [18]. LC hücre somasında bulunan, eozinofilik boyanan, karakteristik bir çekirdeği ve periferik halosu olan inklüzyonlardır [2]. Ancak inklüzyonlar bulunduğu beyin bölgelerine ve hastalık evresine göre daha bulutsu ve soluk halolu görülebilir. Hastalık evresi ilerledikçe daha dens ve kompakt, belirgin halolu inklüzyonlar görülmektedir [19]. LN ise LC ile aynı immunokimyasal boyama özellikleri gösteren filamentöz yapıda birikimlerdir, hücre uzantılarında yer alırlar, ve lewy cisimcikleri gibi reaktiftirler [20].

Parkinson hastalığında bu inklüzyonlar özellikle substansiya nigradan (SN) kaudat ve putamen (striatum)'a projekte olan dopaminerjik hücrelerde izlenmekte ve fonksiyon kaybına neden olarak hastalığın klinik semptomlarına yol açmaktadır [3]. Striatal dopaminin %80'i, SN'deki nöronların ise %50'sinin kaybı ile Parkinson hastalığının karakteristik motor klinik bulguları ortaya çıkmaktadır [16]. LC yalnızca SN'de değil korteks, amigdala, lokus seruleus, vagal nükleus ve periferik otonomik

sinir sisteminde de izlenmektedir. LC yayılımı hastalık evreleriyle ve non-motor belirtiler ile yakından ilişkilidir [17, 21]. 1997 yılında α -sin genindeki (SNCA) missens mutasyonun PH nadir bir ailesel formuna neden olduğunun gösterilmesi [22] ve idiyopatik PH'larında LC ve LN'lerinin α -sine karşı immunreaktivite göstermesi üzerine LC ana bileşenin α -sin olduğu anlaşılmıştır [20]. A-sin ve ubikuitin LC ve LN'nin majör bileşenler olsa da inklüzyonlar nörofilamentler gibi birçok başka yapıyı da barındırmaktadır [2, 19]. PH dışında Lewy cisimcikli demans (LBD), Multisistem atrofi (MSA), AH, Down sendromu, Pick hastalığı gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da santral sinir sisteminin farklı bölgelerinde farklı şiddette LC dağılımı izlenebilmektedir [19].

LC'nin patolojik olmadığı görüşünü savunan araştırmacılar da mevcuttur. Hücre için asıl toksik olanın α -sin ve toksik formları olduğu, LC oluşumunun α -sin detoksifikasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Asemptomatik bireylerde de yaşlanma ile LC'nin görülmesi, LC'nin presemptomatik evreyi mi temsil ettiği yoksa normal yaşlanmanın bir özelliği mi olduğu sorusunu akla getirmektedir. Ayrıca hastalığın primer mekanizmasının hücre ölümünden ziyade LC'nin değil, α -sin agregatlarının indüklediği presinaptik bozukluk olduğu ve bu presinaptik bozulmaya sekonder olarak hücre ölümü ve nörodejenerasyonun gelişiyor olabileceği düşünülmektedir [23]. Bu bulgular ışında PH patofizyolojisinde α -sin proteini ve patolojik birikimlerinin rolü giderek önem kazanmış hem patofizyolojik mekanizmaları araştıran hem de tedaviye yönelik yapılan çalışmalarda odak noktası haline gelmiştir.

2.1.1. Alfa-sinüklein Proteini

A-sin proteini 140 aminoasitten oluşan beyinde yüksek seviyelerde eksprese edilen, sinir terminallerinde sinaptik veziküllerle yakın ilişkide bulunan bir presinaptik proteindir [3]. 1997 yılında LC'nin temel bileşenin α -sin olduğu [20] ve α -sin genindeki mutasyonların ailesel PH'a yol açtığına gösterilmesi ile [22] PH patofizyolojisinde α -sin proteininin anahtar role sahip olduğu anlaşılmıştır. Hücredeki rolü tamamen açıklanmamış olsa da sinaptik vezikül trafiğinde rol

oynamaktadır ve özellikle dopamin başta olmak üzere nörotransmitter salınımında önemli role sahiptir [23]. Proteinin N-terminal bölgesi amfipatik α -heliks yapısındadır ve membranlara bağlanmayı sağlar [24]. Bunu hidrofobik ya da non-amiloid komponent (NAK) bölgesi takip eder ve bu bölge protein kümelenmesinden sorumludur. C-terminal bölgesi ise post-translasyonel modifikasyon bölgesidir ve diğer proteinler, ligandlar ve metal iyonlarıyla etkileşime aracılık yapar [25]. Çözünebilir α -sin doğal haliyle yapılanmamış ve monomerik halde bulunur. Sinaptik veziküller gibi membranlara bağlandığında konformasyonel değişime uğrayıp katlanarak amfipatik α -heliks yapısına dönüşür. Patolojik durumlarda, çözünür α -sin kümelenerek beta yapraklı zengin oligomerler, protofibriller, amiloid fibriller ve Lewy cisimcikleri şeklinde hücre için toksik olan formlara dönüşür [25]. Protofibriller ve amiloid fibriller prion benzeri yayılım ile hücreden hücreye aktarılabilen formlardır [7]. Patolojik α -sin agregatları ve LC'nin oluşum mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, nörotoksositeye yol açan temel mekanizmalar; genetik mutasyonlar ve yaşlanma sonucunda protein miktarında artış ve yanlış katlanmaya yatkınlık gelişmesi, α -sin'in hücre içindeki yıkımının bozulması, mitokondriyal işlev bozuklukları, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve extraselüler protein temizlenmesinin bozulması olarak özetlenebilir [17].

Mutant α -sin aşırı ifadesi: A-sin, 4.kromozom üzerindeki SNCA geni tarafından kodlanmaktadır ve bu gendeki nokta mutasyonları otozomal dominant kalıtılan PH tipleri ile ilişkilidir. A53T, AP30, E46K gibi mutasyonlar sonucunda fazla miktarda α -sin sentezlenir ve oluşan fazla miktardaki mutant α -sin, yabancıl tipteki α -sin'e göre kümelenmeye ve fibrilizasyona daha yatkındır [26, 27]. Bazı sporadik PH vakalarında da SNCA genindeki polimorfizm nedeniyle α -sin ifadesinde artış izlenmiştir [28].

Hücresel yıkımda bozulma: Yanlış katlanmış proteinlerin hücreden temizlenmesi hücre sağ kalımı için elzemdir. İntraselüler α -sin ve agregatları, ubiquitin-proteazom sistemi (UPS) ve otofajik yollarla yıkıma uğramaktadır. PH'de UPS'deki hasarlanma hücrede istenmeyen proteinlerin uygun şekilde parçalanmasında başarısızlığa neden olur, bu da anormal protein birikmesi ve

toplanması, inklüzyon cisimciklerinin oluşumu ve son olarak seçici dopaminerjik nöronal hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. Ailesel PH ile ilişkili UCH-L1, parkin ve α -sin genlerindeki mutasyonlar sonucunda normal UPS aktivitesindeki bozulmalar, PH patofizyolojisinde UPS rolüne ışık tutmaktadır [29].

Lizozomal otofaji 3 farklı mekanizma ile meydana gelmektedir. Bunlar makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji yollarıdır. Yanlış katlanmış ya da kümelenmiş proteinleri içeren çift membranlı otofagozomların lizozomlar ile birleşmesi makrotofaji yolağıdır. Mikrotofajide sindirime uğrayacak moleküller lizozomal pinositoz ile içeri alınmaktadır. Şaperon ilişkili otofajide ise, HSC-70 ile işaretlenmiş moleküller lizozomal membrandaki LAMP-2A (lizozom ilişkili membran proteini tip 2A) reseptörü aracılığıyla lizozomlara alınırlar [30]. Doğal α -sin, hücre içinde şaperon aracılı otofaji ile yıkıma uğramaktadır. Ancak yabanıl tipteki α -sin lizozomal reseptöre yüksek afinite ile bağlansa da membrandan içeri alınamaz ve reseptörü bloke ederek şaperon aracılı otofajiyi inhibe eder. PH beyinlerinde SNpc ve amigdalada şaperon aracılı otofaji proteinleri olan LAMP2A ve HSC70 seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir [30]. A-sin, fosforilasyon başta olmak üzere oksidasyon, asetilasyon, glikasyon, glikozilasyon, nitrasyon ve ubikütinasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğramaktadır. Bu modifikasyonlar sonucunda proteinin diğer moleküllerle etkileşimi bozulmakta ve şaperon aracılı otofajiye dirençli hale gelmesine yol açmaktadır [31]. İnsan SN ve LC nöronları okside olmuş dopamin üretmektedir. Okside olmuş dopaminin modifikasyona uğramış α -sin ile etkileşimi sonucu oluşan protein kompleksi, şaperon aracılı otofajiyi bozarak α -sinin yanında diğer substratların da yıkımını sekreye uğratma ve hücre sağ kalımını tehlikeye atmaktadır. Bu mekanizma PH'daki SN ve LC'deki hücre ölümüne ışık tutmaktadır [32]. Şaperon aracılı otofajideki inhibisyon makrotofajide kompensatuar artışa yol açmaktadır, ancak yabanıl tipteki α -sin otofagozom sentezini bozarak makrotofajide de bozulmaya yol açmaktadır [33].

Mitokondriyal disfonksiyon : Mitokondriyal bir toksin olan MPTP'nin madde kötüye kullanımı olan hastalarda toksin ile kontaminasyon sonucunda levodopaya cevaplı hızlı başlangıçlı parkinsonizm gelişimine neden olması ve bu hastaların

otopsisinde substansiya nigra da hasarlanmanın gösterilmesi, PH patofizyolojisinde mitokondriyal disfonksiyonun öneminin anlaşılmasını sağlamıştır [34]. Genetik parkinsonizme neden olan Parkin, PINK-1, DJ-1 ve POLG genetik mutasyonları mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olmakta ve mitofajiyi indüklemektedir. SNCA ve LRRK2 mutasyonlarının da mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir [35]. Mitokondriyal disfonksiyon sonucunda enerji ihtiyacı fazla olan dopaminerjik nöronlarda enerji ihtiyacı karşılanamamakta ve hücre ölümü meydana gelmektedir.

Oksidatif stres: PH'de oksidatif stres dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda önemli bir rol oynar. Dopamin metabolizmasının kendisi, mitokondriyal disfonksiyon, demir, kalsiyum, nöroinflamasyon ve yaşlanma reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olan kaynaklardır [36]. Oksidatif strese neden olan nörotoksinler ile indüklenen PH hayvan modelleri de (MPTP, 6-OHDA, rotenon ve paraquat modeli) oksidatif stresin PH patofizyolojisindeki rolüne ışık tutmaktadır [37].

Nöroinflamasyon: Çalışmalar SN'da mikroglia aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinler ve nörotoksik faktörlerinin salınımı ile karakterize olan inflamatuvar sürecin PH'da nörodejenerasyonu arttırdığını göstermektedir [38]. Parkinson hastalarının BOS örneklerinde IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-4 gibi proinflamatuvar sitokin yüksek seviyelerde bulunması, PH'da nöroinflamasyonun rolünü desteklemektedir [39]. Hücre kültürlerine ekstraselüler α -sin eklenmesi sonucunda mikroglial aktivasyon gerçekleşmekte ve bu etki α -sinin fagositozu ve NADPH oksidaz aktivasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen radikalleri aracılığı ile olmaktadır [40, 41]. İn-vivo çalışmalarda da SN'ya yabancı tipte α -sin enjeksiyonunun, proinflamatuvar sitokinlerin ve endotelial belirteçlerinin ekspresyonunu indüklediği ve mikroglial aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir [41].

2.1.2. Ekstraselüler Alfa-sinüklein ve Prion Benzeri Yayılım

A-sin agregasyonu Lewy patolojisinin temellerini oluştursa da yanlış katlanmaya, fibrilizasyona ve LC oluşumuna etki eden faktörler ve α -sin proteinin beyinde nasıl

yayıldığı hala tam olarak anlaşılammıştır. A-sin proteinin sekretuar sinyal peptid dizilimine sahip olmaması, yalnızca intraselüler bir protein olduğu ve patolojik fonksiyonun yalnızca hücre içinde gerçekleştiğini düşündürmektedir. A-sin esas olarak sitoplazmik bir proteindir ancak insan ve hayvanlarda BOS ve plazma gibi ekstraselüler sıvılarda α -sin tespit edilmesi, bu proteinin ekstraselüler ortamda da bulunduğunu ve ekstraselüler ortamdaki α -sin'in PH patofizyoloji ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir [4].

Parkinson hastalarının striatumuna nakledilen insan embriyonik dopaminerjik hücrelerinin hem α -sin hem de ubikütin pozitif Lewy cisimcikleri geliştirmesi, α -sin'in hücreden hücreye aktarılabilmesini ve etkilenen hücrelerden sağlıklı nöronlara yayılabildiğini göstermektedir [42]. Hayvan modellerinde ise eksojen yoldan verilen α -sin fibrilleri internalize olup normal monomerik α -sin proteinini LC-benzeri inklüzyonlara dönüştürmekte ve hücreden hücreye prion benzeri yayılım göstermektedir [7].

Son yıllarda α -sin'in ekzositoz yoluyla sağlıklı hücrelerden ekstraselüler sıvıya salınabildiği gösterilmiş ve bu salınımın mekanizmaları, ekstraselüler α -sin'in PH'daki yeri aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Stres durumlarında α -sin'in veziküllere transportu artmaktadır [43]. Veziküler α -sin agregasyona sitozolik formdan daha yatkındır ve stres koşullarında veziküllere alınan α -sin oligomerik formlara dönüşerek ekstraselüler sıvıya salınabilmekte, daha sonra endositoz yoluyla diğer nöronlar ve glialar tarafından hücre içine alınabilmektedir [44]. Ekstraselüler ortamdaki α -sin metalloproteinazlar gibi ekstraselüler proteazlar yoluyla ya da nöronlar, astrositler ve mikroglialar tarafından alınarak hücre içinde yıkıma uğratılmaktadır[44]. Ekstraselüler ortama salınan α -sin komşu hücreler tarafından alınarak direkt nörotoksositeye neden olduğu gibi, astroglial hücreler ve mikroglia aktivasyonu yoluyla nöroinflamasyona da yol açmaktadır [38, 45].

Beyinden makromoleküllerin temizlenmesinde bir diğer mekanizma da glimfatik sistem yoluyla ekstraselüler atıkların drenajıdır [10]. Bu sistemin ekstraselüler α -sin temizlenmesine de katkıda bulunduğunu ve PH patogenezinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar mevcuttur [46]. PH'de glimfatik sistemin rolüne

"2.8.Nörodejeneratif hastalıklarda glimfatik sistemin rolü" başlığı altında ayrıntılı olarak değinilecektir.

2.1.3. Braak Evrelemesi

SN'deki Lewy patolojisi ve dopaminerjik kayıp PH'nin ana motor semptomlarıyla ilişkili olsa da Lewy cisimleri yalnızca bu bölgede değil sinir sisteminde dağılmış halde gösterilmiştir. Vagus sinirinde, hipotalamusta, Meynertin bazal çekirdeğinde, serebral kortekste, olfaktör bulbusta ve otonom sinir sisteminde de Lewy cisimleri izlenmektedir [2]. Braak ve ark. Lewy patolojisinin periferden santrale doğru yayıldığını ve bunun hastalık evreleri ve semptomlar ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir [21].

Evre 1'de periferik sinir sistemi, olfaktör sistem ve medulla oblongata, evre 2'de lokus seruleus, gigantoselüler retiküler çekirdek, evre 3'de pedinkülopontin nükleus, substansiya nigra pars kompakta, bazal ön beyin- magnoselüler nükleus ve limbik sistem-amigdala santral subnükleusu, evre 4'te limbik sistemin diğer yapıları, temporal mezokorteks-CA2 ve evre 5-6'da yüksek kortikal yapılarda Lewy patolojisi izlenmektedir [21].

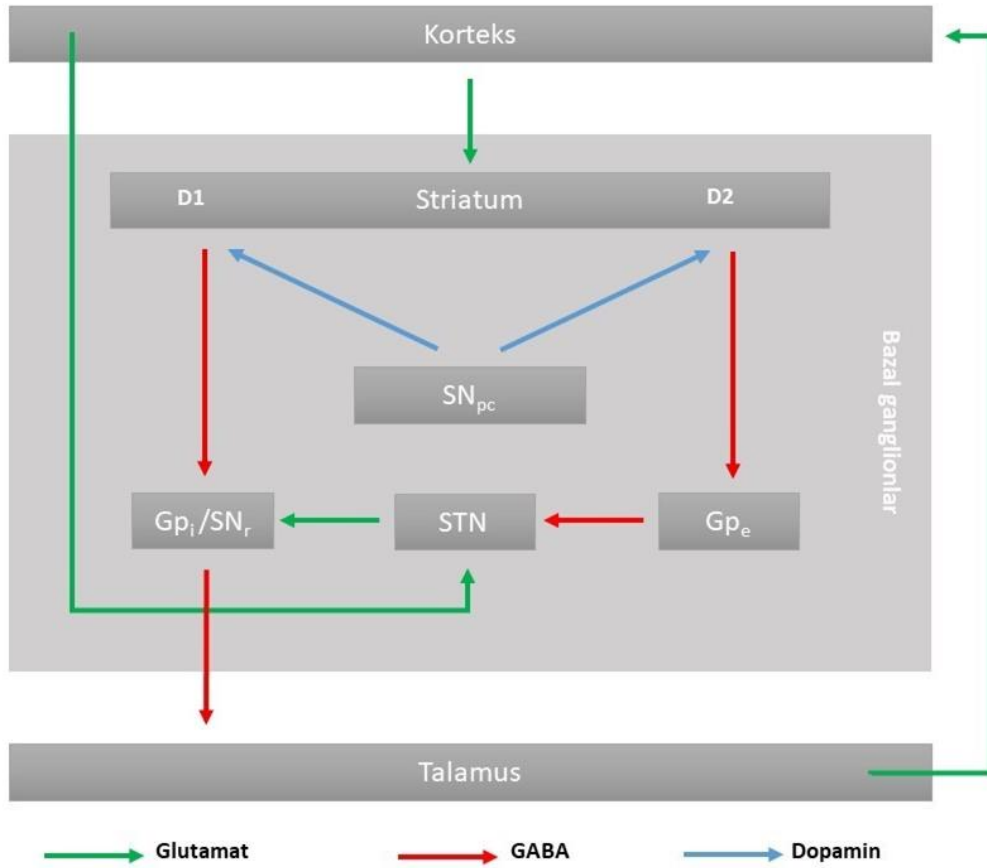
Ancak Braak evrelemesi vakaların yaklaşık %25'inde hastalık progresyonunu açıklamamaktadır ve yalnızca PH özelinde bir skora sağlanmaktadır [47]. 2009 yılında Lewy patolojisinin zamansal ve mekânsal yayılımının daha iyi anlaşılması amacıyla oluşturulan skorlama sisteminde Parkinson ve diğer Lewy cisimcikli hastalıklardan oluşan vakalar; 1- yalnızca olfaktör bulbus, 2a- beyinsapı baskın, 2b- limbik sistem baskın, 3- beyin sapı ve limbik sistem ve 4- neokortikal olarak 5 evreye ayrılmıştır [48]. Bu evrelemeye Lewy cisimcikli bozukluklar için birleşik skorlama sistemi (Unified staging system for Lewy body disorder-USSLB) adı verilmiştir. Hastaların USSLB evresi ile motor ve nonmotor semptomlarının korelasyon gösterdiği, ayrıca bu sınıflama sistemi ile Braak evrelemesine göre vakaların çok daha büyük bir çoğunluğu klasifiye edilebildiği belirtilmiştir [47].

2.1.4. Bazal Ganglionlar

Bazal ganglionlar hareketin kontrolü başta olmak üzere öğrenme, planlama, çalışma belleği ve emosyonda görev yapmaktadır. Korteksten gelen veriyi işleyerek talamus yoluyla kortekse geri göndererek istemli hareketlerin doğru şekilde uygulanmasını sağlarlar. PH başta olmak üzere istemli hareketlerin kontrolünde bozulmaya yol açan nörodejeneratif hastalıklar bazal ganglionların fonksiyonel ve anatomik bağlantılarının önem kazanmasına yol açmıştır. Bazal ganglionlar, kaudat nükleus, putamen, globus pallidus, substansiya nigra ve subtalamik nükleus olmak üzere bağlantılı 5 nükleustan oluşmaktadır. Kaudat ve putamen birlikte neostriatum adını almaktadır. İnsanlarda kaudat ve putamen internal kapsül ile ayrılmıştır ancak rodentlerde striatum anatomik olarak homojen bir yapıdır. Striatuma majör girdiler korteks, subtalamik çekirdek ve substansiya nigradan gelir ve genel olarak eksitatuardır. Striatum ana girdi merkezi olması nedeniyle farklı nörotransmitter reseptörlerinden zengindir ancak ana eksitatuvar nörotransmitter glutamattır ve striatal aktivitenin regülasyonunda çok önemli bir role sahiptir. Korteks ve talamustan gelen glutamaterjik girdilerin yanında, pedinkülopontin çekirdekten asetilkolinergik, rafe çekirdeğinden serotonergik, lokus seruleustan noradrenajik ve substansiya nigra pars kompaktadan gelen dopaminergik nöronlar striatumda sonlanmaktadır [49].

Striatumun çıktılarının ana hedefi ise globus pallidusun internal (GP_i) ve eksternal segmenti (GP_e) ile substansiya nigra pars retikülatadır (SN_r). GP_e'ye giden projeksiyonlar enkafalin içerirken, GP_i ve SN_r'ya gidenler ise substans P ve dinorfin içermektedir. Striatum çıktılarının bu fonksiyonel segmentasyonu direkt ve indirekt yol olarak tanımlanan bazal gangliyon devrelerinin temelini oluşturmaktadır [50]. Direkt yolda kaudat/putamen (striatum), GP_i, SN_r ve talamus görev alır. GP_i ve SN_r'dan talamusa çıktılar inhibitör özelliktedir. Serebral korteksten striatuma gelen eksitatuvar uyarı sonucunda striatum GP_i ve SN_r'ya inhibitör uyarılar gönderir. Striatumun uyarımı sonucunda GP_i ve SN_r'nin talamus üzerindeki inhibisyonu ortadan kalkar ve talamokortikal bağlantılardaki artış sonucunda korteks üzerindeki

net etki eksitasyon olur (Şekil 2.1). İndirekt yolak ise kaudat/putamen(striatum), GPe , Subtalamik nükleus (STN), GPi ve talamustan oluşur. Normalde GPe STN'e inhibitör projeksiyonlar gönderir, STN ise GPi 'ı eksite eder. İndirekt yolakta korteksten striatuma gelen uyarı sonucunda striatumun GPe üzerindeki inhibisyonu artırır. Bunun sonucunda STN üzerindeki inhibisyon ortadan kalkar ve GPi aktive olur. Talamus üzerindeki inhibisyonun artması sonucunda korteks üzerindeki net etki inhibisyon olur [51] (Şekil 2.1) . Direkt ve indirekt yolakta korteksten çıktılar striatum üzerinden iletilir, ancak korteksten direkt STN'e giden projeksiyonlar da mevcuttur ve bu yol hiperdirekt yol olarak adlandırılır ve hareketin durdurulmasından sorumludur [52].



Şekil 2.1. Bazal ganglion devresi

SN, krus serebri ve orta beyin tegmentumu arasında yer alan, yüksek yoğunlukta dopaminerjik nöron içeren bir yapıdır. Pars kompakta ve pars retikülata olarak 2 bölümden oluşur. SN_r, pallidal nöronlara benzer morfolojidedir ve ana

nörotransmitteri Gama-amino bütirik asit (GABA)'tir, direkt ve indirekt yolda talamus üzerinde inhibitör etki gösterir. SN_{pc} ise striatuma dopaminerjik uzantılar göndererek direkt ve indirekt yolu modüle eder. Direkt yolda yer alan putaminal nöronlar D2 reseptörleri içerirler ve dopamin ile fasilite olurlar. Bunun aksine indirekt yoldaki putaminal nöronlar ise D1 reseptörü içerir ve dopamin ile inhibe olur. Böylece nigrostriatal yolda indirekt yolu inhibe edip direkt yolu fasilite ederek hareketi kolaylaştırır [51].

Bazal ganglion devresinin çeşitli bölgelerinde olan patolojiler hipo ve hiper kinetik hareket bozukluklarına yol açar. PH'da dopaminerjik nöronlardaki dejenerasyon sonucunda tüm bazal ganglion devresini etkileyen değişimler meydana gelmektedir. İndirekt yoldaki inhibisyonun azalması sonucunda STN aktif hale gelir ve hareketin başlatılıp sürdürülmesi zorlaşır [49].

2.2. Deneysel PH Modelleri

Parkinsonizm hayvan modelleri, hastalığın patofizyolojisi, moleküler mekanizmaları, genetik / çevresel faktörler, motor/non-motor semptomlar ve tedavi stratejileri konusunda araştırmacılara oldukça değerli bilgiler sağlamaktadır. Hastalığın patofizyolojisinin tamamen aydınlatılamamış olmasından da kaynaklı olarak tüm fenotipik ve patolojik özelliklerini kopyalayabilen bir model henüz mevcut değildir.

PH'yi farklı yönleriyle araştırmaya olanak veren 3 temel hayvan modeli mevcuttur. Bunlar nörotoksin temelli modeller, genetik modeller ve α -sin'in prion-benzeri yayılımını inceleyen modeller olarak sınıflandırılabilir. PH deneysel hayvan modelleri Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

2.2.1. Toksin Temelli Parkinsonizm Modelleri

Nörotoksin ile indüklenen PH hayvan modellerinde nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda dejenerasyon ve bunun sonucunda Parkinson benzeri fenotip elde edilmektedir. Bu amaçla, 6-Hidroksidopamin (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), parakuat ve rotenon kullanılabilir [37].

Toksin bazlı modellerde nigrostriatal dejenerasyon sonucunda Parkinson hastalığının orta-ileri evrelerindeki motor semptomları taklit edilebilmektedir ve bu modeller semptomatik tedavi geliştirilmesi için kullanılmaktadır[53].

Tablo 2.1. Deneysel PH hayvan modelleri

PH modeli	Özellikleri ve kullanımı	Kısıtlılıkları
Nörotoksin modelleri		
<u>MPTP- nörotoksin</u> Kompleks-1 inhibisyonu	Hızlı ve güçlü dopaminerjik nörodejenerasyon Güçlü motor defisit α -sin agregasyonu yok Sistemik enjeksiyon (bilateral parkinsonizm)	Sıçanların dirençli olması Fare ve insan olmayan primatlarda fonksiyonel düzelme
<u>6-OHDA -nörotoksin</u> Kompleks-1 inhibisyonu ve oksidatif stres	Enjeksiyon tarafına bağlı lezyon gelişimi Hızlı ve güçlü dopaminerjik nörodejenerasyon Güçlü asimmetrik motor defisit α -sin agregasyonu olmaz SNpc, striatum yada medial önbeyin demetine enjeksiyon Hemiparkinsonizm	Bilateral enjeksiyon sonucunda yüksek mortalite
<u>Rotenon- pestisid</u> Kompleks 1 inhibisyonu	Orta derecede dopaminerjik nörodejenerasyon Hafif derecede motor defisit α -sin agregasyonu olabilir	İnsanlardaki toksisite tartışmalı
<u>Parakuat ve maneb – herbisid ve fungusid</u> Oksidatif stres	Hafif derecede dopaminerjik nörodejenerasyon Hafif derecede motor defisit α -sin agregasyonu olabilir	İnsanlardaki toksisite tartışmalı Yüksek doz parakuat pulmoner fibroza yol açar
Genetik modeller		
<u>SNCA transgenik rodentler</u> A53T, A30P, E46K nokta mutasyonları ve α -sin aşırı ekspresyonu(ASO)	Fareler ve sıçanlarda Yaygın α -sin agregasyonu Dopaminerjik nörodejenerasyon oluşmaz Hafif derecede motor defisit gelişimi Ailesel SNCA mutasyon modeli α -sin fonksiyonu, yayılımı ve sinükleopatileri çalışmaya olanak verir	Gelişimi etkileyebilir
<u>LRRK2</u> Transgenik ve viral vektör aracılı	Fare ve ratlarda Zayıf dopaminerjik dejenerasyon Çoğunda motor defisit gelişmez LRRK2'nin rolü ve α -sin ile interasyonu üzerine çalışılabilir	Büyük gen boyutu AAV vektör kullanımını engeller
<u>Parkin, PINK1, DJ-1</u> Transgenik, viral vektör aracılı aşırı ifadeneme	Sıçanlarda α -sin modellerinde agregasyonu etkiler Çoğunda dopaminerjik nörodejenerasyon gelişmez Belirgin motor defisit gelişimi izlenmez Parkin, PINK1 ve DJ-1 'nin görevlerinin incelenmesi ASO yada MPTP modelleriyle kombine edilebilir	Tanımlanmış mutasyonların geniş sayısı
Alfa-sinüklein yayılım modelleri		
<u>Viral vektör aracılı α-sin aşırı ifadesi</u> Adeno-asosiy virüs yada lentivirüs vektör	Fareler, sıçanlar ve insan olmayan primatlar Yaygın α -sin agregasyonu Orta derecede dopaminerjik nörodejenerasyon Orta derecede motor defisit	Potansiyel vektör toksisitesi
α -sin preformed fibril modeli	Fareler, sıçanlar ve insan olmayan primatlar Yaygın α -sin agregasyonu Hafif derecede dopaminerjik nörodejenerasyon Ratlarda motor defisit gelişimi yok (farelerde biraz)	Patolojinin yavaş ve zayıf başlaması

2.2.2. Genetik Modeller

Büyük bir kısmı sporadik olarak izlenmekle beraber PH vakalarının % 5-25'si familial özellik taşımaktadır ve günümüzde PH ile ilgili 20'den fazla gen tanımlanmıştır [54]. SNCA, LRRK2, PRKN, PINK-1 ve DJ-1 gibi otozomal dominant ve resesif genlerin manipülasyonu ile hayvan modelleri oluşturulabilmektedir [55]. Genetik modeller, kalıtsal PH formlarıyla ilişkili genetik mutasyonları ifade etmeleri ve söz konusu proteini hastalıkta meydana geldiği gibi uzun süreler boyunca fizyolojiye yakın seviyelerde ifade etmeleri bakımından avantajlıdır ve araştırmacıların ailesel PH formlarındaki mekanizmaları araştırmasına ve terapötik müdahaleleri test etmesine izin vermektedir[56]. Ancak gerçek hayatta hastaların büyük çoğunluğunda altta yatan bir ailesel özellik bulunmamakta ve vakalar sporadik olarak gelişmektedir. Transgenik modellerde patolojik α -sin birikimi oluşsa da bu, PH'nin kendisinde görülen kalıcı, progresif nörodejeneratif değişiklikleri taklit etmekte yetersiz kalmaktadır [57].

Viral vektör aracılı modelde ise rekombinant adeno-assosiyasyon virüsü (AAV) yada lentivirüs (LV) aracılı olarak yabancı yada mutant α -sin aşırı ekspresyonu olmaktadır [57, 58]. Bu sayede α -sin'in doğal ve yavaş yayılımı ve nörodejenerasyon süreci tekrarlanabilmekte ve kognitif bozukluk gibi hastalığın non-motor semptomlarının taklit edilmesine olanak sağlamaktadır [58].

2.2.3. Alfa-sinüklein Yayılım Modelleri

Nörotoksin temelli modellerde hızlı motor defisite neden olan nigrostriatal dejenerasyon gelişse de α -sin ve LB/LN patolojisi oluşmamakta, genetik modellerde ise uzun sürede orta seviyede bir α -sin birikimi olsa da bu nigrostriatal dejenerasyon ve motor bozukluk gibi hastalığın karakteristik patolojik özelliklerini oluşturmaya yetmemektedir.

AAV modelinin ise PH ana patolojik özellikleri taklit edebilmesine rağmen, fizyolojik seviyelerin üzerinde, çok hızlı ve sınırlandırılmış bir bölgede α -sin birikimine neden olması gibi kısıtlılıkları bulunmaktadır [59].

A-sin hücreden hücreye prion benzeri yayılım gösterdiğine dair kanıtlar olması üzerine [42], dağılımının daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla α -sin propagasyon modelleri oluşturulmuştur [60–62]. Bu modelde rekombinant α -sin monomerik proteinleri agrege olan amiloid fibrilleri (α -sin PFF) oluşturmak üzere belirli koşullarda inkübe edilmektedir. Daha sonra sonikasyon işlemi ile fibriller daha küçük boyutlu hale getirilmektedir. Bu küçük boyutlu fibrillerin in-vivo yada in-vitro olarak canlı ortama verilmesi sonucunda hücre içine alınan PFF, endojen α -sinin hiperfosforile, çözünmez inklüzyonlara dönüşümünü indükler [56, 62]. Endozomlar yoluyla internalize olan PFF'i bir kısmı lizozomlar tarafından yıkılır, yıkımdan kaçan fibriller endojen α -sin ile birleşip güçlendirilir, fosforilasyon ve ubikuitinasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayarak uzatılır ve lateral bağlantılarla filamentöz agregatlara dönüşür. Organellerin, endomembranların, protein ve lipidlerin birikmesi ile organize hale gelerek insan LC benzer morfolojiye sahip olur [63]. LC-benzeri inklüzyonların oluşumu mitokondriyal değişimlere, sinaptik disfonksiyona ve progresif nörodejenerasyona sebep olmaktadır [63]. Bu modelde de suprafizyolojik seviyelerde patolojik α -sin oluşsa da viral vektör aracılı ve bazı transgenik modellerle karşılaştırıldığında insan patofizyolojine daha yakın bir birikim meydana gelmektedir.

Striatum bazal ganglion devresinin ana girdi nükleusdur. Korteksten aldığı uyarıları diğer bazal ganglionlara ileterek hareketin başlatılıp sürdürülmesinde ana rol oynar. Rodentlerde α -sin fibrilinin striatuma enjeksiyonu sonucunda striatum ve striatuma projeksiyon gönderen bağlantılı beyin bölgelerinde zamana bağlı olarak fosforile α -sin intranöral birikimleri izlenmektedir. Bu birikimler en belirgin olarak frontal ve insular korteks, amigdala ve SNpc'de oluşmaktadır. Inklüzyonlar, ubikuitin içermesi, tioflavin-S pozitif olması ve proteinaz-K resistans olması ile insan Lewy cisimciklerine benzer özellikler göstermektedir [6, 61]. PFF, enjekte edildikten sonra beyinde hızla yayılmakta ve karşı hemisfere geçmektedir. Fibrilin unilateral enjeksiyonu sonucunda nigral dopaminerjik nöronlarda bilateral kayıp meydana gelmesi [6, 61] ve PFF enjeksiyonu öncesinde kallozotomi yapılan hayvanlarda kontralateral hemisferde α -sin patolojisi anlamlı olarak azalırken, enjeksiyondan 24

saat sonra kallozotomi yapılan hayvanlarda, kallozotomi yapılmayan hayvanlarla benzer dağılım izlenmesi [64] bu hızlı ve bilateral yayılımı desteklemektedir. PFF'in direkt olarak SNpc'ya enjeksiyonu ile dorsal striatum enjeksiyonuna benzer yayılım ve dopaminerjik nörodejenerasyon izlenmektedir [65].

Striatuma enjekte edilen PFF'in miktarı çalışmalar arasında değişkenlik göstermektedir ve verilen miktara bağlı olarak oluşan inklüzyonların miktarı zamansal değişiklik göstermektedir. Pauimer ve ark.'nın [6] çalışmasında striatuma 2 bölgeden yapılan enjeksiyonun tek bölgeye göre daha yaygın patolojiye neden olduğu, Patterson ve ark.'nın [61] çalışmasında ise 2 bölgeden toplam 16µg fibril enjeksiyonunun toplam 8µg'a göre 2.ayda ipsilateral SN_{pc}'da 2.5 kat daha fazla fosforile α-sin birikimine neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda PFF enjeksiyonu sonrasındaki 4 ila 24 hafta arasındaki patolojik α-sin birikimleri ve dopaminerjik hücre kaybı incelenmiştir [6, 61, 66, 67]. 4. Haftadan itibaren SN_{pc}'da fosforile α-sin birikimleri izlenmeye başlamaktadır [6]. Ancak dopamin hücrelerinde dejenerasyon - tirozin hidroksilaz (TH) ekspresyonunda azalma ise 12-16. haftalarda gerçekleşmektedir [61, 66, 67]. Dopamin asimetrisinin motor testlere etkisine bakıldığında en uzun takip süresi olan 6.ayda bile dopamin asimetrisinin motor defisit geliştirmek için yeterli olmadığını görmekteyiz [6, 61].

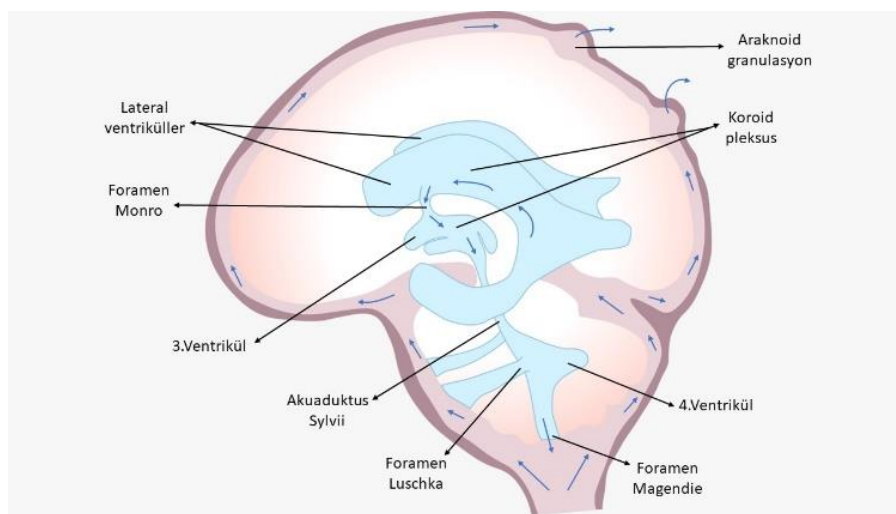
Intrastratial PFF enjeksiyonu aynı zamanda mikroglial aktivasyonu da indüklemektedir. İpsilateral striatumda PFF enjeksiyonu sonrasında MHC-II ekspresyonunda artış izlenmiştir. Bunun başlangıçta verilen ekstrasüler PFF'in etkisi olabileceği düşünülmüştür. Ancak zaman içinde bu ekspresyonun azalmayıp fosforile α-sin birikimleriyle paralel olarak artış göstermesi, mikroglial aktivasyonun α-sin agregatları sonucu geliştiğini göstermektedir [67]. Mikroglial aktivasyon SN_{pc} nöronlarını dejenerasyona hassas hale getirerek dopaminerjik defisiti artırmaktadır [68].

Parkinson hastalığının premotor semptomlarının ve Braak hipotezine göre başlangıç evrelerinin modellenmesi üzerine yapılan çalışmalarda PFF sistemik intravasküler olarak, gastrointestinal sisteme yada olfaktör bulbusa enjekte edilebilmektedir [69–71]. A-sin PFF'in intravasküler olarak enjeksiyonu sonucunda

premotor idiopatik PH benzer, bölgesel ve zaman bağımlı nöronal patoloji gelişimi izlenmektedir. Bu modelde gastrointestinal ve olfaktor defisite ek olarak beyin sapı ve orta beyinde nörojenerasyon izlenmiştir [71]. Olfaktör bulbusa fibril enjeksiyonu ile de patolojik birikimler oluşmakta ve 12 ay içinde transnöral olarak birçok beyin bölgesine yayılmaktadır [72]. Gastrointestinal sisteme enjekte edilen fibril de kaudorostral yayılım göstererek santrale geçmekte ve bu geçiş vagus siniri yoluyla olmaktadır [70].

2.3. BOS Dolaşımı

Geleneksel hipoteze göre BOS primer olarak koroid pleksusta üretilir, foramen Monro aracılığıyla 3.ventriküle, serebral akuaduktus ile 4. Ventriküle buradan da foramen Magendie ve Luschka aracılığıyla subaraknoid aralığa boşalır. Subaraknoid aralıktaki BOS araknoid granuasyonlardan emilerek venöz sisteme drene olur (Şekil 2.2). Ancak sonraki yıllarda BOS'un tek drenaj yolunun araknoid granuasyonlar olmadığı ortaya koyulmuştur. Kribriform lamina, kraniyal ve spinal sinir kılıfları ve dural lenfatikler yoluyla lenfatik sisteme BOS drenajı olduğu gösterilmiştir [11, 73, 74]. Erişkinlerde BOS toplam hacmi 90-200 mL arasındadır ve günde ortalama 500 mL BOS üretilmektedir [74]. Yaşla beraber BOS devir hızı azalmakta ve beyinde metabolitlerin birikmesine neden olmaktadır. Bu durum bazı nörodejeneratif hastalıklarda da izlenmektedir [75].



Şekil 2.2. Klasik BOS dolaşım modeli

Uzun yıllar beyin omurilik sıvısının asıl görevinin santral sinir sistemini saran bir yastık işlevi görerek mekanik etkilere karşı korumak olduğu düşünülmüştür. Ancak son yıllardaki kanıtlar BOS'un beyin parankimindeki interstisyel sıvının homeostazi, nöronal ve immünolojik fonksiyonlarda hayati rolü olduğunu göstermektedir [76].

2.4. Glimfatik Sistem

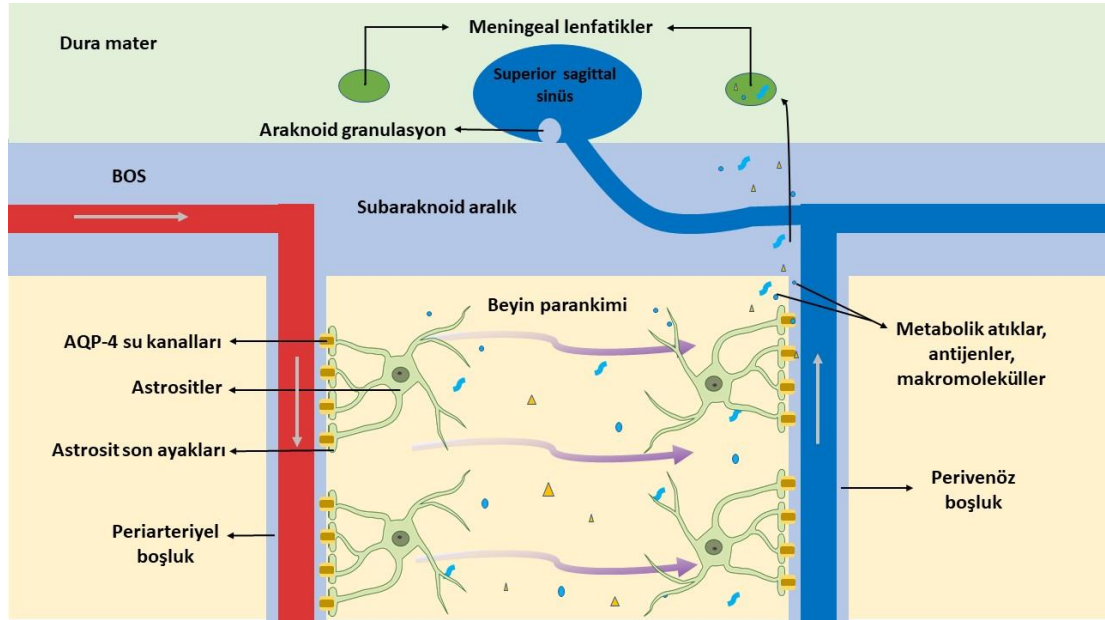
Periferik organlarda oldukça geçirgen kapillerler ve lenfatik sistem intersitisyel sıvıdan proteinlerin ve metabolik artıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Merkezi sinir sisteminin yüksek metabolik hızı ve nöronların toksik moleküllere yüksek hassasiyetine rağmen uzun yıllar boyunca beyinde konvansiyonel bir lenfatik sistemin olmadığı görüşü kabul görmekteydi [77]. 2012 yılında Iloff ve ark. [10] tarafından 'glia' ve 'lenfatik' kelimelerinden gelen 'glimfatik sistem' modeli ortaya koyuldu. Bu sistem bir psödo-lenfatik sistem olarak tanımlanabilir ve beyinden makromoleküllerin uzaklaştırılmasında görev almaktadır [77].

Glimfatik sistem modeli ortaya atılmadan önce de beyindeki damarların çevresinde perivasküler bir boşluk olduğu ve bu boşluğun sıvıların beyin parankimine giriş çıkışı için bir yol olabileceğine dair kanıtlar mevcuttu [78]. Kediler ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise servikal lenfatiklerin bağlanması sonucu beyinlerinde ödem gelişimi olduğu, beyine karbon işaretleyici verildiğinde de işaretleyicinin damar çevresinde ve komşu lenf nodlarında lokalize olduğu gösterilmiştir [79].

Glimfatik sistem modeli ilk tanımlandığında BOS'a verilen işaretleyicilerin lenf nodlarına nasıl drene olduğu belirsizdi ve hala tam bir lenfatik doku gösterilememişti. Aslında meninkslerde lenfatik dokuların olduğu ilk defa 1787'de Mascagni ve ark. [80] tarafından bildirilmişti, ancak 2015 yılında 2 farklı çalışma ile periferik lenfatiklerin karakteristik özelliklerini taşıyan meningeal lenfatiklerin gösterilmesiyle santral sinir sisteminin de lenfatik drenajının olduğu görüşü kabul görmüştür [11, 81].

2.4.1. Glimfatik Sistem Anatomisi

Beyin parankimine penetre olan damarlar arteriyolleri ve dallanarak teminal kapiller yatağı oluşturmaktadır. BOS subaraknoid aralıktan penetran arteriyollerin çevresindeki paravasküler boşluğa dolar. Bu penetran damarlar leptomeningeal hücreler ve glia limitans ile çevrelenmiştir ve BOS dolu perivasküler boşlukları, diğer adıyla Virchow -Robin boşluklarını oluştururlar [82]. Glimfatik sistem modelinde, subaraknoid boşluktaki BOS bu periarteriyel aralıktan astrosit son ayaklarındaki AQP4 su kanalları aracılığıyla interstisyuma, interstisyuma geçen BOS, interstisyel sıvı ve solut maddeler ile karışarak paravenöz yoldan dural lenfatikler aracılığıyla derin servikal lenf nodlarına drene olmaktadır [10, 11] (Şekil 2.3).

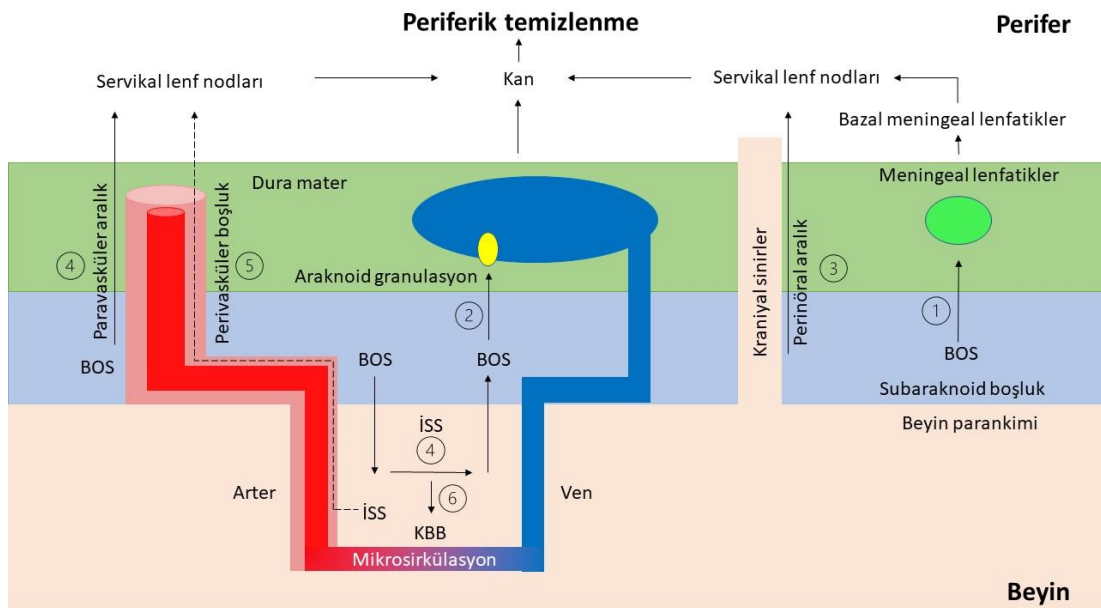


Şekil 2.3. Glimfatik sistemin şematik gösterimi [10]

BOS'un perivasküler aralıktan interstisyuma geçişi ve interstisyel sıvı ile karışmasında arteriyel ve venöz basınç, kardiyovasküler pulsasyonların itici gücü, solunum ve intrakraniyal basınç rol oynar [83, 84].

İnterstisyel sıvı ile birleşen BOS'un beyinden periferik drenajı birkaç farklı şekilde olmaktadır ; i) meningeal lenfatikler aracılığı ile derin servikal lenf nodların drenaj, ii) araknoid granulasyonlar aracılığıyla venöz sinüslere drenaj, iii) kraniyal sinirler boyunca (olfaktör, optik, trigeminal sinir vb.) perinöral kılıftan emilere

servikal lenf nodlarına drenaj, iv) kan-beyin bariyeri yoluyla kan akımına drenaj v) glimfatik sistem yoluyla paravenöz boşluğa drenaj [85] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. BOS'un beyinden periferik drenaj yolları [85] 1) Meningeal lenfatik yolağı, 2) Venöz sinüs yolağı, 3) Perinöral yolağı 4) Glimfatik ve paravasküler yolağı, 5) Perivasküler yolağı 6) KBB yolağı

2.4.2. Akuaporin 4 Su Kanalı

Su molekülleri lipid plazma membranını direkt olarak geçebilse de bu geçiş hem yavaş hem de bir düzenlemeye tabi değildir. Suyun transmembran olarak hızlı geçişini düzenleyen kanalların var olması gerektiği düşünülmektedir ve 1992 yılında akuaporin kanallarının keşfi sonrasında [86], ilerleyen yıllarda 11'i memelilerde, 150'ye yakını bitkiler, mikroplar ve diğer hayvan türlerinde olmak üzere çok sayıda su kanalının varlığı ortaya koyuldu [87]. Aquaporin kanalları selektif olarak suya geçirgen olan kanallardır. AQP kanallarında 1, 4 ve 9 memeli beyinde ekprese edilmektedir [87, 88]. AQP1 koroid pleksustaki epitelyal hücrelerde bulunur ve BOS üretiminde rol oynamaktadır [89]. AQP9 ise baskın olarak katekolaminerjik nöronlarda bulunmaktadır ve bir metabolit kanalı olarak beyin enerji metabolizmasında rol oynadığı düşünülmektedir [90].

AQP4 su kanalları, sıçan beyinlerinde ilk defa 1994'te gösterilmiş olup beyinde özellikle serebellum, hipotalamus, spinal kord ve ventriküllerin ependimal hücrelerinde bolca bulunmaktadır ve diğer akuaporin kanallarının aksine civa ile inhibe olmaması nedeniyle civa-duyarsız su kanalı olarak isimlendirilmiştir [91, 92]. Hücresel dağılımına bakıldığında vaskularizasyonu fazla olan bölgelerde, astrositlerin ayaksı çıkıntılarında ve özellikle kan damarlarına en yakın olan bölgede eksprese edilmektedir (polarizasyon) [93].

AQP4 plazma membranında tetramer olarak ekprese edilir ve M1 ve M23 olmak üzere 2 major izoformu vardır [94]. M23 formu ortogonal parçacık dizinleri (orthogonal arrays of particles – OAP) olarak adlandırılan supramoleküler yapıları oluştururken, M1 tek başına bu yapıları oluşturamaz ancak M23 ile birleşerek yapıya katılabilir[95]. Ortogonal parçacık dizinleri su geçirgenliğini artırır, hücre-hücre adezyonunu düzenler ve astrosit ayaksı çıkıntılarında AQP4 polarizasyonunu kolaylaştırır[94]. AQP4 kanallarının astrosit ayaksı çıkıntılarındaki polarizasyonu glimfatik sistemin işleyişi için elzemdir. Periarteriyel aralıkta bulunan BOS, damarları çevreleyen astrositlerin ayaksı çıkıntılarındaki AQP4 kanalları aracılığı ile interstisyuma geçmekte, burada interstisyel sıvı ve metabolik atıklar ile birleşerek yine AQP4 kanalları aracılığı ile paravenöz aralığa drene olmaktadır [10].

AQP4 kanallarının polarizasyonun bozulması sonucunda, kan damarlarını çevreleyen ayaksı çıkıntılarda kümelenmesi gereken kanallar hücrenin içinde dağınık halde izlenmektedir ve glimfatik disfonksiyon gelişmektedir. Yaşlanma ve AH'de glimfatik sistem fonksiyonlarındaki bozulmanın mekanizmalarından biri de AQP4 polarizasyonun bozulmasıdır [96, 97].

2.5. Meningeal Lenfatikler

Meningeal lenfatik damarlar dural sinüslerin her iki yanında yer almakta ve beyin parankimindeki BOS ile karışan interstisyel sıvının servikal lenf nodlarına drene olmasını sağlamaktadır. Bu lenfatik damarlar Prox1, CD31, Lyve-1, Podoplanin, VEGFR3 ve CCL21 gibi lenfatik endotel hücrelerinin geleneksel belirteçlerinin hepsini ekprese etmektedir [11, 81]. Çalışmalar bu damarların bir çok

immün hücre taşıdığını ve sadece beyinden atıkların uzaklaştırılmasında değil, ayrıca beyin normal immün regülasyonunun da sağlanmasında önemli rolü olduğunu göstermektedir[83]. Bu lenfatik damarlar glimfatik sistem aracılığıyla komşu subaraknoid aralıktaki BOS ve interstisyel sıvıyı absorbe etmekte, kafa tabanındaki bir foraminadan geçerek derin servikal lenf nodlarına drene olmaktadır [11].

Hayvanlarda intraserebroventriküler olarak verilen floresan boyanın sinüslerin her iki yanında bulunan meningeal lenfatiklerde izlenmesi bu lenfatiklerin BOS drenajını sağladığını göstermektedir [81]. Yine intraventriküler olarak enjekte edilen Evans mavisinin 30.dakikada meningeal lenfatiklere ek olarak derin servikal lenf nodlarında izlenmesi ancak bu zaman diliminde yüzeysel derin servikal lenf nodlarında izlenmemesi, primer drenaj bölgesinin derin servikal lenf nodları olduğunu kanıtlamaktadır [81].

BOS'un servikal lenf nodlarına drenaj yollarından biri de kribriform lamina yoluyla servikal lenfatiklere drenajdır. Ancak çalışmalar BOS'un ekstrakraniyal drenajında primer yolun kribriform lamina yoluyla değil, meningeal lenfatikler yoluyla olduğunu göstermektedir [11, 81]. Yapılan çalışmalarda derin servikal lenf nodlarının lenfatik damarlarının bağlanması sonucunda BOS drenajının bozulduğu, ayrıca periferik lenfödeme benzer şekilde meningeal lenfatiklerde çap artışına neden olduğu gösterilmiştir [81].

2.5.1. Meningeal Lenfatikler ve Glimfatik Sistem Arasında İlişki

Meningeal lenfatiklerin ve glimfatik sistemin keşfi ile bu iki sistem arasındaki yakın ilişki çeşitli çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Dural lenfatiklerin aplazik olduğu hayvanlarda beyin parankimine enjekte edilen makromoleküllerin beyinden temizlenmesi bozulmaktadır [11]. Unilateral ligasyon sonucu ise ipsilateral hipokampüste amiloid-beta birikimi artmaktadır [98]. Başka bir çalışmada ise AQP4 ekspresyonu bozularak glimfatik sistem disfonksiyonu oluşturulan farelere bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu yapılmış, bu hayvanlarda lenfatik drenajın bozulması sonucunda AQP4 ekspresyonundaki değişikliklerin A β birikimini artırdığını gösterilmiştir [99]. Derin servikal lenf nodu ligasyonu AQP4 polaritesi ve

ekspresyonunu bozarak ve nöroinflamasyonu tetikleyerek glimfatik sistem fonksiyonlarında bozulmaya yol açmaktadır [46, 100].

2.6. Glimfatik Sistem Görüntülemesi

Glimfatik sistem insanlarda ve hayvan çalışmalarında farkı görüntüleme yöntemleriyle incelenebilmektedir. Hayvan çalışmalarında in-vivo ve ex-vivo olarak inceleme yapılabilmektedir. MRG görüntüleme hem hayvan hem insan çalışmalarında tüm beynin görüntülenmesine olanak sağlarken, floresan mikroskopi ile dar bir alanda mikroskopik düzeyde yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilebilmektedir.

2.6.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme

Glimfatik sistemin MRG ile görüntülenmesi in-vivo incelemeye olanak sağlaması, tüm beynin incelenebilmesi ve dinamik bir görüntü elde edilebilmesi yönünden avantajlıdır ve birçok hayvan ve insan çalışmasında farklı teknikler kullanılarak uygulanmakta ve son zamanlarda çalışmalar giderek hız kazanmaktadır [101].

Dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme: Hayvan modellerinde en sık kullanılan yöntemlerden biri dinamik kontrastlı MRG'dir. Paramanyetik kontrast maddenin intratekal olarak verilmesi sonrası belirli zaman aralıklarında alınan görüntüler ile kontrast maddenin BOS'a yayılımı, parankime alınması ve temizlenmesinin ölçülmesi ile glimfatik sistem fonksiyonları hakkında bilgi edinilebilmektedir. Kontrastlı MRG görüntüleme için seçilen paramanyetik kontrast maddenin paravasküler aralıktan beyin parankimine geçebilecek boyutta olması gereklidir. Büyük molekül ağırlığına sahip paramanyetik maddeler paravasküler aralıkta kalmakta ancak parankime geçememektedir [102].

Literatürde rodentler üzerinde yapılan glimfatik sistem MRG çalışmalarında intratekal kontrast maddenin veriliş yolu olarak sisterna magna [14, 102, 103] yada intraventriküler [104] yol seçilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar glimfatik sistem görüntülemesi için intratekal işaretleyici verilme yolu olarak lomber intratekal yolun

kullanılabileceğini de göstermektedir [105]. Çalışmalarda intrakraniyal basınçta artışa yol açmadan glimfatik sistem fonksiyonlarının korunmasını sağlamak amacıyla 1.6µl /dk infuzyon hızı ve toplam 80µl Gd-DTPA tercih edilmiştir [14, 102, 103]. Ancak bazı çalışmalarda 2µl/dk infuzyon hızının da kullanılabileceği, intrakraniyal basınçtaki değişimin infuzyon bitiminde normalde döndüğü ve fizyolojik akımı bozmadığı gösterilmiştir [96, 106]. Glimfatik sistemin kontrastlı MRG ile incelenmesi iskemik inme [107], diyabetes mellitus [14, 108], travmatik beyin hasarı [109] gibi farklı nörolojik ve sistemik hastalık hayvan modellerinde uygulanmıştır.

Intratekal paramanyetik kontrast madde enjeksiyonu ile glimfatik sistem görüntülenmesi insanlar da uygulanabilmektedir. Verilen işaretleyicinin insan beyinde sentripedal olarak yüzeyden derin yapılara doğru, vasküler pulsasyonlar aracılığıyla iletildiği gösterilmiş olup, bu bulgu glimfatik sistem hipotezini doğrulamaktadır [110]. İnsanlarda intratekal yoldan verilen kontrast madde yoğunluğu kortekste yaklaşık 10-15.saatlerde maksimuma ulaşırken [111], rodentlerde bu süre 30-60.dakikadadır [102]. İnsan çalışmalarında ve klinikte sıklıkla kullanılan gadobutrolün intratekal kullanımı bilinen kontrast alerjisi olmayan hastalarda güvenli olarak kabul edilmektedir ancak hastalarda lomber ponksiyona bağlı baş ağrısı, bulantı, sersemlik görülebilmektedir [13]. Sağlıklı insanlarda gadolinyum bazlı kontrast maddelerin intravenöz yoldan verildiğinde subaraknoid boşlukta ve paravasküler boşlukta izlenebildiği gösterilmiştir [112, 113]. İntravenöz ve intratekal enjeksiyon yöntemlerinin genel olarak güvenli olmasına rağmen invaziv işlem gerektirmesi, kontrast maddenin dağılımı için uzun süre gerektirmesi nedeniyle insanlarda glimfatik sistemin görüntülenmesi için noninvaziv ve hızlı teknikler oluşturulmuştur.

Diffüzyon tensör görüntüleme: DTİ tekniği ile lateral ventrikül gövdesinin dış tarafındaki beyaz cevherdeki perivasküler boşlukta diffüzyon kapasitesi, ana beyaz cevher liflerine dik bir yöndeki diffüzyon kapasitesi olarak oranlarak değerlendirilir ve buna ALPS (along the perivascular space) indeksi denilmiştir. Bu oranın hafif kognitif bozukluk ve Alzheimer hastalarında mini mental test skorlarıyla ters orantılı olduğu gösterilmiştir ve glimfatik sistem fonksiyonlarının belirteci olabileceği öne

sürülmüştür [114]. Bu teknik Parkinson hastaları ve idiyopatik REM uyku davranış bozukluğu (RUDB) olan hastalardaki glimfatik aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla da kullanılmıştır. Parkinson hastalarında hastalık şiddeti ile ve kognitif yıkım ile ALPS indeksi arasında ters orantı gösterilmiştir ve ALPS indeksinin Parkinson hastalarında glimfatik sistem biyobelirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [115, 116].

Genişlemiş perivasküler boşluklar: Virchow-Robin boşlukları (VRB) olarak da bilinen perivasküler boşluklar (PVS), mikrodamarların etrafında bir boşluk ağı oluşturan BOS dolu, metabolik artıklarının drenajının gerçekleştiği bölgelerdir ve glimfatik sistemin ana birleşenidir. Normal perivasküler boşluklar konvansiyonel MRG'de görülemezler ancak genişlediklerinde görünür hale gelirler. Sıklıkla sentrum semiovale, bazal ganglionlar ve beyin sapında, T1 ve FLAIR sekanslarda hipo, T2 ağırlıklı sekanslarda hiperintens görünürler [117]. PVS'lerin genişlemesine neden olan mekanizmalar hala net değildir, ancak bunun potansiyel olarak glimfatik sistem disfonksiyonunu yansıttığı düşünülmektedir. Teorik olarak perivasküler boşluktan parankime BOS alımının ve dışarı atılımının bozulması sıvı birikimine neden olmaktadır. Kognitif yıkım, PH, travmatik beyin hasarı, normal basınçlı hidrosefali (NBH) gibi birçok hastalıkta genişlemiş PVS'ler ile hastalık arasında ilişki gösterilmiştir [118].

Intravoksel tutarsız hareket diffüzyon görüntüleme (intravoxel incoherent motion diffusion weighed imaging- IVIM-DWI), MR perfüzyon, MR spektroskopisi gibi diğer MRG teknikleri de glimfatik sistem görüntülemesi için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır [118].

2.6.2. Hayvan Çalışmalarında Kullanılan Diğer Görüntüleme Yöntemleri

İki-foton mikroskobisi ile canlı hayvanlarda anestezi altında görüntüleme yapılabilmektedir. Genellikle sisterna magnaya yerleştirilen bir kanül yardımıyla floresan işaretleyici subaraknoid boşluğa verildikten sonra parankime dağılımı incelenmektedir. Bu yöntem küçük paravasküler boşlukların görüntülenmesine imkan vermektedir. Mükemmel uzaysal çözünürlük sağlaması yönünden avantajlıdır,

ancak beynin sadece küçük bir bölümünün incelenebilmesi ve invaziv bir kraniyal pencere açılması gibi dezavantajları bulunmaktadır [10, 119, 120].

Ex-vivo floresans görüntüleme ise floresan işaretleyici subaraknoid aralığa verildikten sonra belirli bir süre sonra perfüzyon yapıp beyin çıkarılmakta ve kesitler alınmaktadır [96, 105, 121]. Bu yöntem ile o kesitin tamamında floresan dağılımı değerlendirilebilmektedir. Ancak bu yöntem hayvan sakrifiye edildikten sonra yalnızca tek bir andaki işaretleyici dağılımını göstermekte ve perivasküler boşlukta meydana gelen kollaps nedeniyle işaretleyicilerin dağılımında fizyolojik duruma göre ciddi değişimler olmaktadır [122].

Her iki görüntüleme yöntemindeki dezavantajların ortadan kaldırılması amacıyla yeni görüntüleme teknikleri geliştirmeye başlanmıştır. Transkraniyal optik görüntüleme, canlı hayvanlarda iki-foton görüntülemenin aksine daha geniş bir alanın incelenmesine olanak vermektedir [123].

2.7. Glimfatik Sistemi Etkileyen Faktörler

BOS'un perivasküler boşluktan beyne geçişi büyük oranda kardiyak sistol ile ortaya çıkan arteriyal pulsasyonlar sonucu olmaktadır [106]. Ancak bu geçişi etkileyen tek faktör kardiyovasküler pulsasyonlar değildir. Solunum, uyku, anestezi, vücut pozisyonu, yaşlanma gibi birçok faktör glimfatik drenaja etki etmektedir.

Solunum: Ultra-hızlı manyetik ensefalografi kullanılarak solunumla indüklenen pulsasyonların da BOS'un konvektif akışına etki ettiği gösterilmiştir [124]. Solunumsal pulsasyonlar venöz tarafta düşük basınç kaynağı oluşturarak solüt yüklerin peri-venöz bölgeye doğru itilmesini sağlamaktadır. Kardiyak ve solunum ile ortaya çıkan pulsasyonlara ek olarak düşük frekanslı (0.023-0.73 Hz) ve çok düşük frekanslı (0.001-0.023 Hz) yavaş vazomotor dalga fluktuasyonları da glimfatik akıma katkı sağlamaktadır [124].

Uyku: Yıllardır süren çalışmalara rağmen uykunun neden gerekli olduğu, beyin için nasıl onarıcı olduğu ve uykusuzluk durumunda beyin fonksiyonlarının nasıl kötüleştiği hala anlaşılmamıştır. Uzamış uyku deprivasyonu kognitif performansta

kötüleşme, reaksiyon zamanında uzama ve ekstrem durumlarda ölüme yol açabilmektedir [120].

Yaşayan fareler üzerinde yapılan iki-foton görüntüleme ile doğal uyku ya da anestezinin interstisyel boşlukta %60 artışa yol açtığı, bunun BOS ve interstisyel sıvının konvektif değişiminde ciddi artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu artış interstisyel sıvıdan β -amiloid temizlenmesini de artırmaktadır[120]. Uyanıklıktan uykuya geçişte, merkezi norepinefrin seviyeleri azaldıkça, hücre dışı alanın genişlediği ve doku direncindeki azalmanın daha hızlı BOS akışı ve interstisyel solut temizlenmesine yol açtığı sonucuna varılmıştır [120]. Uykunun glimfatik sistem fonksiyonlarındaki rolüyle ilgili bir kanıt da, uykudaki 1-4 Hz yavaş dalga delta osilasyonlarının gücünün yüksek glimfatik akışla korele olduğunun gösterilmesidir [125].

Uyku deprivasyonu AQP4 polarizasyonunu bozarak glimfatik sistemde disfonksiyon oluşturmaktadır [119] ve AQP4 knockout fareler üzerinde yapılan bir çalışmada bu hayvanlarda kronik uyku deprivasyonu sonucunda β -amiloid ve tau birikiminin arttığı, ayrıca mikrogliya aktivasyonu, nöroinflamasyon ve hipokampusta sinaptik protein kaybında da artış olduğu gösterilmiştir [126].

Vücut Pozisyonu: Glimfatik sisteme etki eden faktörlerden biri de vücut pozisyonudur. Vücut pozisyonu serebral hemodinamikleri ve intrakraniyal basıncı, böylece glimfatik sistem fonksiyonlarını etkilemektedir. Supin ve pron pozisyon ile karşılaştırıldığında sağ lateral dekübit vücut pozisyonunda glimfatik drenaj en etkindir [127]. Sağ lateral dekübit pozisyonunda kalbin daha yukarıda yerleşimli olması nedeniyle kan pompalamasının kolaylaşması ve venöz dönüşte artış ile beraber kardiyak strok volümde artış ve sempatik tonusta azalma ile glimfatik akıştaki artış açıklanmaya çalışılmıştır [127]. Dik duruş ve supin pozisyonun kraniyo servikal bölgedeki BOS akımına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise dik pozisyona göre supin pozisyonunda BOS osilasyonlarının daha fazla olduğu ve 24 saatlik zaman biliminde toplam BOS değişim volümünün supin pozisyonunda 2 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir [128].

Egzersiz: Egzersizin beyin sağlığına olumlu etkileri mevcuttur ve nörodejeneratif hastalık riskini düşürüp kognitif performansı artırmaktadır. Fiziksel aktivite AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklardan korunma stratejilerinin önemli biri birleşenidir [129, 130].

Egzersiz ile beraber glimfatik sistem fonksiyonlarında iyileşme, AQP4 ifadesinde ve polarizasyonunda artış, aktive mikroglia ve astrosit sayısında azalma ve beyinden A β temizlenmesinde artış meydana gelmektedir [131, 132]. Egzersiz sırasında akut olarak glimfatik içeri alımda düşüş gelişmektedir ve durumun adrenalin-noradrenalin değişimlerine bağlı olarak geliştiği düşünölmektedir [133]. Egzersiz ayrıca vasköler resistansı azaltmakta ve serebrovasköler reaktiviteyi artırmaktadır [134]. Egzersizin beyin damarları üzerindeki etkisi glimfatik sistem üzerine olumlu etkilerini açıklayabilir.

Yaşlanma: Yaş nörodejeneratif hastalıklar için en güçlü ve değiştirilemez risk faktörüdür. Özellikle AH ve PH için yaşla beraber hastalık riski artmaktadır[135]. Yaşla beraber nörodejeneratif hastalık oluşumunda altta yatan etkenlerden biri de glimfatik sistemdeki bozulmadır. Hayvan modellerinde yaşla beraber AQP4 polarizasyonunda, serebral arteriyal pulsatilitede ve ekstraselöler volüm regölasyonunda bozulma sonucunda glimfatik drenajda azalma meydana gelmektedir [96].

2.8. Nörodejeneratif Hastalıklarda Glimfatik Sistem

Özellikle gelişmiş ölkelerde hayat beklentisinin artması ile nörodejeneratif hastalıkların prevalansı ve beraberinde getirdiği toplumsal yük de artmaktadır. Henüz küratif bir tedavisi olmayan bu hastalıklara neden olan mekanizmaların daha iyi aydınlatılması tedavi çalışmalarına da ışık tutacaktır. AH, PH, Huntington hastalığı (HH), amyotrofik lateral skleroz (ALS), frontotemporal demans (FTD) yaşlanmayla ilişkili nörodejeneratif hastalıklardır. Bu hastalıkların patofizyolojisinde amiloid- β , tau, α -sin, TAR DNA-protein 43 (TDP-43) ve mutant huntingtin gibi proteinlerin yanlış katlanması, yanlış yerleşimi ve toksik birikimleri sonucunda fonksiyon kaybı ve

nörotoksik etkileri rol oynamaktadır [136]. Bu anormal birikimlerin beyinden temizlenmesindeki bozukluk patoloji gelişiminin ana mekanizmalarından biridir. İntraselüler atıklar ubikuitin-proteozom sistemi ve otofaji yoluyla yıkıma uğramaktadır. İntraselüler olarak yıkılamayan atıklar ise ekstraselüler ortama salınmaktadır. Ekstraselüler alandaki atıklar ise proteazlar, kan beyin bariyeri ve yakın zamanda keşfedilmiş olan glimfatik sistem aracılığıyla beyinden uzaklaştırılmaktadır [136]. Glimfatik sistemin keşfi ile metabolik atıkların beyinden uzaklaştırılması ve buna etki eden faktörler yeniden önem kazanmış ve araştırmaların konusu haline gelmiştir.

Amiloid- β (A β), tau ve α -sin gibi proteinlerin BOS'ta bulunması, beyinden toksik moleküllerin temizlenmesinde BOS'un rolü olduğu düşündürmektedir ve 2012 yılında glimfatik sistem modelinin tanımlanması ile beraber artan kanıtlar nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde glimfatik sistemin önemine ışık tutmaktadır [10].

2.8.1. Alzheimer Hastalığında Glimfatik Sistemin Rolü

Alzheimer hastalığı dünyada en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır ve ortalama yaşam süresinin artması ile ilerleyen yıllarda prevalansının daha yüksek seviyelere çıkması beklenmektedir [137]. AH'nin moleküler patofizyolojisinde A β plaklarının parankim ve serebral damarlar çevresinde ve hiperfosforile tau proteinlerinin intraselüler birikimi yer almaktadır ve A β üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizlik sonucu patolojik birikimler ortaya çıkmaktadır. Ekstraselüler sıvıdaki A β 'nin temizlenmesinde enzimatik yıkım ve hücre alım, kan-beyin bariyerinden (KBB) geçiş ve glimfatik sistem etkili olmaktadır [10, 138]. Hakim görüş KBB'den geçişin hakim temizlenme yolu olduğu yönünde olsa da son zamanlarda glimfatik sistem ile ilgili çalışmalar bu görüşün değişmesine neden olmuştur. AQP4 ifadesi bozulmuş farelerde A β temizlenmesinin %55 oranında azaldığı gösterilmiş olup, kanıtlar çözümler A β 'nin büyük kısmının glimfatik sistem yoluyla beyinden uzaklaştırıldığını göstermektedir [10]. Ayrıca insan çalışmalarında kanser cerrahisi nedeniyle servikal lenf nodları alınan insanlarda derin servikal lenf nodlarında A β -

taşıyan hücreler gösterilmiştir, bu da beyinden A β temizlenmesinde glimfatik sistemin de etkili olduğu kanıtlamaktadır [139].

Geç başlangıçlı AH için en önemli risk faktörü yaşlanmadır [129]. Yaşlanma ile Alzheimer patolojisinde meydana gelen artış, arter duvarındaki pulsatilitenin azalması, perivasküler AQP4 polarizasyonunun kaybı gibi etkilerle glimfatik drenajın bozulması ve A β birikiminin artması için açıklanabilir [96]. Glimfatik sistem ve nörodejeneratif hastalıklar arasında çift yönlü bir ilişki bulunmaktadır. Glimfatik sistem fonksiyonlarında bozulma, beyinde amiloid birikimini artırdığı gibi, AH modeli olan APP/PS1 farelerde daha toksik A β formu olan A β oligomerlerinin birikiminin glimfatik transportu azalttığına gösterilmesi bu çift yönlü ilişkiye kanıt oluşturmaktadır [77].

2.8.2. Parkinson Hastalığında Glimfatik Sistemin Rolü

Alzheimer hastalığına yol açan ekstraselüler amiloid birikimlerinden farklı olarak PH'deki inklüzyonların hücre içinde izlenmesi, nörodejeneratif hastalıklarda glimfatik sistemin incelenmesinde AH'nin daha ön planda tutulmasına yol açmıştır. Ancak kanıtlar α -sin ve patolojik formlarının hücrelerden ekzositoz yoluyla salındığını ve bu ekstraselüler ortama verilen toksik formların diğer hücreler tarafından alınarak α -sin patolojisinin yayılımına neden olduğunu göstermektedir [44, 63]. Bu kanıtlar PH patogenezinde glimfatik sistemin de rol oynadığını düşündürmektedir ve bu konuda yapılan çalışmalar bu düşüncüyü destekler niteliktedir.

Zou ve ark.'nın [46] yaptıkları çalışmada A53T mutant farelerde derin servikal lenf nodu ligasyonu sonucunda substansiya nigrada α -sin birikiminin arttığı gösterilmiştir. Derin servikal lenf nodu ligasyonu, AQP4 polaritesinde bozulmayı, daha yoğun α -sin birikimini, glial aktivasyonu, inflamasyonu ve dopaminerjik hücre kaybını tetiklemektedir. Cui ve ark.'nın [140] çalışmasında ise AQP4 ekspresyonu bozuk farelerde striatuma α -sin PFF enjeksiyonu sonucunda korteks ve striatuma kontrol hayvanlarına göre daha hızlı ve daha fazla patolojik α -sin birikimi olduğu

gösterilmiştir. AQP4 ekspresyonundaki bozulma, α -sin yayılımındaki artışa ek olarak nigral dopaminerjik hücre kaybını da artırmaktadır.

İnsan çalışmalarına baktığımızda ise AQP4 genindeki polimorfizmlerin Parkinson hastalarında değişen oranlardan kognitif yıkım ile ilişkili olabileceği, AQP4 rs162009 polimorfizminin Parkinson hastalarında glimfatik sistem fonksiyonları ve kognitif yıkım için yeni bir genetik prognostik belirteç olabileceği öne sürülmektedir [141]. Ek olarak idiopatik Parkinson hastalarında meningeal lenfatiklerdeki akımın kontrollere göre azalması, bu hastalarda BOS drenajının bozulduğunu göstermektedir [142]. Genişlemiş perivasküler boşlukların perivasküler akımdaki bozulmadan kaynaklandığı ve glimfatik sistemki tıkanmayı yansıttığı düşünülmektedir. Parkinson hastalarında bazal ganglionlarda dilate perivasküler boşluklar sağlıklı kontrollere göre artmış olarak izlenmekte ve bu artış kognitif yıkım ile pozitif korelasyon göstermektedir [117, 143].

Uyku bozuklukları glimfatik sistem disfonksiyonu yapan etkenlerden biridir. Parkinson hastalarında sağlıklı kontrollere göre total uyku süresinde, uyku etkinliğinde, N2 süresinde, REM yüzdesinde azalma; REM latansında, apne-hipopne indeksinde ve periyodik bacak hareketi indesinde artma gibi uyku fizyolojisinde bozulmalar izlenmektedir [144]. Bu verilerden yola çıkarak uyku bozuklukları glimfatik sistem üzerinden Parkinson hastalığı için potasyel bir risk faktörü ve progresyon faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır [145, 146].

2.9. Olası Terapötik Yaklaşımlar

Liu ve ark.'nın çalışmasında, fare modelinde uyku deprivasyonunun AQP4 polaritesini bozarak glimfatik sistemde bozulmaya yol açtığı ve sürekli teta burst stimülasyonu (cTBS) ile uyku deprivasyonu yapılan hayvanlarda AQP4 polarizasyonu normale yakın hale getirerek glimfatik sistem fonksiyonlarında iyileşme olduğu gösterilmiştir [147]. Sürekli teta burst stimülasyonunun ayrıca meningeal lenfatik damarlarda genişleme ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) upregülasyonuna yol açtığı ve bu yolla beyinden makromolekül ve atıkların temizlenmesine katkıda bulunuyor olabileceği gösterilmiştir [147]. Uyku

deprivasyonunun önlenmesi, uyku kalitesinin artırılması ve vücut pozisyonu değişikliği gibi önlemler de glimfatik sistem fonksiyonlarında düzelmeye sağlayacaktır.

Elektroakupunktur AH hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda AH tedavisi için çalışılmakta olan tekniklerden biridir ve Aquaporin-4 kanallarının polaritesini etkileyerek glimfatik sistem fonksiyonlarında düzelmeye yol açıyor olabileceğini gösteren kanıtlar mevcuttur [148]. Glimfatik sistemin ana bileşenlerinden AQP4 kanallarının aktive edilmesi teorik olarak glimfatik sistem fonksiyonlarında iyileşme sağlayacaktır [136]. Bunun yanında arteriyel pulsalliteyi artıran dobutamin, vasküler reaktiviteyi onaran ve perivasküler drenajı artıran silositazol gibi vasküler yapılar üzerine etkili tedavilerin glimfatik sistem fonksiyonlarında düzelmeye yol açması olasıdır.

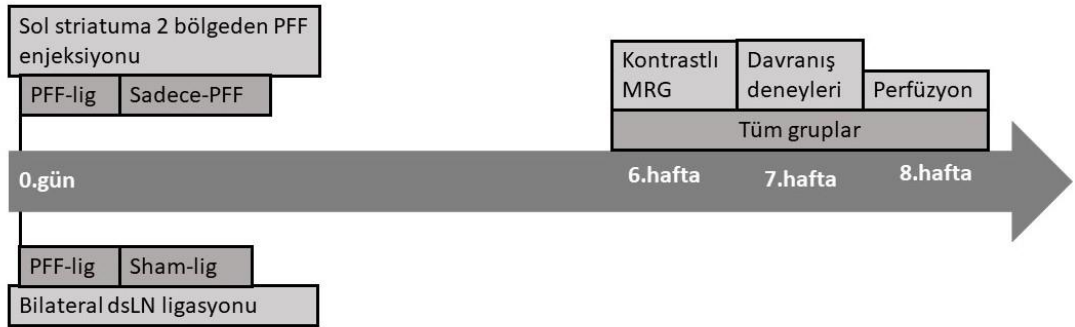
3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada 250-300 gram ağırlığındaki Sprague Dawley tipi erkek sıçanlar kullanıldı. (s=21). Sıçanlar çalışma boyunca sabit nem ve 18-20 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Yiyecek ve içecek sınırlaması yapılmadı. Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni ile yapılmıştır (Toplantı sayısı 2022/01, dosya kayıt numarası 2021/64, karar numarası 2022/01-16)

3.2. Deney Grupları ve Deney Planı

- 1- PFF-lig:** Bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu yapıldıktan sonra unilaterale sol striatuma 2 bölgeden α -sin pre-formed fibril (PFF) enjekte edilen grup (s=5)
- 2- Sadece-PFF:** Bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu yapılmayan, unilaterale sol striatuma 2 bölgeden PFF enjekte edilen grup (s=5)
- 3- Sham-lig:** Bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu yapıldıktan unilaterale sol striatuma 2 bölgeden salin enjekte edilen grup – Sham cerrahi (s=5)
- 4- Naive kontrol:** Derin servikal lenf nodu ligasyonu yapılmayan ve PFF ya da salin enjekte edilmeyen grup (s=6)



Şekil 3.1. Deney planı

3.3. Parkinsonizm Modelinin Oluşturulması

Parkinsonizm modeli oluşturmak amacıyla hayvanlara sol striatuma 2 bölgeden α -sin PFF enjeksiyonu yapıldı. α -sin fibrili 'preformed fibril (PFF)' olarak Kanada'da bulunan Guelph Üniversitesi Ryan Laboratuvarından 4 mg WT α -sin preformed fibril olarak temin edildi. PFF -80 derecede alıkotlanmış şekilde saklandı. Enjeksiyon yapılmadan hemen önce oda havasında eritilerek, Class-2 biyogüvenlik kabininde Omni-Sonic Ruptor 400 sonikasyon cihazı ile literatürdeki sonikasyon önerileri doğrultusunda[149] %30 amplitüdde toplam 60 sn (1 sn on, 1 sn off şeklinde- ısı kontrolü yapabilmek için) sonike edildi.

Denekler Stoelting stereotaksik çerçevesine uygun şekilde yerleştirildikten sonra yarı steril koşullarda skalp temizliği ve takiben orta hat cilt insizyonu yapıldı. Striatuma 2 α -sin preformed fibril enjeksiyonu Sprague-Dawley sıçanlar için belirlenmiş olan koordinatlar [6] (1.Bölge : Anteroposterior +1.6, Mediolateral +2.4, Dorsoventral -4.2 ve 2.Bölge: Anteroposterior -1.4, Mediolateral +0.2, Dorsoventral -2.8 kafa tasından) belirlendikten sonra dura mater görülene kadar kemik doku cerrahi "drill" yardımıyla çıkarıldı. Hamilton şırıngası (5 μ l, 26 gauge), 2 bölgeden belirlenen dorsoventral koordinatlara göre indirildi. Her iki bölgeye 4 μ l/8 μ g sonike edilmiş fibril 0,5 μ l/dakika hızında Hamilton şırıngası ile enjekte edildi. 3. Gruptaki hayvanlara ise aynı teknikle eşit hacimde salin enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyondan sonra şırınga 2 dakika yerinde bırakıldıktan sonra yavaşça yukarı çekilerek beyin dokusundan çıkarıldı. Daha sonra cerrahi suture ile cilt kapatıldı.

3.4. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu

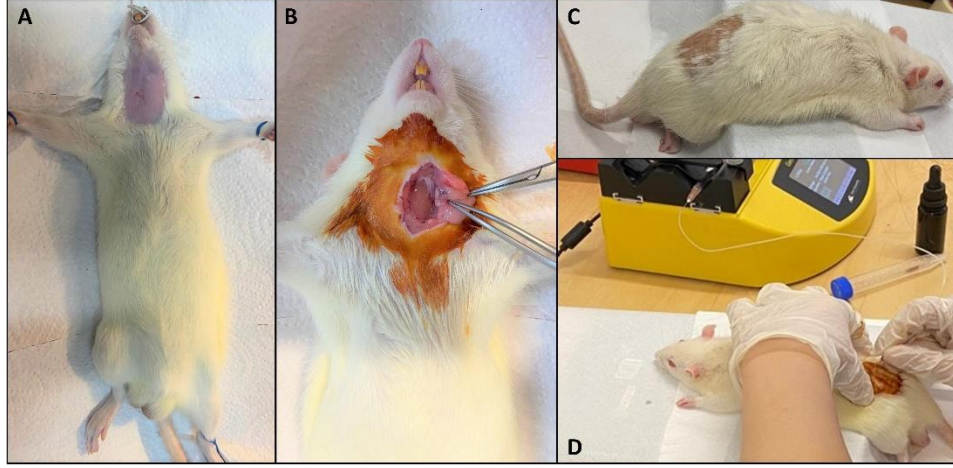
Sıçanlara glimfatik sistem fonksiyonlarının bozulması amacıyla bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu yapıldı. İntraperitoneal (i.p) ketamin (90mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) ile genel anestezi uygulandı. Bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu literatürde tarif edildiği şekilde uygulandı [11]. Hayvanlar supin pozisyonda sabitlenerek boyun bölgesi traş edildi (Şekil 3.2-A). Bölge povidon iyot çözeltisi ile dezenfekte edildikten sonra mandibula altından sternuma uzanan longitudinal kesi yapılarak yağ doku, fasya ve sternokleidomastoid kas ayrıldı ve

bilateral olarak derin servikal lenf nodları ekspozite edilerek (Şekil 3.2-B) efferent damarları 8.0 suture ile bağlandı.

3.5. İntratekal Kontrast Enjeksiyonu ve Manyetik Rezonans Görüntüleme

Manyetik rezonans görüntüleme işlemleri, Bilkent Üniversitesi Aysel Sabuncu Beyin Araştırmaları Merkezi bünyesindeki, UMRAM (Ulusal Manyetik Rezonans Araştırma Merkezi)'da gerçekleştirildi. Hayvanlar ortama alışmaları amacıyla 1 gün önceden UMRAM'a getirildi. Görüntüleme öncesinde intraperitoneal (i.p) ketamin (90mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) ile genel anestezi uygulandı. 3 Tesla MRG cihazında (Magnetom Trio, Siemens Healthcare), sıçan beyni için uyarlanmış tek kanallı baş sargısı kullanılarak görüntüleme yapıldı. 3 boyutlu T1-ağırlıklı MPRAGE sekansı (TE/TR: 3.94/2300 ms, TI: 900 ms; 48 kesit, NEX: 2, görüntü matrisi: 128256, FOV: 50 100 mm², çözünürlük: 0.4 0.4 0.4 mm³) ve 3B T2-ağırlıklı SPACE sekansıdır (TE/TR: 427/6000 ms, TI: 2100 ms; 24 kesit, NEX: 2, görüntü matrisi: 216512, FOV: 76 181 mm², çözünürlük: 0.35 0.35 0.7 mm³) sekansları kullanılarak kontrastsız görüntüler elde edildi.

Kontrastsız görüntüler alındıktan sonra lomber intratekal kontrast madde enjeksiyonu için lomber bölge traş edilerek spinöz proseslerin aralıklarının daha iyi açılması amacıyla hayvanlara pozisyon verildi (Şekil 3.2.-C) Bölge povidon iyot ile dezenfekte edildikten sonra literatürde belirtildiği şekilde 26G iğne ile L5-L6 seviyesinden transkutanöz olarak ponksiyon yapıldı [150] (Şekil 3.2.-D). Kuyrukta seyirme olması ile ponksiyonun başarılı olduğu doğrulanarak dilüe edilmiş 40µl Gadobutrol (Gadovist®, Bayer Schering Pharma AG, Almanya) infüzyon pompası yardımıyla 2 µl/dk hızıyla 20 dakikada enjekte edildi.



Şekil 3.2.Derin servikal lenf nodu ligasyonu ve lomber ponksiyon basamakları A- Bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu için pozisyon verilmesi, B-Derin servikal lenf nodlarının ekspoze edilmesi, C-Lomber intratekal kontrast madde enjeksiyonu için pozisyon verilmesi, D-Kontrast enjeksiyonu

3.6. Motor-davranışsal Deneyler

Tüm hayvanlara bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu ve/veya sol striatum salin/PFF enjeksiyonunda sonraki 7. haftada rotarod, silindir, açık alan motor aktivite ve apomorfin ile indüklenmiş açık alan motor aktivite testleri uygulanmıştır.

3.6.1. Açık Alan Motor Aktivite Testi

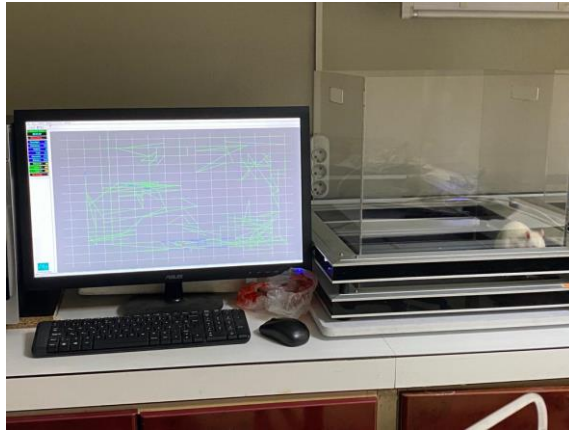
Bu test, hayvanlarda motor engel olup olmadığını ölçmek için kullanılır. Hayvanlar ortama alışmaları için 30 dakika öncesinden testin yapılacağı odaya getirildiler. Yatay ve dikey hareketleri algılamak için 40x40x40 cm³ şeffaf pleksiglas malzemedan yapılmış kare kutular ve kızılötesi sensörlerden oluşan bir sistem kullanıldı (Commat Ltd.). Kafesler bilgisayara bağlanıp ve analiz sırasında hayvanların kafes içerisindeki tüm hareketleri kayıt altına alındı. Toplam hareket (stereotipik: kendi etrafında dönme, koklama, kaşıntı, ambulatuvar: durma ve yeniden başlama ve dikey: arka ekstremitelerde yükselme), yürüme, ayakta durma, ayakta durma süresi ve kat edilen mesafe aynı anda analiz edildi. Kafeste daha fazla vakit geçirdiği bölgeler ve izlediği yol da grafiksel olarak aktarıldı. 30 dakika içinde hayvanların

yatay ve dikey hareketlerdeki değişimler ve kat ettikleri mesafeler incelendi [151] (Şekil 3.3).

3.6.2. Apomorfinle İndüklenmiş Açık Alan Motor Aktivite Testi

Apomorfin selektif olmayan dopamin reseptör agonisti olup striatumda etkisini postsinaptik dopaminerjik reseptörler aracılığıyla gösterir. D1 ve D2 reseptörlerinin stimülasyonu ile hayvanlarda lokomotor aktivitede artış ve stereotipik davranışlar gözlenir [151].

Bu test için, açık alan motor aktivite testinde belirtilen düzenek kullanıldı. Hayvanlara teker teker 0,5 mg/kg dozunda subkütan apomorfin uygulandıktan sonra hayvan test alanına yerleştirildi ve 30 dakika boyunca kayıt alındı.



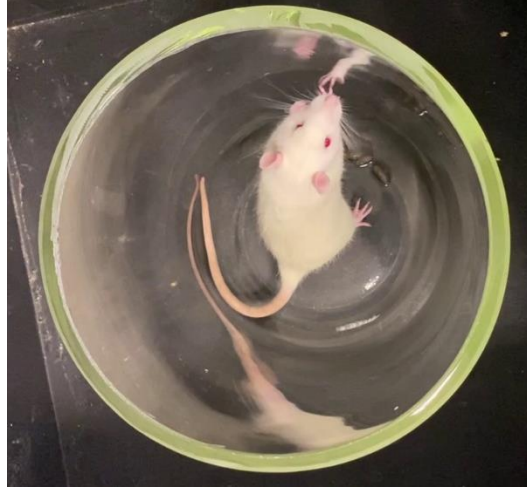
Şekil 3.3. Açık alan motor aktivite kafesleri ve bilgisayar aracılı analiz sistemi

3.6.3. Silindir Testi

Silindir testi hayvanlarda tek taraflı enjeksiyon sonrası oluşan motor asimetriyi değerlendirmek için kullanılır. Motor asimetri, kontralateral ön ayağın silindir çeperine değme sayısı ile ölçülür [152].

Test için 25 cm çapındaki cam silindir kullanıldı. Silindir arkasına uygun açılarla yerleştirilen 3 ayna ile kayıt esnasında silindirin her tarafının görülebilir olması sağlandı. Hayvanlar silindire yerleştirildikten sonra 10 dakika boyunca hayvanların davranışları kayıt altına alındı. Daha sonra izlenen kayıtlarda,

hayvanların silindir çeperine sağ ön ayaklarıyla, sol ön ayaklarıyla ve hem sağ hem sol ön ayaklarıyla aynı anda kaçar defa dokunduğu sayıldı. Her dokunma ayrı ayrı birer dokunma olarak kaydedildi. Sonuçlar ipsilateral (sağ) ve kontralateral (sol) ön ayaklarla çepere dokunma sayısının toplam dokunma sayısına oranının yüzdesi olarak hesaplandı.



Şekil 3.4. Silindir test düzeneği

3.6.4. Rotarod Testi

Rotarod testi kemirgenin belli bir hızda dönen ve dönüş hızı giderek artan bir çubuğun üzerinden düşme latansının ölçüldüğü bir testtir ve motor koordinasyon ve motor öğrenmenin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Motor koordinasyon, farelerin ilk denemedeki düşme latansları karşılaştırılarak; motor öğrenme ise bir farenin ilk denemesi ve takip eden denemelerindeki düşme latansları karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Test için 5 cm çapında ve 40 cm uzunluğundaki dönebilen kolun 40 cm çapındaki yuvarlak plaklarla 4 kompartmana bölündüğü rotarod aleti kullanılmıştır (Commat Ltd.) (Şekil 3.4.). İlk gün alıştırmaya seansı için hayvanlar 4 rpm hızında 1 dakika boyunca roda yerleştirildiler. Deneme 10 dakika arayla her hayvan için 4'er kez tekrarlandı. 2.gün rodun dönüş hızı 4rpm'den 10 rpm'e 1 dakikada hızlanacak şekilde ayarlandı ve yine her hayvan için 10 dakika aralıklarla 4 deneme yapıldı. Test gününde rodun dönüş hızı 4 rpm'den 44

rpm'e 5 dakika içinde hızlandırılarak 10 dakika aralıklarla 4 test yapılarak hayvanların düşme latansı ve düştükleri hız kaydedildi [58].



Şekil 3.5. Rotarod testi cihazı

3.7. Beyinlerin İzole Edilmesi ve Kesit Alınması

Davranış deneyleri tamamlandıktan sonra deney hayvanları intrakardiyak olarak perfüze edilerek beyinleri çıkarıldı. Perfüzyon işlemi için öncelikle yüksek doz kloralhidrat ile derin anestezi sağlandı. Daha sonra intrakardiyak olarak önce heparin çözeltisi ardından %4'lük paraformalehit çözeltisi ile perfüzyon sağlanarak beyin dokusu fikse edildi ve cerrahi olarak çıkarıldı. Çıkarılan beyinler PFA solüsyonunda 24 saat bekletildikten sonra %30 sükröz çözeltisine koyularak +4 derecede saklandı. Sükröz solüsyonunda saklanan dokuların doku kabının tabanına çökmesi beklendikten sonra kesit alma işlemi uygulandı. Kızaklı mikrotom cihazı yardımıyla (Kriyostat-Leica CM 1100) 35 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan beyin kesitleri sıra ile kuyucukları *anti-freeze* çözeltisi ile doldurulan 24'lük *well-plate*lere koyularak -20 derece saklandı.

3.8.İmmunfloresan Boyama, Kullanılan Antikorlar ve Çözeltiler

Anti-freeze solüsyonunda saklanan beyinler önce *anti-freeze* çözeltisinin uzaklaştırılması amacıyla 2 kez 5 dakika süreyle PBS-T (%0.1 triton-X içeren PBS) ile yıkandı. Ardından 1 saat süreyle PBS-T ile sulandırılmış %10 oranında normal keçi

serumu (NGS) ile blokaj yapıldı. Daha sonra dopaminerjik denervasyonun saptanması amacıyla anti-tirozin hidroksilaz (1:1000 oranında), incelenen proteinlerin ifadesinin incelenmesi amacıyla anti-alfa sinüklein (1:1000) ve anti-alfasinüklein phospho-S129 kullanıldı. Primer antikolar ile bir gece inkübe edildi. Kesitler 3 kez 10 dakika süreyle PBS-T ile yıkandıktan sonra 90 dakika boyunca 1:200 oranında sekonder antikor ile inkübe edildi. 2 kez 5'er dakika PBS-t ve 1 kez 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra lamlara yayılan kesitlerin kuruması beklendi. Çekirdek boyası olan Hoechst 33258 ile kapatıldıktan sonra floresan mikroskopta (Nikon Eclipse E600, Ex 450-560 nm), NIS-Elements AR yazılımı aracılığıyla incelendi.

3.8.1. Primer Antikolar

Monoklonal anti-alfa-sinüklein (α -sin): (1:1000 dilüsyon, ab80627, Abcam, Birleşik Krallık). A-sin preformed fibrili enjeksiyonu sonrası α -sin ifadesinin değerlendirilmesi için kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal antikordur. İnsan α -sin proteinine bağlanır. İmmunhistokimyasal boyamalarda ve immunblotlama çalışmalarında kullanılabilir.

Monoklonal anti-alfa-sinüklein (phospho S129): (1:1000 dilüsyon, ab75875, Abcam, Birleşik Krallık). Ser129'dan fosforillenmiş α -sin'i tespit etmek için kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal antikordur. İmmunhistokimyasal boyamalarda ve immunblotlama çalışmalarında kullanılabilir.

Monoklonal anti-tirozin hidroksilaz (TH): (1:1000 dilüsyon, ab75875, Abcam, Birleşik Krallık). Striatum ve substansiya nigrada dopaminerjik hücre ve terminallerinin boyanması ve dopaminerjik denervasyonu tespit etmek amacıyla kullanıldı. Tavşanda üretilmiş monoklonal antikordur. İmmunhistokimyasal boyamalarda ve immunblotlama çalışmalarında kullanılabilir.

3.8.2 Sekonder Antikolar

Primer antikolarla bağlanarak proteinlerin immunfloresan görüntülemeye görünür hale gelmesi için primer antikolarla özgü olan keçide üretilmiş sekonder antikolar kullanıldı. Anti rabbit primer antikolar için *Cyanine Cy2* (1:200 dilüsyon,

111-225-144, Jackson immunoresearch, Birleşik Krallık), anti-mouse antikorlar için *Cyanine Cy3* (1:200 dilüsyon, 115-165-003, Jackson immunoresearch, Birleşik Krallık) kullanıldı.

3.8.3. Kullanılan çözeltiler

<i>Anti-freeze</i> Çözeltisi	<u>1000 ml</u>
Sodyum fosfat monobazik ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13.75 g
Sodyum fosfat dibazik heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	25.75 g
Distile su	400 ml
Etilen glikol	300 ml
Gliserol	300 ml
Paraformaldehit (PFA)	<u>100 ml</u>
Di-natriumhidrojen (Na_2HPO_4)	2.9 g
Natriumdihidrojen (NaH_2PO_4)	0,23 g
Paraformaldehit	4 g
PBS	100 mg
Fosfat tamponu (PBS)	
Fosfat tampon tablet	1 adet
Distile su	100 ml
PBS-T Çözeltisi	
Triton-x	% 0,1
PBS	100 ml
Blocking Çözeltisi	
Normal keçi serumu	% 10
PBS-t	100 ml
Sükroz Çözeltisi	
Sükroz	30 mg
Distile su	100 ml

3.9. MR Görüntülerin Değerlendirilmesi

Elde edilen görüntülerden, ANTs yazılımı kullanılarak (<http://stnava.github.io/ANTs/>) ortak bir şablon oluşturulmuş ve tüm görüntüler bu şablona uzamsal normalize edilmiştir. Şablon uzayındaki görüntüler, sinyal intensitelerini normalize etmek adına her görüntüde beyin dışı kas dokusuna yerleştirilen bir ilgi alanının (ROI) ortalama sinyal intensitesine bölünmüştür. Böylece, her görüntüde kontrast tutulumuna bağlı sinyal artışı tespit edilmiştir.

3.10. İstatiksel Analiz

MRG istatiksel analizi: Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar, genel lineer model kapsamında ve voksel düzeyinde, SPM12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Farklı gruplardan hayvanların 0., 30. dakikada ve 1. saatte alınan kontrast sonrası görüntüleri karşılaştırılmış ve istatistiksel haritalar $p < 0.05$ eşiği kullanarak görüntülenmiştir.

Davranış deneylerinin analizi: Gruplar arası karşılaştırmalar karşılaştırmalarda; gruplar normal dağılım gösterdiğinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılım göstermediğinde ise nonparametrik testlerden olan Kruskal Wallis testi uygulandı. *Post-hoc* test olarak ANOVA'nın ardından *Tukey'in* ya da *Sidak'in* çoklu karşılaştırma testi, Kruskal Wallis'in ardından ise *Dunn'in* çoklu karşılaştırma testleri uygulandı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. MR Görüntüleme Ön Çalışma Bulguları

Literatürde lomber intratekal kontrast madde enjeksiyonu ile glimfatik sistemin incelenmesine yönelik benzer bir çalışma olmadığı için mevcut glimfatik sistem MRG çalışmalarının verilerden yararlanarak yaptığımız ön deneylerde öncelikle lomber yoldan verilecek kontrast madde dozunu optimize etmeye çalıştık. Bu amaçla öncelikle diğer çalışmalarda kullanılan 80µl kontrast miktarı denendi [102]. Ancak bu çalışmalarda kullanılan Gd-DTPA'nın yoğunluğu 0.5mmol/ml iken, bu tez çalışmasında kullanılan gadobutrolün 1.0 mmol/ml yoğunluğunda olması ve bazı hayvanlarda muhtemel nörotoksisiteye yol açarak kuyrukta daha belirgin olmak üzere alt ekstremitelerde kasılma, sıçrama şeklinde nöbet benzeri anormal hareketler şeklinde yan etkilere neden olması üzerine toplam kontrast miktarı 40µl'ye düşürülerek, enjeksiyon hızı 2 µl/dk olarak optimize edildi. Bu düzenleme sonrası nörotoksisite gelişmediği saptandı. Ancak dsLN ligasyonu yapılan 2 hayvanda öncekiler kadar şiddetli olmasa da daha hafif şekilde kuyrukta seyirme ve kasılma izlendi. Bunun ligasyonun neden olduğu kontrast birikimi nedeniyle olabileceği düşünüldü.

Literatürdeki MRG çalışmalarında sisterna magnadan intratekal kontrast madde verildikten sonra kesintisiz şekilde belirli bir zaman diliminde kontrast maddenin beyne yayılımı incelenerek dakika dakika dağılım grafikleri oluşturulmuştur [103, 107]. Ancak çalışmamızda teknik imkanların sınırlı olması nedeniyle dinamik görüntü alınamamıştır. Literatürde sıçanlarda intratekal verilen kontrast maddenin beyinde 1.saatte maksimuma ulaştığının gösterilmesi nedeniyle [153] zaman aralıklarımız kontrast enjeksiyonu bittikten hemen sonrası (5.dakika), 30.dakika ve 1.saat olarak belirlenmiştir. Yaptığımız ön deneylerde beyinde özellikle subaraknoid aralıkta 2.saat görüntülerde gözle görülebilen kontrast kalmamış olması, yine teknik nedenlerden dolayı MRG cihazını kullanım süremizin kısıtlı olması nedeniyle optimum veri alabileceğimizi düşündüğümüz 1.saate kadar görüntü alındı. İnsan çalışmalarında intratekal verilen kontrast 10-15.saatlerde parankimde

maksimuma ulaşmaktadır [111]. Ön deneyler sırasında 12 ve 24.saat gibi daha ileri saatlerde aldığımız görüntülerde kontrastın tamamen temizlendiğini izledik.

4.2. Bilateral Serin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve Fibril Enjeksiyonunun MRG Bulguları Üzerine Etkisi

A-sin PFF ile oluşturulan Parkinson hastalığı sıçan modelinde bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonunun etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla prekontrast görüntüler alındıktan sonra lomber ponksiyon ile intratekal yoldan kontrast madde enjeksiyonunun hemen sonrasında (5-10 dk), 30.dakika ve 1.saatte poskontrast 3D T1-MPRAGE ve 3D T2-SPACE sekans görüntüler alındı. PFF-lig (bilateral dsLN ligasyonu ve fibril enjeksiyonu yapılan) ve sadece-PFF (lenf nodu ligasyonu yapılmadan fibril enjeksiyonu yapılan) karşılaştırılarak fibril modelinde dsLN ligasyonunun glimfatik sistem üzerine etkileri incelendi. Sadece-PFF grubu ile naive kontrollerin karşılaştırılması ile ise PFF ile oluşturulan α -sin patolojisinin glimfatik sistem üzerine etkileri incelendi. Teknik nedenlerden dolayı ligasyon yapılan ancak fibril verilmeyen sham grubu hayvanlara MRG çekilemediği için tez çalışmamızda dsLN ligasyonunun tek başına glimfatik sisteme etkilerini inceleme fırsatımız olmamıştır.

Kontrast maddenin intratekal enjeksiyonunda hemen sonra alınan görüntülerde fibril enjeksiyonunun sinyal intensitesi üzerine sınırlı vokseller dışında, gruplar arası herhangi bir fark göstermediği izlendi (Şekil 4.1). Fibril verilen 2 grubu karşılaştırdığımızda ise dsLN ligasyonu yapılmayan sıçanlarda özellikle neokorteks ve serebellumun dorsalinde yine yaygın olmayarak sınırlı voksellerde, sinyal intensitesinde artış izlendi (Şekil 4.2).

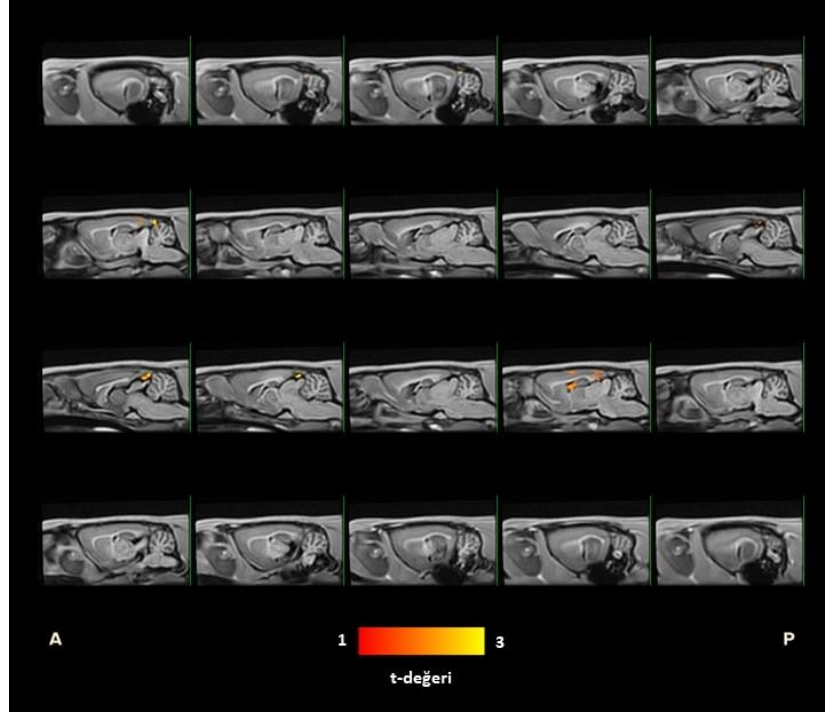
Kontrast enjeksiyonu sonrası 30.dakika görüntüler incelendiğindeyse, fibril gruplarında dsLN ligasyonu yapılmayanlarda (sadece-PFF) ligasyon yapılanlara (PFF-lig) göre serebellum ve neokorteks dorsal kısımlarında kısımlarında sinyal intensitesinin daha yaygın olarak arttığı izlendi (Şekil 4.3). Bu zaman diliminde naive kontrollerde ligasyon yapılmadan fibril verilen gruba göre beyin sapı ventralinde

(özellikle substansiya nigra civarında) kontrast intensitesinin belirgin olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.4).

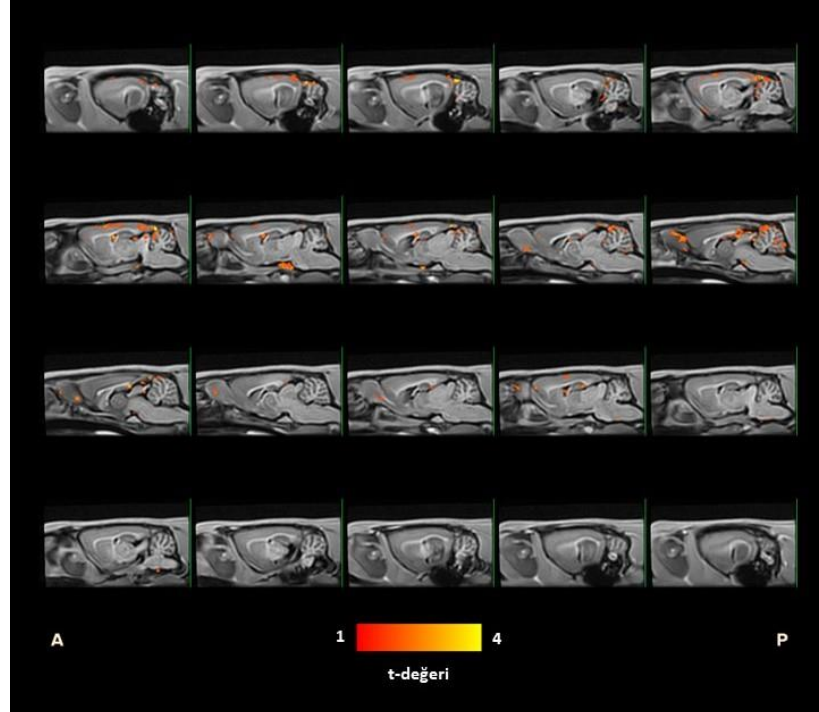
Postkontrast 1.saat görüntülerde fibril verilen sadece-PFF grubunda intensite farkının PFF-lig grubuna göre 30.dakika görüntülerde izlenen bölgelerin çevresinde yayılarak özellikle serebellum da ve posterior beyin bölgelerinde daha da belirginleştiği izlendi (Şekil 4.5.). Naive kontroller ile, sadece-PFF grubu arasında 30.dakikada gözlenen sinyal intensitesi farkının 1.saatte önemli ölçüde azaldığı ve neredeyse kaybolduğu izlendi (Şekil 4.6).

Naive kontroller ile PFF-lig grubu karşılaştırıldığında, post-kontrast ilk görüntülerde beyin sapında daha belirgin olmak üzere beyinde yaygın şekilde dağınık voksellerde intensite artışı izlendi (Şekil 4.7). Postkontrast 30.dakika görüntülerde beyin sapı ventral yüzde çok daha yaygın intensite farkı olduğu izlendi (Şekil 4.8). 1.saat görüntülerde ise serebellum ve beyin sapının orta kısımlarında kontrast intensitesindeki farkın arttığı görüldü (Şekil 4.9)

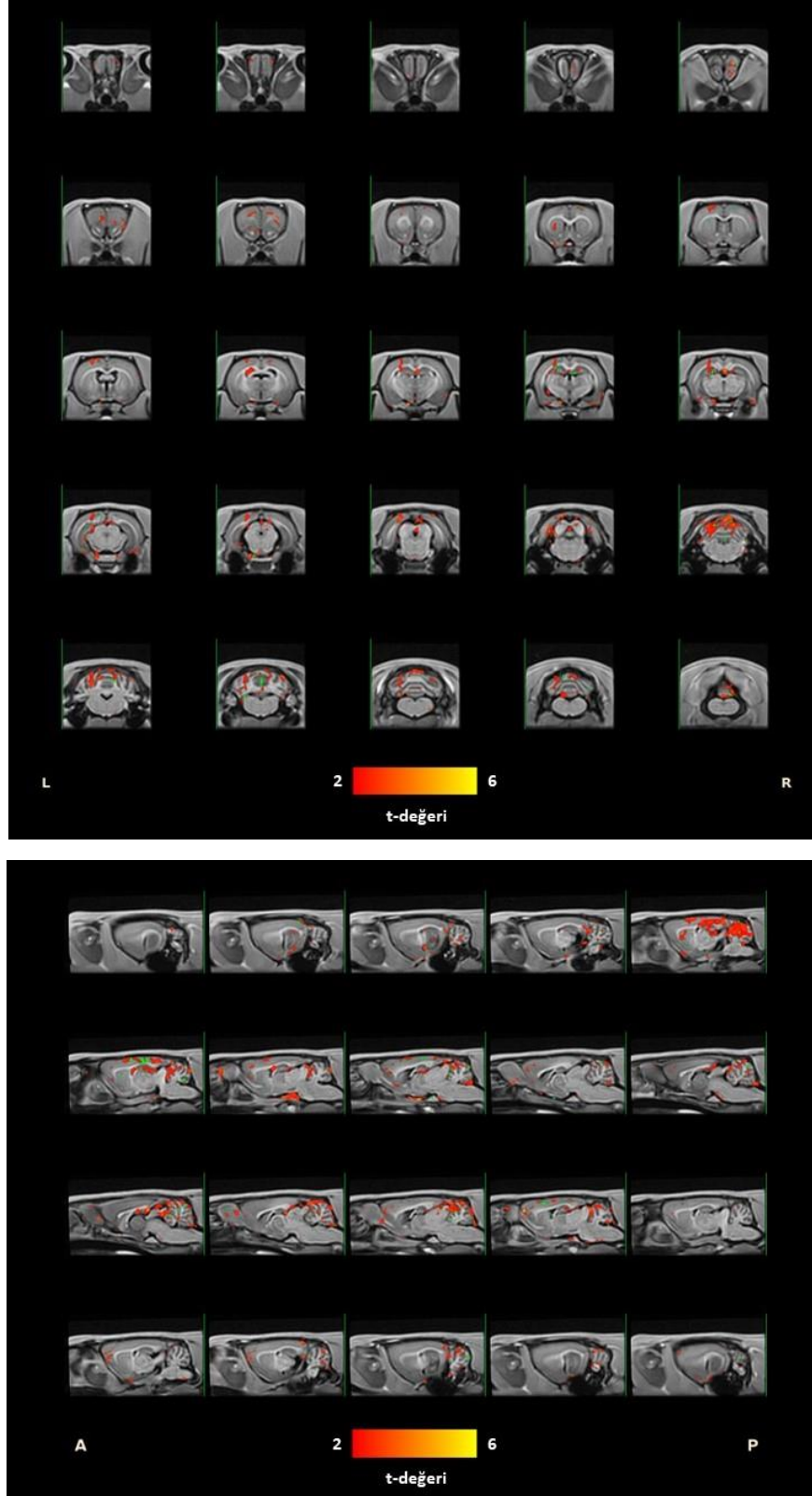
Sonuç olarak, fibril enjeksiyonu özellikle substansiya nigra olmak üzere beyin sapında kontrastın parankime alımında bozukluğa neden olurken, dsLN ligasyonu daha çok serebellum ve neokorteks dorsalinde kontrast alımını – yani glimfatik drenajı bozmaktadır. Çalışmamızda fibril enjeksiyonu sol striatuma yapıldı ancak MRG verilerinde glimfatik sistemdeki bozulmada herhangi bir taraf farkı izlenmedi.



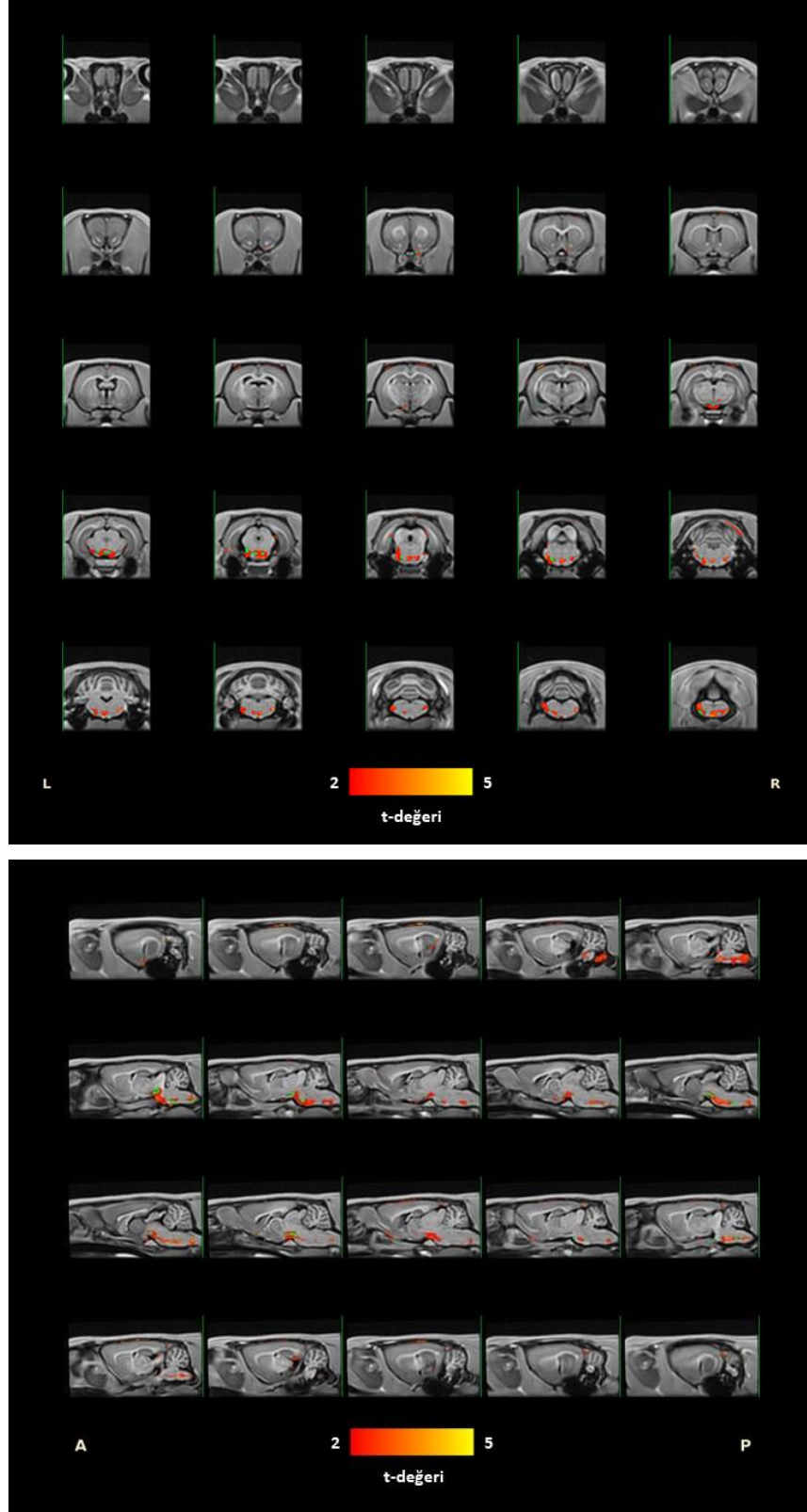
Şekil 4.1. Postkontrast 5.dakika sagittal plan görüntülerde naive kontroller ile fibril enjeksiyonu yapılan grubun karşılaştırılması. Renkli alanlar naive kontrollerde sinyal intensitesinin anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



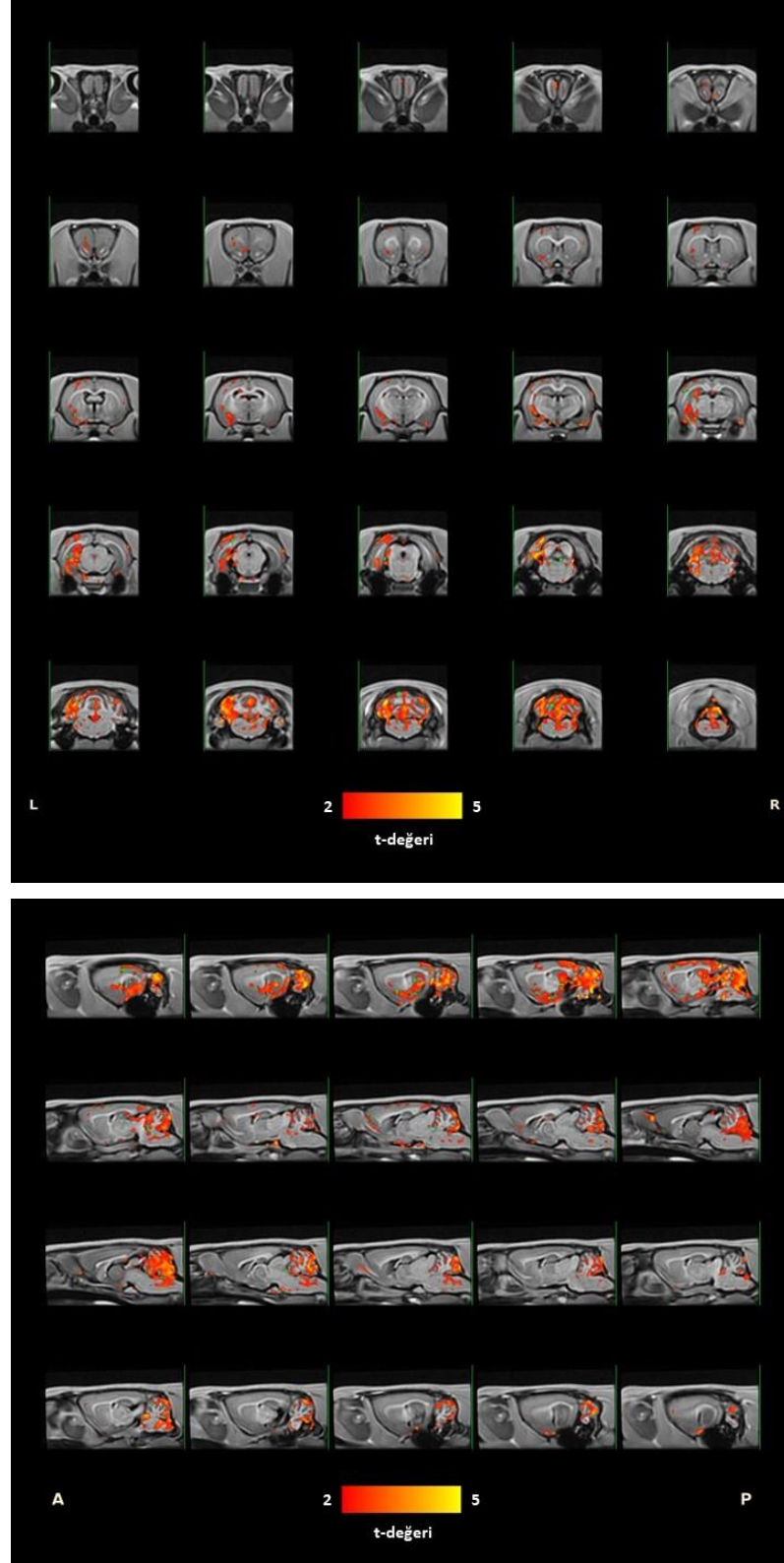
Şekil 4.2. Postkontrast 5.dakika sagittal plan görüntülerde PFF enjeksiyonu yapılan sadece-PFF ve PFF-lig gruplarının karşılaştırılması. Renkli alanlar dsLN ligasyonu yapılmayan grupta sinyal intensitesinin anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



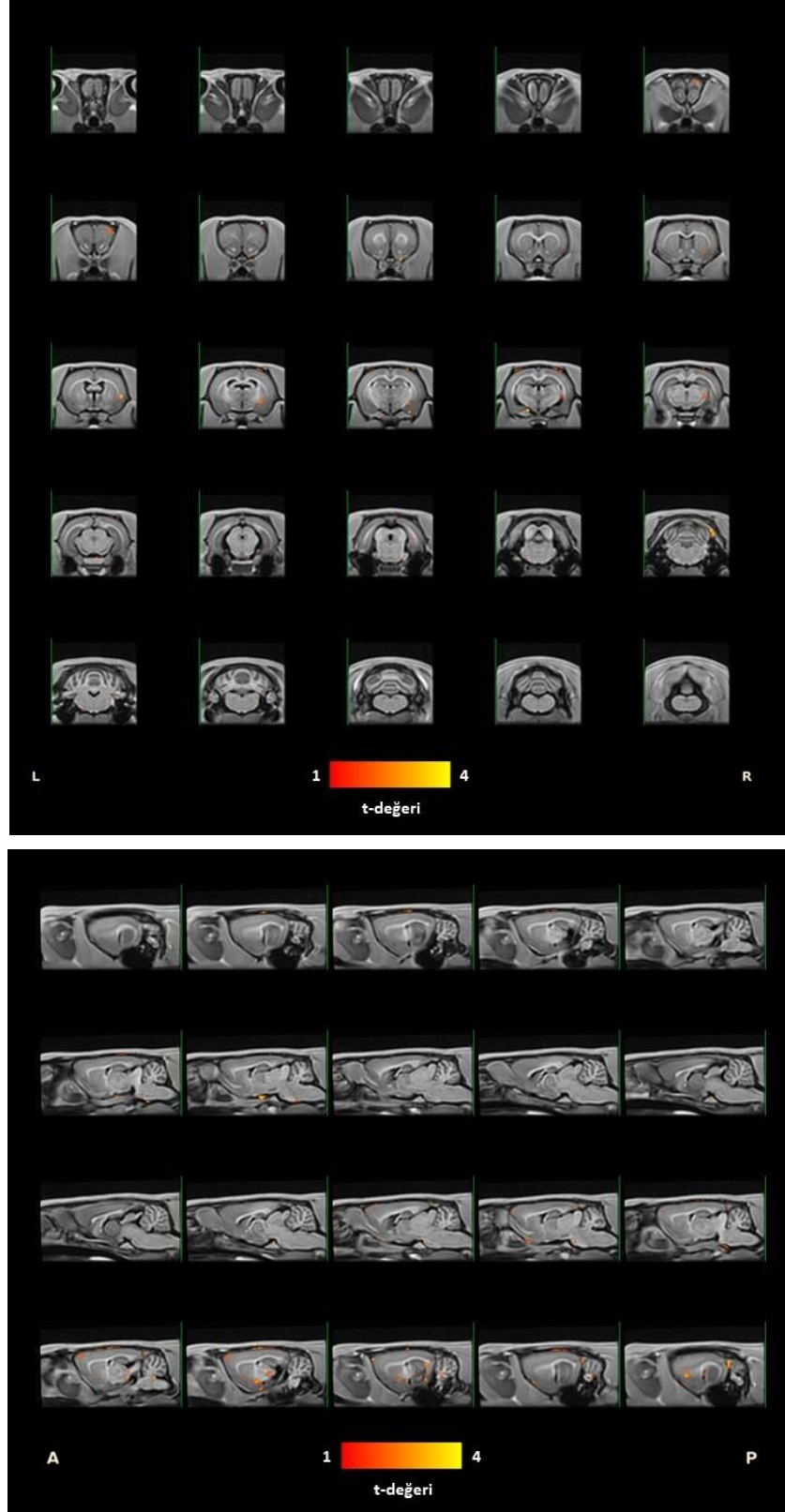
Şekil 4.3. Postkontrast 30.dakika görüntülerde Sadece-PFF ve PFF-lig gruplarının karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar dsLN ligasyonu yapılmayan grupta sinyal intensitesinin anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



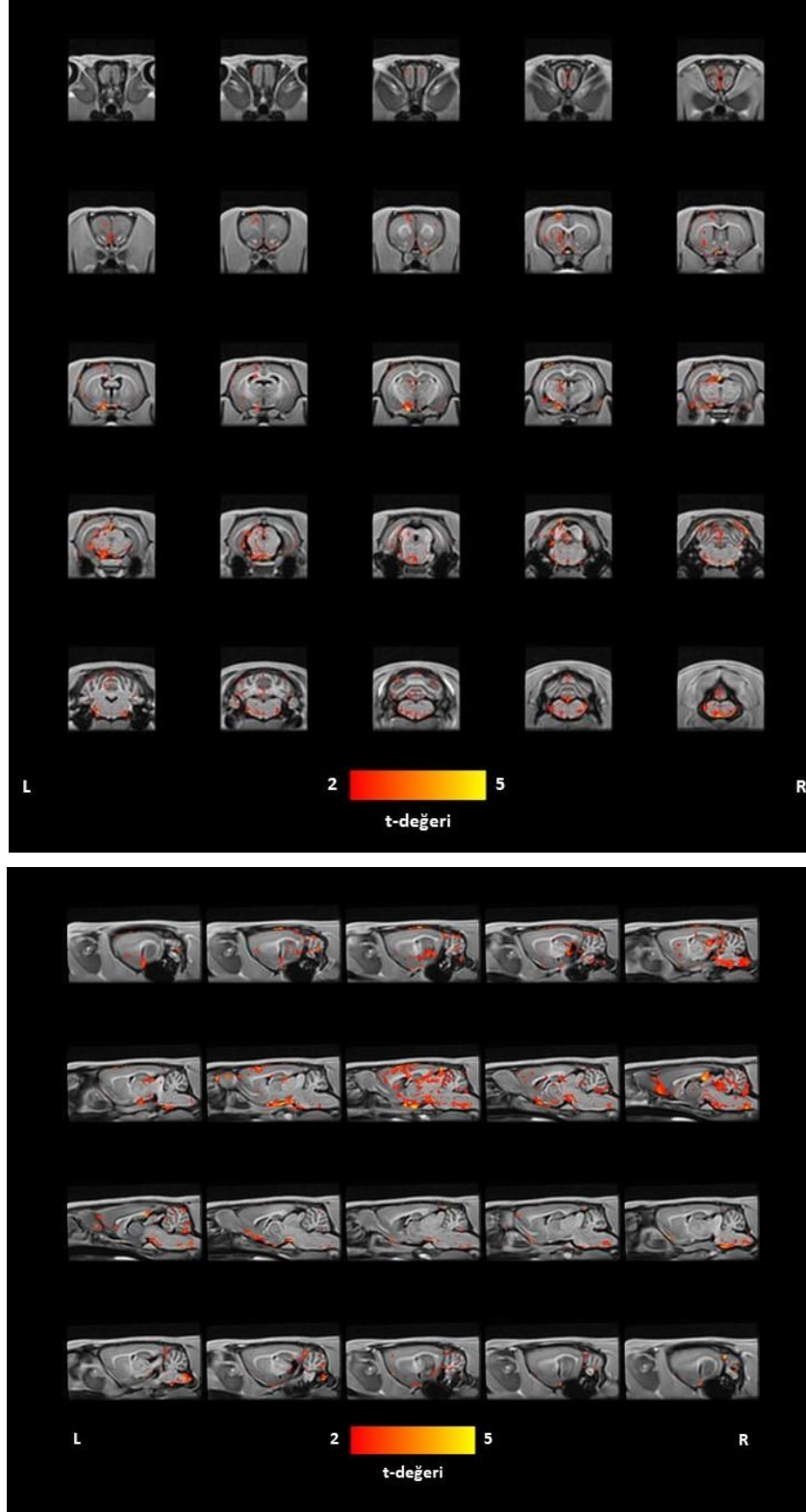
Şekil 4.4. Postkontrast 30.dakika görüntülerde naive kontroller ile sadece-PFF grubunun karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar naive kontrollerde sinyal intensitesinin anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



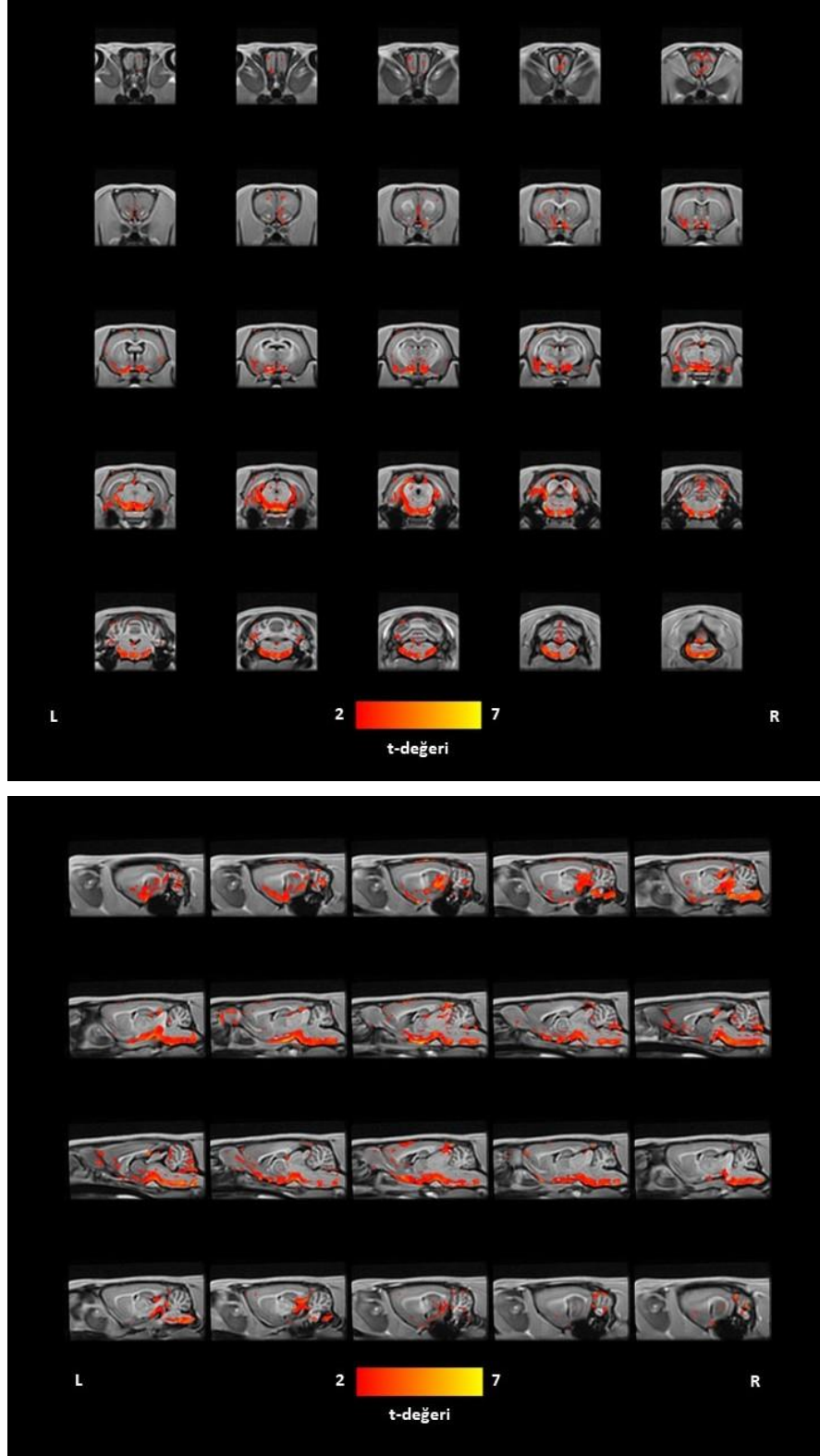
Şekil 4.5. Postkontrast 60.dakika görüntülerde sadece-PFF ve PFF-lig gruplarının karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar dsLN ligasyonu yapılmayan grupta sinyal intensitesinin anlamlı ($p<0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



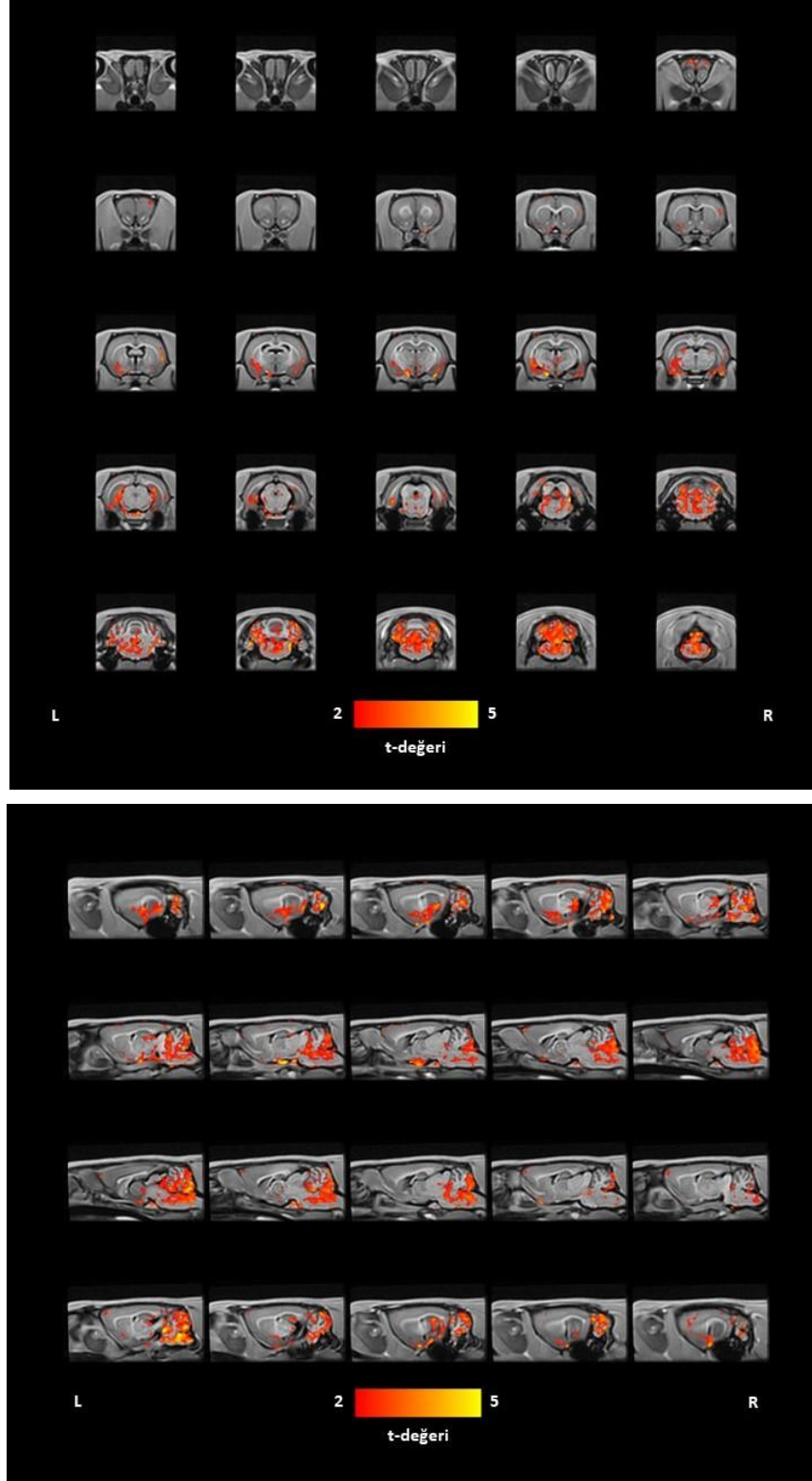
Şekil 4.6. Postkontrast 60.dakika görüntülerde naive kontroller ile sadece-PFF grubunun karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar naive kontrollerde sinyal intensitesinin anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



Şekil 4.7. Postkontrast 5.dakika görüntülerde naive kontroller ile PFF-lig grubunun karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar naive kontrollerde PFF-lig grubuna göre sinyal intensitesinin anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



Şekil 4.8. Postkontrast 30.dakika görüntülerde naive kontroller ile PFF-lig grubunun karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar naive kontrollerde PFF-lig grubuna göre sinyal intensitesinin anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte



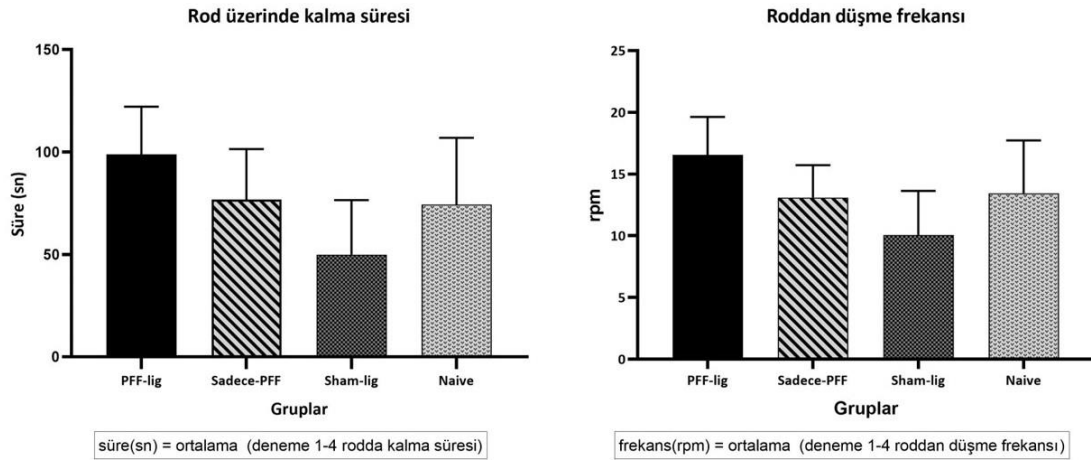
Şekil 4.9. Postkontrast 60.dakika görüntülerde naive kontroller ile PFF-lig grubunun karşılaştırılması, koronal (*üst*) ve sagittal (*alt*) kesitler. Renkli alanlar naive kontrollerde PFF-lig grubuna göre sinyal intensitesinin anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksek olduğu vokselleri temsil etmekte.

4.3. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve A-sin Fibril Enjeksiyonunun Motor Öğrenme ve Koordinasyon Üzerine Etkisi

Tüm hayvanlarda bilateral dsLN ligasyonu ve α -sin PFF enjeksiyonunun motor öğrenme ve koordinasyon üzerine etkileri 7.haftada yapılan rotarod testi ile değerlendirildi (Şekil 4.10).

Ortalama rodta kalma süresi (4 denemenin ortalaması alındı); PFF-lig grubunda 98,9 sn, sadece-PFF grubunda 76,85 sn, sham-lig grubunda 49,9, naive kontrollerde ise 74,3 olarak saptandı. Ortalama rodta kalma süresi (4 denemenin ortalaması) gruplar arasında benzer bulundu ($p > 0.05$).

Roddan düşülen hızların ortalaması; PFF-lig grubunda 16,5 rpm, sadece-PFF grubunda 13,1 rpm, sham-lig grubunda 10,1 rpm, naive kontrol grubunda ise 13,5 rpm olarak saptandı. Gruplar arasında roddan düşme hızında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p > 0.05$).

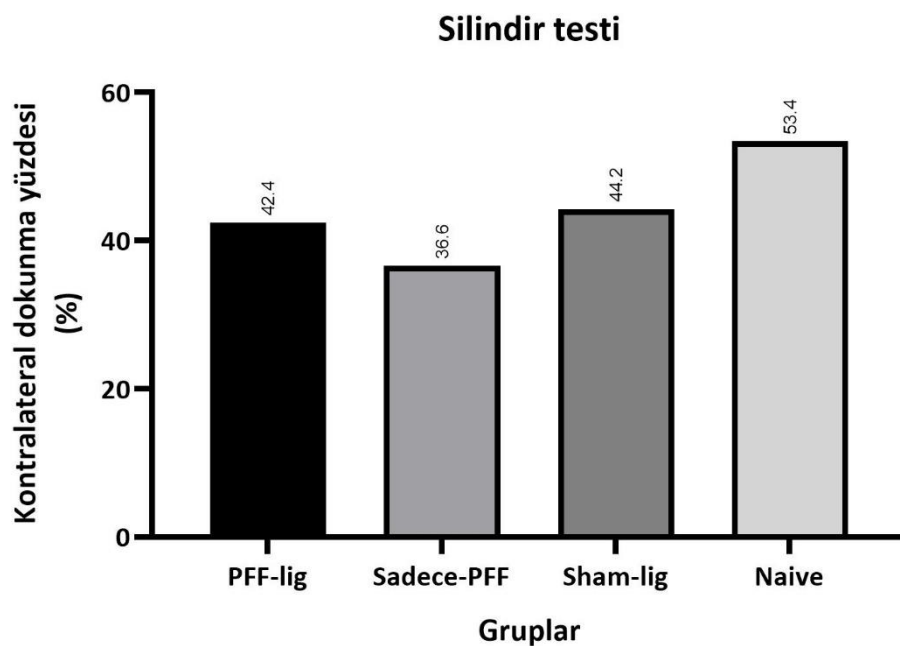


Şekil 4.10. Rotarod testi; rod üzerine ortalama kalma süresi (*solda*), roddan düşme frekansı (*sağda*). Veriler Ort \pm SD olarak ifade edilmiştir. $n_{\text{PFF-lig}}=5$, $n_{\text{sadece-PFF}}=5$, $n_{\text{sham-lig}}=5$, $n_{\text{naive}}=6$. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Turkey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.4. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve A-sin Fibril Enjeksiyonunun Ekstremitte Asimetrisi Üzerine Etkisi

Unilateral α -sin PFF enjeksiyonunun ve bilateral dsLN ligasyonuna bağlı ön ayak asimetrisi gelişip gelişmediğinin değerlendirilmesi amacıyla 7.haftada silindir

testi uygulandı (Şekil 4.11). Lezyon tarafının tersi (kontralateral) ön ayak ile silindire dokunma yüzdesi gruplar arasında karşılaştırıldı. Naive kontrollerde beklendiği gibi kontralateral dokunma yüzdesi %50 civarındayken (%53,4), PFF-lig grubunda %42,4, sadece-PFF grubunda %36,6, sham-lig grubunda ise %44,2 olarak saptandı. Tüm gruplarda naive kontrollere göre kontralateral dokunma yüzdesinde azalma izlendi. Ancak yalnızca naive kontroller ile sadece-PFF grubunun karşılaştırılmasında $p=0,05$ olarak saptandı. Gruplar arasındaki diğer karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlı fark gösterilemedi ($p>0.05$).



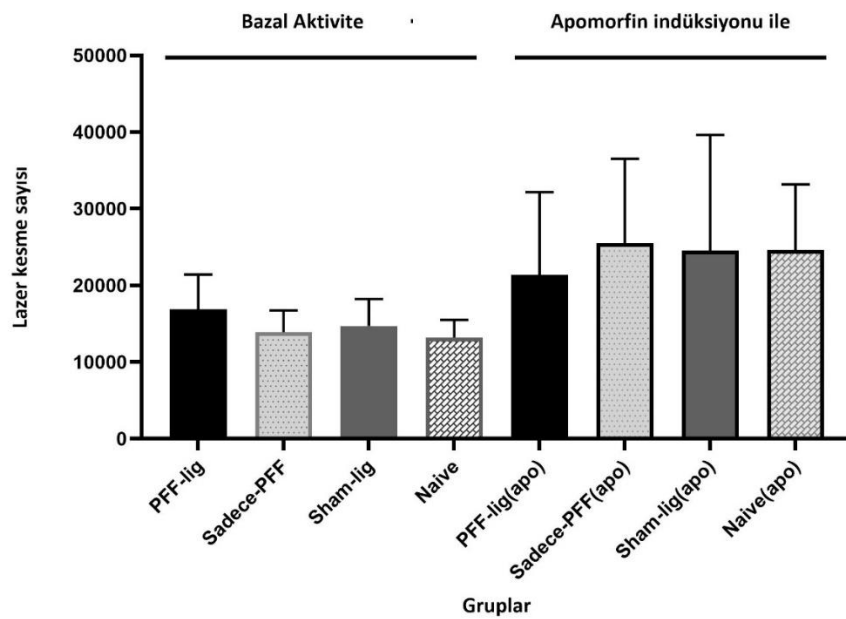
Şekil 4.11. Silindir testi, kontralateral ön ayak dokunma yüzdelерinin karşılaştırılması

4.5. Bilateral Derin Servikal Lenf Nodu Ligasyonu ve A-sin Fibril Enjeksiyonunun Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

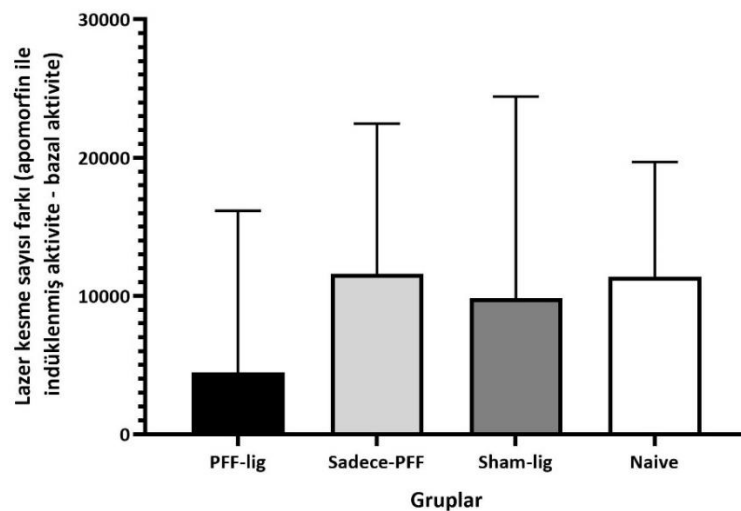
Bilateral dsLN ligasyonu ve unilateral striatuma α -sin PFF enjeksiyonunun motor fonksiyonlar üzerindeki etkisi 7.haftada açık alan lokomotor aktivite testi ve apomorfin ile indüklenen açık alan lokomotor aktivite testi ile değerlendirildi (Şekil 4.12). 30 dakika boyunca bazal aktivite kaydedildikten sonra s.c. apomorfin (0.5mg/kg) enjekte edilerek aktivite kaydı yapıldı. Bazal hareket açısından gruplar

arasında fark izlenmedi. Tüm gruplarda apomorfin enjeksiyonu sonrası bazal aktivitede artış izlenmekle birlikte bu artış açısından gruplar arasında fark izlenmedi. Apomorfin ile indüklenen aktiviteden bazal aktivitenin çıkarılmasıyla değerlendirilen fark da gruplar arasında benzerdi.

Açık alan motor aktivite testi



Açık alan motor aktivite testi

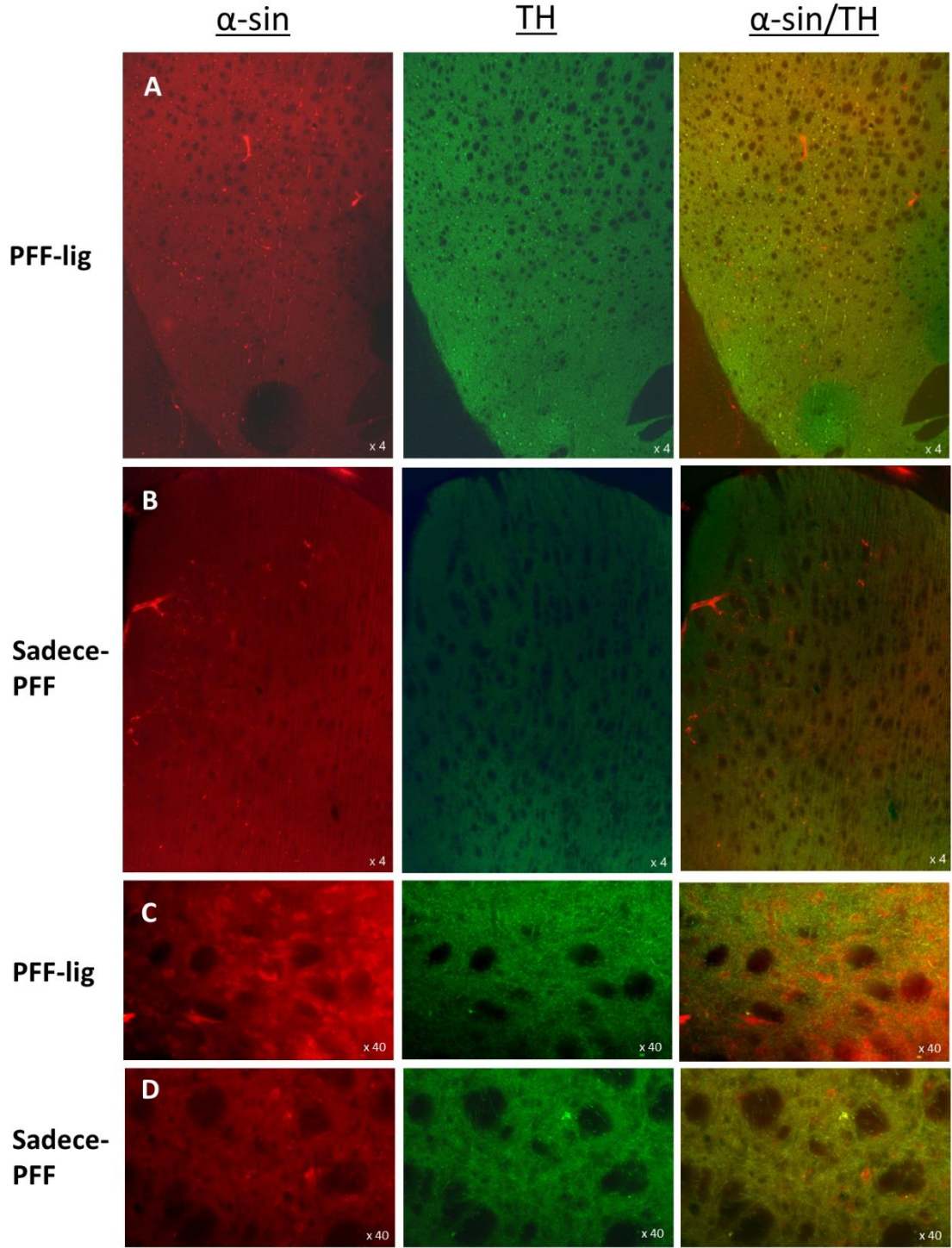


Şekil 4.12. Açık alan motor aktivite testinde bazal ve apomorfin enjeksiyonu sonrası horizontal aktivitenin gösterimi (*üstte*), apomorfin indüksiyonu sonrası bazal aktiviteye göre hareketlilikte meydana gelen artışın gösterilmesi (*altta*). Gruplar

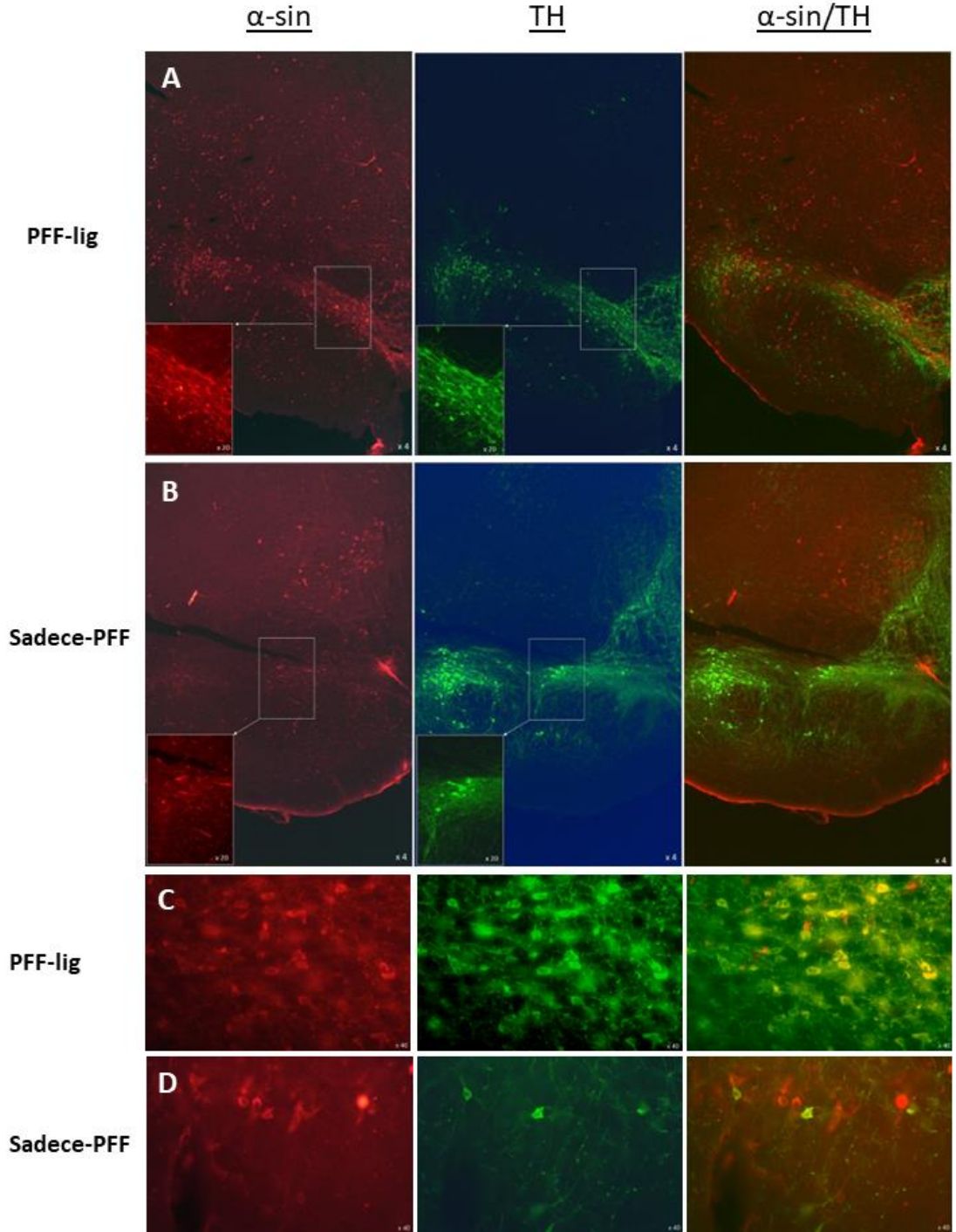
arasında bazal aktivite ve apomorfin ile indüklenen aktivite arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$)

4.6. İmmunofloresan Görüntüleme ile Tirozin Hidroksilaz ve Alfa-sinüklein İfadelerinin Striatum ve Sustansiya Nigrada Değerlendirilmesi

Striatuma unilateral α -sin PFF enjeksiyonu ve bilateral dsLN ligasyonu sonrasında striatum ve substansiya nigra α -sin patolojisinin şiddetinin değerlendirilmesi, α -sin ifadesinin gösterilmesi amacıyla anti- α -sin ve dopaminerjik hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi amacıyla anti-tirozin hidroksilaz immünohistokimyasal işaretlemeleri yapıldı (Şekil 4.13 ve 4.14). A-sin PFF enjeksiyonu yapılan tüm hayvanlarda α -sin patolojisinin olduğu bu deneyler ile doğrulandı. A-sin ile eş zamanlı TH işaretlemesi de yapılarak, dopaminerjik nöronların α -sin patolojisinden etkilenme durumu da araştırıldı. PFF-lig grubunda sadece-PFF grubu ile karşılaştırıldığında, özellikle substansiya nigra α -sin ifadesinin daha fazla olduğu izlendi (Şekil 4.14), ancak herhangi bir kantitatif değerlendirme yapılmadı. TH işaretlemesi ile substansiya nigra pars kompaktada yer yer dopaminerjik hücre yoğunluğunun karşı tarafa göre azaldığı izlenmekle birlikte kantitatif bir değerlendirme ve gruplar arası karşılaştırma yapılmadı. Tez çalışması süresindeki kısıtlılık ve bazı teknik aksaklıklar nedeniyle yalnızca immunofloresan boyama yapılabildi. Takip eden dönemde dopaminerjik kaybın ve α -sin patolojisinin şiddet ve dağılımının kantitatif olarak da incelenmesi planlandı.



Şekil 4.13. İmmunfloresan mikroskopide striatumda α -sin, TH boyamaları ve α -sin/TH üst üste getirildiği görüntüler. x4 büyütme ile alınan görüntüler (A ve B), x 40 büyütme ile alınan görüntüler (C ve D).



Şekil 4.14. İmmunofloresan mikroskopide substansiya nigrada α -sin, TH boyamaları ve α -sin/TH üst üste getirildiği görüntüler. x 4 büyütme içinde hücre yoğunluğunun fazla olduğu alanda x20 büyütmeyle alınan görüntüler yerleştirilmiştir (A ve B). α -sin agregatlarının yoğun olduğu bölgelerde x40 büyütme ile alınan görüntüler (C ve D).

5.TARTIŞMA

Parkinson hastalığı patofizyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda özellikle son 10 yılda yanlış katlanmış α -sin proteininin prion benzeri yayılımı ve hücreler arasında aktararak endojen proteinin agregasyonunu indüklemesi üzerine vurgu yapılmaktadır [7]. Daha önce yalnızca hücre içinde patolojiye neden olduğu düşünülen α -sin agregatlarının hücrelerden salınabildiği ve ekstraselüler ortamdaki α -sin'in tohumlanıp sağlıklı hücrelere alınarak normal proteinin agregasyonunu kolaylaştırdığı ve patolojinin yayılımına etki ettiğinin gösterilmesi ekstraselüler α -sin'in önem kazanmasına neden olmuştur [38]. Ekstraselüler α -sin temizlenmesindeki mekanizmalar metalloproteinazlar gibi ekstraselüler proteazlar yoluyla temizlenme ya da nöronlar, astrositler ve mikroglialar tarafından alınarak hücre içinde yıkılması şeklindedir [44]. Son yıllarda makromoleküllerin ekstraselüler ortamdaki temizlenmesinde görev alan bir diğer yol olarak glimfatik sistem modeli öne sürülmüştür. Bu sistemin amiloid beta'nın hücre dışı bir protein olması nedeniyle Alzheimer hastalığındaki rolü birçok hayvan çalışmasında ile gösterilmiş olsa da [10, 94] Parkinson hastalığındaki rolüne ışık tutan sınırlı sayıda hayvan çalışması mevcuttur [46, 140, 154].

PFF modelinde eksojen yoldan verilen fibriller α -sin proteini internalize olarak endojen α -sin ile birleşip modifikasyona uğrayarak Lewy cisimciklerine benzer inklüzyonlar oluşturmaktadır [63]. Bu çalışmada ekstraselüler ortamda bulunan α -sin ve patolojik formlarının hücreler arası aktararak PH patofizyolojisine katkıda bulunduğu ve glimfatik drenajın bozulmasından etkilendiği ayrıca α -sin patolojisinin de çeşitli mekanizmalarla glimfatik sistemde bozulmaya yol açtığı hipotezi üzerinden yola çıkıldı. Glimfatik sistem aracılığıyla intestisyumdan temizlenen makromoleküller yeniden BOS'a karışarak buradan meningeal lenfatiklere ve daha sonra dsLN'lere direne olmaktadır. Çalışmamız da striatuma fibril enjeksiyonu öncesinde bilateral dsLN lenfatik damarları bağlanarak glimfatik sistem fonksiyonlarında bozulma oluşturulması amaçlandı. α -sin fibrili ile oluşturulan PH modelinde derin servikal lenf nodu ligasyonunun ve ligasyon olmaksızın tek başına α -sin fibril patolojisinin glimfatik sistem üzerine etkileri, intratekal yoldan verilen paramanyetik kontrast

maddenin beyin parankimine dağılımının MRG ile incelenmesi yoluyla değerlendirildi. dsLN ligasyonu yapılan hayvanlarda kontrast enjeksiyonu sonrası 30.dk ve 1.saatte kontrast maddenin beyin parankimine geçişinde anlamlı azalma izlendi. dsLN ligasyonu kadar belirgin etki yaratmasa da striatuma α -sin fibrili enjeksiyonunun da postkontrast 30.dakika görüntülerde kontrast maddenin beyin parankimine dağılımında azalmaya neden olduğu izlendi. Kontrast dağılımındaki azalmanın özellikle substansiya nigra ve çevresinde yoğun izlenmesi, bu bölgede PFF enjeksiyonunun yarattığı nöroinflamasyonun [67] glimfatik sistemde bozulmaya yol açması nedeniyle olabilir. Takip eden dönemde mikrogial aktivasyon belirteçleri ile immunhistokimyasal deneyler yapılması ve bu nöroinflamasyonun incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda fibril enjeksiyonu striatuma sol taraftan unilateral olarak yapılmıştır, ancak MRG'de kontrast dağılımında herhangi bir taraf farkı izlenmemiştir. Bu durum unilateral verilen α -sin PFF'nin çok hızlı bir şekilde bilateral patolojiye neden olmasının bir sonucu olabilir [64]. Sadece-PFF grubunda kontrast verildikten sonra 30.dakikada oluşan intensite farkı 1.saatte gösterilememiştir. Bu durum fibril patolojisinin glimfatik sistem üzerindeki etkisinin kısıtlı olması ve kontrast parankime girdikçe bu etkinin ortadan kaybolması ile açıklanabilir.

PFF-lig grubunda ligasyonun etkisi karşılaştırıldığında, ligasyon yapılmayan grupta özellikle serebellum ve neokortekste beyin dorsal yüzünde kontrast maddenin beyin parankimine daha az geçtiği izlendi. Çalışmamızdaki teknik sorunlar ve zaman kısıtlaması nedeniyle, ligasyonun fibril olmadan tek başına etkileri incelenememiştir. Bu amaçla fibril enjeksiyonu yapılmadan yalnızca bilateral dsLN ligasyonu uygulaması ilerleyen dönemde gerçekleştirilecektir.

Naive kontroller ile dsLN ligasyonu yapılan ve fibril enjekte edilen grup karşılaştırıldığında, hem fibril enjeksiyonunun etkisine benzer bazal ganglionlar ve ventral bölgede, hem de ligasyonun etkisi olduğunu düşündüğümüz serebellum ve neokortekste kontrast intensitesinde belirgin değişiklik saptanmıştır.

Hayvan çalışmalarında intratekal verilen kontrast madde yoğunluğunun beyin parankiminde ortalama 1.saatte maksimuma ulaştığının gösterilmesi nedeniyle [153] görüntüler kontrast verilmesinden hemen sonra, 30. dakikada ve 1.

saatte alındı. Literatürde glimfatik sistemin MRG ile incelenmesi iskemik inme [107], diyabetes mellitus [14, 108], travmatik beyin hasarı [109] gibi farklı modellerde incelenmiştir. Ancak Parkinson modelinde glimfatik sistem ya da derin servikal lenf nodu ligasyonunun etkilerinin MRG ile incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durum çalışmamızın özgünlüğü olmakla beraber MRG bulgularımızı destekleyecek verilerin olmaması yönüyle de dezavantajlıdır. Literatürdeki PH hayvan modellerinde glimfatik sistemin incelendiği çalışmalarda görüntüleme, floresan işaretleyici kullanılarak ex-vivo olarak yapılmıştır [46]. Glimfatik sistemin MRG ile görüntülenmesi in-vivo incelemeye olanak sağlaması, tüm beynin incelenebilmesi ve dinamik bir görüntü elde edilebilmesi yönünden avantajlıdır.

Literatürde rodentler üzerinde yapılan glimfatik sistem MRG çalışmalarında intratekal kontrast maddenin verilme yolu olarak sisterna magna [14, 102, 103] yada intraventriküler [104] yol seçilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar glimfatik sistem görüntülenmesi için intratekal işaretleyici verilme yolu olarak lomber intratekal yolun kullanılabilirliğini de göstermektedir [105]. Ancak bunun MRG için paramanyetik kontrast madde verilme yolu olarak kullanıldığı bir çalışma henüz mevcut değildir. Iliiff ve ark.'nın çalışmasında da sisterna magna enjeksiyonunun uzun sürmesi nedeniyle tek seferlik lomber intratekal yolun tercih edilebileceği tartışılmıştır [102].

Çalışmamızda, kolay ve hızlı uygulanabilir olması, stereotaksiye ihtiyaç duyulmaması ve hayvanlara ek cerrahi işlem gerektirmemesi ayrıca cildin açılmaması nedeniyle daha az travmatik olması gibi avantajları nedeniyle lomber transkutanöz intratekal yol tercih edilmiştir. Lomber transkutanöz yolun kullanılması insan çalışmalarına benzerliği nedeniyle de değerlidir. İnsanlarda enjeksiyon sonrası kontrast madde 10.dakikada sisterna magnaya ulaşmaktadır, ancak hastalar arasında farklılıklar izlenmektedir [13]. Hayvanlarda da kontrast maddenin spinal geçiş zamanının optimize edildiği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Gadolinum bazlı kontrast maddelerin intratekal kullanımı hem insanlarda hem hayvanlarda güvenli görülmektedir. Ancak insan çalışmalarında nadir olarak yüksek dozlara bağlı nöbet, bilinç değişikliği, ataksi, myoklonik sızramalar, kas tonusunda artış gibi nörotoksisite belirtileri izlenebilmektedir [155]. Literatürde hayvan çalışmalarında benzer bir

toksiteden bahsedilmemektedir ancak çalışmamızda dsLN ligasyonu yapılan 2 hayvanda kuyrukta kasılma ve istemsiz atımlar şeklinde nörotoksikite belirtileri izlendi. Bu hayvanlarda ligasyon sonucunda parankime alınamayan kontrast maddenin subaraknoid aralıkta toksik düzeye ulaşarak bu semptomlara yol açmış olması olasıdır.

Glimfatik sistem görüntülemesi için kullanılacak kontrast maddenin paravasküler alandan beyin parankimine alınabilmesi için düşük molekül ağırlığına sahip olması gerekmektedir [102]. Çalışmamızda kontrast madde olarak molekül ağırlığı 604.72 gr/mol (Da) olan [156] gadobutrol kullandık. Glimfatik sistem hayvan modellerinde sıklıkla kullanılan gadopentetik asit (Gd-DTPA) 'in molekül ağırlığı 938 Da'dur [102]. İnsan çalışmalarında sıklıkla gadobutrol kullanılması [13], Gd-DTPA'nın 0.5 mmol/ml konsantrasyonuna karşın gadobutrol 1mmol/ml konsantrasyonda olması, daha düşük dozlarla kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Literatürdeki çalışmalarda intrakraniyal basıncın artırılmadan glimfatik sistem fonksiyonlarının korunmasını sağlamak amacıyla 1.6µl /dk infuzyon hızı ve toplam 80µl Gd-DTPA tercih edilmiştir [14, 102, 103]. Ancak bazı çalışmalarda 2µl/dk infuzyon hızı kullanıldığında da fizyolojik BOS akım yönünü değiştirmedeği gösterilmiştir [107, 122]. Bu verilere dayanarak çalışmamızda 2µl/dk hız ile toplam 40 µl gadobutrol enjekte edilmiştir.

Çalışmalarda sıçan striatumuna PFF enjeksiyonu sonrasındaki 4 ila 24 hafta arasındaki patolojik α -sin birikimleri ve dopaminerjik hücre kaybı incelenmiştir [6, 61, 66, 67]. Dördüncü haftadan itibaren SN_{pc}'de fosforile α -sin birikimleri izlenmeye başlamaktadır [6]. Ancak dopaminerjik hücrelerinde dejenerasyon -tirozin hidroksilaz (TH) ifadesinde azalma ise 12-16. haftalarda gerçekleşmektedir [61, 66, 67]. Çalışmamızda sıçanlar α -sin PFF enjeksiyonu sonrasında 8 hafta boyunca izlendikten sonra perfüze edilmiştir. Bu çalışmada, dsLN ligasyonu ile bozulan glimfatik drenajın α -sin patolojisini daha şiddetli hale getireceği ve yayılımını artıracak hipotezinden yola çıkıldı. İmmunohistokimyasal işaretleme ile α -sin PFF enjeksiyonu yapılan tüm hayvanlarda α -sin patolojisinin oluştuğu doğrulandı. PFF-lig grubunda sadece-PFF grubu ile karşılaştırıldığında, özellikle substansiya nigrada α -

sin ifadesinin daha fazla olduğu izlendi. TH işaretlemesi ile substansiya nigra pars kompaktada yer yer dopaminerjik hücre yoğunluğunun karşı tarafa göre azaldığı izlendi. Takip eden dönemde α -sin ifadesinin miktarı ve dağılımı, fosforile α -sin boyaması ile patojenik α -sin'in gösterilmesi, TH boyamasında hücre sayımı yapılarak dopaminerjik hücre kaybının değerlendirilmesi, thioflavin S boyaması ile oluşan birikimlerin gerçekten agregat olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlandı. Ayrıca ilerleyen dönemde mikroglial belirteçler ile glimfatik sistemin ve α -sin PFF enjeksiyonunun nöroinflamasyon üzerine etkilerinin ve AQP4 boyaması ile polarizasyonuna etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Motor davranış deneyleri PH hayvan modellerinde oluşturulmak istenen motor defisit değerlendirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Lokomotor aktivite testi ile hayvanların genel motor performansı test edilmektedir. Apomorfin enjeksiyonu ile dopaminerjik denervasyonu olan hayvanlarda, normalde apomorfin ile indüklenebilen hareket artışında çok daha fazla hareket artışı meydana gelmektedir. Bu durum dopamin hipersensitivitesine bağlı gelişmektedir. Çalışmamızda dopaminerjik denervasyon süpersensitivitesi olup olmadığının test edilmesi amacıyla apomorfin ile indüklenen açık alan lokomotor aktivite testi uygulandı. Ancak bu modelde bu sürede şiddetli bir dopaminerjik sensitivite oluşmadığı için apomorfin ile normalden fazla bir hareket artışı izlenmedi. Bazal veya apomorfin ile indüklenen aktivitede gruplar arasında istatistiksel fark izlenmedi ($p>0.05$).

Silindir testi unilateral lezyon oluşturulan modellerde oluşabilecek ekstremitte asimetrisini göstermeyi amaçlayan bir testtir. Lezyon kontralateralindeki ekstremitenin kullanımında azalma beklenmektedir. Çalışmamızda da striatuma unilateral olarak α -sin PFF enjeksiyonu yapıldığı için silindir testi kullanıldı. Naive kontrollere göre tüm hayvanlarda kontralateral ekstremitte kullanımında düşüş trendi saptandı, yalnızca sadece-PFF grubunda istatistiksel olarak anlamlı olabilecek ($p=0,05$) bir düşüş izlendi. Literatürdeki çalışmalara baktığımızda striatuma PFF enjeksiyonu sonrasında en uzun takip süresi olan 6. ayda bile dopaminerjik nöron kaybının asimetrik motor defisit gelişimi için yeterli olmadığı görülmektedir [6, 61].

Rotarod testi ise hayvanların motor öğrenme ve koordinasyon becerilerini test etmek için, daha çok simetrik motor defisitlerin ölçümünde kullanılmaktadır. Çalışmamızda unilateral enjeksiyon yapılmış olsa da α -sin PFF'nin hızla karşı hemisfere de yayılabildiği gösterilmiş olduğu için [64] rotarod testi ile hayvanların genel motor performansının değerlendirilmesi amaçlandı. Gruplar arasında rodda kalma süresi veya roddan düşülen dönme hızı arasında istatistiksel fark izlenmedi ($p>0,05$).

Literatürde PH hayvan modelinde glimfatik sistemin rolünün incelendiği 3 çalışma mevcuttur. Zou ve ark. çalışmasında, A53T mutant fareler kullanılmış, bu farelerde derin servikal lenf nodu ligasyonu sonrası substansiya nigrada α -sin birikiminin arttığı, ayrıca derin servikal lenf nodu ligasyonu sonucunda sisterna magnaya floresan madde enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilen hayvanlarda floresan maddenin beyin parenkimine dağılımının azaldığı gösterilmiştir [46]. Çalışmamızda Zou ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak, PH modeli olarak α -sin mutant (A53T) fareler değil, sıçanda α -sin PFF'nin striatuma stereotaksik enjeksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Zou ve ark.'nın da belirttiği gibi A53T mutasyonu sonucu mutant α -sin birikimi yalnızca bu mutasyona bağlı ortaya çıkan familiyal PH vakalarında görülmekte olup, nörodejeneratif hastalıkların büyük çoğunluğunda (idiyopatik PH, Lewy cisimcikli demans gibi) yabani tipte (wild type-WT) α -sin birikimi olmaktadır. Cui ve ark.'nın yaptığı PH'de glimfatik sistemin etkileriyle ilgili çalışmada ise AQP4 ekspresyonu bozuk olan farelerde striatuma α -sin PFF enjeksiyonu sonucunda patolojik α -sin birikiminin kontrol hayvanlara göre arttığı gösterilmiştir [140]. Çalışmanın tartışma kısmında da belirtildiği gibi AQP4'ün nöroprotektif etkileri de olması nedeniyle, AQP4 ekspresyonunun bozulması nöronlarda fonksiyonel bozukluğa neden olarak da protein birikimini arttırmaktadır [140]. Çalışmamızda derin servikal lenf nodu ligasyonu ile nöronlarda fonksiyonel bozulma oluşturmaksızın izole olarak glimfatik sistem fonksiyonunun bozulması sonucunda patolojik α -sin birikimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ding ve ark.'nın çalışmasında ise, α -sin PFF enjeksiyonu yapılan farelerde bilateral derin servikal lenf nodu ligasyonu ile α -sin birikiminin ligasyon yapılmayan hayvanlara göre hem

striatumda hem de korteks, amigdala ve subtansiya nigrada çok daha fazla olduğu gösterilmiştir [142]. Ancak bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda α -sin PFF enjeksiyonunun glimfatik sistem üzerine etkileri incelenmiş ve yöntem olarak MRG kullanılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda α -sin PFF modelinde glimfatik sistem işleyişinin özellikle de α -sin patolojisinin daha yoğun olduğu beyin bölgelerinde bozulduğu, dsLN ligasyonu ile bu bozukluğun çok daha şiddetli ve yaygın hale geldiği saptanmıştır. Ayrıca dsLN ligasyonunun α -sin patolojisini de daha şiddetli hale getirdiği yönünde ön bulgular elde edilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak, glimfatik sistem drenajının artırılmasına yönelik müdahaleler, örneğin uyku bozukluklarının önüne geçilmesi, hastalarda düzenli fiziksel aktivitenin teşvik edilmesi, değiştirilebilir kardiyovasküler risk faktörlerinin ortadan kaldırılması PH tedavisinin bir parçası olmalıdır. Çalışmamız gelecekte PH tedavisinde glimfatik sistemin de hedeflenmesinin gerekliliğine dikkat çekmektedir.

6. SONUÇLAR

1- Striatuma unilateral α -sin PFF enjeksiyonu ile oluşturulan sıçanda PH modelinde, bilateral dsLN ligasyonu sonucunda LP ile enjekte edilen kontrast maddenin beyin parankimine alımında azalma meydana geldiği saptandı.

2- Kontrast maddenin sisterna magna yerine LP toluyla verilmesinin glimfatik sistemin incelendiği MRG çalışmalarında uygulanabilir, kolay bir yöntem olduğu saptandı.

3- dsLN ligasyonu kadar şiddetli olmamakla birlikte, α -sin PFF enjeksiyonunun da muhtemelen nöroinflamasyon mekanizmaları üzerinden glimfatik sistem drenajında bozulmaya yol açtığı, bu etkinin post-kontrast 30.dakikada belirginleştiği, 1.saatte azaldığı izlendi.

4- Striatuma unilateral α -sin PFF enjeksiyonunun 7. haftada açık alan testinde bazal hareketlilikte değişikliğe yol açmadığı, apomorfine indüksiyonu ile de kontroll gruplarına göre farklılık göstermediği saptandı. Bu zaman diliminde silindir testinde kontralateral ekstremitelerde kullanımında azalma eğilimi olsa da belirgin bir motor defisit gelişimi izlenmedi.

5-İmmunofloresan işaretleme ile striatuma enjekte edilen α -sin PFF'nin özellikle substansiya nigrada dopaminerjik nöronlarda ve çevresinde ifade edildiği izlendi, dsLN ligasyonu yapılan grupta α -sin ifadesinin ligasyonsuz α -sin PFF grubuna göre daha fazla olduğu görsel olarak saptandı.

7. ÖNERİLER

- 1- Bu çalışmada immunofloresan işaretleme ile gösterilen α -sin birikimi ve TH işaretleme ile gösterilen dopaminerjik nöron sayısı kantitize edilmelidir.
- 2- Fibril verilmeden bilateral dsLN ligasyonu yapılarak, dsLN ligasyonunun tek başına glimfatik sistem üzerindeki etkileri MRG ile incelenmelidir.
- 3- A-sin birikimlerinin agregat olduğunun doğrulanması için thioflavin S, nöroinflamasyonunun modelimizdeki yerinin araştırılması amacıyla Iba-1 işaretleme yapılmalıdır.
- 4- dsLN ligasyonunun ve α -sin PFF enjeksiyonunun AQP4 polaritesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla AQP4 immünohistokimyasal işaretleme yapılmalıdır.
- 5- Modelimizde α -sin'in substansiya nigra dışında hangi beyin bölgelerine yayıldığı ve hipokampus, korteks gibi striatum ile bağlantılı diğer beyin bölgelerindeki α -sin ifadesi immunhistokimyasal yöntemlerle incelenmelidir.

8. KAYNAKLAR

- [1] Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, et al. How common are the ‘common’ neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68: 326–337.
- [2] Forno LS. Neuropathology of Parkinson’s Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 1996; 55: 259–272.
- [3] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 492–501.
- [4] Lee S-J. Origins and Effects of Extracellular α -synuclein: Implications in Parkinson’s Disease. *J Mol Neurosci* 2008; 34: 17–22.
- [5] Visanji NP, Brooks PL, Hazrati L-N, et al. The prion hypothesis in Parkinson’s disease: Braak to the future. *acta neuropathol commun* 2013; 1: 2.
- [6] Paumier KL, Luk KC, Manfredsson FP, et al. Intrastratial injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiology of Disease* 2015; 82: 185–199.
- [7] Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, et al. Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron* 2011; 72: 57–71.
- [8] Abeliovich A, Gitler AD. Defects in trafficking bridge Parkinson’s disease pathology and genetics. *Nature* 2016; 539: 207–216.
- [9] Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, et al. How is alpha-synuclein cleared from the cell? *J Neurochem* 2019; 150: 577–590.
- [10] Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med*; 4. Epub ahead of print 15 August 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003748.
- [11] Aspelund A, Antila S, Proulx ST, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *Journal of Experimental Medicine* 2015; 212: 991–999.
- [12] Wang L, Zhang Y, Zhao Y, et al. Deep cervical lymph node ligation aggravates AD-like pathology of APP/PS1 mice. *Brain Pathol* 2019; 29: 176–192.
- [13] Edeklev CS, Halvorsen M, Løvland G, et al. Intrathecal Use of Gadobutrol for Glymphatic MR Imaging: Prospective Safety Study of 100 Patients. *AJNR Am J Neuroradiol* 2019; 40: 1257–1264.

- [14] Davoodi-Bojd E, Ding G, Zhang L, et al. Modeling glymphatic system of the brain using MRI. *NeuroImage* 2019; 188: 616–627.
- [15] Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14.
- [16] Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *The Lancet* 2004; 363: 1783–1793.
- [17] MUHİTTİN CENK AKBOSTANCI, FATMA TUĞRA KARAARSLAN TÜRK, Editör, Hareket Bozuklukları Akıl Notları, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, ss.11-17, 2020
- [18] Lashuel HA. Do Lewy bodies contain alpha-synuclein fibrils? and Does it matter? A brief history and critical analysis of recent reports. *Neurobiology of Disease* 2020; 141: 104876.
- [19] Shults CW. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1661–1668.
- [20] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, et al. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388: 839–840.
- [21] Braak H, Tredici KD, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 2003; 24: 197–211.
- [22] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 1997; 276: 2045–2047.
- [23] Schulz-Schaeffer W. Is Cell Death Primary or Secondary in the Pathophysiology of Idiopathic Parkinson's Disease? *Biomolecules* 2015; 5: 1467–1479.
- [24] Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, et al. Stabilization of α -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 9443–9449.
- [25] Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2019; 1867: 890–908.
- [26] Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med* 1998; 4: 1318–1320.
- [27] Roberts H, Brown D. Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric α -Synuclein. *Biomolecules* 2015; 5: 282–305.

- [28] Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA*. 2006;296(6):661-670.
- [29] Behl T, Kumar S, Althafar ZM, et al. Exploring the Role of Ubiquitin–Proteasome System in Parkinson’s Disease. *Mol Neurobiol* 2022; 59: 4257–4273.
- [30] Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, et al. Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Arch Neurol*; 2010;67(12):1464-1472.
- [31] Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8: a024091.
- [32] Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 2008; JCI32806.
- [33] Winslow AR, Chen C-W, Corrochano S, et al. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson’s disease. *Journal of Cell Biology* 2010; 190: 1023–1037.
- [34] Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, et al. Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. *Science* 1983; 219: 979–980.
- [35] Borsche M, Pereira SL, Klein C, et al. Mitochondria and Parkinson’s Disease: Clinical, Molecular, and Translational Aspects. *JPD* 2021; 11: 45–60.
- [36] Dias V, Junn E, Mouradian MM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson’s Disease. *Journal of Parkinson’s Disease* 2013; 3: 461–491.
- [37] Zeng X-S, Geng W-S, Jia J-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro* 2018; 10: 175909141877743.
- [38] Marques O, Outeiro TF. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death Dis* 2012; 3: e350–e350.
- [39] Mogi M, Harada M, Narabayashi H, et al. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson’s disease. *Neuroscience Letters* 1996; 211: 13–16.

- [40] Zhang W, Wang T, Pei Z, et al. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB j* 2005; 19: 533–542.
- [41] Couch Y, Alvarez-Erviti L, Sison NR, et al. The acute inflammatory response to intranigral α -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 166.
- [42] Li J-Y, Englund E, Holton JL, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; 14: 501–503.
- [43] Jang A, Lee H-J, Suk J-E, et al. Non-classical exocytosis of α -synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem.* 2010;113(5):1263-1274. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06695.x
- [44] Lee H-J, Bae E-J, Lee S-J. Extracellular α -synuclein—a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 92–98.
- [45] Dehay B, Vila M, Bezard E, et al. Alpha-synuclein propagation: New insights from animal models: Alpha-Synuclein Propagation. *Mov Disord* 2016; 31: 161–168.
- [46] Zou W, Pu T, Feng W, et al. Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson's disease-like pathology in mice overexpressing mutated α -synuclein. *Transl Neurodegener* 2019; 8: 7.
- [47] Adler CH, Beach TG, Zhang N, et al. Unified Staging System for Lewy Body Disorders: Clinicopathologic Correlations and Comparison to Braak Staging. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2019; 78: 891–899.
- [48] the Arizona Parkinson's Disease Consortium, Beach TG, Adler CH, et al. Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 613–634.
- [49] Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 2000; 62: 63–88.
- [50] Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences* 1989; 12: 366–375.
- [51] Fahn, S., Jankovic, J., & Hallett, M. (2011). *Functional neuroanatomy of the basal ganglia. Principles and Practice of Movement Disorders*, 55–65.

- [52] Chen W, de Hemptinne C, Miller AM, et al. Prefrontal-Subthalamic Hyperdirect Pathway Modulates Movement Inhibition in Humans. *Neuron* 2020; 106: 579-588.e3.
- [53] Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 17–33.
- [54] Xia N, Cabin DE, Fang F, et al. Parkinson's Disease: Overview of Transcription Factor Regulation, Genetics, and Cellular and Animal Models. *Front Neurosci* 2022; 16: 894620.
- [55] Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics* 2014; 11: 92–110.
- [56] Polinski NK, Volpicelli-Daley LA, Sortwell CE, et al. Best Practices for Generating and Using Alpha-Synuclein Pre-Formed Fibrils to Model Parkinson's Disease in Rodents. *JPD* 2018; 8: 303–322.
- [57] Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, et al. Viral vector-mediated overexpression of α -synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 89–111.
- [58] Cinar E, Yalcin-Cakmakli G, Saka E, et al. Modelling cognitive deficits in Parkinson's disease: Is CA2 a gateway for hippocampal synucleinopathy? *Experimental Neurology* 2020; 330: 113357.
- [59] Kasongo DW, de Leo G, Vicario N, et al. Chronic α -Synuclein Accumulation in Rat Hippocampus Induces Lewy Bodies Formation and Specific Cognitive Impairments. *eNeuro* 2020; 7: ENEURO.0009-20.2020.
- [60] Earls RH, Menees KB, Chung J, et al. Intrastratial injection of preformed alpha-synuclein fibrils alters central and peripheral immune cell profiles in non-transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2019; 16: 250.
- [61] Patterson JR, Duffy MF, Kemp CJ, et al. Time course and magnitude of alpha-synuclein inclusion formation and nigrostriatal degeneration in the rat model of synucleinopathy triggered by intrastratial α -synuclein preformed fibrils. *Neurobiology of Disease* 2019; 130: 104525.
- [62] Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Lee VM-Y. Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc* 2014; 9: 2135–2146.
- [63] Mahul-Mellier A-L, Burtscher J, Maharjan N, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; 117: 4971–4982.

- [64] Okuzumi A, Kurosawa M, Hatano T, et al. Rapid dissemination of alpha-synuclein seeds through neural circuits in an in-vivo prion-like seeding experiment. *acta neuropathol commun* 2018; 6: 96.
- [65] Abdelmotilib H, Maltbie T, Delic V, et al. α -Synuclein fibril-induced inclusion spread in rats and mice correlates with dopaminergic Neurodegeneration. *Neurobiology of Disease* 2017; 105: 84–98.
- [66] Tozzi A, Sciaccaluga M, Loffredo V, et al. Dopamine-dependent early synaptic and motor dysfunctions induced by α -synuclein in the nigrostriatal circuit. *Brain* 2021; 144: 3477–3491.
- [67] Thomsen MB, Ferreira SA, Schacht AC, et al. PET imaging reveals early and progressive dopaminergic deficits after intra-striatal injection of preformed alpha-synuclein fibrils in rats. *Neurobiology of Disease* 2021; 149: 105229.
- [68] Duffy MF, Collier TJ, Patterson JR, et al. Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 129.
- [69] Kim S, Kwon S-H, Kam T-I, et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron* 2019; 103: 627-641.e7.
- [70] Uemura N, Yagi H, Uemura MT, et al. Inoculation of α -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol Neurodegeneration* 2018; 13: 21.
- [71] Kuan W-L, Stott K, He X, et al. Systemic α -synuclein injection triggers selective neuronal pathology as seen in patients with Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 2021; 26: 556–567.
- [72] Rey NL, George S, Steiner JA, et al. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol* 2018; 135: 65–83.
- [73] Murtha LA, Yang Q, Parsons MW, et al. Cerebrospinal fluid is drained primarily via the spinal canal and olfactory route in young and aged spontaneously hypertensive rats. *Fluids Barriers CNS* 2014; 11: 12.
- [74] Leinonen V, Vanninen R, Rauramaa T. Cerebrospinal fluid circulation and hydrocephalus. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 39–50.
- [75] Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* 2011; 128: 309–316.

- [76] Carare RO, Hawkes CA, Weller RO. Afferent and efferent immunological pathways of the brain. *Anatomy, Function and Failure. Brain, Behavior, and Immunity* 2014; 36: 9–14.
- [77] Peng W, Achariyar TM, Li B, et al. Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 2016; 93: 215–225.
- [78] Hladky SB, Barrand MA. The glymphatic hypothesis: the theory and the evidence. *Fluids Barriers CNS* 2022; 19: 9.
- [79] Casley-Smith JR, Földi-Börsök E, Földi M. The prelymphatic pathways of the brain as revealed by cervical lymphatic obstruction and the passage of particles. *Br J Exp Pathol.* 1976 Apr;57(2):179-88.
- [80] Tamura R, Yoshida K, Toda M. Current understanding of lymphatic vessels in the central nervous system. *Neurosurg Rev* 2020; 43: 1055–1064.
- [81] Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015; 523: 337–341.
- [82] Gouveia-Freitas K, Bastos-Leite AJ. Perivascular spaces and brain waste clearance systems: relevance for neurodegenerative and cerebrovascular pathology. *Neuroradiology* 2021; 63: 1581–1597.
- [83] Raper D, Louveau A, Kipnis J. How Do Meningeal Lymphatic Vessels Drain the CNS? *Trends in Neurosciences* 2016; 39: 581–586.
- [84] Myllylä T, Harju M, Korhonen V, Bykov A, Kiviniemi V, Meglinski I. Assessment of the dynamics of human glymphatic system by near-infrared spectroscopy. *J Biophotonics.* 2018;11(8):e201700123.
- [85] Cheng Y, Wang Y-J. Meningeal Lymphatic Vessels: A Drain of the Brain Involved in Neurodegeneration? *Neurosci Bull* 2020; 36: 557–560.
- [86] Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, et al. Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science* 1992; 256: 385–387.
- [87] Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 991–1001.
- [88] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, et al. Aquaporins in Brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 367–378.
- [89] Brown PD, Davies SL, Speake T, et al. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience* 2004; 129: 955–968.

- [90] Badaut J, Brunet J-F, Regli L. Aquaporins in the brain: from aqueduct to “multi-duct”. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 251–263.
- [91] Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 13052–13056.
- [92] Hasegawa H, Ma T, Skach W, et al. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 5497–5500.
- [93] Nielsen S, Arnulf Nagelhus E, Amiry-Moghaddam M, et al. Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain. *J Neurosci* 1997; 17: 171–180.
- [94] Mader S, Brimberg L. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. *Cells* 2019; 8: 90.
- [95] Rossi A, Moritz TJ, Ratelade J, et al. Super-resolution imaging of aquaporin-4 orthogonal arrays of particles in cell membranes. *Journal of Cell Science* 2012; jcs.109603.
- [96] Kress BT, Iliff JJ, Xia M, et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain: Paravascular Clearance. *Ann Neurol* 2014; 76: 845–861.
- [97] Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, et al. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol* 2017; 74: 91.
- [98] Chen Y, Dai Z, Fan R, et al. Glymphatic System Visualized by Chemical-Exchange-Saturation-Transfer Magnetic Resonance Imaging. *ACS Chem Neurosci* 2020; 11: 1978–1984.
- [99] Cao X, Xu H, Feng W, et al. Deletion of aquaporin-4 aggravates brain pathology after blocking of the meningeal lymphatic drainage. *Brain Research Bulletin* 2018; 143: 83–96.
- [100] Liu X, Wu G, Tang N, et al. Glymphatic Drainage Blocking Aggravates Brain Edema, Neuroinflammation via Modulating TNF- α , IL-10, and AQP4 After Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 784154.
- [101] Kaur J, Davoodi-Bojd E, Fahmy LM, et al. Magnetic Resonance Imaging and Modeling of the Glymphatic System. *Diagnostics* 2020; 10: 344.
- [102] Iliff JJ, Lee H, Yu M, et al. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest* 2013; 123: 1299–1309.

- [103] Ding G, Chopp M, Li L, et al. MRI investigation of glymphatic responses to Gd-DTPA infusion rates: XXXX. *J Neuro Res* 2018; 96: 1876–1886.
- [104] Cai X, Qiao J, Kulkarni P, et al. Imaging the effect of the circadian light–dark cycle on the glymphatic system in awake rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; 117: 668–676.
- [105] Yang L, Kress BT, Weber HJ, et al. Evaluating glymphatic pathway function utilizing clinically relevant intrathecal infusion of CSF tracer. *J Transl Med* 2013; 11: 107.
- [106] Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, et al. Cerebral Arterial Pulsation Drives Paravascular CSF-Interstitial Fluid Exchange in the Murine Brain. *Journal of Neuroscience* 2013; 33: 18190–18199.
- [107] Lin L, Hao X, Li C, et al. Impaired glymphatic system in secondary degeneration areas after ischemic stroke in rats. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2020; 29: 104828.
- [108] Jiang Q, Zhang L, Ding G, et al. Impairment of the glymphatic system after diabetes. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1326–1337.
- [109] Christensen J, Wright DK, Yamakawa GR, et al. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury Alters Glymphatic Clearance Rates in Limbic Structures of Adolescent Female Rats. *Sci Rep* 2020; 10: 6254.
- [110] Ringstad G, Valnes LM, Dale AM, et al. Brain-wide glymphatic enhancement and clearance in humans assessed with MRI. *JCI Insight* 2018; 3: e121537.
- [111] Watts R, Steinklein JM, Waldman L, et al. Measuring Glymphatic Flow in Man Using Quantitative Contrast-Enhanced MRI. *AJNR Am J Neuroradiol* 2019; ajnr;ajnr.A5931v1.
- [112] Naganawa S, Suzuki K, Yamazaki M, et al. Serial Scans in Healthy Volunteers Following Intravenous Administration of Gadoteridol: Time Course of Contrast Enhancement in Various Cranial Fluid Spaces. *MRMS* 2014; 13: 7–13.
- [113] Ohashi T, Naganawa S, Ogawa E, et al. Signal Intensity of the Cerebrospinal Fluid after Intravenous Administration of Gadolinium-based Contrast Agents: Strong Contrast Enhancement around the Vein of Labbe. *Magnetic Resonance in Medical Sciences*; 18: 6.
- [114] Taoka T, Masutani Y, Kawai H, et al. Evaluation of glymphatic system activity with the diffusion MR technique: diffusion tensor image analysis along the perivascular space (DTI-ALPS) in Alzheimer’s disease cases. *Jpn J Radiol* 2017; 35: 172–178.

- [115] Si X, Guo T, Wang Z, et al. Neuroimaging evidence of glymphatic system dysfunction in possible REM sleep behavior disorder and Parkinson's disease. *npj Parkinsons Dis* 2022; 8: 54.
- [116] Ma X, Li S, Li C, et al. Diffusion Tensor Imaging Along the Perivascular Space Index in Different Stages of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2021; 13: 773951.
- [117] Si X, Gu L, Song Z, et al. Different Perivascular Space Burdens in Idiopathic Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2020; 12: 580853.
- [118] Yu L, Hu X, Li H, et al. Perivascular Spaces, Glymphatic System and MR. *Front Neurol* 2022; 13: 844938.
- [119] Liu D, He X, Wu D, et al. Continuous theta burst stimulation facilitates the clearance efficiency of the glymphatic pathway in a mouse model of sleep deprivation. *Neuroscience Letters* 2017; 653: 189–194.
- [120] Xie L, Kang H, Xu Q, et al. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science* 2013; 342: 373–377.
- [121] Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, et al. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2014;34(49):16180-16193.
- [122] Sweeney AM, Plá V, Du T, et al. In Vivo Imaging of Cerebrospinal Fluid Transport through the Intact Mouse Skull using Fluorescence Macroscopy. *JoVE* 2019; 59774.
- [123] Sweeney AM, Plá V, Du T, et al. In Vivo Imaging of Cerebrospinal Fluid Transport through the Intact Mouse Skull using Fluorescence Macroscopy. *JoVE* 2019; 59774.
- [124] Kiviniemi V, Wang X, Korhonen V, et al. Ultra-fast magnetic resonance encephalography of physiological brain activity – Glymphatic pulsation mechanisms? *J Cereb Blood Flow Metab* 2016; 36: 1033–1045.
- [125] Hablitz LM, Vinitsky HS, Sun Q, et al. Increased glymphatic influx is correlated with high EEG delta power and low heart rate in mice under anesthesia. *Sci Adv* 2019; 5: eaav5447.
- [126] Zhang R, Liu Y, Chen Y, et al. Aquaporin 4 deletion exacerbates brain impairments in a mouse model of chronic sleep disruption. *CNS Neurosci Ther* 2020; 26: 228–239.
- [127] Lee H, Xie L, Yu M, et al. The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport. *Journal of Neuroscience* 2015; 35: 11034–11044.

- [128] Muccio M, Chu D, Minkoff L, et al. Upright versus supine MRI: effects of body position on craniocervical CSF flow. *Fluids Barriers CNS* 2021; 18: 61.
- [129] Lindsay J. Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology* 2002; 156: 445–453.
- [130] Andel R, Crowe M, Pedersen NL, et al. Physical Exercise at Midlife and Risk of Dementia Three Decades Later: A Population-Based Study of Swedish Twins. *The Journals of Gerontology: Series A* 2008; 63: 62–66.
- [131] von Holstein-Rathlou S, Petersen NC, Nedergaard M. Voluntary running enhances glymphatic influx in awake behaving, young mice. *Neuroscience Letters* 2018; 662: 253–258.
- [132] He X, Liu D, Zhang Q, et al. Voluntary Exercise Promotes Glymphatic Clearance of Amyloid Beta and Reduces the Activation of Astrocytes and Microglia in Aged Mice. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 144.
- [133] Kylkilahti TM, Berends E, Ramos M, et al. Achieving brain clearance and preventing neurodegenerative diseases—A glymphatic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 2021; 41: 2137–2149.
- [134] Smith EC, Pizzey FK, Askew CD, et al. Effects of cardiorespiratory fitness and exercise training on cerebrovascular blood flow and reactivity: a systematic review with meta-analyses. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2021; 321: H59–H76.
- [135] Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 565–581.
- [136] Boland B, Yu WH, Corti O, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17: 660–688.
- [137] Imtiaz B, Tolppanen A-M, Kivipelto M, et al. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochemical Pharmacology* 2014; 88: 661–670.
- [138] Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 457–470.
- [139] Nauen DW, Troncoso JC. Amyloid-beta is present in human lymph nodes and greatly enriched in those of the cervical region. *Alzheimers Dement.* 2022;18(2):205-210.

- [140] Cui H, Wang W, Zheng X, et al. Decreased AQP4 Expression Aggravates α -Synuclein Pathology in Parkinson's Disease Mice, Possibly via Impaired Glymphatic Clearance. *J Mol Neurosci*. 2021;71(12):2500-2513.
- [141] Fang Y, Dai S, Jin C, et al. Aquaporin-4 Polymorphisms Are Associated With Cognitive Performance in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2022; 13: 740491.
- [142] Ding X-B, Wang X-X, Xia D-H, et al. Impaired meningeal lymphatic drainage in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Nat Med* 2021; 27: 411–418.
- [143] Li Y, Zhu Z, Chen J, et al. Dilated Perivascular Space in the Midbrain May Reflect Dopamine Neuronal Degeneration in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2020; 12: 161.
- [144] Zhang Y, Ren R, Sanford LD, et al. Sleep in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of polysomnographic findings. *Sleep Medicine Reviews* 2020; 51: 101281.
- [145] Bohnen NI, Hu MTM. Sleep Disturbance as Potential Risk and Progression Factor for Parkinson's Disease. *JPD* 2019; 9: 603–614.
- [146] Sundaram S, Hughes RL, Peterson E, et al. Establishing a framework for neuropathological correlates and glymphatic system functioning in Parkinson's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2019; 103: 305–315.
- [147] Li M, Jing Y, Wu C, et al. Continuous theta burst stimulation dilates meningeal lymphatic vessels by up-regulating VEGF-C in meninges. *Neuroscience Letters* 2020; 735: 135197.
- [148] Liang P, Li L, Zhang Y, et al. Electroacupuncture Improves Clearance of Amyloid- β through the Glymphatic System in the SAMP8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity* 2021; 2021: 1–11.
- [149] Patterson JR, Polinski NK, Duffy MF, et al. Generation of Alpha-Synuclein Preformed Fibrils from Monomers and Use In Vivo. *JoVE* 2019; 59758.
- [150] De la Calle JL, Paíno CL. A procedure for direct lumbar puncture in rats. *Brain Research Bulletin* 2002; 59: 245–250.
- [151] Arakawa O, Ikeda T. Apomorphine effect on single and paired rat open-field behavior. *Physiology & Behavior* 1991; 50: 189–194.
- [152] Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000; 39: 777–787.

- [153] Benveniste H, Liu X, Koundal S, et al. The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review. *Gerontology* 2019; 65: 106–119.
- [154] Ding X-B, Wang X-X, Xia D-H, et al. Impaired meningeal lymphatic drainage in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Nat Med* 2021; 27: 411–418.
- [155] Patel M, Atyani A, Salameh J-P, et al. Safety of Intrathecal Administration of Gadolinium-based Contrast Agents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology* 2020; 297: 75–83.
- [156] Cheng KT. Gadobutrol. 2006 Feb 15 [Updated 2007 Oct 18]. In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013.