

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE MİTOKONDİRİ  
TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**ÖZBEYEN ATALAY**

**Fizyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2024**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE  
MİTOKONDİRİ TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZBEYEN ATALAY

Fizyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Meltem TUNCER

ANKARA

2024

**DENEYSEL PARKINSON HASTALIĞI MODELİNDE MİTOKONDİRİ  
TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**ÖĞrenci: Özbeyen ATALAY**

**Danışman: Prof. Dr. Meltem TUNCER**

Bu tez çalışması 13.09.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Fizyoloji Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Mehmet ÖZLER* (imza)

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi/Gülhane Tıp Fakóltesi. Tıbbi  
Fizyoloji A.B.D*

Üye: *Dr. Öğretim Üyesi Fırat AKAT* (imza)

*Ankara Üniversitesi/Tıp Fakóltesi, Fizyoloji A.B.D*

Üye: *Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU* (imza)

*Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Fizyoloji A.B.D*

Üye: *Doç. Dr. Okan ARIHAN* (imza)

*Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Fizyoloji A.B.D*

Üye: *Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR* (imza)

*Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Genel Biyoloji A.B.D*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-ÖĞretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

11 Ekim 2024

*Prof. Dr. Müge YEMİŐCI ÖZKAN*

Enstitü Müdürü

## 1YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

13/09/2024  
Özbeyen Atalay

<sup>1</sup> **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”**

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Meltem Tuncer danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*(İmza)*

*Arş. Gör. Uzm. Biyo. zbeyen Atalay*

## TEŞEKKÜR

Doktora hayatım boyunca yaptığım çalışmalarda yanımda olan, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, yeri geldiğinde nazımı çeken, yeri geldiğinde sabır gösteren danışmanım Prof. Dr. Meltem TUNCER'e bana kattığı hem bilimsel hem de insani tüm değerler için teşekkür ederim.

Deney süreçlerinde emekleriyle çalışmaya birçok katkıda bulunmuş Dr. Gökhan Burçin KUBAT'a, Dr. Simay ALCAN KIRTAŞ'a, Dr. Mustafa GÖRMÜŞ'e, Dr. Öner ÜLGER'e teşekkürlerimi iletiyorum. Deney süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU'na sonsuz minnettarımı iletmeyi borç bilirim. Tezimin analiz ve yazım aşamalarında çok uzakta olmasına rağmen yardımlarını esirgemeyen Dr. Deniz ÖNAL'a binbir teşekkürler.

Tez aşamasının başından sonuna kadar fikirleriyle çalışmanın olgunlaşmasını sağlayan ve büyük katkılarda bulunan Prof. Dr. Mehmet ÖZLER'e çok teşekkür ederim. Doç. Dr. Özer Aylın GÜRPINAR'a lisans ve lisans sonrası bana kattığı her şey için, beni akademik dünyaya kazandıran ilk insan olduğu için, şu an ayrı fakültelerde çalışıyor olsak da yardımlarını benden esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Tezin deneyleri sırasında özellikle egzersiz deneyleri için hem katkı hem de laboratuvarını kullanma imkânı sağlayan Dr Öğr. Üyesi Fırat AKAT'a sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan aileme, Aysel ATALAY, Aygök ÇELİK, Oğuzhan Çelik ve Oğulcan ÇELİK'e çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Tüm bu süreçler boyunca bana eşlik eden tüm kahrımı çeken, zor zamanlarımı kolaylaştıran, kötü zamanlarımı iyiye çevirme yeteneği olan, hayatımın geri kalanında da bana eşlik etmesini tüm kalbimle dilediğim sevgili eşim Güzide Miray Kotil ATALAY'a tüm sevgimi ve teşekkürlerimi iletiyorum. İyi ki varsın.

*Rattus Norvegicus* ve *Mus musculus* türleri başta olmak üzere tüm deney hayvanlarına atfedilmiştir...

## ÖZET

**Atalay, Ö. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde Mitokondri Transplantasyonu ve Egzersizin Etkilerinin Karşılaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024.** Parkinson hastalığı (PH), beyindeki dopamin salgılayan nöronların dejenerasyonu ile ilişkilidir. PH; harekete başlamada zorluk, tremor, yavaş ve küçük hareketler yapma gibi lokomotor ve spontan aktivitelerin bozukluğu ile kendini gösterirken yıllar içinde yavaşça gelişir. Dopaminerjik nöronlardaki mitokondriyal disfonksiyonlar PH'nin birçok farklı nedeni arasındadır. Son zamanlarda, ekzojen mitokondri transplantasyonunun mitokondriyal disfonksiyonu düzelttiği ve PH'nin klinik semptomlarını hafifletmeye yardımcı olduğu bildirilmiştir. Egzersizin faydalı etkisi PH'de iyi belgelenmiştir. Çalışmanın amacı, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile indüklenen PH fare modelinde egzersiz ve mitokondri naklinin terapötik etkilerini incelemektir. MPTP, C57BL farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işlemi aynı gün içerisinde 4 sefer 20 mg/kg dozla, 2 saat aralıklı uygulanmıştır. PH'nin gelişmesinden 7 gün sonra koşu bandı egzersizleri 4 hafta boyunca haftada 5 gün, 30 dakika, 20 m/dk hızda yapılmıştır. Fare karaciğerinden izole edilen sağlıklı mitokondriler tedavi gruplarına bir hafta ara ile dört kez olacak şekilde intranasal yolla verilmiştir. Spontan aktivite ve lokomotor aktivite testleri tüm gruplara üç farklı seansta (PH'den önce, PH'den sonra ve tedavinin sonunda) uygulanmıştır. İntranasal olarak nakledilen mitokondrilerin beyine ulaştığı floresan mikroskopisi ile doğrulanmıştır. Egzersiz gruplarında ve mitokondri tedavisi alan gruplarda, PH semptomları aktivite testleri açısından azalmıştır. Bunun yanı sıra yapılan moleküler incelemelerde beyinde Bax/Bcl-2 oranının egzersiz yapan gruplarda azaldığı tespit edilmiş ancak mitokondri alan gruplarda bu azalmanın tersine döndüğü görülmüştür. Beklenilenin aksine mitokondri transplantasyonu moleküler açıdan olumsuz etkilerde bulunmuştur. Kaspaz 1 ve 3 proteinlerinin artışına sebep olarak beyinde apoptotik süreçleri tetikleyebileceği kanısına varılmıştır. Davranış testlerinde görülen egzersiz ve mitokondrinin sinerjik etkilerinin moleküler düzeyde gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Egzersiz, PH'deki semptomları azaltan geleneksel bir yaklaşımdır. Bununla beraber mitokondrilerin intranasal yol ile beyine ulaştırılması, yöntemin invaziv olmaması ve insana kolay uygulanabilir olması açılarından umut vaat eden bir tedavi yöntemi olarak göze çarpmaktadır. Ancak alınan sonuçlar mitokondri gibi çok büyük yapıların bu yolla verilmesinin çok etkin olmadığını göstermektedir. Bunun yanı sıra nörodejeneratif hastalıklarda mitokondri kullanımına soru işaretleri bırakmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Parkinson hastalığı, Mitokondri transplantasyonu, Bax/Bcl-2, Kaspaz 1-3, Davranış deneyleri.

**Destekleyen Kurumlar:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (THD-2023-20607).



## ABSTRACT

**Atalay, Ö. Comparison of the Effects of Mitochondrial Transplantation and Exercise in an Experimental Parkinson's Disease Model. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Physiology Program, Doctor of Philosophy Dissertation, Ankara, 2024.** Parkinson's disease (PD) is associated with degeneration of dopamine-secreting neurons in the brain. PD manifests itself with impaired locomotor and spontaneous activities, such as difficulty initiating movement, tremors, and making slow and small movements, and PD develops slowly over years. Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons is among the many different causes of PD. Recently, exogenous mitochondrial transplantation has been reported to help treat mitochondrial dysfunction and alleviate the clinical symptoms of PD. The beneficial effect of exercise is documented clearly in PD. The aim of the study was to investigate the therapeutic effects of exercise and mitochondrial transplantation in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mouse model. MPTP was injected intraperitoneally into C57BL mice. The injections were administered on the same day with a dose of 20 mg/kg, 4 times, 2 h apart. After 7 days of the development of PD, treadmill exercises were done for 30 minutes, 5 days a week, at a speed of 20 m/min for 4 weeks. Healthy mitochondria isolated from mouse liver were transplanted into the brain of the treatment groups intranasally, four times with a one-week interval. Spontaneous activity and locomotor activity tests were applied to all groups in three different sessions (before PD, after PD, and at the end of treatment). Movement of intranasally transplanted mitochondria to the brain was observed with fluorescence microscopy. In the exercise groups and the groups receiving mitochondrial treatment, PD symptoms decreased in terms of activity tests. In addition, molecular studies in brain showed that the Bax/Bcl-2 ratio decreased in the exercise groups, but this decrease was reversed in the mitochondrial groups. Contrary to expectations, mitochondrial transplantation had negative effects in molecular terms. It was concluded that it caused an increase in Caspase 1 and 3 proteins and therefore could trigger apoptotic processes in the brain. It has been determined that the synergistic effects mitochondria and exercise seen in behavioral tests do not occur at the molecular level. Exercise is a traditional approach that reduces symptoms in PD. Moreover, intranasal delivery of mitochondria to the brain is a promising treatment method as it is non-invasive and easily applicable to humans. However, the results obtained show that delivering very large structures such as mitochondria in this way is not very effective. In addition, it has left question marks on the use of mitochondria in neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Parkinson's disease, Mitochondrial transplantation, Bax/Bcl-2, Caspase 1-3, Behavioral experiments.

**Supported by** Hacettepe University Research Foundation (THD-2023-20607).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Parkinson Hastalığı	4
2.2. Mitokondri	4
2.3. Parkinson Hastalığı-Mitokondri İlişkisi	5
2.4. Parkinson Hastalığı ve Egzersiz	7
2.5. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri	9
2.5.1. Nörotoksik Modeller	11
2.5.2. Genetik Modeller	14
2.6. Yeni Bir Tedavi Yaklaşımı: Mitokondri Transplantasyonu	14
2.6.1. İntranazal Mitokondri Transplantasyonu	15
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	17
3.1. Deney Hayvanları	17
3.2. Deney Grupları	17
3.3. Deney Planı	19
3.4. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması	22
3.5. Koşu Bandı Egzersiz Protokolü	23
3.6. Mitokondri Tedavi Prosedürü	25
3.6.1. Mitokondri İzolasyonu	26
3.7. Davranış Deneyleri	27
3.7.1 Yatay Çubukta Zorlu Yürüme Testi	28

3.7.2 Silindir İçerisinde Spontan Aktivite Testi	30
3.8. Protein İzolasyonu	31
3.8.1 Toplam Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	32
3.9. Kas Dokusu Sitrat Sentaz ELISA Ölçümü	32
3.10. <i>Western Blot</i> Analizleri	33
3.10.1. Jel Dökme	34
3.10.2. Elektroforez	34
3.10.3. Transfer	35
3.10.4. Bloklama, Primer ve Sekonder Antikorların Uygulanması	35
3.11. İmmünohistokimya Analizleri	36
3.12. Beyinde Toplam Antioksidan ve Oksidan Seviyesi Analizleri	37
3.13. İstatistiksel Analizler	38
<b>4. BULGULAR</b>	39
4.1. Deney Hayvanları ile İlgili Parametreler	39
4.2. Mitokondriyal Parametreler ve Biyodağılım	40
4.3. Koşu Bandı Egzersizi	44
4.4. Davranış Deneyleri	46
4.4.1. Yatay Çubukta Zorlu Yürüme Testi	46
4.4.2. Spontan Aktivite Silindir Testi	49
4.5. <i>Western Blot</i> Analizleri	59
4.5.1. Bax ve BCL-2 Protein Analizleri	60
4.5.2. Kaspaz 1 ve Kaspaz 3 Protein Analizleri	63
4.5.3. mTOR ve P-mTOR Protein Analizleri	65
4.6. İmmünohistokimya Analizleri	66
4.7. Kas Dokusu Sitrat Sentaz ELISA Ölçümü	70
4.8. Beyinde Toplam Antioksidan ve Oksidan Seviyeleri Analizleri	70
<b>5. TARTIŞMA</b>	72
5.1. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması ve Davranış Testleri	72
5.2. Mitokondri İzolasyonu, Transplantasyonu ve Biyodağılımı	74
5.3. Parkinson Hastalığı ve Egzersiz	76
5.4. Parkinson Hastalığı ve Apoptotik Yolaklar	77

5.5. Parkinson Hastalığı ve Oksidatif Stres	79
5.6. Çalışmanın Kısıtlılıkları	80
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	81
<b>7. KAYNAKLAR</b>	82
<b>8. EKLER</b>	90
Ek-1: Solüsyonlar	90
Ek-2: Etik Kurul İzni	91
Ek-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	93
Ek-4: Dijital Makbuz	95
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	96

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

6-OHDA	6-hidroksidopamin
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	Adenozin 5'-trifosfat
APS	Amonyum persülfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
BME	Beta merkaptoetanol
ÇEG	Çeyrekler arası genişlik
DA	Dopaminerjik
DAB	Diaminobenzidin tetrahidroklorit
DAT	Dopamin taşıyıcı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRP-1	Dinamin ilişkili protein-1
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Etanol
GFAP	Glial fibriler asidik protein
HRP	<i>Horseradish</i> peroksidaz
i.p.	İntraperitoneal

JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine
K	Kontrol grubu
KBB	Kan-beyin bariyeri
MAO-B	Monoamin oksidaz-B
MFN-2	Mitofusin-2
MPDP+	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinyum
MPPP	1-metil-4-fenil-4-propionpiperidinin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
P-mTOR	Fosforolize mTOR
PBS	Fosfat tamponlu salin
PH	Parkinson hastalığı
PHE	PH + Egzersiz Grubu
PHEM	PH + Egzersiz + Mitokondri Grubu
PHM	PH + Mitokondri Grubu
PIC	Proteaz inhibitör kokteyl
PVDF	Polivinil florür
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROS	Reaktif oksijen türleri
SNpc	Substantia nigra pars compacta
TBS-T	<i>Tris-buffered saline ve polysorbate 20 (Tween 20)</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>

UCH-L1	C-terminal hidrolaz
VTA	Ventral tegmental alan

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
3.1.	Deney planı özeti.	21
3.2.	MPTP için alınan koruyucu önlemler ve intraperitoneal enjeksiyon uygulaması.	22
3.3.	Koşu bandı (RT-05) cihazının görüntüleri.	23
3.4.	Koşu bandı egzersizi.	24
3.5.	İntranazal mitokondri uygulaması.	25
3.6.	Mitokondri izolasyon basamakları.	27
3.7.	Yatay çubukta zorlu yürüme testi düzeneği.	29
3.8.	Spontan aktivite silindir test düzeneği.	31
4.1.	Karaciğerden izole edilen mitokondrilerin akım sitometri sonuçları ve ATP analizleri.	41
4.2.	Transplante edilen mitokondrilerin beyin dokusundaki görüntüleri.	43
4.3.	Akciğer dokusu kesitlerinde, transplante edilen mitokondrilerin görüntüleri.	44
4.4.	Yatay çubukta zorlu yürüme testi gruplar arası hata indeksler karşılaştırma grafikleri	48
4.5.	Hata indekslerinin zamana göre değişim grafiği.	49
4.6.	Tedavi sonrası spontan aktivite silindir testi grafikleri.	52
4.7.	Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki arka ayak adım sayıları grafiği.	54
4.8.	Ön ayak adım sayısı/Arka ayak adım sayısı oranının zamana göre değişim grafiği.	55
4.9.	Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki diklenme sayıları grafiği.	56
4.10.	Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki temizlenme süreleri grafiği.	57
4.11.	Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki hareket indeksleri grafiği.	58
4.12.	Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki arka ayak indeksleri grafiği.	59
4.13.	Bax proteininin <i>Western blot</i> analizleri grafiği ve görüntüleri.	60
4.14.	Bcl-2 proteininin <i>Western blot</i> analizleri grafiği ve görüntüleri.	61
4.15.	Bax ışına yoğunluklarının Bcl-2 ışına yoğunluklarına oranı (Bax/Bcl-2) grafiği.	62



<b>4.16.</b>	Kaspaz 1 proteinin <i>Western blot</i> analizleri grafiği ve görüntüleri.	63
<b>4.17.</b>	Kaspaz 3 proteinin <i>Western blot</i> analizleri grafiği ve görüntüleri.	64
<b>4.18.</b>	mTOR proteinin <i>Western blot</i> analizleri grafiği ve görüntüleri.	65
<b>4.19.</b>	Beyin dokusunda DRP-1 İmmünohistokimya görüntüleri.	67
<b>4.20.</b>	Beyin dokusunda MFN-2 İmmünohistokimya görüntüleri.	69
<b>4.21.</b>	Kas dokusunda sitrat sentaz seviyeleri.	70
<b>4.22.</b>	Beyin dokusunda toplam oksidan seviyeleri.	71

**TABLÖLAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	Deney grupları.	19
<b>3.2.</b>	Dökülen jel içeriği, oranı ve yürütölen proteinler..	33
<b>4.1.</b>	Deney hayvanları toplam ağırlık ve kas ağırlıkları.	40
<b>4.2.</b>	Koşu bandı egzersizi gruplarının koşu performansları.	45
<b>4.3.</b>	Koşu bandı egzersizi sırasında yapılan müdahale sayıları.	46
<b>4.4.</b>	MPTP öncesi ve MPTP sonrası yapılan spontan aktivite silindir testi sonuçları.	51
<b>4.5.</b>	Tedavi sonrası yapılan spontan aktivite silindir testi sonuçları.	53
<b>4.6.</b>	Beyin dokusunda toplam antioksidan seviyeleri.	71

## 1. GİRİŞ

Teknolojinin gelişmesi ve tıp dünyasındaki ilerlemeler sayesinde insan ömrü giderek daha da uzamaktadır. Ömür uzunluğu arttıkça karşımıza hem yeni hastalıklar çıkmakta hem de ilerleyen yaşlarda ortaya çıkma olasılığı artan bazı hastalıklardan etkilenen insan sayısı doğal olarak artmaktadır. Bu sebeple bu doktora çalışmasında Parkinson hastalığı çalışılmış ve hastalığa konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra yeni bir tedavi yöntemi ile yaklaşılmıştır. Bu yeni yaklaşım son yıllarda önemli bir ivme kazanmış olan mitokondri transplantasyonudur. Mitokondri hücrelerin enerji metabolizmasını düzenlemede, oksidatif stres ile başa çıkmada, hücre bölünmesi ve ölümünü kontrol etmede kritik rolleri olan oldukça önemli bir organel olması sebebiyle birçok hastalıkta hedef alınmaktadır. Sağlıklı mitokondrilerin zarar görmüş hücrelere ulaştırılabilmesinin oldukça basit ve akılcı bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ökaryotik canlıların evrimsel oluşumuna dair en güçlü teori Boris Kozopolansky'nin endosimbiyoz teorisidir ve günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır. Bu teori kloroplast ve mitokondrilerin iki farklı prokaryotun birleşmesi sonucu oluştuğunu ve ökaryotların bu şekilde meydana geldiğini savunmaktadır (1). Ökaryotların kendi enerji sistemlerini prokaryotlara göre daha iyi kontrol edebilmesi evrimsel süreçte büyük bir avantaj sağlamıştır. Bu sayede ökaryotlar rakiplerine çok fazla avantaj sağlamışlar, günümüzdeki çeşitliliğin en önemli temelini oluşturmuşlardır. Milyonlarca yıllık evrim sonucunda da homo sapiense kadar bu yolculuk devam etmiştir. Aynı yararı hücrelerimiz kendi aralarında mitokondri transferi yaparak devam ettirmektedir. Bu çalışmada da doğal yollarla gerçekleşen mitokondri transferinin bir benzeri oluşturulup canlı için yararları incelenecektir. Mitokondri transplantasyonunun etkilerinin karşılaştırılabileceği konvansiyonel yöntem olarak egzersiz seçilmiştir. Bunun en temel sebebi egzersizin birçok hastalıkta hastalık semptomlarını azaltması ve hastanın hayat kalitesini birçok açıdan arttıran bir tedavi yöntemi olmasıdır. Bunun yanı sıra egzersiz mitokondri dinamiklerini etkileyen bir süreçtir.

Tez çalışmasındaki amaç, nörotoksik ajan 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ile oluşturulan Parkinson hastalığı (PH) fare modelinde intranazal yolla yapılan mitokondri transplantasyonunun ve koşu bandı egzersizinin nöroprotektif etkilerinin ve PH'de iyileşmeye olan katkısının değerlendirilmesidir.

Bu çalışmadan elde edeceğimiz bulgular neticesinde, hasar görmüş *substantia nigra* nöronlarının iyileştirilmesinde ve işlevlerinin yeniden kazandırılmasında, mitokondri transplantasyonu ve egzersizin ayrı ayrı ve kombine olarak etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma hem mitokondri transplantasyonunun intranasal yöntem ile uygulanması sonucu beyin dokusuna ulaşması ve buradaki etkileri hakkında, hem de bu uygulamanın yanında zorunlu egzersizin Parkinson hastalığını nasıl etkilediği hakkında önemli bilgiler vermiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmanın literatüre göre hipotezleri ve bu hipotezler sonucunda özgün değeri şu şekildedir:

#### **Hipotezler:**

- H1: Fare PH modelinde mitokondri transplantasyonu nörodejenerasyonu azaltır.
- H2: Fare PH modelinde mitokondri transplantasyonunun nöroprotektif etkileri zorunlu egzersiz uygulamasına kıyasla daha fazladır.
- H3: Mitokondri transplantasyonu ve zorunlu egzersiz PH'da gözlenen motor işlev bozukluğunu azaltır.

#### **Özgün değerler:**

- Parkinson hastalığında mitokondri transplantasyonu az çalışılmış bir konudur.
- İntranazal yolla mitokondrilerin transplantasyonu hem uygulama kolaylığı hem de kan-beyin bariyerini kolayca aşabiliyor olması sebebiyle bu yöntemin daha fazla araştırılmasını gerektirmektedir.
- Kemirgenlerde yapılan bu çalışmada mitokondri veriliş yönteminin intranasal olması, tedavinin başarılı olup ileriki yıllarda insanlara uygulanma aşamasına geçildiğinde oldukça fazla kolaylık sağlayacak bir yöntemdir.

- Parkinson hastalığında egzersizin etkileri, mitokondri transplantasyonun etkileri ve bu iki tedavi sürecinin etkileşimi açısından öncü bir çalışmadır. Literatürde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır.
- Planlanan çalışmada davranış testleri ve moleküler testlerin bir arada kullanılması, tedavinin işlevsel olarak ne kadar anlamlı olduğunu ayrıntılı bir şekilde literatüre kazandıracaktır.
- Literatürde, MPTP ilişkili Parkinson hastalığı modelinde mitokondri transplantasyonu ve egzersizin etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.
- Mitokondri transplantasyonu ülkemizde çok az ekip tarafından çalışılan bir konudur. Çalışma ekibi bu alanda ülkemizde öncü ekiplerdendir ve bu yöntemin daha çok araştırılması gerekmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH); görülme sıklığı yaş ilerledikçe artan, semptomları ile ilerleme hızı bir kişiden diğerine değişebilen ve dünya çapında seçilen yaş aralığına bağlı olarak 100.000 kişide 40-1.900 vaka prevalansı ile ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (2).

PH, hastaların yaklaşık olarak %90'ında sporadik olarak ortaya çıkarken, %10'unda ise tespit edilen birkaç gendeki çeşitli mutasyonlar neticesinde gelişmektedir. Otozomal dominant olarak aktarılan  $\alpha$ -sinüklein ve C-terminal hidrolaz (UCH)-L1'a ek olarak otozomal resesif olarak aktarılan parkin genlerindeki mutasyonlar sonucu gelişen PH ile dopaminerjik nöron kaybı arasındaki ilişki aydınlatılmaya başlansa da idiyopatik Parkinson hastalığının patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çeşitli genetik ve çevresel risk faktörlerinin etkileşimi sonucu gelişen ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık özelliği gösteren PH belirtileri öncelikle somatomotor işlev bozukluklarını (harekete başlama zorluğu, tremor, rijidite, bradikinezi, duruş bozukluğu, yürüyüş işlev bozukluğu vb.) içermektedir (3). Hastalığın seyri süresince motor olmayan işlevlerde (demans, hipozmi ve gastrointestinal bozukluklar) de bozulmalar görülmeye başlanır (4). Bahsi geçen motor ve motor olmayan işlevlerdeki bozukluklar hastaların günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirmelerini önemli ölçüde zorlaştırmaktadır (5). PH patogenezinin en önemli sonucu olarak görülen dopaminerjik hücre ölümünün altında yatan mekanizmalar konusunda öne sürülen hipotezler; mitokondri işlev bozukluğu, protein yıkım yollarında meydana gelen değişimler,  $\alpha$ -sinüklein gibi proteinlerin yanlış katlanarak birikmesi ve/veya nöroinflamatuvar süreçleri içermektedir.

### 2.2. Mitokondri

Mitokondri ilk olarak 1800'lü yılların ortalarında önce ökaryotik hücrelerde tanımlanmış ve sitozolde serbestçe yüzen bireysel veziküllerin birleşimi olarak

tanımlanmıştır. Mitokondrinin evrimsel kökenine ilişkin kabul gören hipotez, bu organelin ökaryotik hücreler ile oksidatif fosforilasyon yapabilen ilkel bakteriler arasındaki simbiyotik bir ilişkiden kaynaklandığını öne sürmektedir (6). Bu hipotez, mitokondriyal DNA'nın keşfedilmesi ve bu organelin protein sentezi için kendi mekanizmalarına sahip olduğunun bulunması ile desteklenmektedir (6).

Mitokondrinin birincil işlevi, oksidatif fosforilasyon yoluyla adenozin 5'-trifosfat (ATP) formunda hücresel enerji üretmektir. Bu nedenle, mitokondri organeli genellikle "hücresel enerji santrali" olarak kabul edilir. Bununla birlikte, mitokondrinin biyolojik işlevi sadece enerji üretiminin çok ötesine uzanmaktadır; amino asit ve lipit metabolizması gibi önemli hücresel işlevlerin yanı sıra piruvat oksidasyonu, Krebs döngüsü, kalsiyum homeostazının düzenlenmesi, serbest radikallerin temizlenmesi veya programlanmış hücre ölümünün kontrolü gibi çeşitli metabolik yollara da ev sahipliği yapan ve karmaşık yapısal özelliklere sahip olan dinamik yapıda organellerdir. Mitokondrinin bahsi geçen dinamik yapısını sağlayan ve sürekli tekrar eden iki önemli mekanizma; füzyon (iki mitokondrinin tek bir organelde birleşmesi) ve fisyon (mitokondrinin işlevsel iki veya daha fazla küçük parçaya ayrılması) olarak tanımlanabilir. Mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları hala tam olarak bilinmeyen hassas bir denge tarafından düzenlenmekte olsa da bu mekanizmaların mitokondriyal bütünlük ve işlevsellik açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Son dönemde bilim insanları tarafından geliştirilen tedavilerden birisi olan mitokondrielerin sağlıklı hücre veya dokulardan alınarak hasta organizma ve/veya dokuya verilmesi ile bu hastalıklara tedavi sağlanabileceği gösterilmiştir (7).

### **2.3. Parkinson Hastalığı-Mitokondri İlişkisi**

Son yıllarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar PH'de karakteristik olarak görülen dopaminerjik (DA) nöron kaybının apoptoz yoluyla gerçekleştiğini öne sürmektedir (8). Ek olarak, bu çalışmalar apoptoz süreçlerinde önemli roller oynayan mitokondri organelinin bu hastalığın gelişim aşamalarında alabileceği roller konusunda bulgular sunmaktadır. Özellikle anormal mitokondriyal form ve işlevin (özellikle kompleks-1 aktivitesindeki bozukluklar) yanı sıra artan oksidatif stresin PH

gelişimindeki rolünü destekleyen güçlü kanıtlar mevcuttur (9). PH patogenezi sonucunda yaşamı sonlanan hastaların beyin dokuları incelendiğinde elektron taşıma zincirinin önemli bir bileşeni olan kompleks I aktivitesinin substantia nigra ve frontal korteks bölgelerinde azaldığı görülmüştür (10). Elektron taşıma zincirinde ortaya çıkan aksaklıkların hücreleri Bax kaynaklı apoptoza (intrinsik yol) karşı savunmasız hale getirdiği ve hastalık sürecinde hücre ölümü ve işlev kaybına katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu noktada Bax ile PH patogenezi konusunda birkaç önemli noktaya değinmek gerekmektedir.

Bax, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir. Bcl-2 ailesinde yer alan proteinler hücrelerde apoptozun önemli düzenleyicileridir. Bax özetle, mitokondriyal dış zarda geçirgenliği artırarak sitokrom c'nin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitozole geçmesini indükler (11, 12). Sitokrom c sitozolde apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) bağlanır. Bu bağlanma ise Apaf-1'in kaspaz 9'u aktive etmesini sağlayarak kaspaz 3 gibi efektör kaspazların parçalanmasını sağlar (13). Bax'ın apoptotik süreçlerde aldığı diğer bir rol ise anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin BH3 bölgeleri (*Bcl-2 homology domain 3*) ile heterodimer oluşturmak suretiyle işlevlerini inhibe etmektir. Bu yollara alternatif olarak, apoptoz indükleyici faktörün (AIF) salınımı, hücresel parçalanma ve kaspaz 3 aktivasyonunu doğrudan da indükleyebilir (14).

Bahsi geçen *in vitro* bulgulara ek olarak manyetik rezonans spektroskopisi ile temporoparietal bölge ve oksipital lobda PH'ye eşlik eden artmış serebral laktat seviyelerinin tespit edilmesi bu hastalarda anaerobik metabolizmaya geçiş olduğunu da gösterir niteliktedir (15, 16). PH gelişimi ile birlikte seyreden mitokondriyal işlev bozuklukları oksidatif stresin de artmasına neden olmaktadır. PH sürecinde artan oksidatif stres lipit, protein ve DNA düzeyinde hasara sebep olmakta, önemli bir antioksidan olan glutatyon seviyelerindeki azalma ise bu hasarın boyutunu artırmaktadır (17-19). Hücresel düzeyde artan oksidatif stres  $\alpha$ -sinüklein agregasyonunu indüklerken buna eşlik eden antioksidan seviyelerindeki azalma ise proteozomal ubikuitinasyon ve protein yıkımını tetikleyerek PH'nin karakteristik özelliği olan Lewy cisimlerinin birikimi konusunda sinerjistik etki oluşturmaktadır. Oksidatif strese ek olarak, kompleks I inhibitörlerinin de PH'de görülen temel motor bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir. Bahsi geçen inhibitörlerden belki de en ünlüsü



ve daha sonra PH hayvan modellerinde en sık kullanılan kimyasallardan biri olan metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridine (MPTP) sayılabilir (20). Deney hayvanlarına *in vivo* MPTP uygulamasını takiben Bax proteininde mRNA ve ifade düzeyi bakımında ortaya çıkan değişiklikler (artış) de Bax'ın PH patogenezinde alabileceği önemli rolleri düşündürmektedir (21).

MPTP gibi bir pestisit olan rotenonun da sıçanlarda kronik maruziyet sonucu dopaminerjik nöronların seçici kaybı ile birlikte ubikuitin ve  $\alpha$ -sinüklein içeren Lewy cisimciği benzeri fibriler sitoplazmik inklüzyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (22). Herbisit olarak kullanılan parakuatın mitokondriyal serbest radikal oluşumunu artırarak dopaminerjik nöron kaybı ile karakterize motor bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (23). Çalışmalar bahsi geçen çevresel kompleks I inhibitörlerinin PH patogenezindeki kesin rolünü belirleyemese de çevresel toksinlere maruziyet konusunda endişe verici sonuçlar sunmaktadır.

Hüresel düzeyde mitokondri yalnızca elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyonda kilit bir role sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda hücrede serbest radikallerin ana kaynağıdır, kalsiyum homeostazında ve hücre ölümü yolaklarının düzenlenmesi ve başlatılmasında da önemli rol oynar. PH ile ilişkili bir dizi genin bahsi geçen yolaklarla etkileşimde olduğu, mitokondriyal fisyon ve füzyon dengesini etkilemek suretiyle mitokondriyal tübüler yapıların dinamik doğasını değiştirdiği bulunmuştur. Ek olarak, Parkinson hastası tüm bireylerde mitokondri işlev bozukluğunun tespit edilememesi hastalık patofizyolojisindeki heterojenliği de ortaya koymaktadır (24).

#### **2.4. Parkinson Hastalığı ve Egzersiz**

PH yönetiminde farmakolojik tedavi (levadopa, dopamin agonistleri vb.) ana unsur olsa da cerrahi seçenekler (derin beyin stimülasyonu) de bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (25). Cerrahi tedavi seçenekleri invazif olmaları ve cerrahiye eşlik edebilen yan etkiler sebebiyle tercih edilmemektedir. Farmakoterapi açısından bakıldığında ise; hastalık ilerledikçe kötüleşen motor semptomlar (diskinezi, donma vb.) hastaların tedaviye daha kısa süreli ve sınırlı (zayıf) bir yanıt vermesine sebep olmakta, bu durum da hastalığın ileri evrelerinde daha sık dozlarda levadopa ve

dopamin agonistlerinin kullanılmasını sağlamaktadır (26). Her ne kadar farmakoterapi bu hastalığın tedavisinde en sık kullanılan yöntem olsa da semptomatik tedavi açısından giderek artan düzeyde uygulanan ilaçlara rağmen hastalarda yürüyüş ve denge bozukluklarının devam etmesi potansiyel olarak ciddi komplikasyonlara, düşme ve yaralanmalara sebep olabilmektedir. Hastalık ilerledikçe daha belirgin hale gelen depresyon, yorgunluk ve ilgisizlik gibi motor olmayan semptomlar hastaların fiziksel aktivitelerini daha da kısıtlayarak kişileri daha sedanter bir yaşam tarzına itmektedir. Fiziksel aktivite kabiliyetindeki azalma ve sedanter yaşam biçimi hastalar için kısır döngü oluşturmakta ve bu durum da PH'nin daha hızlı ilerlemesine neden olmaktadır (27).

Hasta sağlığı ve refahı için PH'nin farmakolojik ve cerrahi olarak yetersiz yönetimi bu nörodejeneratif hastalığın tedavisinde yeni yöntemlerin aranmasına yol açmıştır. Örnek olarak, Hareket Bozukluğu Derneği Kanıtı Dayalı Tıp Paneli PH tedavisinde egzersiz ve fizik tedaviyi farmakolojik tedaviye yardımcı olarak önermektedir (28). PH tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı bir tedavi olarak görülen egzersizin nöroplastisite ve beynin kendini onarma yeteneğine çeşitli katkılarda bulunduğu birçok çalışma kapsamında gösterilmiştir (29-31).

Tam olarak tedavisi günümüz şartlarında mümkün olmadığından ve mevcut farmakolojik seçeneklerin semptomatik tedaviden öteye geçememesi sebebiyle son yıllarda PH araştırmalarının çerçevesi, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için yeni ajanların bulunması üzerine odaklanmıştır. Bu tartışmada genellikle göz ardı edilen taraf ise düzenli egzersizin PH ilerlemesi üzerindeki potansiyel faydasıdır. Literatür bilgileri düzenli egzersizin kardiyovasküler ve serebrovasküler sağlığın iyileştirilmesi, osteoporoz/kırık riskinin ve yaşa bağlı sarkopeninin azaltılması, psikolojik ve hatta belki de genel bir anti-enflamatuvar etki de dahil olmak üzere bir çok yararı olduğunu göstermektedir (32).

Farklı egzersiz çeşitleri ele alındığında aerobik egzersiz literatür kapsamında en çok çalışılan tür olmakla birlikte insan sağlığı ve yaşam kalitesi açısından da en iyi seçenek olarak kabul edilmektedir (33). Çalışmalar, aerobik egzersizin nörorestoratif ve nöroprotektif etkilere sahip olduğunu, bu etkiyi de sinaptogenez ve anjiyogenezi destekleyen nörotrofik faktörleri düzenleyerek, oksidatif stresi inhibe ederek ve

mitokondriyal işlevleri iyileştirerek gösterdiğini ortaya koymaktadır (34). Bu konuda yapılan birçok çalışma koşu bandı, yürüyüş ve dans gibi aerobik egzersizlerin orta ila şiddetli PH'de hastanın yürüme, denge ve yaşam kalitesini de iyileştirdiğini göstermektedir (35).

Daha önce de belirtildiği gibi tüm PH vakalarının yaklaşık %10'u genetik mutasyon kökenli olsa da çoğunluğu idiyopatiktir ve birden fazla çevresel ve genetik risk faktörü hastalığın gelişimine katkıda bulunmaktadır. Etiyolojisine benzer olarak, PH'nin klinik fenotipi de heterojendir. PH'nin motor ve motor olmayan semptomları klinik olarak saptanıp ayrıntılı biçimde sınıflandırılrsa da hastalığın patolojik süreçleri beyinde gerçekleştiğinden dolayı bu konudaki araştırmalar ancak post-mortem dokuların incelenmesiyle gerçekleşebilmektedir. Bu sebeplerle, bu çok yönlü hastalık hakkındaki anlayışımızı geliştirmek ve şu anda sınırlı olan tedavi seçeneklerini genişletebilmek için deneysel hayvan modellerine büyük ihtiyaç vardır.

## 2.5. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri

Deney hayvanlarında PH'yi modellemek için iki yöntem kullanılmaktadır: nörotoksinler ve genetik. Nörotoksinler, PH'de rol oynayan çevresel faktörlerden kaynaklanan dopaminerjik nörodejenerasyonu geliştirebilmekte ve genellikle *substantia nigra pars compacta*'da (SNpc) güçlü ve hızlı bir hücre kaybına neden olmaktadır. Nörotoksinler ile geliştirilen PH modellerinde hastalığın motor semptomları ve davranışsal değişiklikleri modellenenirse de hastalığın bir diğer karakteristik özelliği olan Lewy cisimciklerinin birikimi görülmemektedir. Genetik temelli modellerde ise hücre kaybı ve motor semptomların gelişimine ek olarak kullanılan modele bağlı olmak kaydıyla  $\alpha$ -sinüklein patolojisi de ortaya çıkabilmektedir. PH'de genetik modellerin geliştirilmesinde en sık kullanılan yöntemler transgenik hayvanlar ve viral transfeksiyonlar olarak sayılabilir. PH'yi modellemek için yaygın olarak 3 hayvan grubu kullanılmaktadır: Kemirgenler, insan dışındaki primatlar ve memeli olmayan bazı türler. Her grubun PH hayvan modelinin geliştirilmesi hususunda belirli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Kemirgenler; laboratuvar koşullarında bakım kolaylığı, çeşitli ilaç uygulama yöntemlerinin varlığı, transgenik çeşitlilik ve ayrıntılı davranışsal değerlendirme

parametreleri de dahil olmak üzere araştırmacılar açısından birçok avantaja sahiptir. Kemirgenlerde PH modellerinin bir diğer avantajı ise, nigro-striatal dopaminerjik dejenerasyonun motor bozukluklarla doğrudan ilişkili olmasıdır. Bahsi geçen motor bozukluklar n pençelerin hareketi, kavraması veya gücünü ölçmeyi içeren bir dizi davranışsal testle gözlemlenebilmekte ve hassas olarak llebilmektedir. PH kemirgen modellerinde lokomotor aktivite değerlendirmesinde açık alan testi, akinezi için zorlu yürütme testleri, bradikinezi değerlendirilmesinde ise direk testi en sık kullanılan yöntemlerdir (36). Kemirgenlerde rijiditeyi ölçmek zor olsa da rotarod testi hayvanlarda denge, g ve koordinasyonu aynı anda ölçtüğü için bu kapsamda kullanılabilir bir test olarak değerlendirilebilir.

PH modellerinde en sık kullanılan yöntemlerden biri deney hayvanlarının beyinlerinde tek taraflı lezyon oluşturmaaktır. Tek taraflı lezyonlar, araştırmacıların kontralateral uzuvların kullanımında gelişen bozuklukları bir nevi kendi iç kontrolü olan ipsilateral uzuvlarla karşılaştırabilmelerine olanak sağlamaktadır. Bu tip modellerde apomorfin benzeri ilaçlar ile indüklenen çember çizme davranışı lezyonlu tarafın aşırı duyarlılığı sebebiyle kontralateral rotasyonlara sebep olmaktadır (37). PH hayvan modellerinde en sık görülen motor olmayan semptomlar ise uyku bozukluğu, yeme bozukluğu, kilo kaybı ile birlikte anksiyete veya kompulsif davranışlara işaret eden aşırı temizlenme davranışları sayılabilir (38).

PH modellerinde kullanılan bir diğer grup olan insan dışı primatlar ise insanlara olan anatomik ve genetik benzerlikleri sebebiyle değerli bilgiler sunabilme potansiyeli içermektedir. Kemirgenlerle karşılaştırıldığında, insan dışı primatların boyut olarak daha büyük olması, daha uzun yaşam süresine sahip olması, daha zorlu bakım gerektirmesi gibi etkenler araştırmacılar için daha yüksek maliyetlere sebep olmaktadır. Ek olarak, insan dışı primatların deneysel araştırmalarda kullanılmaları için gerekli olan etik izinlere dair süreçlerin karmaşık ve zorlu olması da araştırmacıları diğer hayvan gruplarını kullanmaya yöneltmektedir (39). PH çalışmalarında en sık kullanılan insan dışı primat türleri makaklar ve marmosetlerdir. Ek olarak, literatür kapsamında sincap maymunu, afrika yeşil maymunu ve babun gibi insan dışı primatların kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (40).

PH modellemesinde kullanılan memeli olmayan türler arasında *Drosophila* ve *Caenorhabditis elegans* öne çıkmaktadır. Bu türler kolayca üretilebilmeleri, çok çeşitli genetik manipülasyonlara hedef olabilmeleri, düşük bakım maliyetleri ve iyi tanımlanmış nöropatolojik ve davranışsal parametreleri dolayısıyla ilgi çekmektedirler. Tüm bunlara ek olarak, bu türlerin genetik haritalandırmalarının yüksek oranda tamamlanmış olması bu türleri PH gelişiminde meydana gelen hücrel ve genetik değişikliklerin araştırılması için önemli adaylar haline getirmektedir. Bununla birlikte, bahsi geçen türlerin davranışsal ve patofizyolojik mekanizmalarının insan türü ile bağdaştırılmasındaki zorluklar bu türlerin PH modelleme çalışmalarında tercih edilme oranlarını önemli ölçüde düşürmektedir (41, 42).

### 2.5.1. Nörotoksik Modeller

Nörotoksik PH modelleri, çeşitli ajanların deney hayvanlarına lokal veya sistemik olarak uygulanmasıyla indüklenen dopaminerjik nöron dejenerasyonuna dayanmaktadır. Nörotoksik ajanlardan ilk keşfedileni olan 6-hidroksidopamin (6-OHDA), başlangıçta sempatik sinirleri dejenere etmek için periferik olarak uygulanmış olsa da daha sonraları PH'yi modellemek için beyinde kullanılmıştır (43).

PH modellerinde sıklıkla kullanılan bir diğer nörotoksin olan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ise kendisi opioid bir ilaç olan 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidinin (MPPP) keşif sürecinde kimyasal olarak indüklenen parkinsonizm vakaları sebebiyle keşfedilmiştir. Tarımsal amaçlı kullanılan pestisitlere maruz kalan popülasyonlarda PH riskinin arttığına dair çalışmalar, çeşitli pestisit ve herbisitlerin PH hayvan modellerinin geliştirilmesi açısından kullanımını teşvik ederken, çevresel risk faktörlerinin PH gelişimi üzerine olan etkilerini de düşünmeyi gerektirmektedir (44).

MPTP, PH hayvan modellerinin geliştirilmesi için en sık kullanılan nörotoksinlerden biridir. Kullanılan protokole bağlı olarak farklı yollarla akut veya kronik olarak uygulanabilmektedir (45). MPTP, lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini (KBB) kolayca geçebilme özelliğine sahiptir. Beyin dokusuna geçmesini takiben bu nörotoksin glial hücreler tarafından alınır ve burada önce monoamin oksidaz-B (MAO-B) tarafından 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum'a (MPDP<sup>+</sup>)

dönüştürülür, ardından oksidasyonla toksik bir ajan olan 1-metil-4-fenilpiridinyum'a (MPP+) dönüşür (46). Organik katyon taşıyıcı 3 aracılığıyla parankime geri salınan MPP+ dopamin taşıyıcı (DAT) aracılığıyla dopaminerjik hücrelere seçici olarak taşınır ve sitoplazma ile birlikte ve veziküler monoamin taşıyıcılar (VMAT+) içerisinde birikmeye başlar. Biriken MPP+ mitokondriyal kompleks I'i bloke ederek ATP üretimini azaltır, oksidatif stresi artırır ve nihayetinde hücre ölümü ve nöroinflamasyona neden olur.

MPTP, fareler ve insan dışı primatlarda PH'yi modellemek için sıklıkla kullanılmakta iken sıçanlar bu nörotoksine karşı sebebi hala tam olarak bilinmeyen bir direnç gösterdikleri ve yüksek doz ile mortalite oranlarının artması sebebiyle tercih edilmemektedir (47). Fareler daha önce de belirtilen deneysel avantajları sayesinde MPTP ile PH modeli geliştirilmesinde en sık kullanılan hayvan türü olmuştur. Tüm bu bilgilere ek olarak, farelerde nörotoksin aracılığı ile oluşturulacak olan lezyonun düzeyi uygulanan doza, uygulama yoluna ve kullanılan fare alt türüne göre de değişebilmektedir (48). Bu kapsamda, ileri düzey lezyonlar PH'nin geç aşamalarını modellemek için yararlı olduğundan özellikle ilaç keşfi, derin beyin stimülasyonu, hücre nakli ve gen tedavisi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Uygulama yolu açısından incelendiğinde en sık kullanılan yöntem intraperitoneal (i.p.) enjeksiyondur. Genellikle akut olarak uygulanan MPTP ilginç biçimde ventral tegmental alan (VTA) yerine özellikle SNpc'de dopaminerjik nöron kaybına neden olmaktadır (49). İntraperitoneal MPTP uygulamasını takiben nörodejenerasyon saatler içinde başlamakta ve yaklaşık 7 gün içinde stabilize olmaktadır. Çalışmalar, farelerde akut doz uygulamasının (20 mg/kg'a kadar-2 saat ara ile toplam 4 enjeksiyon) striatal dopamin seviyelerinde %90 azalmaya yol açtığını ve SNpc'deki dopaminerjik nöronların ise %70 oranında kaybına neden olduğunu göstermektedir. İlginç şekilde MPTP uygulaması insanlarda PH patogenezinin tanımlanmasında önemli bir kriter olan  $\alpha$ -sinüklein birikimine neden olmamaktadır (45).

Farelerde MPTP ile indüklenen dopaminerjik dejenerasyon ölçülebilen motor bozukluklara da sebep olmaktadır. Bununla birlikte, bahsi geçen motor bozuklukların

zamanla düzelme göstermesi araştırmacıların davranışsal çalışmaların sürelerini planlamaları açısından engel oluşturmaktadır (50).

Akut doz uygulaması modeline alternatif olarak, kronik MPTP uygulaması (tekrarlanan günlük i.p. enjeksiyonları) da literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu iki model arasında nörodejeneratif süreçler açısından benzerlik olsa da kronik model ile birlikte  $\alpha$ -sinüklein birikimi görülmesi önemli bir fark olarak ortaya çıkmaktadır (51).

PH hayvan modellerinde sıklıkla kullanılan diğer bir nörotoksin türü ise 6-OHDA'dır. 6-OHDA bir dopamin ve norepinefrin analogu olmakla birlikte dopamin metabolitlerinin hidrosilasyonu yoluyla endojen olarak da üretilmektedir (52). MPTP'nin aksine 6-OHDA kimyasal yapısı sebebiyle KBB'yi geçemez. Bu sebeple de deney hayvanlarında 6-OHDA aracılı nörodejenerasyonu indüklemek için bu toksinin doğrudan beyine uygulanması gerekmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta beyin dokusuna verilen 6-OHDA'nın hücelere taşınma yoludur. Uygulanan 6-OHDA monoamin taşıyıcıları yardımıyla hücelere alındığından bu nörotoksenden hem dopaminerjik hem de noradrenerjik nöronlar etkilenebilir. Bu durumun önüne geçmek ve dopaminerjik nöronları seçici olarak hedefleyebilmek için deney hayvanlarına noradrenerjik geri alım inhibitörleri (r. desipramin) de uygulanmalıdır (37). Sonuçta hücre içine alınan 6-OHDA mitokondriyal kompleks I'i inhibe ederek süperoksit radikalleri, hidrosil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) retir ve oksidatif stres yoluyla hücre ölümüne neden olur (43).

6-OHDA enjeksiyonları beyinde özellikle SNpc, striatum veya medial n beyin demetini hedefleyerek tek taraflı, hemi-Parkinson modellerinin oluşturulmasını sağlar. Bilateral enjeksiyonlar genellikle adipsi, afaji ve yüksek mortaliteye sebep olduğundan tercih edilmemektedir. Sıçanlarda 6-OHDA'nın SNpc'ya enjeksiyonunu takip eden 24 saat içinde güçlü bir dopaminerjik dejenerasyon başlar ve enjeksiyonu takip eden birkaç gün içerisinde %90 oranında striatal dopamin kaybı gözlenir (46). Striatum bölgesine yapılan 6-OHDA enjeksiyonları ise 1-3 haftalık süreçte nigro-striatal nöronların retrograd dejenerasyonuna yol açar.

### 2.5.2. Genetik Modeller

Genetik PH hayvan modelleri incelendiğinde, fare türü genetik manipülasyonların (transgenik veya *knockout*) en sık ve kolaylıkla uygulanabildiği tür olması sebebiyle nörodejeneratif hastalıkların genetik modellemesinde en sık kullanılan tür olarak karşımıza çıkmaktadır (53). Otozomal dominant PH genetik modelleri hastalığın deney hayvanında kısa sürede gelişimini sağlamak için hedef genlerin aşırı ekspresyonuna dayanmaktadır. Fakat, insanlarda PH'nin gelişim süreci ilişkili genlerin aşırı ifadesini içermediğinden transgenik PH hayvan modellerine ihtiyatlı yaklaşma gereksinimi doğmaktadır. İnsanlarda sporadik PH vakaları incelendiğinde hastalık gelişiminde birden çok gendeki bozukluğun aynı anda rol aldığı tespit edilmiştir. Bu durum özellikle monogenik PH modellerinin hastalık gelişiminde nörotoksin aracılı modellere kıyasla hastalığın gerçek patofizyolojisini yansıtmada daha zayıf kalacağını düşündürmektedir (54). Ek olarak, genetik PH modellerinde hastalık gelişiminden beklenen düzeyde dopaminerjik nöron kaybının gerçekleşmediğinin tespit edilmesi araştırmacıların nörotoksik modelleri daha sık tercih etmesini sağlamaktadır (55-57). Genetik PH modeli geliştirmede sıklıkla hedeflenen beş genin insanlarda da sporadik PH gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Bu genler;  $\alpha$ -sinüklein, Parkin, DJ-1 ve Pink-1 olarak sıralanabilir (58).

### 2.6. Yeni Bir Tedavi Yaklaşımı: Mitokondri Transplantasyonu

Mitokondriyal disfonksiyonun, bir çok nörodejeneratif hastalıkta, yaşlanma ile ilişkili hastalıkların gelişiminde önemli roller oynadığının görülmesi araştırmacıları izole edilen sağlıklı mitokondrilerin transplantasyon yolu ile fonksiyonu bozulmuş mitokondrilerle değiştirilebileceği fikrine yaklaştırmıştır (59, 60). Bu tedavi yaklaşımındaki amaç sağlıklı mitokondrilerin transplantasyonu vasıtası ile hasar almış hücrenin tekrar sağlıklı mitokondrilere kavuşmasını sağlamaktır. Bu kapsamda gerçekleştirilen birçok çalışma mitokondriyal transferin alıcı hücrelerde yer alan mitokondrilerin fonksiyon, metabolizma ve işlevlerinde iyileşmeyi düşündürecek etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır (61-63).

McCully ve arkadaşlarının bu konudaki öncü çalışmaları, sağlıklı mitokondri transplantasyonunun iskemik lezyonlarda rejeneratif etkiler oluşturduğunu



göstermektedir (64-66). Ancak, akut bir hasarı temsil eden iskemi modeli kapsamında yararlı etkileri gözlenen mitokondriyel transplantasyonun, kronik biçimde geliştiği bilinen nörodejeneratif hastalıklar üzerinde de aynı etkiyi gösterip göstermeyeceği bu kapsamda gelecekte gerçekleştirilecek olan çalışmalara bağlıdır. Nörodejeneratif hastalıkların gelişim sürecinde mitokondriyel disfonksiyona ek olarak birçok hücrenel ve moleküler bozuklukların da rol alması durumu daha karmaşık bir hale getirmektedir. Buna rağmen; sentetik ADP/ATP veya DNA hasarı içeren mitokondri transplantasyonunun alıcı hücrelerinde intakt mitokondri transplantasyonuna benzer oranda iyileştirici etkiler göstermemesi bu konuyu ilgi çekici hale getirmektedir (67).

### **2.6.1. İntranazal Mitokondri Transplantasyonu**

Kan-beyin bariyeri, merkezi sinir sistemi (MSS) ile vücudun geri kalanını neredeyse tamamiyle birbirinden ayıran; sistemik dolaşımda yer alan küçük moleküllerin %98'inden fazlası, büyük moleküllerin ise neredeyse tamamının MSS'ye geçişini önleyen sıkı bir bariyerdir (68). KBB, sistemik dolaşım ile MSS arasında molekül, hücre ve iyonların hareketini önemli ölçüde kısıtlayarak MSS homeostazının düzenlenmesinde önemli rol almaktadır. Çeşitli toksin ve patojenlerin yanısıra terapötik moleküllerin de MSS'ye geçişini engellemesi dolayısıyla araştırmacılar uzun yıllar boyunca KBB geçirgenliğini modüle etmek veya KBB'yi atlayarak MSS'ye ulaşmak için çeşitli yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır.

İntraserebroventriküler veya intraparakimal enjeksiyonlar terapötiklerin MSS'ye iletilmesi konusunda ilk akla gelen yöntemler olsalar da, bu yöntemlerin invazif ve riskli olmaları tercih edilmelerini engellemektedir. Ek olarak, kendine özgü damarlanma yapısı sayesinde MSS'ye yapılan enjeksiyonların difüzyon oranlarının yavaş olması ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'un yüksek filtreleme kapasitesi de bu yöntemlerin kullanılmasını zorlaştıran diğer faktörlerdir.

İntranazal uygulama, KBB'yi atlayarak trigeminal ve olfaktör sinirlerin izlediği yolları kullanıp MSS'ye ulaşmayı sağlayan ve invazif olmayan bir yöntemdir (69, 70). Bu yöntem, ilk olarak 1989 yılında Alzheimer Araştırma Merkezi'nden William H. Frey II tarafından önerilmiş ve takip eden yıllarda gerçekleştirilen bir çok çalışma sayesinde etkinliği gösterilmiştir. Örnek olarak, buğday aglütinini ile konjüge karaturp

peroksidaz ile işaretlenmiş maddelerin olfaktör sinir aksonları içinde taşınarak MSS'deki koku soğancığına ulaştığı gösterilmiştir (71). İntranazal uygulama yolu ile ilgili yapılan farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalar bu yolla verilen moleküllerin oldukça hızlı ve etkili biçimde MSS'ye ulaştığını göstermiştir. Bu sebeplerle intranazal ilaç uygulama yolu günümüzde PH, Alzheimer hastalığı (AH), Huntington hastalığı ve epilepsi de dahil olmak üzere birçok MSS hastalığının tedavisi için yeni bir yaklaşım sunmaktadır. Hücreler için hayati önem taşıyan mitokondriler de replasman tedavi seçenekleri kapsamında klinikte birçok hastalığın tedavisinde umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır (72).

Yukarıda verilen bilgiler kapsamında intranazal mitokondri transplantasyonu uygulaması kendisi de mitokondriyal disfonksiyon ile yakın ilişkili olduğu çalışmalar kapsamında gösterilen PH tedavisinde yeni ve umut verici bir yol olarak ortaya çıkmaktadır. Ek olarak, birçok çalışma kapsamında sağlıklı hücrelerden elde edilen mitokondrilerin *in situ* veya intravenöz uygulamalarının mitokondri işlevlerinde iyileşmelere sebep olması bu organelin terapötik potansiyeli hakkında umut vermektedir (73, 74).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu doktora tez çalışmasında Kobay A.Ş'den alınan 4-6 haftalık (20-25 gram), 44 adet *C57BL6* cinsi erkek fare kullanılmıştır (Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu; 2021/15 Onay; 2022/09-10 Karar numarası- Etik kurul onayı Ek 1'de verilmiştir). Tez çalışması planlanırken *G-power* programı kullanılarak örneklem genişliği hesaplanmış ve istatistiksel değerlendirmelerin yapılabilmesi için gereken en az hayvan sayısı  $n=8$  olarak belirlenmiştir. Fareler temin edildikten sonra sonra geçici barındırma ruhsatı olan Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı deney hayvanları laboratuvarına getirilmişlerdir. Herhangi bir kısıtlama olmaksızın, sıkıştırılmış standart fare yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir. Gece gündüz döngüsü 12 saat (Beyaz ışık 08:00-20:00 arası) iç sıcaklığı  $24\pm 2$  °C, nem oranı  $55\pm 10\%$  olacak şekilde ayarlanmış laboratuvar koşullarında barındırılmışlardır. Tüm hayvan deneylerinde deney hayvanı kullanım sertifikasına sahip araştırmacılar görev almıştır. Deney protokolleri ülkemizde yürürlükte olan ilgili yasal mevzuat ile birlikte ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberi" (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8<sup>th</sup> Ed.*) (75) kapsamında belirlenen kurallara göre hazırlanmış ve çalışma boyunca bu kurallara uygun davranılmıştır.

#### 3.2. Deney Grupları

Deney hayvanları laboratuvara getirildikten sonra 3 gün boyunca ortama adapte olmaları sağlanmış ve ardından deney protokolüne geçilmiştir.

Tez çalışmasında 5 farklı grup oluşturulmuştur. Gruplar çalışmanın amaç ve hipotezlerine göre aşağıda belirtildiği şekilde ayarlanmıştır. Deney grupları dışında mitokondrilerin beyindeki biyodağılımını göstermek amacı ile 2 hayvandan oluşan ek bir grup daha oluşturulmuştur (Tablo 3.1.)

**a. Kontrol Grubu (K) (n=6):** Bu gruptaki hayvanlara aynı gün içerisinde 2 saat ara ile 4 doz intraperitoneal serum fizyolojik verilmiştir. Bu işlemden 1 hafta sonra 4 hafta boyunca haftada 1 kez 20 µl (her nostril için 10 µl) serum fizyolojik intranasal

yolla verilmiştir. Bu şekilde hem MPTP uygulaması hem de mitokondri transplantasyonu taklit edilmiştir. Grubun oluşturulmasının amacı negatif kontrol oluşturabilmektir.

**b. Parkinson Hastalığı Grubu (PH) (n=6):** PH modelinin geliştirilmesi için bu gruptaki hayvanlara aynı gün içerisinde 2 saat ara ile 4 doz 20 mg/kg MPTP (Toplamda 80 mg/kg) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 1 hafta sonra 4 hafta boyunca haftada 2 kez 20 µl (her nostril için 10 µl) serum fizyolojik intranazal yolla farelere verilmiştir. Grubun oluşturulmasının amacı pozitif kontrol oluşturabilmektir.

**c. Parkinson Hastalığı + Egzersiz Grubu (PHE) (n=8):** Bu gruptaki hayvanlara aynı gün içerisinde 2 saat ara ile 4 doz 20 mg/kg MPTP (Toplamda 80 mg/kg) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Son enjeksiyondan 1 hafta sonra günde 30 dakika, haftada 5 gün ve toplamda 4 haftalık koşu bandı egzersizi yaptırılmıştır (30 dk/5 gün/4 hafta). Grubun oluşturulmasının amacı 4 haftalık egzersizin PH'ye olan etkisini incelemektir.

**d. Parkinson Hastalığı + Egzersiz + Mitokondri (PHEM) (n=8)** Bu gruptaki hayvanlara aynı gün içerisinde 2 saat ara ile 4 doz 20 mg/kg MPTP (Toplamda 80 mg/kg) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra 4 hafta süresince haftada 1 kez 70-80 µg mitokondri içeren 20 µl fosfat tamponlu salin (PBS) ile transplantasyon yapılmıştır (Her bir nostrile 10 µl verilecek şekilde). Transplantasyonun ardından günde 30 dakika, haftada 5 gün ve toplamda 4 haftalık koşu bandı egzersizi yaptırılmıştır (30 dk/5 gün/4 hafta). Grubun oluşturulmasının amacı; intranazal mitokondri transplantasyonunun ve beraberinde egzersizin PH'ye etkisini incelemektir.

**e. Parkinson Hastalığı + Mitokondri Grubu (PHM) (n=8)** Bu gruptaki hayvanlara aynı gün içerisinde 2 saat ara ile 4 doz 20 mg/kg MPTP (Toplamda 80 mg/kg) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra 4 hafta süresince haftada 1 kez 70-80 µg mitokondri içeren 20 µl PBS ile transplantasyon yapılmıştır (her bir nostrile 10µl verilecek şekilde). Grubun oluşturulmasının amacı; intranazal mitokondri transplantasyonunun PH'ye etkisini incelemektir.

**f. Mitokondri Biyodağılımının Gösterilmesi (n=2):** Mitokondri biyodağılımının gösterilmesi için 2 adet fare kullanılmıştır. Bu kapsamda, bu gruptaki hayvanların tüm beyin dokusu alınarak sıvı azot içerisine konulmuştur. Transplante mitokondriler *Mitospy Green FM (Biolegend,USA)* ve *MitoTracker® Red CMXRos Mitochondrion-Selective* (Invitrogen, Ltd.UK) ile boyanarak dokudaki dağılımları gösterilmiştir. Grubun oluşturulma amacı mitokondrilerin beyin dokusuna ulaşip ulaşmadığını gösterebilmektir.

**Tablo 3.1:** Deney grupları.

Grup	Hayvan Sayısı (n)
Kontrol	6
Parkinson Hastalığı Modeli (PH)	6
Parkinson Hastalığı Modeli + Egzersiz (PHE)	8
Parkinson Hastalığı Modeli + Mitokondri + Egzersiz (PHEM)	8
Parkinson Hastalığı Modeli + Mitokondri (PHM)	8
Mitokondri Biyodağılımının Gösterilmesi	2

### 3.3. Deney Planı

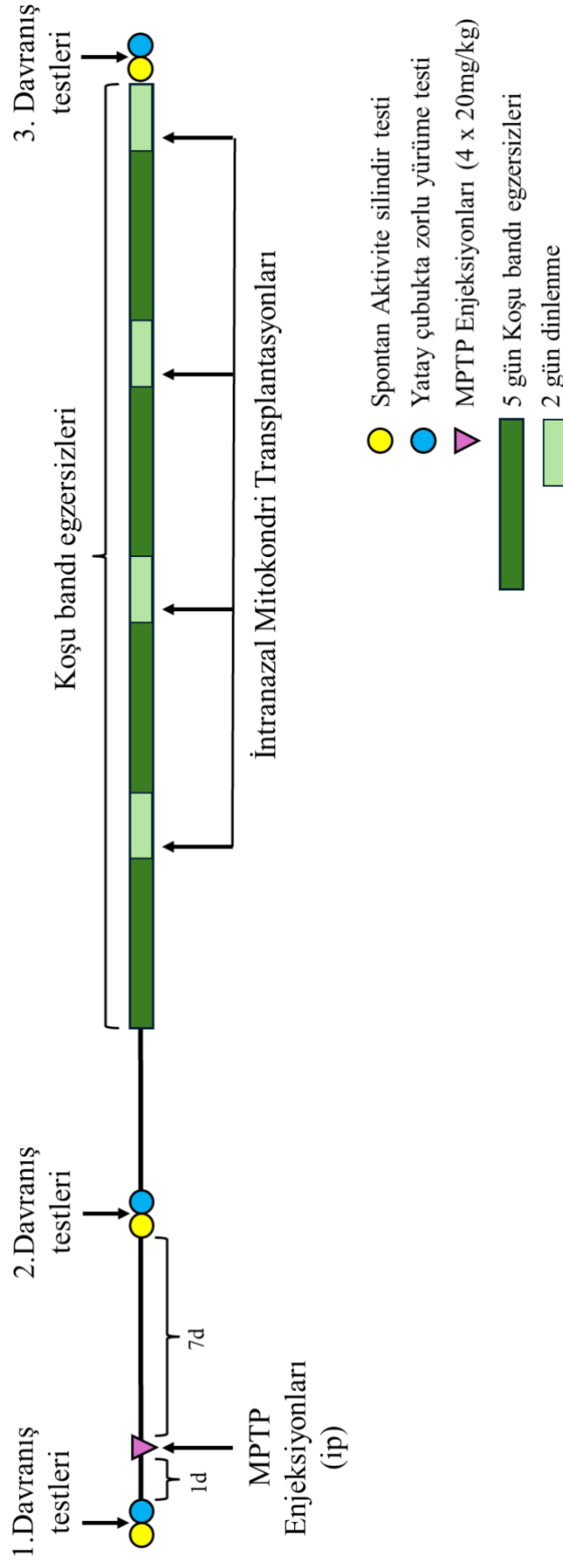
Tez çalışmasının deney planı aşağıdaki gibidir:

- Deney hayvanlarının laboratuvara getirilmesi ve adaptasyonlarının sağlanması.
- 1. Davranış testlerinin yapılması (MPTP öncesi).
- PH, PHE, PHEM ve PHM gruplarına intraperitoneal MPTP enjeksiyonlarını yapılması ve Parkinson hastalığının oluşturulması.
- 2. Davranış testlerinin yapılması (MPTP sonrası).
- 4 hafta süresince haftada 5 gün süren egzersiz protokolünün PHE ve PHEM gruplarına uygulanması.

- 4 hafta süresince haftada 1 gün intranasal yolla mitokondrilerin PHM ve PHEM gruplarına verilmesi.
- 3. Davranış testlerinin yapılması (tedavi sonrası).
- Hayvanların feda edilip doku örneklerinin toplanması.

Deney bitiminde tüm hayvanları ketamin-ksilazin (90-10 mg/kg) karışımı ile anestezi altına alınmış, inferior vena cavadan 2 ml kan çekilerek yaşamlarına son verilmiştir. Beyin, kas ve kan dokuları uygulanacak inceleme yöntemine uygun şekilde toplanmıştır.

Deneyle tamandıktan sonra davranış testleri videoları, toplanan doku örnekleri ve alınan kesitler analiz edilip alınan sonuçlar IBM SPSS v.23 programı ile istatistiksel analize alınmıştır. Tüm deney protokolü Şekil 3.1. de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Deney protokolü özeti.

### 3.4. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması

Parkinson hastalığı modeli oluşturulacak gruplardaki hayvanlara akut ilaç uygulaması ile intraperitoneal yolla aynı gün içerisinde 2 saat ara ile 4 kez 20 mg/kg MPTP enjeksiyonu yapılarak toplamda 80 mg/kg MPTP verilmiştir (76). Uygulama esnasında MPTP'nin toksik etkilerinden korunmak amacıyla tulum, çift kat eldiven, gözlük, bone gibi tüm koruyucu ekipmanlar giyilmiştir (Şekil 3.2.). Her bir hayvana kilosuna uygun MPTP dozu verilmiştir. Uygulamanın ardından 48 saat süre ile hayvanlar karantinada tutulmuş ve laboratuvara diğer araştırmacıların girişleri engellenmiştir. Talaşlar çamaşır suyu içeren solüsyon ile muamele edilip tıbbi atığa atılmıştır. Tüm kullanılan malzemeler (kafes, suluk vb.) çamaşır suyu ile temizlenmiştir. MPTP'nin ortama yayılma riski ortadan kaldırılmıştır.

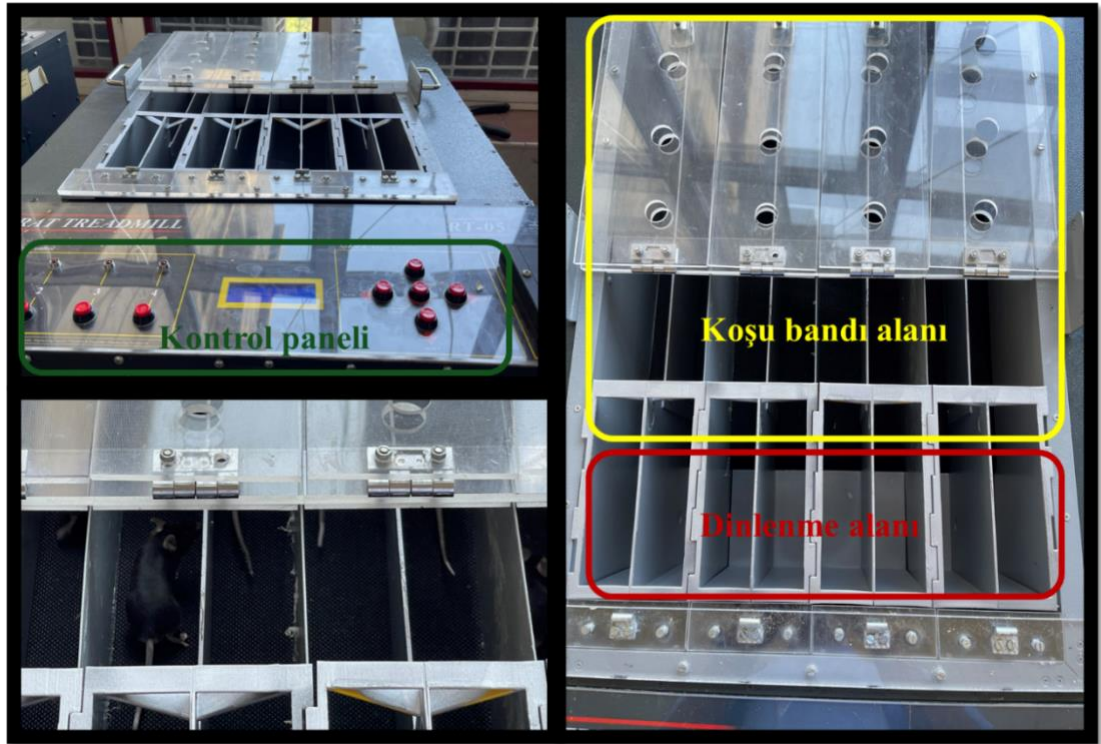


Şekil 3.2. MPTP için alınan koruyucu önlemler ve intraperitoneal enjeksiyon uygulaması.



### 3.5. Koşu Bandı Egzersiz Protokolü

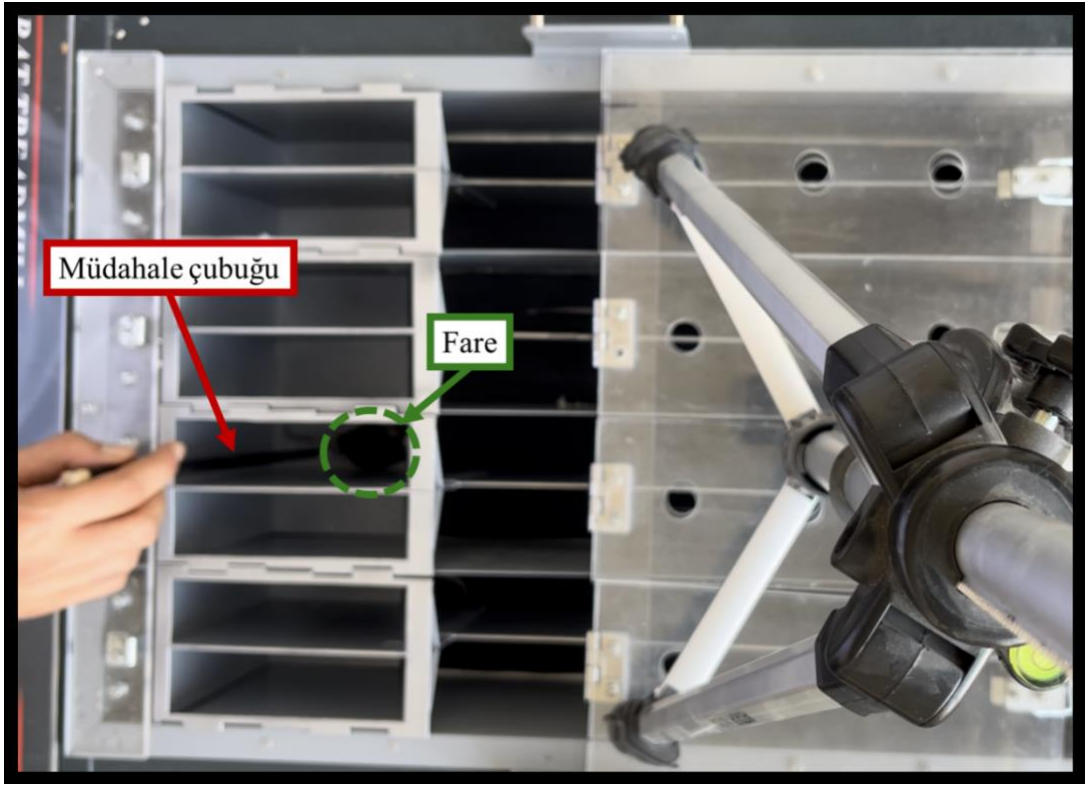
Koşu bandı egzersizleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD. ve Ankara Üniversitesi Elektrik Elektronik Mühendisliğinin ortaklaşa üretmiş olduğu RT-05 sıçan koşu bandı cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaz sıçanlara uygun şekilde üretildiği için üzerine üç boyutlu yazıcıda hazırlanmış yeni kulvarlar tasarlanmış ve bu sayede cihaz farelere uygun hale getirilmiştir. Cihazda farelerin koşabileceği hareketli bandın olduğu bir kısım ve dinlenebilecekleri bir alan mevcuttur (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Koşu bandı (RT-05) cihazının görüntüleri. Koşu bandının bulunduğu kısım sarı çerçeve, dinlenme alanı kırmızı çerçeve ve kontrol paneli ise yeşil çerçeve içinde gösterilmektedir.

MPTP uygulamasından sonra egzersiz gruplarında yer alan deney hayvanlarına 4 hafta süreyle haftada 5 gün ve günde 30 dk olacak şekilde koşu bandında egzersiz yaptırılmıştır. 1. hafta hayvanların koşu bandına alışmaları sağlanmış ve koşu bandı hızı kademeli olarak artırılmıştır. İlk hafta maksimum hız 15-17 m/dk olacak şekilde belirlenmiştir. 2. haftadan itibaren maksimum hız 20 m/dk ya çıkarılmış ve bu hızda koşmaları sağlanmıştır. 3. ve 4. haftalarda ise her gruptaki hayvanların 30 dk boyunca 20 m/dk hız ile koşmaları sağlanmıştır. 30 dakikalık antrenman öncesi 5 dk boyunca hız yavaşça artırılarak hayvanların egzersiz öncesi ısınmaları sağlanmıştır.

Koşu bandı, deney hayvanlarının koşu yapabilecekleri alan ve dinlenebilecekleri alan olmak üzere iki bölmeden oluşmaktadır. Hayvanların koşu egzersizleri sırasında bir çubuk yardımı ile kuyruklarına veya vücutlarının arka bölgelerine hafifçe müdahale edilip koşmaları teşvik edilmiş ve uzun süre dinlenmeleri engellenmiştir. Bu sayede, dinlenme bölgesine gelen deney hayvanların burada 5 sn'den fazla zaman geçirmemesi sağlanmıştır. Deney süresince elektrikle uyarım vb. gibi ağırlı uyaran kullanılmamıştır. Özellikle elektrik gibi ağırlı uyanların kullanılması hayvanların stres seviyelerini arttırabileceği ve davranış testlerini etkileyebileceği için kullanılmamıştır (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.4.** Koşu bandı egzersizi görüntüsü. Egzersiz süresince dinlenme alanına gelen farelerin çubuk yardımı ile müdahale edilip tekrardan koşmaları sağlanmıştır.

Son hafta (4. hafta) yapılan koşu bandı egzersizine mahsus olarak deney hayvanlarına yapılan müdahale sayısının verileri kaydedilmiştir. Müdahale sayısı her bir hayvanın dinlenme bölgesinde geçirmesi için verilen zamandan daha fazla beklemesi durumunda çubuk ile dokunma eyleminin sayısını belirtmektedir. Bu veriler hayvanların egzersize yatkınlıkları, istekleri ve yorulma eğilimleri hakkında bilgi toplamak amacı ile kullanılmıştır.

### 3.6. Mitokondri Tedavi Prosedürü

MPTP aracılı PH modeli oluşturulduktan 1 hafta sonra davranış testleri yapılmıştır. Bu testlerin ardından egzersiz gruplarının tedavi sürecine geçilmiştir. Mitokondri transplantasyonları PHEM ve PHM gruplarına aynı gün yapılmıştır. Transplantasyonlar 4 haftalık egzersiz protokolüne eş zamanlı olarak yapılmıştır. 5. egzersiz gününde egzersiz bitiminden 4-6 saat sonra mitokondri transplantasyonları PHEM ve PHM gruplarına uygulanmıştır. 4 hafta boyunca transplantasyon devam etmiştir (Şekil 3.5.). İntranazal olarak uygulanacak olan izole mitokondri miktarı bu çalışma için 70-80 µg olarak belirlenmiştir (77). Mitokondriler 20 µl PBS içerisinde her bir burun deliğine 10 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Bu uygulama 4 hafta boyunca haftada 1 kez gerçekleştirilmiştir. Fare burun deliğinin içerisine verilebilecek sıvı hacmi literatüre uygun şekilde belirlenmiştir (78). Ek olarak, izole edilmiş ve intranazal yolla hayvana verilmiş olan mitokondrilerin biyodağılımını göstermek amacıyla deney grupları bölümünde de belirtildiği gibi 2 hayvana *Mitospy Green FM* (Biolegend, USA) ve *MitoTracker® Red CMXRos Mitochondrion-Selective* (Invitrogen, Ltd. UK) ile işaretlenmiş mitokondriler verilmiştir (79, 80).

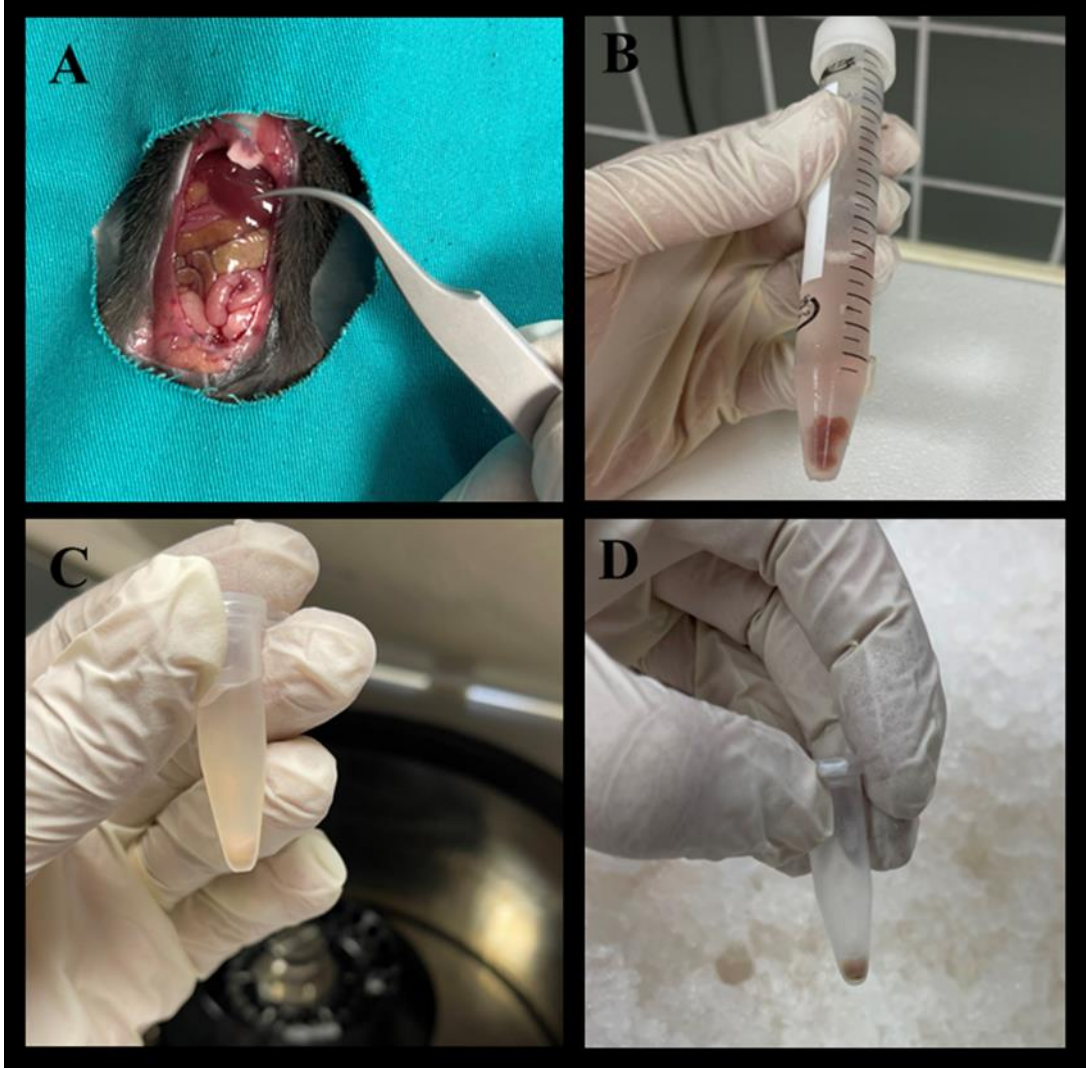


Şekil 3.5. İntranazal mitokondri uygulaması.

### 3.6.1. Mitokondri İzolasyonu

İzole mitokondriler C57BL fare karaciğerinden elde edilmişlerdir. İzolasyon için mitokondri izolasyon kiti (*ScienCell, USA*) kiti kullanılmıştır. İzolasyon öncesi ketamin-ksilazin karışımı 90-10 mg/kg olacak şekilde dozlanıp fareye verilmiş ve fare anestezi altına alınmıştır. Anestezi derinliği sıkıştırma ile kontrol edildikten sonra deney hayvanının batın bölgesi açılarak karaciğer tespit edilmiştir (Şekil 3.6-A). Vena portadan yüksek dozda kan çekilerek (2 ml ve fazlası) hayvan feda edilmiş ve hemen ardından karaciğer dokusu kesilerek çıkartılıp serum fizyolojik içerisine alınarak yıkanmıştır (Şekil 3.6-B). Karaciğer tartılarak uygun boyutlarda kesilmiş ve mitokondri izolasyon kitine (*ScienCell, USA*) ait protokole göre işlemler yapılmıştır (Şekil 3.6.). Tüm süreç boyunca ortamın soğuk (+4°C) olmasına özen gösterilmiştir. Tartılan karaciğer dokuları soğuk PBS ile iki kez yıkanmış ardından 100 mg dokuya 1 ml olacak şekilde mitokondri izolasyon buffer A solüsyonu eklenmiş ve cam homojenizatör (*Dounce* homojenizatör) ile 15-20 darbe uygulanarak doku parçalanmıştır. Ardından 1000 g kuvvette 5 dakika boyunca +4°C'de santrifüj (*KUBOTA*, model 5500) işlemi uygulanmış ve süpernatant kısmı ayrı bir tüpe alınmıştır (Şekil 3.6-C). Süpernatant sıvısı bu kez 10000 g kuvvette 20 dakika süreyle +4°C'de santrifüj edilmiştir (Şekil 3.6-D). İşlem sonucunda tüpün dibinde kalan pelet muhafaza edilip üstteki sıvı kısım atılmış ve pelet üzerine mitokondri izolasyon tampon B solüsyonu (100 µl) eklenmiştir. Elde edilen mitokondri karışımı PBS ile sulandırılarak zaman kaybetmeden transplantasyon işlemine alınmıştır.





**Şekil 3.6.** Mitokondri izolasyon basamakları. (A) Fare karaciğer dokusu, (B) Çıkarılıp tartılan karaciğer dokusunun PBS ile yıkanması, (C) İlk santrifüj sonrası süpernatant kısmında bulunan mitokondriler, (D) İkinci santrifüj sonrası pelet kısmında bulunan izole edilmiş mitokondriler.

### 3.7. Davranış Deneyleri

Davranış deneylerine başlamadan 30 dk öncesinde hayvanlar deneylerin gerçekleştirileceği laboratuvara getirilerek ortamın fiziksel koşullarına (beyaz gürültü, sıcaklık, nem) alışmaları sağlanmıştır. Davranış deneyleri süresince aynı laboratuvar ve aynı ekipmanlar kullanılmıştır. Egzersiz saatleri sabah 10:00-12:00 arasında olduğu için tüm davranış deneyleri 14:00-17:00 saatleri arasında yapılmıştır. Lokomotor ve spontan aktivitenin değerlendirildiği deneyler farklı günlerde yapılmıştır.

PH'nin davranışsal analizleri için yatay çubukta zorlu yürüme testi (Şekil 3.7.) ve spontan aktivite silindir testi yapılmıştır (Şekil 3.8.). Yatay çubukta zorlu yürüme testi lokomotor aktivitenin hastalık ve tedavi süreci ile beraber değişimini göstermektedir. Bazal çekirdekdeki dopaminerjik nöronların hasarına bağlı olarak meydana gelen davranışsal değişikliklerden bir tanesi de içten gelen spontan davranışlardaki azalmadır. Bu semptomları değerlendirmek için ise spontan aktivite silindir testi seçilmiştir.

Davranış testleri deney sürecine uygun olarak üç farklı zamanda yapılmıştır. 1. Davranış testleri (MPTP öncesi) deney hayvanlarının normal davranış verilerinin toplanabilmesi amacı ile hastalık oluşturulmadan önce yapılmıştır. 2. Davranış testleri (MPTP sonrası) PH modeli oluşturulduktan 1 hafta sonra yapılmıştır. Amaç, hastalık modeli gelişiminin davranışsal olarak teyit edilmesi ve tedavi sonrası değişikliklerin incelenebilmesi için gerekli verilerin toplanmasıdır. 3. Davranış testleri (tedavi sonrası) ise tüm tedavi süreci tamamlandıktan sonra yapılmıştır. Tüm deneysel sürecin davranışsal açıdan ayrıntılı bir şekilde takibi bu üç farklı zamanda tekrarlanan davranış deneyleri ile sağlanmıştır.

### **3.7.1 Yatay Çubukta Zorlu Yürüme Testi**

Bu testte, hayvanların parkurun başlangıç noktasından itibaren ileri doğru hareketleri esnasında bir uzvun (ön ayak veya arka ayak) tel örgüden kayması veya tel örgünün altındaki boşluğa girmesi durumu hata olarak sayılmıştır (Şekil 3.7.). Hayvan ileri yönlü hareket etmiyorsa veya hayvanın kafası tel örgünün soluna veya sağına dönükse bu durumda yapılan hatalar sayılmamıştır. Bu durumda, çubukta zorlu yürüme testinde deneklerin parkuru kaç adımda tamamladığı ve bu süreçte yaptıkları hata sayısı kaydedilmiştir. Toplamda üç denemeye tabi tutulan denekler denemeler arasında 15 dakika süresince kendi kafeslerinde dinlendirilmiştir.



Şekil 3.7. Yatay çubukta zorlu yürüme testi düzeneği.

Yatay çubukta zorlu yürüme testi protokolü şu şekildedir:

- En kalından en inceye doğru ilerlemek kaydıyla toplam dört parçadan oluşan çubuk yan yana konulan kafeslerin üzerine yerleştirilerek sabitlenir.
- İçinde az miktarda teste girecek hayvanın kullandığı talaş bulunan bir kafes en uçtaki en ince çubuk parçasının bitimine iç kısmı görünecek biçimde yerleştirilerek denek için varış noktası ayarlanır.
- Deney hayvanı çubuğun en kalın ve varış noktasına en uzak bölümüne yerleştirilir.
- Deney hayvanının çubuğa alışması için zaman tanınır. Farenin geriye dönmek istemesi halinde fare yumuşak biçimde itilerek varış noktasına doğru yönlendirilmesi sağlanır (gerekli durumlarda varış noktasında bulunan kafes gösterilerek deneğin varış noktasına yönelmesi sağlanabilir).
- Deney hayvanının bir tam tur olarak başlangıç ile varış noktası arasında ilerlemesi sağlanmalıdır (alışma fazı).
- Her deney hayvanı için bir tam tur tamamlandıktan sonra deney hayvanının üzerine basarak ilerlediği çubuk %70 etanol (EtOH) ile silinip kurulanmalıdır.
- Test gününde tüm düzen aynı kalmakla birlikte bu sefer çubuk üzerine tel örgülü parmaklık yerleştirilir.

- Video kamera sistemi kullanılarak farelerin başlangıç ile bitiş noktası arası hareketleri kaydedilir (81).

### 3.7.2 Spontan Aktivite Silindir Testi

Bu davranış testinde 20 cm çapında ve 20 cm yüksekliğinde şeffaf bir silindir kullanılmaktadır. Silindir şeffaf bir cam üzerine yerleştirilir ve düzeneğin altına video kayıt sistemi konulur (Şekil 3.8.). Amaç dar bir alanda deney hayvanının yapmış olduğu spontan aktiviteleri kaydetmektir. Video kaydının analizi ile ön ayak adım sayısı, arka ayak adım sayısı, şahlanma sayısı ve temizlenme süresi verileri toplanmıştır.

Silindir içerisinde spontan aktivite testi protokolü aşağıda ayrıntılı tarif edilmiştir:

- Saydam plastik silindir bu cam zemin üzerine yerleştirilir.
- Saydam cam zeminin altına yer kamera sabitlenir.
- Kronometre 3 dakikaya ayarlanır.
- Deney hayvanlarında donup kalma davranışının önlenmesi için testin uygulandığı alanın farenin dikkatini dağıtmayacak sadelikte olmasına ve ortamda yüksek ses oluşturacak materyaller/durumlar bulunmamasına önem gösterilmelidir.
- Deney süresince bir sayaç yardımıyla farenin ayağa kalkma sayısı not edilmelidir. Ayağa kalkma davranışı ön ayakların yerden dikey olarak kaldırılması ile sadece arka ayaklar üzerinde dengede durma şeklinde tanımlanmaktadır.
- 3 dk sonunda denek silindirden çıkarılarak kafesine geri konulmalıdır.
- Her deney hayvanı için test tamamlandıktan sonra tüm deney alanları 70% EtOH ile silinip kurulanmalıdır (82).





Şekil 3.8. Spontan aktivite silindir test düzeneği.

### 3.8. Protein İzolasyonu

Beyin dokularından protein izolasyonu kapsamında yürütülen tüm süreçler buzlu soğuk bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarından elde edilen beyin dokuları ilk olarak hassas terazi aracılığı ile tartılmış ve üzerine ağırlığının 1:9 oranında *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) lizis tamponu ve proteaz inhibitör kokteyl (PIC) karışımı eklenmiştir. Beyin dokuları, makas yardımı ile tüp içerisinde fiziksel olarak olabildiğince küçük parçalara ayrılarak karışım 10 dk buz içerisinde bekletilmiştir. Ardından beyin dokuları sonikatör cihazına alınıp her bir beyin dokusu sonikasyon yöntemi ile homojenize edilmiştir (30 sn). Süreç boyunca beyin dokularını içeren deney tüpleri buzlu su ile temas edecek şekilde konumlandırılmış, sonikatör cihazı aracılığıyla verilen ses dalgalarının frekansı kesikli olacak biçimde ayarlanmış ve bu sayede homojenatların aşırı ısınıp protein denatürasyonu gerçekleşme olasılığı en aza indirilmiştir. Homojenize edilen dokular +4 °C de 15000 g hızda 10 dk boyunca santrifüj (*KUBOTA*, model 5500) edilmiş ve süpernatant kısımları farklı tüplere alınarak örnekler -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Kas dokularından protein izolasyonu için 50 mg ağırlığında olacak şekilde kas örnekleri kesilerek alınmış ve homojenizasyon işlemi için ise PBS ve PIC karışımına konulmuştur. Diğer basamaklar beyin dokularında yapılan işlemler ile aynı olacak şekilde uygulanmış ve homojenatlar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.8.1. Toplam Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Toplam protein seviyelerinin belirlenmesi analiz süreci için oldukça önemli bir basamaktır. Beyin dokularında *Western blot* yöntemi analizleri, kas dokularında *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ölçümlerinin analizleri, intranasal yol aracılığıyla verilen mitokondri miktarlarının belirlenmesi ve ATP analizlerinin yapılabilmesi için homojenatlarda *bicinchoninic acid assay* (BCA) yöntemi ile toplam protein miktarları belirlenmiştir. Bu işlem için *Intron* marka BCA kitinde belirtilen protokole uygun olarak işlemler şu şekilde yapılmıştır:

- Albumin standartları hazırlandı.
- Homojenatlardan alınan örnekler literatüre uygun şekilde sulandırıldı. Sulandırma işlemi kapsamında; beyin dokuları için 10 kat, kas dokuları için 5 kat, izole mitokondriler için ise 10 kat sulandırma faktörü uygulandı.
- Albumin standartları ve örnekler iki tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde konuldu.
- Her bir kuyucuğa kit içeriğindeki solüsyon a ve solüsyon b karışımı 200 µl miktarında eklenerek 30 saniye çalkalayıcıda bekletildi.
- Plaka önceden 37°C sıcaklık değerine ayarlanmış inkübatör içerisinde 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (*Allsheng AMR-100*) okuma yapıldı ve veriler kaydedildi.

### 3.9. Kas Dokusu Sitrata Sentaz ELISA Ölçümü

Kas dokusundan izole edilen proteinlerde sitrat sentaz (CS) protein seviyeleri ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Bu yöntem için BT Lab marka ELISA kit (*Katalog no: E1631Mo, Bioassay Technology Laboratory, China*) kullanılmıştır. Kit sandviç tipi ELISA yöntemi ile çalışmaktadır. Protokole göre CS standartları hazırlanmış, örnekler ve standartlar plakalara alınarak sırası ile protokol gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda ELISA okuyucuda (*Allsheng AMR-100*) 450 nm dalga boyunda okumalar

yapılarak abosorbans değerleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar BCA yönteminde toplam protein değerleri ile normalize edilmiş ve istatistiksel analize sokulmuştur.

### 3.10. Western Blot Analizleri

Beyin dokularından izole edilmiş proteinlerde *Western blot* yöntemi ile gruplar arasında ifade farklılıkları lmlmüştur. lmler yapılmadan önce izole edilen proteinlerin derişimleri hesaplanmış ve uygun katsayıda seyreltme kullanılarak elektroforez kuyucuklarına yüklenecek olan her örnek 0.5 mg/ml protein içerecek şekilde RIPA tamponu + proteaz inhibitör karışımı (PIC) ile seyreltilmiştir. Ardından jel hazırlama, örneklerin yüklenmesi, jel elektroforez, proteinlerin membrana transferi, antikolar ile muamale ve görüntüleme işlemleri sırasıyla yapılarak protein analizleri tamamlanmıştır. *Western blot* yöntemi ile Bax, Bcl-2, kaspaz 1, kaspaz 3, *mammalian target of rapamycin* (mTor), fosforolize mTor (P-mTOR) proteinlerinin ölümleri yapılmıştır .

**Tablo 3.2.** Dökülen jel içeriği, oranı ve yrtlen proteinler.

	Toplayıcı jel %4	Ayırma jeli			
		%7,5	%10	%15	%20
dH <sub>2</sub> O	8,935 ml	7,685 ml	5,935 ml	3,285 ml	0,935 ml
Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	3,75 ml	-	-	-	-
Tris-HCl 1,5 M (pH 8.8)	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
%10 SDS	150 l	150 l	150 l	150 l	150 l
%30 Akrilamid/Bis- akrilamid	2 ml	3,75 ml	5 ml	7,5 ml	10 ml
%10 APS	150 l	150 l	150 l	150 l	150 l
TEMED	15 l	15 l	15 l	15 l	15 l
<b>Yrtlen Proteinler</b>	Ortak	mTOR P-mTOR		CAS1 CAS3	BAX BCL2

Solüsyon reçeteleri EK-1 kısmında verilmiştir.

*Western blot* yöntemi aşağıda belirtilen aşamalar izlenerek uygulanmıştır:

### 3.10.1. Jel Dökme

Proteinlerin büyüklüklerine uygun olarak jel derişimleri hesaplanmıştır. Her bir yürütme için uygun yoğunluktaki jeller aşağıdaki başmaktara göre ayarlanmıştır (Tablo 3.2.).

- Camlar mikrofiber bez ile temizlendi ve birleştirilerek mekanizmaya kondu.
- Taraklar boş camlara takılarak 1 cm aşağısı işaretlendi.
- Ayırma (*separating*) jeli hazırlandı. Malzemeler içerisinde en son amonyum persülfat (APS) ve *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) eklendi. 1 ml'lik pipet yardımı ile jel karışımı camların arasına döküldü.
- Ayırma jeli kısmı üzerine yaklaşık 1 ml 2-propanol (isopropil alkol) kondu. Jelin düz bir çizgi oluşturduğu gözlemlendi. *Falcon* tüpte kalan jelin polimerleşmesi beklendi.
- Filtre kağıdı ile ayırma jeli üzerindeki 2-propanol emdirildi ve üzerine hazırlanmış olan toplayıcı (*stacking*) jel döküldü.
- Toplayıcı jel tamamen camların arasını doldurduğunda taraklar takıldı, herhangi bir baloncuk veya boşluk olmadığı kontrol edilip dökülen jelin donması beklendi.

### 3.10.2. Elektroforez

- *Running* aşamasına geçilmeden önce beta merkaptotanol (BME) ve *laemmli* tampon karışımı hazırlandı (BME: *Laemmli* tampon, 5:95 oranında). Bu karışım örneklerin üzerine eklendi. (Örnek: *Laemmli* tampon + BME karışımı, 3:1). Kısa bir karıştırma aşamasından sonra örnekler protein denatürasyonu için kaynar suya konularak 10 dk boyunca bekletildi ve sonrasında örneklerin kuyucuklara yüklenmesi aşamasına geçildi.

- 2 adet cam içindeki jeller ile beraber iç içe bakacak şekilde mekanizmaya takıldı.
- Deneş günü taze olarak hazırlanmış olan *running* tamponu camlar arasına döküldü.
- Elektroforez kuyucuklarına *ladder* ve örnekler yüklendi. Ladder (5 µl), örnekler (20 µl) olacak şekilde dikkatlice konuldu.
- 50 V sabit güçte 60 dk süresince *stacking* yürütmesi yapıldı.
- *Ladder* yardımıyla görsel olarak proteinlerin *separating* jele ulaştığı görüldüğünde güç 100 V'a çıkartılarak yürütme işlemine devam edildi.
- *Ladder* içerisindeki proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaları göz ile takip edilip yeterli ayrışma gözlemlendiğinde elektroforez işlemi sonlandırıldı (1-2 saat).
- Camlar mekanizmadan ayrıldı ve jellerin *stacking* kısmı atıldı ve alttaki *separating* jel kısmı transfer tamponu içerisine alınarak 4-5 dk bekletildi.

### 3.10.3. Transfer

- Kasetler, süngerler ve *wattman* kağıtları bir kap içerisinde transfer tamponu ile ıslatıldı.
- Polivinil florür (PVDF) membran metanol içerisine alınarak aktifleşmesi sağlandı.
- Aktifleşen PVDF membran *tris-buffered saline ve polysorbate 20 (Tween 20)* (TBS-T) ile yıkanarak fazla metanol uzaklaştırıldı.
- Jel ve membran birbirlerine bakacak ve aralarında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilecek şekilde transfer kaseti içerisine yerleştirildi.
- Transfer kasetleri buz içerisine konuldu.
- 90 V sabit güçte 80 dk süresince transfer işlemi sürdürüldü.
- Transfer işlemi sonrası *coomassie* boyaması ile jelde herhangi bir protein kalmadığı teyit edildi.
- Transfer sonunda membranlar bir kap içerisine alınarak bloklama aşamasına geçildi.

### 3.10.4. Bloklama, Primer ve Sekonder Antikorların Uygulanması

- Bloklama işlemi için %5 oranında *goat bovine* serum içeren TBS-T solüsyonu hazırlandı.
- %5 bloklama solüsyonu membranın üzerine membranı tamamen kaplayacak biçimde döküldü ve 1 sa boyunca karıştırıcı cihaz üzerinde bloklama işlemi yapıldı.
- Bloklama sonrası membranlar TBS-T ile 3x5 dk süresince yıkandı.
- Primer antikolar literatür ve üreticinin önerilerine uygun derişimlerde %5 *goat bovine* serum + TBS-T karışımında çözdürölüp hazırlandı.
- Primer antikolar üzerini tamamen kaplayacak şekilde membranların bulunduğu kaplara eklendi ve +4<sup>0</sup>C de gece boyu karıştırıcı cihaz üzerine konularak inkübe edildi.
- 12 saatlik gece boyu inkübasyonun ardından membranlar 3x5dk süresince TBS-T ile yıkandı.
- Sekonder antikolar literatür ve üreticinin önerilerine uygun derişimlerde %5 *goat bovine* serum + TBS-T karışımında çözdürölüp hazırlandı.
- Sekonder antikolar üzerini tamamen kaplayacak şekilde membranların bulunduğu kaplara eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcı cihaz üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından membranlar 3 x 5 dk süresince TBS-T ile yıkandı.
- Görüntüleme için BioRAD *enhanced chemiluminescence* (ECL) kitindeki iki solüsyon 1:1 (toplam 2 ml olacak şekilde) oranında karıştırılarak membranın üzerine birkaç defa dökölüp çekildi. Bu işlemler karanlıkta yapıldı.
- Görüntüleme *Licor Odyssey* (Almanya) cihazı ile yapıldı. Görüntüleme süresi 2 dk olarak ayarlandı ve görüntüler elde edildi.
- *Image-J* programına alınan görüntüler analiz edilerek ışımaya yoğunlukları karşılaştırıldı.

### 3.11. İmmünohistokimya Analizleri

Fareler feda edilip beyin dokuları çıkartıldıktan sonra sağ yarım küreler immünohistokimyasal analizler için %10 formaldehite alınarak fiksasyon işlemi yapıldı. Dokular formaldehitte en az 48 sa kalacak şekilde bekletildi. Fiksasyon sonrası

gece boyu çeşme suyuna alınan dokular, ilk olarak artan alkol serilerinden alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek kasetlerde parafine gömüldü. Parafine gömülü beyin dokusu örneklerinden mikrotom ile 4-5 µm kalınlıkta kesitler pozitif yüklü lamalara (*TOMO*, Japonya) alındı ve 70°C'da en az 45 dk kuruması sağlandı. İmmünohistokimyasal boyama aşamaları immünohistokimya boyama cihazı (*Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ*) kullanılarak deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri gerçekleştirildi.

Protokol kapsamında biyotinsiz, *horseradish* peroksidaz (HRP) multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3,3'- diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojenden oluşan hazır kit (*ultraView™ Universal DAB Detection Kit*, Katolog no: 760-500, *Ventana Medical Systems, Tucson, AZ*) kullanıldı. Antikor olarak dinamin ilişkili protein-1 (DRP-1) (*Santa Cruz Rabbit Monoclonal Antibody 1:100-1:500*), mitofusin-2 (MFN-2) (*Santa Cruz Rabbit Monoclonal Antibody 1:100-1:500*) uygulandı. Zıt boyama için boyama cihazında, hematoksilen ve mavileştirici solüsyon yapıldı. Kesitler daha sonra seri alkollerden geçirilerek dehidratasyon ve seri ksilenden geçirilerek şeffaflandırılma işlemleri uygulandı ve sonrasında lamel ile kapatıldı. DRP-1 ve MFN-2 analizi optik yoğunluk ölçümü ile ışık mikroskobu (*Nikon Eclipse 80i*, Japonya) kullanılarak değerlendirildi ve görüntü analiz sistemi (*NIS Element 3.0* Japonya, x200 büyütme) kullanılarak ölçüldü.

### **3.12. Beyinde Toplam Antioksidan ve Oksidan Seviyesi Analizleri**

Beyin dokusunda toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan (TOS) seviyelerini belirlemek amacı ile *Elabscience Total Antioxidant Status* ve *Elabscience Total Antioxidant Status* kolorimetrik kitler ile çalışılmıştır (TAS Katalog no: *E-BC-K801-M*, TOS Katalog no: *E-BC-K801-M*, USA) kullanılmıştır. Protokole göre TAS ve TOS için standartlar hazırlanmış, örnekler ve standartlar plakalara alınarak sırası ile protokol gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda ELISA okuyucuda (*Allsheng AMR-100*) TAS için 660 nm TOS için 590 nm dalga boylarında okumalar yapılarak absorbans değerleri alınmıştır. Protokole göre hesaplamalar yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar BCA yönteminde toplam protein değerleri ile normalize edilmiş ve istatistiksel analize sokulmuştur (Bkz. 3.8.1).

### 3.13. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın istatistiksel analizleri IBM SPSS v23 programı ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin tamamı toplandıktan sonra öncelikli olarak normal dağılım gösterip göstermedikleri *Shapiro-Wilk* testi ile kontrol edilmiştir. Bu testin sonuçlarına göre normal dağılım göstermediği saptanmış ve parametrik olmayan istatistik testleri uygulanmasına karar verilmiştir. Ayrıca gruplardaki n sayılarının 15'in altında olması parametrik olmayan istatistiksel analizlerin çalışmaya daha uygun olduğunu göstermektedir. Gruplar arası karşılaştırmalarda *Kruskal-Wallis* testi kullanılarak farklılığın istatistiksel derecesi saptanmıştır. *Kruskal-Wallis* testinin ardından *posthoc* test olarak DUNN testi uygulanmış ve farklılığın hangi gruplar arasında olduğu tespit edilmiştir. Davranış testlerinin üç farklı zamanda yapılmış olmasından dolayı gruplardaki zaman bağlı değişimin istatistiksel analizi için *Wilcoxon* testi kullanılmıştır. Analizler sonucu *P* değeri 0,05 in altında çıkan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Grafikselleştirme için kutu grafiği tercih edilmiştir ancak üç davranış testinin aynı grafikte gösterildiği durumlarda bar grafiği kullanılmıştır. Verilen tablolarda tanımlayıcı istatistik olarak ortanca ve çeyrekler arası genişlik (ÇEG) tercih edilmiştir. Bundan farklı olarak hayvan ağırlıklarının verildiği tabloda (Tablo 4.1.) ortalama ve standart hata verileri kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Deney Hayvanları ile İlgili Parametreler

Deney protokolü sırasında hayvanların sağlık durumları günde en az iki kez olacak şekilde düzenli biçimde takip edilmiştir. Uygulamalar esnasında ve deney sürecinde toplam 3 hayvan yaşamını yitirmiştir. Bunlardan ikisi MPTP enjeksiyonları sırasında, bir tanesi ise egzersiz deneyleri yapıldığı sırada gerçekleşmiştir. Bu sebeple gruplardaki hayvan sayıları Kontrol grubu n=6, PH grubu n=6, PHE grubu n=7, PHEM grubu n=6 ve PHM grubu n=7 olacak şekilde güncellenmiş ve deneyler tamamlanmıştır. Hayvanların genel sağlık durumları, yemek ve su tüketimleri tüm süreç boyunca normal olarak gözlemlenmiştir. Barınma sırasında PH ve PHM gruplarındaki hayvanların Kontrol, PHE ve PHEM gruplarına göre daha az hareketlilik gösterdikleri ve kaldıkları kafeslerin köşe kısımlarında toplanma eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir.

Gruplar arasında ağırlık açısından başlangıçtaki ağırlıkları karşılaştırıldığında bir fark bulunmamaktadır. Deney süresince tüm gruplardaki hayvanlar ortalama olarak 3 gr ağırlık kazanmışlardır. Deney protokolü sonunda vücut ağırlığı bakımından gruplar arasında bir farka rastlanmamıştır. Deney sonunda izole edilen *gastroknemius* kaslarının ağırlıkları ve *gastroknemius* kası-tibialis kemik uzunluğu oran parametreleri kıyaslandığında her iki durumda da PH grubundaki hayvanlar en düşük değerleri almışlardır (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Deney hayvanları toplam ağırlık ve kas ağırlıkları.

	İlk ağırlık (g)	Son ağırlık (g)	<i>Gastroknemius</i> kası ağırlığı (mg)	<i>Gastroknemius</i> kası ağırlığı / <i>Tibialis</i> kemik uzunluğu oranı (mg/cm)
<b>Kontrol</b>	20,9 (± 0,80)	24,0 (± 0,75)	15,5 (± 0,94)	0,85 (± 0,06)
<b>PH</b>	20,3 (± 0,64)	23,8 (± 0,47)	11,8 (± 0,82)	0,71 (± 0,07)
<b>PHE</b>	20,3 (± 0,67)	23,0 (± 0,67)	14,0 (± 1,02)	0,80 (± 0,05)
<b>PHEM</b>	20,8 (± 0,44)	22,8 (± 0,61)	14,4 (± 0,62)	0,88 (± 0,05)
<b>PHM</b>	19,24 (± 0,47)	22,0 (± 0,41)	15,0 (± 1,13)	0,91 (± 0,06)

Deney hayvanlarının ilk ve son ağırlıkları, *gastroknemius* kası ağırlıkları ve *gastroknemius* kas ağırlığı / *tibialis* kemik uzunluğu oranları her grup için ortalama (± Standart hata) sonuçları gösterilmektedir.

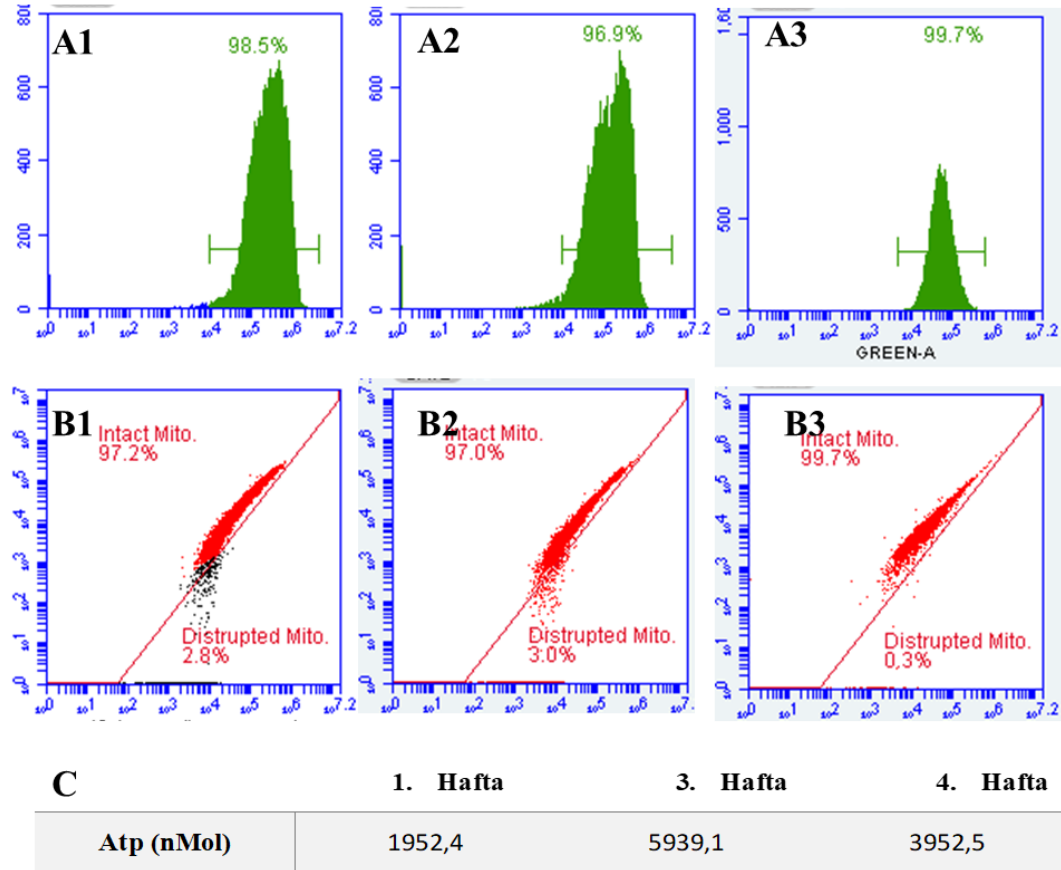
#### 4.2. Mitokondriyal Parametreler ve Biyodağılım

Bu kısım mitokondriyal ATP, *MitoSpy green FM* ve JC-1 ölçümlerini kapsamaktadır. Ölçümler her hafta uygulanan intranasal mitokondri transplantasyonları için izole edilen mitokondrilerden örnekler alınarak yapılmıştır. İkinci haftaya ait örnekler yaşanan aksilik sonucu (soğuk zincirin bozulması) zarara uğramış ve ölçümleri gerçekleştirilememiştir. Sonuçlar 1., 3. ve 4. haftalara ait izolasyonlardan yapılmıştır.

*MitoSpy green FM* boyamasının akım sitometri ölçümleri sonucunda izole edilen mitokondrilerin %98,5, %96,9 ve %99,7 oranında mitokondriyal membran bütünlüklerini koruduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde mitokondrilerin JC-1 boyaması akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlar, %97,2 , %97,0 ve %99,7 oranlarında membran potansiyeli korunmuş sağlam mitokondriler elde edildiğini göstermektedir. Böylelikle tranplantasyon için izole edilen mitokondrilerin sağlık durumları ve kaliteleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar ışığında sağlıklı mitokondrilerin izolasyonunun başarı ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir.

Bunun yanı sıra yapılan BCA ölçümleri ve hesaplamalar sonucunda hayvan başına verilen mitokondri miktarının her bir uygulama için 70-80  $\mu\text{g}$  olduğu tespit edilmiştir.

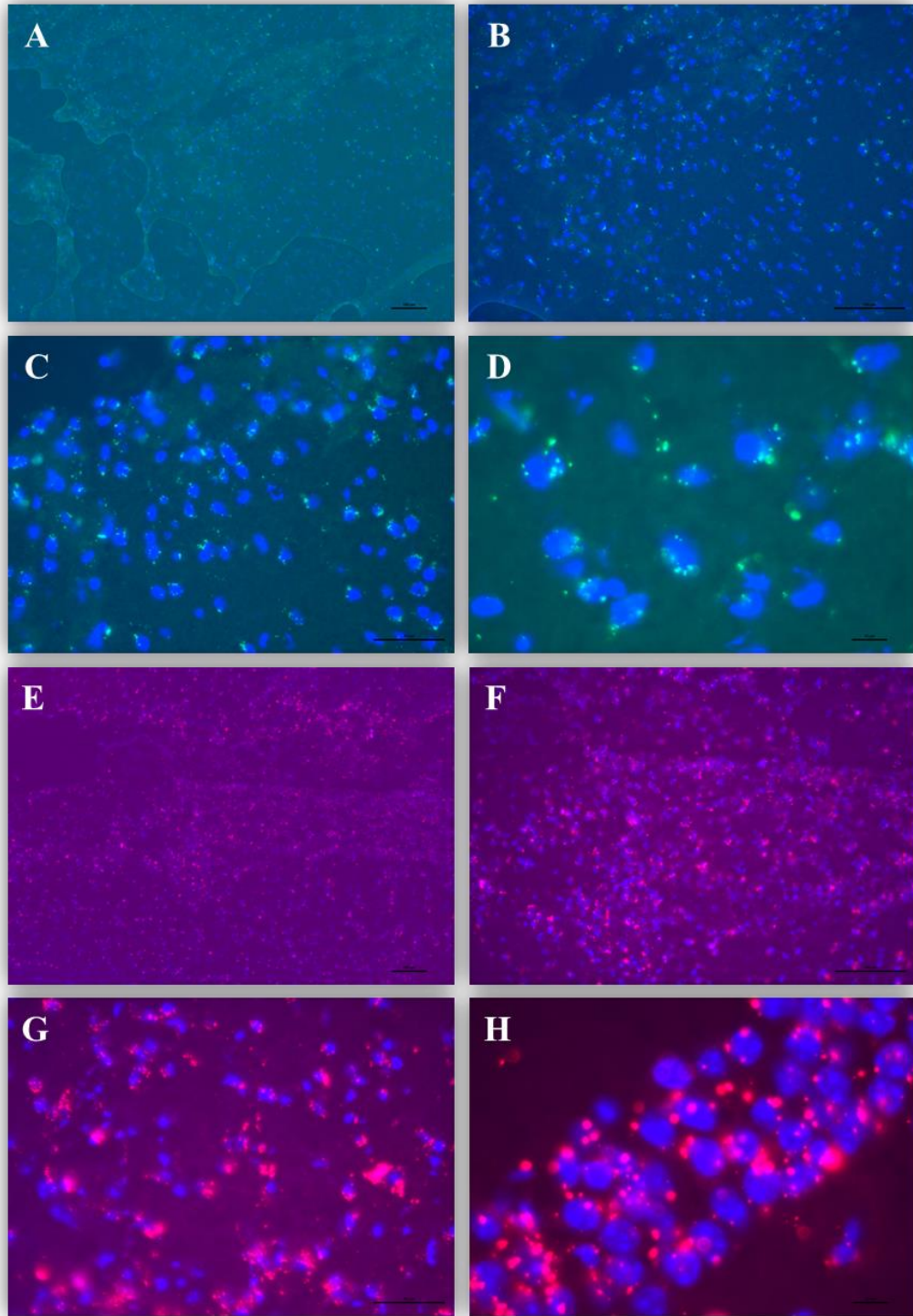
İzole edilen mitokondrilerin ATP ölçümleri tamamlandı ve BCA toplam protein değerleri ile normalize edilmiştir. Ölçülen değerler sırası ile 1952,4 nMol , 5939,1 nMol, 3952,5 nMol olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Karaciğerden izole edilen mitokondrilerin akım sitometri sonuçları ve ATP analizleri. Ekzojen mitokondrilerin *Mitospy green FM* ve *JC-1* akım sitometri ölçümleri ve ATP analizleri gösterilmektedir. A1, A2, A3 sırası ile 1. hafta, 3. hafta, 4. hafta izole edilen mitokondrilerin *Mitospy green FM* ölçümleridir. B1, B2, B3 sırası ile 1. hafta, 3. hafta, 4. hafta izole edilen mitokondrilerin *JC-1* ölçümleridir. C’de izole edilen mitokondrilerin ATP analiz sonuçları gösterilmiştir.

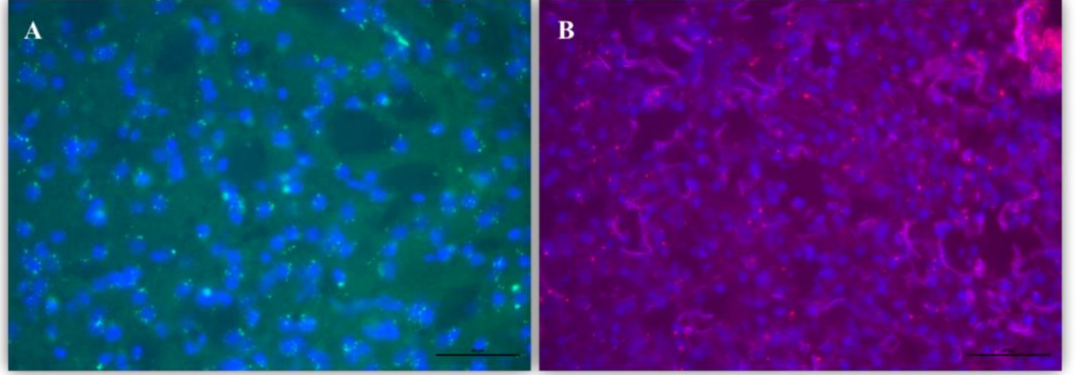
İntranazal yolla verilen mitokondrilerin beyin dokusuna ulaşım ulaşmadığını kontrol etmek amacıyla daha önce de belirtildiği gibi iki hayvanda mitokondri biyodağılım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Karaciğerden izole edilen mitokondriler *Mitospy Green FM* ve *Mitotracker Red CMROXS* boyaları ile boyandıktan sonra

hayvanlara transplante edilmiştir. Transplantasyondan 24 sa sonra beyin dokuları ve akciğer dokuları çıkartılıp soğutmalı mikrotom yardımı ile doku kesitleri alınmıştır. Yapılan incelemeler sonrası ekzojen mitokondrilerin hem beyin dokusunda hem de akciğer dokusunda buldukları gösterilmiştir (Şekil 4.2). Bulgular mitokondri transplantasyonunun başarılı olduğunu kanıtlar niteliktedir.



**Şekil 4.2.** Transplante edilen mitokondrilerin beyin dokusundaki görüntüleri. Beyin dokusu kesitlerinde transplante edilen mitokondrilerin immunfloresan görüntüleri gösterilmiştir. (A, B, C, D) *Mitospy green FM* ile boyanmış mitokondrilerin sırasıyla 100x, 200x, 400x ve 1000x immunfloresan görüntüleridir. (Yeşil- izole mitokondri, mavi- hücre çekirdeği). (E, F, G, H) *Mitotracker red CMXROS* ile boyanmış mitokondrilerin sırasıyla 100x, 200x, 400x ve 1000x immunfloresan görüntüleridir. (Kırmızı- izole mitokondri, mavi- hücre çekirdeği).

Ekzojen mitokondrilerin beyin dokularındaki dağılımlarının incelenmesinin yanı sıra farelerin akciğerlerinden de örnekler alınıp incelenmiştir. İnceleme sonucunda intranasal yolla verilen mitokondrilerin beyin dokusunun yanı sıra akciğer dokusuna da ulaştıkları gösterilmiştir (Şekil 4.3.).



**Şekil 4.3.** Akciğer dokusu kesitlerinde, transplante edilen mitokondrilerin görüntüleri. İntranazal yolla transplante edilen mitokondrilerin immunfloresan görüntüleri gösterilmiştir. (A) *Mitospy green FM* ile boyanmış mitokondrilerin 400x immunfloresan görüntüleridir. (Yeşil- izole mitokondri, mavi- hücre çekirdeği). (B) *Mitotracker red CMXRos* ile boyanmış mitokondrilerin 400x immunfloresan görüntüleridir. (Kırmızı- izole mitokondri, mavi- hücre çekirdeği).

#### 4.3. Koşu Bandı Egzersizi

PHE ve PHEM gruplarının 4 haftalık koşu bandı egzersizi sırasında gün başına düşen ortalama hızları tabloda verilmiştir (Tablo 4.2.). Hayvanların maruz kaldığı koşu bandı hızı ve egzersizin süresi mitokondri tedavi süreciyle uyumlu olacak şekilde seçilmiştir (83, 84).

**Tablo 4.2.** Koşu bandı egzersizi gruplarının koşu performansları.

	Gün	PHE 30 dk'lık ortalama hız (m/dk)	PHEM 30 dk'lık ortalama hız (m/dk)
<b>1. Hafta</b>	1	8,8	8,8
	2	12,2	12,5
	3	13,8	13,5
	4	14,6	14,6
	5	15,7	15,5
<b>2. Hafta</b>	6	18,6	18,4
	7	18,6	18,6
	8	18,7	18,9
	9	19,1	19,1
	10	19,1	19,3
<b>3. Hafta</b>	11	20	20
	12	20	20
	13	20	20
	14	20	20
	15	20	20
<b>4. Hafta</b>	16	20	20
	17	20	20
	18	20	20
	19	20	20
	20	20	20

Bunun yanı sıra son hafta yapılan koşu bandı egzersizinde hayvanların 30 dakikalık koşuları sırasında hayvanlara müdahale sayıları hesaplanmıştır. Dinlenme alanına gelen hayvanların müdahale sayılarına bakıldığında PHEM grubundaki ortalama müdahale sayısının anlamlı bir şekilde PHE grubundan daha az olduğu saptanmıştır ( $P < 0,001$ ) (Tablo 4.3.).

**Tablo 4.3.** Koşu bandı egzersizi sırasında yapılan müdahale sayıları.

Gün	PHE Ortalama müdahale sayısı			PHEM Ortalama müdahale sayısı		
	0-10 dk	10-20 dk	20-30 dk	0-10 dk	10-20 dk	20-30 dk
16	38,4*	32,3*	38,3*	14,0	15,7	13,2
17	37,1*	30,4*	31,6*	21,2	14,2	13,8
18	40,3*	35,6*	39,0*	24,3	16,7	19,8
19	39,3*	32,0*	38,5*	22,8	18,5	22,7
20	40,3*	34,8*	50,7*	23,3	18,3	22,7

#### 4.4. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri değerlendirme süreci videoların izlenmesi ve verilerin toplanması ile başlamıştır. Veriler hem gruplar arası farklar açısından hem de aynı grubun zaman içinde değişimi açısından istatistiksel olarak analiz edilmişlerdir. Gruplar arası karşılaştırmalar uygulanan yöntemlerin hastalık modelini nasıl etkilediğine dair sonuçlar vermektedir. Zamana bağlı değişimlerin karşılaştırılması ise tüm deney sürecinin aynı gruptaki hayvanlar üzerindeki etkileri hakkında bilgi vermektedir. MPTP öncesi ve MPTP sonrası karşılaştırmak hastalık modelinin oluşması hakkında yorum yapabilmek içindir. MPTP sonrası ve tedavi sonrası verilerin değerlendirilmesi hastalığın iyileşme eğilimini gözlemleyebilmek adına bilgi vermektedir. MPTP öncesi ve tedavi sonrası verilerin karşılaştırılması ise grubun ilk hallerine ne kadar geri döndükleri veya ne kadar değiştikleri hakkında bilgi toplamak amacı ile yapılmıştır.

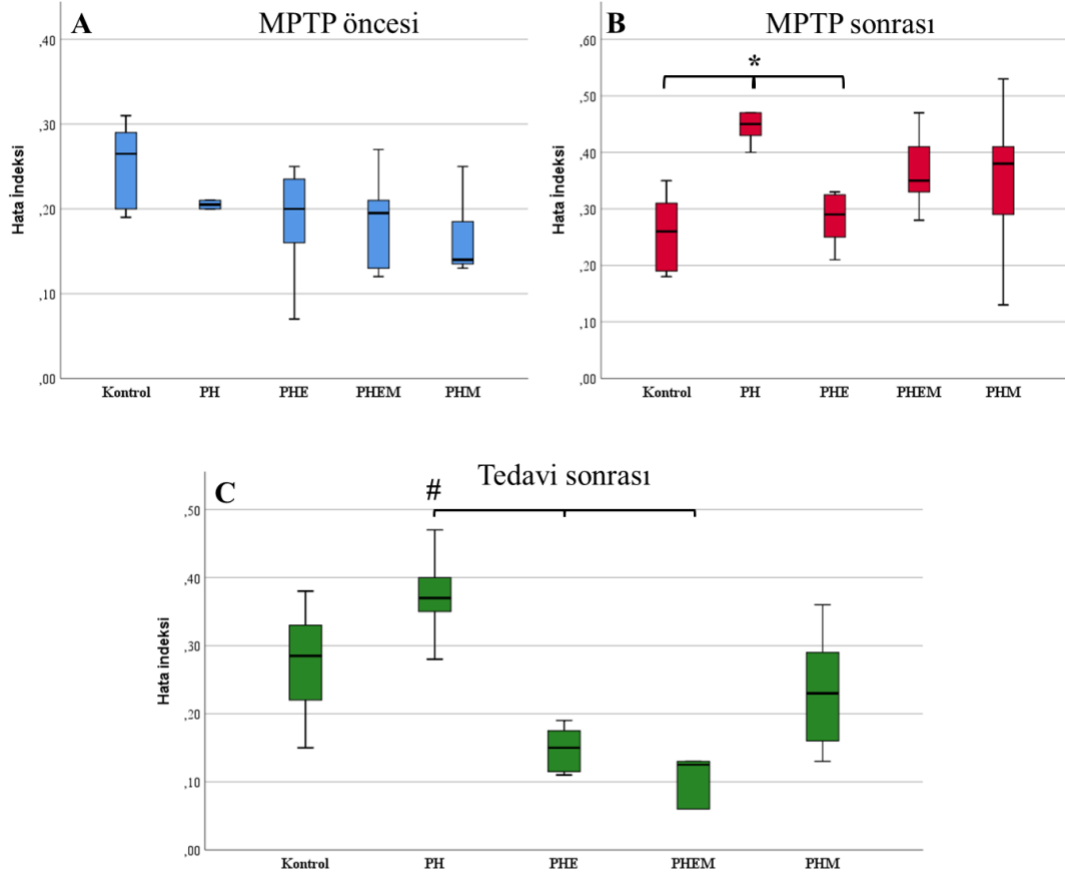
##### 4.4.1. Yatay Çubukta Zorlu Yürüme Testi

Yatay çubukta zorlu yürüme test videoları incelenerek deney hayvanlarının tel üzerinde yürürken adım attıkları sayıları ve hata sayıları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ile “Hata indeksi” hesaplanmıştır. Hata indeksi = hata sayısı/adım sayısı formülü ile hesaplanmıştır. Hata indeksi sayesinde adım başına yapılan hata sayısı



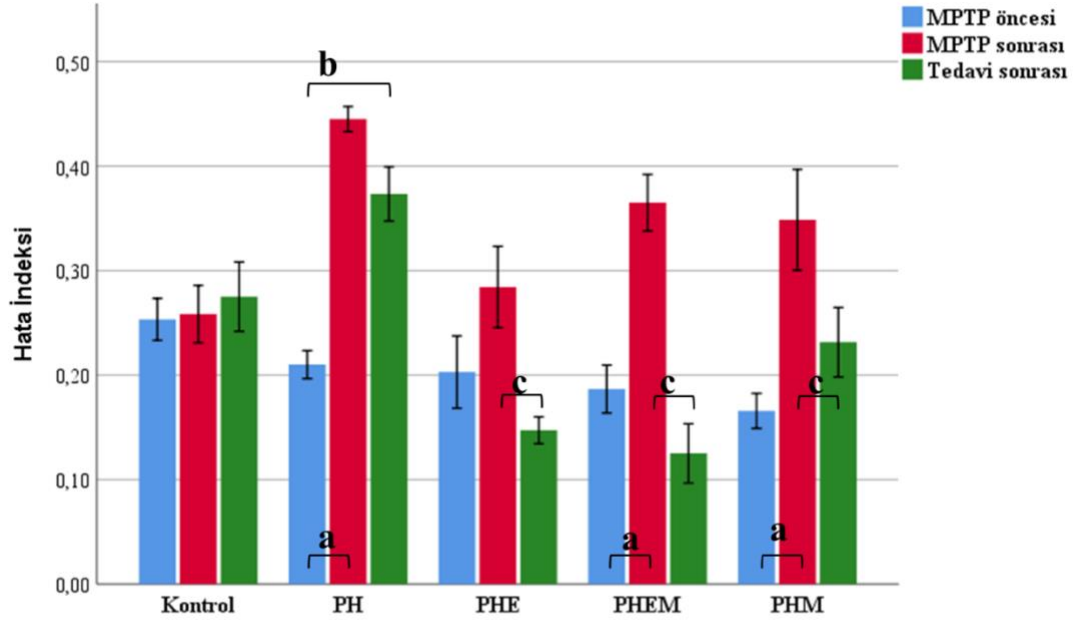
belirlenmektedir. İstatistiksel incelemeler temelde iki şekilde yapılmıştır. İlk olarak her bir zamana göre (MPTP öncesi, MPTP sonrası ve tedavi sonrası) gruplar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İkinci olarak grup içi karşılaştırma yapılmıştır. Yani grubun zaman içindeki performans değişimi saptamak amacıyla üç farklı zamanda yapılan test sonuçları karşılaştırılmıştır.

Gruplar arası farklara bakıldığında şu sonuçlara rastlanmıştır. PH öncesi yapılan davranış testlerinde gruplar arasında hata indeksi açısından herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır. PH sonrası yapılmış olan davranış deneyleri ilk testler ile karşılaştırılarak hastalık modelinin gelişip gelişmediği değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı derecede fark olduğu hesaplanmıştır ( $P = 0,010$ ). Gruplar arası farklara bakıldığında PH grubu kontrol ve PHM grubundan daha yüksek bir hata indeksine sahip olduğu görülmüştür ( $P_{PH-Kontrol} = 0,009$ ,  $P_{PH-PHM} = 0,047$ ). Tüm gruplarda hata indeksi kontrol grubuna göre artmıştır. tedavi sonrası hata indeksleri gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu saptanmıştır ( $P < 0,001$ ). Bu anlamlılığı ortaya çıkaran grup farklılıkları analiz edilince PH grubu ile PHE ve PHEM grupları arasında olduğu saptanmıştır. PHE ve PHEM gruplarının hata indeksleri PH grubuna göre anlamlı seviyede düşüktür ( $P_{PH-PHE} = 0,004$ ,  $P_{PH-PHEM} = 0,002$ ) (Şekil 4.4.).



**Şekil 4.4.** Yatay çubukta zorlu yürüme testi grupları arası hata indeksleri karşılaştırma grafikleri. Hata indekslerinin grupları arası değerlendirme grafikleri gösterilmektedir. (A, MPTP öncesi) Grupları arası anlamlı bir fark bulunmamaktadır. (B, MPTP sonrası) PH grubu anlamlı derecede kontrol ve PHE grubundan yüksektir. (\*  $P_{PH-Kontrol} = 0,009$ ,  $p_{PH-PHE} = 0,047$ ). (C, tedavi sonrası) PHE ve PHM grupları hata indeksleri PH grubuna göre anlamlı seviyede düşüktür. (#  $P_{PH-PHE} = 0,004$ ,  $P_{PH-PHEM} = 0,002$ ).

Grupları kendi içlerinde zaman göre değişimleri incelendiğinde MPTP öncesi ve MPTP sonrası hata indekslerinde Kontrol grubunda fark oluşmamıştır. Buna karşın PH ( $P = 0,027$ ), PHE ( $P = 0,018$ ), PHEM ( $P = 0,027$ ) ve PHM ( $P = 0,028$ ) gruplarında hata indekslerinin anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. MPTP öncesi ile tedavi sonrası hata indeksleri açısından ise PH grubu dışında hiçbir grupta anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. PH grubunda hata indeksinin sayısında anlamlı derecede artış olduğu tespit edilmiştir ( $P = 0,028$ ). MPTP sonrası ve tedavi sonrası verileri incelendiğinde, Kontrol grubu ve PH grubunda bir fark bulunmazken, PHE ( $P = 0,027$ ), PHEM ( $P = 0,027$ ) ve PHM ( $P = 0,027$ ) gruplarında anlamlı seviyede düşüş olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5.).



**Şekil 4.5.** Hata indekslerinin zamana göre değişim grafiği. Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki hata indekslerini gösteren grafik verilmektedir. (a) MPTP öncesi ve MPTP sonrasına ait hata indekslerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı derecede fark olan sonuçlar gösterilmektedir. ( $P < 0,05$ ). (b) MPTP öncesi ve tedavi sonrası ait hata indekslerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı derecede fark olan sonuçlar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (c) MPTP sonrası ve tedavi sonrası ait hata indekslerinin karşılaştırılması sonucu anlamlı derecede fark olan sonuçlar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.2. Spontan Aktivite Silindir Testi

Spontan aktivite silindir testinin videoları izlenerek arka ayak adım sayısı, ön ayak adım sayısı, dikelme sayısı ve temizlenme süreleri analiz edilmiştir. Bu veriler kullanılarak belirlenen ve istatistiksel analize alınan indeks ve değerler aşağıdaki gibidir.

- Arka ayak adım sayısı
- Ön ayak/arka ayak adım sayısı oranı
- Dikelme sayısı
- Temizlenme süresi
- Hareket indeksi = (arka ayak adım sayısı + dikelme sayısı)/(toplam süre - temizlenme süresi)

- Arka ayak indeksi = arka ayak adım sayısı/(toplam süre - temizlenme süresi)

MPTP öncesi ve MPTP sonrasını karşılaştırmak hastalık modelinin oluşması hakkında yorum yapabilmek için yapılmıştır. MPTP sonrası ve tedavi sonrası verilerin değerlendirilmesi hastalığın iyileşme eğilimini gözlemleyebilmek adına yapılmıştır. MPTP öncesi ve tedavi sonrası toplanan verilerin karşılaştırılması ise grubun ilk hallerine ne kadar geri döndüklerini incelemek için yapılmıştır.

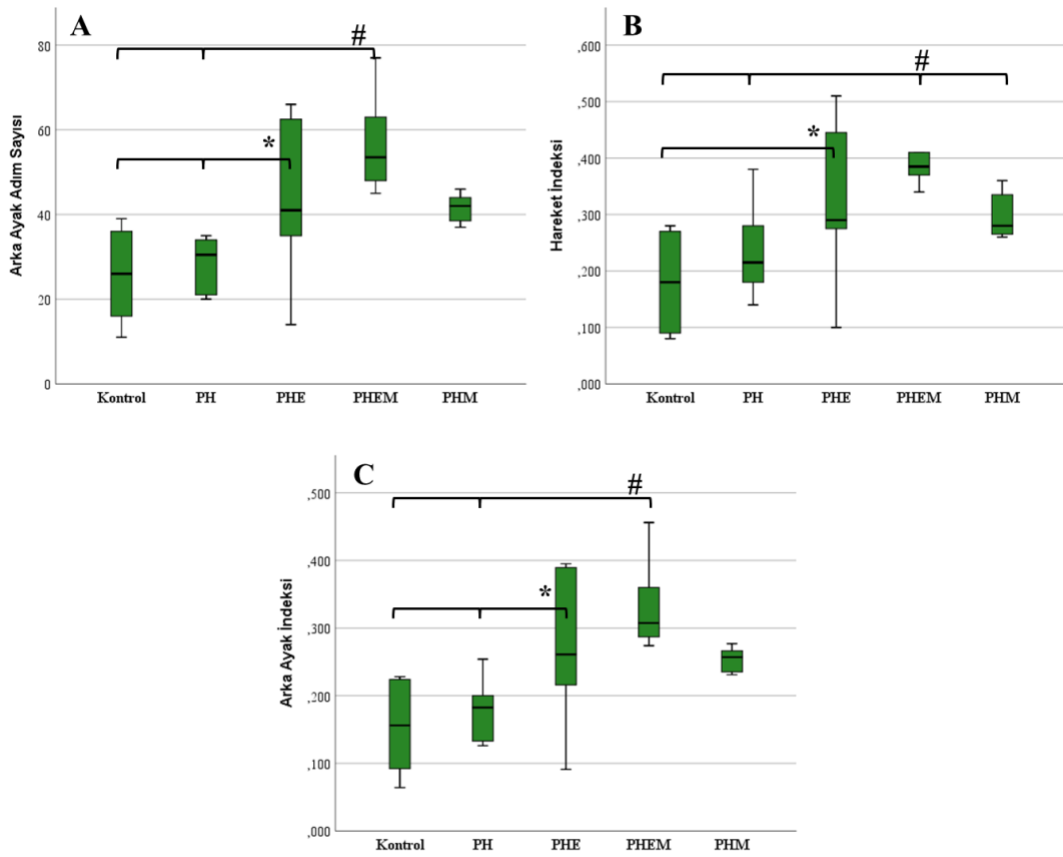
Gruplar arası istatistiksel analizler üç farklı davranış testi zamanı için ayrı ayrı yapılmıştır. MPTP öncesi ve MPTP sonrasına ait spontan aktivite testlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** MPTP öncesi ve MPTP sonrası yapılan spontan aktivite silindir testi sonuçları. Spontan aktivite silindir testi arka ayak adım sayıları, dikelme sayıları ve temizlenme süreleri gösterilmektedir. Sonuçlar ortanca (Çeyrekler arası genişlik-ÇEG) olarak verilmiştir.

<b>MPTP öncesi</b>	<b>Arka ayak</b>	<b>Ön ayak/ Arka ayak</b>	<b>Dikelme sayısı</b>	<b>Temizlenme süresi (sn)</b>
<b>Kontrol</b>	37,5 (21,75)	1,71 (1,41)	5 (11,75)	7,5 (9,25)
<b>PH</b>	56 (45)	1,42 (1,66)	16 (13,75)	10 (12,5)
<b>PHE</b>	42 (38)	1,5 (1,28)	9 (13)	14 (8)
<b>PHEM</b>	52 (26,25)	1,49 (0,85)	12 (13,5)	14 (5,5)
<b>PHM</b>	58 (14)	1,12 (0,73)	15 (11)	12 (8)
<b>MPTP Sonrası</b>	<b>Arka ayak</b>	<b>Ön ayak/ Arka ayak</b>	<b>Dikelme sayısı</b>	<b>Temizlenme süresi (sn)</b>
<b>Kontrol</b>	41 (30,75)	1,64 (0,54)	8,5 (8,5)	9 (8,5)
<b>PH</b>	29,5 (40,5)	1,87 (1,76)	8,5 (13,75)	11,5 (14)
<b>PHE</b>	40 (35)	1,37 (0,21)	10 (6)	11 (11)
<b>PHEM</b>	44 (29,5)	1,31 (0,68)	8,5 (13,5)	15,5 (8,25)
<b>PHM</b>	33 (14)	1,52 (0,27)	2 (8)	15 (11)

Tedavi sonrası yapılan davranış testi sonuçlarında arka ayak adım sayılarında gruplar arasında anlamlı derecede bir fark bulunmuştur ( $P = 0,003$ ). PHE ve PHEM grupları kontrol ve PH gruplarına kıyasla daha fazla arka ayak adım sayısına sahiptir ( $P_{PHE-PH} = 0,046$ ,  $P_{PHE-Kontrol} = 0,036$ ,  $P_{PHEM-PH} = 0,001$ ,  $P_{PHEM-Kontrol} = 0,001$ ). PHM grubunda da artış oluşmuş fakat anlamlılığa ulaşmamıştır. Bunun yanı sıra hareket indeksi ( $P = 0,007$ ) ve arka ayak indeksi ( $P = 0,003$ ) verilerinde de benzer şekilde gruplar arası fark olduğu saptanmıştır. Farklılığı yaratan gruplar incelendiğinde

hareket indeksi açısından PHE ve PHEM gruplarının Kontrol ve PH gruplarına göre anlamlı derecede yüksek skorlar elde ettiği görülmüştür ( $P_{\text{PHE-Kontrol}} = 0,016$ ,  $P_{\text{PHEM-PH}} = 0,009$ ,  $P_{\text{PHEM-Kontrol}} = 0,001$ ). Hatta PHEM grubu PHM grubundan da anlamlı seviyede daha yüksek skor elde etmiştir ( $P_{\text{PHEM-PHM}} = 0,040$ ). Arka ayak indeksi verilerinde durum yine aynı şekildedir. Farklılık PHE ve PHEM gruplarının Kontrol ve PH gruplarına göre daha yüksek skorlar elde etmesinden kaynaklı olduğu görülmüştür ( $P_{\text{PHE-Kontrol}} = 0,021$ ,  $P_{\text{PHEM-Kontrol}} < 0,001$ ,  $P_{\text{PHEM-PH}} = 0,002$ ). Her iki parametre için PHM grubu kontrol ve PH gruplarına kıyasla yüksek skorlar elde etmiştir ancak bu artış anlamlılığa ulaşmamıştır (Şekil 4.6.).



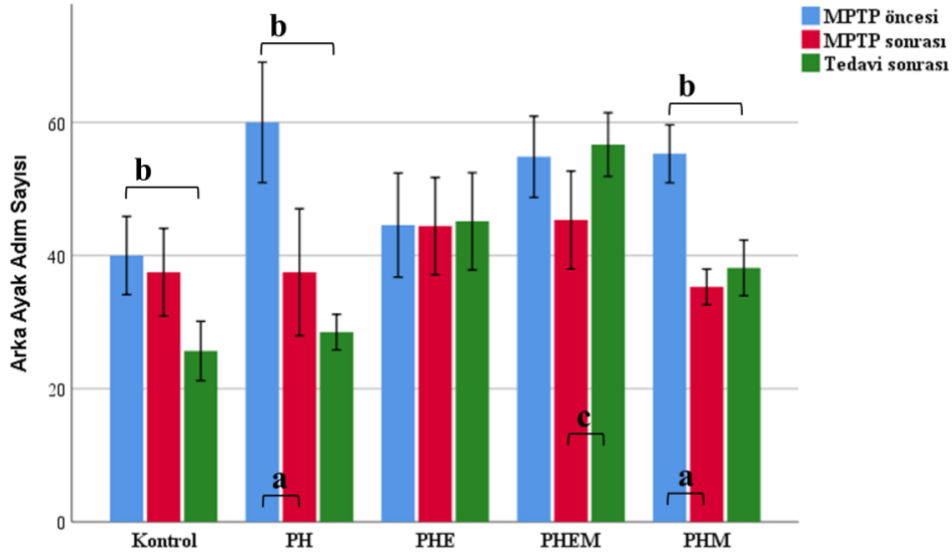
**Şekil 4.6.** Tedavi sonrası spontan aktivite silindir testi grafikleri. (A, Arka ayak adım sayısı) PHE ve PHEM grupları anlamlı derecede Kontrol ve PH grubundan yüksektir ( $*P_{\text{PHE-PH}} = 0,046$ ,  $P_{\text{PHE-Kontrol}} = 0,036$ ,  $\#P_{\text{PHEM-PH}} = 0,001$ ,  $P_{\text{PHEM-Kontrol}} = 0,001$ ). (B, Hareket indeksi) PHE ve PHEM grupları anlamlı derecede Kontrol ve PH grubundan yüksektir. Bunun yanı sıra PHEM grubu PHM grubundan anlamlı derecede yüksektir ( $*P_{\text{PHE-Kontrol}} = 0,016$ ,  $\#P_{\text{PHEM-PH}} = 0,009$ ,  $P_{\text{PHEM-Kontrol}} = 0,001$ ,  $P_{\text{PHEM-PHM}} = 0,040$ ). (C, Arka ayak indeksi) PHE ve PHEM grupları anlamlı derecede Kontrol ve PH grubundan yüksektir ( $*P_{\text{PHE-Kontrol}} = 0,021$ ,  $\#P_{\text{PHEM-Kontrol}} < 0,001$ ,  $P_{\text{PHEM-PH}} = 0,002$ ).

Tedavi sonrası, ön ayak adım sayısı/arka ayak adım sayısı oranı, dikiş sayısı ve temizlenme süresi parametrelerinde gruplar arasında fark saptanmamıştır (Tablo 4.5.).

**Tablo 4.5.** Tedavi sonrası yapılan spontan aktivite silindir testi sonuçları. Arka ayak adım sayıları, dikiş sayıları ve temizlenme süreleri gösterilmektedir. Sonuçlar ortanca (Çeyrekler arası genişlik-ÇEG) olarak verilmiştir.

<b>Tedavi sonrası</b>	<b>Ön ayak/ Arka ayak</b>	<b>Dikiş sayısı</b>	<b>Temizlenme süresi (sn)</b>
<b>Kontrol</b>	1,71 (0,86)	4,5 (5,25)	8 (13,75)
<b>PH</b>	1,5 (1,06)	7,5 (10,25)	20,5 (19,5)
<b>PHE</b>	1,39 (0,18)	9 (8)	22 (11)
<b>PHEM</b>	1,39 (0,46)	12,5 (10)	9,5 (9)
<b>PHM</b>	1,21 (0,57)	6 (9)	17 (13)

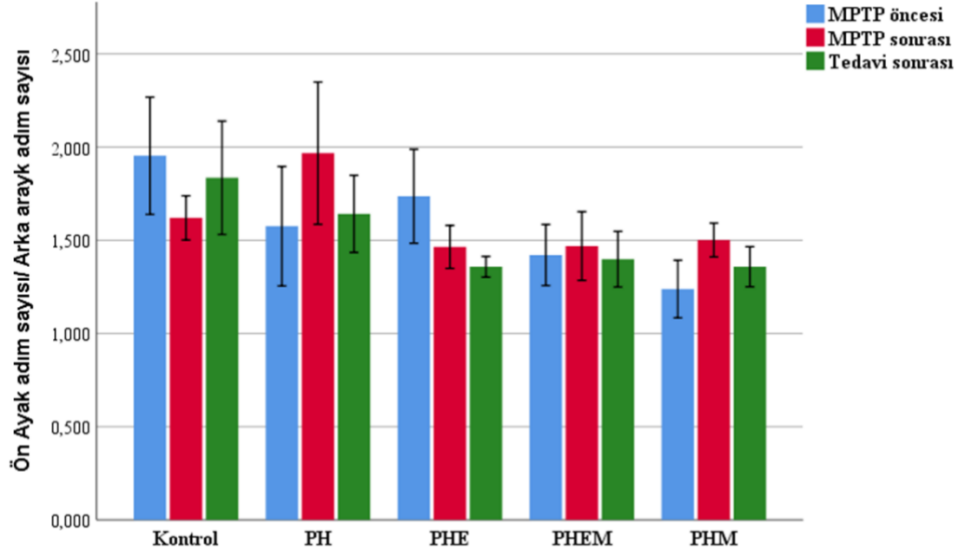
Spontan aktivite davranış testleri grupların kendi içinde zamana göre değişimleri incelendiğinde anlamlı farklılıkların olduğu gözle çarpmaktadır. MPTP öncesi ve MPTP sonrası arka ayak adım sayıları analiz edildiğinde sadece PH ( $P = 0,028$ ) ve PHM ( $P = 0,028$ ) gruplarında anlamlı seviyede azalma tespit edilmiştir. MPTP sonrası ve tedavi sonrası sonuçlara bakıldığında PHEM grubunda anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ( $P = 0,042$ ). MPTP öncesi ve tedavi sonrası arka ayak adım sayıları karşılaştırıldığında Kontrol ( $P = 0,046$ ), PH ( $P = 0,028$ ) ve PHM ( $P = 0,018$ ) gruplarında anlamlı seviyede düşüş yaşandığı görülmüştür (Şekil 4.7.).



**Şekil 4.7.** Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki arka ayak adım sayıları grafiği (a) MPTP öncesi ve MPTP sonrasına ait arka ayak adım sayılarının karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (b) MPTP öncesi ve tedavi sonrasına ait arka ayak adım sayılarının karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (c) MPTP sonrası ve tedavi sonrasına ait arka ayak adım sayılarının karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ).

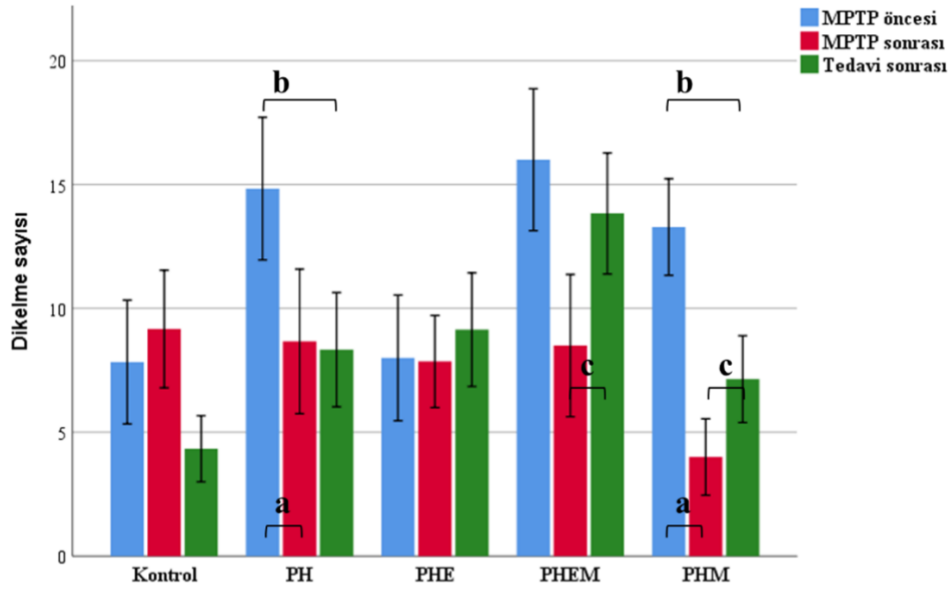


Ön ayak adım sayısı/Arka ayak adım sayısı oranının zamana göre değerlendirilmesi sonucunda istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilememiştir. Gruplarda bu oranın genel olarak bir miktar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.8.).



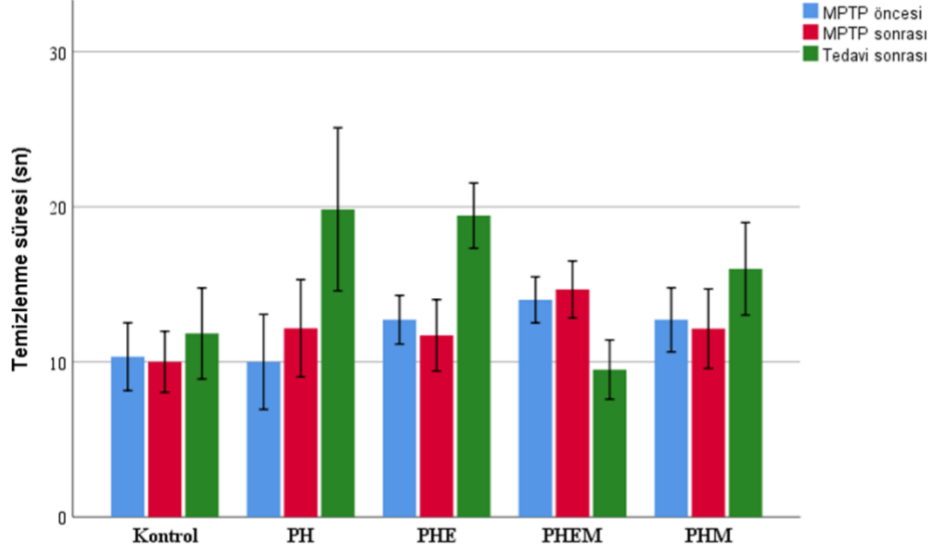
**Şekil 4.8.** Ön ayak adım sayısı/Arka ayak adım sayısı oranının zamana göre değişim grafiği.

Dikelme sayılarının açısından MPTP öncesi ve sonrası değerlendirildiğinde PH ( $P = 0,028$ ) ve PHM ( $P = 0,017$ ) gruplarında arasında anlamlı düşüş olduğu saptanmıştır. Diğer gruplar arasında bir fark yoktur. MPTP sonrası ve tedavi sonrası karşılaştırıldığında PHM ( $P = 0,041$ ), PHEM ( $P = 0,039$ ) gruplarında anlamlı seviyede artış olduğu görülmüştür. MPTP öncesi ve tedavi sonrası değerlendirildiğinde ise sadece PH ( $P = 0,042$ ) ve PHM ( $P = 0,027$ ) gruplarında düşüşlerin olduğu, diğer gruplarda anlamlı bir farkın olmadığı göze çarpmaktadır (Şekil 4.9.).



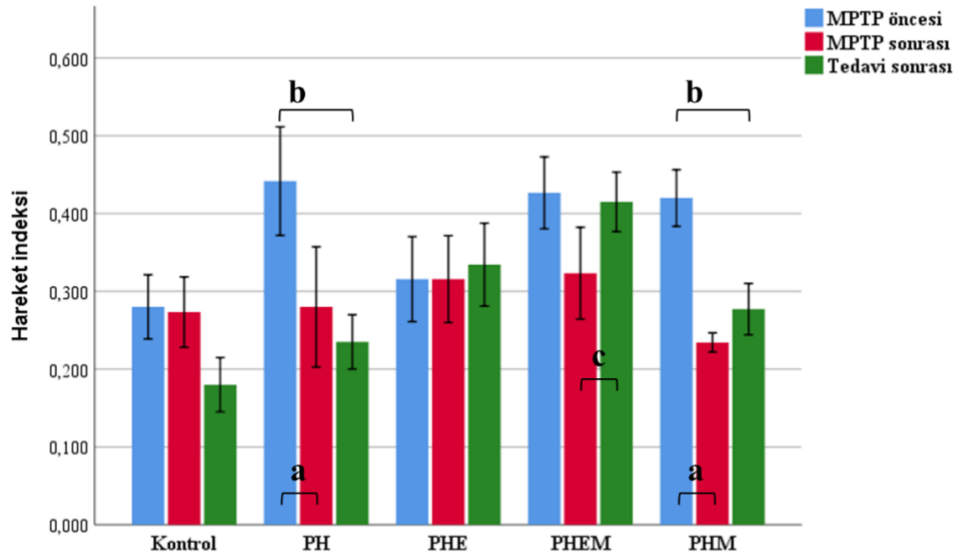
**Şekil 4.9.** Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki dikelme sayıları grafiği. (a) MPTP öncesi ve MPTP sonrasına ait dikelme sayılarının karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (b) MPTP öncesi ve tedavi sonrasına ait dikelme sayılarının karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (c) MPTP sonrası ve tedavi sonrasına ait dikelme sayılarının karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ).

Temizlenme sürelerinin grup içinde zamana göre değişimi incelendiğinde gruplar açısından anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 4.10.).



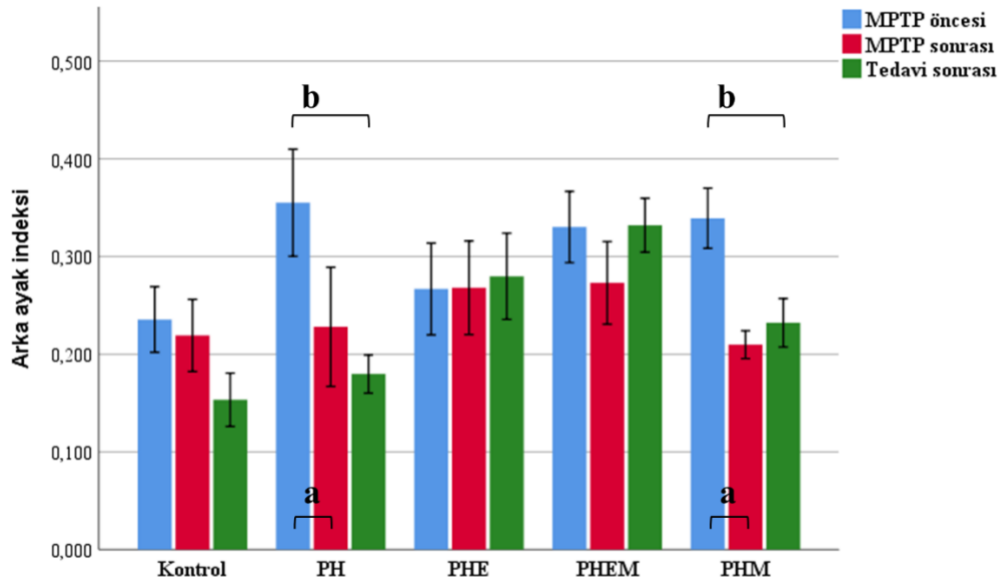
**Şekil 4.10.** Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki temizlenme süreleri grafiği.

Hareket indeksi sonuçları zamana göre grup içi değişimleri incelendiğinde MPTP öncesi ve MPTP sonrası değerlerin karşılaştırılmasında PH ( $P = 0,028$ ) ve PHM ( $P = 0,018$ ) gruplarında anlamlı seviyede azalma olduğu bulunmuştur., MPTP sonrası ve tedavi sonrası değerlere bakıldığında ise hareket indeksinde sadece PHEM ( $P = 0,046$ ) grubunda anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür. MPTP öncesi ve tedavi sonrası değerler karşılaştırıldığında Kontrol, PHEM ve PHE gruplarında ilk hallerine göre bir fark oluşmadığı, PH ( $P = 0,028$ ) ve PHM ( $P = 0,018$ ) gruplarında bir azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11.).



**Şekil 4.11.** Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki hareket indeksleri grafiği. (a) MPTP öncesi ve MPTP sonrasına ait hareket indekslerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (b) MPTP öncesi ve tedavi sonrasına ait hareket indekslerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (c) MPTP sonrası ve tedavi sonrasına ait hareket indekslerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ).

Arka ayak adım indeksi sonuçlarının grup içi zamana göre değişimleri incelendiğinde, MPTP öncesi ve MPTP sonrasında PH ( $P = 0,028$ ), PHM ( $P = 0,028$ ) gruplarında istatistiksel açıdan azalış olduğu saptanmıştır. MPTP sonrası ve tedavi sonrası veriler karşılaştırıldığında PHM ve PHEM gruplarında bir miktar artış olduğu ancak istatistiksel açıdan bir fark oluşmadığı görülmüştür. MPTP öncesi ve tedavi sonrası veriler karşılaştırıldığında ise PH ( $P = 0,028$ ) ve PHM ( $P = 0,018$ ) gruplarında anlamlı seviyede azalma görülmüştür (Şekil 4.12.).



**Şekil 4.12.** Tüm grupların üç farklı zamanda yapılan testlerdeki arka ayak indeksleri grafiği. (a) MPTP öncesi ve MPTP sonrasına ait arka ayak indekslerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ). (b) MPTP öncesi ve tedavi sonrasına ait arka ayak indekslerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel düzeyde anlamlılığa ulaşmış farklılıklar gösterilmektedir ( $P < 0,05$ ).

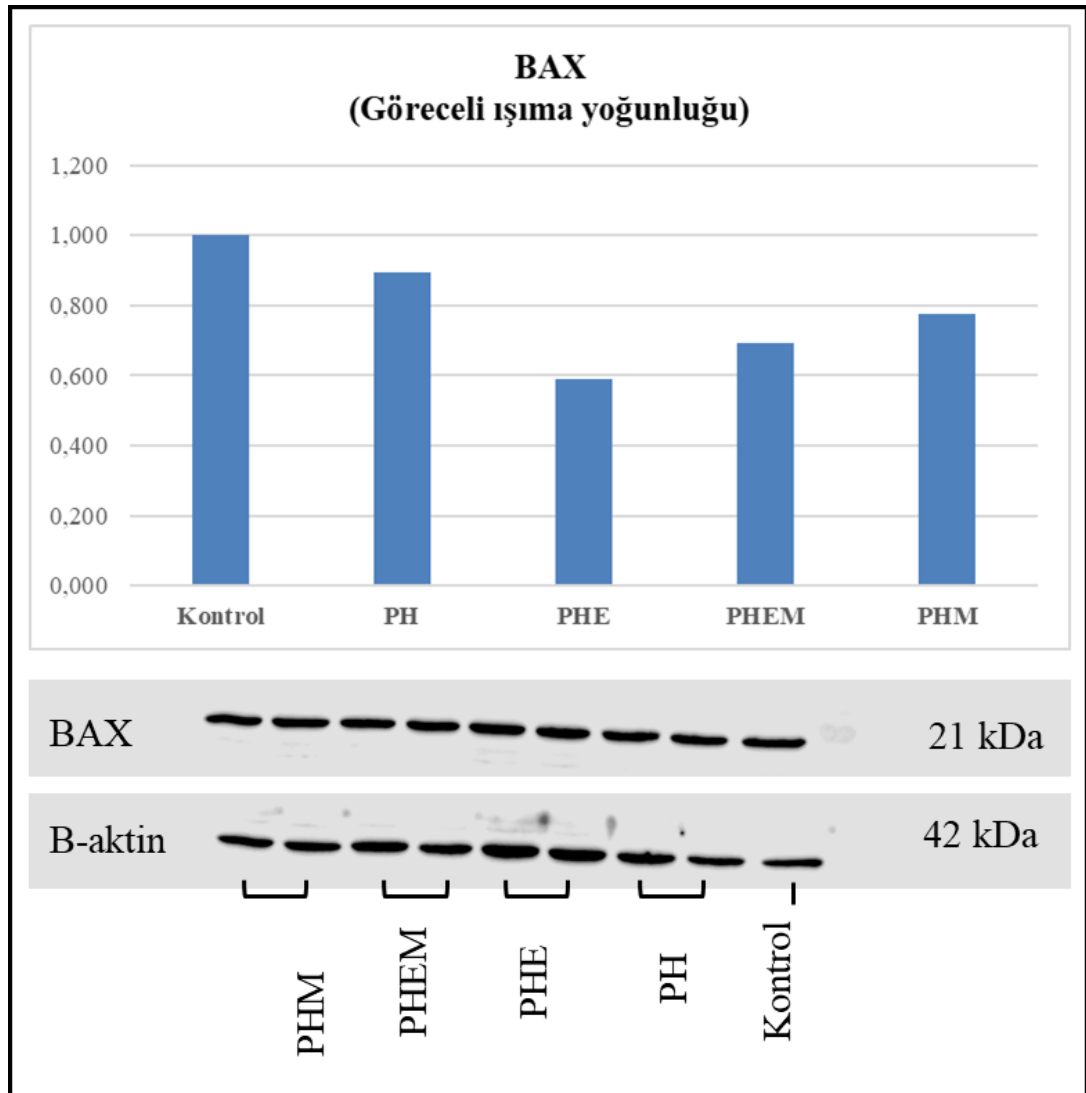
#### 4.5. Western Blot Analizleri

Beyin dokusundan izole edilen homojenat ile yapılan *Western blot* deneyleri sonucunda ilgili proteinlerin kontrol grubuna göre göreceli ışına yoğunlukları hesaplanmış ve aynı membrana ait  $\beta$ -aktin proteini seviyelerine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon için  $\beta$ -aktin seviyeleri ölçülmeden önce membranların üzerindeki eski primer ve sekonder antikörlerin temizlenmesi için *stripping* tamponu

ile temizleme işlemi yapılmıştır. Bu işlemin hemen ardından membran ECL substratı ile tekrar muamele edilerek fotoğraflanmış ve cihazda herhangi bir ışımaya olmadığı saptanmıştır. Bu yöntem ile antikorların membrandan uzaklaştığı ve yeni primer ve sekonder antikorlar ile muamele edilebileceği kanıtlanmaktadır.

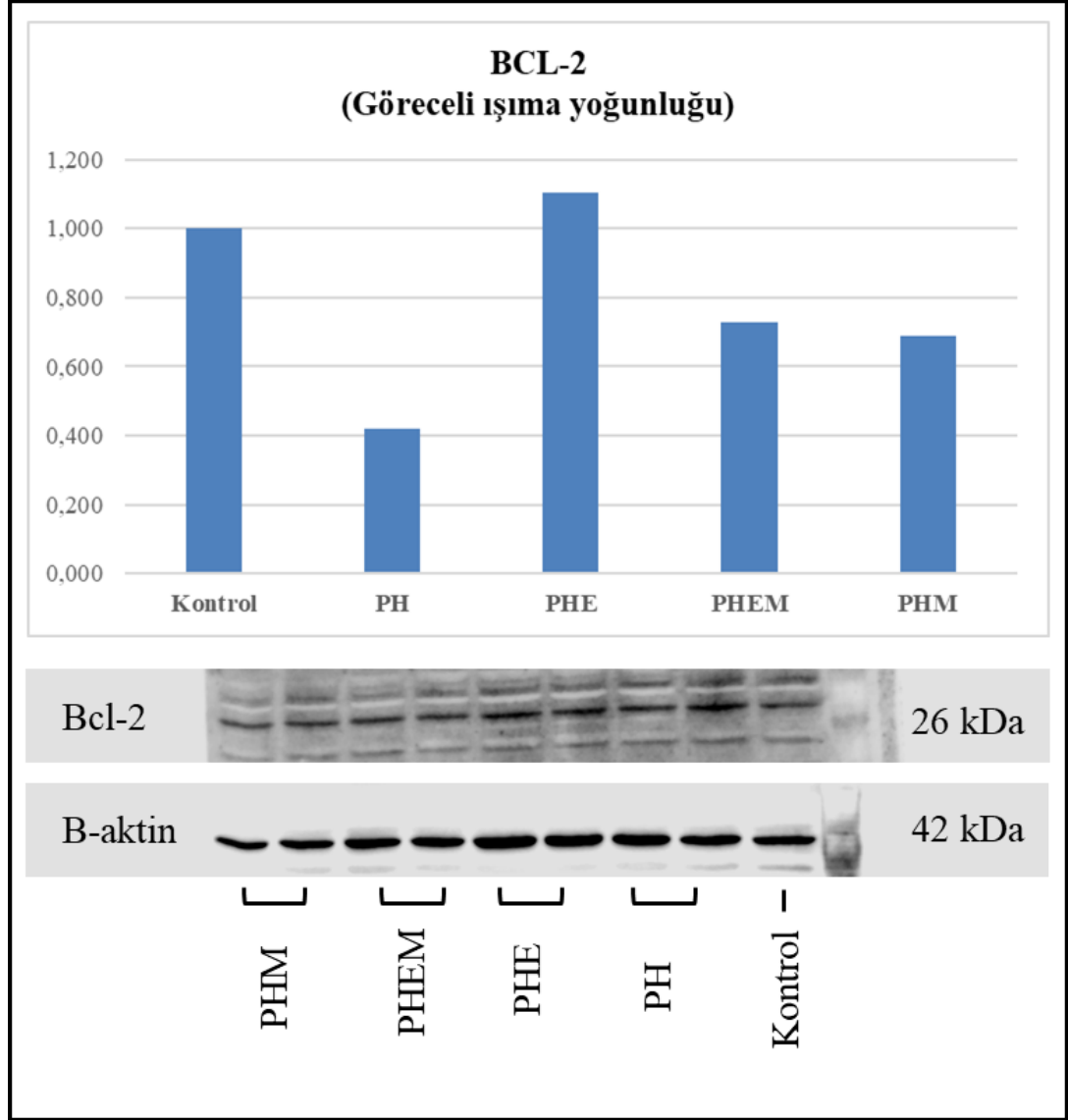
#### 4.5.1. Bax ve BCL-2 Protein Analizleri

Bax proteininin göreceli ışımaya yoğunlukları değerlendirildiğinde kontrole göre diğer tüm gruplarda azalma olduğu görülmüştür. Azalma egzersiz protokolü uygulanan PHE ve PHEM gruplarında daha belirgindir (Şekil 4.13.).



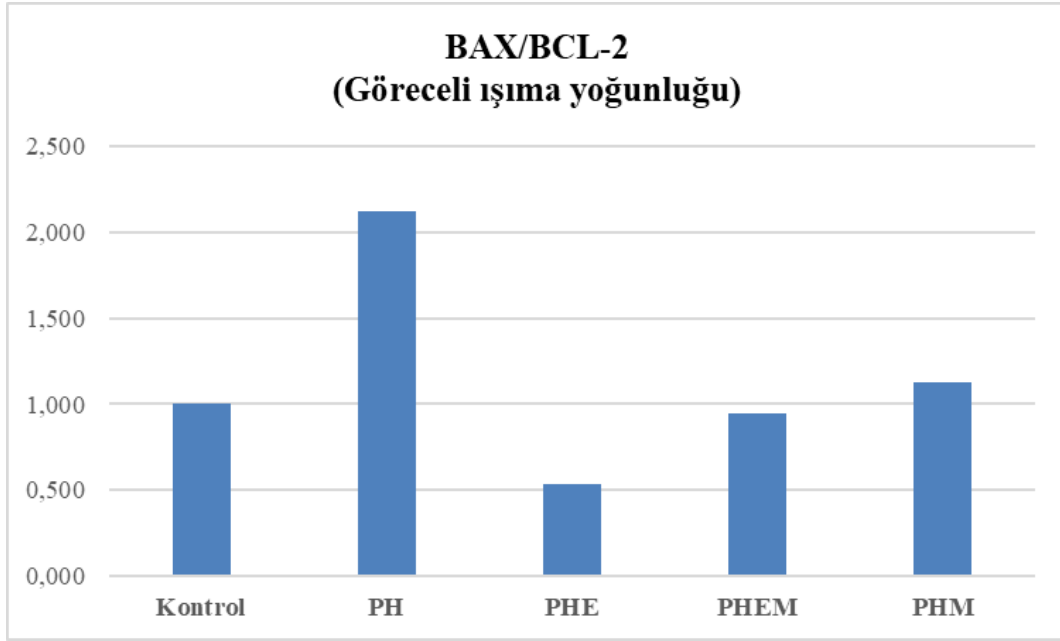
Şekil 4.13. Bax proteininin *Western blot* analizleri grafiği ve görüntüleri.

BCL-2 sonuçları değerlendirildiğinde kontrole oranla PH grubunda belirgin bir azalış saptanmıştır. Bunun yanı sıra BCL-2'deki en yüksek artışın PHE grubunda olduğu saptanmış, mitokondri verilen PHEM ve PHM gruplarında ise BCL-2 seviyeleri kontrol grubunun altında kalmıştır (Şekil 4.14.).



**Şekil 4.14.** Bcl-2 proteininin *Western blot* analizleri grafiği ve görüntüleri.

Bax/Bcl-2 oranı anti-apoptotik sürecin bir belirteci olarak Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ışına yoğunluklarının oranlanmasıyla hesaplanmıştır. PH grubunda en yüksek değer elde edilmiştir. PHM grubunda Bax/Bcl-2 oranının kontrol grubuna kıyasla çok az bir artış gösterdiği saptanmıştır. Egzersiz yaptırılan PHE ve PHEM gruplarında kontrole göre azalış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.15.).

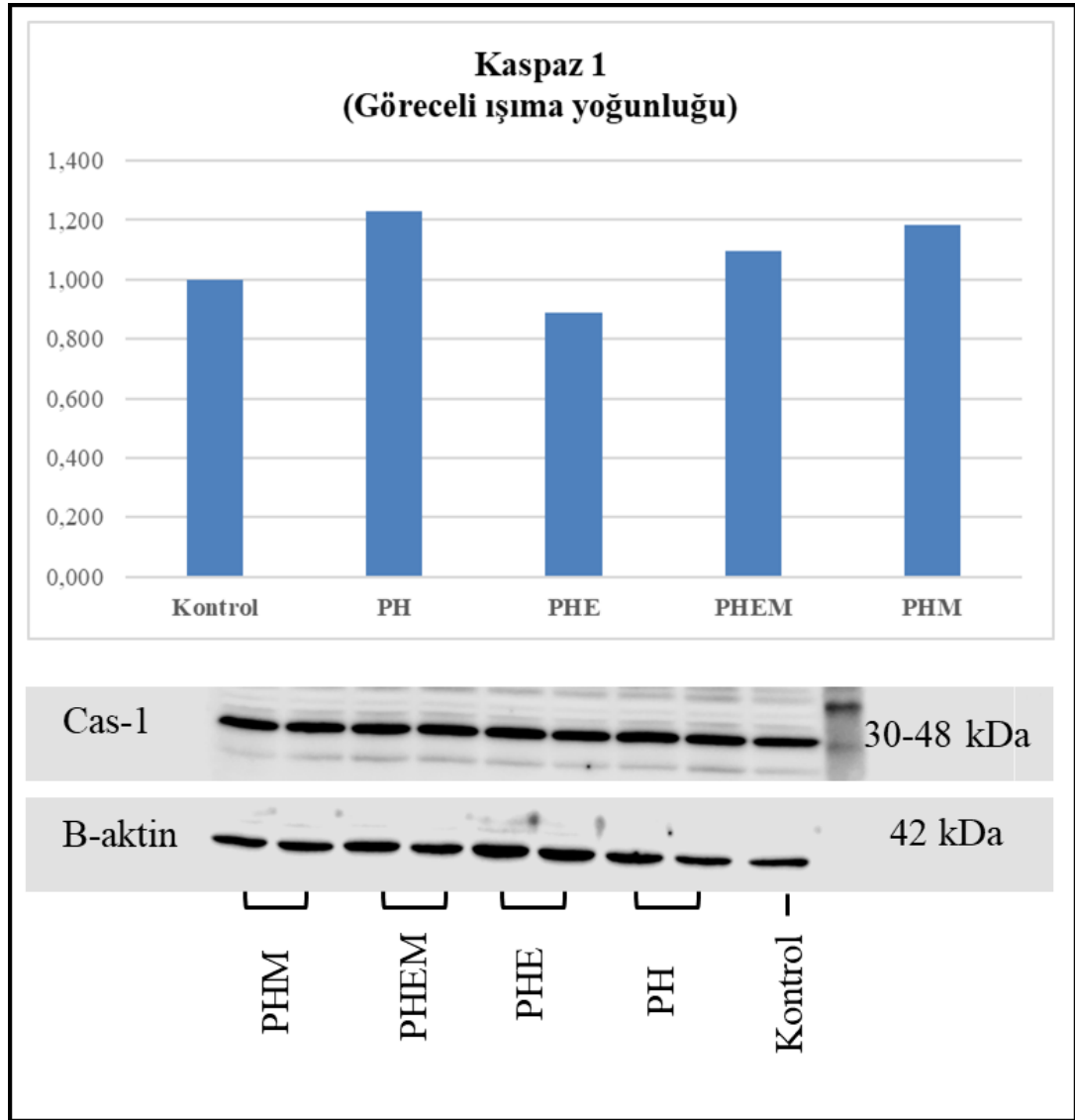


**Şekil 4.15.** Bax ışına yoğunluklarının Bcl-2 ışına yoğunluklarına oranı (Bax/Bcl-2) grafiği.



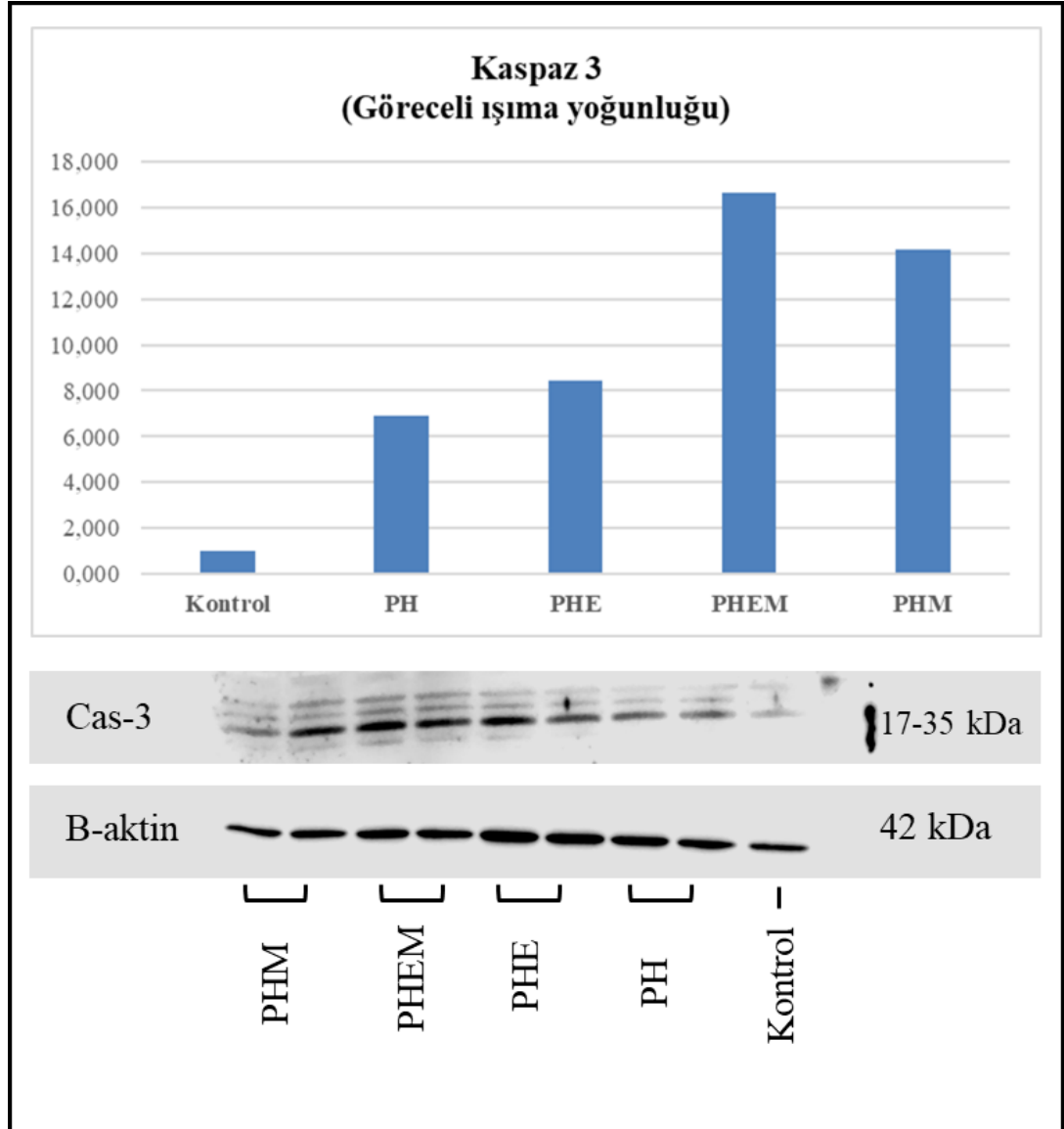
#### 4.5.2. Kaspaz 1 ve Kaspaz 3 Protein Analizleri

Kaspaz 1'in protein seviyelerinin PH grubunda kontrol grubuna göre arttığı göze çarpmaktadır. PHE grubunda kontrol grubundan daha düşük seviyelerde kaldığı gözlemlenmiştir. Mitokondri transplantasyonu yapılan gruplarda kaspaz 1 seviyelerinin kontrole oranla yine artış gösterdiği ve bu artışın PHM grubunda PHEM grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Kaspaz 1 proteininin *Western blot* analizleri grafiği ve görüntüleri.

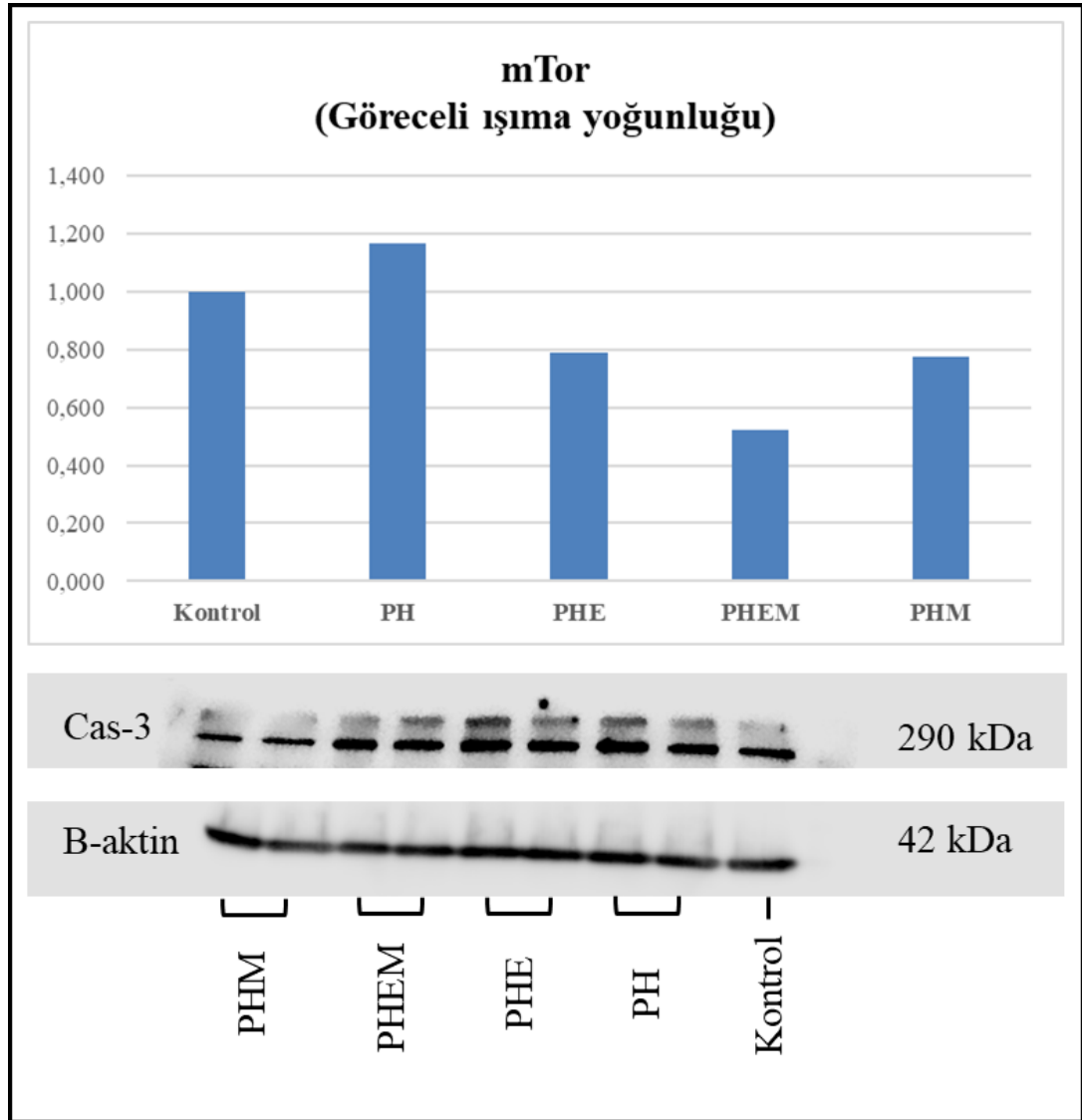
Kaspaz 3 proteini için yapılan değerlendirmelerde tüm gruplardaki ışımaya yoğunluğunun kontrole göre arttığı saptanmıştır. Artışın mitokondri verilen PHEM ve PHM gruplarında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. PHE ve PH gruplarında kaspaz 3 seviyelerindeki artışın benzer miktarlarda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.17.).



**Şekil 4.17.** Kaspaz 3 proteininin *Western blot* analizleri grafiği ve görüntüleri.

### 4.5.3. mTOR ve P-mTOR Protein Analizleri

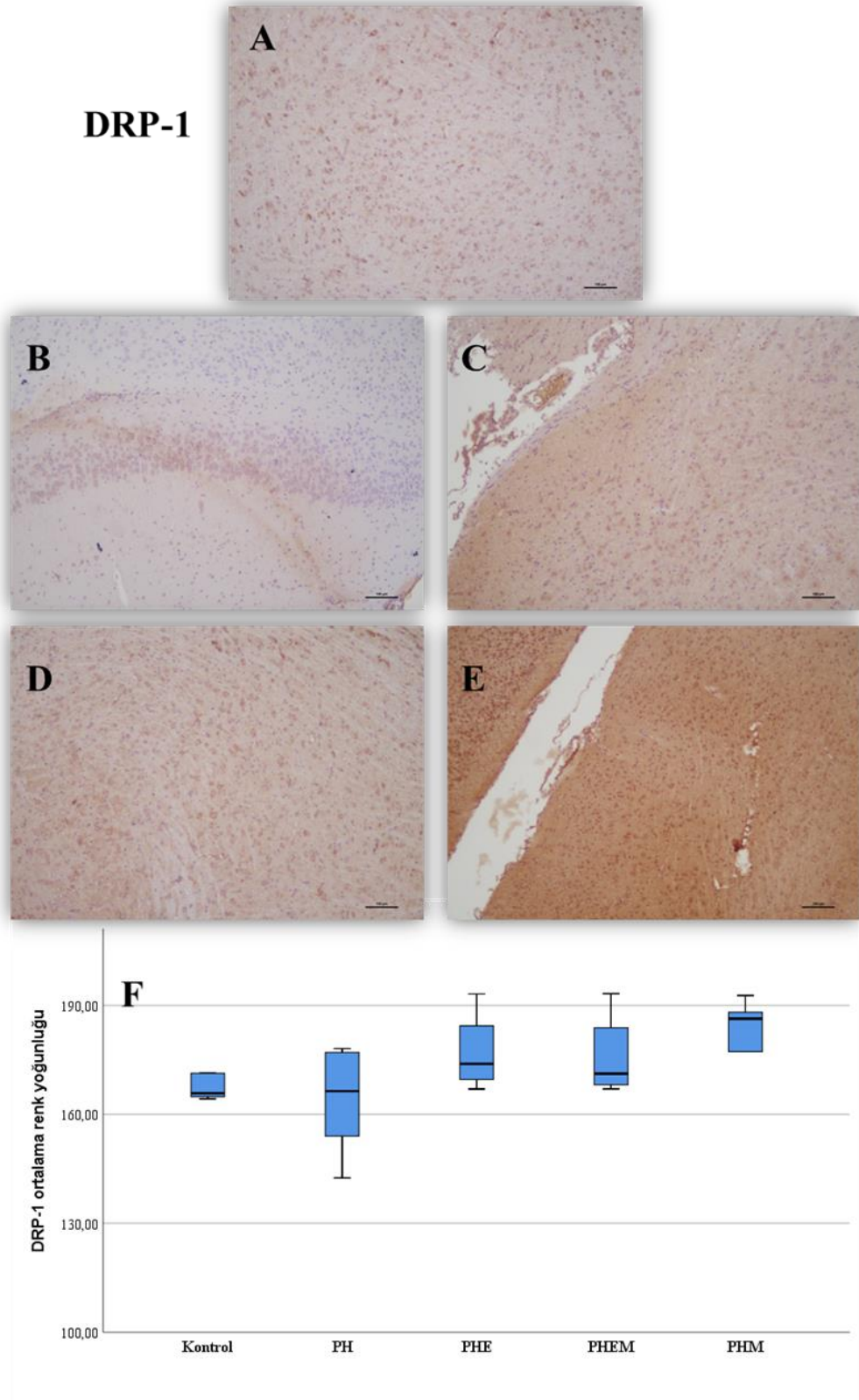
mTOR protein seviyelerinin PH grubunda diğer gruplara göre arttığı gözlemlenmektedir. PHE, PHEM ve PHM gruplarında belirgin düzeyde kontrol grubundan daha düşük seviyelerde kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18.). Bu azalma eğiliminin egzersiz ve mitokondri transplantasyon tedavisinin beraber uygulandığı PHEM grubunda en fazla olduğu görülmüştür. P-mTOR ifadeleri için yapılan *Western blot* deneylerinde herhangi bir sonuç alınamamıştır. Sonucun çıkmamasının sebebi olarak primer antikorun üretim hatası sebebiyle çalışmadığı düşünülmektedir. P-mTOR deneyleri tekrarlanacaktır.



Şekil 4.18. mTOR proteinin *Western blot* analizleri grafiği ve görüntüleri.

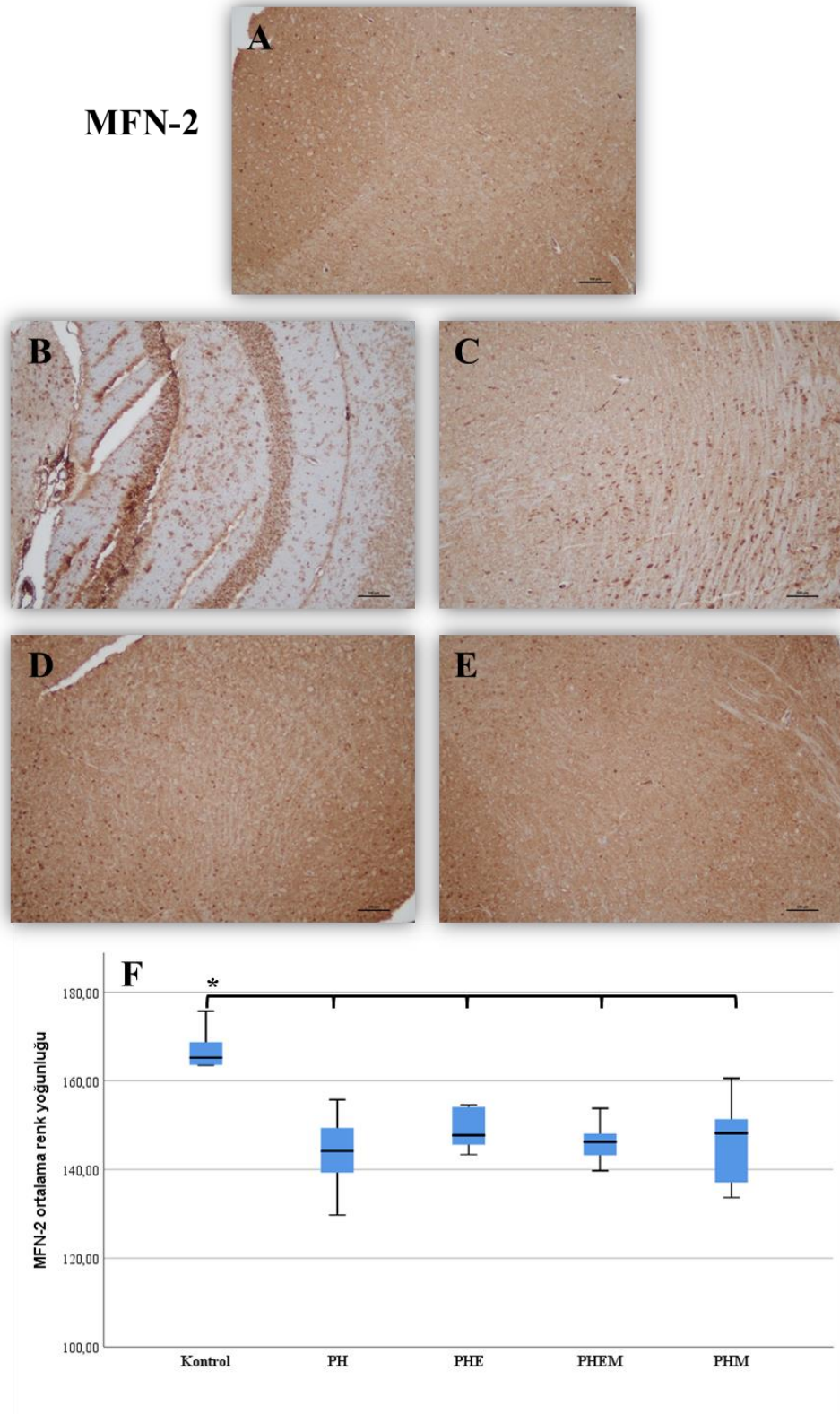
#### 4.6. İmmünohistokimya Analizleri

İmmünohistokimyasal boyamalarda DRP-1 ve MFN-2 proteinleri çalışılmıştır. Kesitler İmmünohistokimyasal yöntemlere göre boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Gruplara ait örnek görüntüler “Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.’de” gösterilmiştir. Görüntülerin analizleri için Her bir kesitten beş farklı alan seçilerek buralardaki kahverengi renk yoğunlukları *Image-J* programı ile ölçülmüştür. Ölçümden elde edilen ortalamalar istatistiksel olarak analiz edilmiştir. DRP-1 proteinin kesitlerdeki yoğunluğu en yüksek olarak PHM grubunda bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 4.19.).



**Şekil 4.19.** Beyin dokusunda DRP-1 immunohistokimya görüntüleri. (A) Kontrol, (B) PH, (C) PHE, (D) PHEM ve (E) PHM gruplarına ait 200x büyütmede çekilmiş görüntülerdir. (Kahverengi boyanmalar DRP-1 varlığını göstermektedir).

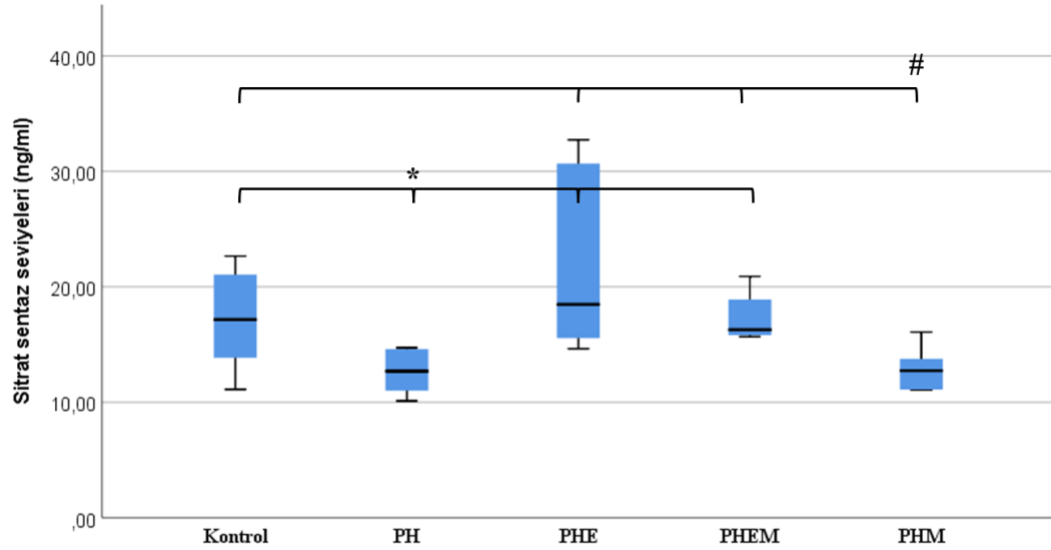
MFN-2 için de aynı yöntemler ile boyamalar yapılmış ve görüntüler elde edilmiştir. Beş farklı alan seçilerek buralardaki kahverengi renk yoğunlukları *Image-J* programı ile ölçülmüştür. Elde edilen verilerin analiz edilmesiyle istatistiksel sonuçlara ulaşılmıştır. Sonuçlar MFN-2 renk yoğunluklarına göre gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ( $P = 0,017$ ). Farkı oluşturan grup Kontrol grubu olduğu görülmüştür. Kontrol grubu PH ve PHE gruplarında daha fazla MFN-2 renk yoğunluğuna sahiptir ( $P_{\text{Kontrol-PH}} = 0,003$ ,  $P_{\text{Kontrol-PHE}} = 0.023$ ,  $P_{\text{Kontrol-PHEM}} = 0,005$ ,  $P_{\text{Kontrol-PHM}} = 0,008$ ) Kontrol grubu ile PHEM ve PHM grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 4.20.).



**Şekil 4.20.** Beyin dokusunda MFN-2 immunohistokimya görüntüleri. (A) Kontrol, (B) PH, (C) PHE, (D) PHEM ve (E) PHM gruplarına ait 200x büyütmede çekilmiş görüntülerdir. (\* $P_{\text{Kontrol-PH}} = 0,003$ ,  $P_{\text{Kontrol-PHE}} = 0,023$ ,  $P_{\text{Kontrol-PHEM}} = 0,005$ ,  $P_{\text{Kontrol-PHM}} = 0,008$ )

#### 4.7. Kas Dokusu Sitrat Sentaz ELISA ölçümü

*Gastroknemius* kas dokusundan alınan örneklerde ELISA yöntemi ile sitrat sentaz seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre Egzersiz yapan gruplarda sitrat sentaz seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır. İstatistiksel analiz sonucu gruplar arasında anlamlı farklılığın olduğu saptanmıştır ( $P = 0.005$ ). Farklılığı oluşturan grupları belirlemek amacıyla ikili karşılaştırmalara bakıldığında PHE grubunun en yüksek skorları aldığı, PH ve PHM gruplarında anlamlı seviyede daha fazla sitrat sentaz seviyelerine sahip olduğu görülmüştür ( $P_{PHE-PH} = 0,004$ ,  $P_{PHE-PHM} = 0,008$ ). Ayrıca PH grubu Kontrol ve PHEM gruplarına kıyasla daha düşük seviyede kalmıştır ( $P_{PH-Kontrol} = 0,021$ ,  $P_{PH-PHEM} = 0,013$ ). PHM grubunun da PH grubuyla benzer şekilde Kontrol ve PHEM gruplarından daha düşük sitrat sentaz seviyelerine sahip olduğu saptanmıştır ( $P_{PHM-Kontrol} = 0,036$ ,  $P_{PHM-PHEM} = 0,022$ ) (Şekil 4.21.).



**Şekil 4.21.** Kas dokusunda sitrat sentaz seviyeleri. PH ve PHM gruplarında diğer üç gruba kıyasla daha düşük sitrat sentaz seviyelerine sahip oldukları saptanmıştır (\* $P_{PHE-PH} = 0,004$ ,  $P_{PH-Kontrol} = 0,021$ ,  $P_{PH-PHEM} = 0,013$ ). (#  $P_{PHE-PHM} = 0,008$ ,  $P_{PHM-Kontrol} = 0,036$ ,  $P_{PHM-PHEM} = 0,022$ )

#### 4.8 Beyinde Toplam Antioksidan ve Oksidan Seviyeleri Analizleri

Beyin dokusundan alınan örneklerde TAS ve TOS analizleri gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlar kitin içerisindeki yöntemlere göre hesaplanarak



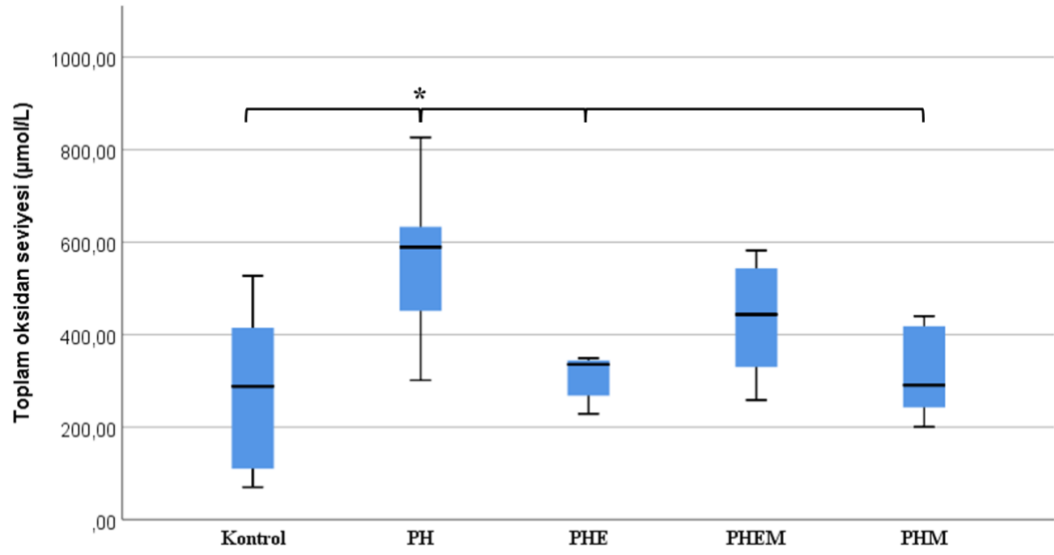
BCA sonuçları ile normalize edilmiştir. Toplam antioksidan seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.6.).

**Tablo 4.6.** Beyin dokusunda toplam antioksidan seviyeleri.

<b>Gruplar</b>	<b>Toplam Antioksidan seviyeleri (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
<b>Kontrol</b>	1,443(0,38)
<b>PH</b>	1,763(0,72)
<b>PHE</b>	1,516(0,58)
<b>PHEM</b>	1,486(0,75)
<b>PHM</b>	1,364(0,40)

Toplam antioksidan seviyeleri tanımlayıcı istatistiği ortanca (Çeyrekler arası genişlik-ÇEG) şeklinde verilmiştir.

Toplam oksidan seviyeleri incelendiğinde ise gruplar arasında fark olduğu bulunmuştur ( $P = 0,029$ ). PH grubunda bulunan toplam oksidan seviyesi diğer gruplara oranla en yüksek seviyededir. PH grubundaki toplam oksidan seviyesi Kontrol, PHE ve PHM gruplarından istatistiksel olarak fazladır ( $P_{\text{PH-Kontrol}} = 0,009$ ,  $P_{\text{PH-PHE}} = 0,008$ ,  $P_{\text{PH-PHM}} = 0,013$ ) (Şekil 4.22.).



**Şekil 4.22** Beyin dokusunda toplam oksidan seviyeleri. PH grubu anlamlı derecede Kontrol, PHE ve PHM gruplarından daha fazla oksidan seviyesine sahiptir (\* $P_{PH-Kontrol} = 0,009$ ,  $P_{PH-PHE} = 0,008$ ,  $P_{PH-PHM} = 0,013$ ).

## 5. TARTIŞMA

Çalışmada, farelerde MPTP ilişkili Parkinson hastalığı (PH) modeli oluşturularak egzersiz ve mitokondri transplantasyonunun etkileri incelenmiştir. Davranışsal ve moleküler açıdan farklı teknikler kullanılarak tedavi yöntemlerinin etkinliği geniş bir yelpazede değerlendirilmiştir. Literatürde bu tez çalışmasında incelenen parametrelerin bir arada olduğu bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmanın amacına uygun olarak PH modelinde mitokondri transplantasyonunun etkileri, egzersizin etkileriyle karşılaştırılmıştır. Alınan verilere göre her iki tedavinin birlikte uygulandığı grupta davranış deneyleri açısından başarılı sonuçlar elde edilirken moleküler düzeyde yapılan değerlendirmelerde mitokondri transplantasyonunun bazı olumsuz etkileri olabileceği bulunmuştur. Bu bölümde elde edilen bulgular ışığında sonuçlar tartışılacaktır.

### 5.1. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması ve Davranış Testleri

MPTP ilişkili PH modeli akut ve kronik enjeksiyonlarla farklı dozlamalarla yapılabilir. Çalışmada seçilen doz akut bir model oluşturmak için en uygun dozdur. Literatür incelendiğinde aynı gün içerisinde 4 defa i.p. verilen 20 mg/kg MPTP dozu erkek C57BL farelerde *substantia nigra* bölgesinde dopaminerjik nöronlarda dejenerasyona yol açtığı ve hayvanlarda hastalık modelini oluşturduğu görülmüştür (45, 85). Çalışmamızda PH modelinin oluştuğu hem moleküler açıdan hem de davranış testleri açısından doğrulanmıştır. Davranış testlerinden lokomotor aktiviteyi değerlendiren yatay çubukta zorlu yürüme testinde alınan sonuçlar MPTP enjeksiyonundan sonra artan hata sayıları ile hayvanlarda koordinasyon ve ardışık hareketlerde zorlanma eğilimlerinin arttığını göstermektedir. Bu da hastalığın başarılı bir şekilde oluştuğuna dair ipuçları vermektedir. Spontan aktivite parametrelerinde MPTP enjeksiyonu sonrası beklenen arka ayak adım sayısı, ön ayak adım sayısı/arka ayak adım sayısı oranı, dikelme, arka ayak indeksi ve hareket indeksi parametrelerinde genel bir azalma görülürken bu azalma her grupta anlamlılığa ulaşmamıştır. Örneğin hareket indeksi ve arka ayak indeksinde anlamlı düşüş sadece PH ve PHM gruplarında olmuştur. Bu sonuçların alınmasında gruplardaki hayvan sayılarının az olması öne

sürülebilir. Ancak yapılan *G-power* analizleri sayıların yeterli olduğunu göstermektedir. Literatür kapsamında deney hayvanlarına MPTP enjeksiyonları sonrasında verilen model oluşma süreci 1 hafta olsa da, deney hayvanları arasındaki bireysel farklılıklar da gözardı edilmemelidir. Şöyle ki, bireysel olarak her deney hayvanının kendisine verilmiş olan nörotoksik maddeye karşı gösterdiği fizyolojik cevap yine her hayvanın bu nörotoksinden etkilenme derecesini de değiştirebilmektedir (49). Fakat, her bir deney hayvanında MPTP enjeksiyonu sonrası nöroinflamasyona bağlı olarak gelişen dopaminerjik nöron hasarının oranı tespit edilemediğinden enjeksiyon sonrasında verilen 1 haftalık iyileşme süreci de doğal olarak tartışmaya açıktır. Bu sebeplerle, çalışmamız kapsamında deney hayvanlarında gerçekleştirilen ikinci davranış testlerinde gruplar arasında spontan aktivite testleri açısından beklenen değişimin gözlenmemesi hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklardan dolayı kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda kullanılan olan deneysel Parkinson hastalığı modeli seçiminde bizim için son derece önemli olan başka bir parametre de terapötik olarak hayvanlara verilecek olan mitokondrilerin hedeflenen dokulara ve dopaminerjik hücrelere girişinin sağlanmasıdır. Şöyle ki, çalışmamız kapsamında akut bir MPTP modeli seçmemizin sebeplerinden birisi de bu uygulamanın inflamatuvar süreçleri başlatıp oksidatif stres parametrelerini artırırken aynı zamanda hücrelerde canlılığın da belirli oranda korunabilmesidir (86).

Mitokondri transplantasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi, hedef dokulara gönderilen mitokondrilerin ulaştıkları ortamda transplante olabileceği kadar canlılığını koruyabilmiş hücrelerin varlığına bağlıdır. Bu sebeple, hücre ölümünün çok fazla olması tedavinin etkinliğini dramatik bir şekilde düşürecektir. Tedavi sonrası elde edilen davranış deneyleri sonuçlarına bakıldığında ise mitokondri transplantasyonun PH semptomlarını azalttığı gözlemlenmiştir. Lokomotor deneylerinde gruplar arası farklar incelendiğinde hata sayılarının tedavi gruplarında oldukça düştüğü görülmektedir. Bu düşüş mitokondri ve egzersizin beraber uygulandığı PHEM grubunda en yüksek seviyededir.

Tedavi sonunda spontan aktivite verileri incelendiğinde arka ayak adım sayısı ve hareket indeksi verilerinde PH grubuna göre PHEM grubunda anlamlı artış

gözlemlenmiştir. Diğer spontan aktivite parametrelerinde semptomların azaldığına dair benzer eğilimler gözlemlenmiştir ancak bu eğilimler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. MPTP ilişkili fare PH modelinde göz önünde bulundurulan diğer önemli bir husus, oluşturulan modelin etkilerinin geri dönüşlü olabilmesidir. MPTP enjeksiyonları ve deneyin sonlandırılması arasında 42 günlük bir süre vardır (50). Bu süreç egzersiz tedavi protokolünün uygulanabilmesi için yeterli zamanı oluşturmaktadır. Literatür incelendiğinde bu süre zarfı içinde akut MPTP PH modelinin geri dönüşünün başlamadığı rapor edilmiştir (50). Bu sebeple belirlenen süreler çalışmada ulaşılmak istenen amaca uygun şekildedir. Ayrıca PH grubuna ait davranış ve moleküler parametreler incelendiğinde hastalık sürecinin devam ettiği görülmektedir. Çalışmada spontan aktivite parametrelerinin değerlendirilmesi aşamasında literatürde olmayan iki farklı indeks kullanılmıştır. Bunlar hareket indeksi ve arka ayak indeksidir. Çalışma ekibinin daha önceden yaptığı başka bir PH araştırmasında elde edilen veriler ile bu iki indeks formülleri geliştirilmiştir. İndekslerin ayırt edicilik ve tanımlayıcılık açısından literatürdeki klasik parametrelere göre daha başarılı olduğu istatistiksel açıdan gösterilmiştir (87). Sunulan çalışmada da indekslerin PH'nı daha hassas bir şekilde ayırt edip tanımlayabildiği gösterilmiştir.

## 5.2. Mitokondri İzolasyonu, Transplantasyonu ve Biyodağılımı

Mitokondri transplantasyonunun önemli basamaklarından bir tanesi mitokondrilerin sağlıklı bir şekilde izole edilebilmeleridir. İzole edilen mitokondrilerin kalitesi ve sağlıklı olma durumları *Mitospy green* ve *JC-1* boyamaları ile incelenmiştir. Akım sitometrisi sonuçları mitokondri izolasyonları sırasında mitokondrilerin %98 oranında membran bütünlüklerini ve membran potansiyellerini koruyabildiklerini göstermektedir. Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde canlılık oranına sahip ve membran potansiyellerini koruyabilen mitokondriler izole edilebildiği gösterilmiştir (88, 89). Bunun yanı sıra izole edilen mitokondrilerin ATP ölçümleri yapılmış ve literatür incelendiğinde yüksek miktarlarda ATP'ye sahip oldukları görülmüştür (90). Bu sonuçlar ışığında uygulanan izolasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde sağlıklı ve kaliteli mitokondriler elde edildiği gösterilmiştir.

Mitokondri transplantasyonunun diğer önemli kısmı ise mitokondrilerin gönderilmek istenen doku veya organa ulaştırılabilmesidir. Çalışmada intranazal yol

ile transplantasyon gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem invazif olmaması sebebiyle dokuya herhangi bir zarar vermemektedir. Lokal olarak uygulamalarda dokuda hematoma oluşumu, doku parankimasına zarar verme gibi durumlar diğer çalışmalarda raporlanmıştır (90). Uygulamanın kolaylığı ileride insan çalışmalarına geçilebilmesinde avantaj sağlayabilir. İntranazal yol ile burun içine verilen mitokondriler kan-beyin bariyerine takılmadan olfaktör nöronlar aracılığı ile taşınmaktadır (71). Çalışmada izole edilmiş mitokondriler *Mitospy green* ve *Mitotracker red* ile boyanarak verilmiş ve beyin dokusundaki dağılımları incelenmiştir. Sonuçlara göre, mitokondrilerin beyine ulaştığı ve beyin dokusunda genel bir yayılım gösterdikleri bulunmuştur. Lokal olarak *substantia nigra* bölgesine gitmemiş olmaları uygulanan yöntemin kısıtlılıklarındandır. Literatürde intranazal yolla benzer tedaviyi uygulayan başka bir çalışmada mitokondrilerin SNpc'de lokalize edilemediği ancak davranış testlerinde başarılı sonuçlar alındığı raporlanmıştır (91). Bunun yanı sıra MPTP ilişkili PH modeli lokal uygulanmayan ve tüm beyindeki dopaminerjik nöronlarda hasar oluşturan bir modeldir. Beyinde 6-OHDA gibi lokal bir oksidatif stres yaratmak yerine genel bir oksidatif stres yaratmaktadır (91). Bu sebeple seçilen model ve tedavi yöntemleri ulaşılmak istenen amaç açısından uyumludur. Çalışmada mitokondri dağılımı için beyin dokusu dışında akciğer doku örnekleri de incelenmiş ve akciğer dokusunda da izole edilmiş ekzojen mitokondrilere rastlanmıştır. Bu durum çalışmanın ilerleyen dönemlerde akciğer üzerindeki etkilerinin incelenmesinin gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca mitokondrilerin akciğere de ulaşmış olması çalışmada ikinci bir tedavi yöntemi olarak kullanılan egzersiz de etkileyebileceğini düşündürmektedir. PH ve egzersiz bölümünde bu durum tartışılacaktır.

DRP-1 ve MFN-2 protein ailesi mitokondrilerin hücre içindeki dinamikleri hakkında bilgi vermektedir. DRP-1 mitokondri bölünmesi (fizyon) ve sayısını artırmasıyla yakından ilişkiliyken, MFN-2 ise mitokondri kaynaşması (füzyon) ile ilişkilidir. Bu iki protein hücre içi mitokondri biyogenez dengesini sağlamaktadır. Mitokondri transplantasyonlarında, ekzojen mitokondrilerin nakledildikleri hücre içindeki mitokondrilerle kaynaşmaya eğilim gösterdikleri ve hücrelerde MFN-2 seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (92). Benzer şekilde DRP-1'in artmasıyla da hücre içi mitokondri sayılarının artabildiği rapor edilmiştir (93). Azalan DRP-1 seviyelerinin

dopaminerjik nöronlarda aksonal dejenerasyonu tetiklediği bildirilmiştir (94). Çalışmada alınan sonuçlara göre MFN-2 seviyelerinde PHM grubunda ufak bir artış olduğu görünse de bu artış istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. DRP-1 seviyeleri ise MPTP uygulanan tüm gruplarda kontrole göre düşüş göstermiştir. Mitokondri verilen gruplarda DRP-1 yönünden bir artış beklense de bu durum gerçekleşmemiştir. DRP-1 ve MFN-2’de elde edilen bu sonuçlar beyine ulaşan mitokondrilerin hücreler arası transferde ve hücre içlerine girme konusunda verimliliğin düşük olduğunu işaret etmektedir. Beyin dokusuna ulaşmış ancak hücre içerisine verimli bir şekilde girememiş mitokondrilerin inflamasyon gibi parametreleri tetiklemiş olması olasıdır. Bu durum kaspaz-1 ve kaspaz-3 bulguları ile uyumaktadır. Beyin dokusunun kendine has ortamı ve hücre çeşitliliği bu duruma yol açmış olabilir.

### 5.3. Parkinson Hastalığı ve Egzersiz

Egzersiz, PH’da uygulanan temel tedavi yöntemlerinden biridir (95, 96). Egzersizin hem sistemik hem de hastalığın semptomlarını azaltmadaki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, mitokondri transplatasyonunun etkinliğini değerlendirmede karşılaştırılabilecek uygun bir yöntem olduğu düşünülmektedir. *Gastroknemius* kaslarının incelenmesi sonucunda egzersiz sonrası kas kütlelerinde artış görülmüştür. Benzer şekilde kas kütlelerinin ağırlığı *tibialis* kemik uzunluklarına oranlandığında egzersiz yapan gruplarda daha yüksek değerler bulunmuştur. Bunun yanı sıra kas dokusunda sitrat sentaz seviyelerinin artışı koşu bandı egzersizin yeterli süre ve yoğunlukta yapıldığını göstermektedir. Alınan sonuçlarda egzersiz yapan gruplarda farelerin spontan aktivitelerinde artış yaşandığı görülmektedir. Bu artışın önemli bir sebebi olarak egzersiz ile sedanter yaşamdan uzaklaşmış farelerin gün içinde de hareketliliklerini artırdıkları söylenebilir.

Çalışma planlanırken egzersiz saatleri ve davranış deneylerinin saatleri arasında fark olmasına dikkat edilmiştir. Tüm egzersizler sabah saatlerinde, tüm davranış deneyleri ise öğleden sonra yapılmıştır. Uzun süreli ve düzenli egzersiz zamanla vücutta sirkadyen ritimle beraber adaptasyonlar oluşturmaktadır. Egzersiz yapılan saat aralığında deneklerin kalp atım hızları ve hareketli olma istekleri egzersiz yapmasalar dahi artmaktadır. Çalışmada davranış ve egzersiz saatleri ne kadar ayrıştırılmış, birbirlerini etkileme ihtimalleri azaltılmış olsa da yine de böyle bir etki

oluşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bunun yanı sıra egzersiz yapan grupların lokomotor testinde de daha az hata yaptıkları ve performanslarının arttığı dikkat çekmektedir. Egzersiz ve mitokondri tedavisinin beraber uygulandığı grup olan PHEM davranış testleri açısından en başarılı performansları göstermiştir. Ayrıca egzersiz döneminin son haftası müdahale sayılarının kaydedilmesi oldukça ilginç sonuçlar ortaya çıkarmıştır. İki tedavi sisteminin birlikte kullanıldığı gruptaki hayvanlara yapılan müdahale sayısı sadece egzersiz tedavisi alan gruptaki hayvanlara yapılan müdahale sayısından yarı yarıya düşüktür. Bu parametre ile mitokondri alan hayvanların egzersize daha yatkın oldukları, daha istekli oldukları ve daha dayanıklı oldukları söylenebilir. Müdahale sayıları üç farklı zamanda toplanmıştır (0-10 dk, 10-20 dk, 20-30 dk). İlk 10 dk egzersize başlama ve istekli olmaları ile ilişkilendirilmiştir. İkinci 10 dk ise egzersizi kendi istekleri ile devam ettirmeleri ile ilişkilendirilmiştir. Son 10 dk'lık kısımda ise artık yorulmaya başlayan hayvanlara müdahale sayıları dayanıklılıkları ile ilişkilendirilmiştir. Bu yeni parametre literatürde bulunmayan ekibin kendi gözlemleri sonucu ortaya çıkmıştır. Egzersiz gruplarındaki gözleme göre, mitokondri verilen PHEM grubunun egzersize daha yatkın olduğu ve daha uzun süre koşabildiği farkedilmiştir. Bu durumu açıklayabilecek iki hipotez bulunmaktadır. Birincisi PH'nın en önemli semptomlarından biri olan hareket etme azlığı ve harekete başlama zorluğunun mitokondri transplantasyonları ile azaltılmış olmasıdır. Ancak bu durum moleküler verilere tam olarak yansımamıştır. İkinci hipotez ise akciğere ulaşabilen mitokondrilerin akciğer kapasitelerini artırmış olabileme ihtimalidir. İlerideki çalışmalarda bu durum incelenmelidir.

#### **5.4. Parkinson Hastalığı ve Apoptotik Yolaklar**

Nörodejeneratif hastalıklarda apoptotik süreçleri kontrol eden protein ailelerinin seviyelerindeki değişimler dejenerasyonun hızını, azalmasını veya tersine dönmesini sağlayabilmektedir (9, 10). Bu aileye ait proteinlerden biri olan Bcl-2 proteinin anti-apoptotik özellikleri sayesinde nöron dejenerasyonunu kontrol ettiği, artan Bcl-2 seviyelerinin dejenerasyonu azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (97-99). Bax proteini ise pro-apoptotik özellikte olup seviyelerindeki artışlar hücre ölümünü artırmaktadır (100). Apoptotik yolak oldukça karmaşık bir mekanizmaya sahiptir ve birçok farklı protein tarafından düzenlenmektedir. Yolakta bulunan proteinlerin tek tek artış veya azalışlarından ziyade birbirlerine göre oransal



değişimleri yolağın ne tarafa doğru gideceğinin asıl belirleyicisidir (99). Bu sebeple çalışmada Bax ve Bcl-2'nin birbirlerine oranı (Bax/Bcl-2) incelenmiştir. Bax/Bcl-2 oranının artış göstermesi hücrenin apoptoza gitme eğilimini artırmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda Bax seviyelerinde azalma görülmüş ve en düşük Bax değerleri PHE grubunda elde edilmiştir. Bcl-2 protein seviyeleri değerlendirildiğinde PH grubunda en düşük düzeyler bulunmuştur ve bu sonuç MPTP'nin nörodejenerasyonu tetiklediğini gösteren önemli bir bulgudur. Bax/Bcl-2 oranı hesaplandığında PH grubunda büyük bir artış olduğu nörodejenerasyonun devam ettiği ve hastalık modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu yargısına varılmaktadır. Egzersiz ve mitokondri grupları Bax ve Bcl-2 açısından göz önünde bulundurulduğunda moleküler düzeyde en düşük Bax seviyesi ve en yüksek Bcl-2 seviyesi PHE grubunda olduğu saptanmıştır. Bunun sonucu olarak Bax/Bcl-2 oranının en düşük olduğu grup tek başına egzersiz yaptırılan gruptur. Mitokondri verilen gruplara bakıldığında ise Bax/Bcl-2 oranının PH grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Ancak mitokondri verilen (PHEM ve PHM) gruplarda, sadece egzersiz yaptırılan (PHE) gruba göre Bax/Bcl-2 oranının daha yüksek bulunmuştur. Bu durum mitokondrinin etkisinin olumsuz yönde olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada, apoptotik süreç ile ilgili Bax ve Bcl-2 proteinleri dışında kaspaz ailesinden kaspaz 1 ve kaspaz 3 proteinleri incelenmiştir. Kaspaz 3 mitokondriyal apoptotik yolağın kritik elemanlarından biridir (101, 102). Kaspaz 1 ise inflamasyonun tetiklediği apoptotik yol proteini olarak görev yapmaktadır (103, 104). Sonuçlar incelendiğinde her iki kaspaz proteinin de mitokondri verilen gruplarda arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmanın özgün bir değeri de kaspaz 3 ve kaspaz 1'in birlikte incelenmiş olmasıdır. Mitokondrilerin kaspaz 1 seviyelerinde artışa sebep olması apoptotik yolağı sps yaratarak da tetikleyebilme eğilimi olduğunu düşündürmektedir. Kaspaz 1 seviyesi egzersiz yaptırılan gruplarda kontrol grubuna göre azalma eğilimi gösterirken, PH ve PHM grubunda artış göstermiştir. PH grubundaki artış hastalık modeli ile uyurken, PHM grubundaki kaspaz 1 seviyesi artışı mitokondri tedavisinin etkinliğine soru işareti düşürmektedir. Kaspaz proteinlerin seviyelerindeki değişimler ile Bax proteini seviyelerindeki değişimler uyumluluk göstermektedir. Apoptotik

süreçler ile ilgili alınan bu sonuçlar mitokondrilerin nörodejenerasyondaki etkilerinin olumsuz yönde olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada hücre bölünmesi, yaşlanma, protein sentezi gibi bir çok farklı hücre işlevde rol alan mTOR proteinleri de ayrıca çalışılmıştır. Bu proteinin PH üzerindeki etkileri ve rolleri daha tam olarak aydınlatılamamıştır. mTOR seviyelerindeki azalmaların otofajiyi artırarak hücre içinde  $\alpha$ -sinüklein birikimini engelleyebileceği belirtilmektedir (105, 106). Benzer şekilde nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığında da mTOR inhibisyonunun hücre ölümlerini azaltabileceği belirtilmiştir (107). Tez çalışması sonuçları, mTOR seviyelerinin tedavi gruplarında azaldığını göstermektedir. Bu azalış hem mitokondri verilen hem de egzersiz gruplarında görülmüştür. Ancak yolağın daha ayrıntılı bir şekilde çalışılması gerekmektedir. mTOR yolağı değerlendirilirken fosforolize mTOR (P-mTOR) seviyeleri oranlanarak değerlendirilmektedir. Çalışmada her ne kadar literatürü desteklediği sonuçlar bulunmuş olsada P-mTOR seviyesi tekrar ölçülüp, mTOR seviyesi ile oranlanarak bir sonuca varılmalıdır.

### **5.5. Parkinson Hastalığı ve Oksidatif Stres**

MPTP ilişkili PH modelinde beyinde oksidatif stres artmaktadır. MPP+ nöronlar üzerinde toksik etkiler oluşturarak hücre içi oksidatif stresin artmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda da nörodejenerasyon gerçekleşmektedir (108, 109). Sonuçlara göre MPTP uygulanan gruplardan PH grubunda beyinde toplam oksidan miktarının hastalık modeline uygun şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarının hepsinde PH grubuna göre azalma olmuş olması egzersiz ve mitokondri transplantasyonunun oksidatif stresi azalttığını göstermektedir. Her üç tedavi grubunun oksidan seviyeleri istatistiksel olarak kontrol grubuna yaklaşmıştır. Apoptotik yolakla ilgili sonuçların aksine mitokondri transplantasyonu oksidatif stresi azaltma noktasında oldukça başarılı olmuştur. Bu sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir. Özellikle iskemi reperfüzyon çalışmalarında oksidatif stresi azalttığı belirtilen mitokondri transplantasyonu, toksik bir ajan olan MPTP'de de aynı etkiyi göstermiştir. Beyindeki toplam antioksidan düzeyleri değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Antioksidan ölçümlerinin tekrarlanması

düşünülmektedir. Antioksidanlar daha hassas moleküller olduğundan homojenizasyon işlemleri sırasında hasara uğramış olabileme ihtimali vardır.

### 5.6. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmada yapılan gözlemler, uygulanan yöntemler ve alınan sonuçlar değerlendirildiğinde bazı kısıtlılıkların olduğu farkedilmiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir.

- Fare beyin dokusu moleküler incelemeleri tüm beyin dokusunda yapılmıştır. PH'nı daha iyi değerlendirebilmek için dopaminerjik nöronların yoğun olduğu orta beyin izole edilerek çalışılması parametrelerin daha hassas değerlendirilmesini sağlayabilirdi. Ancak fare beyin dokusunun çok küçük olması ve yapılan analizlerin fazlalığı buna imkân vermemiştir.
- Çalışmada mitokondri biyodağılımı için alınan görüntüler taze donmuş beyinlerde çalışılmış böylelikle fare beyin atlasına uygun şekilde birçok kesit alınabilmiştir. Bu durum immünohistokimya boyamaları için de uygulanmış ancak doku fiksasyonu parafine gömme ve kesit alma aşamaları işlemleri atlası uygun şekilde kesit almayı oldukça zorlaştırmış ve bölgesel olarak yakın bölgelerde çalışılmasına karşın donmuş beyinlerde çalışılan kesitler kadar hassas çalışılamamıştır.
- İntranazal yolla verilen mitokondrilerin dozlaması tam olarak yapılamamıştır. Yöntemde ekibin önceki çalışmalarına uygun şekilde dozlar seçilmiş ancak burun boşluğuna bırakılan mitokondrilerin ne kadarının beyine gittiği tam olarak belirlenememektedir. Lokal veya damar içi mitokondri transplantasyonları bu yönüyle dozlama açısından daha öngörülebilir uygulamalardır.
- Çalışmada egzersiz tedavisi uzun süreli bir uygulama olmasından dolayı mitokondri transplantasyonu da kronik bir şekilde uzun süreli uygulanmıştır. Bu durum sonuçlarda gözlemlenen PH patolojisini tetiklemiş olabilir. Akut mitokondri transplantasyonu ile kronik uygulamaların karşılaştırılmamış olması çalışmanın kısıtlılıklarındandır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında alınan sonuçlara göre uzun süreli egzersiz tedavisinin PH üzerinde semptomları azaltma ve apoptotik yolları inhibe etme yönünden oldukça başarılı bir tedavi yöntemi olduğu ortaya çıkmıştır. Mitokondri transplantasyonu da davranış testleri açısından oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Apoptotik yolları egzersiz gibi inhibe edebildiği ve nörodejenerasyonu azaltabileceği gösterilmiştir. Buna karşın kaspaz ailesi proteinlerinin analizleri PH patolojisini tetiklendiğini ve mitokondrilerin olumsuz etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Literatürde mitokondri transplantasyonu karaciğer, böbrek, kalp gibi birçok dokuda çalışılmış ve umut vaat eden sonuçlar alınmıştır. Ancak beyin dokusunda yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar mitokondri transplantasyonunun her dokuda olumlu etki gösteremeyebileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla mitokondri transplantasyonunun uygulandığı dokudaki hücre topluluklarının çeşitliliği, doku ortamı ve mitokondrilerin ulaştırılma şekli yöntemin başarısını etkilemektedir.

Bu çalışmada mitokondri transplantasyonunun MPTP sonrası tedavi edici özelliği incelenmiştir. İlerideki çalışmalarda hastalık oluşturulmadan önce uygulanarak koruyucu etkisi de incelenmelidir. Mitokondrilerin beyin dokusuna ulaştırılma yöntemi olarak kullanılan intranasal uygulamanın yanı sıra stereotaksik yöntemler ile lokal uygulamalar karşılaştırılarak transplantasyonun etkinliğinin bölgesel olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. İntranazal yolun kullanılması sebebiyle akciğere de ulaşan mitokondrilerin bu dokuda moleküler olarak neler yaptığı incelenmelidir.

Sonuç olarak mitokondri transplantasyonu egzersiz ile uygulandığında Parkinson hastalığı semptomlarını azalttığı, apoptotik yolağın önemli proteinlerinden Bax/Bcl-2 oranını anti-apoptotik yöne kaydıracağı ancak beyin dokusunda PH patolojisini tetikleyebileceği görülmüştür. Bu yolların daha ayrıntılı çalışılması önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR.

1. Kozo-Polianskiĭ BM. Symbiogenesis: a new principle of evolution: Harvard University Press; 2010.
2. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders*. 2014;29(13):1583-90.
3. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*. 2008;79(4):368-76.
4. Chaudhuri KR, Martinez-Martin P. Quantitation of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European journal of neurology*. 2008;15:2-8.
5. Morris ME, Watts JJ, Iansek R, Jolley D, Campbell D, Murphy AT, et al. Quantifying the profile and progression of impairments, activity, participation, and quality of life in people with Parkinson disease: protocol for a prospective cohort study. *BMC geriatrics*. 2009;9:1-6.
6. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology*. 2006;16(14):R551-R60.
7. McCully JD, Levitsky S, Del Nido PJ, Cowan DB. Mitochondrial transplantation for therapeutic use. *Clinical and translational medicine*. 2016;5:1-13.
8. Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y, Mizuno Y, Mochizuki H, et al. Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 1999;14(2):383-4.
9. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2008;7(1):97-109.
10. Schapira A. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Advances in neurology*. 1993;60:288-91.
11. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine*. 2000;6(5):513-9.
12. Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature cell biology*. 1999;1(8):E209-E16.
13. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *cell*. 1997;91(4):479-89.
14. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397(6718):441-6.
15. Hu M, Taylor-Robinson SD, Chaudhuri KR, Bell JD, Labbe C, Cunningham V, et al. Cortical dysfunction in non-demented Parkinson's disease patients: a combined <sup>31</sup>P-MRS and <sup>18</sup>FDG-PET study. *Brain*. 2000;123(2):340-52.

16. Henchcliffe C, Shungu DC, Mao X, Huang C, Nirenberg MJ, Jenkins BG, et al. Multinuclear magnetic resonance spectroscopy for in vivo assessment of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1147(1):206-20.
17. Dexter D, Carter C, Wells F, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 1989;52(2):381-9.
18. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, et al. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *The American journal of pathology*. 1999;154(5):1423-9.
19. Perry TL, Yong VW. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neuroscience letters*. 1986;67(3):269-74.
20. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983;219(4587):979-80.
21. Hassouna I, Wickert H, Zimmermann M, Gillardon F. Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neuroscience letters*. 1996;204(1-2):85-8.
22. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*. 2000;3(12):1301-6.
23. Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke BW, et al. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology of disease*. 2005;20(2):360-71.
24. Wüllner U, Borghammer P, Choe C-u, Csoti I, Falkenburger B, Gasser T, et al. The heterogeneity of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2023;130(6):827-38.
25. Muthuraman M, Koirala N, Ciolac D, Pinteá B, Glaser M, Groppa S, et al. Deep brain stimulation and L-DOPA therapy: concepts of action and clinical applications in Parkinson's disease. *Frontiers in neurology*. 2018;9:711.
26. Warren Olanow C, Kieburtz K, Rascol O, Poewe W, Schapira AH, Emre M, et al. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2013;28(8):1064-71.
27. Speelman AD, Van De Warrenburg BP, Van Nimwegen M, Petzinger GM, Munneke M, Bloem BR. How might physical activity benefit patients with Parkinson disease? *Nature Reviews Neurology*. 2011;7(9):528-34.
28. Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Ravina B, Seppi K, Coelho M, et al. The movement disorder society evidence-based medicine review update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2011;26(S3):S2-S41.
29. Döbrössy MD, Dunnett SB. Motor training effects on recovery of function after striatal lesions and striatal grafts. *Experimental neurology*. 2003;184(1):274-84.

30. Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research*. 1998;61(1-2):147-53.
31. Hurwitz A. The benefit of a home exercise regimen for ambulatory Parkinson's disease patients. *Journal of Neuroscience Nursing*. 1989;21(3):180-4.
32. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology*. 2005;98(4):1154-62.
33. Voss MW, Nagamatsu LS, Liu-Ambrose T, Kramer AF. Exercise, brain, and cognition across the life span. *Journal of applied physiology*. 2011;111(5):1505-13.
34. Zigmond MJ, Cameron JL, Leak RK, Mirnics K, Russell VA, Smeyne RJ, et al. Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. *Parkinsonism & related disorders*. 2009;15:S42-S5.
35. Amara AW, Memon AA. Effects of exercise on non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Clinical therapeutics*. 2018;40(1):8-15.
36. Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*. 2001;125(1-2):109-25.
37. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2012;211:51-76.
38. Taylor TN, Greene JG, Miller GW. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*. 2010;211(1):1-10.
39. Grow DA, McCarrey JR, Navara CS. Advantages of nonhuman primates as preclinical models for evaluating stem cell-based therapies for Parkinson's disease. *Stem cell research*. 2016;17(2):352-66.
40. Fox SH, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Progress in brain research*. 2010;184:133-57.
41. West RJ, Furnston R, Williams CA, Elliott CJ. Neurophysiology of Drosophila models of Parkinson's disease. *Parkinson's disease*. 2015;2015(1):381281.
42. Cooper JF, Van Raamsdonk JM. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *Journal of Parkinson's disease*. 2018;8(1):17-32.
43. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research*. 2004;318(1):215-24.
44. Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2014;54(1):141-64.
45. Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature protocols*. 2007;2(1):141-51.
46. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
47. Giovanni A, Sieber B-A, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-

tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994;270(3):1000-7.

48. Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behavior genetics*. 2000;30:171-82.

49. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:123289.

50. Huang D, Wang Z, Tong J, Wang M, Wang J, Xu J, et al. Long-term changes in the nigrostriatal pathway in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2018;369:303-13.

51. Zhang Q-s, Heng Y, Mou Z, Huang J-y, Yuan Y-h, Chen N-h. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. *Acta pharmacologica sinica*. 2017;38(10):1317-28.

52. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 2001;65(2):135-72.

53. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*. 2010;66(5):646-61.

54. Jagmag SA, Tripathi N, Shukla SD, Maiti S, Khurana S. Evaluation of models of Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*. 2016;9:503.

55. Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, et al. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human  $\alpha$ -synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiology of disease*. 2001;8(3):535-9.

56. Daher JPL, Ying M, Banerjee R, McDonald RS, Hahn MD, Yang L, et al. Conditional transgenic mice expressing C-terminally truncated human  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ Syn119) exhibit reduced striatal dopamine without loss of nigrostriatal pathway dopaminergic neurons. *Molecular neurodegeneration*. 2009;4:1-14.

57. Thiruchelvam M, Powers J, Cory-Slechta D, Richfield E. Risk factors for dopaminergic neuron loss in human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*. 2004;19(4):845-54.

58. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature genetics*. 2014;46(9):989-93.

59. Bustamante-Barrientos FA, Luque-Campos N, Araya MJ, Lara-Barba E, de Solminihaç J, Pradenas C, et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders: Potential therapeutic application of mitochondrial transfer to central nervous system-residing cells. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):613.

60. Ulger O, Kubat GB. Therapeutic applications of mitochondrial transplantation. *Biochimie*. 2022;195:1-15.

61. Tseng N, Lambie SC, Huynh CQ, Sanford B, Patel M, Herson PS, et al. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism



after oxidant injury in vitro: The role of Miro1. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2021;41(4):761-70.

62. Court AC, Le-Gatt A, Luz-Crawford P, Parra E, Aliaga-Tobar V, Bátiz LF, et al. Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO reports*. 2020;21(2):e48052.

63. Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature medicine*. 2012;18(5):759-65.

64. McCully JD, Cowan DB, Pacak CA, Toumpoulis IK, Dayalan H, Levitsky S. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;296(1):H94-H105.

65. Cowan DB, Yao R, Akurathi V, Snay ER, Thedsanamoorthy JK, Zurakowski D, et al. Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection. *PloS one*. 2016;11(8):e0160889.

66. Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013;304(7):H966-H82.

67. Gollihue JL, Rabchevsky AG. Prospects for therapeutic mitochondrial transplantation. *Mitochondrion*. 2017;35:70-9.

68. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005;2:3-14.

69. WH II F. Intranasal delivery: Bypassing the blood-brain barrier to deliver therapeutic agents to the brain and spinal cord. *Drug Deliv Technol*. 2002;2(5):46-9.

70. Thorne R, Pronk G, Padmanabhan V, Frey Ii W. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004;127(2):481-96.

71. Balin BJ, Broadwell RD, Salzman M, El-Kalliny M. Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology*. 1986;251(2):260-80.

72. McCully JD, Cowan DB, Emani SM, Del Nido PJ. Mitochondrial transplantation: from animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion*. 2017;34:127-34.

73. Shi X, Zhao M, Fu C, Fu A. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2017;34:91-100.

74. Chang J-C, Wu S-L, Liu K-H, Chen Y-H, Chuang C-S, Cheng F-C, et al. Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Translational Research*. 2016;170:40-56. e3.

75. Health NIo. Guide for the care and use of laboratory animals: National Academies; 1985.

76. Sonsalla PK, Heikkila RE. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *European journal of pharmacology*. 1986;129(3):339-45.
77. Hosseini L, Karimipour M, Seyedaghamiri F, Abolhasanpour N, Sadigh-Eteghad S, Mahmoudi J, et al. Intranasal administration of mitochondria alleviated cognitive impairments and mitochondrial dysfunction in the photothrombotic model of mPFC stroke in mice. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2022;31(12):106801.
78. Ullah I, Chung K, Beloor J, Lee S-K, Kumar P. A positioning device for the placement of mice during intranasal siRNA delivery to the central nervous system. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019(150):e59201.
79. Preble JM, Pacak CA, Kondo H, MacKay AA, Cowan DB, McCully JD. Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2014(91):e51682.
80. Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols*. 2007;2(2):287-95.
81. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Current protocols in neuroscience*. 2001;15(1):8.12. 1-8.. 4.
82. Dunham N, Miya T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. 1957.
83. Petzinger GM, Walsh JP, Akopian G, Hogg E, Abernathy A, Arevalo P, et al. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(20):5291-300.
84. Shin M-S, Jeong H-Y, An D-I, Lee H-Y, Sung Y-H. Treadmill exercise facilitates synaptic plasticity on dopaminergic neurons and fibers in the mouse model with Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 2016;621:28-33.
85. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*. 1995;4(3):257-69.
86. El Massri N, Johnstone DM, Peoples CL, Moro C, Reinhart F, Torres N, et al. The effect of different doses of near infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *International Journal of Neuroscience*. 2016;126(1):76-87.
87. Önal D, Atalay Q, Pehlivanoglu B. Assessment of spontaneous activity in MPTP-induced Parkinson models: standard indexes. *Anatomy: International Journal of Experimental & Clinical Anatomy*. 2020;14.
88. Hartwig S, Kotzka J, Lehr S. Isolation and quality control of functional mitochondria. *Mitochondrial Medicine: Volume I, Probing Mitochondrial Function*. 2015:9-23.

89. Redmann M, Benavides GA, Wani WY, Berryhill TF, Ouyang X, Johnson MS, et al. Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture. *Redox biology*. 2018;17:59-69.
90. Kubat GB, Kartal Y, Atalay O, Ulger O, Ekinci O, Celik E, et al. Investigation of the effect of isolated mitochondria transplantation on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2021;433:115780.
91. Chang J-C, Chao Y-C, Chang H-S, Wu Y-L, Chang H-J, Lin Y-S, et al. Intranasal delivery of mitochondria for treatment of Parkinson's Disease model rats lesioned with 6-hydroxydopamine. *Scientific Reports*. 2021;11(1):10597.
92. Chang C-Y, Liang M-Z, Chen L. Current progress of mitochondrial transplantation that promotes neuronal regeneration. *Translational neurodegeneration*. 2019;8:1-12.
93. Hu C, Huang Y, Li L. Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1):144.
94. Mishra A, Singh S, Tiwari V, Bano S, Shukla S. Dopamine D1 receptor agonism induces dynamin related protein-1 inhibition to improve mitochondrial biogenesis and dopaminergic neurogenesis in rat model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*. 2020;378:112304.
95. Sung Y-H, Kim S-C, Hong H-P, Park C-Y, Shin M-S, Kim C-J, et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. *Life sciences*. 2012;91(25-26):1309-16.
96. Koo J-H, Cho J-Y, Lee U-B. Treadmill exercise alleviates motor deficits and improves mitochondrial import machinery in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Gerontology*. 2017;89:20-9.
97. Dai L, Diao R, Zhang J, Cao M, Gao H, Tang B. Tetramethyl pyrazine exerts anti-apoptotic and antioxidant effects in a mouse model of MPTP-induced Parkinson's disease via regulation of the expressions of Bax, Bcl-2, Nrf2 and GCLC. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;20(5):893-8.
98. Rekha KR, Selvakumar GP. Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*. 2014;217:57-66.
99. Liu J, Liu W, Yang H. Balancing apoptosis and autophagy for Parkinson's disease therapy: targeting BCL-2. *ACS chemical neuroscience*. 2018;10(2):792-802.
100. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(5):2837-42.
101. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death & differentiation*. 1999;6(2):99-104.
102. D'amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(7):1104-14.

103. Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, et al. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(47):15811-20.
104. Qiao C, Zhang L-X, Sun X-Y, Ding J-H, Lu M, Hu G. Caspase-1 deficiency alleviates dopaminergic neuronal death via inhibiting caspase-7/AIF pathway in MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*. 2017;54:4292-302.
105. Woo JH, Shin KO, Lee YH, Jang KS, Bae JY, Roh HT. Effects of treadmill exercise on skeletal muscle mTOR signaling pathway in high-fat diet-induced obese mice. *Journal of physical therapy science*. 2016;28(4):1260-5.
106. Lan A-p, Chen J, Zhao Y, Chai Z, Hu Y. mTOR signaling in Parkinson's disease. *Neuromolecular medicine*. 2017;19:1-10.
107. Wang C, Yu J-T, Miao D, Wu Z-C, Tan M-S, Tan L. Targeting the mTOR signaling network for Alzheimer's disease therapy. *Molecular neurobiology*. 2014;49:120-35.
108. Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2008;1147(1):93-104.
109. Chang K-H, Chen C-M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants*. 2020;9(7):597.

## EKLER

### **EK-1. Solüsyonlar**

1. 1.5 M Tris-HCl Buffer (100 ml)

18.15 g Tris (Trisma-base) + 75 ml dH<sub>2</sub>O

5 M HCl ile pH: 8.8 e getirilir. \*Toplam 100 ml ye tamamlanır.

2. 0.5 M Tris-HCl Buffer (100 ml)

6.05 g Tris (Trisma-base) + 75 ml dH<sub>2</sub>O

5 M HCl ile pH: 8.8 e getirilir. \*Toplam 100 ml ye tamamlanır.

3. %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (10 ml)

1 g SDS + 8 ml dH<sub>2</sub>O. \*10 ml ye tamamlanır.

4. %10 Ammonium Persulphate (1 ml)

0.1g APS + 1 ml dH<sub>2</sub>O.

5. %30 Acrylamide/Bis-Acrylamide (200 ml)

58.4 g Acrylamide + 1.6 N,N'-methylene-bis-acrylamide + 150 ml dH<sub>2</sub>O .

\* Toplam hacim 200 ml ye tamamlanır.

6. Hazır Malzemeler

Methanol, 2-Propanol, dH<sub>2</sub>O

7. TBS 10X (1 L) + Tween 20 (TBS-T)

24 g Tris-Hcl + 5.6 g Tris-base + 88 g + 900 ml dH<sub>2</sub>O

\*Toplam hacim 1 L ye tamamlanır.

\*\*pH=7,6 ya getirilir.

8. Runnig Buffer 5X (1L)

15g Tris + 72g Glycine + 5 g SDS + 800 ml dH<sub>2</sub>O.

\*Toplam hacim 1000 ml ye tamamlanır.

9. Transfer Buffer 1X (2L)

6.04 g Tris + 28.8 Glycine + 200 ml Methanol + 1.6 L dH<sub>2</sub>O

\* Toplam hacim 2 L ye tamamlanır.

## EK-2 Etik Kurul İzni



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-157

## HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 25.10.2022 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2022/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2021/15 (ONAY TARİHİ: 23.02.2021)
KARAR NUMARASI	: 2022/09- 10
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 23.02.2026
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Meltem TUNCER
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Doç. Dr. Meltem TUNCER, Doç. Dr. Bilge
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: PEHLIVANOĞLU, Doç. Dr. Gül Yalçın ÇAKMAKLI, Gökhan Burçin KUBAT, Arş. Gör. Özbeyen ATALAY (Doktora Tezi), Arş. Gör. Deniz ÖNAL.
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	:
SAYISI	: 44 Adet <i>Mus musculus C57BL6 Fare (4-6 Hafta)</i>

Kurulumuzun 23.02.2021 tarihli toplantısında 2021/15 dosya kayıt numarasıyla onaylanmış olan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji-Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Meltem TUNCER'in araştırma yürütücüsü olduğu "*DeneySEL Parkinson Hastalığı Modelinde Mitokondri Transplantasyonu ve Egzersizin Etkilerinin Karşılaştırılması*" başlıklı proje için verilen 18.10.2022 tarihli dilekçe Kurulumuzun 25.10.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Araştırma ekibinden Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi öğretim elemanı Dr. Öner ÜLGER çıkarılmış ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Kurul Üyesi Doç. Dr. Meltem TUNCER çıkar çatışması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

## EK-3 Tez Çalışması Orijinallik Raporu



Sayfa 1 of 121 - Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği trnoid::1:3038328191

### Özbeyen Atalay

#### DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE Mİ TOKONDİRİ TRANSPLANTASYONU VE EGZERSİZİN ETKİLE...

Quick Submit

Quick Submit

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

#### Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği

trn:oid::1:3038328191

114 Sayfa

Gönderi Tarihi

11 Eki 2024 13:55 GMT+3

22.033 Sözcük

İndirme Tarihi

11 Eki 2024 14:04 GMT+3

144.196 Karakter

Dosya Adı

Doktora\_Tez\_Ozbeyen\_Atalay\_Jiri\_du\_zeltme.pdf

Dosya Boyutu

3.2 MB



Sayfa 1 of 121 - Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği trnoid::1:3038328191




## 12% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

### Rapordan Filtrelenen

- › Bibliyografya
- › Alıntılanan Metin
- › Atıf Yapılan Metin
- › Küçük Eşleşmeler (8 sözcükten az)

### Ön Sıradaki Kaynaklar

- 12%  İnternet kaynakları
- 6%  Yayınlar
- 6%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

### Bütünlük Bayrakları

#### İnceleme için 0 Bütünlük Bayrağı

Herhangi bir şüpheli metin manipülasyonu belirlenmedi.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.



## EK-4 Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Özbeyen Atalay  
Ödev başlığı: Quick Submit  
Gönderi Başlığı: DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE MİTOKONDR...  
Dosya adı: Doktora\_Tez\_Ozbeyen\_Atalay\_Juri\_du\_zeltme.pdf  
Dosya boyutu: 3.24M  
Sayfa sayısı: 114  
Kelime sayısı: 22,033  
Karakter sayısı: 144,196  
Gönderim Tarihi: 11-Eki-2024 01:55ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2482079111



## ÖZGEÇMİŞ