

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

**SIÇANLARDA ADENO İLİŞKİLİ VİRAL VEKTÖR ARACILI
GERÇEKLEŞTİRİLEN NİGRAL VE HİPOKAMPAL
ALFASİNÜKLEİNOPATİ MODELİNDE RAPAMİSİNİN
ETKİLERİ**

Ecz. Elif ÇINAR

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2018

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

**SIÇANLARDA ADENO İLİŞKİLİ VİRAL VEKTÖR ARACILI
GERÇEKLEŞTİRİLEN NİGRAL VE HİPOKAMPAL
ALFASİNÜKLEİNOPATİ MODELİNDE RAPAMİSİNİN
ETKİLERİ**

Ecz. Elif ÇINAR

Farmakoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL

ANKARA

2018

**SIÇANLARDA ADENO İLİŞKİLİ VİRAL VEKTÖR ARACILI GERÇEKLEŞTİRİLEN NİGRAL
VE HİPOKAMPAL ALFASİNÜKLEİNOPATİ MODELİNDE RAPAMİSİNİN ETKİLERİ**

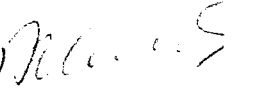
Elif ÇINAR

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL

Bu tez çalışması 25.04.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. M. Serdar UMA

(imza) 

(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)

Üye:

Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU

(imza) 

(Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi)

Üye:

Prof. Dr. Bülent ELİBOL

(imza) 

(Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi)

Üye:


Prof. Dr. Şaban Remzi ERDEM

(imza) 

(Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Üye:

Prof. Dr. Esen SAKA TOPÇUOĞLU

(imza) 

(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)

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

18 Mayıs 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYINLAMA 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.

Tezimin 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.

- o **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- **Tezimin/Raporumun 31.12.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- o **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

24/04/2018


Ecz. Elif ÇINAR

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, Dok. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.


(İmza)
Ecz. Elif ÇINAR

TEŞEKKÜR

“Dünyada her şey için, medeniyet için, hayat için, başarı için, en hakiki mürşit ilimdir, fendir”

M. Kemal ATATÜRK

Lisanstan itibaren bütün eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve beni destekleyen sevgili hocam, danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide Tel’e,

Tezimin her aşamasında deneyimleri, bilgileri ve fikirleri ile destek sağlayan Prof. Dr. Bülent Elibol, Prof. Dr. Esen Saka Topçuoğlu, Ayşe Ulusoy’a,

Her anımda yanımda olan, bana destek veren, yardım eden ve motive eden Dr. Öğr. Üyesi Gül Yalçın Çakmaklı’ya,

Doktora süreci boyunca eğitimime katkı sağlayan Farmakoloji Anabilim dalındaki tüm hocalarıma,

Bilimsel çalışmalar konusunda her zaman destek veren ve cömertçe tüm ekipmanlarını paylaşan başta Prof. Dr. Turgay Dalkara olmak üzere tüm Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü hocalarıma,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü teknik destek sağlayan ve yaratıcılıkları ile yardımlarını esirgemeyen Mesut Fırat, Necati Şengönül, Erdoğan Aksay’a,

Birlikte çalıştığım, heyecanımı ve dertlerimi paylaştığım tüm Farmakoloji asistanlarına, nörolojik bilimler enstitüsü asistanlarına ve her zaman yanımda olan arkadaşlarıma,

Bugüne kadar her daim yanımda olan, bana destek veren, benimle birlikte çalışıp, benimle birlikte sevinen ve üzülen biricik ailem; Ozan Çınar, Sevgi Çınar ve Özlem Çınar’a,

Çok teşekkür ederim.

Bu çalışma (TSA-2015-5291) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. AAV-a-sin ve AAV-GFP virüsleri “Michael J. Fox Foundation” tarafından sağlanmıştır.

ÖZET

Çınar, E., Sıçanlarda Adeno İlişkili Viral Vektör Aracılı Gerçekleştirilen Nigral ve Hipokampal Alfasinükleinopati Modelinde Rapamisinin Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Bu tez çalışmasında, bilateral substantia nigra (SN) ve dentat girus (DG)'ta AAV-aracılı alfa-sinüklein (a-sin) aşırı ifadesi sağlanarak, motor ve motor-dışı belirtilerin bir arada görüldüğü bir Parkinson hastalığı (PH) modeli oluşturulması ve bu modelde otofaji indüksiyonuna sebep olan rapamisinin tedavi potansiyelinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. İmmünohistokimya yöntemleri ile a-sin ve GFP aşırı ifadesi teyit edilmiş, immünohistokimya çalışmaları ile a-sin enjeksiyonu sonrası yoğun sinaptik kayıp olduğu gözlenmiştir. AAV-aracılı PH modelinde ilk defa denenen rapamisin uygulanmasının ise sinapsları koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. A-sin aşırı ifadesinin motor performansa etkisi hafta bazında değerlendirilmiş ve süreç içerisinde kompanzatuvar mekanizmaların devreye girmiş olabileceği gözlenmiştir. Yükseltmiş artı labirenti testinde; a-sin grubunun anksiyete düzeyinin daha az olduğu, yeni nesne tanıma testi ve Morris su labirenti testlerinde; a-sin enjeksiyon grubunun hatırlamada ve öğrenmede zorluk çektiği, rotarod ve lokomotor aktivite testlerinde; motor performansta kötüleşme olduğu gözlenmiştir. Rapamisin tedavisi sonrası ise öğrenme ve hatırlamada iyileşme gözlenirken, anksiyetede artış, motor performansta ise düzelme olmadığı gözlenmiştir. Rapamisinin, p62 yıkımında artış ile otofaji indüksiyonuna, ancak bir diğer otofaji belirteci olan LC3 I'den LC3 II dönüşümünde azalma ile otofajik yolakta değişikliğe neden olduğu gözlenmiştir. A-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan ve motor ve motor dışı belirtilerin ilk defa beraber oluşturulduğu bu PH modeli, rapamisin gibi otofaji indüksiyonuna neden olan ilaçların etkinliğini değerlendirmek için güvenli bir şekilde kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Parkinson hastalığı, Alfa-sinüklein, Rapamisin, Motor-dışı semptomlar, Sinaptik kayıp

Bu çalışma (TSA-2015-5291) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. AAV-a-sin ve AAV-GFP virüsleri "Michael J. Fox Foundation" tarafından sağlanmıştır.

ABSTRACT

Çınar, E., Effects of Rapamycin In A Rat Model Of Adeno Associated Viral Vector Mediated Nigral and Hippocampal Alpha-synucleinopathy, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmacology Programme Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2018. In this thesis study, we aimed to develop a Parkinson's disease (PD) model recapitulating both motor and non-motor symptoms of the disease by AAV-mediated alpha-synuclein (a-syn) overexpression in bilateral substantia nigra (SN) and dentate gyrus (DG) and to evaluate the potential therapeutic effects of rapamycin via autophagy induction. A-syn and its viral control GFP overexpression was confirmed by immunohistochemistry and immunoblotting. A dense synaptic loss and a neuronal loss tendency were detected in a-syn group by immunoblotting. First time in this model using rapamycin treatment showed a protective effect against the synaptic loss. Effect of a-syn overexpression on the motor performance was evaluated in every two weeks and a compensatory mechanism was noticed to take part in the process. Elevated plus maze test showed a decrease in anxiety whereas memory deficits, spatial learning difficulties and worsening in motor performance were detected in novel object recognition, Morris water maze, rotarod and locomotor activity tests, respectively. After rapamycin treatment improved learning and memory, increased anxiety and did not change motor performance. In immunoblotting; p62 an autophagy marker, increased with rapamycin treatment, confirming autophagic induction, on the other hand, conversion of LC3 I to LC3 II another autophagy marker decreased. This AAV-mediated a-syn overexpression model of PD, developed motor and non-motor symptoms together for the first time, can be used safely to try potential autophagy inducing treatment options like rapamycin.

Key words: Parkinson's disease, Alpha-synuclein, Rapamycin, Non-motor symptoms, Synaptic loss

This study (TSA-2015-5291) was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. AAV-a-syn and AAV-GFP virus was kindly requested from Michael J. Fox.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYINLANMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi ve Patogenezi	3
2.2. Bazal Gangliyonlar	6
2.2.1. Bazal Gangliyonların Anatomisi ve Girdileri	7
2.2.2. Direkt ve İndirekt Yolaklar	9
2.2.3. Bazal Gangliyonlar ile İlişkili Hareket Bozuklukları	11
2.3. Hipokampus: Anatomi ve Fizyolojisi	12
2.3.1. Hipokampusün Anatomik Bağlantıları	12
2.3.2. Hipokampusün Fizyolojik Fonksiyonu	14
2.4. Parkinson Hastalığının Patofizyolojisi	16
2.5 Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri	20
2.5.1 Nörotoksin/Farmakolojik Parkinson Hayvan Modelleri	20
2.5.2 Genetik Parkinson Hayvan Modelleri	23
2.5.3. A-sin ve A-sin ile Oluşturulan Parkinson Hayvan Modelleri	25
2.5.4. Viral Vektör Aracılı Parkinson Hayvan Modelleri	29
2.6 Parkinson Hastalığı Tedavi Yöntemleri	30
2.7 Nörodejeneratif Hastalıklarda Nöroprotektif mekanizmalar	35
2.7.1 Otofajik Yolaklar	35
2.7.2 Apoptotik Yolaklar	40

2.7.3. Rapamisin	44
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	46
3.1. Deneysel Parkinson Modelinin Oluşturulması	46
3.2. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelinde Tedavinin Uygulanması	49
3.3. Deney Planı	49
3.4. Davranış Deneyleri	51
3.4.1. Yükseltmiş Artı Labirenti Testi	52
3.4.2. Yeni Nesne Tanıma Testi	53
3.4.3. Sükroz Tercih Testi	54
3.4.4. Morris Su Tankı Testi	55
3.4.5. Rotarod Testi	56
3.4.6. Bazal ve Apomorfin ile İndüklenmiş Lokomotor Aktivite Testi	58
3.5. Beyinlerin İzole Edilmesi	59
3.6. Beyin Kesitlerinin Saklanması	60
3.7. Proteinlerin Ekstraksiyonu	60
3.8. Proteinlerin İmmünblotlama ile Tayin Edilmesi	61
3.9. Kesitlerin İmmünohistokimyasal Boyanması	63
3.10. Deneyde Kullanılan Çözeltiler ve Antikorlar	64
3.10.1. Primer Antikorlar	65
3.10.2. Sekonder Antikorlar	67
3.10.3. Kullanılan Çözeltiler	68
3.10.4. Kullanılan Kitler	70
3.10.5. Kullanılan Cihazlar	70
3.11. İstatistiksel Analiz	71
4. BULGULAR	72
4.1. Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması	72
4.2. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG'ye Alfa-sinüklein Enjeksiyonunun Başlangıcından İtibaren Lokomotor Aktivitede Meydana Gelen Değişiklikler	72
4.3. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Davranış Deneyleri ile Karakterizasyonu	74

4.3.1. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Aksiyete Üzerine Etkisi	75
4.3.2. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Hafıza Üzerine Etkisi	75
4.3.3. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Hedoni Üzerine Etkisi	77
4.3.4. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Öğrenme ve Uzaysal Hafıza Üzerine Etkisi	77
4.3.5. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Motor Öğrenme ve Koordinasyon Üzerine Etkisi	80
4.3.6. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi	81
4.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Davranış Deneilerine Etkisi	84
4.4.1 AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Anksiyete Üzerine Etkisi	84
4.4.2 AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hafıza Üzerine Etkisi	85
4.4.3 AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hedoni Üzerine Etkisi	89
4.4.4 AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Öğrenme ve Uzaysal Hafıza Üzerine Etkisi	91
4.4.5 AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Motor Öğrenme ve Koordinasyon Üzerine Etkisi	95
4.4.6 AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi	98

4.5. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi	103
Sağlanarak Hafta Bazında Motor Fonksiyonları Değerlendirilen	
Grubun 16. Haftada Patolojik Olarak Meydana Gelen Değişiklikleri	
4.5.1. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi	104
Sağlanarak Hafta Bazında Motor Fonksiyonları Değerlendirilen	
Grubun 16. Hafta Striatum TH Düzeyinde Meydana Gelen	
Değişiklikler	
4.5.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan	105
Parkinson Hastalığı Modelinde 16. Haftada Striatumda	
Sinaptofizin Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler	
4.6. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson	105
Hastalığı Modelinde Patolojik Olarak Meydana Gelen Değişiklikler	
4.6.1. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan	107
Parkinson Hastalığı Modelinde Hipokampüste NeuN Düzeyinde	
Meydana Gelen Değişiklikler	
4.6.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan	109
Parkinson Hastalığı Modelinde Striatumda TH Düzeyinde	
Meydana Gelen Değişiklikler	
4.6.3. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan	110
Parkinson Hastalığı Modelinde Hipokampus ve Striatumda	
Sinaptofizin Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler	
4.6.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson	112
Hastalığı Modelinde Hipokampus ve Striatumda Iba-1	
Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler	
4.7. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson	113
Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Moleküler Düzeyde	
Meydana Gelen Değişikliklere Etkisi	
4.7.1. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan	115
Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin	
Hipokampüste NeuN Düzeyinde Meydana Gelen Değişikliklere	
Etkisi	

4.7.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Striatumda TH Düzeyine Etkisi	117
4.7.3. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda Sinaptofizin Düzeyine Etkisi	117
4.7.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda ALDH1L1 Düzeyine Etkisi	121
4.7.5. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda LC3 I/II Düzeylerine Etkisi	123
4.7.6. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda p62 Düzeyine Etkisi	131
4.7.7. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda Kaspaz 3 Düzeyine Etkisi	133
5. TARTIŞMA	136
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	162
7. KAYNAKLAR	164
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

6-OHDA	6-hidroksidopamin
AAV	Adeno ilişkili viral vektör
ACh	Asetil kolin
AH	Alzheimer hastalığı
AMPK	AMP aktive edilmiş protein kinaz
AP	Anterior-posterior
a-sin	Alfa-sinüklein
BAC	Bakteriyel yapay kromozom
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CBA	<i>Chicken β-aktin promoter</i>
CMA	Şaperon aracılı otofaji
CMV	Sitomegalovirüs
CO ₂	Karbondioksit
COMT	Katekolamin o-metil transferaz
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
DAT	Dopamin taşıyıcısı
DBS	Derin beyin stimülasyonu
DG	Dentat girus
DMV	Vagusun dorsal motor çekirdeği
DV	Dorsal-ventral
ESS	Enterik sinir sistemi
GABA	Gama aminobutirik asit
GFP	Yeşil floresan protein
GPe	Globus pallidus eksterna
GPI	Globus pallidus interna
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HSP A8	Isı şok proteini 8
Iba-1	İyonize kalsiyum bağlanan adaptör molekül 1

IHC	İmmünohistokimyasal
i.p	İntraperitoneal
JNK	Jun-N-terminal kinaz
KO	<i>Knock out</i>
LAMP 2A	Lizozomal ilişkili membran protein 2A
LC3	Mikrotübül ilişkili protein hafif zinciri 3
LEC	Lateral entorinal korteks
L-DOPA	Levodopa (L-3,4-dihidroksiofenilalanin)
LGP	Lateral globus pallidus
LRRK2	Lösin açısından zengin tekrar kinaz 2
LTD	Uzun dönem depresyon
LTP	Uzun dönem potansiyasyon
LV	Lentiviral vektör
MAO	Monoamin oksidaz
MEC	Mediyal entorinal korteks
MFB	Orta ön beyin demeti
MGP	Medial globus pallidus
ML	Medio-lateral
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroksipiridin
MSA	Çoklu sistem atrofisi
MSL	Morris su labirenti
MTL	Mediyal temporal bölge
mTORC1/2	Memeli rapamisin hedefi kompleks 1 ve 2
NaCl	Sodyum klorür
NeuN	Nöronal çekirdek antijeni
NMDA	N-metil-D-aspartat
OSS	Otonom sinir sistemi
PBS	Fosfat tamponu
PE	Fosfotiletanolamin
PEG 400	Polietilen glikol
PFA	Paraformaldehit
PH	Parkinson hastalığı

PINK1	PTEN indüklenmiş varsayılan kinaz 1
PKA	Protein kinaz A
PSP	Supranükleer felç
PSS	Periferik sinir sistemi
PVDF	Polivinilidin Florid
RBD	REM uyku davranış bozukluğu
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
ROS	Reaktif oksijen türleri
s.c	Ciltaltı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SERT	Serotonin transporter
SF	Serum fizyolojik
SMA	Suplemer motor alan
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars kompakta
SNpr	Substantia nigra pars retikulata
SOM/NOS	Somatostatin/ Nitrik oksit sentetaz
SSS	Santral sinir sistemi
STN	Subtalamik çekirdek
STT	Sükroz tercih testi
TBS	Tris tamponu (pH 7.6)
TBS-T	%0,05 triton-X 100 içeren Tris tamponu
TBS-t	%0.1 Tween 20 içeren tris tamponu
TH	Tirozin hidroksilaz
VLo	Ventral lateral çekirdek
VMAT	Veziküler monoamin taşıyıcısı
VTA	Vental tegmental alan
YAL	Yükseltilmiş artı labirenti
YNT	Yeni nesne tanıma

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Bazal gangliyonların yapısı ve bağlantıları	7
2.2.	Bazal gangliyon döngüsü	11
2.3.	Hipokampüsün sinaptik organizasyonu	14
2.4.	Alfa-sinüklein proteininin yapısı	26
2.5.	Otofajik yıkım mekanizmaları	37
2.6.	Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yollarının şematik gösterimi	42
3.1.	Enjeksiyon bölgeleri ve enjektörün özellikleri	47
3.2.	Parkinson hastalığının motor belirtilerinin ilk haftalardan itibaren hayvan modelindeki ilerleyişini göstermek için oluşturulan grubun deney planının şematik gösterimi.	49
3.3.	Parkinson hastalığı hayvan modelini karakterize etmek için oluşturulan ilk grubun deney planının şematik gösterimi.	50
3.4.	Parkinson hastalığı hayvan modelinde rapamisin tedavisinin etkisini göstermek için oluşturulan tedavi grubu deney planının şematik gösterimi.	51
3.5.	Yükseltilmiş artı labirenti testi düzeneği	52
3.6.	Yeni nesne tanıma testi düzeneği	54
3.7.	Morris Su Labirenti test düzeneği	56
3.8.	Rotarod motor koordinasyon ve öğrenme test cihazı	57
3.9.	Lokomotor aktivite kafesleri ve bilgisayar analiz sistemi	58
3.10.	İmmünohistokimyasal boyama için kullanılan cihazlar	60
4.1.	Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun toplam hareket miktarına etkisi	73
4.2.	Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun kat edilen mesafeye etkisi	73
4.3.	Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun horizontal aktiviteye etkisi	74
4.4.	Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun YAL testine göre açık kolda geçirilen süreyi etkisi	75
4.5.	Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun YNT testine göre 1 saat sonrasında 24 saat sonrasında yeni nesne ile geçirilen süreye etkisi	76

Şekil	Sayfa
4.6. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı enjeksiyonunun sükröz tüketimine etkisi	77
4.7. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin öğrenmeye etkisi.	78
4.8. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun MSL prob testine göre platformu bulma süresine etkisi, platform bölgesinde kalma süresine etkisi ve platform kadranında geçirilen süreler etkisi	79
4.9. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun rotarod testine göre; döner mil üzerinde kalma süresine etkisi, düşme frekansına etkisi	81
4.10. Lokomotor aktivite testinde grupların 30 ile 60 dk arasındaki bazal ve 5 ile 35 dk arasındaki apomorfin enjeksiyonu sonrası horizontal aktivitelerindeki değişimin dakika bazında kümülatif gösterimi.	82
4.11. Enjeksiyon yapıldıktan sonraki 18. haftada yapılan lokomotor aktivite testinde grupların bazal ve apomorfin enjeksiyonundan sonraki horizontal aktiviteleri, apomorfin enjeksiyonu sonrası hareketlilikteki artışın bazal aktivitelerinden farkı	83
4.12. YAL testine göre hem ilk 8 hem de son 8 hafta tedavinin toplu olarak, ilk 8 hafta tedavinin, son 8 hafta tedavinin açık kolda geçirilen süreye etkisi	85
4.13. YNT testine göre ilk 8 hafta ve son 8 hafta tedavi gruplarının toplu olarak, ilk 8 hafta tedavinin, son 8 hafta tedavinin 1 saat sonra değerlendirilen yakın dönem bellek davranışlarına etkisi, ilk ve son 8 hafta tedavi uygulanmasının 24 saat sonra değerlendirilen uzun dönem bellek davranışlarına etkisi	87
4.14. STT'ne göre ilk 8 hafta ve son 8 hafta tedavi gruplarının toplu olarak, ilk 8 hafta tedavinin, son 8 hafta tedavinin sükröz tüketimine etkisi	89
4.15. Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisinin Morris su labirenti testine etkisi.	94
4.16. MSL testine göre; son 8 hafta tedavi gruplarının öğrenme eğrileri, son 8 hafta tedavi gruplarının prob testine göre platformun olduğu bölgeyi bulma süreleri	93
4.17. Rotarod testine göre; ilk 8 hafta ve son 8 hafta tedavi gruplarının toplu olarak, İlk 8 hafta tedavinin döner mil üzerinde kalma süresine etkisi, İlk 8 hafta tedavinin düşme frekansına etkisi	95
4.18. Rotarod testine göre; son 8 hafta tedavinin döner mil üzerinde kalma süresine etkisi, son 8 hafta tedavinin düşme frekansına etkisi	97

Şekil	Sayfa
4.19. Lokomotor aktivite testinde grupların 30 ile 60 dk arasındaki bazal ve 5 ile 35 dk arasındaki apomorfin enjeksiyonu sonrası horizontal aktivitelerindeki değişimin dakika bazında gösterimi	99
4.20. Açık alan lokomotor aktivite testine göre bazal ve apomorfin enjeksiyonu sonrası grupların horizontal aktivitelerinin gösterimi: apomorfin indüksiyonu sonrası hareketlilikte meydana gelen artıştan bazal aktivitelerinin çıkarılması sonucu elde edilen horizontal aktivite farkının gösterimi	100
4.21. Açık alan lokomotor aktivite testi ilk 8 hafta bazal ve apomorfin ile indüklenmiş horizontal aktivite, horizontal aktivitede meydana gelen değişiklikler	101
4.22. Açık alan lokomotor aktivite testi son 8 hafta bazal ve apomorfin ile indüklenmiş horizontal aktivite, horizontal aktivitede meydana gelen değişiklikler	102
4.23. Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin immünoiblottlama ile protein bantlarının gösterimi	104
4.24. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin motor hareketliliğe etkisi değerlendirilen gruplarda striatum sinaptofizin düzeyleri.	104
4.25. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin motor hareketliliğe etkisi değerlendirilen gruplarda striatum sinaptofizin düzeyleri.	105
4.26. Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin ve GFP aşırı ifadesinin immünoiblottlama ile gösterimi	106
4.27. İmmünohistokimyasal boyama ile a-sin, p-a-sin ve GFP aşırı ifadelerinin gösterimi	106
4.28. İmmünohistokimyasal boyama ile a-sin, GFP, SF ve <i>naive</i> kontrol gruplarının hipokampus NeuN boyaması	108
4.29. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampüste NeuN miktarına etkisi	109
4.30. İmmünohistokimyasal boyama ile a-sin, GFP, SF ve <i>naive</i> kontrol gruplarının SN ve striatumda TH boyaması	112
4.31. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin striatumda TH miktarına etkisi.	113
4.32. İmmünohistokimyasal boyama ile a-sin, GFP, SF ve <i>naive</i> kontrol gruplarının hipokampus ve striatumda sinaptozin boyaması	111
4.33. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampus, striatumda sinaptofizin miktarına etkisi	112

Şekil	Sayfa
4.34. İmmünohistokimyasal hipokampüste, striatumda a-sin ve <i>naive</i> kontrol gruplarının Iba-1 boyaması	113
4.35. AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampus ve striatumda her gruptan rastgele 3 numunede şekilsel gösterimi	114
4.36. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta uygulandığında, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste, ilk 8 hafta uygulandığında, son 8 hafta uygulandığında striatumda göreceli a-sin yüküne etkisi	114
4.37. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta ve son 8 hafta uygulandığında striatumda NeuN miktarına etkisi	116
4.38. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta ve son 8 hafta uygulandığında striatumda TH miktarına etkisi	117
4.39. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi sinaptofizin düzeyine etkisi	119
4.40. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi ALDH1L1 düzeyine etkisi	122
4.41. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi LC3 I düzeyine etkisi	124
4.42. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi LC3 II düzeyine etkisi	126
4.43. Sıçanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisinin LC3 II/I oranına, LC3 II/ LC3 (II+I) oranına, son 8 hafta rapamisin tedavisinin LC3 II/I oranına, LC3 II/ LC3 (II+I) oranına striatumda etkisi	129
4.44. Sıçanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisinin LC3 II/I oranına, LC3 II/ LC3 (II+I) oranına, son 8 hafta rapamisin tedavisinin LC3 II/I oranına, LC3 II/ LC3 (II+I) oranına striatumda etkisi	130
4.45. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi p62 düzeyine etkisi	132
4.46. Sıçanlarda rapamisin tedavisi ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve ilk 8 hafta, son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi kaspaz 3 düzeyine etkisi	134

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	PH'nin toksin ve genetik hayvan modelleri	20
3.1.	Deneylerde kullanılan toplam sıçan sayısı	48
3.2.	İmmünohistokimya ve immünoablötama için kullanılan deney hayvanı sayısı	59

GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), dinlenme halindeki tremor, bradikinezi, rijidite ve postural refleks kaybı ile seyreden ve substantia nigra (SN)'daki dopaminerjik nöron kaybı ve SN'nin projeksiyon alanı olan striatumda dopaminerjik terminal kaybı ile ilişkili bir hastalıktır. PH'nin motor belirtilerinin yanında hem premotor dönemde hem de geç dönemde motor dışı semptomlar hastalığa eşlik eder. PH'de görülen motor belirtiler kadar kognitif bozukluklar, anhedoni, apati, otonom sinir sistemi bozuklukları gibi motor dışı belirtiler de hastaların yaşam kalitesini oldukça düşürmektedir.

PH'nin altında yatan mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, çalışmalarla birlikte PH'ye neden olduğu düşünülen etkenler ortaya çıkartılmaya başlanmıştır. Beyinde yüksek oranda özellikle de presinaptik olarak ifade edilen nöronal bir protein olan alfa-sinüklein (a-sin) etkenlerden biridir. PH patolojik belirteci olan Lewy cisimcikleri içeriğinin a-sin olduğu keşfedilmiştir.

PH'nin patolojisini araştırmak üzere çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu modellerden en sık kullanılanları; toksin modelleri, transgenik hayvanlar ve viral vektör aracılı a-sin aşırı ifadesine bağlı modellerdir. Kullanılan modellerin farklı özellikleri ve avantajları olmasına rağmen, viral vektör aracılı a-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan hayvan modelleri hastalığın yavaş ilerleyen doğal seyrini daha iyi taklit etmekte ve hastalarda izlenen patolojiye daha yakın bir patoloji oluşumu göstermektedir.

PH etiolojisinin anlaşılabilmesi, hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılabilmesi ya da durdurulabilmesi için ve ayrıca tedavi mekanizmalarının daha detaylı incelenerek geliştirilebilmesi, semptomların azaltılması ya da yok edilmesi için hayvan modellerinin varlığı ve yeni tedavi yöntemlerinin denenmesi oldukça önemlidir.

Parkinson hastalarında tedavi olarak kullanılan altın standart L-DOPA'dır. L-DOPA semptomatik tedavi sağlamaktadır ve uzun dönemde tedaviye bağlı görülen yan etkiler L-DOPA'nın kullanımını kısıtlamakta ve yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmasına yol açmaktadır. Hastalığın seyrini yavaşlatacak ya da durduracak, SN'de nöron ölümünü engelleyebilecek bir tedavinin bulunabilmesi; hastaların yaşam süresini ve kalitesini artıracaktır.

Rapamisin, ilk olarak antifungal etkili bir ilaç olarak ortaya çıkmıştır. Ancak daha sonra; rapamisinin otofaji indüksiyonu yaparak yanlış katlanmış proteinlerin birikimini azalttığı ve nöroprotektif etkisinin olabileceği keşfedilmiştir. Parkinson hastalarında görülen a-sin agregatlarının Lewy cisimcikleri ya da Lewy nöritlerinin temel yapı taşlarından olması, rapamisin aracılı bu agregatların temizlenmesinin hastalığın tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı; AAV-aracılığı ile yabancı insan a-sin ifadesinin ilk defa bilateral SN ve hipokampüsün DG'sinde birlikte gerçekleştirilmesi ile PH'nin motor, davranışsal ve kognitif etkilerinin bir arada ayrıntılı olarak incelenmesidir. Böylece patolojik a-sin agregasyonunun, hücre-otonom mekanizmalarla oluşturduğu nöronal ve glial patoloji yayılımının ve sinaptik etkisinin oluşturulan model üzerinde geçerliliğinin ve öneminin test edilmesidir. Ayrıca, yine ilk defa kronik rapamisin tedavisinin bu model üzerinde nöroprotektif ve nörorestoratif etkilerinin incelenmesi de hedeflenmiştir. Oluşturulan PH modelinde, sürecin erken evrelerinden itibaren rapamisin tedavisi ile otofaji indüksiyonu aracılı nöron kaybı ve öncesindeki sinaptik fonksiyonel kayıptan sorumlu olduğu düşünülen agregat oluşumunun inhibe edileceği öngörülmüştür. Patoloji oluşuktan sonra kronik rapamisin tedavisi ile sinaptik disfonksiyon ve nöronal kayıp süreçlerine karşı olası restoratif/protektif etki ortaya konmaya çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Parkinson Hastalığı Etiyolojisi ve Patogenezi

Parkinson hastalığı (PH) 60 yaş üstü nüfusun neredeyse %1'ini etkileyen ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Genel olarak hastalık 60 yaş ve üzerinde görülmesine rağmen; genç başlangıçlı PH, 20-50 yaş arasındaki nüfusu etkiler ve toplam hastaların %5-10 civarını oluşturur (1). PH, hem çevresel hem de genetik faktörlerin etkili olduğu ve yaşın en büyük riski oluşturduğu bir hastalıktır (2, 3).

1817'de James Parkinson adında bir İngiliz doktor "*shaking palsy*" adı altında bir rapor yayınlamıştır ve PH'nin karakteristik özellikleri olan dinlenme halinde tremor, anormal postür ve yürüyüş, kas gücü kaybı ve paralizi gibi özelliklerinin yanında hastalığın zaman içindeki ilerleyişini de tanımlamıştır (4). Ancak bundan çok daha önce, geleneksel Hint kayıtlarında M.Ö. 1000 yılında ve tarihi Çin kayıtlarında PH'i anlatan tanımlamalar bulunmuştur (5, 6). Jean-Martin Charcot, James Parkinson'ın tanımını genişletmiştir. Charcot, PH hastalarının hepsinin güçsüz olmaması ya da tremorunun olmaması sebebiyle titrek felç, ajite felç gibi terimlerin yerine "Parkinson hastalığı" terimini kullanmayı öneren ilk kişidir (6).1912'de ise Frederic Lewy; hastalardan alınan örneklerde, nöronlarda agregatları tanımlamıştır ve daha sonra bu agregatlara Lewy cisimcikleri adı verilmiştir (7).

PH'nin 4 temel semptomu vardır. Bunlar; dinlenme halindeki tremor, hareketlerde yavaşlık (bradikinezi), rijidite ve postural refleks kaybıdır (8). Nigrostriatal sistemdeki dopaminerjik nöronların %80'e varan kaybından sonra temel motor semptomlar gözlenmeye başlar. Motor semptomlara ek olarak; otonomik disfonksiyon, bilişsel/nörodavranışsal anomali, duyuusal ve uyku bozuklukları gibi motor dışı semptomlar da görülür (2). Amigdala ve hipokampüste nöropatolojik değişikliklerin hastalığın etiyolojisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (9). Parkinson hastalarında kognitif bozukluklar ve demans geç ya da erken dönemde yaygın olarak görülmektedir (10).

PH; SN ve onun projeksiyon bölgesi olan striatumun dejenere olmuş nöronlarında hücre içi Lewy cisimciklerinin oluşumuna bağlı dopaminerjik nöron kaybı ile seyreden bir hastalıktır (2). PH, nöronal sitoplazmada ubikutinlenmiş

proteinlerin birikimi ile işaretlenir ve bu agregatlar Lewy cisimcikleri olarak anılır. Lewy cisimcikleri büyük oranda alfa-sinükleinden (a-sin) oluşur ve hastalıkta anahtar rol oynarlar (11). PH, a-sin proteinin yanlış katlanmasına bağlı olarak ortaya çıkan, hareketlerin kontrolünde yetersizliğe sebep olan ve bu nedenle de hareket bozukluğu olarak anılan bir hastalıktır (2, 12). A-sin'in hastalıktaki rolü tam olarak bilinmemekte ancak pek çok çalışma, mekanizmayı etkileyerek hastalık patogenezinde etkili olduğunu göstermektedir (11, 13). Nigrostriatal dopaminerjik nöron kaybı ve posttranslasyonel olarak ubikütinlenmiş, fosforillenmiş ve/veya S-nitrosillenmiş fibriller a-sin proteininin beyinde Lewy cisimcikleri olarak birikmesi ile karakterizedir (11, 14). Bazı ailesel PH vakalarında, a-sin 53 treonin-alanin bağlanmasında mutasyon gözlenmiştir. Bu mutasyonun en önemli etkisi, a-sin'in agregat olarak birikerek filamentleri oluşturması ve buna bağlı olarak da Lewy cisimcikleri oluşumu olabilir (11). Bir çalışmada, parkinin; a-sin ile ilişkili protein *synphilin-1* ile bağlantılı olduğu ve onun ubikütinlenmesini sağladığı ve böylece a-sin ile ko-lokalize bulunan ubikütinlenmiş *synphilin-1*'in Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyonları oluşturduğu gösterilmiştir (15).

A-sin geninde mutasyonun otozomal dominant PH'e neden olduğu belirli ailelerde gösterilmiştir (16). Her ne kadar a-sin mutasyonu ile ilişkili PH nadir gözükse de yabancı tür a-sin Lewy cisimciklerinin temel bileşenlerinden biridir ve a-sin'in dağılımında ve/veya fonksiyonunda meydana gelen bir bozukluk sporadik PH patogenezinde önemli bir rol oynuyor olabilir (11, 17). Ayrıca, Parkin mutasyonu olan hastalarda Lewy cisimcikleri olmadığı gözlenmiştir (15, 18).

Motor semptomlar görülmeden ve teşhis konulmadan önce, hastalar pek çok pre-motor semptom gösterebilir ve bu semptomlar teşhisten 10 yıl öncesine dayanıyor olabilir (19). Anhedoni, apati, bilişsel bozukluklar ve dikkat dağınıklığı 2 yıllık premotor dönemde sıklıkla oluşmaktadır (20). Koku, kabızlık, depresyon ve hızlı göz hareketleri gibi motor dışı semptomlar, yaş ve yaşam kalitesi arttıkça oldukça ciddi problem oluşturmaktadır (21, 22).

Bilişsel Bozukluklar: Parkinson hastalarında demans, %40 daha fazla oranda görülür (23). Demans ilerleyicidir ve uzaysal-görsel yeteneklerde bozukluk, geçmiş hatırlayamama, L-DOPA ve diğer dopaminerjik ilaçlara cevapta azalma ile karakterizedir (24). Kortikal ve subkortikal Lewy cisimciklerinin varlığı dışında nigral

dopaminerjik nöron hasarı ile de ilişkilidir. Meynert bazal çekirdeğinde kolinerjik hücre kaybı ön plandadır, bu nedenle hastalıkta demans tedavisinde kolinerjik ilaçlar temel alınmaktadır (21).

Anksiyete ve Apati: Anksiyete PH’de oldukça yaygın görülen ve panik atak, fobi, genel anksiyete bozukluğu ve ilaç ile indüklenen motor dalgalanmalar şeklinde kendini gösterebilen bir bozukluktur (21). Ayrıca yüksek doz L-DOPA ya da dopamin agonistleri ile tedavinin yan etkisi olarak da anksiyete görülebilmektedir (25). Parkinson hastalarında apatinin de yüksek oranda görüldüğü gözlenmiştir (26). PH’de apati psikolojik ya da adaptif değişikliklerden ziyade fizyolojik değişikliklere bağlı olarak görülmektedir ve bilişsel bozukluklar ile de yakından ilişkilidir (26). Apati, anhedoni ve yorgunluk gibi negatif semptomlar; ventral tegmantal alan (VTA) ile nukleus akumbens arasındaki dopaminerjik projeksiyonlar nöronlarının hasarından kaynaklı olabilir (27).

Depresyon: Parkinson ile ilişkili depresyon, serotoninerjik nöronal aşırım ile noradrenerjik ve dopaminerjik mekanizmalardaki hasara bağlı olarak gözleniyor olabilir (28). Depresyon, suçluluk duygusu, kendine saygı kaybı, üzüntü ve vicdan azabı gibi duygularla karakterizedir ve bir çalışmada depresyon belirtilerinin PH’nin gelişiminin öncüsü olabileceği söylenmiştir (21).

Psikoz ve görsel halüsinasyonlar: Hastaların %40’ında görsel halüsinasyonlar görülür fakat çoğu zaman hastayı rahatsız edecek boyutta değildir ancak hastalığın ilerlemesi ile birlikte delüzyon, paranoyak fikirler, deliryum gibi daha şiddetli semptomlar görülmeye başlar (29). Görsel halüsinasyonlar, genellikle PH tedavisinin yan etkisi olarak kabul edilse de pedinkülopontin çekirdeğin, lokus seruleusun ve dopaminerjik rafe çekirdeğinin hasarı da nedenler arasında olabilir (29). Bu çekirdekler aynı zamanda REM uyku davranış bozukluğu (RBD) ile de ilişkilidir. Bir teoriye göre ilaç ile indüklenen psikoz, ilaç ile indüklenen uyku bozukluğu ile birlikte başlar ve canlı rüyalara, halüsinasyonlara ve sonunda da deliryuma sebep olur (30).

Uyku Bozukluğu: Hemen hemen bütün Parkinson hastalarının uyku problemi yaşadığı ve bu sorunun özellikle de hastalığın erken dönemlerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir (31). Beyin sapında ve talamokortikal yolakta uykuyu düzenleyen merkezlerdeki hasar patolojide önemli rol oynamaktadır (21). REM uyku davranış bozukluğu (RBD) ise bir başka uyku bozukluğudur ve Parkinson hastalarının üçte

birinde görülür (32). Uyku sırasında konuşma, bağırma, el ve ayaklarda şiddetli hareketler, yataktan düşme gibi anormal hareketler gözlenir (21). RBD; pedinkülopontin, subcoeruleal çekirdek gibi beyin sapı çekirdeklerindeki hasara bağlı olabileceği düşünülmektedir (33). Bunun yanında gün içerisinde aşırı uykululuk da görülebilen uyku bozukluklarından. Gece uykusunun düzensizliği ve bazı Parkinson ilaçları bu durumun sebebi olabilir (21).

Otonom Sistem Bozuklukları: Ortostatik baş dönmesi, kabızlık, mesane rahatsızlıkları, erektil disfonksiyon gibi, hastanın günlük yaşamını etkileyen rahatsızlıklar PH'de sıklıkla görülebilmektedir. PH patofizyolojisine etki eden pek çok bileşen vardır ve otonomik fonksiyonlara aracılık eden dorsal vagal çekirdek, ambigus çekirdek, rostral ventrolateral medulla, ventromedial medulla ve kaudal rafe çekirdeği gibi çekirdeklerin hasarı ya da fonksiyon bozuklukları ile ilişkilidir (21). A-sin mutasyonu ile ilişkili genetik PH'nin kardiyak sempatik hasar ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (34). Kabızlık; PH'de görülen en yaygın motor dışı semptomlardan biridir. PH'de hem santralde hem de kolonda dopaminerjik nöron kaybı olsa da; kabızlık dopaminerjik tedavilere çok iyi yanıt vermemektedir. Bu da patolojide non-dopaminerjik yolların da etkili olduğunu düşündürmektedir (35).

2.2.Bazal Gangliyonlar

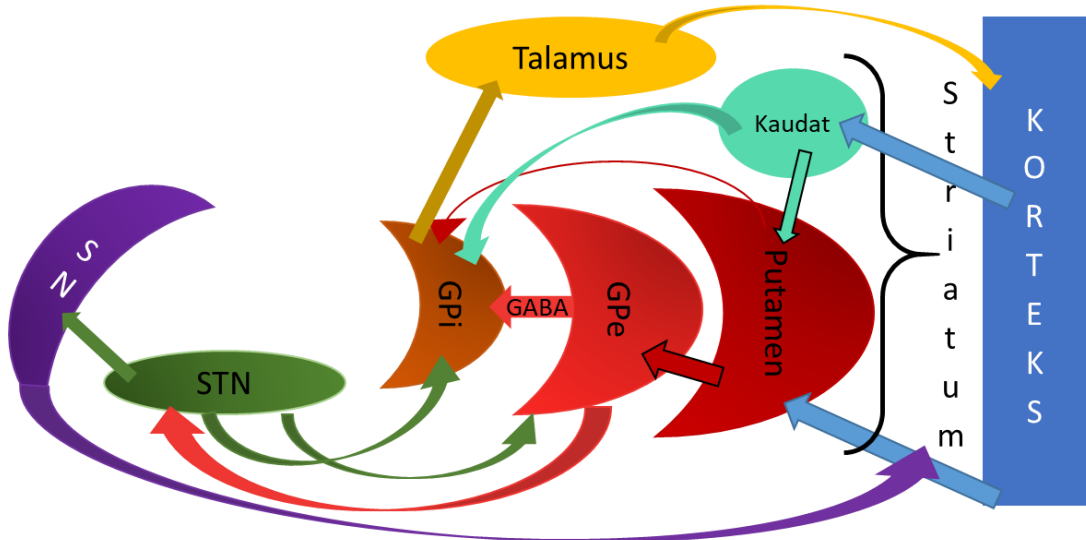
Bazal gangliyonlar; memelilerde ön beyin ile orta beyin arasında yer alan ve ara bağlantıları oldukça zengin olan beyin çekirdekleridir. Bazal gangliyonlar, özellikle frontal, prefrontal ve parietal korteks olmak üzere serebral korteksin hedefidir. Korteks ve bazal gangliyonlar arasında bir döngü vardır. Korteksten gelen bilgiler bazal gangliyonlar ve talamusa gider ve buradan tekrar kortekse özellikle suplementer motor alana (SMA) döner. Bu döngünün işlevlerinden biri de istemli hareketlerin seçimi ve başlatılmasıdır (36, 37). Bazal gangliyonlar gelen bilgileri yorumlayarak, hedefe ve stratejilere göre aday hareketler içerisinde uygun olanı seçmektedir.

2.2.1. Bazal Gangliyonların Anatomisi ve Girdileri

Bazal gangliyonlar; kaudat nükleus, putamen ve globus pallidustan oluşur. Bu yapılara bazal gangliyonlar ile bağlantılı olan subtalamik çekirdek (STN) ve substantia nigra (SN) orta beyin bölgesi de eklenebilir (Şekil 2.1).

Bazal gangliyonların temel girdi aldığı kaynaklar; serebral korteks ve talamustur. Bazal gangliyonlara gelen uyarıların büyük kısmı; kaudat çekirdek putamen ve nükleus akumbensten oluşan *neostriatum*'a ulaşır. Kaudat çekirdek ve putamende; duyuşsal, motor ve kortikal bölgeler ile ilişkili girdiler, talamik intralaminar çekirdek girdileri, *substantia nigra pars compacta* (SNpc)'dan dopaminerjik girdiler ve dorsal rafe çekirdeğinden serotoninerjik girdiler birleşir. Limbik korteks ve hipokampüsten yükselen analog bağlantılar, ventral tegmental alan (VTA)'dan dopaminerjik girdiler; striatal yapının üçüncü kısmı olan nükleus akumbenste birleşir.

Neostriatumdan çıktılar, bazal gangliyonların diğer bölgelerine projekte olurlar. Ana hedefler; *globus pallidus eksterna* (GPe), *globus pallidus interna* (GPi) ve *substantia nigra pars retikülata* (SNpr)'dır. GPi ve SNpr bazal gangliyonların dışına projekte olarak ana çıktı yollarını oluştururlar.



Şekil 2.1. Bazal gangliyonların yapısı ve bağlantıları (Kaudat: kaudat çekirdek, GPe: globus pallidus eksterna, GPi: globus pallidus interna, STN: subtalamik çekirdek, SN: substantia nigra kısaltması olarak kullanılmıştır.)

Bazal gangliyonların hedef yapıları ile bütün bağlantıları inhibitördür ve etkisini diğer döngülerin iletimini düzenleyerek gösterir. Talamusta; bazal gangliyon girdileri temel olarak kortiko-talamo-kortiko yolak aktivitesini düzenler.

Kortikal ve Talamik Afferentler: Kortikostriatal ve talamokortikal projeksiyonların her ikisinden de çıkan nöronlar, yalnızca bazal gangliyonlara projekte olmazlar. Kortikostriatal uzantılar, korteks, talamus, beyin sapı ve omurilik gibi pek çok bölgeye projekte olur. Talamokortikal yolak nöronları ise kortekse ve striatuma projekte olur. Korteks ve talamustan çıkan nöronlar pek çok dallanma gösterir. Bu nedenle; serebral korteksin küçük bir bölgesinden çıkan aksonlar bile neostriatumda geniş bir bölgeye yayılabilir (37, 38).

Nigrostriatal Aferentler: SN'den çıkan dopaminerjik aksonların dağılımı neostriatumdaki sinaptik plastisite için gerekli bir düzenleyicidir. Bu aksonlar seyrek dallanma gösterir. Neostriatumun herhangi bir yerel bölgesine ulaşan dopaminerjik bağlantılar görece küçük bir dopaminerjik nöron topluluğundan gelir. Nigrostriatal nöronlardan dopamin salıverilmesinin ana işlevlerinden biri de striatal çıktı nöronlarının girdilerini düzenleyerek, ateşleme düzeninin değiştirilmesidir (39). Nigrostriatal yolağın dopaminerjik nöronları katekolamin sentezinde gerekli olan, tirozin hidroksilaz (TH) enzimi içeren nöronlardır ve SN'den çıkan aksonların belirteci olarak TH boyaması kullanılır.

Esas neostriatal nöronlar, çok sayıdaki dendritik dikenden dolayı dikensi çıkıntılı (*spiny*) nöronlar olarak adlandırılır (40). Dikensi çıkıntılı neostriatal nöronların aksonları, bir araya gelerek neostriatumun gri maddesinde delikler açan küçük kablo demetleri oluşturur ve striatuma adını veren çizgili görüntüyü meydana getirir.

Neostriatumda çok çeşitli internöron morfolojisi bulunmaktadır. Bunlar arasında en çok 3 grup çalışılmıştır. 1) Dev kolinerjik internöronlar, 2) Gama aminobutirik asit (GABA)/Parvalbumin içeren sepet hücreler ve 3) somatostatin (SOM)/nitrik oksit sentaz (NOS) içeren internöronlar.

Kolinerjik internöronlar: neostriatumdaki oranları toplam hücrelerin %2'sinden daha az olsa da dokudaki en büyük nöronlardır. Diğer beyin bölgelerine oranla, asetilkolin (ACh) striatumda oldukça yüksek oranda bulunmaktadır ve striatal ACh'nin esas kaynağı kolinerjik internöronlardır.

GABA/Parvalbumin içeren internöronlar: ekzojen GABA alımı için oldukça güçlü bir kapasiteye sahiptirler. GABA içeren nöronlar toplam neostriatal nöron miktarının %3-5'ini oluşturmaktadır. Genel olarak geniş alanlara yayılmışlardır fakat dendritleri birbirleri ile *gap junction* oluştururlar (41). Neostriatumdaki GABAerjik internöronlar bir tür orta boy *aspiny* internöronlardır. Striatumdaki ve daha uzaktaki beyin bölgelerinden sinaptik girdilere ulaşırlar (42). Bu hücreler kalsiyum bağlanma proteini olan parvalbumin ile birlikte bulunurlar (41). Yuvarlak, düzgün somaları ve yoğun dendritleri, çok dallı aksonları vardır (37).

Somatostatin/Nitrik oksit sentaz (SOM/NOS) içeren internöronlar: ikinci grup orta boy *aspiny* internöronlardır (43). Ayrıca, bu internöronlar hem nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi ile hem de striatal nöromodülatör olan SOM ve nöropeptit Y ile de pozitif boyama ile tanımlanır (44, 45). Total nöronların %1-2'lik kısmını oluştururlar. Orta boyutlu internöronlardır ve GABA/parvalbumin internöronlarına göre daha az dallanmış dendritler ve daha uzun aksonal alana sahiptirler (46).

2.2.2. Direkt ve İndirekt Yolaklar

Enkefalin ve P maddesi, sitokimyasal işaretleyici olarak neostriatumda striozom ve matriks yapılarının ayrılmasında kullanılması, bazal gangliyonlarda, direkt ve indirekt efferent yolakların keşfine yol açmıştır (37). Dikensi nöronların yarısının yoğun ve ayrıntılı bir şekilde GPe'ye projekte olduğu fakat SN'ye gitmediği ortaya çıkmıştır (47). SN veya GPi bölgelerinde yoğun olarak izlenen nöronlar ise GPe'de çok az miktarda bulunmuştur (37). Ayrıca; enkefalin, GPe'de striatal akson sonlanmalarında yoğun olarak bulunurken; P maddesi GPi'de neostriatal akson terminallerinde ve SNpr'de yoğun olarak bulunur. Aralarındaki farklardan biri dopamin reseptör alt tipidir. Neostriatumda genel olarak D1 ve D2 olmak üzere iki dopamin reseptör alt tipi bulunur. Neostriatumda D1 reseptörü bulunan ve P maddesi içeren dikensi çıkıntılı projeksiyon nöronları (SPN) direkt yolağı oluştururken, D2 reseptörleri ise enkefalin içeren indirekt yolak dikensi nöronlarında bulunur (48).

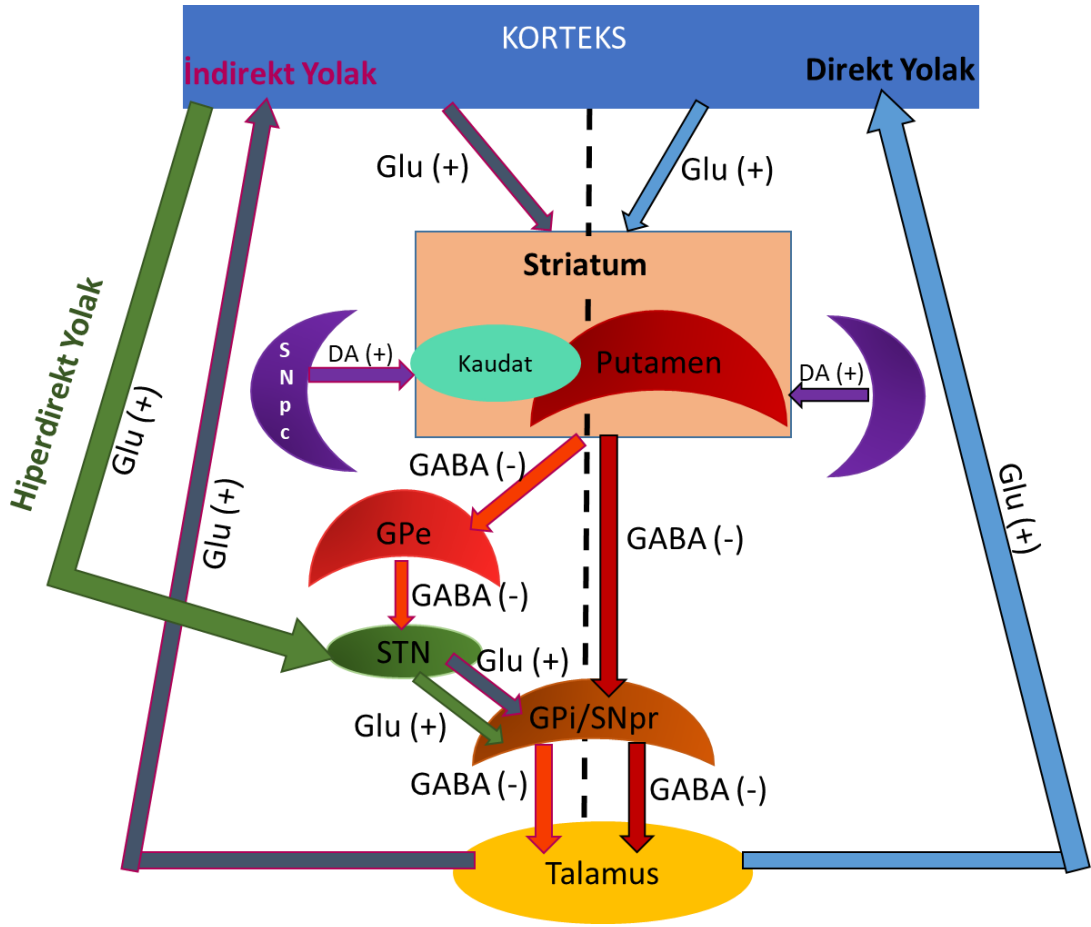
Direkt yolak; GPi veya SNpr gibi striatal hedeflerin kombinasyonuna projekte olan dikensi nöronlar tarafından oluşturulur. Böylece bazal gangliyon çıktılarının hızlı bir şekilde ulaşması sağlanır. Motor döngünün içindeki direkt yolak; korteksin eksitator bağlantılarından köken alarak putamen nöronlarına gider. Putamendeki

nöronlar, GPi'deki inhibitör nöronlarla sinaps yapar ve daha sonra talamusun ventral lateral çekirdek (VLo) nöronları ile inhibitör bir bağlantıya dönüşür. VLo'dan SMA'ya talamokortikal bağlantı eksitatördür ve SMA'daki hareket ile ilişkili nöronlarda uyarılmayı kolaylaştırır.

İndirekt yolak ise; korteksin eksitatör bağlantılarından köken alarak, striatumun kaudat bölgesine gelir. Buradan inhibitör uyarın, GPe dikensi nöronlarına projekte olur. GPe'den çıkan inhibitör uyarınlar, STN'e gelir. İnhibisyondan kurtulan STN, GPi/SNpr'ye eksitatör uyarın gönderir. Uyarılan GPi/SNpr ise talamusa inhibitör uyarınlar göndererek istenmeyen hareketler baskılanır.

Hiperdirekt yol olarak adlandırılan; korteksin frontal bölgesinden subtalamik çekirdek ve oradan da pallidal çekirdeklere hızlı girdi ulaştıran bir yolak (Şekil 2.2) daha vardır (49). Bu yol; SNpr ve GPi'deki çıktı nöronları aracılığıyla talamokortikal yolağı inhiye eder (50).

Direkt yolağın uyarılması, SNpr/GPi nöronlarının seçici olarak inhibisyonu sonucu hareketin başlaması olarak ortaya çıkar. İndirekt yolak aracılı etki ise motor hareketlerin baskılanmadır ve SNpr/GPi nöronlarının uyarılması sonucu ortaya çıkar. Temel bazal gangliyonların çıktı (*output*) nöronları; motor çıktı üzerine striatal direkt ve indirekt yolaklar aracılığıyla açılıp, kapanabilen inhibitör kapı görevi görür (51). Direkt yolak, SNpr gibi GABAerjik bazal gangliyonların çıktı çekirdeklerini ateşleyerek, talamokortikal ve beyin sapı döngüsü üzerinde disinhibisyon yaparak hareketi artırırken, indirekt yolak subtalamik çekirdek aracılı uyarılma ile GPi/SNpr ateşlemesini artırır ve hareketi baskılar (52).



Şekil 2.2. Bazal gangliyon döngüsü (Glu: glutamat, DA: dopamin, GABA: Gama aminobutirik asit, Kaudat: kaudat çekirdek, GPe: globus pallidus externa, GPi: globus pallidus interna, STN: subtalamik çekirdek, SNpr: substantia nigra pars reticulata, SNpc: substantia nigra pars compacta kısaltması olarak kullanılmıştır.)

2.2.3. Bazal Gangliyonlar ile İlişkili Hareket Bozuklukları

Bazal gangliyonların motor hareketleri sağlayan temel döngüsü; direkt ya da indirekt yolağa gelen uyarıların artması ya da azalması ile hareketlerde artış ya da kısıtlılığa neden olmaktadır. Hareketlerde anomaliye neden olan bazal gangliyonlar bozukluklarına, hareket bozuklukları denir. En sık görülen bazal gangliyon bozukluklarından biri; hiperkinetik hareket bozukluklarıdır ve kontrol edilemeyen, hızlı ve aşırı motor hareketler ile karakterizedir. Tremor, hiperkinetik hareketlerin en yaygın görülenidir ve bir diğeri de Yunanca dans anlamına gelen bir kelimeden türetilen Kore'dir. Tremor; ellerde, baş, ses veya vücudun diğer bölgelerinde kontrol edilemeyen titremelerdir. Kore ise, kafa, boyun, yüz ve bacaklarda hızlı hareketler

şeklinde görülür ve normal hareketlerin arasına girer. Koreye sıklıkla yavaş, burkulma-kıvrılma şeklinde görülen atetoz eşlik eder.

Bazal gangliyon bozukluklarında sık görülen bir diğer durum ise hipokinetik bozukluklardır. Akinezi, bradikinezi ve rijidite en sık görülen özelliklerdir. Parkinsonizm, hareketlerde yavaşlama, artmış kas tonusu, tremor ve spontan hareketlerde azlık ile karakterize, hipokinetik bozuklukların en bilinenidir. Parkinson hastalarının harekete başlamada zorluk çektiği gözlenmiştir. Bu durum, bazal gangliyonların, her bir motor eylemi sıraya dizerek, düzgün bir seri hareket oluşmasını sağlamada ve öğrenilmiş motor hareketlerin otomatik gerçekleştirilmesinde rol aldığı hipotezini ortaya çıkarmıştır (53).

2.3. Hipokampus: Anatomi ve Fizyolojisi

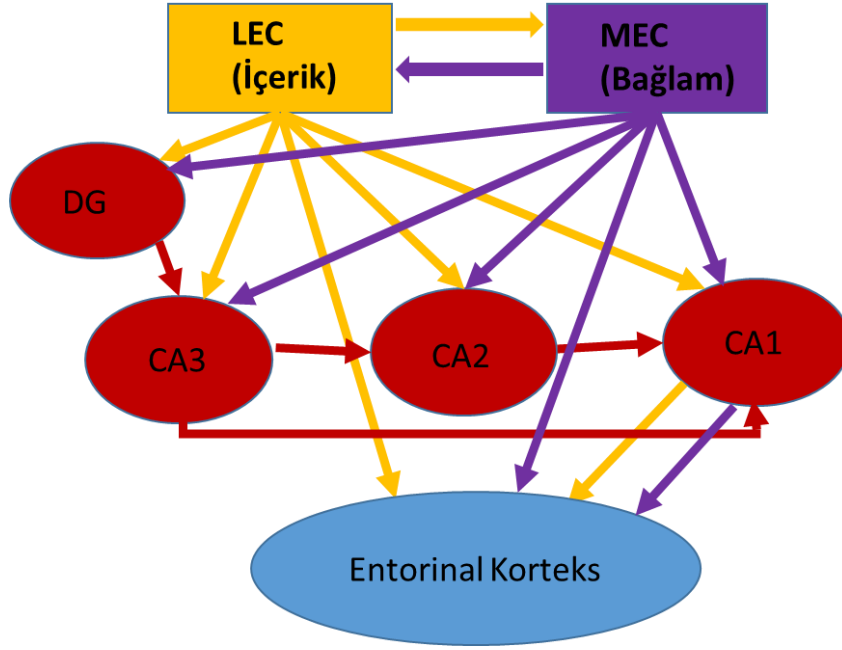
Hipokampus, beyinde en çok çalışmış yapılardan birisidir. 1957'de epilepsi tedavisi sırasında hipokampus ve yakınındaki temporal lobun cerrahi olarak çıkarılması sonucunda yeni, deklaratif hafıza kaybı yaşayan bir hasta ile birlikte hipokampüse olan ilgi artmıştır (54). Hastanın, ameliyattan önceki hafızasını koruyolmasına rağmen daha fazla yeni hatıra üretmediği, non-deklaratif hafızasının normal iken deklaratif hafızasının bozulmuş olduğu gözlenmiştir (54). Böylece; hipokampusün bilgilerin kısa dönem bellekten, uzun dönem belleğe aktarılmasında rol oynadığı ve hafızanın hücresel temelini uzun dönem potansiyasyon (LTP) ile ilişkili olduğu bulunmuştur (54, 55). Hipokampüste, konum (*place*) hücreleri, kafa yön (*head direction*) hücreleri ve ızgara (*grid*) hücrelerinin keşfi ile birlikte de hipokampusün bir deneyime ait pek çok duyusal ve bilişsel parçayı birleştirip, zaman-uzaysal çerçeveyi çizerek hafıza oluşumunda rol aldığı anlaşılmıştır (55-57).

2.3.1. Hipokampusün Anatomik Bağlantıları

Hipokampus, mediyal temporal bölgenin (MTL) içine uzanmış bir yapıdır. Şekil olarak denizatına (*genus hippocampus*) benzediği için hipokampus adını almıştır. Hipokampus; neokorteksin hemen altında uzanan geniş bir bölgedir ve dentat girus (DG) ve cornu ammonis (CA) yapılarından meydana gelir. CA bölgesi de histolojik olarak CA1, CA2 ve CA3 olmak üzere üç gruba ayrılır. Hipokampal

anatomik bağlantılar üçlü sinaptik halka olarak adlandırılır (55). Entorinal korteks, hipokampüsün en önemli kortikal girdi kaynağıdır. Entorinal korteksin en yoğun projekte olduğu bölge DG'dir. Nöronlar, DG'de ilk sinapsı yapıldıktan sonra, DG'den *mossy* fiber yolağı aracılığıyla CA3 bölgesine projekte olurlar. CA3 bölgesinden de *Schaffer* yolağı aracılı CA2 ve CA1 bölgesine projekte olurlar. CA1 bölgesinden ise tekrar entorinal kortekse projekte olarak halkayı tamamlarlar. Bu üçlü sinaptik döngüde (Şekil 2.2.) CA3 aksonları, CA1 bölgesine projeksiyona ek olarak, CA3 bölgesindeki diğer nöronlara da yan dallar gönderirler (55). Tekrar eden yan yolların bulunması CA3 bölgesinin otoasosiyatif hafıza sistemi olabileceğine dair teorilerin üretilmesine neden olmuştur (58). Son çalışmalarda; CA2 bölgesinin hipokampal döngüde rol aldığı ve deklaratif öğrenme gibi süreçlerde gerekli olduğu ayrıca, CA2 bölgesinde yoğun olarak bulunan RGS-14 geninin hafızayı baskıladığı bulunmuştur (59, 60).

Hipokampüs, kortikal girdilerini temel olarak mediyal entorinal korteks (MEC) ve lateral entorinal korteks (LEC) olmak üzere iki bölgeden oluşan entorinal korteksten alır (Şekil 2.2). MEC, entorinal korteksin en kaudal kısmıdır ve uzaysal hafıza ile ilişkilidir. LEC ise, nesnelere tanıma gibi bölgeler ile ilişkilidir (61, 62). Her iki bölgede prefrontal korteksten ve olfaktör korteksten girdi alırlar ve hem birbirlerine, hem de DG ve CA3 bölgelerine projeksiyon gönderirler. Böylece DG ve CA3 bu bölgelerden gelen bilgileri birleştirir.



Şekil 2.3. Hipokampüsün sinaptik organizasyonu (LEC: lateral entorinal korteks, MEC: medial entorinal korteks, DG: dentat girus, CA: cornu ammonis kısaltması olarak kullanılmıştır).

Hipokampüsün içinde oluşan sinaptik *remodelling* ve LTP gibi yapısal ve fonksiyonel değişiklikler uzun dönem hafıza sürecinde anahtar rol almaktadır. Yetişkinlerde hipokampüs nöronlarının *de novo* sentez ürünleri, hafıza ve plastisitede önemli yer tutmaktadır ve hafıza sürecinin devamlılığı için de gerekli etkenlerden biridir (63). Bilginin esnekçe kullanılması için gerekli olan pek çok çevresel ipuçları, zaman-uzaysal ilişkinin kurulması sırasında hipokampüste bir araya getirilir (63).

2.3.2. Hipokampüsün Fizyolojik Fonksiyonu

Hafızanın oluşturulmasında üç ana aşama vardır. Başlangıç aşamasında potansiyel hafızanın izleri bilgi olarak kodlanır ve içinde bulunulan çevre ile beyinde oluşturulan çevre bilgileri bir araya getirilir ve ikinci aşamada kodlanan bilgiler konsolidasyon süreci ile kalıcı hale getirilerek saklanır. Hafıza sürecinin son aşaması; kodlanan ve saklanan hafızadaki bilgilere ulaşabilme sürecini kapsar ve geri çağırma ya da yeniden toplama olarak adlandırılır. Geri çağırma işlemi, bir aktivite veya bir işlem sürecinde, çevresel ipuçlarına cevap olarak meydana gelir; yeni beceriler edinmede ya da daha önceki bilgileri düzeltmede yardımcı bir işlemdir.

Bellek; kısa dönem ve uzun dönem olmak üzere ikiye ayrılır. Kısa dönem bellek belirli bir kapasiteye sahiptir ve birkaç saniye ile dakikalar arasında değişir. Uzun dönem bellek ise sınırsız kabul edilir ve deklaratif (eksplicit), non-deklaratif (implicit) olmak üzere ikiye ayrılır (64). Deklaratif bellek; mekan, eşya ve insan ile bunların ne anlama geldiğini kapsayan “ne biliyorum?” sorusuna cevap veren yapıdır. Non-deklaratif bellek ise; motor yetenek ve alışkanlıkları içeren “nasıl?” sorusuna cevap verir. Deklaratif bellek ikiye ayrılır: anısal “epizodik” bellek yaşanmış ve uzaysal bağlamı (*context*) hatırlamaya bağlı kişisel deneyimleri içerirken, anlamsal “semantik” bellek kişinin deneyimlerinden bağımsız öğrendiği genel bilgi, kavram ve olguları içerir (65).

Hipokampüste bazı nöronların, belirli bir test platformunda, belirli bir yöne dönük olarak bırakılan sıçanda, direkt olarak ve maksimum cevap verdiği gözlenmiş ve yapılan deney sonucunda bu nöronların; bilişsel, uzaysal veya çevresel harita sağladığı teorisi geliştirilmiştir (61, 66). Bilişselliğin nöronal temeli, önce konum hücrelerinin keşfi ile daha sonra da ızgara hücrelerinin bulunması ile anlaşılmaya başlanmıştır (57, 61). Beyinin içinde konumumuzu ve yönümüzü belirleyen bir “içsel GPS (küresel konumlama sistemi)” olduğu gösterilmiş ve bu sayede kendimizi uzaysal olarak nasıl konumlandığımız anlaşılmaya başlanmıştır (67).

İçsel GPS ile deklaratif hafıza fonksiyonu arasındaki ilişki üzerine çalışmalar yapılmıştır. Hipokampüsün nöronal hafıza sisteminin merkezi olduğu, organizmanın deneyimlerinin yer aldığı ve birbiri ile ilişkili nesne ve olaylara uzaysal bir çerçeve sağladığı teorisi geliştirilmiştir (68). Ayrıca; hipokampüsün içinde lokal ve takson olmak üzere iki sistem olduğu; lokal sistemin bilişsel haritayı yarattığı ve bulunduğu yeri değerlendirme, geliştirme imkanı sağlayan esnek, hızlıca değişebilen ve belirli bağlama özel bir sistem olduğu, takson sisteminin ise striatum, neokorteks gibi alışkanlıklarla ilişkili öğrendikçe artan, esnek olmayan, stereotipik ve farklı bağlamlara adapte olamayan bir sistem olduğuna dair bilişsel harita teorisi geliştirilmiştir (68).

Hipokampüs ile MEC arası bağlantılar, bulunulan konumun algılaması ile ilişkilidir. İçerdiği ızgara hücreleri, kafa yön hücreleri, hız hücreleri, teta hücreleri ve sınır (border) hücreleri, uzay ve hareket ilişkili sinyaller taşır (69, 70). MEC, içerdiği konum hücreleri ile birlikte yol birleştirme de rol alan yapılardan biridir (71). MEC,

çevresel ipuçlarından bağımsız olarak, içsel konum haritalarıyla, bilişsel olarak kendini dış dünyaya adapte edebilir (61).

LEC; MEC'ten farklı olarak, uzaysal hafızanın temel bileşenlerinden biridir. LEC, ızgara (grid) hücreleri, kafa yön (head direction) ya da güçlü teta hücreleri içermez. LEC'in fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bir nesneyi incelerken, MEC'e göre daha çok ateşleme yaptığı gözlenmiştir. LEC, genel olarak "bu nedir?" sorusunun cevabını içeren duyuşsal süreç, dış dünyadaki nesnelere ait bilginin kodlanması ve bulunulan çevreye ait uzaysal bilgiler ile ilişkili iken (61); MEC, yolak birleştirmenin sayısal döngüsü ile ilişkili olarak kabul edilir.

MEC ile LEC'den gelen bilgiler birleştirilerek konum hücreleri ile birlikte hafızanın oluşturulmasında rol oynarlar. Farklı çevrelerde farklı alt tipteki konum hücrelerinin aktif olduğu yeniden haritalandırma olgusu ve içeriğe bağlı (content) öğrenme hipokampal plastisitenin altında yatan potansiyel mekanizma olabilir (61). Bir çevredeki aktif konum hücreleri, belirli bir bağlam içerisinde oluşan, deneyimlenen olay ve nesnelere organize edebilir. Ayrıca; farklı alt tipteki konum hücreleri, farklı bağlamda çakışma potansiyeli olan nesne ve olayları birbirinden ayırabilir. Böylece, bellekte daha önce yer alan izlerin birbirinden ayrılmasını sağlayarak, geri çağırma işlemi sırasındaki bölünmeleri azaltır (61). Izgara hücreleri ise, konum hücreleri gibi yeniden haritalandırılmamaktadır. Daha ziyade aynı uzaysal ateşleme örneğini korumaktadırlar. Bu farklılık konum hücreleri ile ızgara hücreleri arasındaki en önemli fonksiyonel farktır (61, 72).

2.4. Parkinson Hastalığının Patofizyolojisi

PH; rijidite, tremor ve postural refleks kaybını da içeren bradikinetik bir sendromdur. SNpc'da nöromelanin içeren dopaminerjik nöron kaybı PH'nin pek çok motor semptomlarının temel nedeni olarak kabul edilmektedir. Bunun dışında, daha az oranda, çoğunluğu katekolaminerjik olmak üzere diğer nöronlar ve sitoplazmik Lewy cisimciği bulunan nöronlarda, hastalığın motor semptomlarının oluşmasında etken olmaktadır (73). Her ne kadar ailesel genetik geçişli PH nadir görülür ve olguların büyük bir çoğunluğunun etiyolojisi bilinmemektedir.

PH hastalarında hem santral sinir sistemi (SSS) hem de periferik sinir sistemi (PSS)'nin etkilendiği görülmektedir. PSS; otonomik (sempatik, parasempatik, enterik)

ve somatik (duyu ve motor) olmak üzere 2 gruba ayrılır. PH'de duyu ve motor nöronlarda Lewy patolojisi ya da nörodejenerasyon görülmezken, otonomik sinir sistemi (OSS) nöronlarında Lewy patolojisi ve fonksiyon bozukluğu meydana geldiği gösterilmiştir (73, 74). PH'de, Lewy cisimciklerinin N. Vagus'un dorsal motor çekirdeklerinin (DMV) pregangliyonik parasempatik nöronlarında bulunduğu gösterilmiştir (75). Bunun yanında, Lewy patolojisi ve dopaminerjik nöron kaybı, enterik sinir sistemi (ESS)'de de gösterilmiştir. PH'nin erken dönem motor dışı bulgularından olan gastrik hareketin azalması ve kabızlıktan bu patolojinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (76, 77). PH, erken ve orta-dönem patolojik belirtileri ve nöronal kayıp esas olarak beyin sapında görülmektedir (76). PH'nin ilerleyen dönemlerinde ise Lewy patolojisi lateral hipokampus ve talamusun intralaminar çekirdeğinde, serebral kortekse ve amigdalaya yayıldığı görülür (78)

SNpc, lokus sereleus, rafe çekirdeği, enterik dopaminerjik nöronlar ve sempatik postgangliyonik nöronların herbiri monoamin nörotransmitterleri sentezler ve artan sitozolik monoaminler nöronlara toksik etki gösterir bu da belirli nöronların ölümünün altında yatan sebep olabilir (76). SNpc ve lokus sereleus nöronları nöromelanin içerir ve PH'de yüksek oranda bu nöronların kaybı görülür. Ancak, bu hipoteze karşı öne sürülen iki tartışma vardır. Birincisi; var olan patoloji ve kaybolan nöronların monoaminleri kullanmadığına dairdir ki bu duruma örnek; DMV, pedinkülopontin çekirdek, Meynert bazal çekirdeği ve ESS yapıları gösterilebilir. İkincisi ise dopaminin veya noradrenalinin hastalığın ilerlemesinde toksik etkili olması beklenirken, dopamin prekürsörü olan L-DOPA kullanımının; hastalığın ilerleyişini artırmadığına dair var olan gözlemlerdir (73).

SNpc, lokus sereleus, rafe çekirdeği, pedinkülopontin çekirdek, DMV ve Meynert bazal çekirdek nöron aksonları ya ince bir miyelin tabakası içerir ya da miyelinsizdir ve aksonlardaki pek çok noktadan nörotransmitter salıverilmesi gerçekleştirirler. Nörotransmitter salıverilen terminallerde her ne kadar artmış mitokondriyel oksidatif stres gözlenmese de; yoğun sinir ucu sonlanmalarının bulunması, hücre gövdesine metabolik ve proteostatik yük oluşturmaktadır. Proteostatik yük, sinaptik aşırımı artırarak mitokondride yanlış katlanmaların artmasına katkı sağlayabilir. Bu durum presinaptik veziküller ekzositozun

düzenleyicisi olan a-sin'in yanlış katlanmasında rol oynayan mekanizmalardan biri olabilir (79).

Sinaptik aşırıya ve aktiviteye bağlı artan metabolik yük, mitokondriyel solunum depolarını tüketir. Sürekli mitokondriyel oksidatif stres, mitokondriyel DNA mutasyonlarının birikimine ve mitokondriyel kompleks I fonksiyonunda bozulmaya neden olur. Kompleks I'de var olan bozukluğa bağlı oksidatif fosforilasyonun yetersizliği, nöronların duyarlılığını ve eksitotoksiteyi artırır (80). Mitokondriyel bozukluk PH'de oldukça yaygın görülmektedir (81). PH patogeneğinde, eksitotoksiste ortaya atılan ilk teorilerden biridir (76).

Nöronlar, diğer hücre tiplerinden farklı özelliklere sahiptirler. Nöronlar için en ayırt edici özellik uyarılabilir olmalarıdır. Nöronlar gelen elektriksel uyarıyı alırlar ve kimyasal uyarılara çevirerek diğer nöronlara iletirler. Bu süreçteki her bir işlem enerji harcanarak gerçekleştirilir. Nöronların fizyolojik fenotipleri geniş bir aralıkta değişir. Bazı nöronlar sürekli sessiz durumdayken, bazı nöronlar ise “*chatter box*” olarak adlandırılan sürekli ateşleme durumundadırlar (76). SNpc, lokus sereleus, rafe çekirdeği, pedinkülopontin çekirdek, DMV ve Meynert bazal çekirdek nöronları sürekli ateşleme durumundadırlar (76). Nöronların sürekli uyarılabilme özelliği, hücreler için yeni bir stres kaynağı oluşturmaktadır. Ateşleme sırasında gerekli olan en önemli iyonlardan biri kalsiyumdur. Kalsiyum aktif transport ile taşınır ve oldukça fazla enerji tüketir. Hücre membranı depolarize olduğu zaman, voltaj-bağımlı N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, magnezyum bloğundan kurtulur ve reseptörün devamlı uyarılmasına izin verir. Eksitator sinaptik iletim sırasında nöronların NMDA reseptörleri magnezyum bloğundan kurtulmuş durumdadırlar ve sodyum ile kalsiyum girişine izin veren görece depolarize membran potansiyeline sahiptirler. NMDA reseptör aktivasyonunun ardından mitokondride kalsiyum birikmesi ve mitokondriyel depolarizasyon eksitotoksik hücre ölümünün önemli bir bileşenidir. Hücre içi kalsiyum artışı NOS aktivasyonuna neden olur ve NO ile süperoksit üretimini artırır (82). Sonuçta peroksinitrit miktarı artar. Peroksinitrit, proteinleri, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonuna neden olur ve tirozin nitrasyonuna aracılık eder (83). Tirozin nitrasyonu pek çok enzimin aktivitesinin bozulmasına neden olabilir ve pek çok büyüme faktörü tarafından kullanılan tirozin kinazı da inaktive edebilir (80). Bunun dışında; glikoliz veya oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu ile indüklenen kısmi

nöronal depolarizasyon NMDA reseptörünün aktivasyonuna ve ekstraselüler glutamat artışına sebep olmaksızın hücre ölümüne neden olur (80, 84).

Lizozom ve otofajik vakuollerin düzenlenmesi kalsiyum sinyaline bağımlıdır ve reaktif oksijen türleri (ROS) otofajik yıkım için potansiyel hedeflerdir. Otofajik vakuoller, hücre içi bileşenleri lizozoma taşıyarak, yıkım mekanizmalarında anahtar rol oynarlar. PH ile ilişkili pek çok gen, lizozomal fonksiyonu da etkiler (85). Lizozomal aktiviteyi artıran proteostatik yük, nöronlarda bazal oksidatif stresi artırarak, dejenerasyonun ilerlemesine neden olabilir (76).

PH patogenezinin mekanizmasına dair bir diğer hipotez ise *prion* hipotezidir (86). Prion hipotezi; alıcı nöronların etrafına transfer edilmiş bir donörün yayılma yoluyla donör nörondan, alıcı nörona transferi olarak tanımlanabilir (87). PH hastasının beynine sağlıklı bir nöronal greft nakilinin ardından Lewy patolojisinin sağlıklı dokuda da gözlenmesi ve agregatların nakil dokusuna geçmesi *prion* benzeri bir mekanizmayı çağrıştırmaktadır (88). Fareye enjekte edilen insan a-sin'in nöronlar arasında geçiş yaptığı ve striatuma nakil edilmiş *naive* greft nöronlarında insan a-sin bulunduğu gözlenmiştir (86).

A-sin'in ekstraselüler aralıktan alım mekanizmasına endositozun da dahil olduğuna dair öneriler de mevcuttur (89-91). Ekstraselüler aralıkta bulunan a-sin fibrilleri nöronlarca alınır ve bu fibriller Lewy patolojisinin temelini oluşturur. Bu fibrillerin bazı alt tipleri daha sonra salıverilir ve patoloji yayılır. Böylece, a-sin fibrilli *prion* benzeri yayılım gösterir. Bu hipotezi destekleyen sonuçlar; PH'li hastaların beyinlerine dopaminerjik nöronal greft ya da transplantı yapıldığında bu dokularda da Lewy patolojisinin görülmesi ve a-sin fibrillerinin *seeding* yöntemi ile Lewy benzeri patoloji oluşturarak yayılmasıdır (90, 92).

2.5. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri

PH'nin altında yatan mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Nadir görülen genetik PH patolojisinin daha detaylı araştırılabilmesi, idiopatik PH etiyojisinin anlaşılabilmesi, tedavi mekanizmalarının daha detaylı incelenebilmesi ve geliştirilebilmesi, semptomların azaltılması ya da yok edilmesi için yeni tedavi yaklaşımlarının test edilebilmesi ve hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılabilmesi ya da

durdurulabilmesi için PH hayvan modellerinin varlığı oldukça önemlidir. Hayvan modelleri genel olarak nörotoksin/farmakolojik hayvan modelleri ve genetik hayvan modelleri olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. PH'nin toksin ve genetik hayvan modelleri

Model	Mekanizma	Uygulama Şekli	Nigrostriatal Hasar	ilerleyiciliği	LC Benzeri İnküzyon
6-OHDA	Kompleks 1 inhibisyonu	i.c. enjeksiyon	+++	+/-	-
MPTP	Kompleks 1 inhibisyonu	Sistemaitik enjeksiyon	++	+	-
Parakuat	Kompleks 1 inhibisyonu, ROS	Sistemaitik enjeksiyon	++	+	+
Rotenon	Kompleks 1 inhibisyonu, ROS	Sistemaitik veya i.c. enjeksiyon	++	+	+
Maneb	Glutamat ve DA alım yetersizliği	Sistemaitik enjeksiyon	+	+	-
A-sin	LC benzeri agregat	Aşırı ifade	+	+	++
Parkin	Ubikutin E3 ligaz aktivite	<i>Knock-out</i>	+/-	+/-	+/-
PINK1	Mitokondriyal yetersizlik	<i>Knock-out</i>	+/-	+/-	+/-
LRRK2	Ezmatik aktivite	<i>Knock-out</i>	+/-	+/-	+/-

6-OHDA: 6-hidroksidopamin, i.c. İntracerebral, MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin; ROS: serbest oksijen radikalleri, a-sin: alfa-sinüklein, LC: Lewy cisimcikleri, PINK: PTEN ile indüklenmiş kinaz, LRRK: Lösün zengin tekrarlayan kinaz kısaltma olarak kullanılmıştır.

2.5.1. Nörotoksin/Farmakolojik Parkinson Hayvan Modelleri

6-OHDA (6-hidroksidopamin): 6-OHDA katekolaminlerin yapısal analogudur ve 1960'lerden beri özellikle de sıçanlarda en sık kullanılan PH modelidir ve kan beyin engelini geçemediği için stereotaksik olarak SNpc, orta ön beyin demeti (*medial forebrain bundle*; MFB) ya da striatuma enjeksiyon yapmak gerekmektedir. 6-OHDA; dopamin ve noradrenalin membran taşıyıcısı aracılığıyla katekolaminerjik nöronların içinde birikir ve daha sonrasında mitokondriyal kompleks I inhibisyonu yapar (93). 6-OHDA, SNpc ya da MFB'a unilateral enjeksiyon yapıldığı zaman hem çok yoğun hem de çok hızlı dopaminerjik nöron hasarı yapar. Böylece unilateral motor bozukluğa neden olur ve bu bozukluk davranışsal olarak farmakolojik ajanlarla (amfetamin, apomorfin vs) test edilebilir (94). 6-OHDA'nın bilateral enjeksiyonu ile anksiyete, depresyon ve görme bozukluğu gibi motor-dışı semptomlarda

görülebilmekte ve değerlendirilebilmektedir (95). 6-OHDA enjeksiyonuna bağlı kısmi ya da yoğun striatal dopaminerjik hasara bağlı kortikostriatal sinaptik plastisitenin değiştiği ve bazal gangliyonlarda glutamaterjik aşırının arttığı gözlenmiştir (95). MFB'a 6-OHDA enjeksiyonunun noradrenalin, serotonin ve dopaminerjik nöron kaybına neden olarak anksiyete ve depresyon benzeri davranış ile anhedoniye oldukça artırdığı gözlenmiştir (96). Ancak, 6-OHDA modelinin çeşitli kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Lewy cisimleri oluşumu gözlenmez ve bir anda nöron ölümüne neden olarak hastalığın ilerleyici nitelikteki doğal seyrini taklit etmez (95).

MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin): MPTP'nin toksik etkisi ilk olarak 1980'lerde keşfedilmiştir. MPTP ile kontamine olmuş sentetik eroini kullanan bir grup bağımlıda aniden Parkinson benzeri semptomların görülmesi üzerine keşfedilmiştir (97). MPTP sistemik uygulandığında da lipofilik özelliği sayesinde kan beyin bariyerini geçerek, mitokondriyal kompleks I inhibisyonu yapar. MPTP'nin kendisi toksik olmamasına rağmen metabolizma ürünleri; 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum (MPDP⁺) ve özellikle de 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP⁺) oldukça toksiktir. MPP⁺'i dopamin taşıyıcısı (DAT), dopaminerjik nöronlara taşıyarak sitoplazma içinde, veziküler monoamin taşıyıcısı (VMAT) ise sinaptik veziküllere taşıyarak veziküllerde birikmesine neden olur. MPP⁺ daha sonra mitokondriyal membran potansiyeli aracılığıyla organelin içine girerek kompleks I inhibisyonuna neden olur (98). MPTP toksisitesi; mitokondriyal hasar ve buna bağlı *down-stream* yolağı etkileyerek apoptotik düzenleyici Bax ve Jun-N-terminal (JNK) kinaz up-regülasyonunu, sitokrom c salıverilmesini, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu kapsayan apoptotik nörodejeneratif süreci içerir. Aynı zamanda N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü aracılı eksitotoksiste ve nöroinflamasyonu da içeren bir süreçtir (99). MPTP, PH'nin hemen hemen bütün semptomlarını maymunlarda ve farelerde oldukça gerçeğe yakın taklit edebilmektedir ki bu durum, MPTP modelinin avantajlarını oluşturmaktadır. Ancak, aynı etkiler sıçanlarda görülmemiştir. Bu durum sıçanların bu toksine daha dirençli olduğunu göstermektedir (100).

Rotenon: Rotenoid nörotoksin ailesine ait herbisit, pestisit ve pisisittir. *Pachyrhizus erosus* gibi bazı tropik bitki türlerinde doğal olarak bulunabilir. Lipofilik özellikte olduğu için kan beyin engelini aşabilir ve nöronların içine girdikten sonra mitokondriyal kompleks I'i bloke eder, ROS artışına sebep olur, proteazom

aktivitesini inhibe eder, dopamin ve glutasyon seviyelerini azaltarak oksidatif hasara neden olur (95). Rotenon modeli, SNpc dopaminerjik nöron kaybı, nigrostriatal dopaminerjik hasar, davranışsal değişiklikler, inflamasyon, a-sin ve ubikutin içeren Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyon, oksidatif stres ve mide-barsak sistemi rahatsızlıkları gibi PH'de görülen semptomların hemen hemen hepsini taklit edebilir (101). Ancak rotenon, deney hayvanlarında yüksek oranda ölüme sebep olmaktadır. Sonuçların tekrar edilmesi oldukça zordur ve dopaminerjik hasarın boyutu deneyler arasında değişkenlik göstermektedir (95).

Parakuat: MPP⁺'nin yapısal analogu olan 1,1-dimetil-4,4'-bipiridinyum diklorit içeren bir pestisit ve herbisitir. Kan beyin engelini geçerek hücre içine girer ve mitokondri kompleks 1 inhibisyonu yapar. Ayrıca, yüksek doz parakuat, dopaminerjik nöronlarda DAT aracılığıyla birikir (102). Parakuatın indirgenmiş hali O₂ ile reaksiyona girerek ROS türlerini oluşturur ve glutasyonun geri dönüşümünü bozar böylece nöronal hasar ve ölüme neden olan oksidatif stresi başlatır (95). Ayrıca; JNK, c-Jun gibi enzimlerin fosforilasyonu, kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptoza neden olur (99). Kronik, sistemik parakuat uygulanması, SNpc'de yavaş ilerleyen hasara neden olarak, PH'nin erken, presemptomatik, dönem dopaminerjik aşırım hasarını taklit eder (103).

Maneb: Mn-etilen-1,2-bisditiyokarbamat içeren bir fungusittir. Lipofilik yapısı sayesinde kan beyin engelini geçerek glutamat taşıyıcısını inhibe eder ve dopamin alımını ve salıverilmesini bozar (104). Kronik, sistemik Maneb uygulanması, SNpc nöron hasarına ve striatal dopaminerjik deafferentasyona neden olurken, dopamin salıverilmesi görece korunur (95, 105).

Parakuat ya da Maneb ile oluşturulan PH modelinin bir avantajı a-sin içeren Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyonlara sebep olmalarıdır. Ancak, bu modellerin tekrar edilebilirliği düşüktür ve dopaminerjik hücre ölüm, striatal dopaminerjik kayıp ve davranış konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (106).

PH modeli oluşturmak için kullanılan toksin modelleri dışında bir de farmakolojik ajan modelleri vardır.

Haloperidol: Haloperidol, indirekt ve direkt yolları oluşturan orta boy dikensi çıkıntılı nöronlardaki dopamin D2 ve daha az oranda da D1 reseptörünü antagonize ederek etki gösterir. Haloperidol enjeksiyonundan kısa bir süre sonra

striatal dopamin aşırımının blokajına bağlı, bazal gangliyonların döngüsü içinde *down-stream* ateşlemede anormali meydana gelir ve kaslarda rijidite ve katelepsi gibi semptomların görülmesi ile sonuçlanır. Haloperidol modeli, mGlu4, mGlu7 agonistleri, adenozin A_{2A}/A₁ antagonistleri gibi yeni non-dopaminerjik ajanların potansiyel semptomatik etkisini değerlendirmek için iyi bir model olsa da, haloperidolün etkisinin geçici ve zayıf olması, uzun süreli kullanılamaması, PH ile ilişkili karakteristik patolojiyi oluşturamaması modelin kısıtlılıklarıdır (107).

Rezerpin: Veziküler monoamin transporter 2 (VMAT2)'nin irreversible inhibitörüdür. Dopaminin veziküler alımının inhibe edilmesi, nörotoksik dopamin oksidasyon ürünlerinin birikimi ile sonuçlanır. Monoamin oksidaz aracılı dopaminin enzimatik yıkım ürünleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olur ve artan ROS miktarı oksidatif hasar meydana getirir (108). Rezerpinin motor aktivite için gerekli olan monoaminlerden dopamin miktarında azalmaya neden olması, PH için uygun bir farmakolojik hayvan modeli oluşturmaktadır.

0,1 mg/kg gibi düşük dozlarda tekrar eden rezerpin uygulanması, sinir terminallerinde hücre içi veziküler monoamin depolanmasını engelleyerek; lokomotor aktivitede azalma, rijidite gibi motor bulguların görülmesine neden olur (108). Her ne kadar rezerpin modeli SNpc'de ve striatumda dopamin miktarını azaltma gibi PH'nin temel biyokimyasal bileşenlerini taklit etse ve hastalığın klinik bulgularından akinezi, rijiditeyi indüklese de nigral dopaminerjik nöron hasarına neden olmaması, modelin kısıtlılıklarındandır (107).

2.5.2. Genetik Parkinson Hayvan Modelleri

Parkinson hastalığı çok yaygın görülüyor olmasına rağmen ancak çok küçük bir kısmı (%10) otozomal dominant ya da çekinik genetik mutasyona bağlı olarak görülmektedir (109). 15 adet gen ve 25 adet genetik risk faktörü, "*PARK*" ve "*non-PARK*" olarak tanımlanmıştır. En yaygın olanları; SNCA (a-sin, PARK1 ve 4), PRKN (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligaz, PARK2), PINK1 (PTEN-indüklenmiş varsayılan kinaz 1, PARK6), DJ-1 (PARK7) ve LRRK2 (lösin açısından zengin tekrar kinaz 2, PARK8)'dir.

Parkin: Bir ubiquitin E3 ligazdır ve enzimatik aktivite kaybının hem ailesel hem de sporadik PH'de rol oynadığı düşünülmektedir. İlk olarak PRKN gen mutasyonu, Japon PH hastalarında keşfedilmiştir (110). Otozomal çekinik ve erken başlangıçlı-PH genel olarak ekzon 2, 3 ve 8'de silinme; ekzon 2-4 ve 9'da dublikasyon olarak görülür (111). Ekzon 3 olmadığında striatal glutamat seviyesinin arttığı, hafif mitokondriyal bozukluğun görüldüğü, antioksidan seviyesinin azaldığı ve oksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir (95). Bakteriye yapay kromozom (BAC) aracılı dopaminerjik nöronlarda C-terminali kesilmiş insan mutant parkin ifade ederek SNpc dopaminerjik nöron hasarı ve striatal dopaminerjik terminallerde azalmaya neden olan, geç başlangıçlı ve ilerleyici motor hasar görülen, bir transgenik fare modeli geliştirilmiştir (112).

PINK1: Parkin ile etkileşime girerek mitokondriyal depolarizasyon sonucu otofaji indüksiyonu yapar ve böylece, hücreleri mitokondriyal bozukluktan korur (113). PINK1 gen mutasyonu ilk olarak erken başlangıçlı, otozomal çekinik PH hastası olan İtalyan ailelerde tanımlanmıştır (114). PINK1 modelleri, nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda fonksiyonel bozulmaya neden olmaktadır (95).

DJ1: DJ1 geninin transkripsiyonel düzenleyici, oksidatif stres sensörü, proteaz ve mitokondriyal düzenleyici gibi pek çok fonksiyonu vardır (115). *Missense* DJ1 mutasyonunun erken başlangıçlı, otozomal çekinik PH ile ilişkili olduğu ilk olarak Alman ve İtalyan ailelerde bulunmuştur (116). DJ1 fareler SNpc dopaminerjik nöron kaybı göstermezken, striatal dopamin salıverilmesinde azalma, D2 otoreseptör uyarılmasına cevapsızlık, lokomotor aktivitede azalma ve kortikostriatal sinaptik plastisitede değişiklik görülür (117).

LRRK2: LRRK2 proteini; bir kinaz, bir RAS ve bir GTPaz olmak üzere pek çok bölgeye ve fonksiyona sahiptir. Otozomal dominant ve geç başlangıçlı PH'de, LRRK2 geninde *missense* ve nokta mutasyon bulunmuştur (95). Ayrıca, idiyopatik PH'de de etkili olduğu düşünülmektedir (118). En yaygın görülen mutasyon kinaz (G2019S) veya GTPaz (R1441C/G) bölgelerinde görülür ve bazen hafif dopaminerjik hasara, dopamin salıverilmesinde ve geri alımında değişikliğe neden olur (118, 119). Mutant LRRK2 ifade eden BAC transgenik fare modeli geliştirilmiştir ve bu modelde yaşa bağlı, ilerleyici motor bozukluk ve striatumda dopamin salıverilmesinde hafif

azalma gözlenirken, nigrostriatal hasar gözlenmemiştir. LRRK2 fare modeli, PH ile ilgili yalnızca hafif dopaminerjik eksiklik ya da diğer patolojik belirtileri gösterir (95).

Sonik *hedgehog* (*shh*), çekirdek reseptörü ilişkili protein-1 (Nurr1), hipofiz homeobox 3 (Pitx3), *engrailed* 1 (EN) gibi transkripsiyon faktörlerinin eksikliğinin de dopaminerjik nöronların hayatta kalmasında ve gelişmesinde rolü olduğu, bu nedenle bu faktörlerin eksikliği ile PH modeli oluşturulabileceği gösterilmiştir (120-122).

Genetik PH modelleri hastalığın patolojisini aydınlatmaya dair mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, agregat oluşumu, gliozis gibi bir takım bilgiler veriyor olsa da dopaminerjik nöron hasarına neden olmaması ve modellerin temelinin insanda gerçekleşmeyen bir şekilde gen aşırı ifadesine ya da *knock out* olmasına dayanması transgenik hayvan modellerinin kısıtlılıklarındandır.

2.5.3 A-sin ve A-sin ile Oluşturulan Parkinson Hayvan Modelleri

A-sin ilk olarak *Torpedo Californica* türünün elektrik organından elde edilen kolinerjik veziküler sinapsların saflaştırılarak sinüklein kodlayan cDNA'nın izole edilmesi ile keşfedilmiştir (123). A-sin 14.46 kDa moleküler ağırlığında, beyinde yüksek oranda, özellikle de presinaptik olarak ifade edilen nöronal bir proteindir (124). Alzheimer hastalarından alınan korteks dokularında yapılan bir çalışmada amiloid β ($A\beta$) yanında, plakların içinde 2 peptid daha keşfedilmiştir ve 140 amino asitlik proteine Alzheimer hastalığı (AH)'nın non- $A\beta$ bileşeni anlamında (NAC) ve prekürsörüne de NACP adı verilmiştir (125). 140 amino asitlik proteinin *Torpedo*'dan izole edilen sinüklein ile oldukça yüksek oranda homolog olduğu ve 134 amino asitlik proteinin de, sığır fosfonöroprotein 14'ün insan homologu olduğu keşfedilmiştir (124). Bu proteinler, sinüklein ailesine ait proteinler olarak alfa (α) ve beta (β)-sinüklein olarak adlandırılmışlardır (124). A-sin'in sadece nöron hücrelerinde değil, T hücresi, B hücresi, doğal öldürücü hücreler ve monositler gibi hematopoetik hücrelerde, iskelet kasında, kalpte, pankreasta, böbrekte, akciğerde, plasentada ve periferik eritrositlerde de ifade edildiği gösterilmiştir (126-128).

A-sin tersiyer yapısı oldukça çözünür bir proteindir ve doğal olarak α -helikal yapısında monomer şeklinde bulunur (129). Sinüklein ailesi; α -, β -, γ - ve retina özel

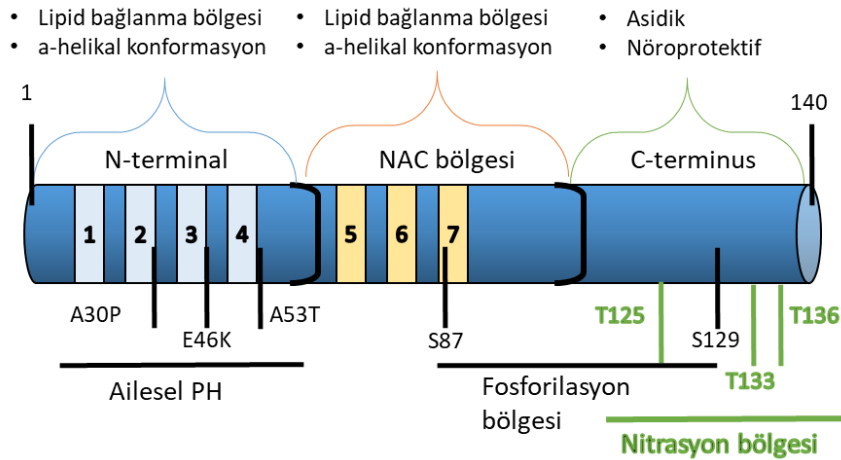
paralog sinoretin'den oluşur. α -, β - ve γ -sinüklein genleri, beyinde oldukça yüksek oranda sentez edilir (130).

A-sin 3 bölümden oluşmaktadır. 1. N-terminal bölgesi, 2. Plakların non-amiloid bileşen (NAC) bölgesi ve C-terminal bölgesi.

N-terminal bölgesi: A-sin'in pozitif yüklü, lipid bağlanma bölgesidir (131). A-sin'in lipid tabakası ile etkileşimini sağlayan içerdiği 11 aminoasitli tekrar eden KTKEGV hegzamerik apolipoproteinin α -helikal motifidir. KTKEGV motifi a-sin içerisinde 7 bölgede tekrar etmektedir (132).

NAC bölgesi: A-sin'in merkezi hidrofobik bölgesidir ve ilk olarak Alzheimer hastalarının senil plaklarından izole edilmiştir (125). Hidrofobik NAC bölgesi oldukça amiloidojenik yapıdadır ve agregat oluşumu için gereklidir (133).

C-terminal bölgesi: Esas olarak asidik pH'lı amino asitleri içerir, negatif yüklüdür (134). C-terminali kesilmiş a-sin'in daha fazla agregat oluşturmasından dolayı; bu bölgenin NAC bölgesini engelleyerek, agregasyonu inhibe ettiği öne sürülmüştür (135).



Şekil 2.4. Alfa-sinüklein proteininin yapısı

A-sin'in fizyolojik fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak, sinaptik veziküllerin oluşumunda, veziküler homeostaziste, veziküler havuzda, vezikül boyutunun ayarlanmasında ve böylece de sinaptik aşırımda rolü olduğu ve bunun dışında a-sin'in dopamin salıverilmesinde ve depolanmasında da görev aldığı düşünülmektedir (136-138).

A-sin'in fizyolojik ve patofizyolojik özelliklerini anlamak için pek çok model geliştirilmiştir. Bunların çok azı *knock-out* (KO) modellerdir ve büyük çoğunluğu da aşırı ifade ile sağlanan modellerdir. Geliştirilmiş olan bir KO fare modelinde; ekzon 1 ve 2 ya da ekzon 4 ve 5 silinmiştir ve farelerin normal bir beyin organizasyonu ve yaşam sürdürdükleri gözlenmiştir. Bu da a-sin'in hayati bir fonksiyonu olmadığını düşündürmektedir ancak aynı farelerde amfetamin ile lokomotor aktivitenin, açık alanda arka ayakları üzerinde durma "*rearing*" davranışının ve striatumda dopamin seviyesinin azaldığı gözlenmiştir (139, 140). Ayrıca; a-sin'in dinlenme ya da depo durumundaki vezikül havuzunu kontrol ederek presinaptik düzenleyici fonksiyonuna sahip olduğu ve ayrıca dopamin salıverilmesinde de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (128, 140).

Sitozolik a-sin'in monomerik durumu, a-sin membran proteinleri ile etkileşime geçip hücrel fonksiyonu için gerekli olan multimerik forma gelene kadar gerekli, geçici bir durum olabilir. Membran-protein bağlanması için gerekli olan dengedeki değişiklikler ve sırasıyla çoklu katlanmalar a-sin'in fizyolojik fonksiyonunu bozuyor olabilir (137). Ayrıca a-sin, kalsiyum aracılı vezikül birleşmesinin kinetiğini değiştirmeden veziküllerin kümelenmesini artırarak sinaptik aşırımı etkiler ki bu etki sadece a-sin membrana bağlanıp multimerik hale geldiği zaman olur (137, 141).

A-sin, özellikle dopaminerjik sinapslarda, dopamin biyosentezi ve geri alımı ile ilişkili proteinlerle etkileşime girerek, TH ile etkileşerek ya da direkt TH fosforilasyonunu azaltıp, TH defosforilasyonunu düzenleyen temel fosfataz PP2A aktivitesini artırıp TH'i inhibe ederek önemli rol oynar (142).

A-sin diğer proteinler ile etkileşime girebildiği gibi, kendi kendisi ile de etkileşime girerek multimerik bir yapı oluşturabilir ki fizyolojik a-sin'in tetramer yapıda olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (143). Genetik mutasyon, yüksek konsantrasyonda makromolekül varlığına bağlı moleküler yük artışı, a-sin protein seviyesinin artışı, translasyon sonrası değişiklikler ve oksidatif koşullar nedeniyle kendi kendine β -plak formu oluşturan a-sin çözünemeyen a-sin agregatlarına dönüşebilir (144, 145). A-sin'in agregat oluşturması için gerekli koşullar belirlenmiş olsa da altta yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. A-sin'in katlanmamış ya da kısmen katlanmış halden agregat haline geçişi için basit bir yapı değişikliği yeterli olabilmektedir (145).

PH'de a-sin agregatlarından etkilenen nöronal bölgelerin kaudalden rostrale ve beyin sapından kortekse doğru olmak üzere belirli bir stereotipik yol izlediği gösterilmiştir (146). Böylece; hastalığın ilerleyişi ile birlikte nöroanatomik çekirdeklerde a-sin agregatları gösterilerek, hastalığın şiddetini gösteren şemalar oluşturulmuştur (33). A-sin agregatları ilk olarak beyin sapındaki vagusun dorsal motor çekirdeğinde ve olfaktör bulbus'ta gösterilmiştir (33). Hastalığın ilerleyişi ile birlikte a-sin tegmentum pontis, amigdala ve SNpc'de agregat oluşturur ve en son temporal korteks ile neokortekse ulaşır (146). A-sin agregatları sadece SSS'de değil aynı zamanda PSS'de de görülür. A-sin'in bazal gangliyonların dışındaki hücrelerde de bulunmuş olması PH'nin motor dışı semptomlarının altında yatan sebep olabilir (21). Bu semptomlardan en önemlilerinden biri gastro-intestinal semptomlardır ve motor semptomlardan yıllar önce ortaya çıkar (77, 147). PH hastalarının özefagustan rektuma kadar tüm enterik sinir sisteminde a-sin agregatlarının bulunması bu hipotezi desteklemektedir (77, 147).

A-sin oligomerleri, Lewy cisimciği patolojisinin temel bileşeni olduğu için oldukça dikkat çekmektedir. Aşırı ifade edilmiş a-sin fibrilleşmekten ziyade genellikle oligomerleşme eğilimi göstermektedir. Bu durum oligomerik türlerin, a-sin'in en toksik türü olduğunu düşündürmektedir (148). Ancak; patolojik olarak oligomerlerin yanında fibriller de bulunmaktadır. Bu nedenle pek çok grup; tampon bileşenleri, agregat koşulları ve genetik mutasyonlar gibi dış etkenlerin a-sin'in fibriller yapısına nasıl etki ettiğini araştırmıştır (149). Oligomerik türlerin toksisitesi dikkat çekse de, a-sin'in çözünmeyen formlarının ve yanlış katlanmış halinin prion benzeri yayılımı, fibriller ve olgun a-sin türlerinin toksik etkisine dikkat çekmektedir (150). Ekzojen fibrillerin uygulanması ile birlikte; sadece olgun agregat içeren belli hücrelerin ölüp, komşu hücrelerin ölmemesi ile a-sin agregatları ile hücre ölümü arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur (151).

Ailesel PH ile ilişkili a-sin üzerinde 5 adet nokta gen mutasyonu A30P (152), E46K (153), H50Q (154), G51D (155) ve A53T (16) tanımlanmıştır ve kromozomal triplikasyonlar ve dublikasyonlar da erken başlangıçlı PH ile ilişkili bulunmuştur (156). A-sin geninin *promoter* bölgesinde meydana gelen polimorfizmler, protein ifadesinde artışa ve PH gelişiminde daha yüksek duyarlılığa sebep olmaktadır (157).

2.5.4. Viral Vektör Aracılı Parkinson Hayvan Modelleri

Rekombinant viral vektörlerin geliştirilmesi ile birlikte *in vivo* olarak değiştirilmiş genler transfer edilerek SSS hastalıklarını modellemenin yeni bir yolu açılmıştır. Özellikle de Adeno-ilişkili viral vektör (AAV) ve lentiviral vektör (LV) aracılığıyla beyin içerisinde uzun süreli ifade sağlayan etkili gen transfer araçları geliştirilmiştir (128, 158). AAV, yüksek verimde vektör taşıma kapasitesine sahiptir, beyin içerisinde geniş bir alanı etkiler ve özellikle de yüksek seçicilikte nigral dopaminerjik nöronlarda uzun süreli, sürekli ifadeyi sağlar. (159). AAV-aracılı nigral nöronlarda insan a-sin aşırı ifadesi sağlandığında; SN'de nörodejenerasyona, striatumda dopaminerjik terminallerin kaybına ve dokuda dopamin içeriğinin azalmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu nöropatolojik değişiklikler a-sin proteininin hücre gövdesinde ve etkilenmiş hücrelerin terminallerinde anormal birikime ve Parkinson hastalarının beyinlerinde görülen Lewy nöritlerine benzer yapıların oluşmasına bağlıdır. Hücre ve terminallerde akut lezyon oluşumuna neden olan toksin modellerinin tersine, bu modelde lezyon oluşumu haftalar sürmektedir (160, 161).

AAV en sık kullanılan viral vektör sistemidir. İlk olarak AAV serotip-2 kullanılmıştır (160). Patolojinin hafifçe ilerlediği ve SNpc'de %30-80 TH⁺ nöron kaybı, %50 striatal terminal ve dopamin kaybı gözlenmiştir (160). Viral aracılı a-sin aşırı ifadesi ile PH patolojisini en iyi taklit eden model AAV2 ve 6 aracılı yabanıl tip a-sin aşırı ifadesinin nörona özel sinapsin *promoter*'ı ile sağlanmıştır (162). AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi ile sağlanan PH modeli sadece rodentlerde değil yetişkin marmosetlerde de çalışılmıştır ve hem TH kaybı hem de davranışsal değişiklikler gözlenmiştir (163).

Fare dışında diğer yabanıl tip hayvanları da kullanabilmek, yetişkinlerde hedef hücrede istenilen genin transfer edilmesi ile aşırı ifadesinin sağlanabiliyor olması, karşı tarafın iç kontrol olarak kullanılabilmesi, tek taraflı olarak transgenin ifadesini sağlamaya olanak vermesi ve böylece motor bozuklukların apomorfin, amfetamin gibi farmakolojik ajanlarla değerlendirilebilmesi viral vektör kullanıyor olmanın en temel avantajlarıdır (158).

Viral vektör aracılı yabanıl tip insan a-sin geninin SNpc'de aşırı ifadesi; agregat oluşumu, TH nöronlarının kaybı ve nigrostriatal yolakta terminal kaybı ve

dopamin konsantrasyonunun azalması ile sonuçlanır. Ancak; bu modelin ne kadar ilerleyici olduğu viral aracılı a-sin lezyonlarının görece kısa bir süre sonra plato yapması ve hatta bazen düzelme görülmesi nedeniyle tartışma konusudur (160, 162, 164, 165). Viral vektör aracılı yüksek oranda transgen üretimi enjeksiyon sonrası sağlansa da, bu ifade nigrostriatal sistem ile kısıtlıdır ve oldukça katı ve yoğun nigrostriatal hasar gözlenir (160, 162, 163, 165). Pek çok viral vektör aracılı aşırı ifade modelinde motor davranış bozukluğu ya değişkendir ya da kısmi nigrostriatal sistem lezyonuna bağlı olarak çok görülmez (160, 164, 165).

2.6. Parkinson Hastalığı Tedavi Yöntemleri

Parkinson hastalığında bazal gangliyonların anatomisi, biyokimyası ve fizyolojisi hakkındaki bilgilerin artması ile birlikte diğer nörolojik durumlardan ayrılması, gözleme dayalı tedaviden kanıta dayalı tedaviye geçilmesini sağlamıştır (6).

PH'de kullanılan ilk tedavi, Parkinson tremorunun tedavisinde kullanılan belladonna alkaloidleridir (6, 166). Belladonna alkaloidleri, santral etkili antikolinerjiklerdir ve striatumda dopaminerjik/kolinerjik dengenin Parkinsonizme etkisini anlamada rol almışlardır.

L-DOPA: Dopamin ilk olarak 1910 yılında G. Berger ve J. Ewens tarafından sentez edilmiştir (167). Dopa dekarboksilaz enziminin keşfi ile birlikte Levodopa (L-DOPA) sentez edilmiş ve dopamin benzeri etkili olduğu keşfedilmiştir (6). Rezerpin ile indüklenen Parkinson benzeri semptomlar L-DOPA'nın uygulanması ile hafiflemiştir (168). L-DOPA'nın dopaminin doğal öncülü olması, ilacın PH hastalarında denenmesini kolaylaştırmıştır. Çalışmalar sonucunda L-DOPA'nın; oturan hastaların ayağa kalkmasını kolaylaştırdığı, duran hastaların yürümeye başlamasını, hareketleri daha kolay ve rahatlıkla yapabilmesini sağladığı gözlenmiştir (169). Oral formunun oluşturulması ile birlikte L-DOPA, PH tedavisinin temel ilacı olarak kabul edilmiştir. Ancak; L-DOPA kullanımına bağlı diskinezi (istemsiz hareketler), motor dalgalanmalar gibi motor yan etkiler görülmesi, ilacın kullanımını kısıtlamaktadır (170). Katekolamin-O-metil-transferaz (COMT) ve monoamin oksidaz (MAO) B inhibitörleri L-DOPA ile birlikte kullanılır ve L-DOPA'nın metabolizma oranını azaltarak, etki süresini uzatırlar. MAO B inhibitörleri hem

endojen hem de ekzojen dopaminin etkisini artırır. L-DOPA ve aromatik L-aminoasit dekarboksilaz inhibitörü (karbidopa ve benserazid) birlikte kullanılarak da L-DOPA'nın periferde yıkılması azaltıp, etki süresi uzatılmaktadır ve şu anda L-DOPA PH tedavisindeki en etkili tedavi yöntemidir (171, 172).

IPX066: Karbidopa/L-DOPA'nın yeni bir formülasyonudur ve hem hızlı hem de uzatılmış salıverimli bileşenler içerir. Böylece, semptomların hemen kontrolünü sağlamak ve daha uzun süre bu kontrolü idame ettirmek hedeflenmiştir. Çalışmalarda hem L-DOPA'ya ihtiyaç süresini geciktirdiği hem de motor skorda iyileşme sağladığı gösterilmiştir (173).

MAO B inhibitörleri: MAO B inhibitörleri, genellikle PH'de başlangıç tedavisi olarak kullanılmaktadır. Ancak, hastaların göstermiş olduğu ilerleme L-DOPA ya da dopamin agonisti kullanımına göre daha zayıftır (172). Selejilin, MAO B enziminin geri dönüşsüz inhibitörüdür ve PH'de nöroprotektif etkisi çalışılan ilk ilaçlardan biridir. Fakat daha sonra nöroprotektif etkisinden ziyade semptomatik tedavide etkili olduğu görülmüştür (174). Selejilin tedavisinden sonra motor dalgalanmalarda, donmada ve doz sonu fenomeninde azalma olduğu ancak diskinezi görülme sıklığında artış olduğu gözlenmiştir (175). Rasajilin, PH'nin semptomatik tedavisinde kullanılan, bir diğer geri dönüşsüz MAO B inhibitörüdür ve rasajilin MAO B inhibisyonu haricinde; sitokrom c salıverilmesini azaltır, pro-antiapoptotik gen ve proteinlerde değişikliğe neden olur ve nörotrofik faktörleri artırır böylece hastalığın ilerleme sürecinde de etki gösterir (174, 176).

L-DOPA kullanımına bağlı yan etki görülmesi yeni tedavi arayışlarına ve tedavinin yeniden düzenlenmesine neden olmuştur. Diskinezi riskini azaltan dopamin reseptör agonistleri böylece tedaviye girmiştir (177, 178).

Dopamin Agonistleri: Tek ilaç ile tedavide başlangıç için ilk seçenek ilaçlar arasındadırlar. İki ana kategoriden oluşur: D3/D2 ergot-olmayan dopamin reseptör agonistleri: pramipeksol, ropinirol ve rotigotin ile D2 ergot türevleri: bromokriptin, lisurid, kabergolin ve pergolid semptomatik tedavi de etkili olan dopamin agonistleridir (171, 179). Pramipeksol'ün hastalarda motor belirtileri iyileştirdiği gösterilmiştir (180). Her ne kadar erken dönemde dopamin agonistleri ile monoterapi yeterli gözükse de, hastalığın ilerleyişi ile birlikte hastaların büyük bir çoğunluğunda L-DOPA kullanımına ihtiyaç olmaktadır. Dopamin agonistlerinin L-DOPA ile birlikte

kullanılmasının, PH semptomlarını azaltmada tek başına L-DOPA tedavisinden daha etkili olduğu gösterilmiştir (181). Dopamin reseptör agonistleri, PH'de L-DOPA kullanımına bağlı diskinezi oluşumunu azaltmak için öncelikle tercih edilecek ilaçlardır. Dopamin agonistleri motor semptomların tedavisinde L-DOPA'ya göre daha az etkilidirler ve uyuşukluk, ödem, halüsinasyon, dürtü kontrol bozukluğu gibi psikolojik yan etkiler daha sık görülür (182).

Apomorfin hidroklorür: Kısa etki süreli, ergot-olmayan dopamin reseptör agonistidir. Dopamin agonistlerinin en eskilerinden biri olmasına rağmen PH tedavisinde kullanımı son zamanlarda onaylanmış bir ilaçtır. D1, D2, D3 ve D4 reseptörlerine benzer afinite gösterir ve L-DOPA'ya benzer etki gösteren tek dopamin agonistidir. Apomorfin'in hepatik klerensi oldukça yüksek olduğu için oral kullanımı zordur. Uzun süreli s.c. infüzyon yapılmasının ise teknik zorlukları bulunmaktadır (171, 183).

Safinamid: MAO B inhibisyonu, sodyum kanal blokajı, dopamin ve glutamatın salıverilmesini inhibe etme gibi farklı etki mekanizmalarına sahip bir ajandır. Safinamid, kullanımının motor belirtilerde hem plasebo hem de dopamin agonistlerine göre iyileşme sağladığı gösterilmiştir (184). MAO B enzimini selejilin ve rasajilinden daha yüksek seçicilikte ve tamamen geri dönüşlü olarak inhibe eder (185).

Pardoprunoks: 5HT-1A agonisti ve kısmi dopamin D2 ve D3 agonistidir. Pardoprunoks'un motor belirtileri anlamlı şekilde iyileştirdiği gösterilmiştir. Kısmi agonist olduğu için diğer dopamin agonistlerine göre daha az yan etki görülür. En yaygın görülen yan etkiler; bulantı, baş dönmesi, uyuşukluk, baş ağrısı ve halsizliktir (186).

Antikolinergik İlaçlar: PH tedavisinde antikolinergiklerin kullanımı oldukça eskidir. PH'de rijidite ve tremor tedavisi için tercih edilirler. Yan etkileri oldukça fazladır ve yaşlılarda tolerans azdır. Yan etkilerin genellikle periferik M2 ve M3 reseptörlerin etkisinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle selektif M4 ve M5 reseptörlere etki eden bir ilaç geliştirilmesinin tedavide faydalı olacağı düşünülmektedir (187).

Adenozin A_{2A} reseptör Antagonistleri: PH tedavisinde hem semptomatik hem de nöroprotektif etkili olabilecekleri düşünülmektedir. Adenozin reseptörünün 4 alt

tipi bulunmaktadır. Bunlardan A_1 ve A_{2A} beyinde ve A_{2A} özellikle dorsal striatum, nükleus akumbens ve GPe'da ifade edilir (188). A_{2A} reseptörü, striatumda D2 reseptörü ve metabotropik glutamat reseptörü 5 (mGlu5) ile ko-lokalizedir (189). D2 ve A_{2A} reseptörleri striatal nöronlar üzerinde birbirlerine ters etki gösterirler. A_{2A} reseptörünün aktivasyonu striatopallidal sinapslarda GABAerjik aşırımı düzenler ve striatumda hem glutamaterjik hem de GABAerjik aşırımı değiştirir. PH'de hem striatopallidal GABAerjik sinapslar hem de kortikostriatal glutamaterjik sinapslar aşırı aktiftir bu nedenle A_{2A} reseptör blokajının hastalığın motor semptomlarını azaltacağı düşünülmektedir (188, 190). İstradefilin ve preladenant geliştirilmiş olan A_{2A} reseptör antagonistleridir. Parkinson semptomlarının iyileştirilmesinde ve L-DOPA ile indüklenen diskinezinin oluşumunun azaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (185, 191, 192).

Metabotropik Glutamat Reseptör Antagonistleri: SSS'de glutamatın etki ettiği iki tip reseptör vardır: hızlı etkili iyonotropik reseptörler ya da yavaş G-protein ile kenetli metabotropik glutamat reseptörleri. PH'in kortikostriatal yolakta ve bazal gangliyonların döngüsü içerisinde subtalama fugal sinapslarda artmış glutamaterjik aşırım ile ilişkili olduğu ve bu nedenle de glutamaterjik reseptör blokajının PH tedavisinde etkili olacağı düşünülmektedir (52). Amantadin bu bağlamda anti-diskinetik etki gösteren NMDA reseptör antagonistidir ve PH tedavisinde kullanılmaktadır (171). mGlu reseptörleri esas olarak üç gruba ayrılır. İlk grup mGlu1 ve 5'den oluşur ve postsinaptik olarak ifade edilirler, glutamatın uyarıcı etkisine aracılık ederler. İkinci grup mGlu2 ve 3 ve üçüncü grup mGlu4, 6, 7 ve 8'den oluşur ve esas olarak presinaptik olarak ifade edilirler. GABAerjik ve glutamaterjik aşırımın inhibitör düzenleyicisidirler. Her üç grup da bazal gangliyonlarda yoğun olarak bulunmaktadır ve sinaptik aşırımda etkilidirler. mGlu4 ve 5 reseptörlerini hedefleyen ilaçların PH tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir (171). MPEP (2-metil-6-(feniletinil)-piridin ve MTEP (3-(2-metil-1,3-tiyazol-4-il(etinil)piridin)) antiparkinson etkili olduğu düşünülen mGlu5 antagonistleridirler. Bir çalışmaya göre; akut uygulandığında hafif antiparkinson etki gösteren ve antidiskinetik etkili olan MPEP'in, kronik olarak uygulanırsa daha etkili olacağı düşünülmektedir (193, 194).

Hastalığın klinik ya da patoanatomik ilerleyişini durduracak ya da yavaşlatacak bir tedavi ihtiyacı günümüzde hala önemini korumaktadır. Bu amaçla nöroprotektif ya

da hastalığın ilerleyişini yavaşlatabilecek moleküller tedavi seçeneği olarak denenmektedir. Kreatin bu anlamda denenmiş moleküllerden biridir. Glutamat aracılı eksitotoksisteye karşı koruyucu, MPTP toksisitesine karşı nöroprotektif olduğu, mitokondriyal fonksiyonu ve hücre biyoenerjisini artırdığı gösterilmiştir (185). Bunun üzerine faz II çalışmaları yapılmış ve geniş çaplı faz III çalışmaları başlamıştır ancak motor skorda herhangi olumlu bir etki sağladığı gösterilememiştir (195).

Cerrahi Tedavi: Derin beyin stimülasyonu (DBS), L-DOPA'ya iyi yanıt veren ancak motor dalgalanmalar ya da diskinez gibi yan etkilerinden dolayı problem yaşayan hastalarda uygulanabilen cerrahi bir yöntemdir (174). STN ya da GPi hedeflenerek uygulanabilir. Bu yöntemle hem motor fonksiyonda ilerleme olduğu hem de diskinezi de iyileşme olduğu gözlenmiştir (174). Hafif davranışsal ya da bilişsel bozukluğu olan ve diskinezili hastalarda GPi'e DBS uygulanması; bilişsel olarak bir problemi olmayan fakat L-DOPA dozunun azaltılması gereken hastalarda ise STN'ye DBS uygulanmasının daha faydalı olduğu düşünülmektedir (196). Ancak bir hastaya DBS uygulanabilmesinin çeşitli kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Bunlar arasında; 5 yıldan uzun süredir PH hastası olmak, L-DOPA'ya cevapsızlık, hastayı sıkıntıya sokan motor dalgalanmalar ve diskinezinin olması, tedaviye cevapsız tremor, L-DOPA ya da dopamin agonistlerine hassasiyet ve kişinin ameliyat için sağlık durumunun iyi olması gerekmektedir (174).

Gen Tedavisi: Beyinin belirli bir bölgesinde hedef protein ifadesini viral vektör aracılı gen transfer ederek değiştiren tedavi yöntemidir (185). AAV2-aracılı glutamik asit dekarboksilaz (GAD) ile gen tedavisi, CERE-120, aromatik L-amino asit dekarboksilaz (AADC) gen tedavisi, prosavin ile çalışmalar yapılmıştır (185). AAV2-GAD'ın subtalamik çekirdeğe enjeksiyonu ile aşırı GABA aktivitesi baskılanarak motor skorda iyileşme sağlanmıştır (197). Neurturin, glial hücre türevi nörotropik faktör (GDNF)'in homologudur. CERE-120 ise insan neurturin'in değiştirilmiş şeklidir. Ancak bir klinik çalışmaya göre CERE-120'nin motor fonksiyonda önemli bir gelişme sağladığı gösterilememiştir (198). Striatuma AAV-aracılı AADC enjeksiyonu L-DOPA'dan dopamin oluşumunu artırır. Yapılan faz I çalışmalarında PH semptomlarını orta derecede iyileştirdiği gösterilebilmiştir (199). Prosavin; TH, aminoasit dekarboksilaz ve GPT siklohidrolaz kodlayan lentivirüs aracılı üçlü genin

intrastratial enjeksiyonu yaklaşımıdır (200). Yapılan faz I/II çalışmaları umut vaat etmektedir (201).

2.7. Nörodejeneratif Hastalıklarda Nöroprotektif Mekanizmalar

PH patolojisinde a-sin agregatlarının önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hastalığın tedavisinde agregat oluşumunun engellenmesinin, birikiminin azaltılmasının ya da agregatların yıkımının önemli olduğu düşünülmekte ve nöroprotektif ajan arayışları sürmektedir (202-204). Otofaji ve apoptoz mekanizmalarının da, meydana gelen hasara bağlı olarak, PH patogenezinde rol oynadıkları düşünülmektedir (205-207).

2.7.1. Otofajik Yolaklar

Otofaji; bütün ökaryotik hücrelerde sıkı bir şekilde kontrol edilen hücresel yıkım ve geri dönüşüm sürecidir. Memeli hücrelerinde üç temel otofaji türü vardır. Birincisi; mikrootofaji, ikincisi şaperon aracılı otofaji ve üçüncüsü ise en çok kullanılan otofaji yolağı olan makrootofajidir.

Mikrootofaji: Lizozomun membranını bir miktar genişleterek, direkt olarak sitozolik bileşenleri içine alması ve sindirmesi olayıdır (Şekil 2.4.a).

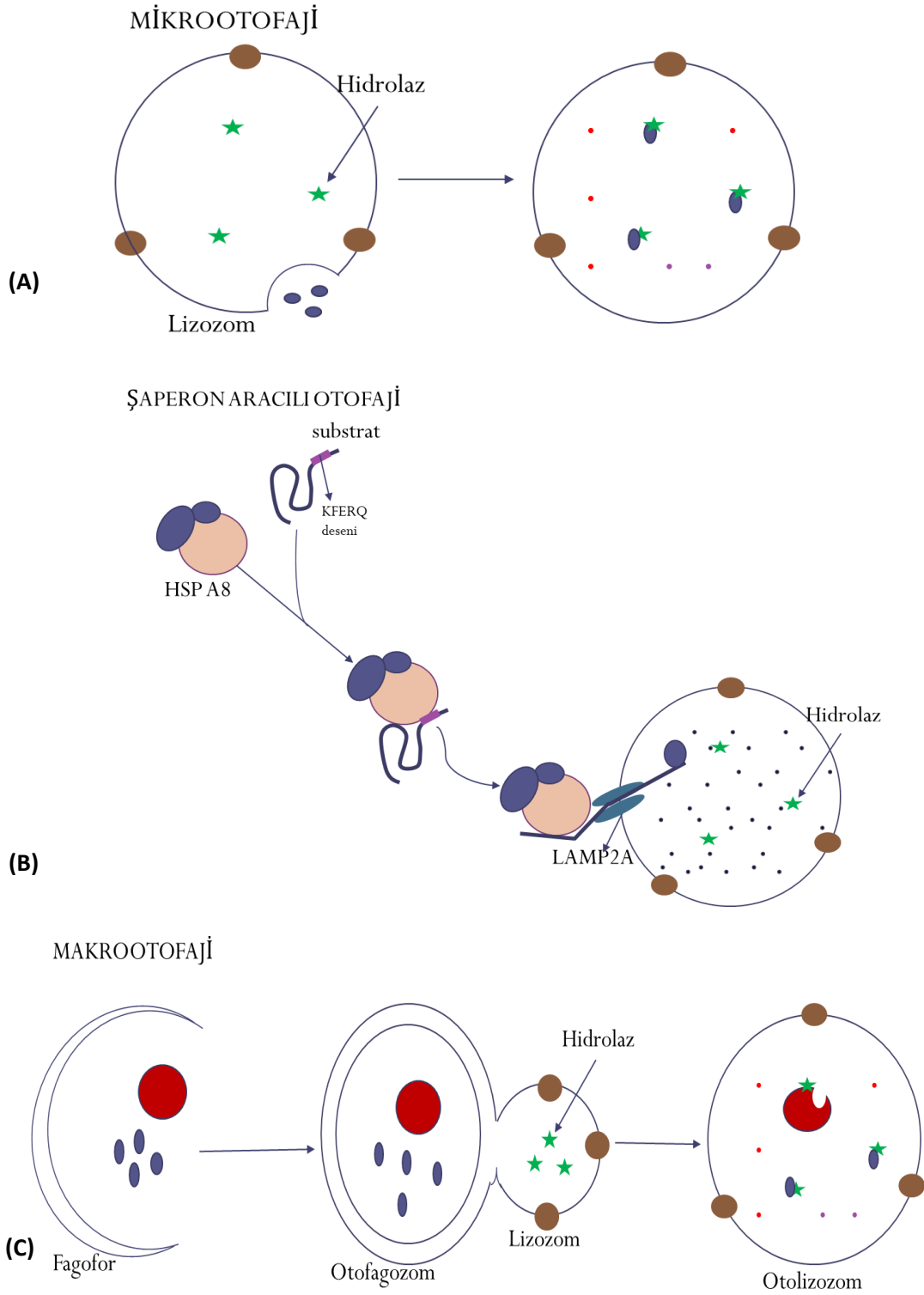
Şaperon Aracılı Otofaji (CMA): Mikrootofajiden farklı olarak, bileşenleri yıkmak için membranal yapıları kullanmaz, onun yerine proteini tanıyan şaperon moleküllerini kullanır. CMA, özgün bir şekilde KFERQ ve ilişkili pentapeptit motiflerini tanıyan bileşenler içerir. CMA ile glikolitik enzimler, transkripsiyon faktörleri ve inhibitörleri, kalsiyum ve lipid bağlanma proteinleri, veziküler proteinler gibi çok geniş aralıktaki proteinlerin yıkımı sağlanır (208). KFERQ motifi, otofaji sırasında 70 kDa ağırlığındaki ısı şok proteini 8 (HSP A8/HSC70) ve benzeri yardımcı şaperonlar tarafından tanınır. HSP A8 daha sonra bileşeni lizozomal membrana taşır. Lizozomal membranda bileşen CMA substrat reseptörü olan lizozomal ilişkili membran protein 2A (LAMP 2A)'ya bağlanır (208, 209). Lamp 2A, substratı lizozomal lümene taşır ve LAMP 2A, HSP A8 ve yıkılacak olan içerik birbirinden

ayrılır (Şekil 2.4.b) ve daha sonra LAMP 2A yeni bir bileşeni bağlamak üzere monomerik formuna geri döner (209).

HSP A8 ve LAMP 2A aynı zamanda şaperon aracılı seçici otofaji denen, bir tür makrotofajide de görev alırlar (208). Bu süreçte, şaperonlar belirli ubiquitinlenmiş organel ve protein bileşiminin yıkımına yardımcı olurlar. Şaperonlar, ubiquitinlenmiş proteinlerin p62 ve NBR 1 proteinleri tarafından tanınması ile birlikte makrotofajik yollarda devreye girerler ve bileşenin lizozoma taşınarak yıkılmasına aracılık ederler (210).

Makrotofaji: Hücrel homeostazın sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Hasarlı/yaşlanmış organellerin yıkımında, uzun süredir var olan proteinlerin ve agregatların yıkılıp yeniden yapılmasında ve gerekli hücrel bileşenlerin kalite kontrolünün sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Hücreler açlık, hipoksi, oksidatif stres, patojen varlığı, radyasyon ve anti-kanser ilaç tedavisi gibi çevresel stres faktörlerine maruz kaldığında, adaptasyon ve hayatta kalmayı artıran sitoprotektif otofajik cevap artar. Ancak otofajide düzensizlik olduğunda ya da aşırı uyarıldığında ise otofaji hücre ölümüne sebep olabilir (211).

Mikrotofaji ve CMA'dan farklı olarak yıkılacak bileşenlerin lizozomal membrandan uzakta bir yerde sitozolik bir vezikül oluşumu ile paketlenerek lizozoma taşınması söz konusudur. Makrotofajide diğer otofajik yollardan farklı olarak, *de novo* sentez sonucu çift membranlı bir otofagozom oluşumu gözlenir. Otofagozom oluşumu, sitoplazma boyunca pek çok perivakuoler bölgeden başlar. Başlangıç aşamasından sonra membran genişlemeye başlar ve esas olarak çift membranlı bu yapı fagofor (*phagophore*) adını alır. Fagofor genişledikçe, membran bükülür ve küresel otofagozomu meydana getirir. Yıkılacak olan bileşenin etrafını tamamen saran, çift membranlı bir otofagozom oluşur ve lizozoma doğru taşınır. Daha sonrasında otofagozomun dış membranı lizozomal membran ile kaynaşarak otolizozomu meydana getirir (Şekil 2.4.c.). Asidik lümene ve hidrolazlara maruz kalan iç membran ve içerik zamanla yıkılır ve parçalanma ürünleri yeniden kullanılmak üzere sitoplazmaya geçer (208, 212).



Şekil 2.5. Otofajik yıkım mekanizmaları: (A) mikrotofaji, (B) şaperon aracılı otofaji, (C) makrotofaji

Makrotofaji, cAMP-bağımlı protein kinaz A (PKA), AMP-aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve mTOR yolakları aracılığıyla hücrenin enerji ihtiyacına göre

düzenlenir. mTOR, fosfotidilinositol 3-kinaz ilişkili protein (PIKK) ailesine ait 2549 aminoasitli serin/treonin protein kinazdır. mTOR, kinaz katalitik bölgesi (KIN) ve FKBP12 rapamisin bağlanma bölgesi (FRB) içerir. KIN bölgesi mTOR'un aktivasyonu ile ilişkilidir ve FRB bölgesine rapamisinin bağlanması, mTOR kompleksinin dağılmasına ve mTOR aktivitesinin inhibisyonuna neden olur (213). mTOR iki bileşenden oluşur: mTORC1 ve mTORC2. *Upstream* ve *downstream* sinyal yollarında aldıkları görev bakımından ve rapamisine verdikleri cevap bakımından bu iki bileşen birbirlerinden farklıdırlar. mTORC2, aktin hücre isketini düzenlemede ve Akt yolağının fosforilasyonuna neden olarak mTORC1'i de aktive etmede rol oynar (214). mTORC1 spesifik olarak memeli rapamisin hedefi düzenleyici-ilişkili protein (Raptor) ve 40kDa ağırlığında Akt substratı prolinden zengin protein (PRAS40) bölgelerini içerirken; mTORC2 spesifik olarak mTOR rapamisin-bağımsız bileşen (Rictor), memeli stres ile aktive olan map-kinaz etkileşim proteini 1 (mSin1) ve rictor ile birlikte gözlenen protein (Protor) 1 ve 2 bölgelerini içerir (214). Raptor mTORC1 ve Rictor mTORC2'nin aktivasyonunu sağlarken, DEP bölgesi içeren protein (Deptor) ise hem mTORC1 hem de mTORC2'de mTOR'un negatif düzenleyicisidir (213).

Makrotofajinin başlatılması için unc-51 benzeri kinaz 1'in ya da 2'nin (ULK1/2), otofaji ilişkili protein 13 (Atg13) ve RB1 ile indüklenen sarılmış bobin 1 (RB1CC1/FIP200)'in bir araya gelerek kompleks oluşturması gerekmektedir. Hücrenin enerji ihtiyacına göre bu kompleks mTORC1 ile birleşir ya da ayrılır. mTORC1 otofagozomun başlangıç aşamasında gerekli olan Atg13 proteinini fosforilleyerek, ULK1/2 kompleks oluşumunu engeller, otofajiyi inhibe eder (215). Ancak hücreler rapamisin ile muamele edilirse ya da aç kalırsa mTORC1, ULK1/2, Atg13 fosforilasyonu inhibe olur ve defosforilasyona bağlı aktif olan ULK1/2, FIP200'ü fosforilleyerek makrotofajiyi başlatır (211, 216). Otofagozom oluşumunun bir sonraki aşaması uzama aşamasıdır. Bu aşamada fagoforun uzamasına ubikutin benzeri (UBL) proteinler dahil olur. Geniş multimerik birleşim ile oligomerizasyon sonucu Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi meydana gelir (211). Mikrotübül-ilişkili protein 1A/1B hafif zinciri 3 (LC3)/Atg8, C terminalinden Atg4 aracılı ayrılır ve sitozolik LC3 I'i meydana getirir. LC3 I'in C terminaline fosfotidiletanolamin (PE) bağlanması sonucu, LC3 II meydana gelir. LC3 II fagofor membranının her iki yüzünde de bulunur ancak otofagozomun lizozom/endozom ile birleşimden sonra iç membranındaki LC3

II yıkılır (211). LC3 I'in lipidlenmesi hücreler açlık çektiğinde ya da hücrede stres faktörleri arttığında meydana gelir.

Otofagozomun indüksiyonunda Atg14, Atg6 ve sınıf III fosfotidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) birleşimi görev alır. Böylece diğer Atg'lerin bağlanması ve fagoforun uzaması sağlanır. Sınıf III PtdIns3K; fosfotidilinositol 3-kinaz katalitik alt birim 3 tip 3 (PIK3C3/VPS34), PIK3R4/p150 ve beclin 1'den oluşur (208). Açlık durumunda Atg14; Atg16 ya da LC3 içeren yapılarda lokalize olur. Atg14, VPS34 ve beclin 1 ile etkileşerek, otofajiyi artırır. Atg9, transmembran proteindir ve açlık, rapamisin tedavisi gibi durumlarda periferik bölgelerde yeniden dağılır, LC3 pozitif otofagozomların üzerine yerleşir ve otofagozom oluşumunda görev alır (211). Otofagozomun tamamlanması ve kaynaşması, makrotofajinin en az anlaşılan aşamasıdır. Uzamış fagofor sonuç olarak olgunlaşır ve kapanarak endozom ve/veya lizozom ile kaynaşarak otolizozomu meydana getirir. Otofagozomun lizozoma doğru hareketi mikrotübül bağımlıdır (217). Ultraviyole ışınlama direnç ilişkili gen (UVRAG) proteini, GTPaz'ı aktive ederek lizozom ile kaynaşmayı tetikler. UVRAG-beclin 1-VPS34-p150 kompleksi daha sonra RUN ve sistein zengin bölge içeren beclin 1 ilişkili protein (Rubikon) ile de birleşerek endozom/lizozom'un yanında lokalize olur ve otofagozomun olgunlaşmasını negatif olarak düzenler (211).

mTORC1, besin miktarı, enerji seviyesi, büyüme durumu ve stres faktörleri gibi pek çok hücre dışı ve içi sinyali birleştirir. Besin miktarı ve büyüme faktörleri mTORC1'i aktive ederek protein sentezi, hücre büyümesi, proliferasyonu ve metabolizmasını artırır. Aksine; açlık durumunda, düşük enerji seviyesinde ve hücrel stres artığında hücre canlılığını koruyabilmek için mTORC1 inhibe edilerek; biyosentez oranını azaltır, katabolik süreçleri artırır ve hücre proliferasyonunu yavaşlatır (218).

Otofaji düzenleyicilerinden PKA, mTORC1'i fosforilleyerek otofajiyi inhibe eder (219). PKA bunun dışında, LC3'ün fosforillenmesine neden olarak da otofajiyi inhibe eder (220). AMPK ise, besin veya enerji yokluğunda fosforillenerek aktive olur ve dolaylı olarak mTORC1'in aktivitesini inhibe eder, buna bağlı olarak ULK1 aktive olur ve makrotofaji indüklenir (208, 221). Ayrıca, AMPK direkt olarak mTORC1 alt ünitesi Raptor'u fosforilleyerek de mTORC1'i inhibe eder ve otofaji indüksiyonu yapar (222).

Otofaji indüksiyonunda “hücrel genomun koruyucusu”, tümör baskılayıcı faktör p53’ün hem pozitif hem de negatif düzenleyici rolü vardır (223). Genotoksik stres ya da onkogenik olarak p53 aktivasyonu, AMPK aktivasyonuna, mTORC1 inhibisyonuna ve otofajinin indüksiyonuna sebep olur. Ancak, açlık durumu ya da ER stresi otofaji indüksiyonuna sebep olarak, p53’ün yıkımını artırır (211). Çekirdekte p53’ün transkripsiyonel olarak aktivasyonu otofajiyi artırırken; sitoplazmik p53 otofaji inhibisyonuna sebep olmaktadır (211).

Makrotofaji, ayrıca seçici olarak belirli moleküllerin sindiriminde rol alabilir. Örneğin; peroksizomların yıkımı peksofaji (*pexophagy*) olarak adlandırılır ve normal büyüme koşullarında peroksizomların yıkımında önemli bir rolü vardır. Açlık durumunda, otofagozomun LC3 II molekülü tarafından peroksimal membranın PEX14 bileşeni tanınır ve makrotofaji ile yıkımı sağlanır (224). Mitofaji ise bir başka seçici makrotofaji türüdür. Hasarlı mitokondrinin seçici olarak yıkımını sağlar (225). Sitozolik E3 ubikutin ligaz PARK2, hasarlı mitokondrinin dış membran kinazı PINK1’i tanır ve mitokondri bileşenlerinin ubikutinlenmesini sağlayarak, mitofajinin başlamasına neden olur (208).

2.7.2. Apoptotik Yolaklar

Apoptoz tanımı ilk defa 1972 yılında ortaya atılmıştır. *Caenorhabditis elegans* adındaki nematodun gelişimi sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün araştırılması ile yetişkinliğe geçişte belirli hücrelerin programlı bir şekilde öldüğünün gösterilmesi sonucu memeli hücrelerinde apoptoz sürecinin mekanizması araştırılmaya başlanmıştır (226, 227).

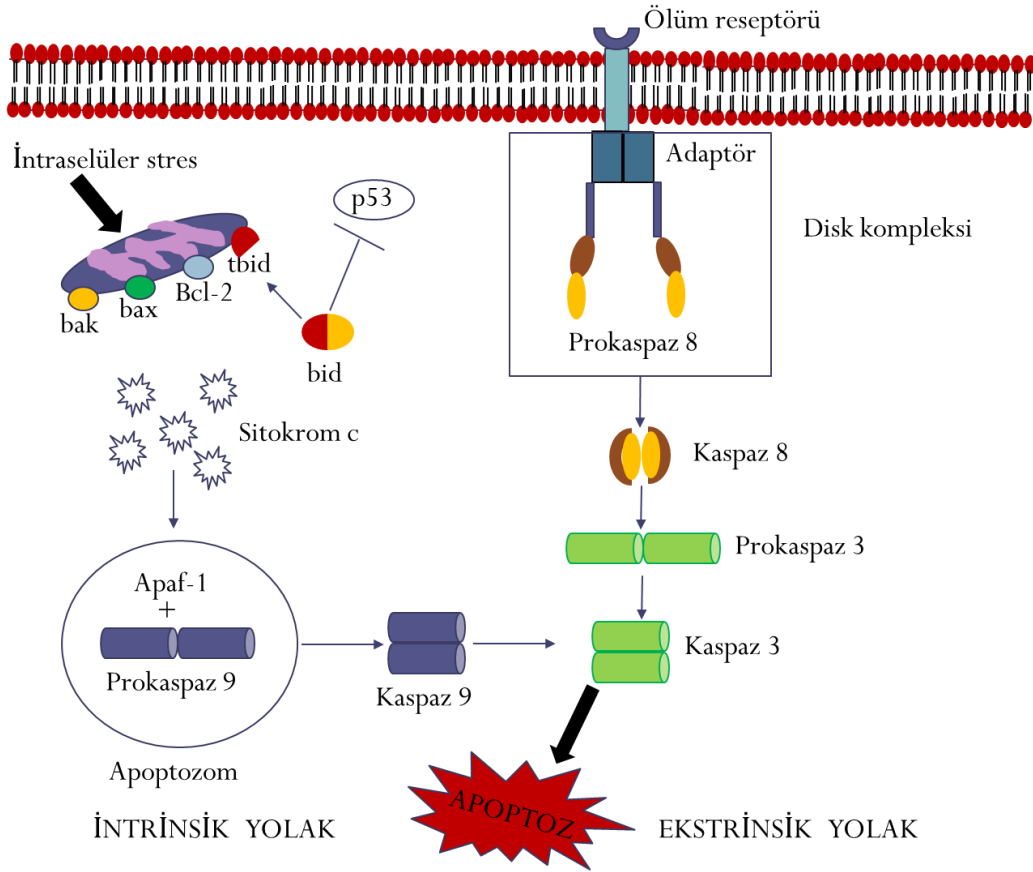
Apoptoz, dokularda hücre popülasyonunun homeostatik dengesinin korunması, gelişimi ve yaşlanmasında görev alır ve aynı zamanda, hastalık ya da zararlı bir ajan tarafından hücreler hasar gördüğü zaman, bağışıklık sistemi gibi savunma mekanizması olarak da rol oynar (227).

Apoptozun erken aşamasında hücreler büzüşür, piknozis görülür. Piknozis sonucunda, apoptozun en karakteristik özelliği olan kromatin kondensasyonu görülür. Hücrelerin büzüşmesi ile birlikte hücre boyutu küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve organeller sıkı bir kargo haline gelir ve apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptotik

cisimcik; çekirdek parçaları içeren ya da içermeyen sıkıca paketlenmiş organeller ile sitoplazmadan meydana gelir. Apoptotik cisimciklerin içerisinde hücrenin parçalanma ürünleri ve karyoreksis aşamasından sonra plazma membranında yoğun olarak tomurcuklanma meydana gelir. Hücreler, organel yoğunluğunun hala korunduğu bütün halindeki plazma membranı ile çevrilidir. Bu cisimcikler daha sonra makrofaj aracılı fagositoz ile parçalanır. Apoptotik hücre yıkımı sırasında, apoptotik hücre içeriği çevre dokulara bırakılmadığından, hızlı bir şekilde fagositoza uğradığından ve ayrıca genişlemiş hücreler anti-inflamatuvar sitokin üretmediğinden; inflamatuvar süreçler meydana gelmez (228).

İki temel apoptoz yolağı vardır: 1) ekstrinsik ya da ölüm reseptörü aracılı yolak, 2) intrinsik ya da mitokondriyal yolak (Şekil 2.6). İki temel yolak dışında, T hücre aracılı sitotoksinite ve perforin–granzim-bağımlı hücre ölüm yolağı da vardır. Bu yolak granzim A ya da B aracılığıyla apoptozu indükleyebilir. Her üç yolak da sonuç olarak kaspaz 3'ün aktive olduğu infaz yolağını aktive eder. Kaspaz 3'ün aktive olması, DNA'nın parçalanması, hücre iskeleti ve çekirdek proteinlerinin yıkımı, apoptotik cisimcik oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligand ifadesi ve son olarak fagositik hücrelerce alım ile sonuçlanır (227).

Kaspazlar genel olarak pek çok hücrede proenzim formunda ifade edilirler. Bir defa aktive olan prokaspaz diğer prokaspazları da aktive ederek proteaz kaskadını başlatır. Bir kaspazın diğer kaspazları aktive etmesi ile birlikte apoptotik sinyal, yolak boyunca çoğaltılarak hızlı bir şekilde hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar (227). On adet temel kaspaz tanımlanmıştır ve üç kategoriye ayrılmışlardır: kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı; kaspaz 3,6 ve 7 efektör ya da infaz kaspazları, kaspaz 1, 4 ve 5 ise inflamatuvar olarak kategorize edilmişlerdir (229).



Şekil 2.6. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolaklarının şematik gösterimi

Ekstrinsik Yolak: Apoptozun başlatılması reseptör aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu reseptörler, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen üst ailesine ait ölüm reseptörlerini kapsar (230). TNF reseptör ailesinin içerdiği 80 aminoasitlik sitoplazmik bölüm “ölüm bölgesi” olarak adlandırılır ve hücre yüzeyinden ölüm sinyalinin alınarak, intraselüler sinyal yollarına iletiminde kritik bir önem taşır (227). En çok çalışılan TNF reseptör ve ligandları FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1’dir. Ligandın reseptörün ölüm bölgesine bağlanması ile birlikte, FADD ya da TRADD adaptör proteinleri hücre içine göç ederler. Adaptör proteinler daha sonra prokaspaz 8 ile dimerizasyon yoluyla birleşir ve ölüm indükleyici sinyal birleşimini (DISC) oluşturarak prokaspaz 8’in otokatalitik aktivasyonunu sağlarlar (231, 232). Kaspaz 8 aktive olduktan sonra apoptozun infaz fazı başlatılır (Şekil 2.5).

İntrinsik Yolak: Apoptozu reseptör aracısız olarak hücre içi sinyallerle başlatan, mitokondri başlangıçlı ve direkt olarak hedef hücre içerisinde etki gösteren yoldur. Apoptozu başlatan hücre içi sinyaller pozitif ya da negatif kaynaklı olabilir.

Büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin eksikliği negatif sinyalleri oluştururken; radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller pozitif sinyallere örnektir. Bütün bu sinyaller, mitokondri iç membranında ve transmembran potansiyelinde değişiklik yaparak, proapoptotik proteinlerin sitozol içerisine salıverilmesini neden olmaktadır (233). İki ana proapoptotik protein grubu vardır: ilk grup; sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşurken, ikinci grup AIF, endonükleaz G ve CAD'dan oluşur (227, 234, 235). İlk grup proapoptotik proteinler aracılı prokaspaz 9 aktive edilerek "apoptozom" oluşur (236). Prokaspaz 9'un küme oluşturması ile kaspaz 9 aktive olarak, infaz yolağını aktive eder (Şekil 2.5). İkinci grup ise, hücrenin ölümü kesinleştikten sonra mitokondriden salıverilir. AIF, çekirdeğe gider ve DNA'nın parçalanmasına neden olur (237).

Sonuçta hem ekstrinsik yolak hem de intrinsik yolak apoptozun son yolağı olan infaz fazını aktive ederler. İnfazda görevli kaspazlar bu aşamada aktive olurlar. Sitoplazmik endonükleazları aktive ederek çekirdeğin yıkımını ve proteazları aktive ederek de çekirdek ve hücre iskelet proteinlerinin yıkımını sağlarlar. En önemlisi kaspaz3'dür, diğer infaz kaspazları ise kaspaz 6 ve 7'dir. Kaspaz 3 başlangıç kaspazları olan kaspaz 8, 9 ve 10 tarafından aktive edilir.

Apoptozun son aşaması; apoptotik hücrelerin fagositoza uğramalarıdır. Asimetrik fosfolipidler, apoptotik hücre yüzeyindeki fosfatidilserin ve hücre parçaları, bu aşamanın temel göstergeleridir (227). Apoptotik hücre dış yüzeyinde fosfatidilserinin belirmesi, inflamatuvar olmayan fagositik tanınmayı ve hızlı bir şekilde alınıp parçalanmasını sağlar (238).

Apoptoz gibi bir diğer hücre ölüm yolağı ise nekrozdur. Nekroz; patolojik süreçler sonucunda meydana gelen, hücrelerin pasif olarak ölüme gittiği hücre ölüm yolağıdır (227). Apoptoz ve nekroz birbirinden bağımsız olarak peşpeşe ya da aynı anda görülebilir. Uyarının şiddetine bağlı olarak hücre apoptoz ya da nekroza gidebilir. Isı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik kanser ilaçları gibi faktörlerin düşük dozları hücrede apoptoza neden olurken, yüksek dozlar nekroza neden olabilir (239).

2.7.3. Rapamisin

Rapamisin, *Streptomyces hygroscopicus* bakterisi tarafından üretilen bir metabolittir. İlk olarak antifungal bir ilaç olarak tanımlanmıştır ancak daha sonra bağışıklık sistemini baskılayıcı ve antitümör etki dâhil pek çok farmakolojik özelliği keşfedilmiştir (240). Günümüzde antifungal olarak kullanılsa da rapamisin ve analoglarının, organ naklinde doku reddini önlemek için, renal kanser tedavisinde monoterapi olarak, subependimal dev hücreli astrositom-ilişkili tuberoz skleroz ve kalp damarlarında restenozu önlemek için kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (241, 242).

mTOR'un, genetik ve farmakolojik olarak (örneğin rapamisin) inhibisyonunun maya, solucan, meyve sineği gibi omurgasız hayvanlarda ve farelerde yaşam süresini uzattığı, yaşa bağlı bozuklukları geciktirdiği gösterilmiştir ve rapamisin mTOR inhibitörü olması, "yaşlanma karşıtı ilaç" olabileceği düşüncesini doğurmuştur (213, 243, 244). Rapamisin yaşa bağlı olarak görülen; uzaysal öğrenme ve hafıza bozuklukları, keşifsel aktivitelerde azalma gibi durumları olumlu yönde artırdığı fareler üzerinde gösterilmiştir (245). Rapamisin, otofaji indüksiyonu yaparak yanlış katlanmış proteinlerin birikimini azaltır (246). Ayrıca rapamisin SSS'de vasküler fonksiyonların korunmasından, inflamatuvar süreçlerin engellenmesine kadar çok geniş etkileri vardır (213).

mTORC1'in parçası olduğu bilinen iki substrat; bir serin/treonin kinaz aktivatörü olan S6 kinaz 1 (S6K1) ve ökaryotik inhibitör faktör eIF4E bağlanma proteini 1 (4E-BP1), mTORC1 aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir. Rapamisin, S6K1'in aktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve fosfotidilinositol 3 kinaz (PI3K) sinyalinin de önemli bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (245, 247). Normal koşullar altında mTORC1, S6K/PI3K sinyal iletiminin azalmasına neden olur. Rapamisin ile mTORC1 inhibisyonu ise bu negatif geri bildirim döngüsünü inhibe ederek PI3K sinyalinin artmasını sağlar (245). Rapamisin aynı zamanda mTORC1 aracılı büyüme faktörü reseptör bağlı protein 10 (Grb10) inhibisyonunu engelleyerek de PI3K yolağının aktivasyonunu sağlar (214). Rapamisin, FK506-bağlanma proteini (FKBP-12) ile kompleks oluşturur ve bu kompleks mTORC1'e bağlanarak, mTORC1 birleşiminin allosterik inhibitörü gibi

davranır (245). Rapamisin, mTORC1'i esas olarak Raptor alt birimi üzerinden inhibe eder. Ancak, uzun süreli rapamisin maruziyetinin bazı hücre tiplerinde mTORC1 hariç yeni sentez edilmiş olan mTOR'un mTORC2 kompleksini de inhibe ettiği gösterilmiştir (214).

Kanserin pek çok türünde mutasyona bağlı, mTORC1'in *upstream* düzenleyici onkogenlerde fonksiyon artışı ve tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı nedeniyle mTORC1 aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. mTORC1 aktivasyonu, glikoliz ve lipid biyosentezini artırır. Bu nedenle rapamisin gibi mTORC1 seçici inhibitörlerin, kanser metabolizmasını inhibe ederek anti-kanser etki gösterdiği düşünülmektedir (245).

mTORC1 *upstream* sinyallerinin birleştirilmesi esas olarak tuberoz skleroz kompleks 1 (TSC1) ve 2 (TSC2) seviyesinde oluşur ve bu komplekslerin aktive edilmeleri mTORC1 sinyalinin inhibisyonuna neden olur (218, 245). TSC, epilepsi, kognitif fonksiyon bozukluğu ve otizm gibi pek çok nörolojik hastalıkta rol oynamaktadır. Bu nedenle mTORC1 inhibisyonu nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel tedavi yolağını oluşturmaktadır. mTORC1'in farmakolojik inhibisyonunun Alzheimer hastalığı, PH, Huntington hastalığı gibi pek çok *in vivo* nörodejeneratif hastalık modelinde nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (218, 248, 249).

mTOR sinyali besin ve büyüme faktörlerine cevapta anabolik ve katabolik metabolizmalar arasındaki dengeyi sağlayarak düzenleyici görev görür. mTOR sinyalindeki düzensizlikler diyabet ve obezite gibi birkaç metabolik hastalık ile ilişkili bulunmuştur (214). Rapamisin tedavisinin S6K aracılı geri bildirim mekanizmasını bozarak *in vivo* ve *in vitro* koşullarda insülin duyarlılığını artırdığı, *in vitro* adiposit farklılaşmasını inhibe ettiği ve yüksek yağ diyeti ile beslenen farelerde obeziteye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (250, 251). Bunun yanında; rapamisin tedavisinin tip 2 diyabette beslenmeye bağlı olarak hipoglisemiye kötüleştirildiği, diyet ile indüklenen obezitede glukoz intoleransını kötüleştirildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (252, 253). İki haftalık rapamisin tedavisinden sonra, farelerin pankreaslarının küçüldüğü ve karaciğerlerinin büyüdüğü gözlenirken, daha uzun süreli tedavi sonrasında bu değişikliklerin normal seviyelere dönmesine rağmen adiposit, vücut ağırlığı ve besin tüketiminde ciddi azalma olduğu gözlenmiştir (245).

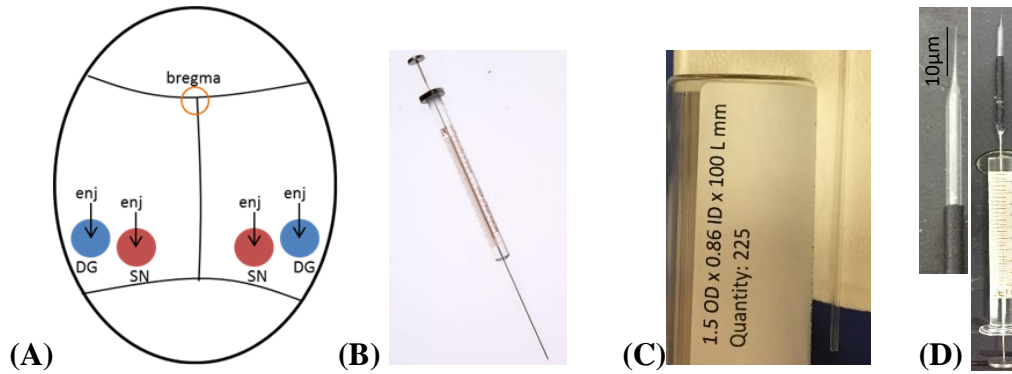
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneyleerde Sprague-Dawley (SD), 200-250 g ağırlığında, uzun süre bir arada yaşayacak oldukları için daha az agresif olan dişi sıçanlar (n=117) kullanıldı. Deneyleerde kullanılan sıçanlar sabit nem ve sıcaklıkta 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda tutuldular. Deney öncesinde ya da deney sırasında sıçanlara herhangi bir yiyecek ya da sıvı kısıtlaması uygulanmadı. Bu araştırmalar Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul izni ile yapılmıştır (toplantı sayısı 2014/08, dosya kayıt numarası 2014/51, karar numarası 2014/51-08).

3.1. Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması

Sıçanlarda Parkinson hastalığı (PH) modeli; “*Chicken β -aktin promoter (CBA)*” içeren Adeno ilişkili viral vektör (AVV) serotip 5 aracılı insan alfa-sinüklein (a-sin) proteini (AAV5-CBA-aSyn, 1.0×10^{13} vg/ml)’nin ve virüs kontrolü olarak yeşil floresan proteini (GFP) (AAV5-CBA-eGFP, 9.5×10^{12} vg/ml)’nin stereotaksik olarak bilateral substantia nigra (SN) ve dentat girus (DG) bölgelerine enjekte edilmesi ile oluşturuldu. PH modeli oluşturulmak üzere stereotaksik olarak enjekte edilen viral vektörler *Michael J Fox* kurumu tarafından hediye olarak verildi. Cerrahi işlem öncesi sıçanlar; kilogram başına 80-100 mg ketamin ve 5-10 mg ksilazin karışımı intraperitonel (i.p) uygulanarak anesteziye edidi. Derin anesteziye geçtikleri pençe kısırtma testi ile doğrulandıktan sonra stereotaksik aparata yerleştirildiler. Baş deri dokusu batikon ile temizlendi ve traş edildi. Kafa derisi 1,5 cm genişliğinde açıldı. Kafatası üzerinde mikroskop yardımı ile bregma bulunarak başlangıç noktası olarak alındı ve *substantia nigra pars compacta* (SNpc)’ya enjeksiyon yapabilmek için streotaksik çerçeve üzerinde koordinatlar Anterior-Posterior (AP)= -5.2, Medio-Materal (ML)= \pm 2.0, Dorsal-Ventral (DV)= -7.2 (tooth bar -2.3), dentat girus (DG) için ise AP= -5.0, ML= \pm 3.5, DV= -2.6 (tooth bar -2.3) olacak şekilde ayarlandı (254, 255). Uygun koordinatlar belirlendikten sonra 1-2 mm genişliğinde delik açıldı (Şekil 3.1. a). Hamilton iğnesinin ucuna virüsün metale değmemesi ve yapışmaması için 10 mm uzunluğunda, 150 μ m dış çapı olan cam kapiller eklendi ve kapillerin ucu, ısı yardımı ile iç açıklığı 50 μ m olacak şekilde ayarlandı (Şekil 3.1. b, c). Hamilton iğnesi

yardımı ile cam kapillere önce 2 µl serum fizyolojik (SF), SF ve virüs süspansiyonunun karışmaması için 1 µl hava ve 2 µl virüs süspansiyonu çekildi (Şekil 3.1. d). Hamilton iğnesi ile uygun derinliğe inildi ve 1 dakika dokunun normale dönmesi için beklenildi. Dakikada 0,4 µl olacak şekilde 30 saniyede bir toplam 2 µl virüs süspansiyonu verildi. Enjeksiyon bitiminde virüsün, kafa içi basıncına bağlı olarak aniden dışarı çıkmasının önlenmesi için; Hamilton iğnesi SN dokusundan çıkarılmadan önce 5 dakika, DG dokusundan çıkarılmadan önce 7 dakika beklendi ve yavaşça dokudan çıkarıldı. Cerrahi işlem sonrası önce batikon ile kafa derisi temizlendikten sonra 3 mm'lik cerrahi iplik ile dikildi.



Şekil 3.1. Enjeksiyon bölgeleri ve enjektörün özellikleri (A) Parkinson hastalığı modeli oluşturmak için yapılan AVV-aracılı virüs süspansiyonunun uygulandığı enjeksiyon bölgeleri, (B) Hamilton iğnesi, (C) Cam kapiller tüp, (D) Enjeksiyona hazır hale getirilmiş hamilton iğnesi

İğnenin ucu kalan doku parçalarının temizlenmesi için öncelikle %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinde bekletildi daha sonra ise H_2O_2 kalıntılarının temizlenmesi için distile suya konuldu. İğnenin ucunda kalmış olan SF ya da süspansiyonun temizlenmesi için ise Hamilton iğnesinin içinden SF geçirildi.

Cerrahi işlem sonrası sıçanlarda sıvı kaybını azaltmak için 1 ml s.c SF ve ağrıları azaltmak için 10 mg/ml dozunda intraperitoneal (i.p) parasetamol enjeksiyonu yapıldı. Sıçanlar uyanana kadar, vücut sıcaklıklarını korumak için ısıtıcı üzerinde tutuldu ve gözlerinde kuruma olmaması için 30 dakikada bir gözlerine SF damlatıldı.

Cerrahi işlem sonrası bir grup sıçana (n=11 a-sin, n=11 GFP, n=8 SF, n=7 kontrol) herhangi bir tedavi uygulanmayarak 16. haftadan itibaren davranış deneylerine başlandı. Sıçanların bir kısmında (n=5 a-sin, n=6 kontrol) cerrahi işlem

sonrası her iki haftada bir lokomotor aktivite testi uygulanarak motor hareketlilik değerlendirildi ve 16. haftada sakrifiye edildi. Oluşturulan Parkinson hastalığı hayvan modelinde rapamisin tedavisinin erken dönem, nöroprotekrif etkisini değerlendirmek için a-sin enjeksiyonunun yapıldığı günden itibaren haftada 3 defa (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) 8 hafta boyunca hem enjeksiyon grubuna hem de kontrol grubuna tedavi ya da çözücü uygulaması yapıldı (a-sin enjeksiyonu yapılan n=8 sıçanda rapamisin tedavisi, n=10 çözücü, kontrol olarak n=5 sıçanda rapamisin tedavisi, n=6 çözücü ayrıca n=4 *naive* kontrol). Patoloji oluştuktan sonra tedavinin hastalığın ilerlemesini engelleyici, nörorestoratif etkisini değerlendirmek için a-sin enjeksiyonu yapıldıktan sonraki 10. haftadan itibaren haftada 3 defa (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) 8 hafta boyunca hem enjeksiyon grubuna hem de kontrol grubuna tedavi ya da çözücü uygulaması yapıldı (a-sin enjeksiyonu yapılan n=10 sıçanda rapamisin tedavisi, n=10 sıçanda çözücü, kontrol olarak n=6 sıçanda rapamisin tedavisi, n=6 sıçanda çözücü ayrıca n=4 *naive* kontrol). (Tablo 3.1.) ve 16. haftadan itibaren davranış deneyleri gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan toplam sıçan sayısı

		Deney Grupları			
		Bilateral SN ve DG a-sin enjeksiyonu	Bilateral SN ve DG GFP enjeksiyonu	Bilateral SN ve DG SF enjeksiyonu	<i>Naive</i> kontrol
tedavi türü	Rapamisin	n=8 ilk 8 hafta	-	-	n=5
		n=10 son 8 hafta			n=6
	Çözücü	n=10 ilk 8 hafta	-	-	n=6
		n=10 son 8 hafta			n=6
	Herhangi bir tedavi uygulanmayan	n=11	n=11	n=8	n=15 [#]
		n=5*			n=6 ^{**}

[#] Karakterizasyon grubunun ve tedavi grubunun toplam *naive* kontrol sayısıdır.

* Bilateral a-sin enjeksiyonunun ardından her iki haftada bir lokomotor aktivite testi yapıp 16. haftada sakrifiye edilen grup

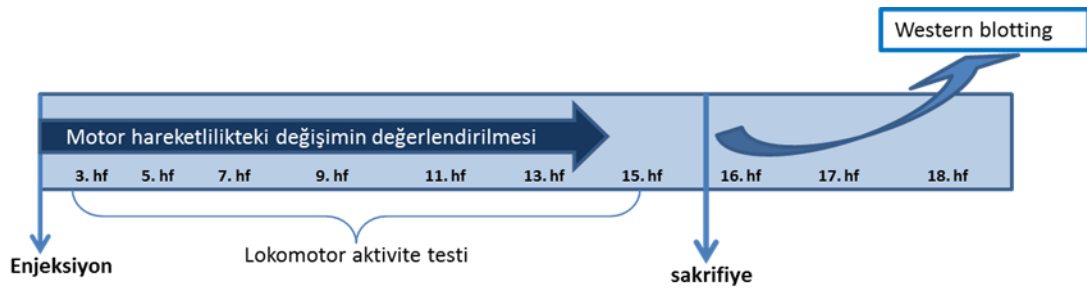
** Herhangi bir işleme tabi tutulmamış sıçanlar, a-sin enjeksiyonu yapılmış sıçanlarla birlikte her iki haftada bir lokomotor aktivite testine tabi tutulup 16. haftada sakrifiye edildi.

3.2. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelinde Tedavinin Uygulanması

Cerrahi işlem ile AAV-aracılı a-sin enjekte edilerek oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde sıçanlara i.p. olarak rapamisin enjekte edilerek etkisi değerlendirildi. Rapamisinin alkoldeki çözünürlüğü 10 mg/ml'dir. 10 mg/ml olarak hazırlanan rapamisin stok solüsyonu son konsantrasyon 1 mg/1 ml olacak şekilde çözücü ile seyreltilti. Çözücü olarak %5 PEG 400 (polietilen glikol 400), %5 Tween 80 ve %4 etil alkol içeren distile su kullanıldı (256). Hazırlanan 1 mg/ml rapamisin çözeltisinden kilogram başına 3 mg/kg olacak şekilde gerekli miktar i.p. olarak uygulandı (256, 257). Aynı şekilde çözücü kontrol grubuna da vücut ağırlıklarına göre çözücü solüsyonundan uygun miktar (3 mg/kg karşılığı) i.p. olarak uygulandı.

3.3. Deney Planı

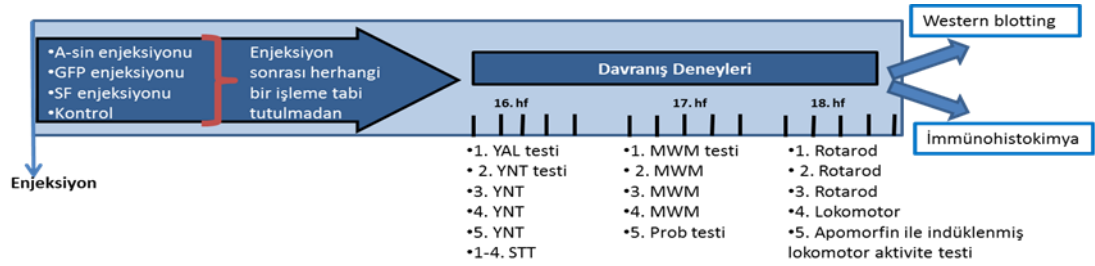
Deneyler 3 bölüm olarak planlandı. İlk bölümde AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun etkisi hafta bazında değerlendirilmek istendi. Bu amaçla enjeksiyon yapılan ilk haftadan itibaren her iki haftada bir lokomotor aktive testi yapılarak, a-sin enjeksiyonunun motor hareketliliğe etkisi değerlendirildi. 16. hafta başında ise moleküler düzeydeki değişiklikleri izlemek için sıçanlar, perfüze edilmeden sakrifiye edildi. Böylece beyinlerde yapılan analizler ile 16-18. haftalar arasında yapılan davranış deneyleri sırasında, 3 hafta içerisinde, moleküler düzeydeki değişiklikler incelenebildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Parkinson hastalığının motor belirtilerinin ilk haftalardan itibaren hayvan modelindeki ilerleyişini göstermek için oluşturulan grubun deney planının şematik gösterimi

İkinci bölümde ise; AAV-aracılı bilateral SN ve DG'ye a-sin enjeksiyonu ile sıçanlarda Parkinson hastalığı modellenerek; hastalığın moleküler düzeyde

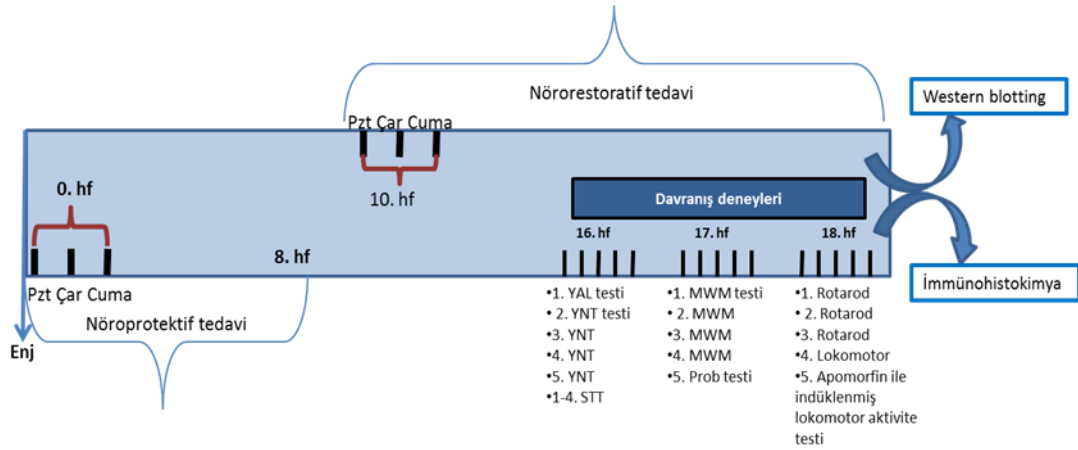
incelenmesi sağlandı ve var olan değişikliklerin davranışa yansımaları gösterildi. Elde edilen etkinin a-sin aşırı ifadesi kaynaklı olduğunu göstermek ve virüsün kendi “etkisi olabileceği ihtimalini dışlamak” için AAV-aracılı GFP enjeksiyonu ve cerrahi işleme bağlı oluşan “hasarı olasılığını elemek” için de SF enjeksiyonu gerçekleştirildi. Bunun dışında bir grup *naive* kontrol olarak kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Parkinson hastalığı hayvan modelini karakterize etmek için oluşturulan ilk grubun deney planının şematik gösterimi

Üçüncü grup ise a-sin aşırı ifadesine bağlı olarak oluşan nöronal ve sinaptik kaybı önlemek ya da durdurmak için tedavi grubu olarak planlandı. İlk olarak bilateral SN ve DG’ye a-sin enjeksiyonu yapılan ilk günden başlanarak 8 hafta boyunca haftada 3 gün 3 mg/kg dozunda rapamisin ya da çözücü i.p. olarak enjekte edildi. Böylece, ilacın nöronları koruyucu etkisinin ölçülmesi planlandı. Sonraki 8 hafta herhangi bir işlem yapılmadan beklenildi ve 16. hafta davranış deneylerine başlandı. İkinci olarak bilateral SN ve DG’ye a-sin enjeksiyon yapıldıktan sonra herhangi bir işlem yapılmadan beklendi ve 10. haftadan itibaren 8 hafta boyunca haftada üç gün 3 mg/kg dozunda rapamisin ya da çözücü i.p. enjekte edildi. Rapamisin tedavisi devam ederken 16. haftadan itibaren yine planlandığı şekilde davranış deneyleri gerçekleştirildi (Şekil 3.4).

Rapamisin tedavisi sonrası sıçanlarda bir miktar kilo kaybı gözlemlendiği için her hafta başında kilo kontrolü yapılarak kilo kaybından ölmeleri için tedavi gruplarında ve ayrıca kontrol gruplarında, ek besine bağlı bir etkiyi elemek için haftada bir gün yemlerin yanına yulaf bisküvi eklendi.



Şekil 3.4. Parkinson hastalığı hayvan modelinde rapamisin tedavisinin etkisini göstermek için oluşturulan tedavi grubu deney planının şematik gösterimi

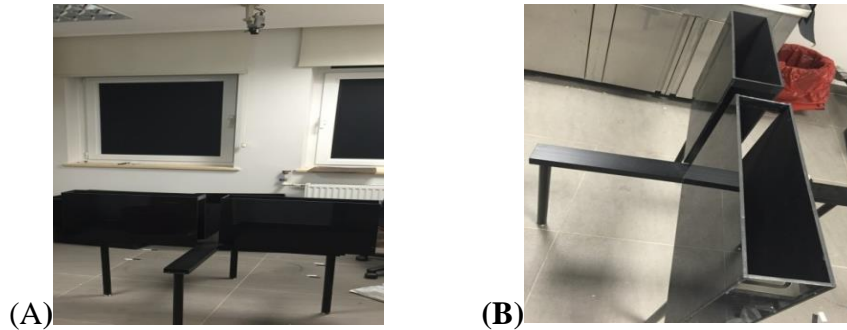
3.4. Davranış Deneyleri

İntraserebral AAV-aracılı bilateral SN ve DG'ye a-sin enjeksiyonu gerçekleştirildikten sonra a-sin aşırı ifadesinin sağlanması ve hücre içinde patolojik çökeleklerin oluşması için belirli bir süre gerekmektedir. Hem literatür değerlendirildiğinde hem de daha önce yapmış olduğumuz pilot çalışmalar göz önüne alındığında hastalığın ileri evrelerinde görülen bilişsel fonksiyon kayıplarının değerlendirilebilmesi için davranış deneyleri öncesi 16 hafta beklenilmesine karar verildi (258). A-sin aşırı ifadesine bağlı oluşan patolojinin motor ve motor-dışı işlevler üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile davranış deneyleri uygulandı. Bütün davranış deneyleri ve analizler kör olarak gerçekleştirildi. Aksiyeteyi azaltmak ve ortama alışmalarını sağlamak için sıçanlar deneye başlamadan 1 saat öncesinde deneyin yapılacağı odaya getirilerek ortama alışmaları sağlandı. Ayrıca; deneylere başlamadan önceki 3 gün boyunca günde 1 saat elde tutularak, deneyi yapacak kişiye alışmaları sağlandı. Davranış deneyleri için daha az stres yaratan ve daha az güç gerektiren testlerden, daha çok güç gerektiren testlere doğru bir sıralama belirlendi. Buna uygun olarak da belirli deneyler arasında 2 gün süre bırakıldı.

3.4.1. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi

Artı şeklinde siyah pleksiglass bir düzenek kullanıldı. Artı şeklindeki düzeneğin tüm kolları yerden 70 cm yükseklikte, 45 cm uzunlukta ve 12 cm genişliktedir. Dört koldan sadece karşılıklı iki kol 45 cm'lik yüksek duvarlarla çevrili olup uçları da kapalıdır. Dört kolun her birine eşit uzaklıkta ortada 12x12 cm'lik kare bir merkez bulunmaktadır (259). Düzeneğin üzerinde tavana sabitlenmiş, hareketleri takip etmeyi ve kayıt etmeyi sağlayan bir kamera bulunmaktadır (Şekil 3.5). Kamera bir bilgisayara bağlıdır ve kameranın kaydetmiş olduğu görüntüler bilgisayarda yüklü bulunan video takip sistemi (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) aracılığıyla analiz edilir. Oda içerisinde sabit basınç ve sıcaklığı sağlayan havalandırma sistemi vardır. Deneyin gerçekleştirildiği oda çok aydınlık olmamalıdır.

Deney sırasında sıçanlar kafesten tek tek alınarak yükseltilmiş artı labirentinin (YAL) orta noktasına yüzleri kapalı olan kollardan birine dönük olacak şekilde konuldu ve 5 dakika boyunca kayıt alındı (260).



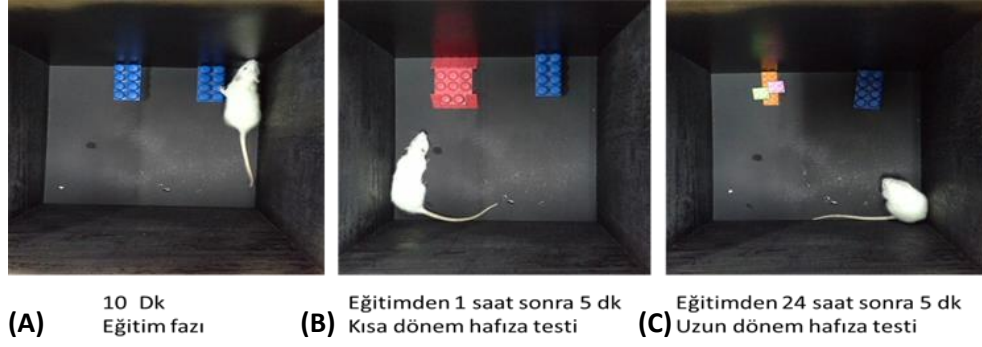
Şekil 3.5. Yükseltilmiş artı labirenti testi düzeneği: (A) Karşıdan görünüşü, (B) Üstten görünüşü

Kayıt ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilen analiz ile her bir sıçanın açık kollarda geçirdiği toplam süre, kaç defa açık kollara uğradıkları, kapalı kollarda geçirdikleri toplam süre ve kaç defa kapalı kollara uğradıkları hesaplandı. Her bir grup için **ortalama açık kolda geçirilen süre/ kapalı kolda geçirilen süre, açık kola uğrama sıklığı/ kapalı kola uğrama sıklığı** hesaplandı (261). Böylece sıçanların aksiyete ve benzeri davranışlar açısından değerlendirilmesi amaçlandı (262). Kayıt sürecinde deney hayvanlarının açık kolda daha çok vakit geçirmesi anksiyete

seviyelerinin düşük olduğunun göstergesidir. Kapalı kollarda geçirilen sürenin artması ise anksiyetenin arttığına işaret etmektedir.

3.4.2. Yeni Nesne Tanıma Testi

Yeni nesne tanıma (YNT) testi, 40x40x40 cm boyutlarında siyah renkli üstü açık kare ahşap kutu kullanılan bir bellek testidir ve hafızayı değerlendirmeyi sağlar (263). Test, YAL testinin yapıldığı odada ve aynı oda koşullarında gerçekleştirildi. Birbiri ile aynı olan 3 adet kutu, tavana sabitlenmiş olan kameranın altına net olarak görülecek şekilde yerleştirildi. Sıçanlar, ilk iki gün boyunca boş kutuya konularak ve 10 dakika kutuyu tanımalarına izin verildi. Böylece kutuya alışmaları sağlandı. Daha sonra eğitim fazı için kutunun arka tarafına kenarlardan 10 cm içerde olacak şekilde birbirinin aynısı iki nesne (aynı legolar) yerleştirildi. Sıçanların arkası nesnelere, yüzü duvara dönük olacak şekilde kutuya konuldu ve nesnelere 10 dakika vakit geçirmesi sağlandı. Test fazı olarak ise; eğitimden 1 saat sonra nesnelere bir tanesi, başka bir nesne (farklı bir lego) ile değiştirildi. Tekrardan yüzleri duvara ve arkaları nesneye dönük olacak şekilde kafesin içine bırakılarak, 5 dakika boyunca nesnelere vakit geçirmeleri sağlandı. 24 saat sonrasında yine yakın dönem belleği test etmek için değiştirilmiş olan nesne bambaşka bir nesne (yeni bir lego) ile değiştirildi ve 5 dk boyunca hem eski nesne hem de yeni eklenen nesne ile vakit geçirmesi sağlandı (Şekil 3.6). Bu test 1 saat sonrasında, kısa dönem bellek testi olarak (263), eğitim fazının üzerinden 24 saat geçtikten sonra yapılan test ise uzun dönem bellek testi olarak uygulandı (264). Bu sırada nesnelere değiştirilirken sağ ya da sol seçimine bağlı yanlış bir yorum olmaması için, aynı gruptan sıçanların bir kısmında sağ taraftaki nesne, bir kısmında ise sol taraftaki nesne, yeni bir nesne ile değiştirildi.



Şekil 3.6. Yeni nesne tanıma testi düzeneği: (A) Birbirinin aynısı iki nesne ile alıştırma yapılan sıçanlara, (B) 1 saat ve (C) 24 saat sonra farklı nesnelere verilerek yakın ve uzak bellek testi yapılır.

Bu sırada video takip sistemi ile sıçanların hareketleri ve nesnelere ne kadar vakit geçirdikleri kayıt edildi. Analiz sırasında da yeni nesne ile % ne kadar vakit geçirdikleri hesaplandı. Normal olarak sıçanların herhangi bir bellek bozukluğu yok ise eski nesneyi tanıdıklarından, yeni nesne ile daha çok vakit geçirmeleri beklenir. Ancak; bellek bozukluğuna bağlı olarak eski nesneyi de unutacağından, yeni nesne ile geçirilen % süre azalır.

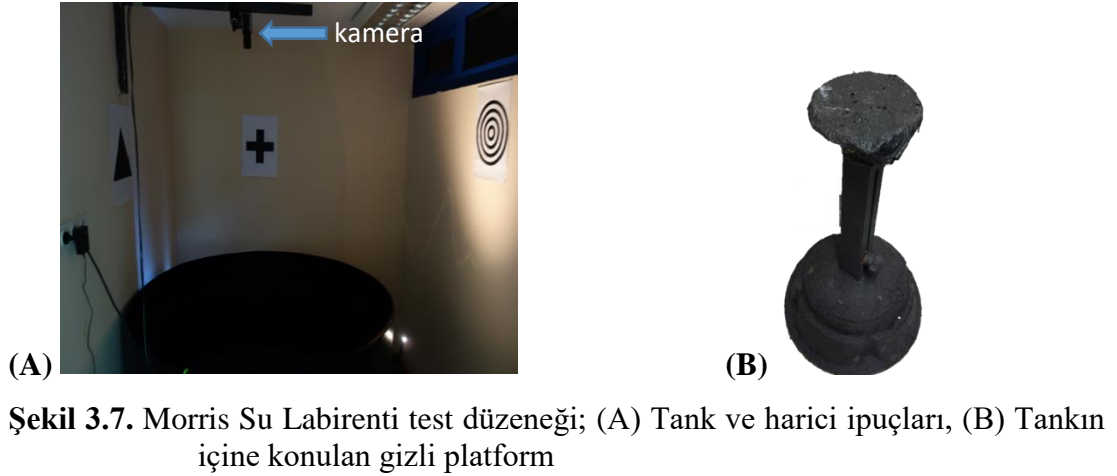
3.4.3. Sükroz Tercih Testi

Alıştırma amaçlı her kafese %2'lik sükrozlu su olan 2 suluk konuldu. 24 saat sonra suluklardan biri (sağ ya da sol) içme suyu ile değiştirildi. Ancak, suluklar kafese konmadan önce başlangıç ağırlıklarını tespit etmek için tartıldı. Daha sonra tüketilen içme suyu ve sükrozlu su miktarını belirlemek için hem kafese konmadan önce hem de 24 saat sonrasında suluklar yeniden tartıldı. Bir hafta boyunca 24 saatte bir içme suları ve sükrozlu sular tartılarak tazelenildi. Her 24 saatte bir içme suyu ve sükrozlu suyun yeri ters yönlerde konarak değiştirildi ki herhangi bir yöne eğilim varsa bu durumun dışlanması hedeflendi. Kafes sayısının az olması ve deney hayvanlarının sayısının çok olması sebebiyle kafeslerdeki sayılar eşit olamadı. Bu nedenle aynı gruptan olan 3 ya da 4 sıçan aynı kafese konuldu. Hesaplama yapılırken; (*başlangıç sükrozlu su miktarı- 24 saat sonraki sükrozlu su miktarı*) ile tüketilen sükroz miktarı bulunur. (*başlangıç içme suyu miktarı- 24 saat sonraki içme suyu miktarı*) ile tüketilen içme suyu miktarı bulunur. Tüketilen toplam sükroz miktarı ölçüldükten

sonra bir kafeste birden fazla sıçan bulunduğu için her birinin ne kadar sükröz tükettiğini belirlemede ağırlıkları esas alındı. Meydana gelen hedoniyi değerlendirmek için her bir sıçan için ayrı ayrı olacak şekilde her gün **% Sükröz Tercih= tüketilen sükröz miktarı (g) / tüketilen toplam sıvı miktarı (g)*100** formülü kullanılarak hesaplama yapıldı (265). Sükröz tercih testi (STT) hedoniyi ölçmek için kullanılan bir testtir ve anhedoni durumunda sükröz tüketiminin azalması beklenmektedir (266). Bu test, bilateral SN'ye a-sin aşırı ifadesine bağlı ventral tegmental alanda (VTA) oluşması beklenen nöron kaybının fonksiyonel göstergesi olan anhedoniyi ölçmek için yapıldı (267).

3.4.4. Morris Su Tankı Testi

140 cm çapında ve 75 cm derinliğinde siyah, daire bir tank kullanılır. Tankın içine eğitimler sırasında ayağı 50 cm yüksekliğinde ve çapı 10 cm genişliğinde olan siyah renkli bir platform (Şekil 3.7.b), odanın girişi kuzey kabul edilerek güneybatı yönünde tankın içine yerleştirildi. Tankın içi platformun üstünü 5 cm geçecek şekilde 24-25°C sıcaklığında su ile dolduruldu. Tankın kenar yüksekliği, tanktan kaçamamaları için su seviyesinin üstünden 20 cm boşluk olacak şekilde ayarlandı. Tankın etrafındaki 4 duvara (kuzey, güney, doğu ve batı yönlerine) yönleri bulabilmeleri için farklı ipuçları yerleştirildi (Şekil 3.7). Odanın içi loş bir ışık ile ipuçları görülecek, ancak platform görülmeyecek şekilde aydınlatıldı. Kamera tankı net olarak görececek şekilde tavana monte edildi. Kamera ve bağlı olduğu video takip sistemi (VideoMot2, TSE Systems, Thuringia, Germany) yardımı ile izledikleri yol, platformu bulma süreleri ve farklı kadranslarda geçirdikleri süreler kayıt edildi. TSE VideoMot2 sisteminin yazılımı ile de analiz edildi.

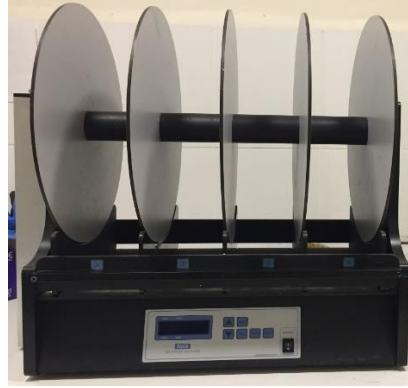


Eğitim için, ilk 4 gün sıçanlar yüzleri tankın duvarına ve arkaları da platforma dönük olacak şekilde, her gün farklı bir kadrandan başlamak koşuluyla 4 farklı kadrandan (platform güneybatı yönünde olduğu için; kuzey, kuzeybatı, güneydoğu ve doğu yönlerinden) tanka bırakılarak 2 dakika boyunca platformu bulmaları için beklendi ve bu işlem gün içerisinde 4 defa tekrarlandı. 2. dakikanın sonunda hala platformu bulamayanların el yardımı ile platforma ulaşmaları sağlandı (268). Platform üzerinde 10 sn etrafı incelemesi ve platformun yerini öğrenmesi için beklendi. Eğitim süresince platformu bulmak için ortalama geçirdikleri süre hesaplandığında ve eğer bu süre kontrol hayvanları için 4. günün sonunda 15 sn'nin altında ise, 5. gün tüm gruplar prob testine tabi tutuldu. Prob testinde; tankın içinde bulunan gizli platform çıkartıldı ve sistem üzerinde yeri işaretlendi. Kuzey kadrından yüzleri duvara dönük olarak suya bırakılan sıçanlarda 90 sn kayıt alındı. Daha sonra platformun daha önce bulunmuş olduğu bölgede ne kadar vakit geçirdiği ve platform bölgesini bulma süreleri analiz edildi. Bu test ile uzaysal hafıza ve öğrenilen bilgilerin geri çağırılabilme yetenekleri “*reconsolidasyon*” test edilmektedir (269). Bilateral DG'ye a-sin enjeksiyonu ile sıçanların uzaysal hafızalarının bozulması ve buna bağlı olarak da platformu bulamamaları ya da daha uzun sürede bulmaları beklenmektedir.

3.4.5. Rotarod Testi

Döner bir mil üzerinde gerçekleştirilir. Belli bir hızla dönen ve hızı giderek artan döner mil (rod/mil) üzerinde sıçanların ne kadar kalabildiği (düşme latansı) ölçülerek motor koordinasyon ve motor öğrenme test edilir. Rotarod cihazı (Commat

Ltd.) 4 bölmeden oluşmaktadır. Her bölümün altında düşmeyi algılayan ve o bölüm için süreyi durduran bir sensör vardır. Her bölüm 40 cm çapındaki silindirlerle birbirlerinden ayrılmıştır. Silindirlerin merkezinden 5 cm çapında mil geçer (Şekil 3.8). Milin dönme hızı 2 ile 48 rpm arasında olabilir ve 1 ile 10 dakika arasında dakika bazında 2 rpm'den başlayarak 48 rpme kadar hızlandırılabilir.



Şekil 3.8. Rotarod motor koordinasyon ve öğrenme testi cihazı

Dengede kalabilmek için; sıçanlar yüzleri dönüş yönünün tersine bakacak şekilde mil üzerine yerleştirildi. Eğer yerleştirildikten 4 saniye ya da daha kısa sürede düşerlerse; yeniden milin üzerine yerleştirilir. Deneyde ilk gün mil üzerinde durmaya alışılması için, bir dakika boyunca sabit 4 rpm hızda mil üzerinde yürümleri sağlandı. Bu işlem 10 dakika ara ile 4 defa tekrarlandı. İkinci gün eğitim fazı olarak; 1 dakika içinde 4 rpm'den 10 rpme kadar hızlandırılan mil üzerinde dengede kalmaları sağlandı ve yine 10 dakika ara ile 4 defa deneme yapıldı. Düşme latansları ve kaç rpm'de (frekansta) düştükleri kayıt edildi. Üçüncü gün test fazında ise; döner mil 300 saniyede (5 dk) 4 rpm'den-44 rpm'e hızlanacak şekilde ayarlandı, düşme latansları ve frekansları kayıt edildi. Test fazında da 10 dk ara ile 4 deneme yapıldı. Her biri için ortalama düşme latansı ve frekansı hesaplanarak motor öğrenme dereceleri belirlendi (270). SN'ye a-sin aşırı ifadesi bilateral olarak sağlanması sebebiyle asimetri beklenmemektedir. Ancak dopaminerjik nöron kaybına bağlı, motor öğrenmede ve koordinasyonda bozukluk beklenmektedir. Motor koordinasyon bozukluğu olduğunda mil üzerinde daha kısa süre dengede durma ve daha düşük frekansta düşmeleri beklenmektedir.

3.4.6. Bazal ve Apomorfin ile İndüklenmiş Açık Alan Lokomotor Aktivite Testi

40X40X40 cm boyutlarında şeffaf pleksiglass malzemedan yapılmış kare kutular ve altında bulunan infrared sensör sistemi ile yatay ve dikey hareketleri algılayan bir düzenek kullanılır. Kafesler kablo aracılığıyla bilgisayara bağlıdır ve kafes içindeki bütün hareketler analiz süresince kayıt edilir (Şekil 3.9). Bilgisayara yüklü yazılım yardımıyla toplam hareket (*stereotipik*: kendi etrafında dönme, koklama, kaşınma, *ambulatory*: durup yeniden harekete başlama ve *vertikal*: arka ekstremiteleri üzerinde yükselme), yürüme, ayağa kalkma, durağan geçirdiği süre ve kat ettikleri mesafe eş zamanlı olarak analiz edilir. Kafes içinde daha yoğun vakit geçirilen bölgeler ve izlenen yol grafiksel olarak da aktarılır.



Şekil 3.9. Lokomotor aktivite kafesleri ve bilgisayar-aracılı analiz sistemi

Test için; kafeslerin içine tek tek konulan sıçanların 1 saat boyunca bazal aktiviteleri analiz edildi. 24 saat sonra 0,5 mg/kg dozunda apomorfin ciltaltına uygulandıktan sonra 1 saat boyunca kayıt alındı ve analiz edildi. Literatür değerlendirildiğinde ve daha önce gerçekleştirdiğimiz deneylerde 1 mg/kg gibi yüksek dozlarda beklenen etki gözlenmediğinden, apomorfin dozu 0,5 mg/kg olarak seçilmiştir (271). Motor fonksiyonları değerlendirmek amacıyla özellikle horizontal hareketde ve kat edilen mesafedeki artma/azalma incelendi. SN'de a-sin aşırı ifadesine bağlı motor fonksiyon kaybının göstergesi olarak bazal harekette azalma ve apomorfin enjeksiyonu sonrası a-sin enjeksiyonu yapılmış sıçanlarda dopaminerjik nöron kaybına bağlı hareketlilikte artış gözlenmesi beklenmektedir (271).

Apomorfinin yarılanma ömrü oldukça kısadır ve etkisi çabuk geçmektedir (272). Ancak yine de diğer davranış deneylerinde apomorfine bağlı olası bir etki görmeyi engellemek için; apomorfine ile indüklenmiş lokomotor aktivite testi davranış deneylerinin en sonucusu olarak planlandı.

3.5. Beyinlerin İzole Edilmesi

Davranış deneylerinin hemen bitiminde deney hayvanlarının bir kısmı immünoablota ile protein düzeyinde meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için CO₂ (karbondioksit) gazı ile sersemletildikten sonra dekapite edildi (Tablo.3.2.). Sürekli oksijenlendirilen dondurulmuş beyin omurilik sıvısı (BOS) üzerine alınan beyinlerde sağ ve sol striatum, hipokampus ve korteksleri ayrılarak sıvı azotta hızlıca donduruldu. Sıvı azotta dondurulmuş olan beyinler, uzun süre saklanmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı. İmmünohistokimyasal incelemeler için ise; diğer bir grup hayvan yüksek doz ketamin/ksilazin karışımı ile uyutulduktan sonra kardiyak olarak perfüze edildi (Tablo.3.2.). Perfüzyon sırasında önce %30'luk heparin geçirilerek kanın vücuttan atılması sağlandı ve daha sonra %4'lük paraformaldehit (PFA) ile dokular fikse edildi. Perfüzyon sonrası beyinler cerrahi olarak çıkartıldı. Çıkartılan beyinler PFA solüsyonunda oda sıcaklığında 24 saat bekletildi ve sonra uzun süre saklamak için %30'luk sükröz solüsyonuna alınarak +4°C'de buzdolabında saklandı.

Tablo 3.2. İmmünohistokimya ve immünoablota için kullanılan deney hayvanı sayısı

		Deney Grupları							
		Bilateral SN ve DG a-sin enjeksiyonu		Bilateral SN ve DG GFP enjeksiyonu		Bilateral SN ve DG SF enjeksiyonu		Naive Kontrol	
		IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB
Tedavi Türü	Rapamisin	n=4 ilk 8 hf	n=4 ilk 8		-		-	n=2	n=3
		n=5son 8 hf	n=5son 8					n=3	n=3
	Çözücü	n=5 ilk 8 hf	n=5 ilk 8		-		-	n=3	n=3
		n=5son 8 hf	n=5son 8					n=3	n=3
	Herhangi bir tedavi uygulanmayan	n=6	n=5	n=6	n=5	n=4	n=4	n=8	n=7

3.6. Beyin Kesitlerinin Saklanması

+4°C’de %30’luk sükröz çözeltisinde saklanan beyinlerden 35 µm kalınlığında mikrotom (Kriostat-Leica CM 1100) yardımı ile kesitler alındı (Şekil 3.10.a). Doku yapıştırıcısı ile metal bir yüzeye sabitlenen beyinler, kuru buz yardımı ile donduruldu. Sıra ile alınan tüm beyin kesitleri, her bir kuyucukta bütün bölgeler olacak şekilde sıralanarak 24’lük *well plate*lerde saklandı (Şekil 3.10.b). Beyinlerin bozulmadan saklanabilmesi için kuyucukların içerisine etilen glikol ve gliserol içeren, bir *anti-freeze* solüsyonu konuldu.



Şekil 3.10. İmmünohistokimyasal boyama için kullanılan cihazlar: (A) mikrotom cihazı, (B) 24’lü *well plate*

3.7. Proteinlerin Ekstraksiyonu

Sıvı azotta dondurulan beyinler, moleküler analiz yapabilmek için homojenize edildi. Bu amaçla hipokampuslar ve striatumlar tek tek tartılarak doku ağırlıklarının 10 katı RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay*) solüsyonu, solüsyonun 1:50 oranında proteaz inhibitör kokteyli (Sigma® P8340-5ml) ve 1:100 oranında fosfataz inhibitör kokteyli (Sigma® P0044-1ml) eklendi. Ultrasonik homojenizatör ile dokular parçalanıp, süspansiyon oluşturana kadar homojenize edildi. Homojenize edilmiş dokular +4°C’de soğutulmuş santrifüj cihazında 14000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pelet ve proteinleri içeren süpernatantlar birbirinden ayrıldı ve ependorflara konarak -80°C’de saklandı.

Süpernatantlarda, immünoiblottama öncesi konsantrasyonu belirlemek için protein tayini yapıldı. Protein konsantrasyon tayininde; *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* kullanıldı. Kitin protokolüne göre; belirli konsantrasyonlarda hazırlanan albuminin absorbans değerleri ölçülerek, denklemi bilinen bir doğru elde edildi. Bu denklemde

konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbands değerleri formüldeki yerlerine konularak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.8 Proteinlerin İmmünblotlama ile Tayin Edilmesi

İmmünblotlama, doku örneklerinde özgül protein miktarının saptanması için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Proteinler jel elektroforezi yöntemi ile negatif yüklendirilerek jelin yapısındaki farklı boyutlardaki porlardan geçerken molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılırlar. Negatif yüklü moleküller artı kutba doğru hareket ederlerken büyük boyutlu moleküller gittikçe daralan porlardan geçemezler yukarlarda kalırlar. Küçük molekülü proteinler ise daha aşağılara kadar hareket ederler. Jel üzerinde boyutlarına göre hızlı ya da yavaş hareket eden proteinlerin görünür hale gelebilmeleri için membrana aktarılması gerekmektedir. Bu işleme de blotlama denir. Membranlar her tür proteini bağlayabilmektedir. Proteinlerin jelden membrana aktarılması özel bir tampon ve elektrik aracılığıyla gerçekleşmektedir. Membrana aktarılan proteinler özel antikolar aracılığıyla görünür hale geçirilir ve farklı örneklerdeki proteinlerin miktarları ölçülerek karşılaştırılmaları sağlanır.

Konsantrasyonları bilinen proteinlerde immünoblotlama ile *semi-quantitative* miktar tayini yapıldı. Öncelikle; örneklerin yükleneceği ideal miktarı belirlemek için optimizasyon yapıldı. Bu amaçla tek bir örneğin artan miktarları jele yüklenerek proteinin doygunluğa ulaştığı miktarı saptandı. Yapmış olduğumuz optimizasyon çalışması sonrasında her örnekten 30 µg yüklemeye karar verildi. 30 µg üzerine toplam hacmin ¼ oranında yükleme tamponu (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), 1/10 oranında %5'lik merkaptolanol eklendi. Bütün kuyucuklarda eşit hacmi sağlamak için kalan miktar distile su ile tamamlandı. Ependorflara hazırlanan yükleme çözeltileri 5 dk, 90°C de kaynatıldı ve 10 sn kadar -20°C'de hızlıca soğutuldu. Yürütme işlemi için Nu-PAGE™ %4-12'lik Bis-Tris 1.0mm 10 ve 12 kuyucuklu (Novex, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) hazır jeller kullanıldı. Jeller elektroforez cihazına yerleştirildi. Jellerin arasına ve dış kısmına yürütme için gerekli miktarda yürütme tamponu 2-(N-morfolino) ethan sulfonik asit (MES, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) konuldu. Proteinlerin yüklenmesi ve ayrıştırılması Sodyum

dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sisteminde gerçekleştirildi. İlk kuyucuğa moleküler ağırlık belirteci (SeeBlue® Plus2 Prestained Standart, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) yüklendikten sonra diğer kuyucuklara örnekler yüklendi. Yürütme işlemi 100 voltta 90 dakika gerçekleştirildi. Yürütme işlemi devam ederken Polivinilidinden Florid (PVDF) membranın aktive edilmesi için oda sıcaklığında 5 dk metanol, 1 dk distile su ve 20 dk transfer tamponu (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile çalkalandı. Jel çıkarıldıktan sonra membran altta, jel üstte olacak şekilde transfer cihazına yerleştirildi. Tek membran için akım şiddeti 120 mA olacak şekilde 3 saat 15 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer aşamasından sonra membranlar, spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak ve kirliliği engellemek için oda sıcaklığında %5 yağsız süt tozu eklenmiş %0,1 tween20 içeren tris tamponu (TBS-t) ile çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloke edildi. Blokaj işleminden sonra membranlar, primer antikor ile üretici protokolüne göre uygun süre ve oranda oda sıcaklığında ya da buzdolabında %5 yağsız süt tozu içeren TBS-t içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra bağlanmamış primer antikorların temizlenmesi için 3 defa 10 dakika boyunca TBS-t ile yıkama yapıldı ve daha sonra primere özgül sekonder antikor ile üretici protokolüne göre uygun süre ve oranda oda sıcaklığında %5 yağsız süt tozu içeren TBS-t içerisinde inkübasyon gerçekleştirildi. Sekonder antikor kirliliğini engellemek için 2 kere 10 dakika TBS-t ile, 1 kere 5 dakika distile su ile yıkama yapıldı.

Sekonder antikorda *horse radish peroxidase* (HRP) enzim sistemleri vardır ve ortama kemoluminesans eklendiği zaman tepkimeye girerek ışımaya sağlarlar. Böylece incelenen protein görünür hale gelir. Şeffaf plastik dosyaya konan membranın üzerine 1 ml kemoluminesans (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products, 34095) eklenerek tüm membran yüzeyinin temas etmesi sağlandı. Image Station 4000 MM (kodak) ve Caresteam MI yazılımı kullanılarak membrandaki bantların dijital görüntüleri elde edildi. Resim formatında kaydedilen görüntünün ImageJ yazılımı aracılığıyla dansiteleri ölçüldü.

Yüklemeden kaynaklanabilecek farklılıkları engellemek için beta-aktin, tübülün gibi örnekler arasında değişmesi beklenmeyen yapısal proteinlerin de miktarları ölçüldü. Bu çalışmada standardizasyon için örnek proteinin optik

yoğunluğu/ yükleme kontrolü (tübülün III ya da beta-aktin) optik yoğunluğu hesaplandı.

Aynı membran üzerinde birden fazla protein görüntülenmek istendiğinde protein sinyallerinin birbirini etkilememesi için orta derecede *stripping* uygulandı. Bu amaçla; glisin, SDS ve tween 20 ile hazırlanan düşük pH'li *stripping* solüsyonu ile 2 kere 10 dakika muamele edildi. 2 kere 10 dakika fosfat tamponu ve 2 kere 5 dakika TBS-t ile yıkama yapıldıktan sonra 1 saat %5 yağsız süt tozu içeren TBS-t blokaj yapılıp ardından primer antikor ile inkübasyona bırakıldı.

Alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan grupta ekspresyonun varlığını göstermek için immünoiblottlama ile optik yoğunluk hesaplandı. Ancak; a-sin monomerleri membrandan kolayca kopabildiği için membranda bantları tespit etmek özellikle de hipokampus bölgesinde oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle; önce %0,4 PFA içeren fosfat tamponu (PBS) ile 30 dakika fikse edilen membranlar, daha sonrasında yine 1 saat %5 yağsız süt tozu içeren TBS-t ile bloke edildi ve primer antikor ile inkübasyona bırakıldı (273).

3.9. Kesitlerin İmmünohistokimyasal Boyanması

Mikrotom ile 35µm kalınlığında alınan kesitlerde histopatolojik inceleme ve a-sin/GFP aşırı ifadesini teyit etmek amacıyla *free-float* olarak immünohistokimyasal (IHC) boyama yapılmıştır. Bu yöntemde dokulardan *anti-freeze*'in uzaklaştırılması için öncelikle Tris-HCl (pH 7,6) solüsyonu ile 2 defa 5 dakika yıkandı. Membranların geçirgenliğini artırmak amacıyla metanol ve %30 H₂O₂ içeren *quenching* çözeltisi ile 20 dakika muamele edildi. *Quenching* çözeltisini uzaklaştırmak için 4 defa 5 dakika %0,05 triton-X 100 içeren Tris, NaCl tuz tamponu pH 7,6 (TBS) ile yıkama yapıldı. Görüntüleme sırasında kirliliği azaltmak için 10 dakika boyunca %0,25 triton-X 100 (sigma) içeren TBS (TBS-T) içerisinde protein blokaj solüsyonu (Acu-stain HRP Kit, Genemed) ile blokaj yapıldı. Ardından %0,05'lik TBS-T solüsyonuna blokaj solüsyonu ve uygun miktarlarda primer antikorlar eklenerek gün aşırı inkübasyona bırakıldı. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. İkinci gün primer antikordan arındırmak için 3 defa 10 dakika TBS ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından %0,05'lik TBS-T içeresine IHC kitinin biotinlenmiş sekonder

içeren solüsyondan (Acu-stain HRP Kit, Genemed) damlatılarak 10 dakika inkübe edildi. 3 defa 10 dakika %0,05'lik TBS-T ile yıkamanın ardından IHC kitinin Streptoavidin-peroksidaz içeren solüsyonundan %0,05'lik TBS-T içerisine damlatılarak 10 dakika inkübe edildi. Böylece streptoavidin-peroksidaz kompleksi sekonder antikora bağlanarak ilgi moleküllerin tespit edilebilir hale gelmesi sağlandı. Dokulardan sekonderi uzaklaştırmak için 2 defa 10 dakika TBS-T ve 1 defa 10 dakika Tris-HCl çözeltisi ile yıkandı. Bağlanılan proteinin görünür hale gelmesi için 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ile muamele edildi. Bütün aşamalar oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. DAB ile boyama için ticari olarak satın alınan DAB kiti (Power-Stain™ 1.0 Poly HRP DAB Kit, Genemed) kullanıldı. DAB karışımı eklendikten sonra kuyucuklara reaksiyonu hızlandırmak için bir damla H₂O₂ eklenerek hafifçe çalkalandı ve dokuların kahverengini alması beklendi. DAB reaksiyonunu durdurmak için dokular Tris-HCl pH 7.6 çözeltisi ile yıkandı. Tris-HCl içerisinde yüzer vaziyette bulunan dokular poli-L-lizin ile kaplanmış lam üzerine fırça yardımı ile sabitlendi. Dokular lam üzerine alındıktan sonra en az 1 gün kuruması için oda sıcaklığında üzerleri açık olarak beklendi. Uzun süreli saklayabilmek için dokular dehidrate ve rehidrate edilerek lamel ile kapatıldı. Bunun için öncelikle 1 dakika distile suda daha sonra dehidrate etmek için artan konsantrasyonda %70 ve %90'lık etil alkolde ikişer dakika, %100 ve %100'lük etil alkolde ise üçer dakika bekletildi. Rehidrate etmek için ise ksilen içerisinde 10 dakika bekletildi. Dokular ksilenden alındıktan sonra üzerine entellan doku yapıştırıcısı (Sigma) damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.10. Deneyde Kullanılan Çözeltiler ve Antikorlar

Moleküler düzeydeki değişiklikleri incelemek ve analiz edebilmek için uygulanan immünohistokimya ve immünoiblottlama yöntemlerinde çeşitli antikorlar kullanılmıştır.

3.10.1. Primer Antikorlar

Monoklonal anti-alfa-sinüklein (a-sin): (1:1000 dilüsyon, ab80627, Abcam, Birleşik Krallık). AVV-aracılı a-sin stereotaksik enjeksiyonu sonrası a-sin aşırı ifadesini teyit etmek için kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal bir antikordur ve insana özel olan a-sin proteinine bağlanır. Sıçan ya da fare ile çapraz reaksiyon göstermez. Hem immünohistokimyasal boyamalarda hem de immünoblotlama çalışmalarında kullanılabilir. İmmünoblotlama ile bu antikor 19 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Monoklonal anti-alfa-sinüklein (a-sin): (1:1000 dilüsyon, MA1-90346, Thermo Fischer Scientific, ABD). Farede üretilmiş monoklonal bir antikordur ve insana özel olan a-sin proteinine bağlanır. Sıçan ya da fare ile çapraz reaksiyon göstermez. immünoblotlama ile bu antikor 27 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir. İmmünoblotlama ile GFP miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı.

Monoklonal anti-alfa sinüklein (phospho S129): (1:1000 dilüsyon, Abcam, Birleşik Krallık). Tavşanda üretilmiş monoklonal bir antikordur. Sadece Ser129'dan fosforillenmiş a-sinleri tanır. Fosforile a-sin, sağlıklı bir insan beyni hipokampusünde herhangi bir boyanmaya neden olmazken, Parkinson hastalarının beyinlerinde boyanma gerçekleştirir. Patolojik a-sinlerin belirlenmesi için immünoblotlama yönteminde kullanılmıştır. İmmünoblotlama ile bu antikor 14 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Poliklonal anti-green floresan protein (GFP): (1:2000 dilüsyon, ab13970, Abcam, Birleşik Krallık). AVV-aracılı GFP stereotaksik enjeksiyonu sonrası GFP aşırı ifadesini teyit etmek için kullanıldı. Tavukta üretilmiş poliklonal bir antikordur. Enerji-transferi alıcısıdır. Enerji transferi ile ekörin proteininin mavi kemoluminesansını yeşil floresan ışığına çevirir. Floresan *in vivo* olarak Ca^{+2} ile aktive olan ekörin fotoproteininden enerji alır. İmmünoblotlama ile bu antikor 19 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir. İmmünoblotlama yöntemi ile a-sin miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı.

Monoklonal anti-tirozin hidroksilaz (TH): (1:1000 dilüsyon, ab75875, Abcam, Birleşik Krallık). Dopaminerjik denervasyon miktarını tespit etmek amacıyla immünohistokimyasal olarak boyanan striatum ve SN doku örneklerinde TH enzim

düzeylerinin saptaması için kullanıldı. Ayrıca; immünoablottama yöntemi ile TH miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Tavşanda üretilmiş monoklonal bir antikordur ve TH enziminin N terminal bölgesinde 50-150. amino asitler arasını tanır. Sıçan beyin dokusunda, immünoablottama ile bu antikor 59 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Monoklonal anti-Nöronal Çekirdek Antijeni (NeuN): (1:1000 dilüsyon; MAB377B, Merck Millipore, Almanya). NeuN; bütün omurgalıların santral ve periferik sinir sisteminin pek çok nöronal hücresinde bulunan, DNA-bağlanan nörona özel NeuN proteinini tanır. Hem immünohistokimyasal boyamada hem de immünoablottama yöntemi ile NeuN miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal bir antikordur. İmmünoablottama ile bu antikor 62 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Monoklonal anti-sinaptofizin: (1:1000 (IHC); 1:300 (WB) dilüsyon, S 5768, Sigma-Aldrich Inc, ABD). Hem immünohistokimyasal boyama sonrasında sinaptik dansitenin ölçülmesinde hem de immünoablottama yöntemi ile sinaptofizin miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal bir antikordur, immünoablottama ile 38 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Poliklonal anti-ALDH1L1: (1:1000 dilüsyon, ab87117, Abcam, Birleşik Krallık). Aldehit dehidrogenaz 1 L1 ailesine ait bir enzimdir ve astrosit belirteci olarak kullanılır. İmmünoablottama ile ALDH1L1 miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Tavşanda üretilmiş poliklonal bir antikordur, immünoablottama ile 100 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Poliklonal anti-iyonize kalsiyum bağlayan adaptör protein 1 (İba-1): (1:1000 dilüsyon, 19-19741, Wako chemicals, ABD). İba-1 özel olarak mikroglia ve makrofajlar ile etkileşime giren bir proteindir. İmmünohistokimyasal boyama ile beyindeki mikroglial aktiviteyi tayin etmek için İba-1 boyaması yapıldı.

Poliklonal anti-LC3B: (1:1000 dilüsyon, ab48394, Abcam, Birleşik Krallık). İnsan LC3 protein sekansının 1-100 arasındaki N-terminal ucuna bağlanan sentetik bir peptittir. Otofagozomal veziküllerin oluşumunda görev alır. İmmünoablottama ile LC3 I/II miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Tavşanda üretilmiş

poliklonal bir antikordur, immüno blotlama ile 16 ve 17 kDa moleküler ağırlıklarında bantlar şeklinde bir sinyal verir.

Monoklonal anti-SQSTM1/p62: (1:2000 dilüsyon, ab56416, Abcam, Birleşik Krallık). Ubikutine bağlanan adaptör bir proteindir. İmmüno blotlama ile p62 miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal bir antikordur, immüno blotlama ile 60 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir.

Poliklonal anti-kaspaz 3: (1:500 dilüsyon, ab4051, Abcam, Birleşik Krallık). Apoptotik cevapta görev alan kaspaz kaskadının aktivasyonundan sorumlu proteindir. İmmüno blotlama ile kaspaz 3 miktarının semi-kantitatif hesaplanmasında kullanıldı. Tavşanda üretilmiş poliklonal bir antikordur, immüno blotlama ile 32 kDa ve 55 kDa moleküler ağırlıklarında bant şeklinde bir sinyal verir.

Monoklonal anti-Beta-aktin: (1:7500 dilüsyon, A2228, Sigma-Aldrich Inc, ABD) Yükleme kontrolü proteini olarak beta-aktin kullanıldı. Farede üretilmiş monoklonal bir antikordur ve aktin proteinin beta izoformunun N-terminalindeki epitopu tanımaktadır. İmmüno blotlama ile 42 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir. Diğer primer antikolar ile elde edilen bant yoğunlukları aynı örneğin β -aktin ile elde edilen bant yoğunluğuna oranlanarak rölatif yoğunluk değerleri elde edildi ve gruplar arası karşılaştırma bu değerler üzerinden yapıldı.

Poliklonal anti- β -Tubulin III: (1:7500 dilüsyon, A2200, Sigma-Aldrich Inc, ABD) Yükleme kontrolü proteini olarak beta-tubulin III kullanıldı. Tavşanda üretilmiş poliklonal bir antikordur. İmmüno blotlama ile 50 kDa moleküler ağırlığında bant şeklinde bir sinyal verir. Diğer primer antikolar ile elde edilen bant yoğunlukları aynı örneğin β -aktin ile elde edilen bant yoğunluğuna oranlanarak rölatif yoğunluk değerleri elde edildi ve gruplar arası karşılaştırma bu değerler üzerinden yapıldı.

3.10.2. Sekonder antikolar

IHC de GFP primer antikoru ile bağlanan proteinlerin DAB reaksiyonu ile görünür hale gelmesinde HRP bağlı *anti-chicken* (ab6753, Abcam, Birleşik Krallık) antikoru kullanıldı. İmmüno blotlama için primer antikolar ile oluşturulan bantların görüntülenebilmesi için HRP bağlı *anti-mouse* (7076, Cell Signaling Technology Inc,

ABD), anti-rabbit (7074, Cell Signaling Technology Inc, ABD) ve *anti-chicken* (ab6753, Abcam, Birleşik Krallık) sekonder antikoları kullanıldı.

3.10.3. Kullanılan Çözeltiler

Yapay Beyin Omurilik Sıvısı:

Sodyum klorür (NaCl)	120 mM
Potasyum klorür (KCl)	2.5 mM
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2 mM
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	2 mM
Sodyum bikorbonat (NaHCO ₃)	26 mM
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	1.25 mM
Glukoz (D-Glukoz.H ₂ O)	10 mM

CaCl₂ ayrı bir kapta çözülür. Diğer maddeler çözülüp 5%CO₂ ve 95%O₂ ile oksijenlendirildikten sonra karışımın içine CaCl₂ damla damla eklenir ve oksijenlendirilmeye devam edilir. pH 7,4 ve sıcaklığı 28-30°C ayarlanır.

Radioimmunoprecipitation Assay Tamponu (RIPA)

NaCl	150 mM
Triton-X	%0.1
Sodyum Deoksikolat (DOC)	%0.5
%20 SDS	%0.1
Tris pH 8.0	50 mM
Proteaz İnhibitör Kokteyli	1:50 oranında
Fosfataz İnhibitör Kokteyli	1:100 oranında

Proteaz ve fosfataz inhibitörleri beyinler homojenize edilmeden hemen önce eklenir.

Anti-freeze Çözeltisi

	<u>1000 ml</u>
Sodyum fosfat monobazik (Na ₂ H ₂ PO ₄ .H ₂ O)	13.75 g
Sodyum fosfat dibazik heptahidrat (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	25.75 g
Distile su	400 ml
Etilen glikol	300 ml
Gliserol	300 ml

Paraformaldehit (PFA)**100 ml**

Di-natriumhidrojen (Na_2HPO_4)	2.9 g
Natriumdihidrojen (NaH_2PO_4)	0,23 g
Paraformaldehit	4 g
PBS	100 ml

Yüksek pH derecesinde ısıtılarak hepsi çözülür. Maddeler çözüldükten sonra pH 7,4'e ayarlanır.

***Strip* Tampon Çözeltisi**

Glisin	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml
Distile su	

Bütün maddeler karıştırılır ve bir miktar distile su içerisinde çözülür. pH 2,2'ye ayarlanır ve daha sonra toplam çözelti 1 L'ye tamamlanır.

***Quenching* (Permeabilizasyon) Çözeltisi**

%30 H_2O_2	%10
Metanol	%10
Tris-HCl	%100'e tamamlanır.

%30 Hidrojen Peroksit Çözeltisi

H_2O_2	30 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

Fosfat Tamponu (PBS)

Fosfat tampon tablet	1 adet
Distile su	500 ml

Tris-HCl Çözeltisi (TBS)

Tris Baz	0.05 M
NaCl	0.15 M
Distile su	1 L

Tris baz ve NaCl distile suda çözülür ve pH 7,6'ya ayarlanır.

TBS-T Çözeltisi

Triton-x-100	%0,05
TBS	100 ml

TBS-t Çözeltisi

Tween 20	% 0,1
TBS	100 ml

Blokaj Çözeltisi

Yağsız süt tozu	%5
TBS-t	100 ml

Sükroz Çözeltisi

Sükroz	300 mg
Distile su	1000 ml

3.10.4. Kullanılan Kitler

BCA protein tayin kiti (Thermo Scientific Pierce™ 23225)

IHC boyama kiti (Genemed Acu-Stain™ 54-0003)

DAB kiti (Genemed Sensitive DAB Substrate Kit 10-0048)

Lüminesans kiti (Thermo Scientific SuperSignal® West Femto 34096)

3.10.5. Kullanılan Cihazlar

Stereotaksi cihazı (Kopf, ABD), diseksiyon mikroskobu (Leica S8AP0, Almanya), mikrotom (Leica SM200R, Almanya), mikroskop (Nicon Eclipse E600, Japonya), *video tracking* sistemi (TSE VideoMot2, Almanya), *video tracking* sistemi yazılımı (TSE VideoMot2, Almanya), EthoVision *Video Tracking* Sistemi (Noldus, Hollanda), NIS Elements Ar Mikroskop Görüntüleme Yazılımı (Nicon, Japonya), pH metre, vorteks, immünblot sürükleme cihazı, BioRad Mini Protean Tetra Cell (BioRad, ABD), sürükleme cihazı güç kaynağı, BioRad PowerPac (Bio-Rad, ABD), transfer cihazı (Hofer, ABD), elektroforez güç kaynağı (Consort, Belçika), soğutmalı mikrosantrifuj (Kubata, Japonya), mikroplak okuyucu (Biotek Powerwave XS2,

ABD), kemiluminesans *Image Station 4000 MM* (Kodak, ABD), Kodak *Molecular Imaging* yazılımını (version 5.0, Kodak, ABD)

3.11. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda *Student*'in *t* testi, ikiden fazla olan gruplar arasındaki karşılaştırmalarda; gruplar normal dağılım gösterdiğinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılım göstermediğinde ise nonparametrik testlerden olan Kruskal Wallis testi uygulandı. *Post-hoc* test olarak ANOVA'nın ardından *Tukey'in* ya da *Sidak'in* çoklu karşılaştırma testi, Kruskal Wallis'in ardından ise *Dunn'in* çoklu karşılaştırma testleri uygulandı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kontrol gruplarına ANOVA uygulanarak, gruplar arasında bir fark olmadığında (*naive* kontrol, SF ve GFP kontrolleri) alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılmış deney grubunun herhangi bir kontrol grubundan farklı olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

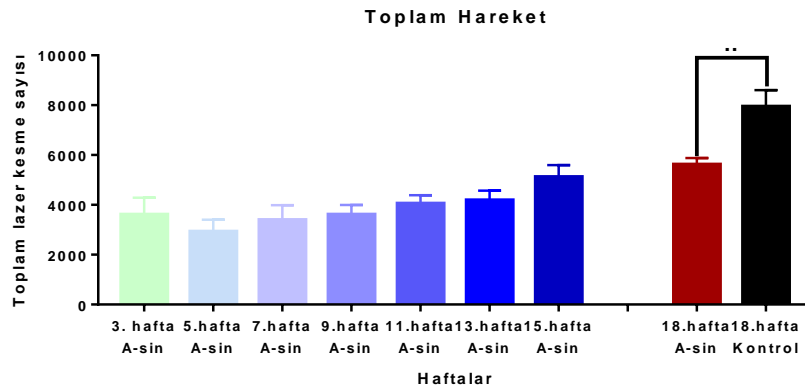
4.1. Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması

Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonu yapılarak 18 hafta içerisinde zamana bağlı olarak a-sin aşırı ifadesi sağlanmış ve Parkinson hastalığı benzeri patoloji oluşturulmuştur. Bu patoloji hem davranışsal olarak hem de moleküler düzeyde aşağıda belirtilen deneylerle değerlendirilmiştir.

4.2. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG'ye Alfa-sinüklein Enjeksiyonunun Başlangıcından İtibaren Lokomotor Aktivitede Meydana Gelen Değişiklikler

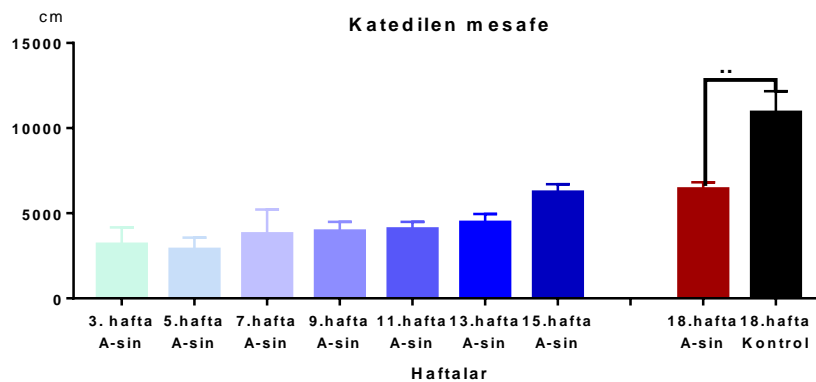
A-sin enjeksiyonun zaman içerisinde neden olduğu patolojiyi daha detaylı olarak görebilmek ve zamansal olarak değerlendirebilmek için ayrı bir deney grubu oluşturuldu. Bu deney grubuna bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanmasının hareketliliğe ve motor fonksiyona olan etkisi lokomotor aktivite testi ile 3. haftadan itibaren 16. haftaya kadar 2 haftada bir değerlendirildi. Hem yatay hem de dikey düzlemdeki hareketler, kat edilen mesafe ve stereotipik hareketler 1 saat boyunca kayıt edildi.

AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş grupta her 2 haftada bir yapılan lokomotor aktivite testinde enjeksiyon yapıldıktan sonra ilk beş hafta hareketlilikte azalma daha sonrasında ise tekrardan bir artış gözlemlendi. Grup içinde haftalar arasında hareketlilikteki artış ve azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak karakterizasyon grubunun *naive* kontrol ve a-sin enjekte edilmiş grubunun 18. haftadaki lokomotor aktivite test sonucu eklendiği zaman 15. haftadaki toplam hareketin 18. hafta a-sin grubuna benzer ve *naive* kontrol grubundan az olduğu gözlemlendi. Ancak, grupların farklı olmasından dolayı istatistiksel olarak analiz yapılmadı. 18. haftada a-sin enjekte edilmiş grubun kontrol grubuna oranla toplam hareket miktarında azalma bulundu ($p=0,0022$ a-sin_{18. hafta} ($5621 \pm 257,8$) vs kontrol_{18.hafta} ($7943 \pm 661,9$); Şekil 4.1).



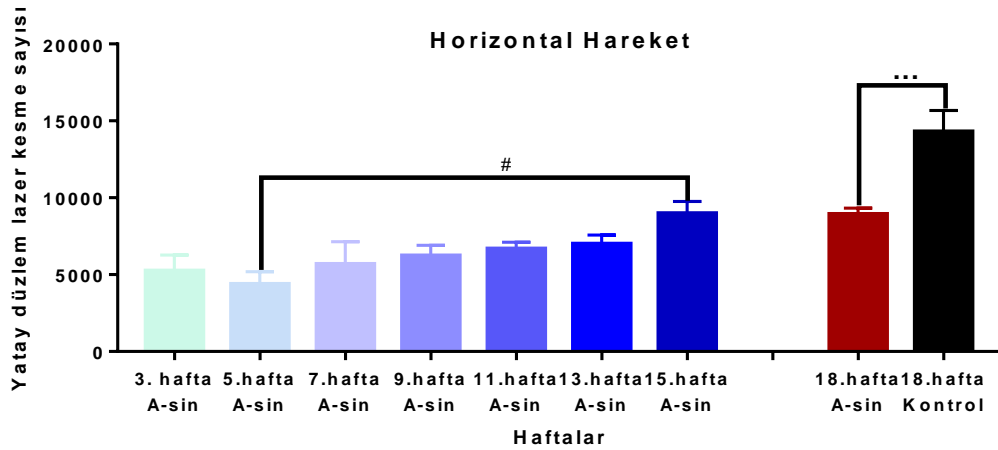
Şekil 4.1. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun toplam hareket miktarına etkisi (** $p < 0,01$ 18. hafta_{a-sin} vs 18. hafta_{kontrol}, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin}=5$ (3.hafta), $n_{a-sin}=4$ (5., 7., 9., 11., 13., 15.hafta), $n_{a-sin}=10$ (18.hafta), $n_{kontrol}=7$ (18.hafta); tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; eşlenmemiş veriler için *Student'in t* testi uygulanmıştır).

AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş grubun her 2 haftada bir yapılan açık alan lokomotor aktivite testinde "toplam hareket"e benzer şekilde "kat edilen mesafe"nin de ilk 5 hafta azaldığı, daha sonrasında arttığı gözlemlendi. Ancak, grup içinde haftalar arasında hareketlilikteki artış ve azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. 18. haftada a-sin enjekte edilmiş grubun aynı dönemde teste tabi tutulan kontrol grubuna oranla kat ettiği mesafe daha az bulundu ($p=0,0014$ a-sin_{18. hafta} ($6415 \pm 402,7$) vs kontrol_{18.hafta} (10916 ± 1248); Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun kat edilen mesafeye etkisi (** $p < 0,01$ 18. hafta_{a-sin} vs 18. hafta_{kontrol}, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $N_{a-sin}=5$ (3. hafta), $n_{a-sin}=4$ (5., 7., 9., 11., 13., 15. hafta), $n_{a-sin}=10$ (18. hafta), $n_{kontrol}=7$ (18. hafta); tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; eşlenmemiş veriler için *Student'in t* testi uygulanmıştır).

AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş grubun 2 haftada bir yapılan açık alan lokomotor aktivite testinde 5. hafta horizontal aktivitenin 15. haftaya oranla daha az olduğu hesaplandı ($p=0.0269$ a-sin_{5.hafta} (4370 ± 817) vs a-sin_{15.hafta} ($8977\pm 788,1$)). 18. haftada a-sin enjekte edilmiş grubun aynı dönemde teste tabi tutulan kontrol grubuna oranla horizontal aktivite miktarının daha az olduğu bulundu ($p=0.0006$ a-sin_{18.hafta} ($8928 \pm 394,3$) vs kontrol_{18.hafta} (14300 ± 1378); Şekil 4.3).



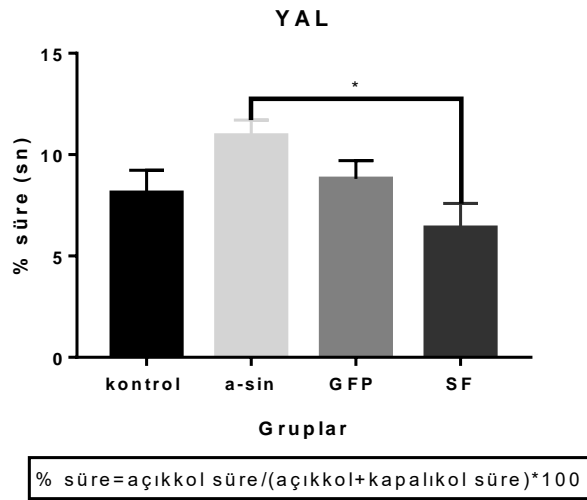
Şekil 4.3. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun horizontal aktiviteye etkisi (# $p<0,05$ 5. hafta_{a-sin} vs 15. hafta_{a-sin}, *** $p<0,01$ 18. hafta_{a-sin} vs 18. hafta_{kontrol}, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin}=5$ (3. hafta), $n_{a-sin}=4$ (5., 7., 9., 11., 13., 15. hafta), $n_{a-sin}=10$ (18. hafta), $n_{kontrol}=7$ (18. hafta); tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; eşlenmemiş veriler için *Student'in t* testi uygulanmıştır).

4.3. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Davranış Deneyleri ile Karakterizasyonu

Yeni bir grup sıçan, AAV-aracılı bilateral SN ve DG'ye a-sin enjeksiyonu yapıp, 16 hafta boyunca hastalığın patolojisinin oluşması için hiçbir ek işlem yapılmadan normal şartlar altında yaşatıldı. 16. haftadan itibaren var olan patolojinin davranışsal olarak meydana getirdiği değişiklikler davranış deneyleri ile test edildi.

4.3.1. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Aksiyete Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin aksiyete üzerine etkisi yükseltilmiş artı labirenti testi ile değerlendirildi. YAL testine göre kontrol grupları arasında fark yokken (GFP enjekte edilmiş, SF enjekte edilmiş hayvanlar ve *naive* kontrol hayvanları), bilateral SN ve DG’ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların, açık kolda daha çok vakit geçirdikleri gözlemlendi ($p=0,0115$ a-sin ($10,9\pm0,8$) vs SF ($6,3\pm1,2$), Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sıçanlarda bilateral SN ve DG’ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun YAL testine göre açık kolda geçirilen süreyi etkisi (* $p < 0,05$ a-sin vs SF grubu, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n=7$ a-sin, $n=8$ GFP, $n=7$ SF, $n=6$ *naive* kontrol; tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından *post hoc* Tukey’in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

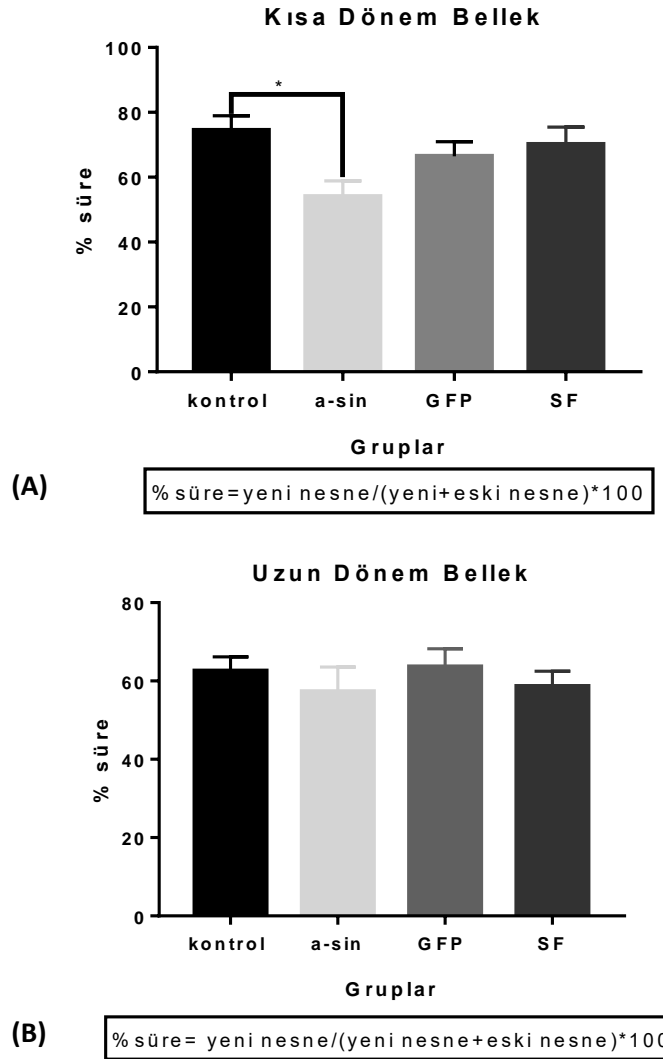
4.3.2. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Hafıza Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hafızaya etkisi yeni nesne tanıma (YNT) testi ile değerlendirildi. Nesnelere tanıtıldıktan 1 saat sonra gerçekleştirilen test ile yakın dönem bellek, 24 saat sonra ise uzun dönem bellek fonksiyonları değerlendirildi.

YNT testinde 1 saat sonra % yeni nesne ile geçirilen vakitte kontrol grupları arasında fark görülmezken, bilateral SN ve DG’ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş

sıçanların daha az vakit geçirirdikleri gözlenmiştir ($p=0,0128$ a-sin ($54\pm 4,9$) vs *naive* kontrol ($74,5\pm 4,5$), Şekil 4.5.a).

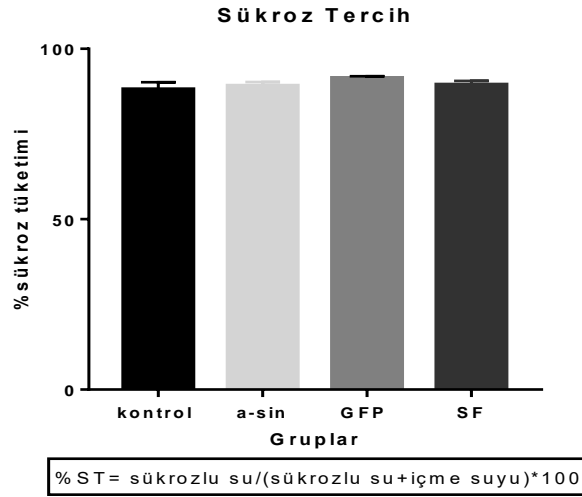
24 saat sonra gerçekleştirilen YNT testine göre ise gruplar arasında fark gözlenmemiştir (Şekil 4.5.b).



Şekil 4.5. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun YNT testine göre (A) 1 saat sonrasında (B) 24 saat sonrasında yeni nesne ile geçirilen süreye etkisi (* $p < 0,05$ a-sin vs *naive* kontrol grubu (yakın dönem), veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n=7$ a-sin, $n=8$ GFP, $n=7$ SF, $n=10$ kontrol; tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.3.3. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Hedoni Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hedoni üzerine etkisi sükröz tercihi testi ile değerlendirildi. Sükrözlü suya alıştırdıktan sonra sıçanların %1’lik sükrözlü su ile normal içme suyuna eşit oranda erişimleri sağlanarak % sükrözlü suyu tercih etme oranları hesaplandı. A-sin enjeksiyonunun hedoni üzerine etkisi olmadığı ve gruplar arasında sükrözlü su tercih etme oranları arasında fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.6).

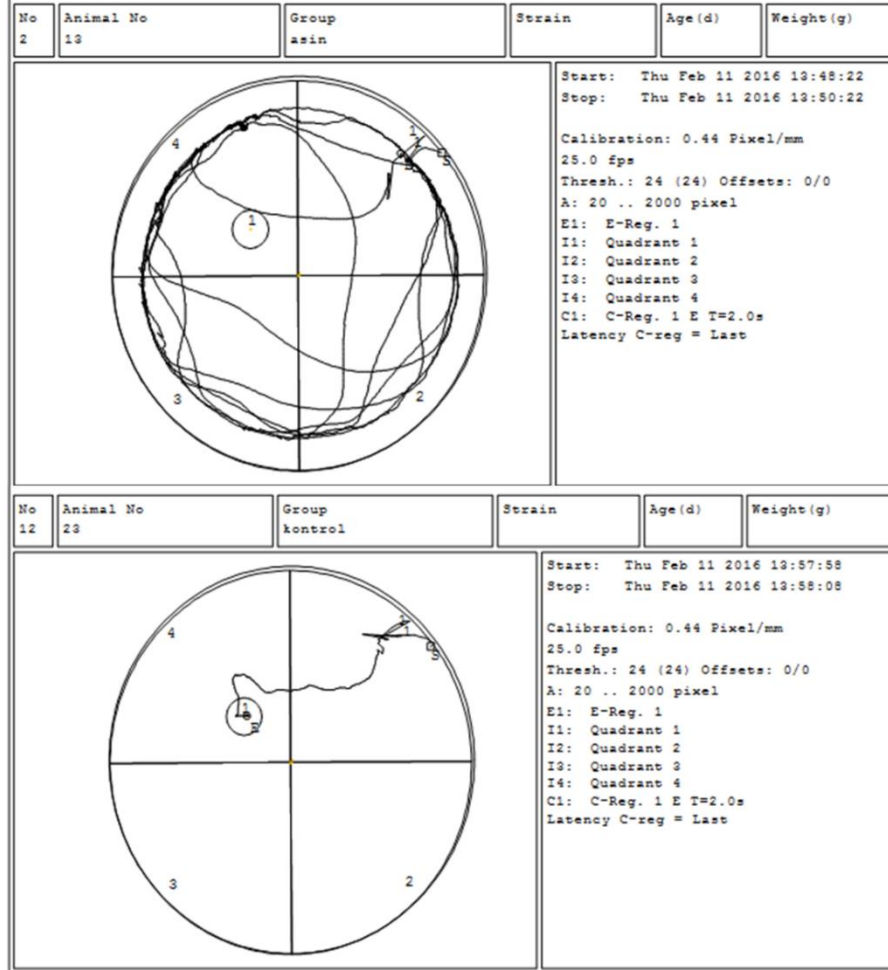


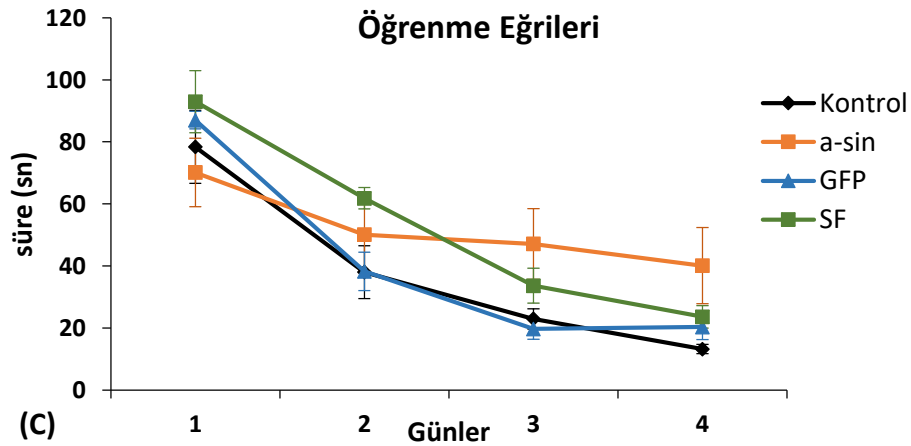
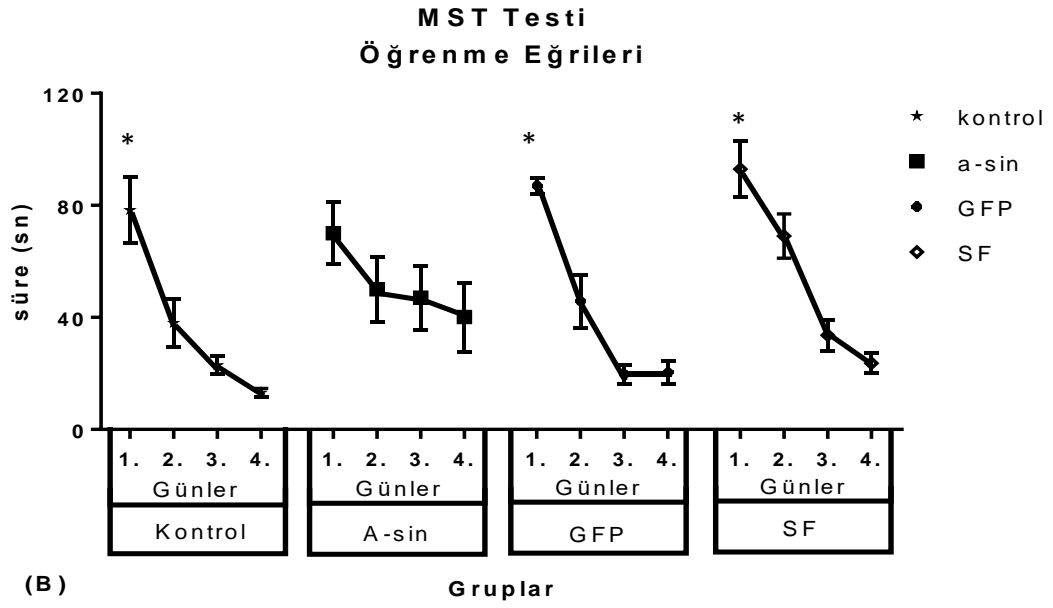
Şekil 4.6. Sıçanlarda bilateral SN ve DG’ye AAV-aracılı a-sin aşırı enjeksiyonunun sükröz tüketimine etkisi. (veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n=11 a-sin, n=11 GFP, n=8 SF, n=7 kontrol; tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey’in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.3.4. Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Öğrenme ve Uzaysal Hafıza Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin öğrenme ve uzaysal hafızaya etkisi Morris su labirenti testi (MSL) ile değerlendirildi. 4 gün boyunca günde 4 defa farklı kadrardan bırakılıp çevredeki ipuçlarına göre platformu bulma süresi hesaplanarak öğrenme düzeyleri, 5. gün platform kaldırıldıktan sonra platformun olduğu bölgede geçirdikleri süre hesaplanarak da uzaysal hafızaları ve pekiştirme düzeyleri değerlendirildi.

İlk 4 günlük öğrenme süresi içerisinde a-sin enjekte edilmiş grubun diğer gruplara göre platformun yerini daha geç bulduğu gözlemlendi (Şekil 4.7.c). Tekrarlı ölçümler için ANOVA ile analizi sonucunda a-sin grubunun 1. ile 4. gün arasında platformun yerini öğrenmede fark olmadığı ve öğrenemediği gözlenirken, diğer gruplarda fark olduğu ve öğrenebildikleri gözlemlendi (Şekil 4.7.b).

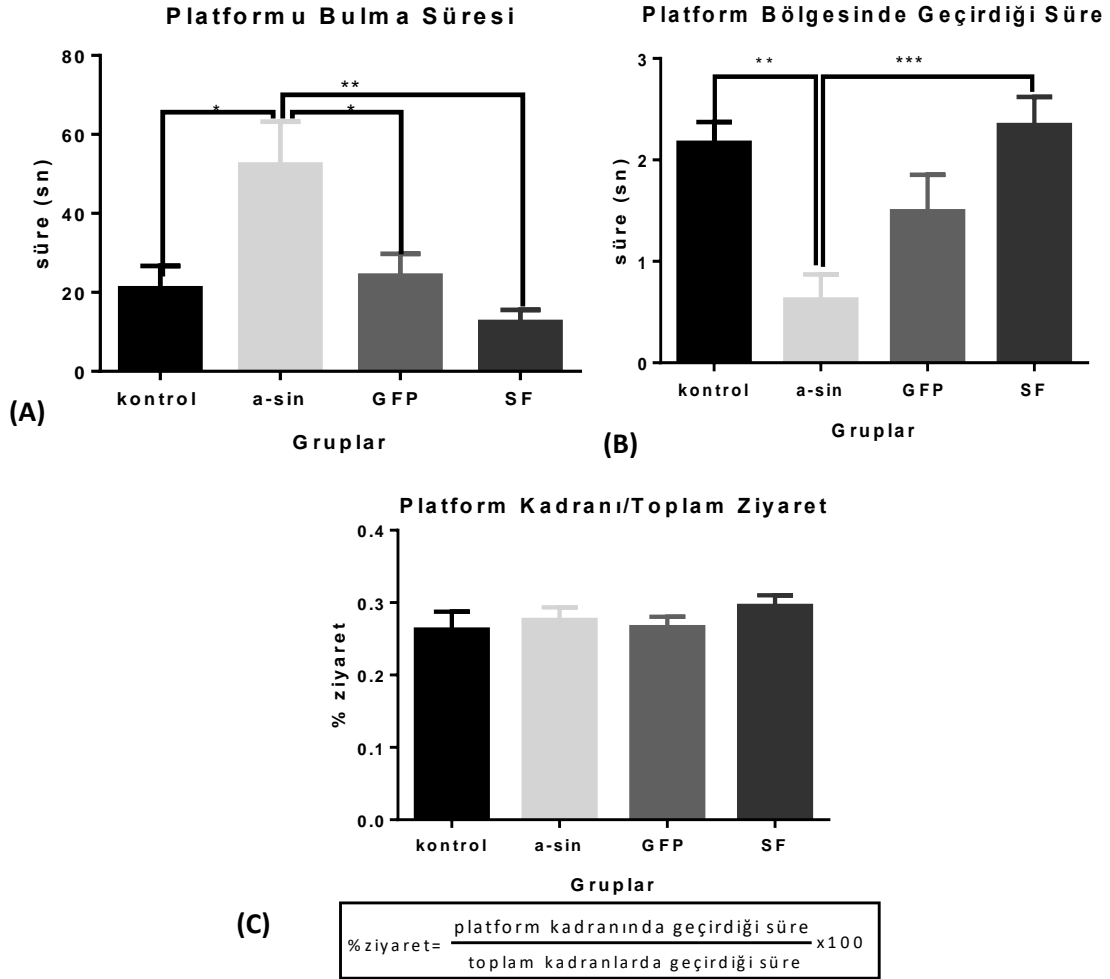




Şekil 4.7. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-arcılı a-sin enjeksiyonunun öğrenmeye etkisi (A) A-sin ve kontrol grubu için örnek analiz çıktısı (B) Her bir grubun günler içerisindeki öğrenme eğrileri, (C) Grupların toplu öğrenme eğrileri (* $p < 0,05$ kontrol, GFP ve SF gruplarının kendi içlerinde günlere göre öğrenme durumları, veriler Ort \pm SH olarak gösterilmiştir. $n=9$ a-sin, $n=10$ GFP, $n=8$ SF, $n=7$ kontrol; Tekrarlı ölçümler için ANOVA ardından *post hoc* Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4 günlük eğitim süresinden sonra 5. gün platform su tankının içerisinde çıkartılarak prob testi yapıldı. Prob testinde, kontroller arasında fark gözlenmezken; a-sin enjekte edilen grubun platformun olduğu noktayı bulmak için en çok vakit harcayan grup olduğu gözlemlendi ($p=0,002$ a-sin ($52,4 \pm 10,8$) vs SF ($12,5 \pm 3,1$), $p=0,02$ naive kontrol ($21,04 \pm 5,6$), GFP ($24,23 \pm 5,6$), Şekil 4.8.a). Ayrıca; a-sin enjekte edilen

grubun platformun olduğu noktada en az vakit geçiren grup olduğu da gözlemlendi (Şekil 4.8.b). Platformlarda geçirdikleri toplam süreler değerlendirildiğinde ise gruplar arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.8.c).

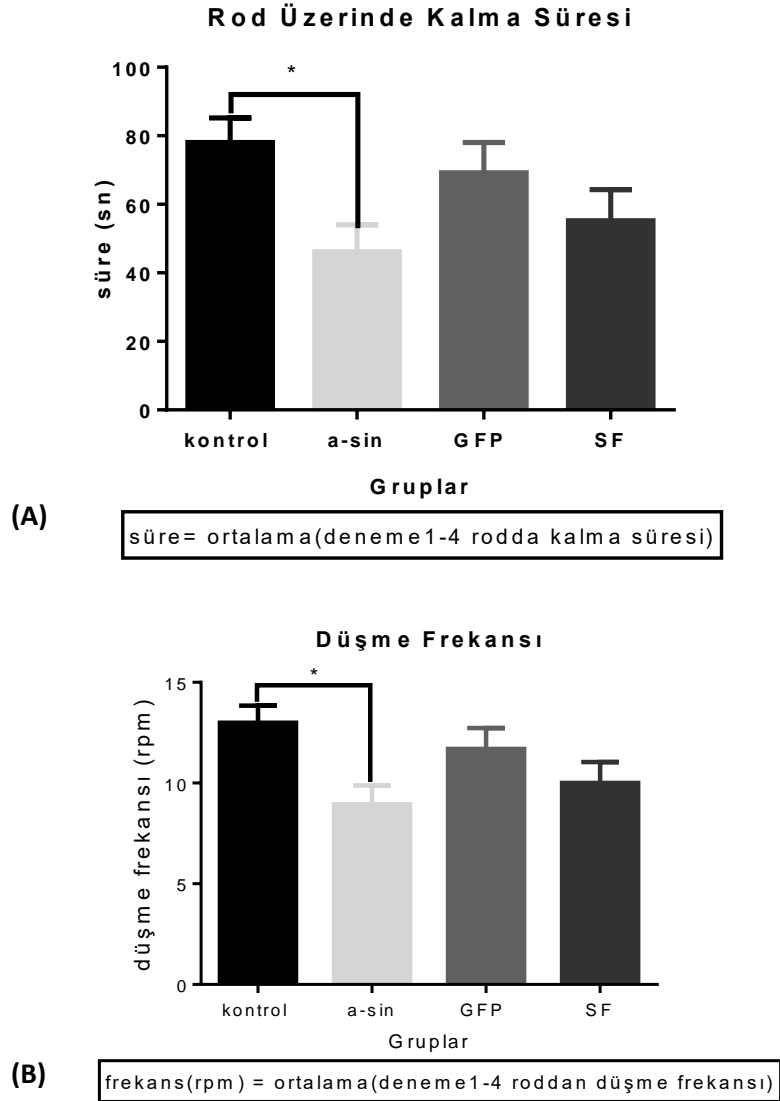


Şekil 4.8. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun MSL prob testine göre (A) platformu bulma süresine etkisi, (B) platform bölgesinde kalma süresine etkisi ve (C) platform kadranında geçirilen süreler etkisi (**p<0,01 a-sin vs SF, *p<0,05 a-sin vs SF; veriler Ort ± SH olarak ifade edilmiştir. n=9 a-sin, n=10 GFP, n=8 SF, n=7 kontrol; Kruskal-Wallis ardından *post hoc* Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.3.5 Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Motor Öğrenme ve Koordinasyon Üzerine Etkisi

Sıçanlarda bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin motor öğrenme ve dengeye etkisi rotarod testi ile değerlendirildi. İlk 2 gün döner mil üzerinde

dengede durma öğretildikten sonra 3. gün test fazı olarak yapılan deneyde kontrol grupları arasında fark gözlenmezken, a-sin enjekte edilen grubun döner mil üzerinde kalma süresinin kontrollerden daha az olduğu ($p=0,02$ a-sin ($46,13\pm7,91$) vs *naive* kontrol ($78\pm7,24$), Şekil 4.9.a) ve döner mil üzerinden düşme frekansının da en düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9.b).

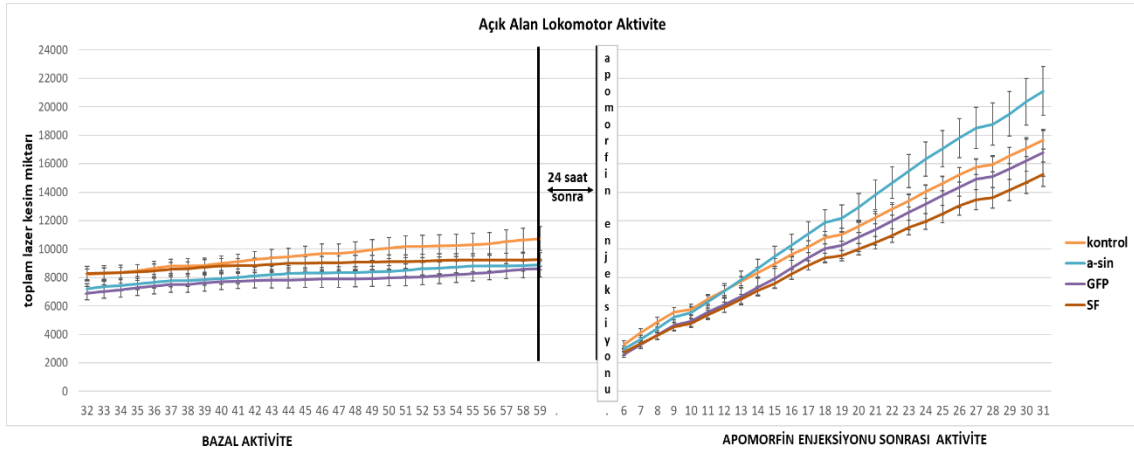


Şekil 4.9. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonunun rotarod testine göre;(A) döner mil üzerinde kalma süresine etkisi, (B) düşme frekansına etkisi (* $p<0,05$ a-sin vs *naive* kontrol, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n=10$ a-sin, $n=9$ GFP, $n=8$ SF, $n=8$ kontrol; tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.3.6 Bilateral SN ve DG de AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesinin Açık Alan Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hareketliliğe ve motor fonksiyona olan etkisi açık alan lokomotor aktivite testi ve apomorfine ile indüklenen lokomotor aktivite testi ile değerlendirildi. Öncelikle deneyde hem yatay hem de dikey düzlemdeki hareketleri ölçebilen lokomotor aktivite kafesleri içerisinde tutuldular ve 1 saat boyunca kayıt alındı. Aynı işlem 24 saat sonra aynı saatte 0,5 mg/kg dozunda subkütan apomorfine uygulandıktan sonra tekrar edildi ve tekrar 1 saat kayıt alındı.

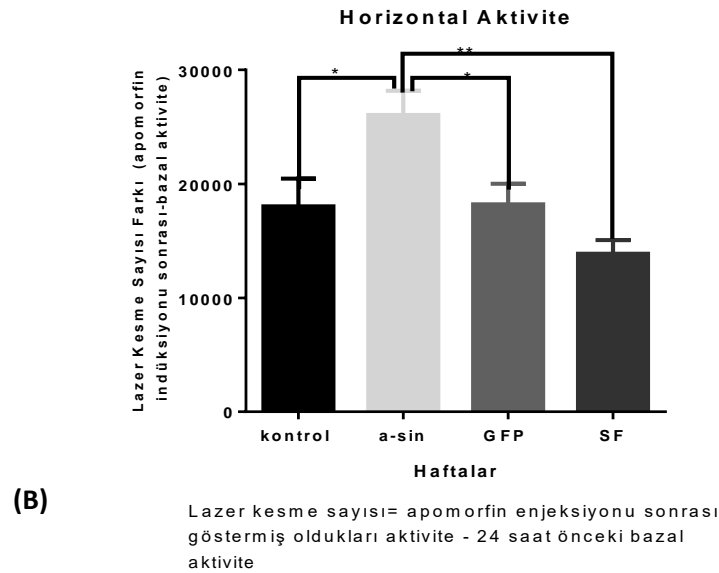
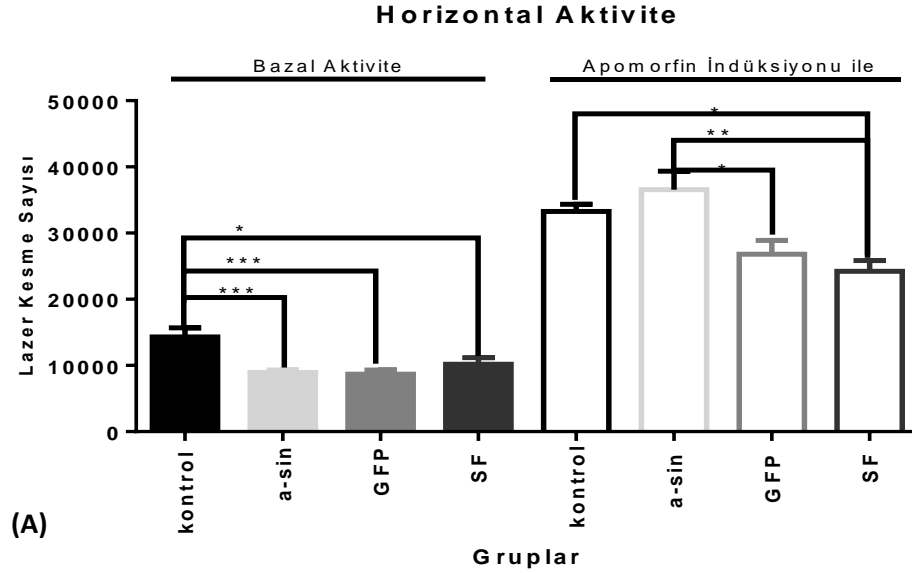
Açık alan lokomotor aktivite testinde kafese alıştırma ve apomorfine enjeksiyonu sonrası etkinin ortaya çıkması için, yapılan kayıttın 30. dakika ile 60. dakika arası analiz edildi (271). Bazal lokomotor aktivitede dakika bazında gruplar arasında hareketlilikte büyük bir fark gözlenmezken, apomorfine enjeksiyonu sonrası a-sin grubunda horizontal aktivitede artış gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Lokomotor aktivite testinde grupların 30 ile 60 dk arasındaki bazal ve 5 ile 35 dk arasındaki apomorfine enjeksiyonu sonrası horizontal aktivitelemlerindeki değişimin dakika bazında kümülatif gösterimi

Açık alan lokomotor aktivite testinde, kontrol grubunun bazal aktivitesinin diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11.a). Apomorfine enjeksiyonu sonrasında ise a-sin grubunun diğer gruplara oranla daha fazla hareket ettiği gözlemlendi (Şekil 4.11.a). AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş grubun bazal aktivitesinin düşük ve apomorfine enjeksiyonu sonrasında horizontal aktivitesinin en yüksek olduğu gözlemlendi. Buna bağlı olarak a-sin enjekte edilmiş grubun

hareketlilikteki artışının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlemlendi ($p=0,026$ a-sin (26053 ± 2109) vs *naive* kontrol (18039 ± 2427), $p=0,001$ a-sin (26053 ± 2109) vs SF (13875 ± 1203), $p=0,019$ a-sin (26053 ± 2109) vs GFP (18207 ± 1793); Şekil 4.11.b).



Şekil 4.11. Enjeksiyon yapıldıktan sonraki 18. haftada yapılan lokomotor aktivite testinde grupların (A) bazal ve apomorfine enjeksiyonundan sonraki horizontal aktiviteleri, (B) apomorfine enjeksiyonu sonrası hareketlilikteki artışın bazal aktivitelerinden farkı (** $p<0,01$ a-sin vs SF; grafikler Ort \pm SH olarak gösterilmiştir. $n=10$ a-sin, $n=9$ GFP, $n=8$ SF, $n=7$ kontrol; * $p<0,05$ a-sin vs kontrol, GFP, tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Davranış Deneylerine Etkisi

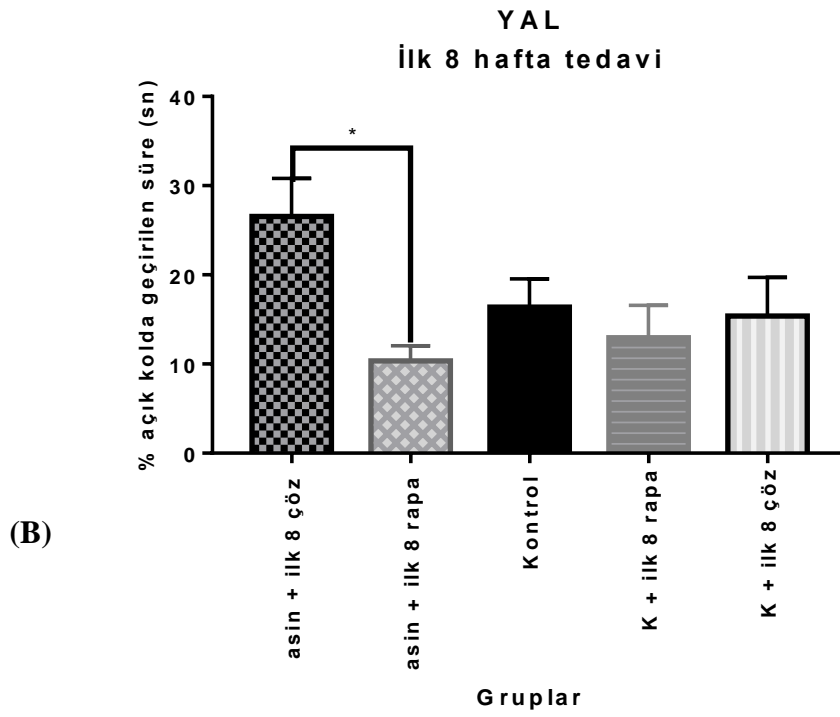
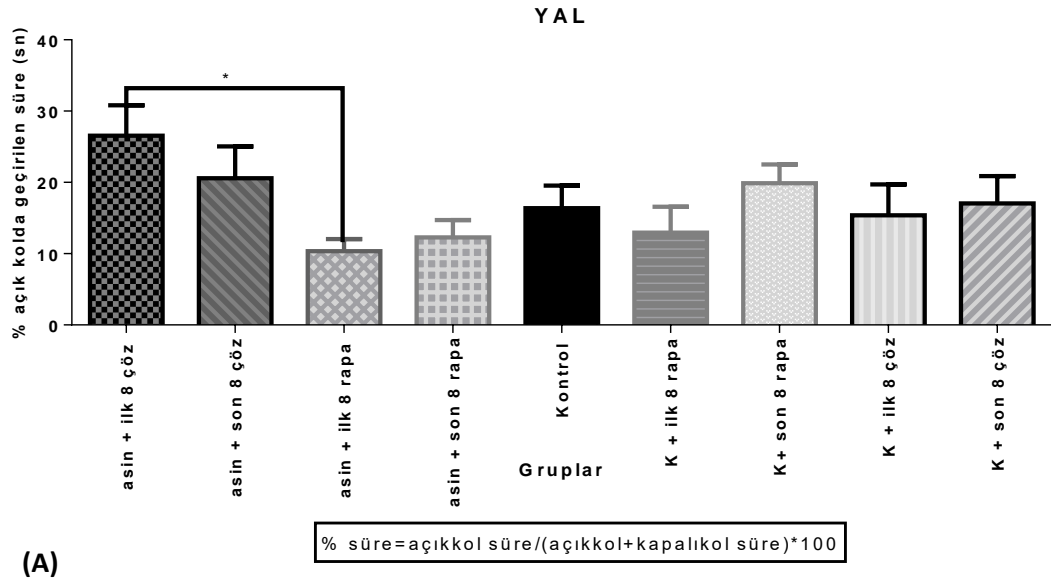
AAV-aracılı a-sin enjeksiyonu yapılan bir başka grup sıçanda a-sin enjeksiyonun yapıldığı ilk günden başlanılarak 8 hafta boyunca haftada üç defa s.c rapamisin tedavisi uygulandı ve rapamisinin etkisi 16.-18. haftalar arasında davranış deneyleri ile değerlendirildi. Ayrıca; AAV-aracılı a-sin enjeksiyonu yapıldıktan sonra patolojinin oluşması beklenen farklı bir grup sıçanda 10. haftadan itibaren 8 hafta boyunca haftada 3 defa subkütan rapamisin tedavisi uygulandı ve yine etkisi 16.-18. haftalar arasında davranışsal olarak değerlendirildi (Bkz bölüm 3.3 ve Şekil 3.4).

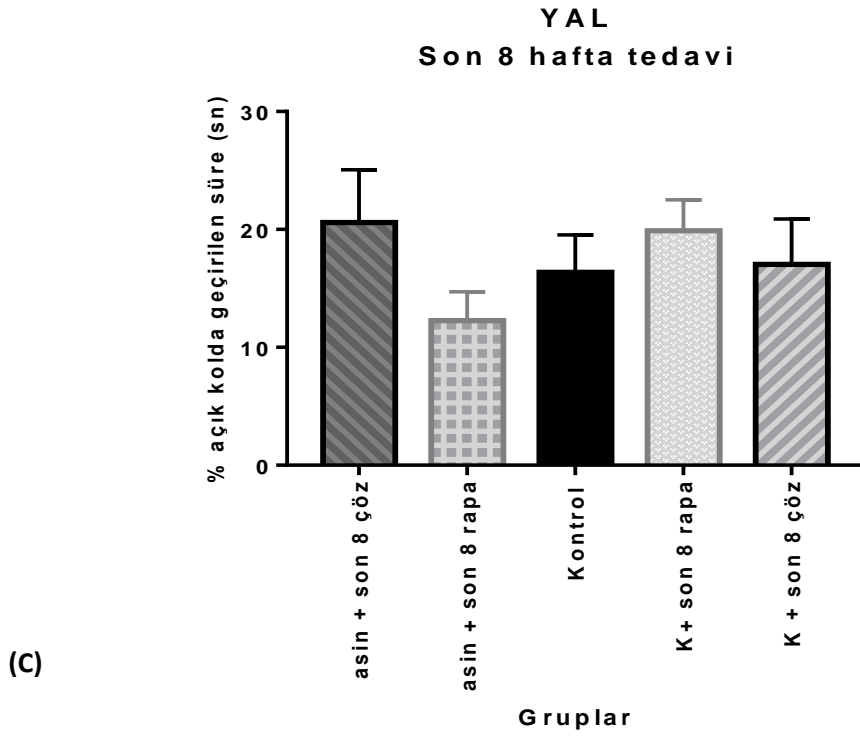
4.4.1. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Anksiyete Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin ardından rapamisin tedavisi uygulanmasının anksiyete üzerine etkisi YAL testi ile değerlendirildi.

A-sin enjeksiyonu sonrası ilk 8 hafta rapamisin tedavisi alan grubun açık kolda az vakit geçirdiği gözlenirken, çözücü uygulana grubun açık kolda en çok vakit geçiren grup olduğu gözlendi (Şekil 4.12.b). Kontrol grupları arasında ise fark gözlenmedi (Şekil 4.12.a ve b).

A-sin enjekte edilip son 8 hafta tedavi alan gruplar arasında ise YAL testinde açık kolda geçirilen süreler açısından fark gözlenmedi (Şekil 4.12.c).





Şekil 4.12. YAL testine göre (A) hem ilk 8 hem de son 8 hafta tedavinin toplu olarak, (B) ilk 8 hafta tedavinin, (C) son 8 hafta tedavinin açık kolda geçirilen süreye etkisi (* $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa vs a-sin ilk 8 çözücü, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ ilk\ 8\ rapa}=7$, $n_{a-sin\ son\ 8\ rapa}=10$, $n_{a-sin\ ilk\ 8\ çözücü}=9$, $n_{a-sin\ son\ 8\ çözücü}=10$, $n_{kontrol}=13$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ rapamisin}=5$, $n_{kontrol\ son\ 8\ rapamisin}=6$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ çözücü}=6$, $n_{kontrol\ son\ 8\ çözücü}=5$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

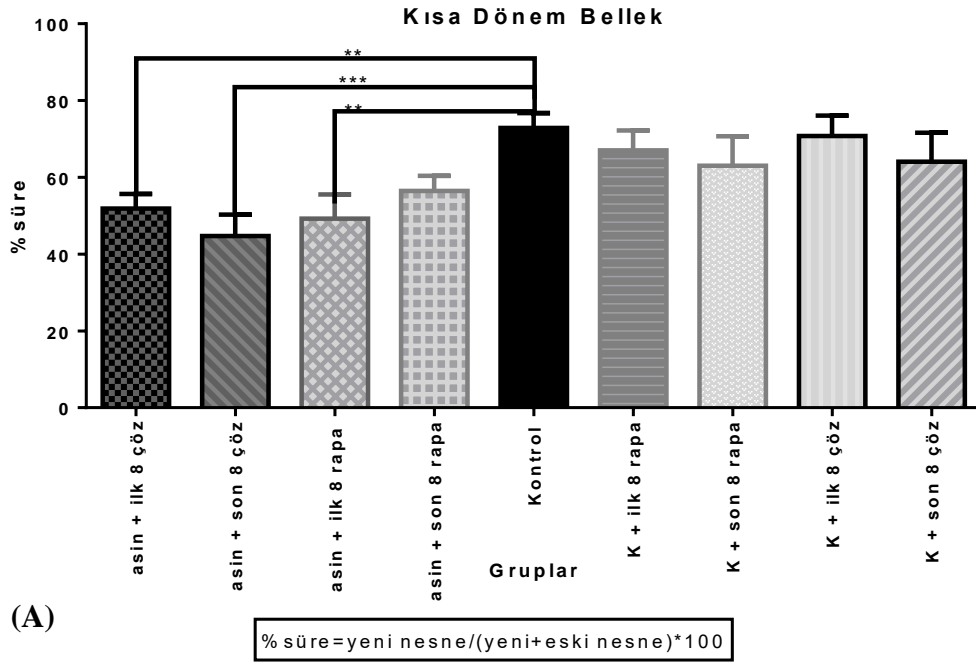
4.4.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hafıza Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin ardından rapamisin tedavisi uygulanmasının hafıza üzerine etkisi yeni nesne tanıma testi ile alıştırmalardan 1 ve 24 saat sonrasında değerlendirildi.

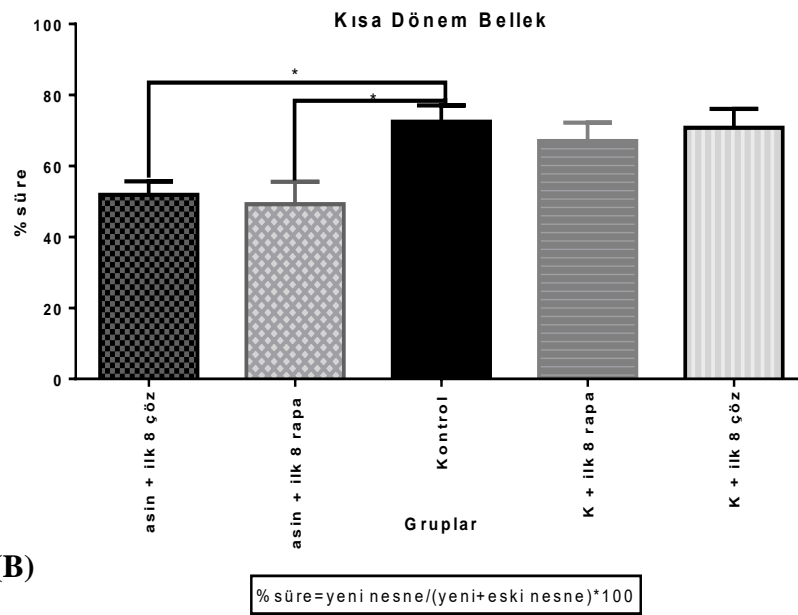
Kısa dönem belleği değerlendirmek için yapılan YNT testinde; kontrol grupları arasında fark gözlenmezken (Şekil 4.13.a), bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilip, ilk 8 hafta rapamisin tedavisi ya da çözücü uygulanan grupların, *naive* kontrol grubuna göre yeni nesne ile daha az vakit geçirdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.b).

Son 8 haftada ise çözücü uygulanan a-sin grubunun, *naive* kontrol grubuna göre yeni nesne ile yine daha az vakit geçirdiği gözlenirken, rapamisin tedavisi alan grupta bu fark gözlenmedi ve koruyucu etki gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.c).

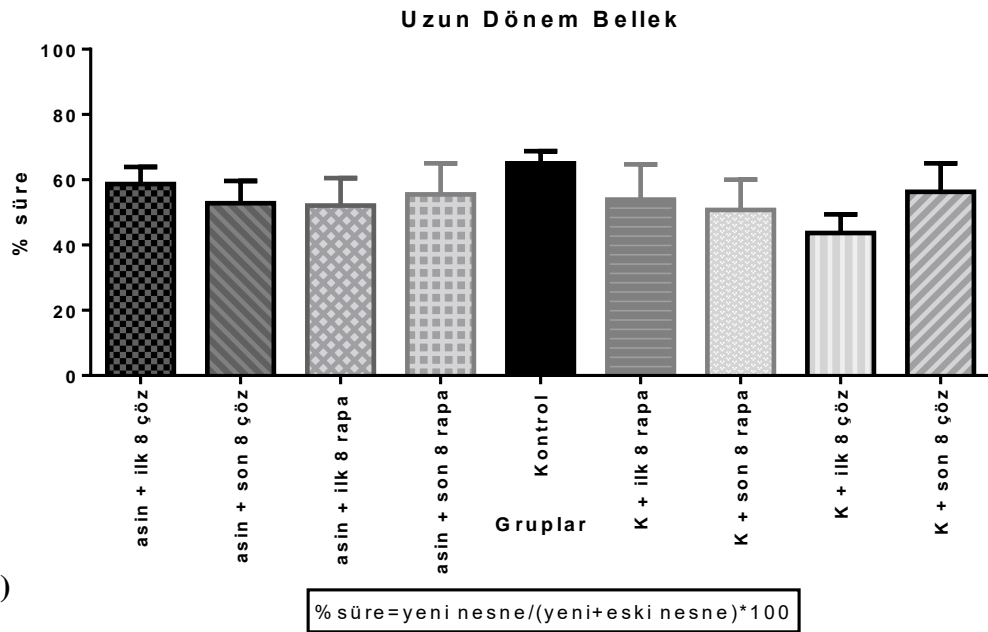
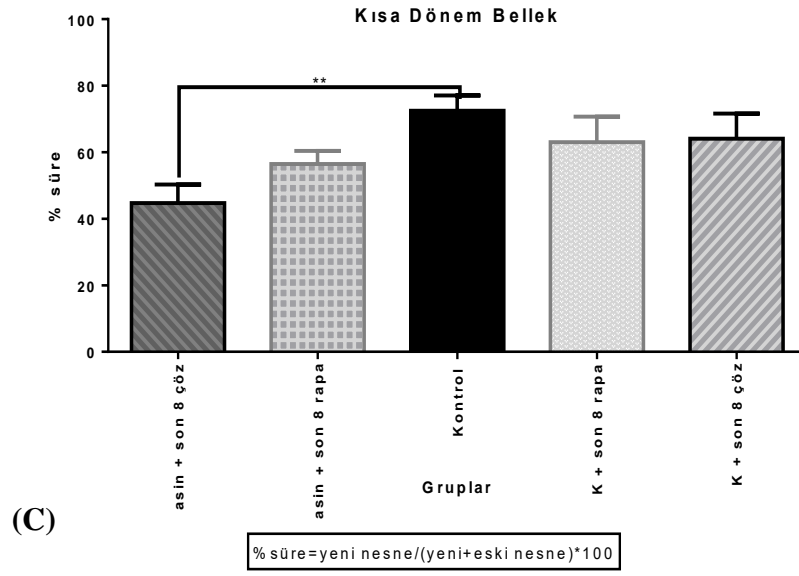
Uzun dönem belleği değerlendirmek için 24 saat sonra YNT testi yapıldı. Ancak gruplar arasında bir fark gözlenmedi (Şekil 4.13.d).



(A)



(B)



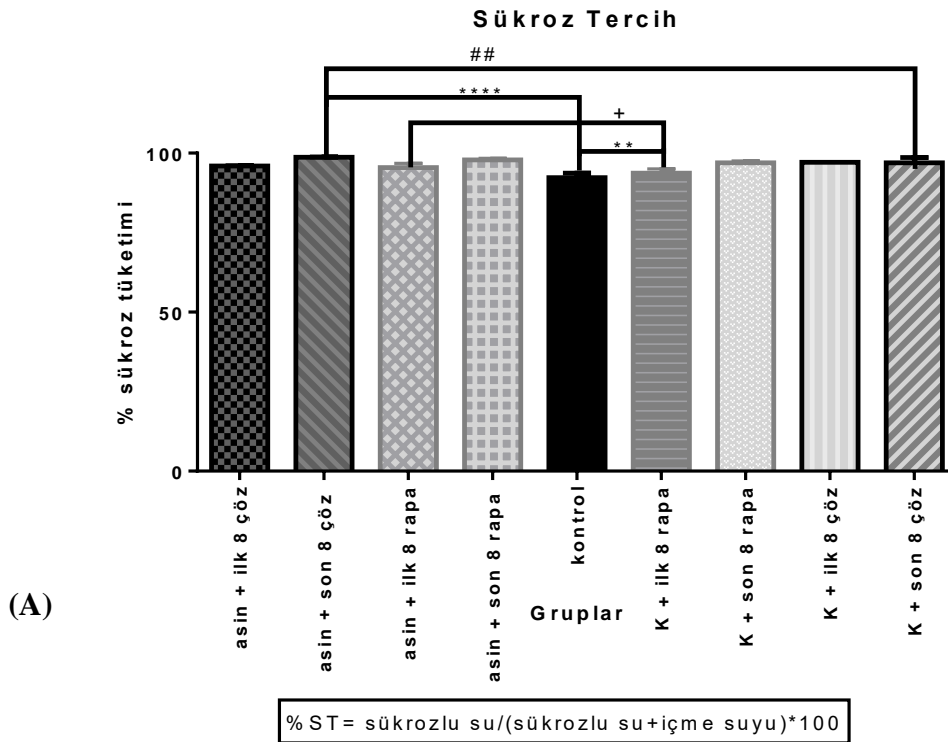
Şekil 4.13. YNT testine göre (A) İlk 8 hafta ve son 8 hafta tedavi gruplarının toplu olarak, (B) İlk 8 hafta tedavinin, (C) Son 8 hafta tedavinin 1 saat sonra değerlendirilen yakın dönem bellek davranışlarına etkisi, (D) ilk ve son 8 hafta tedavi uygulanmasının 24 saat sonra değerlendirilen uzun dönem bellek davranışlarına etkisi. (** $p < 0,01$ a-sin son 8 çöz vs *naïve* kontrol, * $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa, ilk 8 çözücü vs *naïve* kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{\text{a-sin ilk 8 rapa}}=8$, $n_{\text{a-sin son 8 rapa}}=8$, $n_{\text{a-sin ilk 8 çözücü}}=9$, $n_{\text{a-sin son 8 çözücü}}=10$, $n_{\text{kontrol}}=13$, $n_{\text{kontrol ilk 8 rapamisin}}=4$, $n_{\text{kontrol son 8 rapamisin}}=6$, $n_{\text{kontrol ilk 8 çözücü}}=5$, $n_{\text{kontrol son 8 çözücü}}=6$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

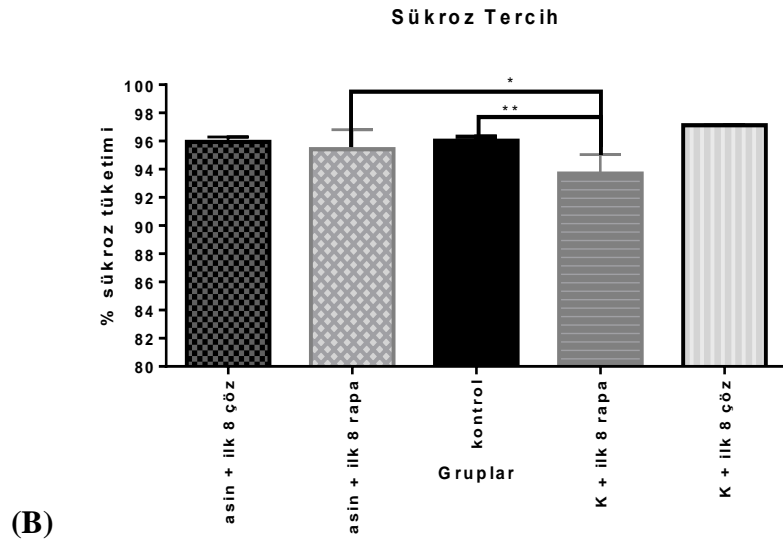
4.4.3. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hedoni Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin ardından ilk 8 ya da son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının hedoniye etkisi sükröz tercih testi ile değerlendirildi.

İlk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının, hem a-sin enjeksiyon grubunda hem de kontrol grubunda % sükröz tüketiminde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14.a). Kontrole ilk 8 hafta rapamisin uygulanması sükröz tüketimini *naive* kontrole göre azaltmıştır (Şekil 4.14.b).

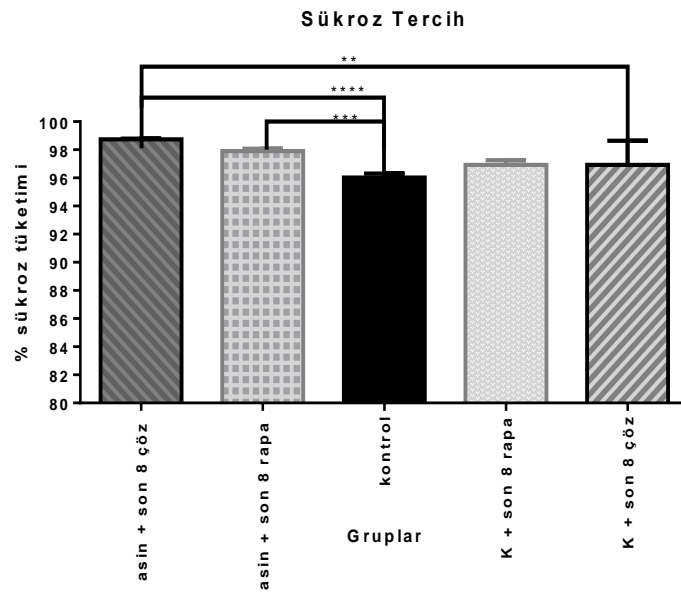
Son 8 çözücü uygulanan a-sin enjeksiyon grubunda ise hem *naive* kontrole hem de son 8 hafta çözücü uygulanan kontrol göre daha fazla sükröz tüketti olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14.c).





(B)

$$\% ST = \frac{\text{sükrozlu su}}{\text{sükrozlu su} + \text{içme suyu}} \times 100$$



(C)

$$\% ST = \frac{\text{sükrozlu su}}{\text{sükrozlu su} + \text{içme suyu}} \times 100$$

Şekil 4.14. STT'ne göre (A) İlk 8 hafta ve son 8 hafta tedavi gruplarının toplu olarak, (B) İlk 8 hafta tedavinin, (C) Son 8 hafta tedavinin sükroz tüketimine etkisi (**** $p < 0,01$ a-sin son 8 çöz vs kontrol, ### $p < 0,01$ a-sin son 8 çöz vs kontrol son 8 çöz; ++ $p < 0,01$ a-sin ilk 8 rapa vs K ilk 8 rapa, ** $p < 0,01$ K ilk 8 rapa vs kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 rapa=8, n_{a-sin} son 8 rapa=10, n_{a-sin} ilk 8 çözücü=10, n_{a-sin} son 8 çözücü=10, $n_{kontrol}$ =8, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapamisin=6, $n_{kontrol}$ son 8 rapamisin=6, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=6, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

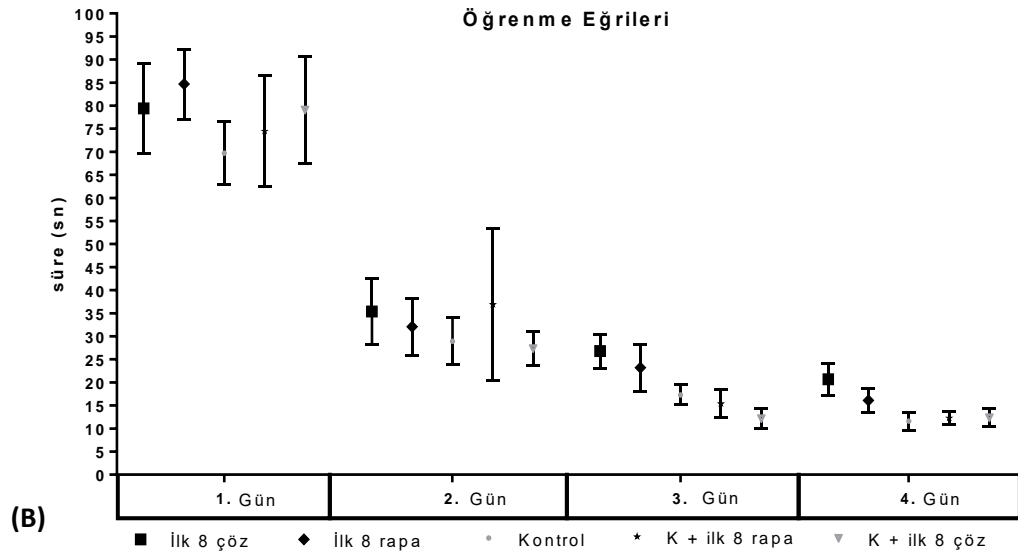
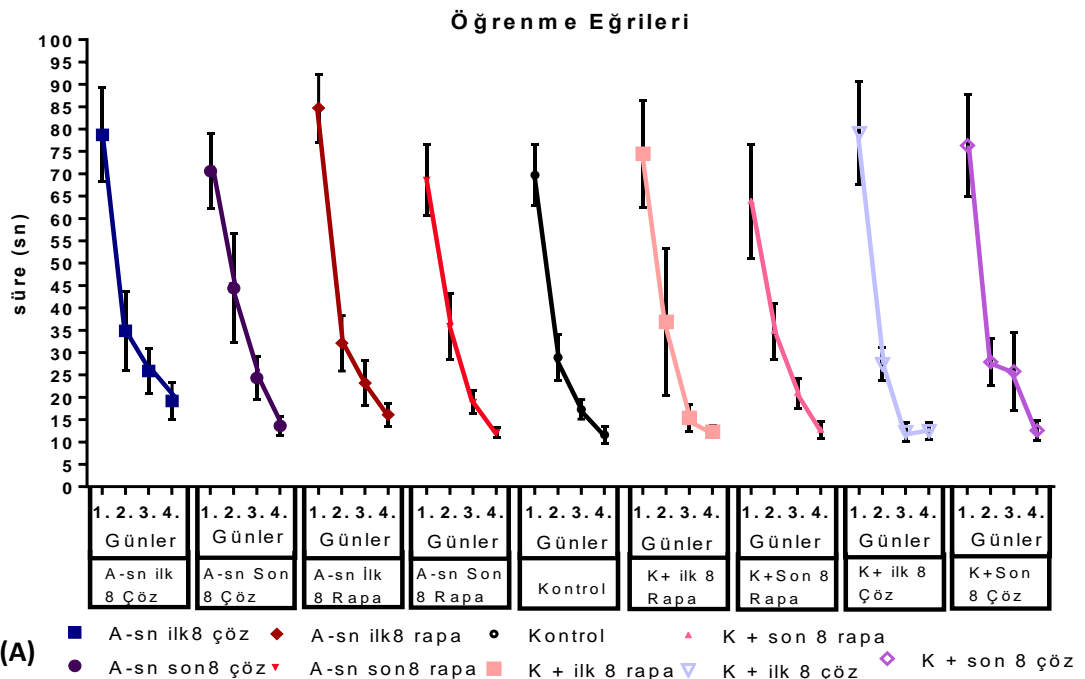
4.4.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Öğrenme ve Uzaysal Hafıza Üzerine Etkisi

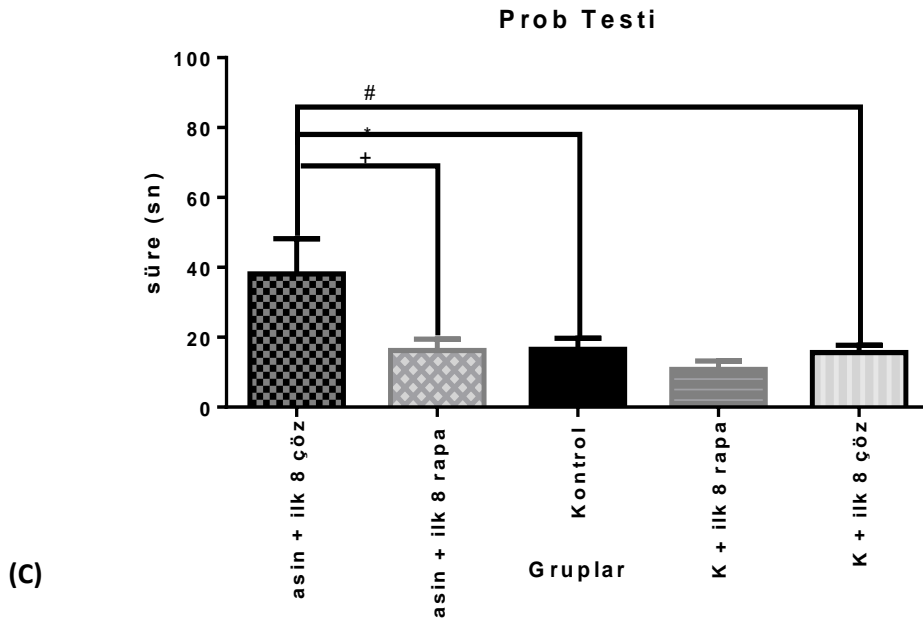
Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin ardından ilk 8 hafta ya da son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının öğrenme ve uzaysal hafıza üzerine etkisi MSL testi ile değerlendirildi.

İlk 4 gün boyunca hem ilk 8 hafta hem de son 8 hafta tedavi alan grupların platformun yerini öğrenme düzeyleri değerlendirildi (Şekil 4.15.a). Kontrol grubunun ortalama platformu bulma süresi 4. gün 10 saniyeden daha kısa olduğundan gruplar 5. gün prob testine tabi tutuldu.

5. gün platform su tankının dışına alınarak prob testi uygulandı ve tek bir noktadan havuza bırakılan sıçanların platformun daha önceden olduğu bölgeye ulaşmak için geçirdikleri zaman ölçüldü. 90 sn sonunda havuzun dışına alındılar.

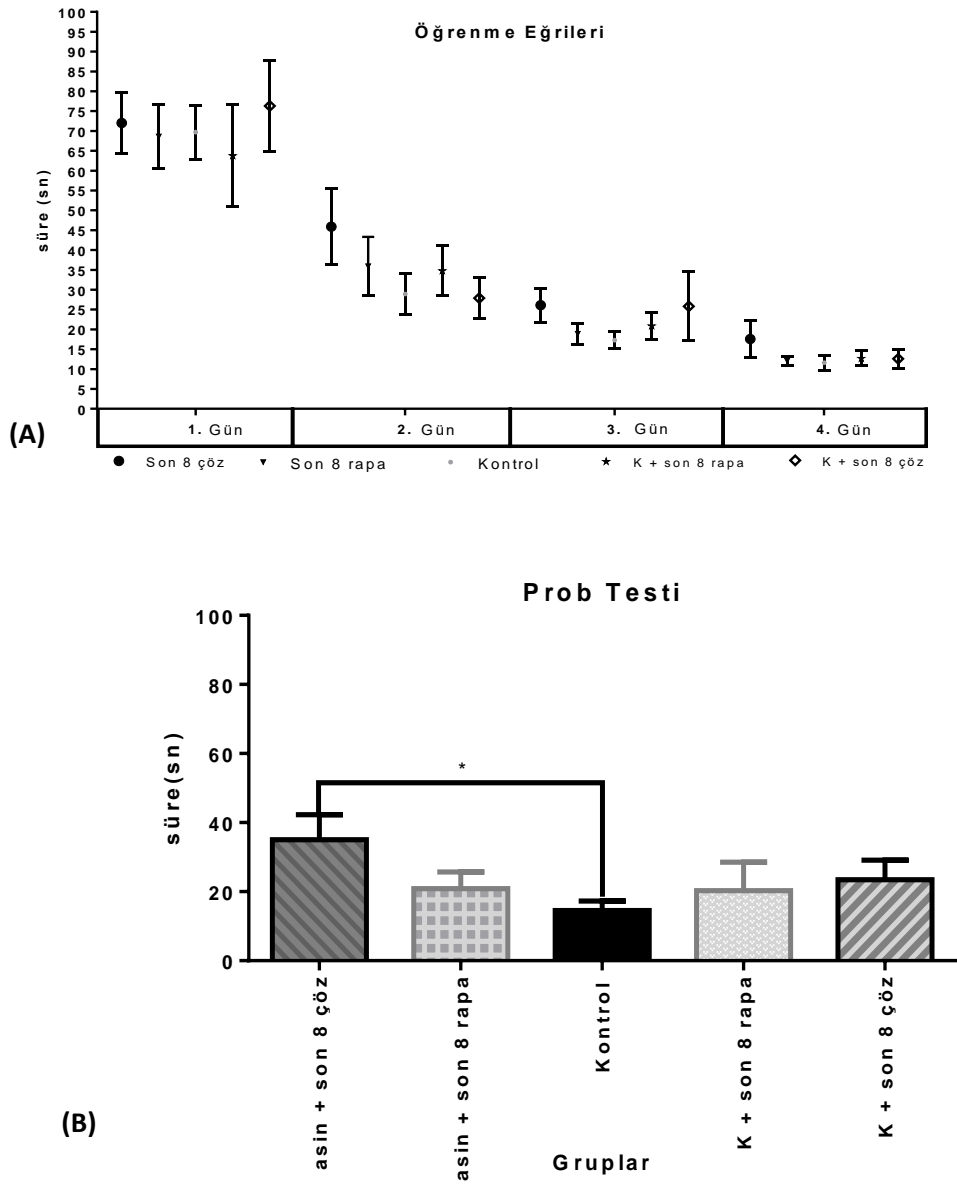
İlk 8 hafta tedavi gruplarında; a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grubun hem öğrenme sürecinde (Şekil 4.15.b), diğer gruplara göre platformu bulmak için daha çok vakit harcadığı hem de prob testinde kontrol grupları arasında fark görülmezken, çözücü uygulanan a-sin grubunun platform bölgesini bulmak için daha çok vakit geçirdiği gözlemlendi ($p=0,037$ a-sin ilk 8 çöz $(38,11\pm 10,13)$ vs kontrol ilk 8 çöz $(15,59\pm 2,13)$, $p=0,015$ a-sin ilk 8 çöz $(38,11\pm 10,13)$ vs kontrol $(16,51\pm 3,22)$, $p=0,041$ a-sin ilk 8 çöz $(38,11\pm 10,13)$ vs a-sin ilk 8 rapa $(16,19\pm 3,26)$, Şekil 4.15.c).





Şekil 4.15. MSL testine göre (A) Her bir deney grubunun öğrenme eğrileri, (B) İlk 8 hafta tedavi alan grupların öğrenme eğrileri, (C) İlk 8 hafta tedavi alan grupların prob testine göre platformun olduğu bölgeyi bulma süresi (* $p < 0,05$ a-sin ilk 8 çöz vs *naïve* kontrol, kontrol ilk 8 çöz, a-sin ilk 8 rapa; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=8, n_{a-sin} son 8 çözücü=8, n_{a-sin} ilk 8 rapa=7, n_{a-sin} son 8 rapa=9, $n_{kontrol}$ =12, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapamisin=5, $n_{kontrol}$ son 8 rapamisin=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=6, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

Son 8 hafta tedavi uygulanan grupta; a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grubun öğrenme sürecinde (Şekil 4.16.a), diğer gruplara göre platformu bulmak için daha çok vakit geçirdi. Prob testinde ise çözücü alan a-sin grubunun, kontrol grubuna göre platform bölgesini bulmak için daha çok vakit geçirdiği gözlemlendi ($p=0.018$ a-sin son 8 hafta çözücü ($35,08 \pm 7,18$) vs *naïve* kontrol ($14,52 \pm 2,76$), Şekil 4.16.b). A-sin enjeksiyonu yapılan ve son 8 hafta rapamisin tedavi alan grubun ise *naïve* kontrole benzer şekilde platformu daha kısa sürede bulduğu gözlemlendi.

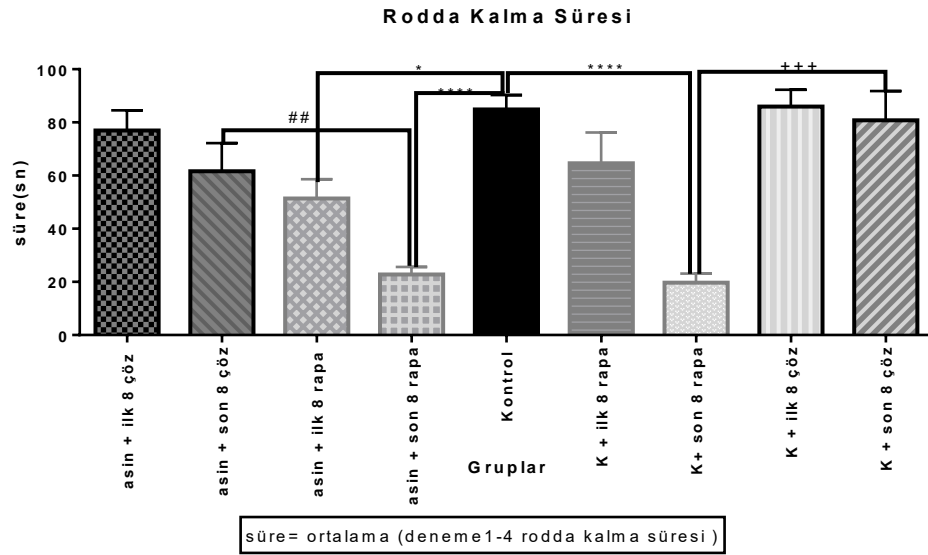


Şekil 4.16. MSL testine göre; (A) son 8 hafta tedavi gruplarının öğrenme eğrileri, (B) son 8 hafta tedavi gruplarının prob testine göre platformun olduğu bölgeyi bulma süreleri (* $p < 0,05$ a-sin son 8 çöz vs kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ son\ 8\ çözücü}=8$, $n_{a-sin\ son\ 8\ rapa}=9$, $n_{kontrol}=12$, $n_{kontrol\ son\ 8\ rapamisin}=5$, $n_{kontrol\ son\ 8\ çözücü}=6$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

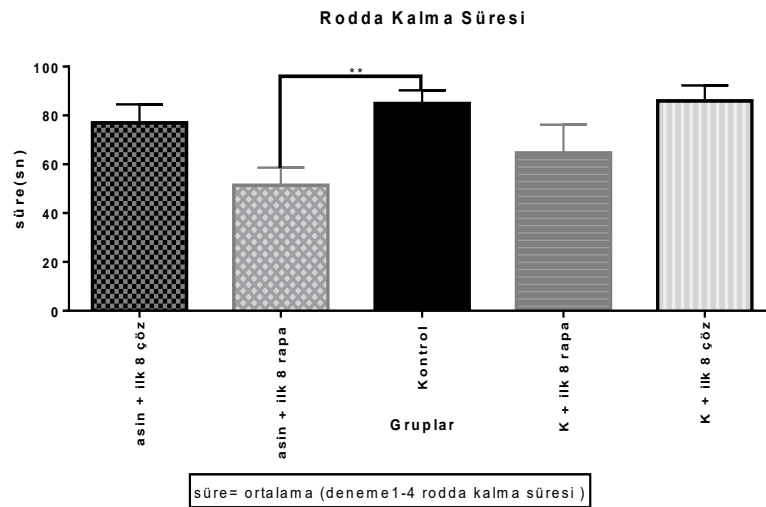
4.4.5.AAV-araçlı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Motor Öğrenme ve Koordinasyon Üzerine Etkisi

Bilateral SN ve DG’de AAV-araçlı a-sin aşırı ifadesinin ardından ilk 8 hafta ya da son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının motor öğrenme ve denge üzerine etkisi rotarod testi ile değerlendirildi (Şekil 4.17.a).

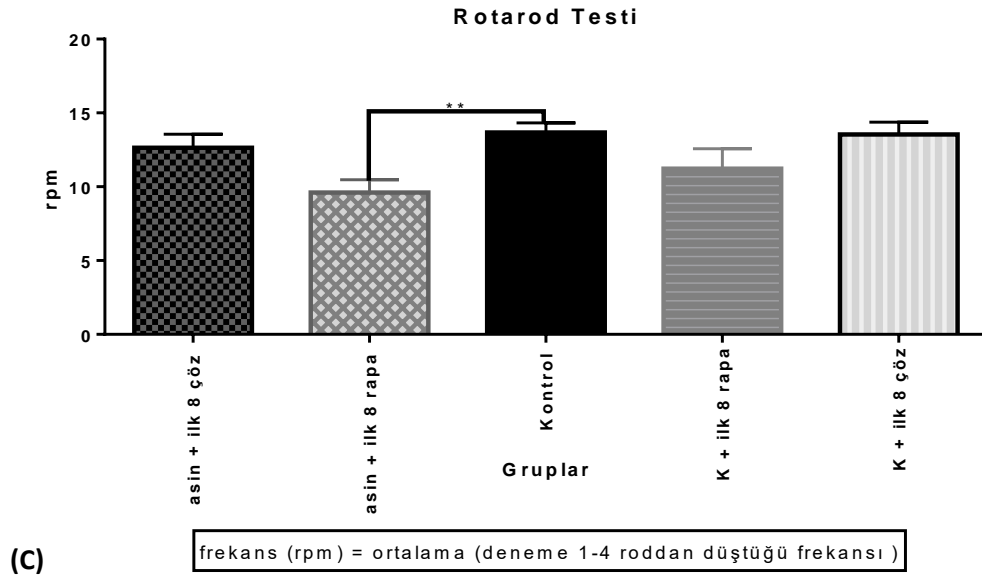
İlk 8 hafta rapamisin tedavisinin özellikle a-sin enjekte edilmiş grupta daha fazla olmak üzere kontrol grubuna uygulandığında dahi döner mil üzerinde kalma süresini azalttığı gözlemlendi ($p=0,0079$ a-sin ilk 8 rapa ($51,41\pm7,23$) vs kontrol ($84,84\pm5,45$), Şekil 4.17.b)



(A)

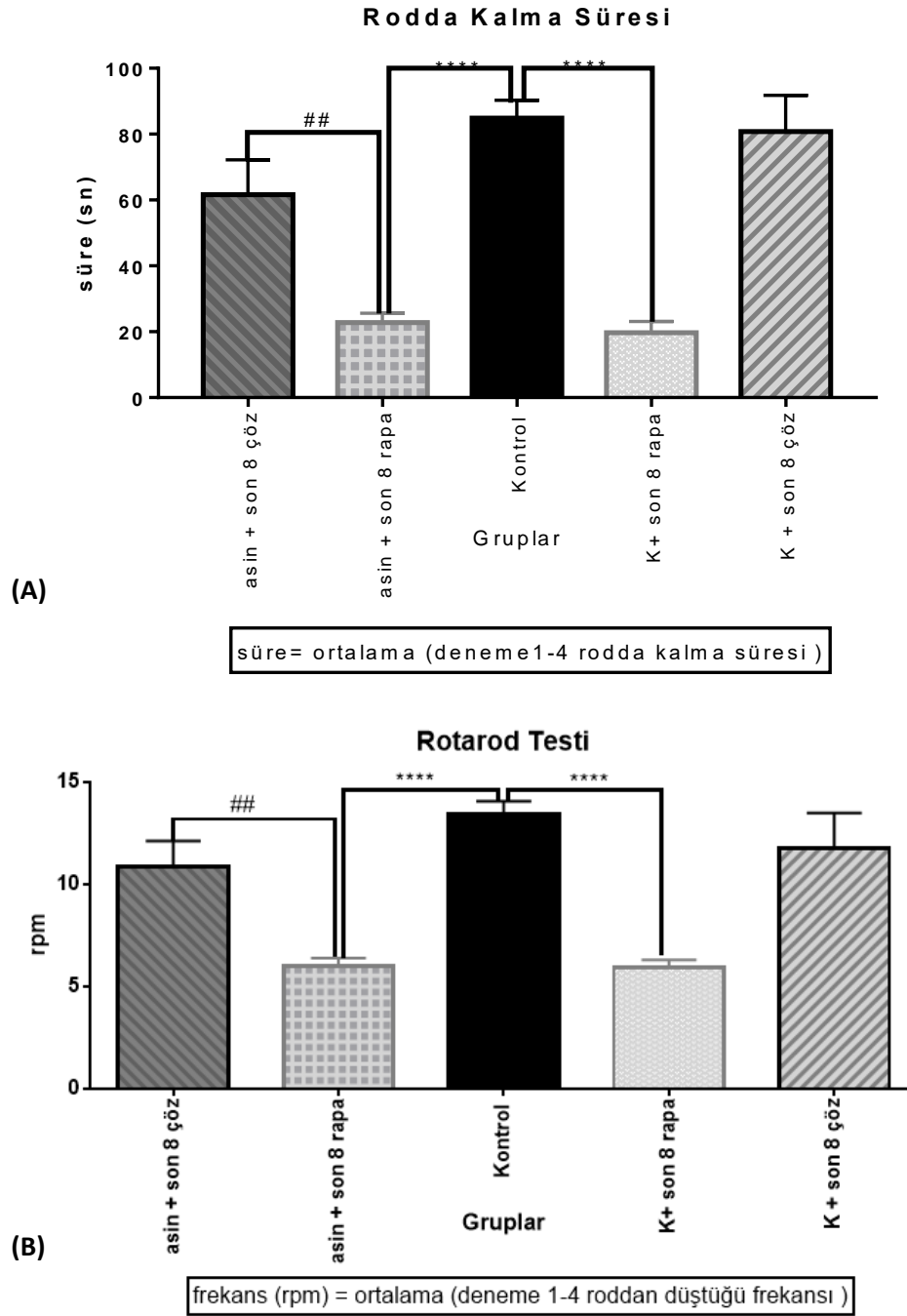


(B)



Şekil 4.17. Rotarod testine göre; (A) İlk 8 hafta ve son 8 hafta tedavi gruplarının toplu olarak, (B) İlk 8 hafta tedavinin döner mil üzerinde kalma süresine etkisi, (C) İlk 8 hafta tedavinin düşme frekansına etkisi (** $p < 0,01$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ ilk\ 8\ çözücü}=9$, $n_{a-sin\ son\ 8\ çözücü}=10$, $n_{a-sin\ ilk\ 8\ rapa}=8$, $n_{a-sin\ son\ 8\ rapa}=8$, $n_{kontrol}=11$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ rapamisin}=5$, $n_{kontrol\ son\ 8\ rapamisin}=6$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ çözücü}=5$, $n_{kontrol\ son\ 8\ çözücü}=5$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

Son 8 hafta rapamisin tedavisinin de ilk 8 hafta tedaviye benzer şekilde döner mil üzerinde kalma süresini hem a-sin enjeksiyon grubunda hem de kontrole uygulandığında azalttığı gözlemlendi ($p=0,0001$ a-sin son 8 rapa ($22,75 \pm 2,84$) vs kontrol ($84,84 \pm 5,45$), $p=0,0042$ a-sin son 8 rapa ($22,75 \pm 2,84$) vs a-sin son 8 çöz ($61,59 \pm 10,63$), $p=0,0001$ kontrol son 8 rapa ($19,72 \pm 3,43$) vs kontrol ($84,84 \pm 5,45$), Şekil 4.18.a)



Şekil 4.18. Rotarod testine göre; (A) Son 8 hafta tedavinin döner mil üzerinde kalma süresine etkisi, (B) Son 8 hafta tedavinin düşme frekansına etkisi (**** $p < 0,0001$ a-sin son 8 rapa, K son 8 rapa vs kontrol, ## $p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs a-sin son 8 çöz, +++ $p < 0,005$ K son 8 rapa vs K son 8 çöz; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ son\ 8\ çözücü}=10$, $n_{a-sin\ son\ 8\ rapa}=8$, $n_{kontrol}=11$, $n_{kontrol\ son\ 8\ rapa}=6$, $n_{kontrol\ son\ 8\ çözücü}=5$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.4.6.AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi

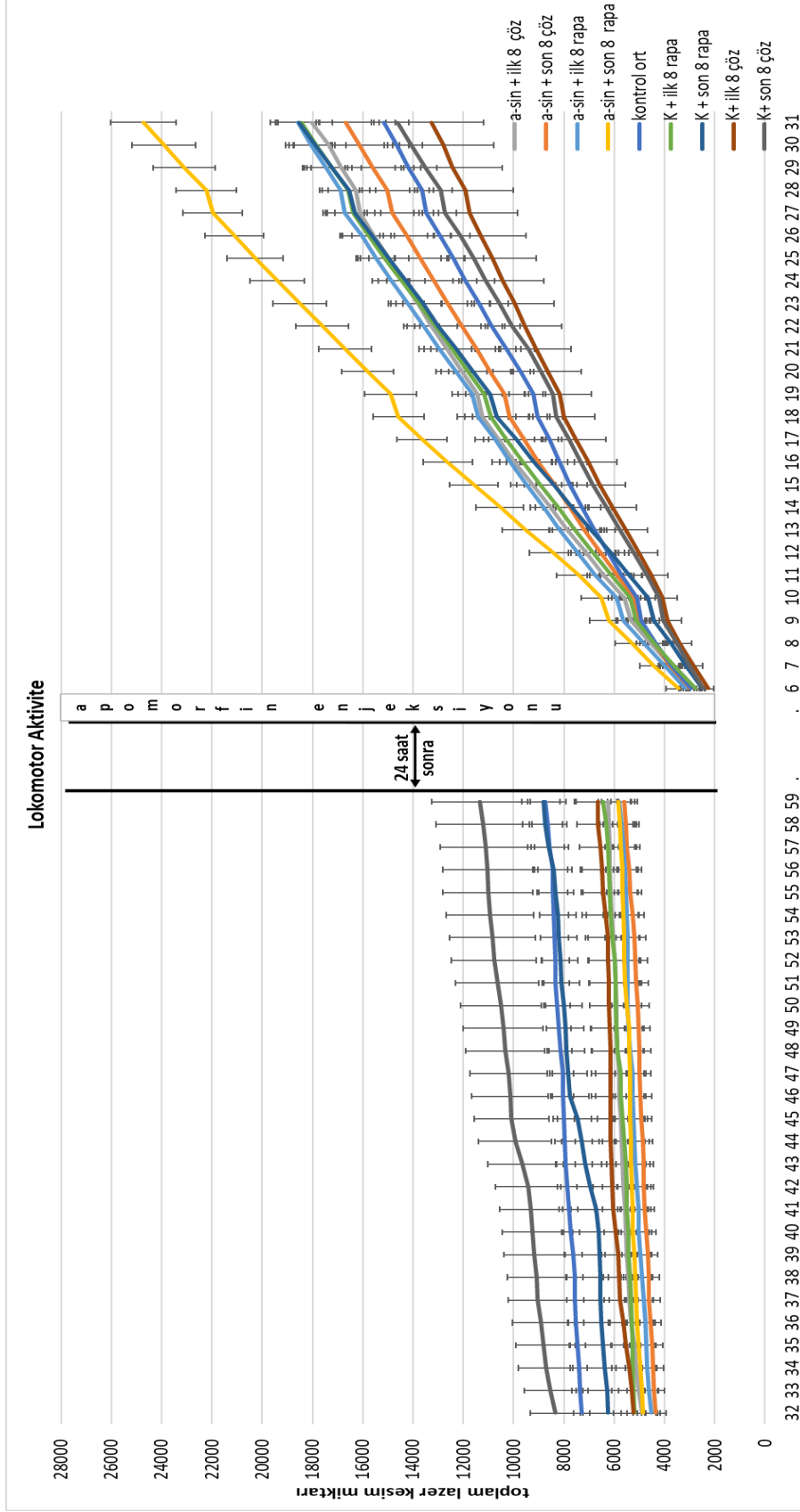
Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin ardından ilk 8 ya da son 8 hafta tedavi uygulanmasının hareketliliğe ve motor fonksiyona olan etkisi açık alan lokomotor aktivite testi ve apomorfine ile indüklenen açık alan lokomotor aktivite testi ile değerlendirildi.

Lokomotor aktivite testinde hem ilk 8 hafta hem de son 8 hafta tedavi alan sıçanların bazal aktiviteleri 30. dakika ile 60. dakika arasında, apomorfine etkisi ise 5-35 dakika arasında analiz edildi.(Şekil 4.19). Bazal aktivitesi en yüksek olan grup son 8 hafta çözücü alan kontrol grubu olduğu gözlemlendi. Apomorfine enjeksiyonu sonrasında ise son 8 hafta rapamisin alan a-sin grubunda hareketlilikte artışın en yüksek olduğu gözlemlendi.

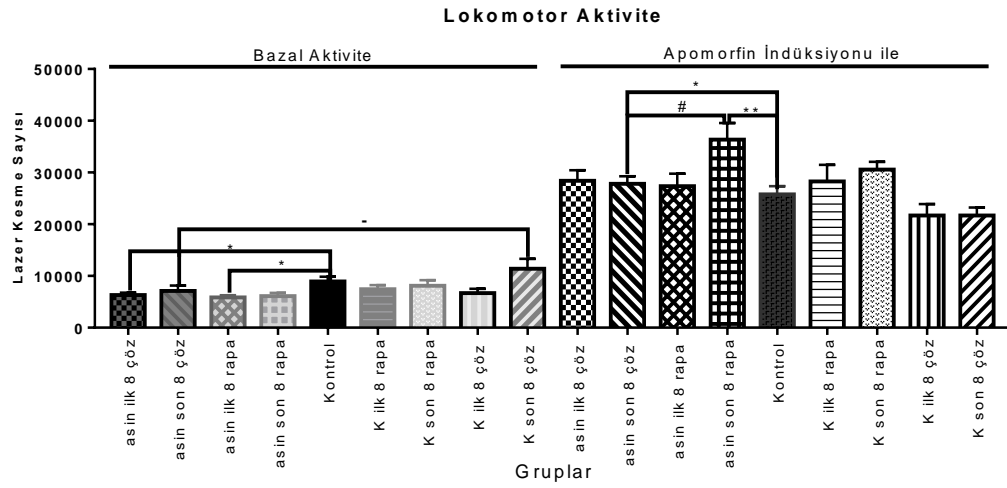
Açık alan lokomotor aktivite testinde; ilk 8 hafta tedavi alan a-sin gruplarının kontrol grubuna göre daha az hareket ettiği gözlemlendi. Apomorfine enjeksiyonu sonrası ise tüm gruplarda artış gözlemlendi (Şekil 4.20.a).

Son 8 hafta tedavi gruplarında ise bazal harekette kontroller arasında fark gözlenmezken, a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grubun çözücü alan kontrol grubundan daha az hareket ettiği gözlemlendi. Apomorfine enjeksiyonu sonrası tüm gruplarda artış olmasına rağmen rapamisin tedavisi alan gruplarda meydana gelen artışın daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.20.a).

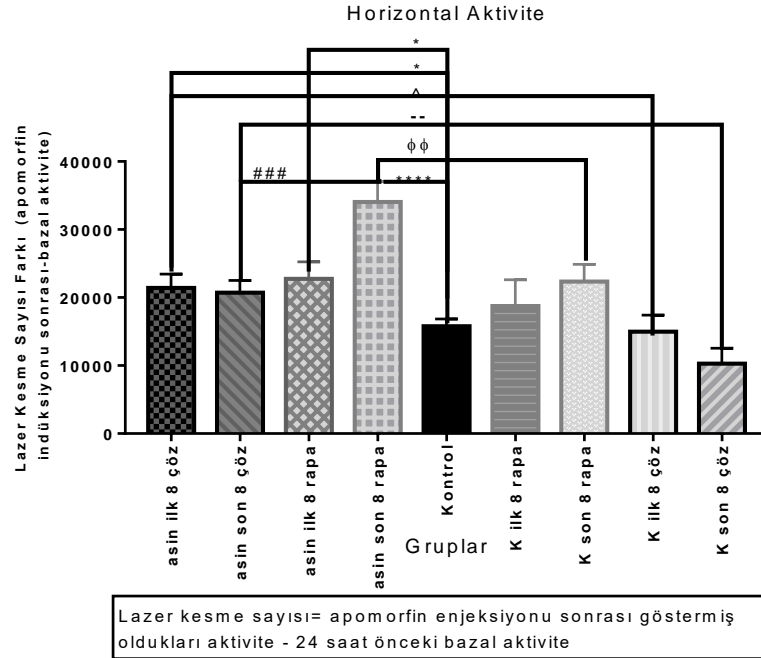
Açık alan lokomotor aktivite testinde horizontal aktivitede meydana gelen artış, apomorfine enjeksiyonu sonrası hareketlilik ile bazal hareketlilik farkı olarak hesaplanmıştır. Kontroller arasında fark gözlenmezken, a-sin enjeksiyon gruplarının hepsinde artış olduğu ve bu artışın son 8 hafta rapamisin tedavisi alan grupta en yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20.b).



Şekil 4.19. Lokomotor aktivite testinde grupların 30 ile 60 dk arasındaki bazal ve 5 ile 35 dk arasındaki apomorfın enjeksiyonu sonrası horizontal aktivitelerindeki değişimin dakika bazında gösterimi



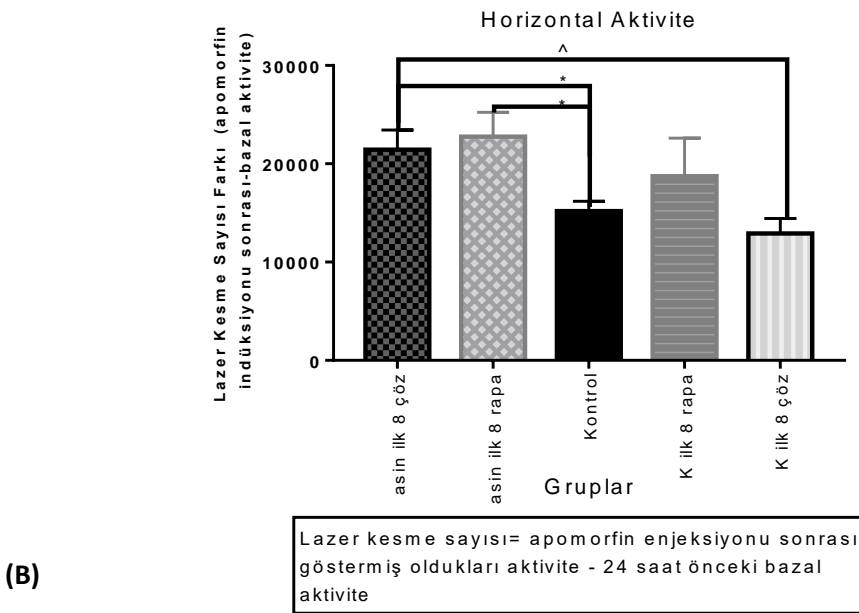
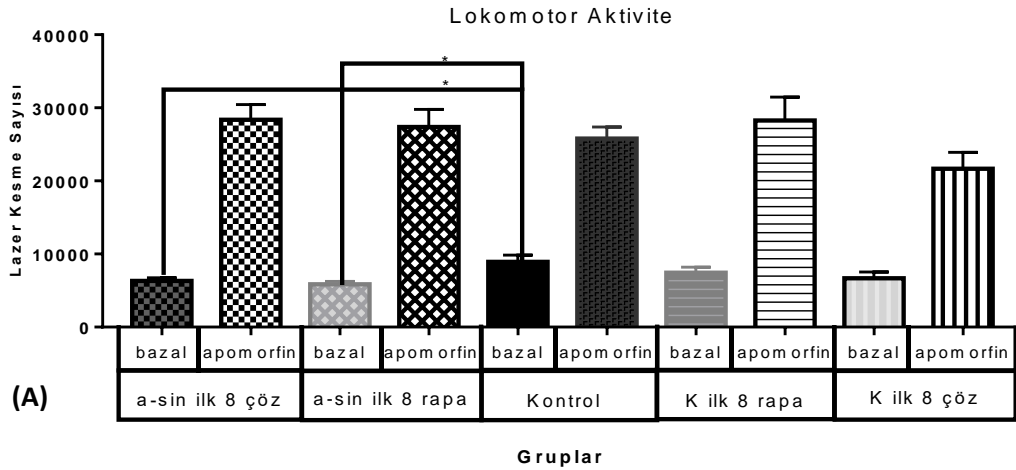
(A)



(B)

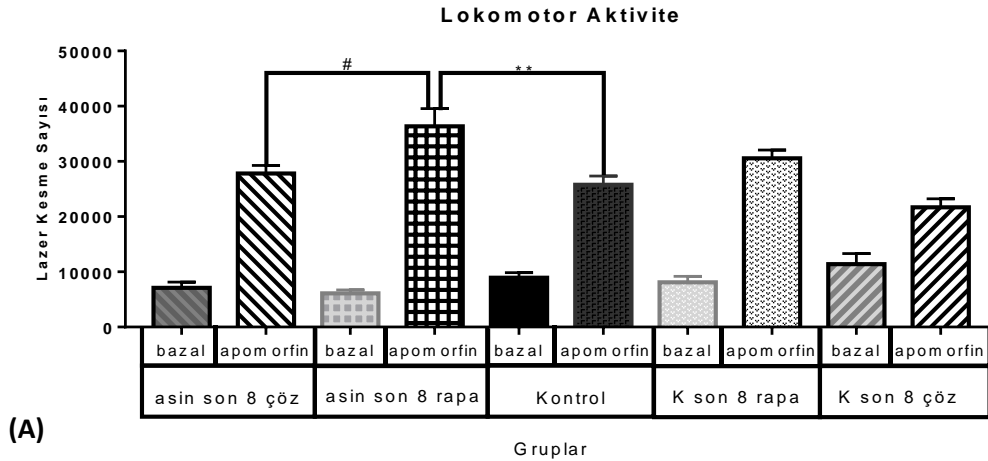
Şekil 4.20. Açık alan lokomotor aktivite testine göre (A) bazal ve apomorfine enjeksiyonu sonrası grupların horizontal aktivitelerinin gösterimi: (B) apomorfine indüksiyonu sonrası hareketlilikte meydana gelen artışın bazal aktivitelerinin çıkarılması sonucu elde edilen horizontal aktivite farkının gösterimi ($\wedge p < 0,05$ a-sin ilk 8 çöz vs K ilk 8 çöz, $-p < 0,05$ a-sin son 8 çöz vs K son 8 çöz, $#### p < 0,001$ a-sin son 8 çöz vs a-sin son 8 rapa, $*p < 0,001$ a-sin ilk 8 çöz, a-sin ilk 8 rapa, a-sin son 8 rapa vs naïve kontrol, $\phi\phi p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs K son 8 rapa, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ ilk\ 8\ çözücü}=9$, $n_{a-sin\ son\ 8\ çözücü}=8$, $n_{a-sin\ ilk\ 8\ rapa}=7$, $n_{a-sin\ son\ 8\ rapa}=9$, $n_{kontrol}=11$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ rapamisin}=5$, $n_{kontrol\ son\ 8\ rapamisin}=5$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ çözücü}=6$, $n_{kontrol\ son\ 8\ çözücü}=6$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile eşlenmemiş veriler için *student'in t* testleri uygulanmıştır).

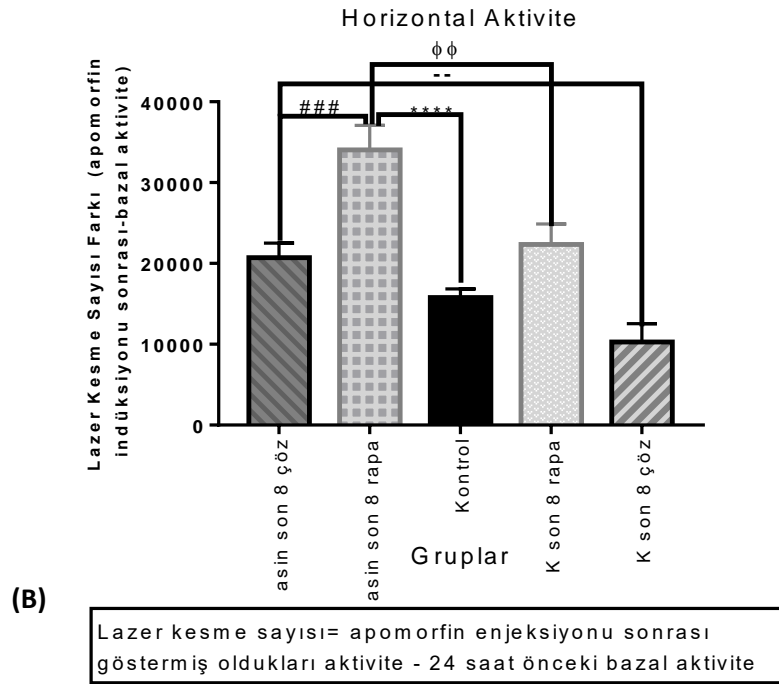
A-sin enjeksiyonunun ardından ilk 8 hafta tedavi uygulandığında hem çözücü hem de rapamisin tedavisi alan grupların bazal hareketlerinin *naive* kontrol grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21.a). Apomorfin enjeksiyonu sonrasında harekette meydana gelen artışın bazal hareketlilikten farkında ise a-sin enjeksiyon gruplarında kontrollere göre daha fazla artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21.b).



Şekil 4.21. Açık alan lokomotor aktivite testi ilk 8 hafta (A) bazal ve apomorfin ile indüklenmiş horizontal aktivite, (B) horizontal aktivitede meydana gelen değişiklikler ($^{\wedge}p<0,05$ a-sin ilk 8 çöz vs K ilk 8 çöz, $*p<0,05$ a-sin ilk 8 çöz, a-sin ilk 8 rapa vs kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ ilk\ 8\ \text{çözücü}}=9$, $n_{a-sin\ ilk\ 8\ rapa}=7$, $n_{kontrol}=11$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ rapamisin}=5$, $n_{kontrol\ ilk\ 8\ \text{çözücü}}=6$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

Son 8 hafta tedavi grupları arasında bazal hareketlilikte fark gözlenmedi. Apomorfin ile indüklenen lokomotor aktivite de ise harekette en büyük artışın a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grupta olduğu gözlendi ($p=0,0029$ a-sin son 8 rapa (36365 ± 3211) vs kontrol (25786 ± 1575); $p=0,0391$ a-sin son 8 rapa (36365 ± 3211) vs a-sin son 8 çöz (27822 ± 1435); Şekil 4.22.a). Apomorfin indüksiyonu sonrası bazal aktiviteye göre hareketlilikte meydana gelen fark değerlendirildiğinde, a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun, hareketliliğinde meydana artışın en yüksek olduğu gözlendi (Şekil 4.22.b). Ayrıca; rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda da diğer kontrollerden daha fazla artış olduğu gözlendi (Şekil 4.22.b). Bunun yanında a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grupta meydana gelen artışın da kontrole çözücü uygulanmasına göre daha fazla olduğu gözlendi (Şekil 4.22.b).

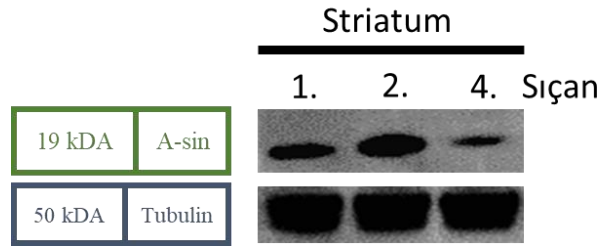




Şekil 4.22. Açık alan lokomotor aktivite testi son 8 hafta (A) bazal ve apomorfine ile indüklenmiş horizontal aktivite, (B) horizontal aktivitede meydana gelen değişiklikler (*** $p < 0,001$ a-sin son 8 rapa vs kontrol, ### $p < 0,005$ a-sin son 8 çöz vs a-sin son 8 rapa, $\phi\phi p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs K son 8 rapa, $p < 0,05$ a-sin son 8 çöz vs K son 8 çöz,; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n_{a-sin\ son\ 8\ \text{çöz}}=8$, $n_{a-sin\ son\ 8\ rapa}=9$, $n_{kontrol}=11$, $n_{kontrol\ son\ 8\ rapa}=5$, $n_{kontrol\ son\ 8\ \text{çöz}}=6$; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü, K: Kontrol kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.5.AAV-aracılı Bilateral SN ve DG Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi Sağlanarak Hafta Bazında Motor Fonksiyonları Değerlendirilen Grubun 16. Haftada Patolojik Olarak Meydana Gelen Değişiklikleri

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesine bağlı hastalığın ilerlemesi ile beraber motor fonksiyona etkisini değerlendirmek için iki haftada bir lokomotor aktivite testi yapılan grup 16. haftada sakrifiye edildi. İmmüno-blotlama ile striatumda a-sin aşırı ifadesi sağlandığı gösterildi (Şekil 4.23).



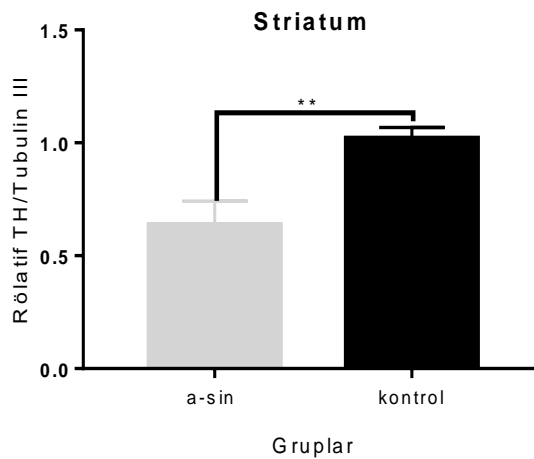
Şekil 4.23. Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin immünoyotlama ile protein bantlarının gösterimi

Analiz sonucunda, bir sıçanın striatumunda a-sin aşırı ifadesi görülmediği için, değerleri açık alan lokomotor aktivite değerlendirmelerine katılmadı.

4.5.1. AAV-aracılı Bilateral SN ve DG Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi Sağlanarak Hafta Bazında Motor Fonksiyonları Değerlendirilen Grubun 16. Hafta Striatum TH Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin 16. haftada striatumda dopaminerjik nöron terminalleri üzerine etkisi immünoyotlama ile değerlendirildi.

Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların, kontrol grubuna göre TH miktarında azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,0017$ a-sin ($0,64\pm0,1$; $n=4$) vs kontrol ($1,02\pm0,05$; $n=5$); Şekil 4.24).

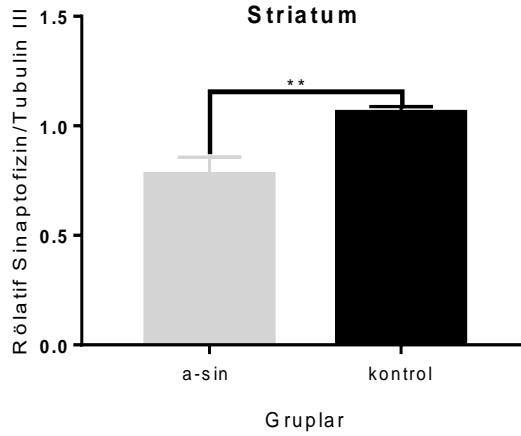


Şekil 4.24. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin motor hareketliliğe etkisi değerlendirilen gruplarda striatum TH düzeyleri ($**p<0,01$ a-sin vs kontrol, veriler Ort \pm SH olarak ifaded edilmiştir. $n=4$ a-sin, $n=5$ kontrol; eşlenmemiş veriler için *Student'in t* testi uygulanmıştır).

4.5.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde 16. Haftada Striatumda Sinaptofizin Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin 16. haftada striatumda sinapslar üzerine etkisi immünoiblamlama ile anti-sinaptofizin antikoru kullanılarak değerlendirildi.

Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların, kontrol grubuna göre sinaptofizin miktarında azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,0013$ a-sin ($0,78\pm0,08$; $n=4$) vs kontrol ($1,06\pm0,03$; $n=5$); Şekil 4.25).

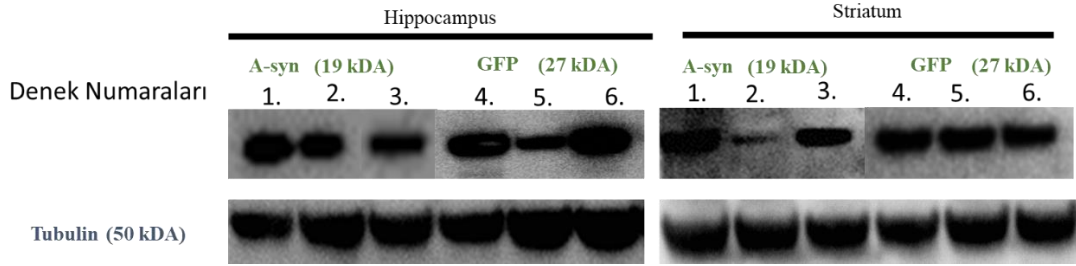


Şekil 4.25. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin motor hareketliliğe etkisi değerlendirilen gruplarda striatum sinaptofizin düzeyleri (veriler Ort \pm SH olarak ifaded edilmiştir. $n=4$ a-sin, $n=5$ kontrol; eşlenmemiş veriler için *Student'in t* testi uygulanmıştır).

4.6. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Patolojik Olarak Meydana Gelen Değişiklikler

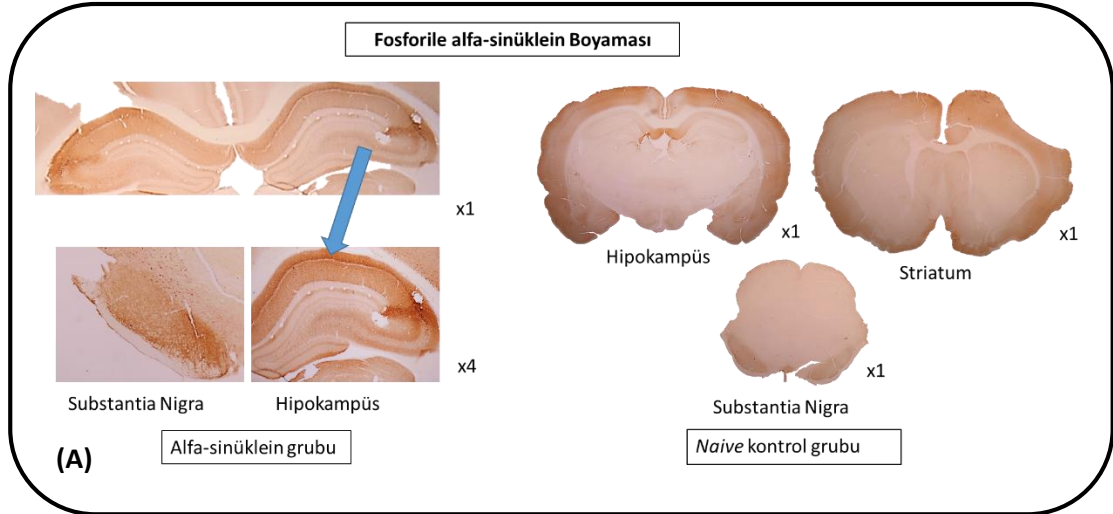
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin ve GFP aşırı ifadesinin başarı ile sağlandığı immünoiblamlama yöntemi ile hipokampus ve striatumda teyit edildi (Şekil 4.26). A-sin aşırı ifadesi daha önce belirtildiği gibi (Bkz. Bölüm 3.8) immünoiblamlamada transfer sonrası %0.4 PFA ile fikse edilip gün aşırı a-sin antikoru

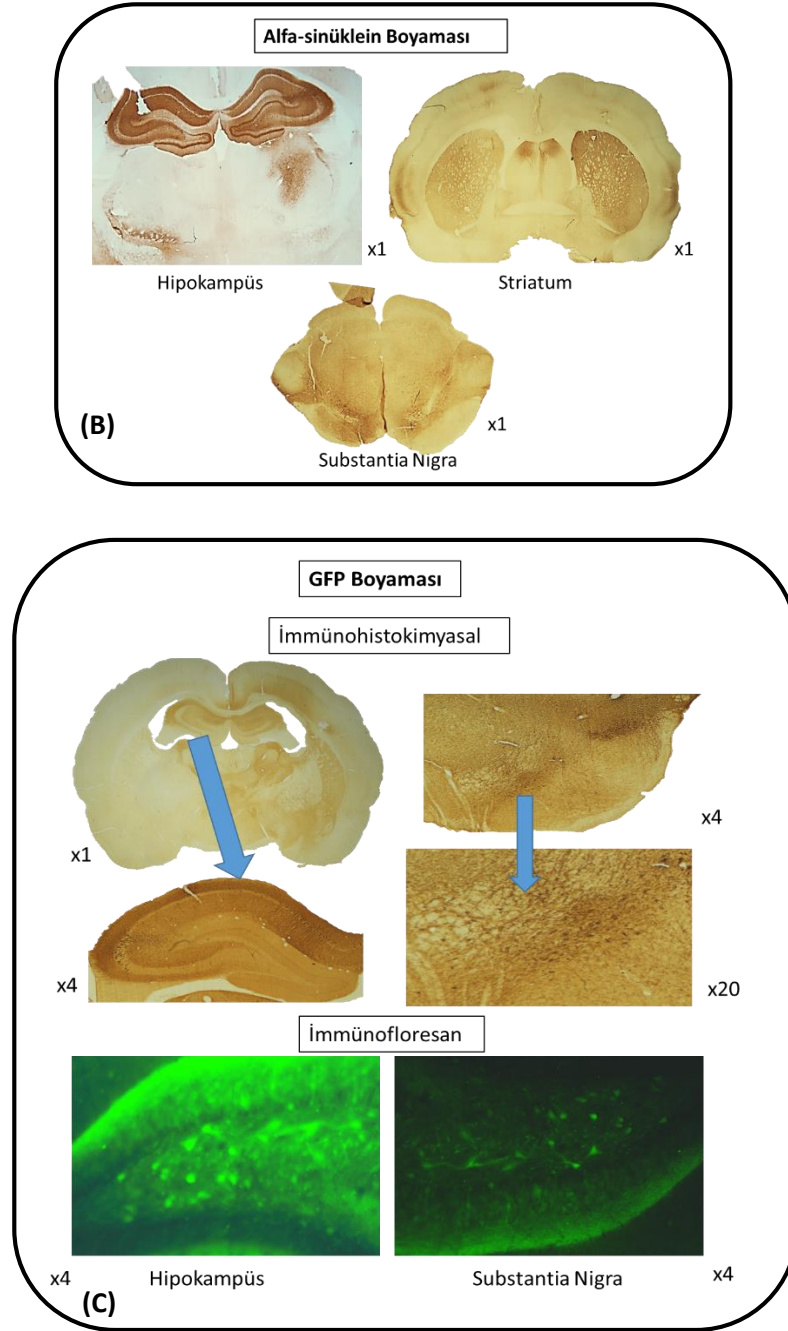
ile muamele edildi. GFP ifadesi ise rutin olarak tekrarlanan transfer işlemi sonrası gün aşırı GFP antikoru ile muamele edildi.



Şekil 4.26. Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin ve GFP aşırı ifadesinin immünoiblottlama yöntemi ile gösterimi

A-sin boyaması, Parkinson hastalığının patolojik belirteci fosforile a-sin (p-a-sin) boyaması ve GFP boyaması immünohistokimyasal olarak gerçekleştirilerek hedeflenen bölgelerde patoloji oluşturulabildiği teyit edildi (Şekil 4.27). P-a-sin boyaması, a-sin enjeksiyon grubunda yoğun olarak boyanırken, *naive* kontrol grubunda belirgin bir boyanma gözlenmedi (Şekil 4.27.A)



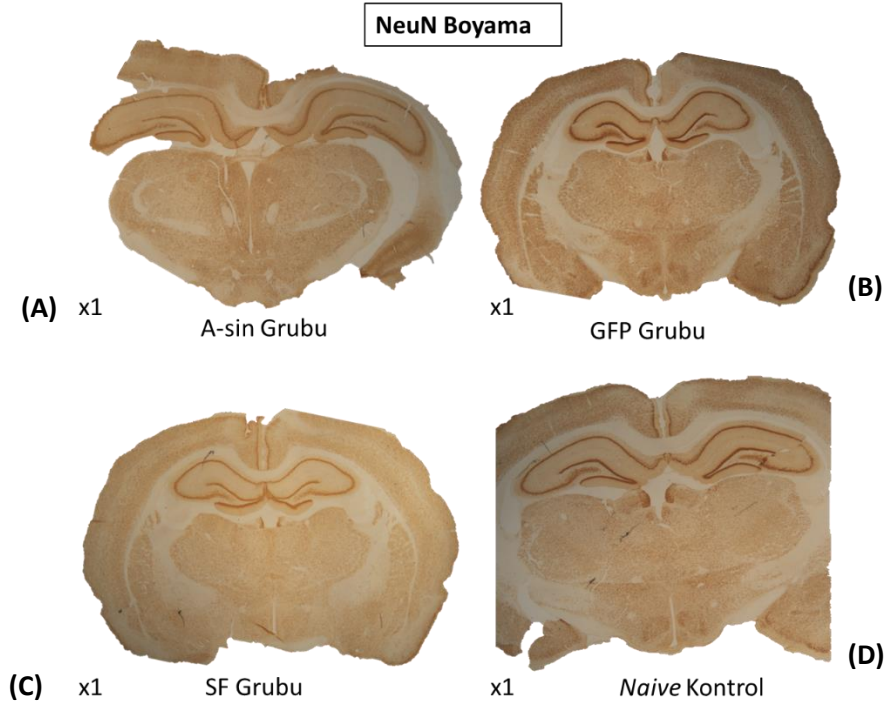


Şekil 4.27. İmmünohistokimyasal boyama ile (A) a-sin, (B) p-a-sin ve (C) GFP aşırı ifadelerinin gösterimi (x1, x4 ve x20 büyütme uygulanmıştır).

4.6.1. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Hipokampüste NeuN Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler

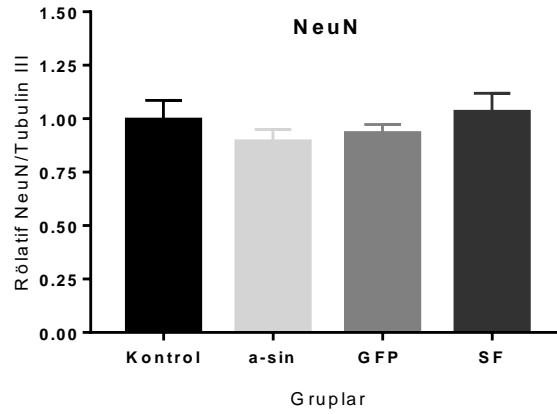
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampüs nöronları üzerine etkisi immünoiblottama ile Nöronal çekirdek antijeni (NeuN) ile miktar tayini

yapılarak değerlendirildi. Ayrıca immünohistokimyasal olarak da hipokampus NeuN boyaması gerçekleştirildi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. İmmünohistokimyasal olarak (A) a-sin, (B) GFP, (C) SF ve (D) *naive* kontrol gruplarında hipokampus NeuN boyaması (x1 büyütme ile gösterilmiştir).

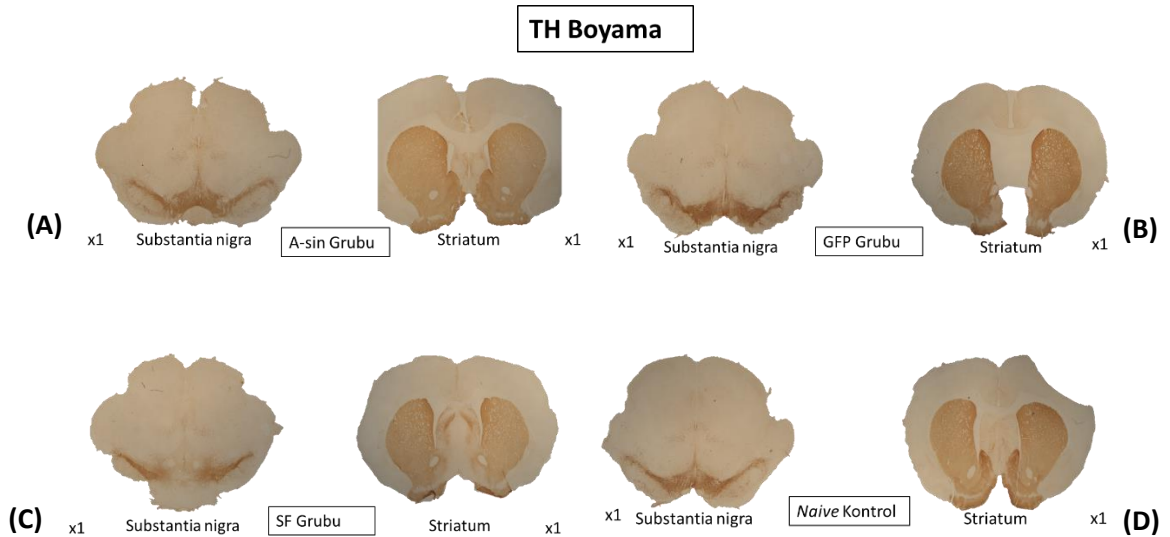
Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların, diğer kontrol gruplarına göre (SF enjekte edilmiş sıçanlar ve *naive* kontrol hayvanları) NeuN miktarında azalma gözlemlendi (Şekil 4.29). GFP enjekte edilmiş sıçanlarda da NeuN miktarında a-sin enjekte edilmiş gruba benzer şekilde azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.29). Ancak her iki gruptaki nöron miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadı.



Şekil 4.29. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampüste NeuN miktarına etkisi (veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n=5 a-sin, n=5 GFP, n=4 SF, n=7 kontrol; tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

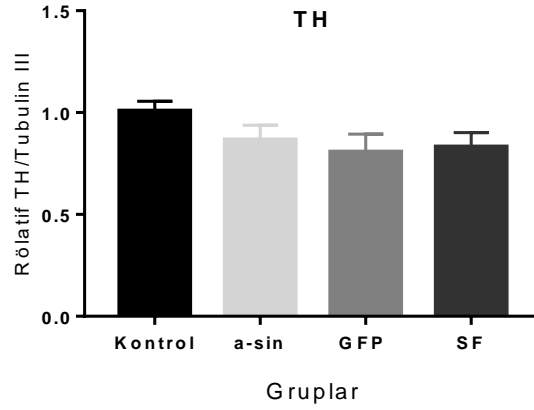
4.6.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Striatumda TH Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin striatumda dopaminerjik nöron terminalleri (sonlanmaları) üzerine etkisi immünoiblottlama ile değerlendirildi. Ayrıca immünohistokimyasal olarak da hipokampus NeuN boyaması gerçekleştirildi (Şekil 4.30).



Şekil 4. 30. İmmünohistokimyasal olarak (A) a-sin, (B) GFP, (C) SF ve (D) *naive* kontrol gruplarında SN ve striatumda TH boyaması (x1 büyütme uygulanmıştır).

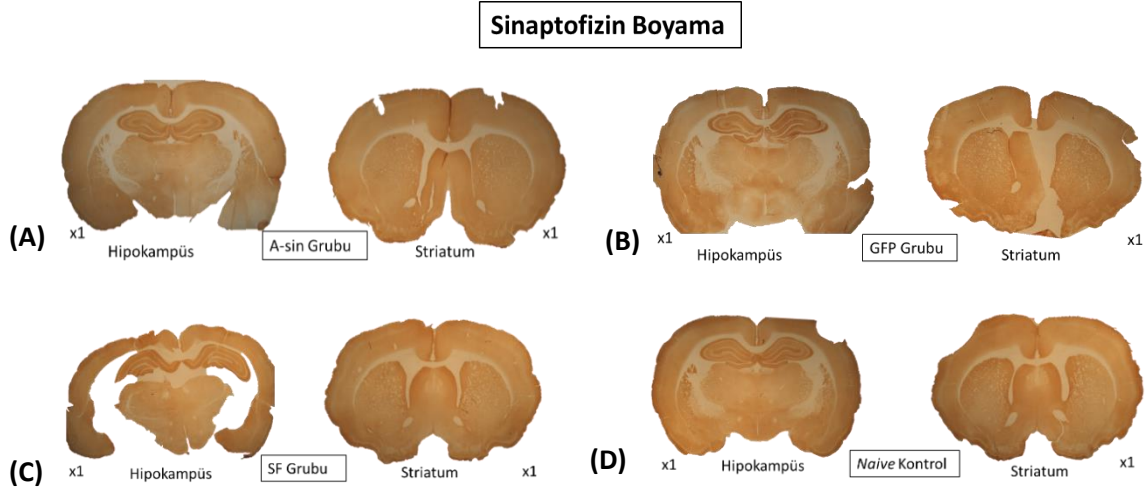
Bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların, kontrol gruplarına göre (GFP, SF enjekte edilmiş sıçanlar ve *naive* kontrol hayvanları) TH miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmedi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin striatumda TH miktarına etkisi (veriler Ort \pm SH olarak edilmiştir. n=5 a-sin, n=5 GFP, n=4 SF, n=7 kontrol; tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.6.3. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Hipokampus ve Striatumda Sinaptofizin Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler

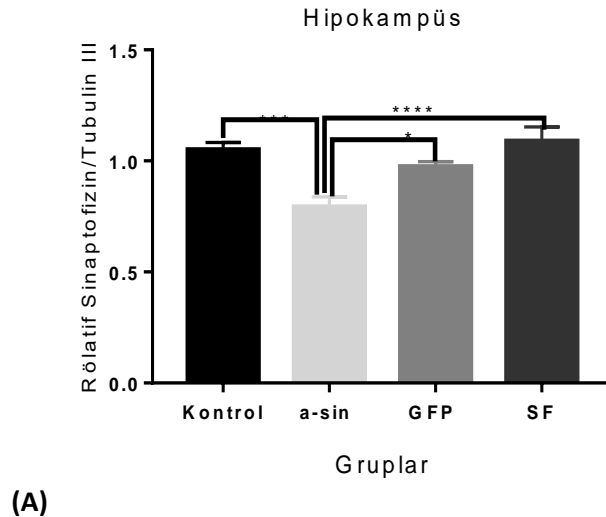
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampus ve striatumda sinapslar üzerindeki etkisi immünoiblottama ile anti-sinaptofizin antikoru kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca immünohistokimyasal olarak da sinaptofizin boyaması gerçekleştirildi (Şekil 4.32).

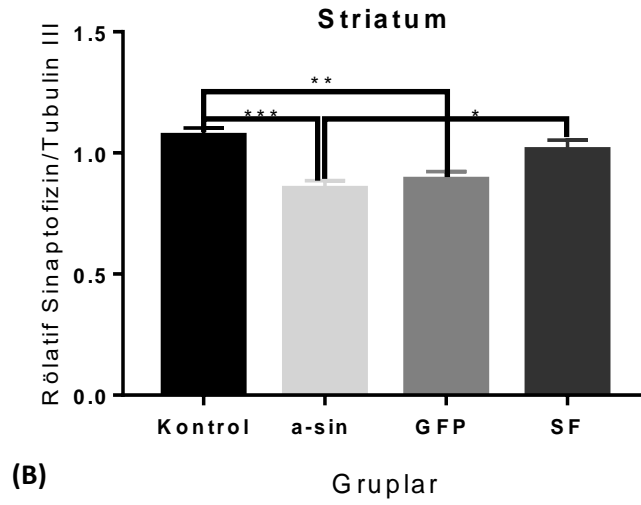


Şekil 4.32. İmmünohistokimyasal olarak (A) a-sin, (B) GFP, (C) SF ve (D) *naive* kontrol gruplarında hipokampus ve striatum sinaptofizin boyaması (x1 büyütme uygulanmıştır).

Bilateral SN ve DG'ye AAV- aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların hipokampusünde diğer gruplara göre sinaptofizin miktarında azalma olduğu gözlemlendi ($p=0.0087$ a-sin ($0,79\pm0,4$) vs GFP ($0,97\pm0,2$), $p=0.0002$ a-sin ($0,79\pm0,4$) vs kontrol ($1,5\pm0,3$), $p=0.0001$ a-sin ($0,79\pm0,4$) vs SF ($1,09\pm0,6$); Şekil 4.33.a).

Bilateral SN ve DG'ye AAV- aracılı a-sin enjekte edilmiş sıçanların striatumunda da diğer kontrol gruplarına göre sinaptofizin miktarında azalma olduğu gözlemlendi ($p=0.0003$ a-sin ($0,85\pm0,03$) vs kontrol ($1,07\pm0,3$), $p=0.0081$ a-sin ($0,79\pm0,4$) vs SF ($1,01\pm0,4$); Şekil 4.33.b). Ayrıca GFP enjekte edilmiş grubun sinaptofizin miktarında da *naive* kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,0025$ GFP ($0,89\pm0,03$) vs kontrol ($1,07\pm0,3$), Şekil 4.33.b).

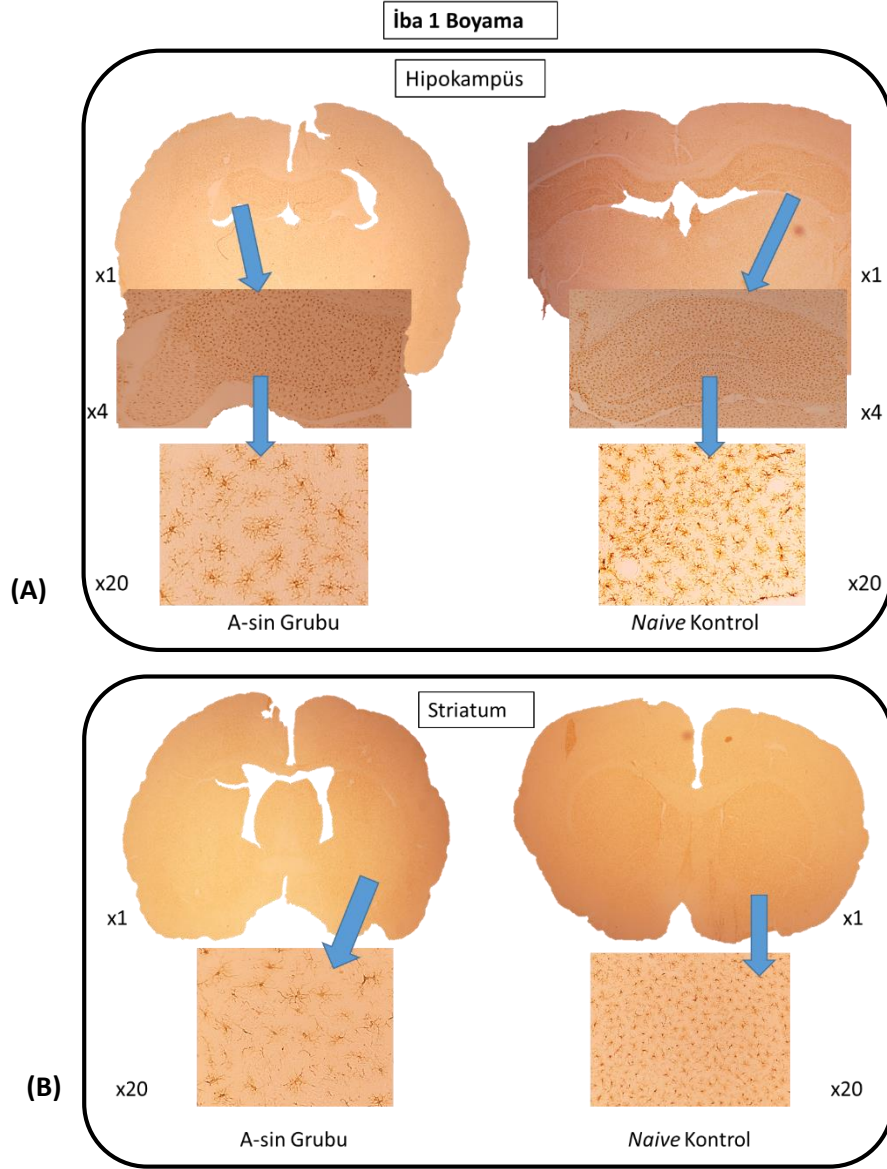




Şekil 4.33. Sıçanlarda bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin (A) hipokampus, (B) striatumda sinaptofizin miktarına etkisi (* $p < 0,05$ a-sin vs GFP, *** $p < 0,005$ a-sin vs *naive* kontrol, **** $p < 0,001$ a-sin vs SF (hipokampus); * $p < 0,05$ a-sin vs SF, *** $p < 0,005$ a-sin vs kontrol, ** $p < 0,01$ GFP vs *naive* kontrol (striatum); veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. $n=5$ a-sin, $n=5$ GFP, $n=4$ SF, $n=7$ kontrol; tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.6.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Hipokampus ve Striatumda İba 1 Düzeyinde Meydana Gelen Değişiklikler

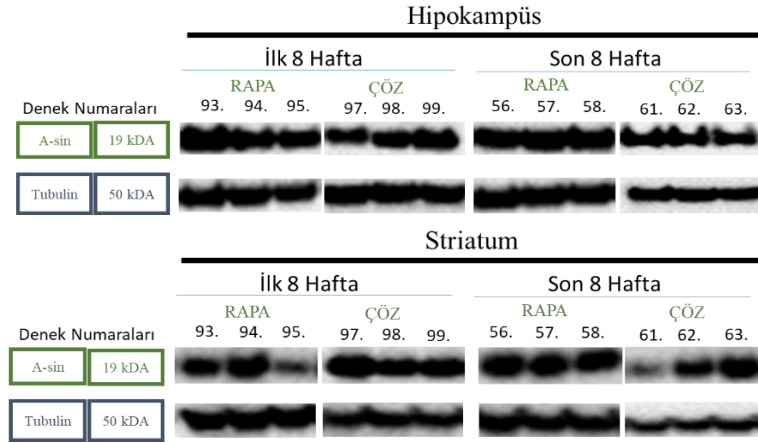
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampus ve striatumda glialar üzerindeki etkisi immünohistokimyasal boyama ile anti-iba-1 antikoru kullanılarak gösterildi (Şekil 4.34). İba 1 boyaması sonrasında a-sin grubunun hipokampuslerindeki glial hücrelerin daha geniş ve dallanmış olduğu gözlemlendi ancak kantitatif olarak değerlendirilmedi.



Şekil 4.34: İmmünohistokimyasal olarak (A) hipokampüste, (B) striatumda a-sin ve *naive* kontrol gruplarının iba-1 boyaması (x1, x4 ve x20 büyütme uygulanmıştır).

4.7. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Patolojik Olarak Meydana Gelen Değişikliklere Etkisi

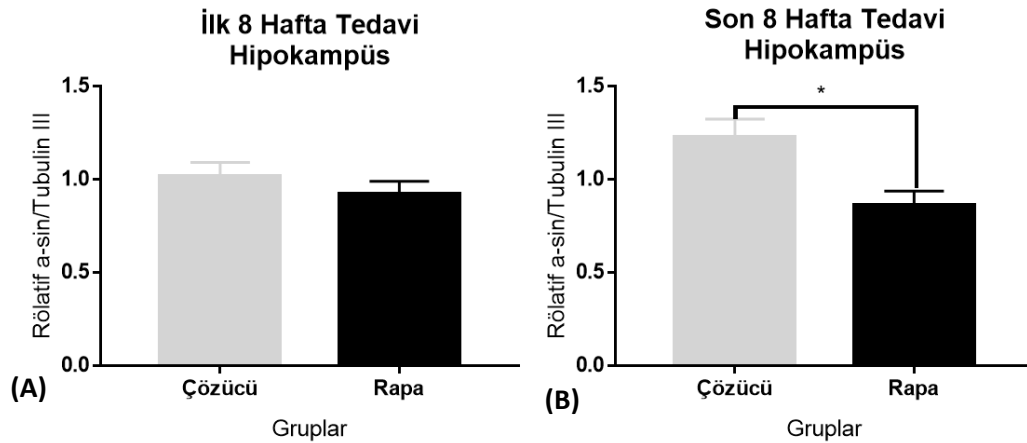
Bilateral SN ve DG’de AAV aracılı a-sin aşırı ifadesinin başarı ile sağlandığı immünoiblottlama ile teyit edildi (Şekil 4.35).

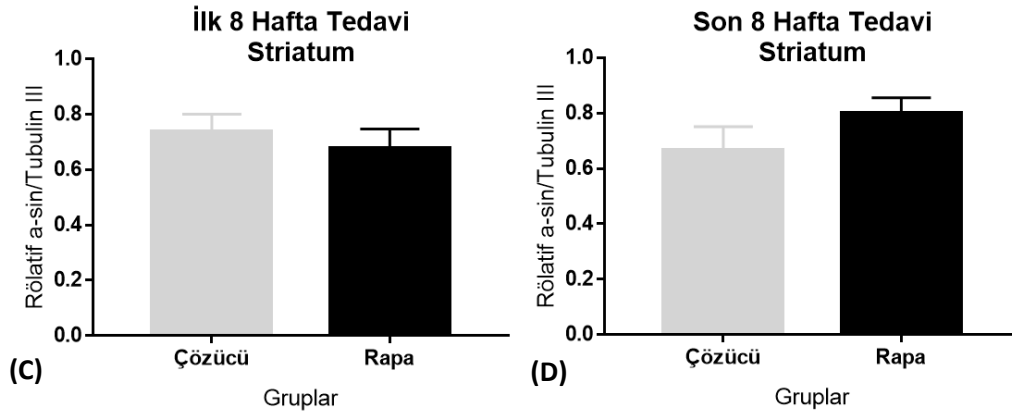


Şekil 4.35. AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin hipokampus ve striatumda her gruptan rastgele 3 numunede şekilsel gösterimi

Rapamisin tedavisinin a-sin ifadesine etkisini değerlendirmek için hem ilk 8 hem de son 8 hafta tedavi alan grupların a-sin yükü miktarına göre karşılaştırıldı. Hipokampüste ilk 8 hafta rapamisinuyugulanan grubun, çözücü uygulanan gruba göre daha az a-sin aşırı ifade ettiği gözlenirse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.36.a). Ancak son 8 hafta rapamisin tedavisi alan grubun hipokampus a-sin yükünün çözücü alan gruptan daha düşük olduğu bulundu ($p=0,01$ a-sin son 8 rapa ($0,86\pm 0,1$) vs a-sin son 8 çöz ($1,22\pm 0,08$); Şekil 4.36.b).

İlk 8 hafta rapamisin ile çözücü uygulanan grubun striatum a-sin aşırı ifade miktarları arasında da hipokampüse benzer şekilde fark gözlenmedi (Şekil 4.36.c). Son 8 hafta tedavi gruplarının striatum a-sin yükleri arasında da ilk 8 hafta gruplarına benzer şekilde fark gözlenmedi (Şekil 4.36.d).





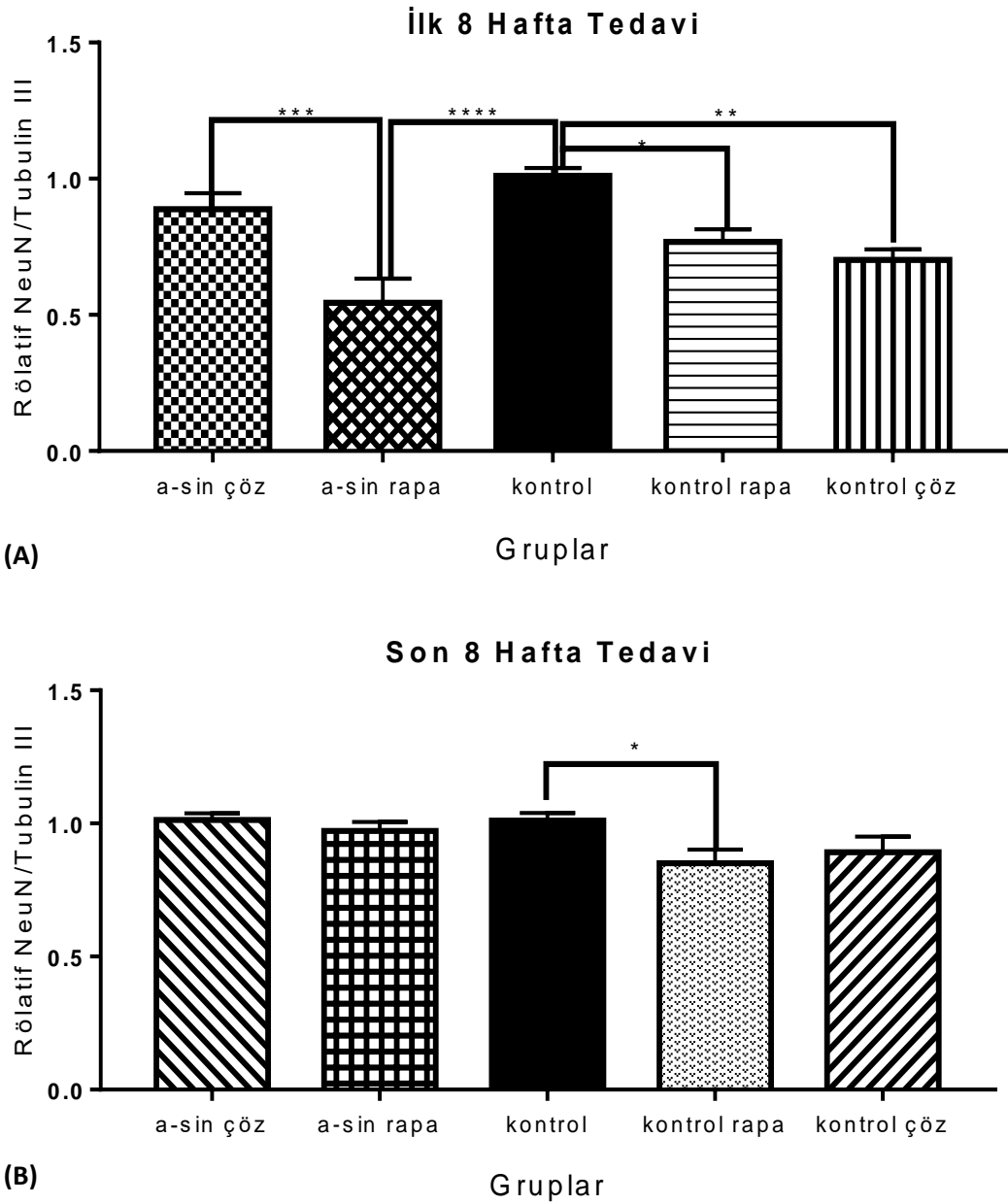
Şekil 4.36. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta uygulandığında, (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste, (C) ilk 8 hafta uygulandığında, (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda göreceli a-sin yüküne etkisi (* $p < 0,05$ a-sin + son 8 hafta rapa vs a-sin+ son 8 hafta çözücü; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5; Rapa: Rapamisinin kısaltması olarak kullanılmıştır. Eşlenmemiş veriler için *Student'in t* testi uygulanmıştır).

4.7.1. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampüste NeuN Düzeyinde Meydana Gelen Değişikliklere Etkisi

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan sıçanlarda rapamisin tedavisinin hipokampüste nöronlar üzerine etkisi immünoablota ile anti-NeuN antikoru kullanılarak değerlendirildi.

İlk 8 hafta tedavi uygulanan gruplarda rapamisin tedavisi alan a-sin grubunun diğer gruplara göre NeuN miktarının en az olduğu gözlemlendi (Şekil 4.37.a). İlk 8 hafta kontrole rapamisin ya da çözücü uygulanmasının da NeuN miktarını azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.37.a).

Son 8 hafta tedavi grupları arasında a-sin enjeksiyonu sonrası NeuN miktarında anlamlı bir azalma gözlenmezken, kontrole rapamisin uygulanmasının NeuN miktarını azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.37.b).



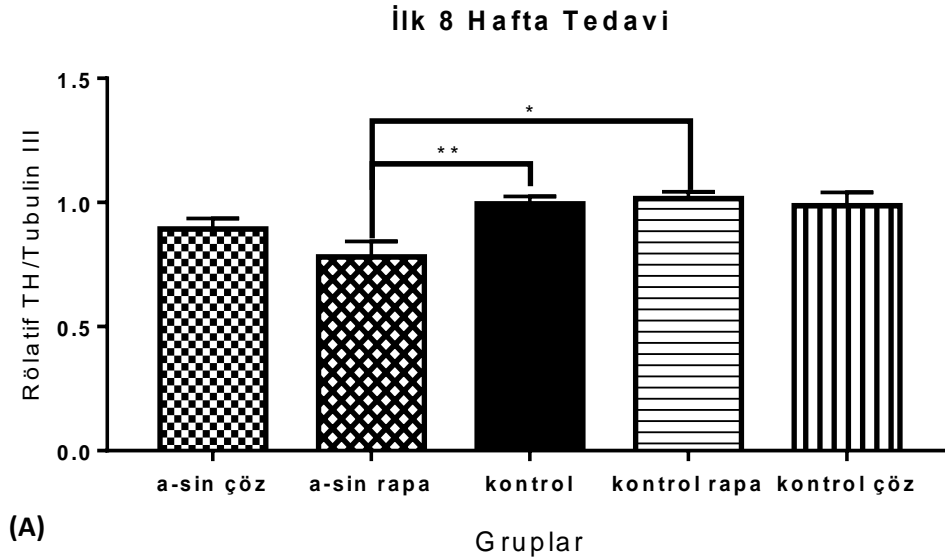
Şekil 4.37. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta ve (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampus NeuN miktarına etkisi (#### $p < 0,001$ a-sin ilk 8 rapa vs a-sin ilk 8 çöz,*** $p < 0,001$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol, $\phi\phi\phi p < 0,005$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol ilk 8 rapa, ** $p < 0,01$ kontrol vs kontrol ilk 8 rapa, kontrol ilk 8 çözücü, $^+p < 0,05$ a-sin ilk 8 çözücü vs kontrol ilk 8 çözücü, * $p < 0,05$ kontrol + son 8 hafta rapa vs kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

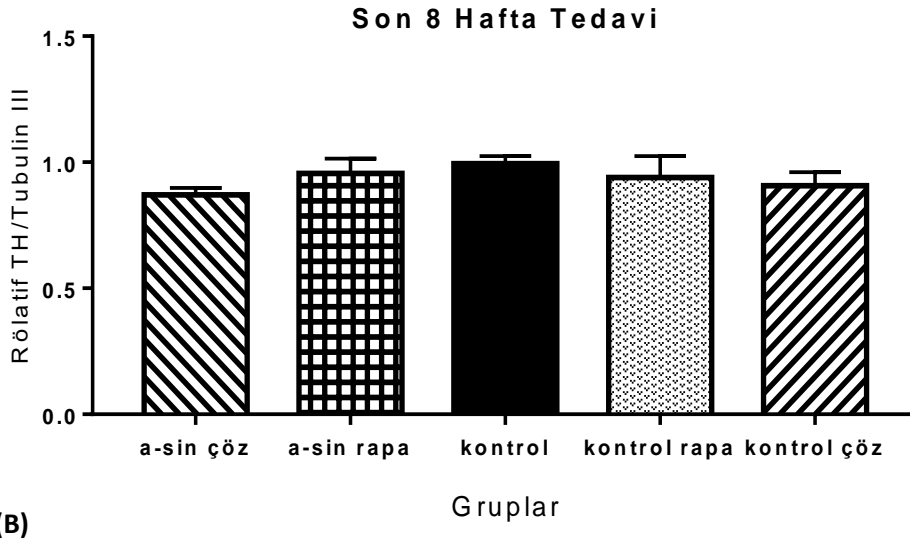
4.7.2. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Striatumda TH Düzeyine Etkisi

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda rapamisin tedavisinin striatumda dopaminerjik nöron terminalleri üzerine etkisi immünoiblottama ile anti-TH antikoru kullanılarak değerlendirildi.

İlk 8 hafta tedavi uygulanan gruplarda rapamisin tedavisi alan grubun diğer gruplara göre TH miktarının en az olduğu gözlemlendi (Şekil 4.38.a).

Son 8 hafta tedavi uygulanması sonrası gruplar arasında striatum TH miktarında fark gözlenmedi (Şekil 4.38.b).





Şekil 4.38. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta ve (B) son 8 hafta uygulandığında striatumda TH miktarına etkisi. (* $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol ilk 8 rapa, ** $p < 0,01$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol; grafikler Ort \pm SH olarak gösterilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey's çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.7.3. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda Sinaptofizin Düzeyine Etkisi

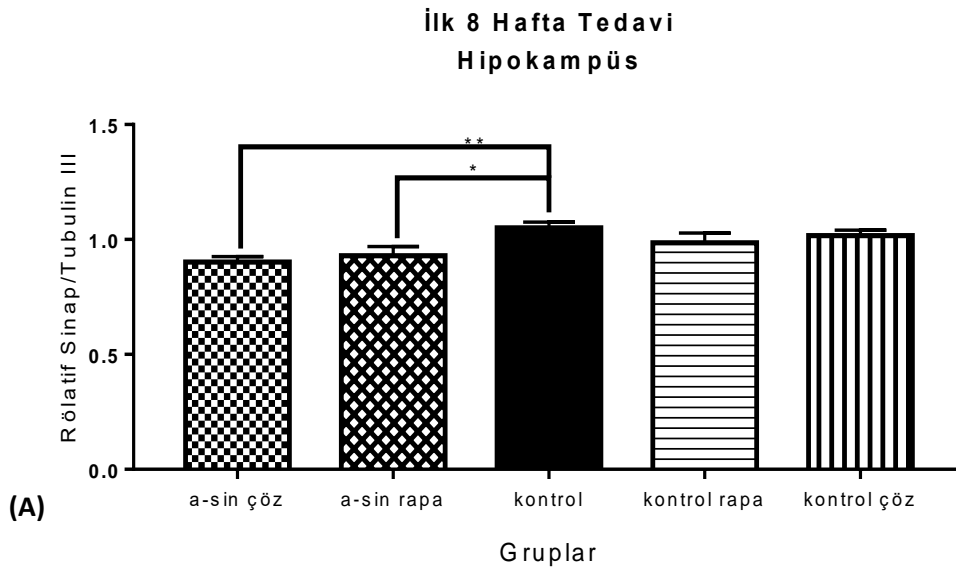
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan sıçanlarda rapamisin tedavisinin hipokampus ve striatumda sinapslar üzerine etkisi immünoiblottama ile anti-sinaptofizin antikoru kullanılarak değerlendirildi.

İlk 8 hafta tedavi gruplarında, a-sin enjeksiyonu sonrası hem çözücü alan hem de rapamisin tedavisi alan grupların hipokampuslarındaki sinaptofizin miktarlarının, *naive* kontrole göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.39.a).

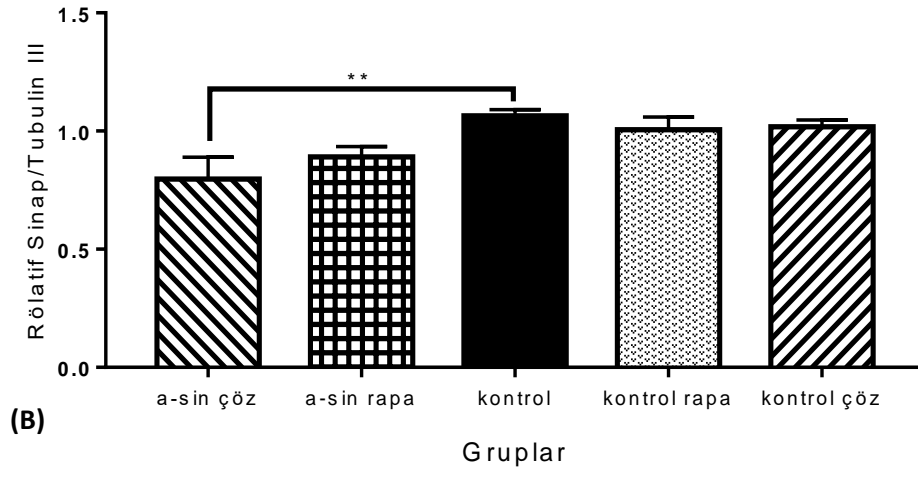
Son 8 hafta tedavi gruplarında ise a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grubun hipokampus sinaptofizin miktarlarının, *naive* kontrol grubuna göre daha az olduğu bulundu (Şekil 4.39.b). Rapamisin tedavisi uygulanan a-sin grubun ise sinaptofizin seviyesinin çözücü uygulanmasına göre bir miktar korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.39.b).

İlk 8 hafta çözücü uygulanan a-sin grubun striatumdaki sinaptofizin miktarlarının da, *naive* kontrol grubuna göre daha az olduğu bulundu (Şekil 4.39.c). A-sin enjekte edilip rapamisin tedavisi uygulanan grup ile *naive* kontrol grubu arasındaki farkın ise striatumda olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.39.c). Ancak, kontrole rapamisin tedavisi uygulanmasının sinaptofizin miktarını *naive* kontrol grubuna göre azalttığı bulundu (Şekil 4.39.c).

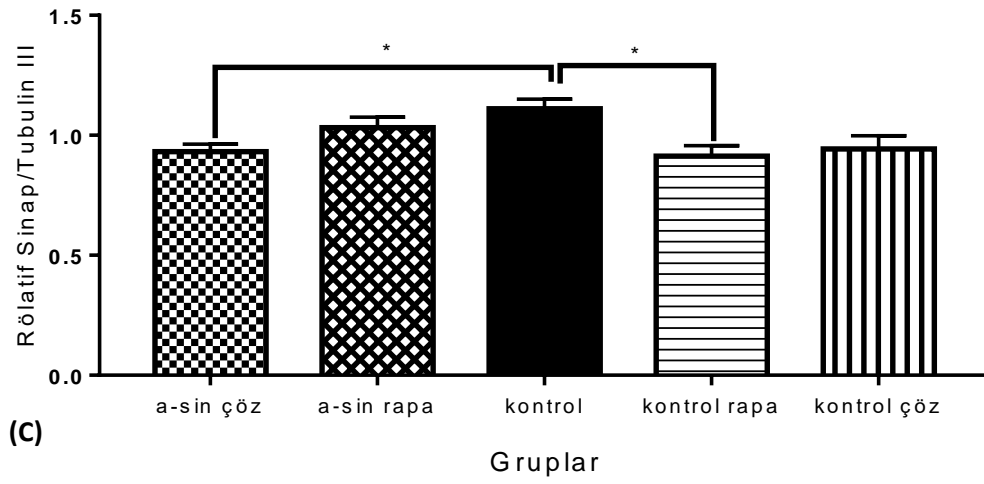
Son 8 hafta tedavi gruplarında ise asin enjeksiyonu sonrası striatum sinaptofizin miktarında azalma olduğu ve bu azalmanın özellikle çözücü uygulanması sonrası *naive* kontrol grubuna göre daha yoğun olduğu bulundu (Şekil 4.39.d).

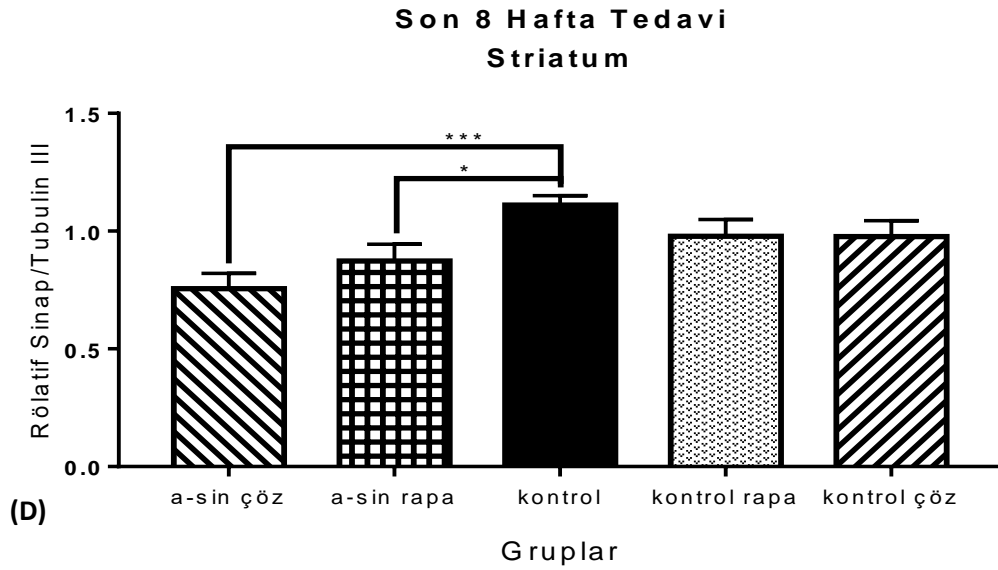


**Son 8 Hafta Tedavi
Hipokampus**



**İlk 8 Hafta Tedavi
Striatum**





Şekil 4.39. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta ve (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste, (C) ilk 8 hafta ve (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda sinaptofizin miktarına etkisi (* $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol, ** $p < 0,01$ a-sin ilk 8 çözücü vs kontrol; ** $p < 0,01$ a-sin son 8 çözücü vs kontrol (hipokampus), * $p < 0,05$ a-sin ilk 8 çöz vs kontrol, * $p < 0,05$ kontrol ilk 8 rapa vs kontrol, * $p < 0,05$ a-sin son 8 rapa vs kontrol, *** $p < 0,005$ a-sin son 8 çözücü vs kontrol (striatum); veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.7.4. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda ALDH1L1 Düzeyine Etkisi

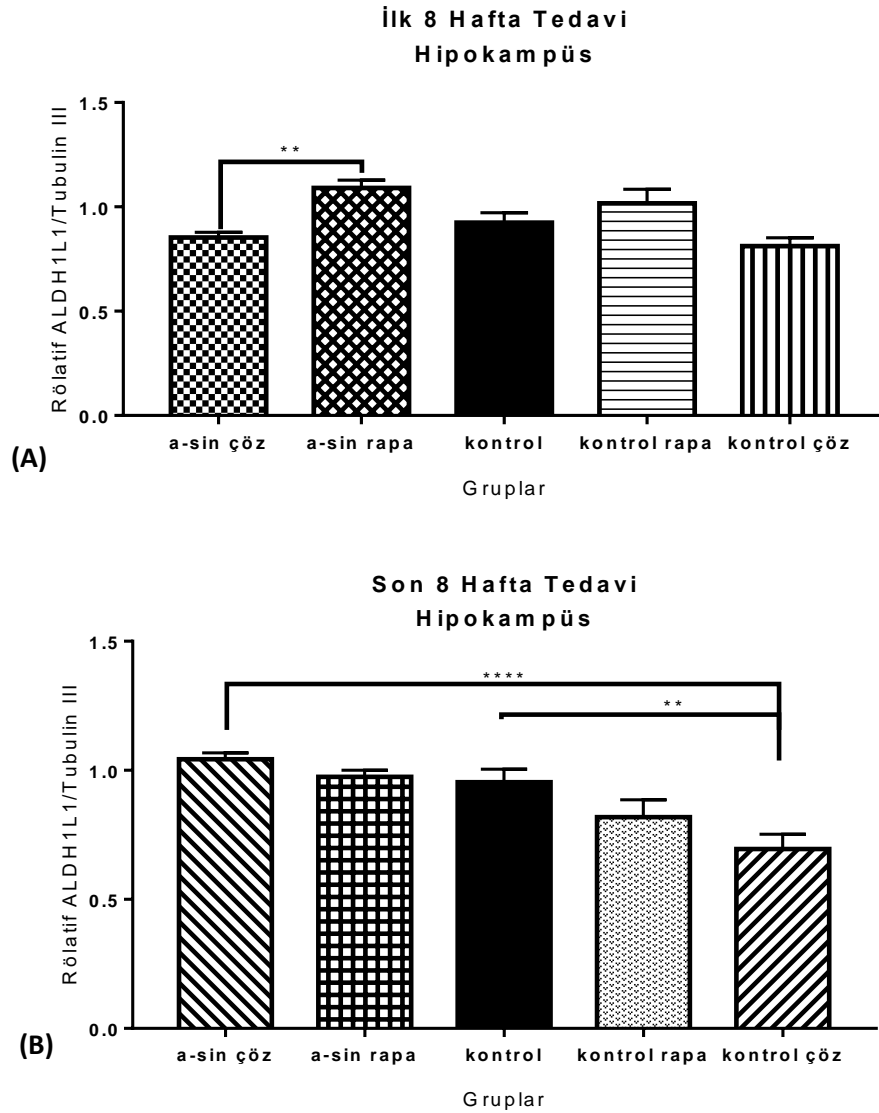
Bilateral SN ve DG'de AAV aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda rapamisin tedavisinin hipokampus ve striatumda astrositler üzerindeki etkisi immünoblotlama ile anti-ALDH1L1 antikorunu kullanılarak değerlendirildi.

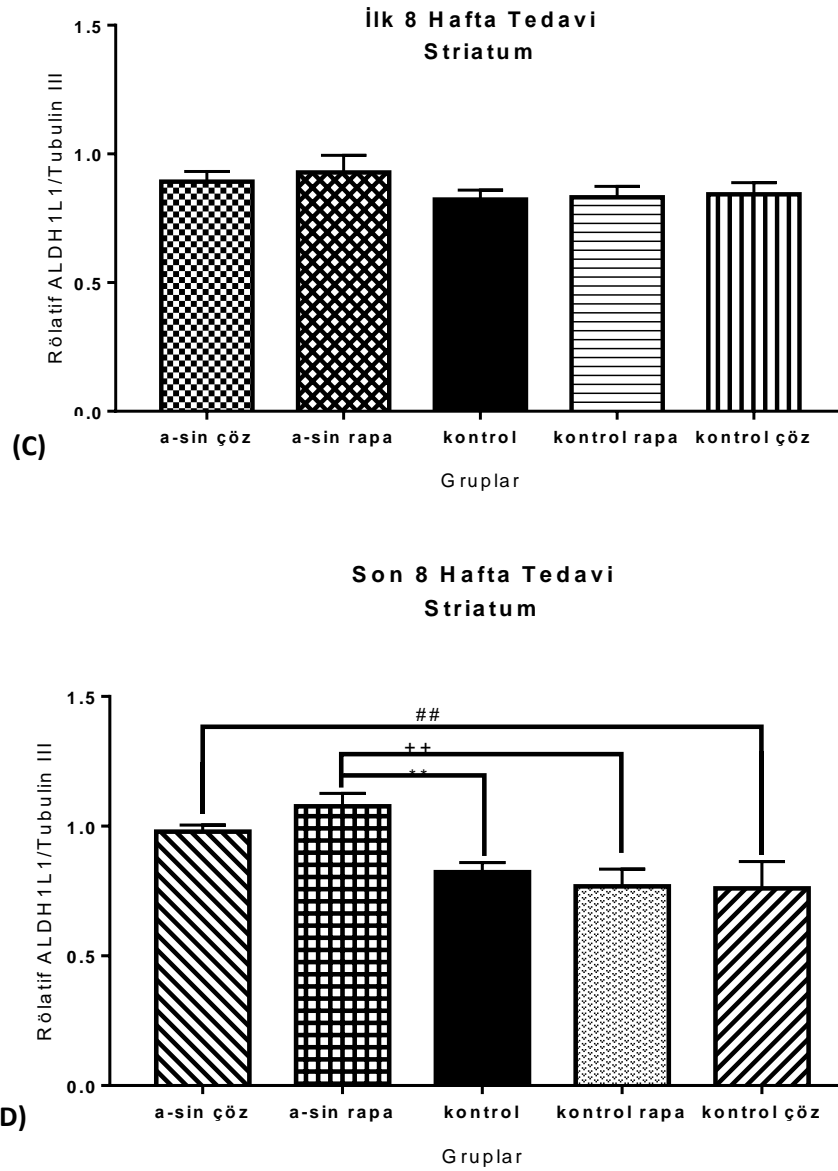
İlk 8 hafta tedavi grupları arasında rapamisin tedavisi uygulanması sonucu hipokampus ALDH1L1 miktarlarında özellikle a-sin enjeksiyonu sonrası artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40.a).

Son 8 hafta tedavi alan grupların hipokampuslarındaki ALDH1L1 miktarları değerlendirildiğinde ise a-sin enjekte edilip çözücü alan grubun ALDH1L1 seviyesinin

çözücü alan kontrol grubuna göre ve *naive* kontrol grubunun da çözücü alan kontrol grubuna göre daha az olduğu bulundu (Şekil 4.40.b).

İlk 8 hafta tedavi gruplarının striatum ALDH1L1 seviyeleri arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.40.c). Ancak; son 8 hafta tedavi uygulanan gruplarda a-sin enjeksiyonu sonrası striatum ALDH1L1 seviyelerinde artış olduğu gözlemlendi. Özellikle a-sin enjeksiyonu ardından son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının ALDH1L1 seviyesini hem *naive* kontrole hem de kontrole rapamisin uygulanmasına göre artırdığı gözlemlendi (Şekil 4.40.d). Bunun yanı sıra a-sin enjeksiyonu ardından son 8 hafta sadece çözücü uygulanan grubunda striatum ALDH1L1 seviyesinin kontrole çözücü uygulanmasına göre arttığı gözlemlendi (Şekil 4.40.d).





Şekil 4.40. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta, (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve (C) ilk 8 hafta, (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda ALDH1L1 miktarına etkisi (** $p < 0,01$ a-sin ilk 8 rapa vs a-sin ilk 8 çözücü, *** $p < 0,005$ a-sin son 8 çözücü vs kontrol, ** $p < 0,01$ kontrol son 8 çöz vs kontrol (hipokampüs), ** $p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol, ++ $p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol son 8 rapa, # $p < 0,05$ a-sin son 8 çözücü vs kontrol son 8 çözücü (striatum); veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.7.5. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda LC3 I/II Düzeylerine Etkisi

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda rapamisin tedavisinin hipokampüste ve striatumda otofaji ve apoptoz üzerine etkisi immünoiblottama ile değerlendirildi. Bu amaçla otofajik yolağın işaretleyicisi olarak mikrotübül ilişkili protein hafif zinciri 3 (LC3) I/II ve p62 antikoru ile apoptotik yolağın işaretleyicisi olarak da kaspaz 3 antikoru kullanıldı. Hem ilk 8 hafta tedavi uygulanmasının otofajik ve apoptotik yollar üzerindeki nöroprotektif etkisi hem de son 8 hafta tedavinin nörorestoratif etkisi hipokampus ve striatum bölgelerinde değerlendirildi.

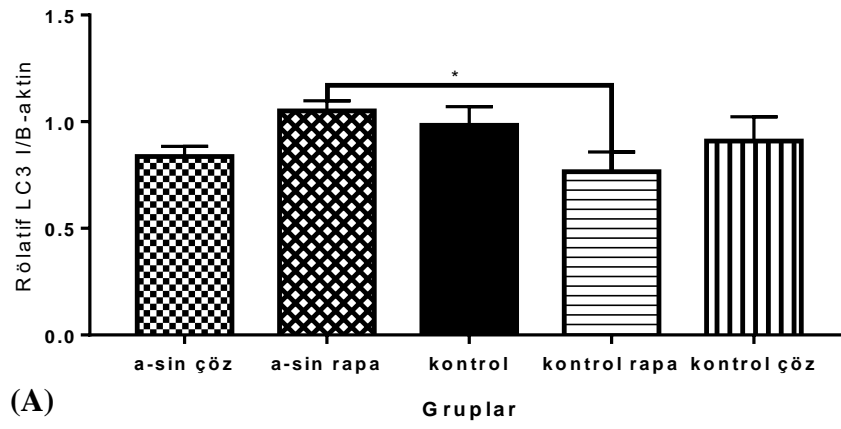
Otofaji sırasında hücre içerisinde otofagozomlar oluşur ve LC3 I otofagozomun membranına bağlanarak LC3 II'ye dönüşür. Bu nedenle LC3 II/I oranı otofajinin tayin edilmesinde yaygın olarak kullanılır (274).

İlk 8 hafta tedavi gruplarının hipokampus LC3 I miktarları değerlendirildiğinde kontrol grupları arasında fark gözlenmezken, a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun LC3 I miktarının kontrole rapamisin uygulanmasına göre arttığı gözlemlendi (Şekil 4.41.a).

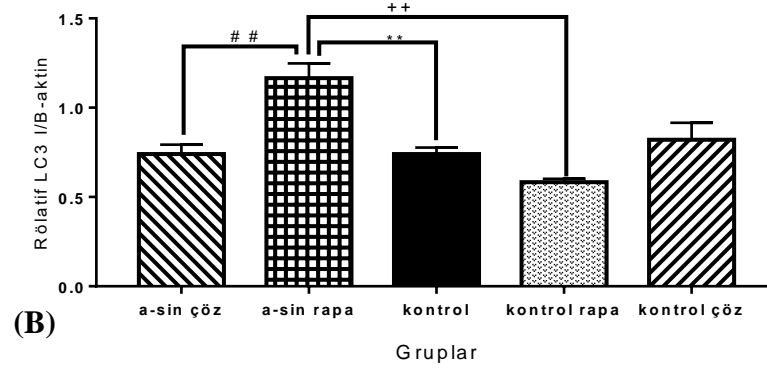
Son 8 hafta tedavi gruplarının hipokampus LC3 I miktarları değerlendirildiğinde ise a-sin enjekt edilip rapamisin tedavisi almış grubun LC3 I seviyesinin en yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.41.b). Kontrol grupları arasında fark gözlenmezken, a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun LC3 I miktarında *naive* kontrol ve rapamisin tedavisi alan kontrol grubuna göre artış olduğu görüldü (Şekil 4.41.b). Ayrıca a-sin enjekte edilen grupta rapamisin tedavisi sonrası LC3 I miktarının, a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü uygulanan gruba göre de daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.41.b).

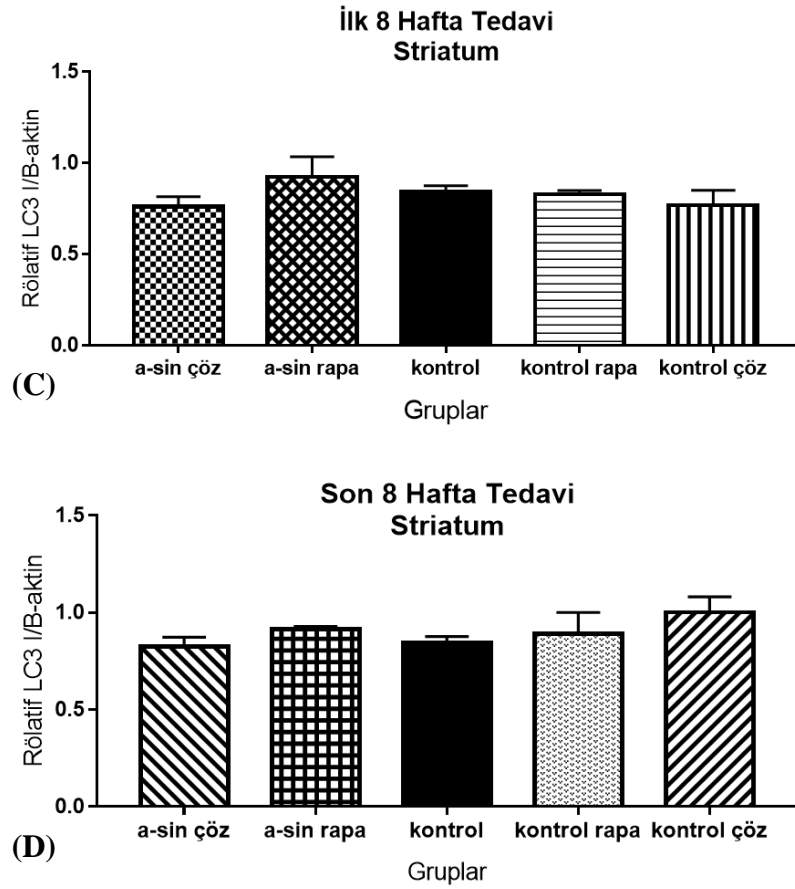
Rapamisin tedavisinin striatum LC3 I düzeyine etkisi değerlendirildiğinde ise, ilk 8 hafta ya da son 8 hafta tedavi uygulanmasının ne a-sin enjeksiyon gruplarında ne de kontrol gruplarında fark yaratmadığı gözlemlendi (Şekil 4.41.c, d).

İlk 8 Hafta Tedavi
Hipokampüs



Son 8 Hafta Tedavi
Hipokampüs





Şekil 4.41. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta, (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve (C) ilk 8 hafta, (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda LC3 I miktarına etkisi, (* $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol ilk 8 rapa, $^{##}p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs a-sin son 8 çöz, $^{**}p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol, $^{++}p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol son 8 rapa, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: Çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

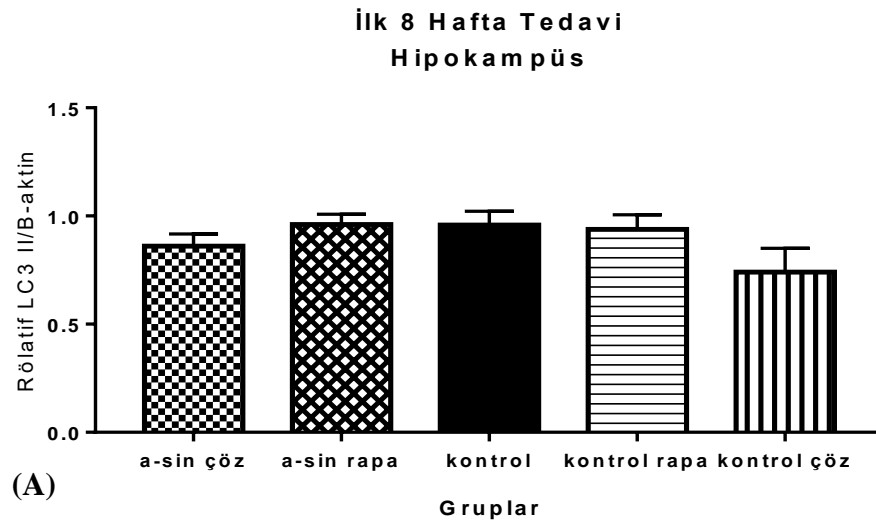
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan sıçanlardan ilk 8 hafta çözücü ya da rapamisin tedavisi alan gruplar ile kontrol grupları arasında hipokampus LC3 II miktarları kıyaslandığında fark gözlenmedi (Şekil 4.42.a).

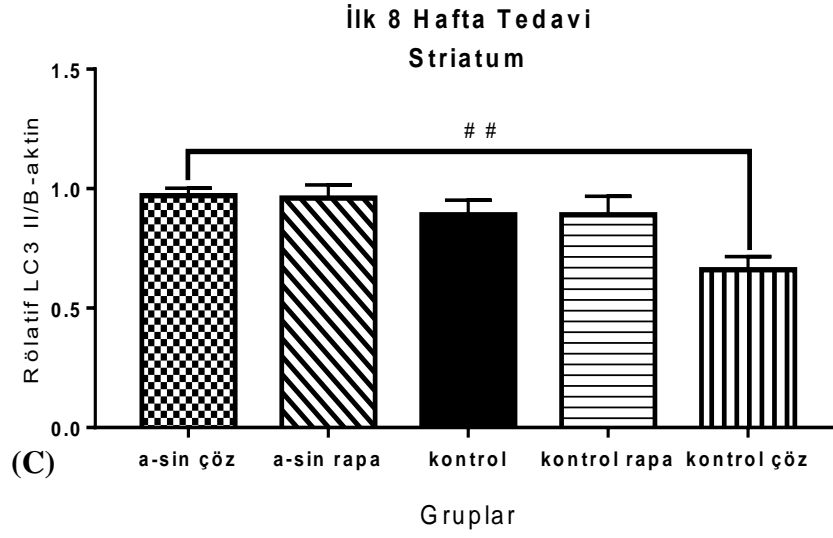
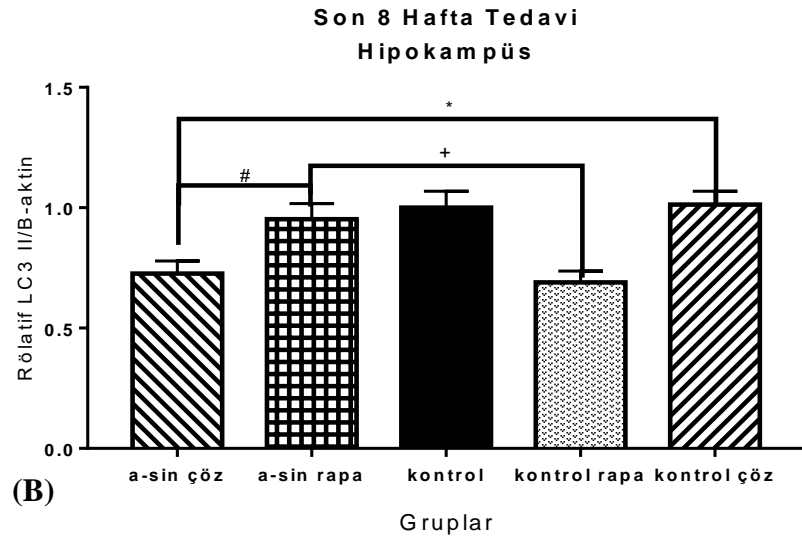
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlardan son 8 hafta çözücü alan grupta hipokampus LC3 II miktarında, rapamisin tedavisi alan ya da *naive* kontrol grubuna göre azalma bulundu. Rapamisin alan kontrol grubunun LC3 II miktarının azaldığı ve bu azalmanın *naive* kontrol ve çözücü alan kontrol

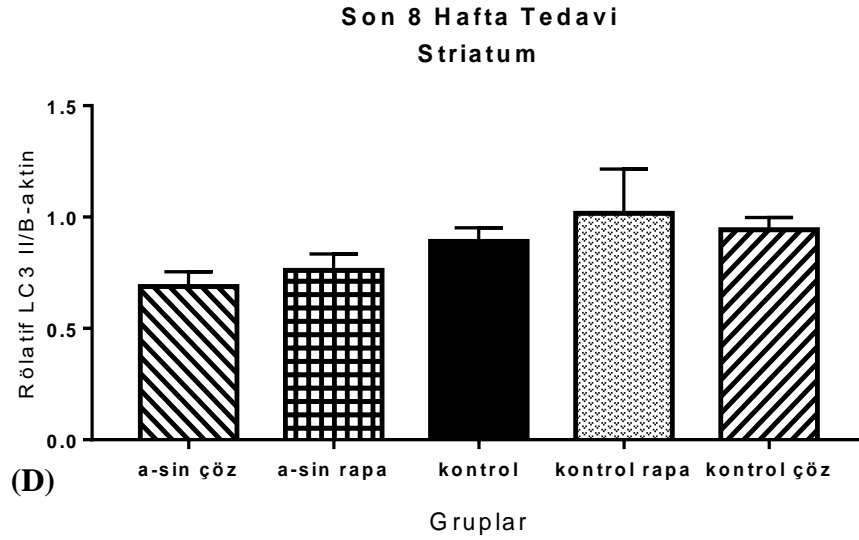
grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (* $p < 0.05$ a-sin son 8 çöz vs kontrol, # $p < 0.05$ a-sin son 8 rapa vs son 8 çöz, * $p < 0.05$ kontrol son 8 rapa vs *naive* kontrol, ^ $p < 0.05$ kontrol son 8 rapa vs kontrol son 8 çöz; Şekil 4.42.b).

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanların striatumlarındaki LC3 II miktarları değerlendirildi. İlk 8 hafta tedavi alan gruplar arasında sadece çözücü alan kontrol grubunun, çözücü alan a-sin grubuna göre LC3 II miktarının azaldığı gözlemlendi (## $p < 0.01$ a-sin ilk 8 çöz vs kontrol ilk 8 çöz; Şekil 4.42.c).

Son 8 hafta tedavi alan gruplar arasında ise a-sin enjekte edilmiş olup çözücü alan ya da rapamisin tedavisi alan grubun LC3 II miktarlarının azaldığı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (### $p < 0.01$ a-sin son 8 çöz vs kontrol son 8 çöz; Şekil 4.42.d). Ayrıca rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda LC3 II miktarında hafif bir artış olduğu gözlemlendi.







Şekil 4.42. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta, (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve (C) ilk 8 hafta, (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda LC3 II miktarına etkisi (* $p < 0,05$ a-sin son 8 rapa vs kontrol rapa, # $p < 0,05$ a-sin son 8 çöz vs a-sin son 8 rapa, ^ $p < 0,05$ a-sin son 8 çöz vs kontrol son 8 çöz, ## $p < 0,01$ a-sin ilk 8 çöz vs kontrol ilk 8 çöz; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Sidak'ın çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır).

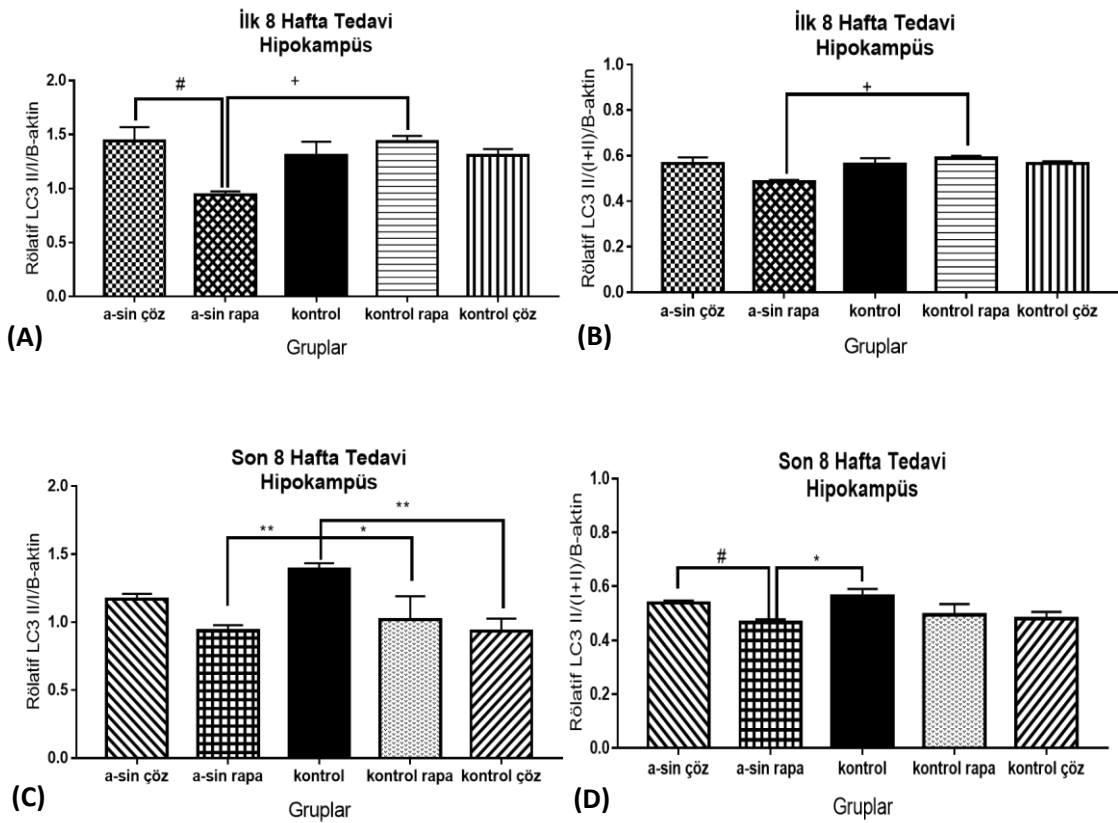
LC3 I'in II'e dönüşümü otofajinin aktif olduğunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla farklı farklı hesaplamalar yapılmaktadır (274). Burada iki farklı yöntemle otofaji aktivasyonu değerlendirilmeye çalışılmıştır. Öncelikle direkt olarak β -aktine standardize edilmiş LC3 II miktarı, β -aktine standardize edilmiş LC3 I miktarına oranlanmıştır. Ayrıca; β -aktine standardize edilmiş LC3 II miktarı, β -aktine standardize edildikten sonra LC3 I ve II'nin toplamına oranlanarak hesaplanmıştır (formül 4.1 ve 4.2).

$$\text{Rölatif LC3} = \frac{\text{LC3 II}/\beta - \text{aktin}}{\text{LC3 I}/\beta - \text{aktin}} \quad (4.1)$$

$$\text{Rölatif LC3} = \frac{\text{LC3 II}/\beta - \text{aktin}}{(\text{LC3 I}/\beta - \text{aktin}) + (\text{LC3 II}/\beta - \text{aktin})} \quad (4.2)$$

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan sıçanların hipokampüsünde ilk 8 hafta rapamisin ile tedavi sonrasında rölatif LC3 miktarının azaldığı gözleildi (Şekil 4.43.a). Ancak, rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda ise rölatif LC3 miktarında azalma olmadığı gözleildi (Şekil 4.43.a).

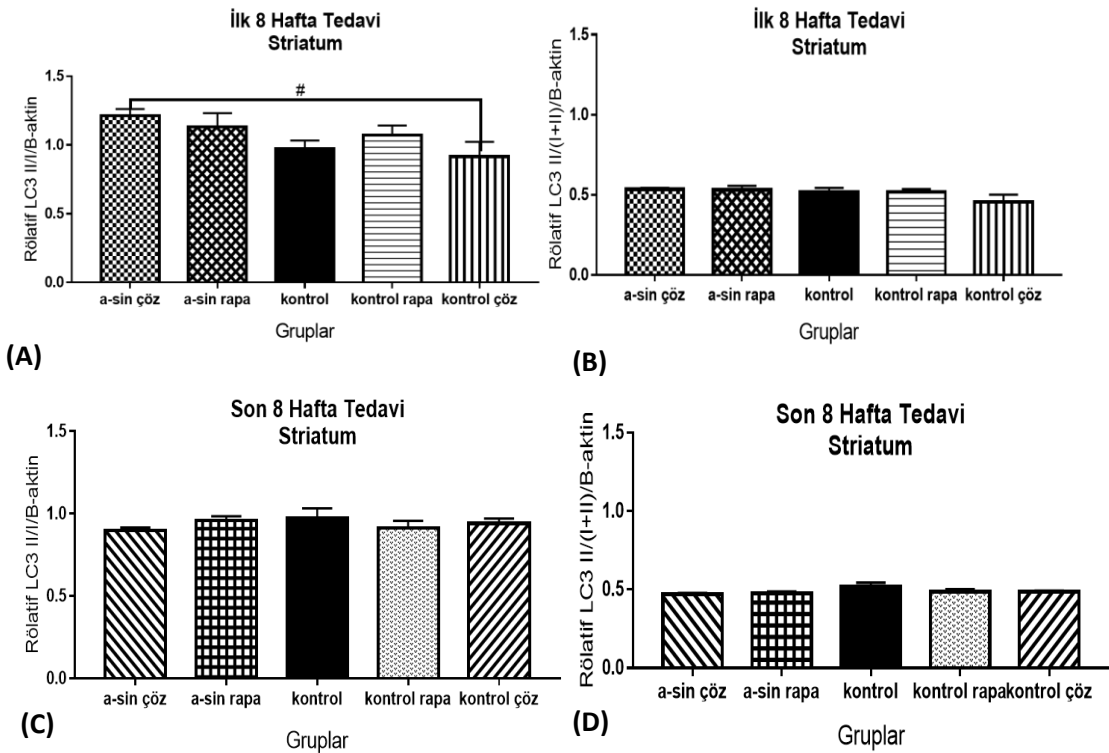
Son 8 hafta tedavi gruplarının hipokampüs sonuçları değerlendirildiğinde ise; *naive* kontrol grubunun rölatif LC3 miktarının en yüksek olduğu gözleildi (Şekil 4.43.c). Rapamisin tedavisi sonrası hem a-sin enjeksiyon grubunda hem de kontrol grubunda *naive* kontrole göre azalma olduğu gözleildi (Şekil 4.43.c). Ayrıca, *naive* kontrol ile çözücü uygulanan kontrol arasında da fark olduğu gözleildi (Şekil 4.43.c).



Şekil 4.43. Sıçanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisinin (A) LC3 II/I oranına, (B) LC3 II/ LC3 (II+I) oranına, son 8 hafta rapamisin tedavisinin (C) LC3 II/I oranına, (D) LC3 II/ LC3 (II+I) oranına hipokampüste etkisi (# $p < 0,05$ a-sin ilk rapa vs a-sin ilk 8 çöz, + $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol ilk 8 rapa, ** $p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol, * $p < 0,05$ kontrol son 8 rapa vs kontrol, ** $p < 0,05$ kontrol son 8 çöz vs kontrol; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Sidak’ın çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır).

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda ilk 8 hafta çözücü ya da rapamisin tedavisi alan grupların striatumlarında rölatif LC3 miktarında hafif bir artış eğilimi olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.44.a). Rapamisin uygulanması sonucu hem a-sin enjeksiyon grubunda hem de kontrol grubunda bir miktar artış gözlenirken, kontrol grupları arasında fark olmamasına rağmen a-sin enjeksiyonu sonrası sadece çözücü uygulanan grubun rölatif LC3 miktarının kontrole çözücü uygulanan gruptan yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.44.a).

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan sıçanlara son 8 hafta çözücü ya da rapamisin tedavisi uygulanmasının ise striatumda rölatif LC3 miktarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.44.c, d).



Şekil 4.44. Sıçanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisinin (A) LC3 II/I oranına, (B) LC3 II/ LC3 (II+I) oranına, son 8 hafta rapamisin tedavisinin (C) LC3 II/I oranına, (D) LC3 II/ LC3 (II+I) oranına striatumda etkisi ($\#p < 0,05$ a-sin ilk 8 çöz vs kontrol ilk 8 çöz, veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =4; Rapa: Rapamisin, Çöz: çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Sidak’ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

4.7.6. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda p62 Düzeyine Etkisi

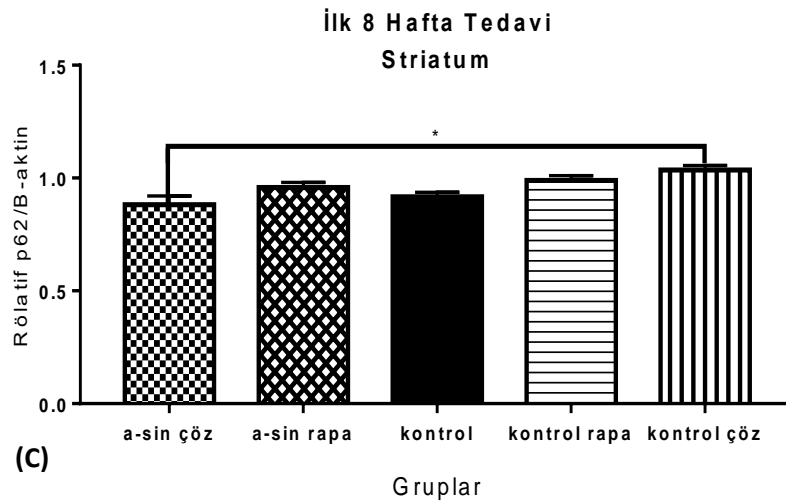
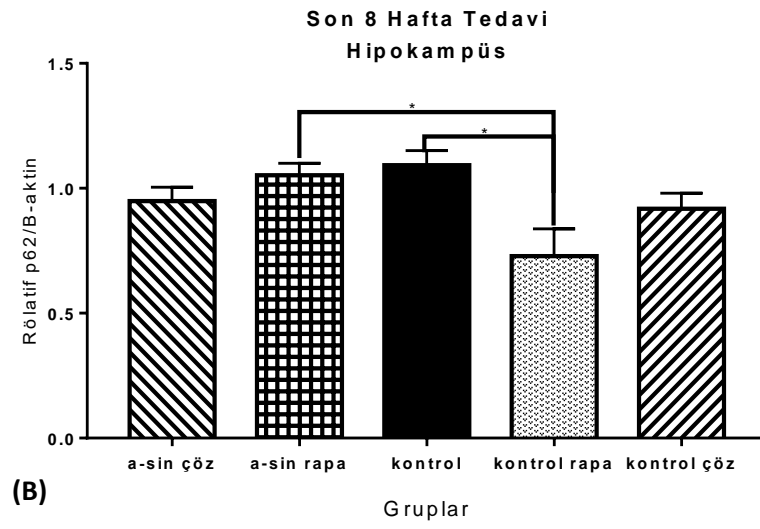
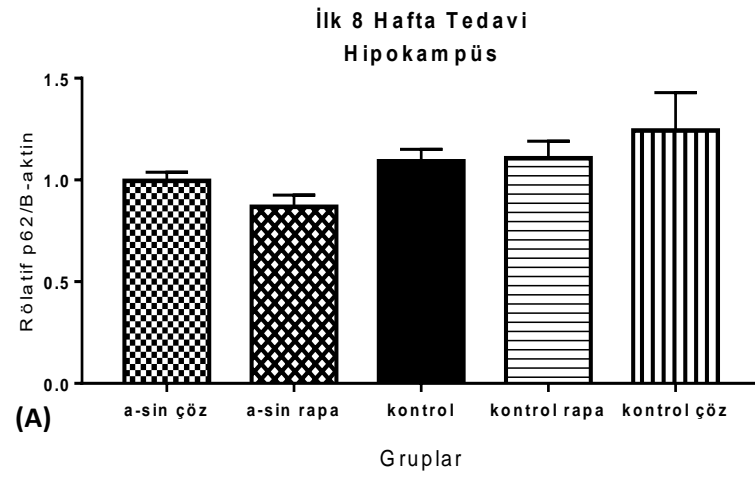
Poliubikutin bağlanma proteini p62 (SQSTM1) otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır. p62 otofagozom oluşumu sırasında LC3 II'e bağlanır ve otofaji sırasında parçalanır. Bu nedenle p62 miktarının azalması otofajinin belirteci olarak kullanılır (274, 275).

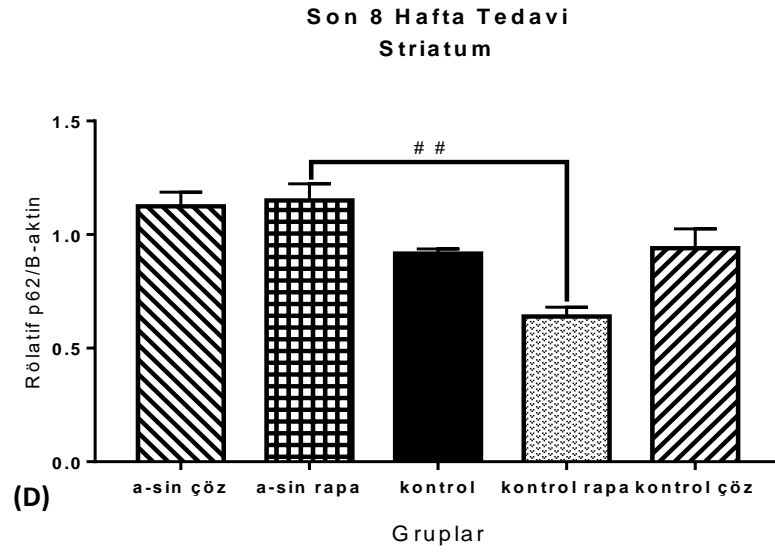
Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanması sonrası hipokampus p62 düzeyinin a-sin gruplarında daha az olmasına rağmen, gruplar arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.46.a).

Son 8 hafta tedavi gruplarının hipokampus p62 düzeylerine bakıldığında; kontrole rapamisin uygulanması sonucu azalma olduğu ancak aynı azalmanın a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin uygulanan grupta olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.45.b). Ayrıca a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi uygulanan grubun hipokampus p62 düzeyinin kontrole göre arttığı gözlemlendi (Şekil 4.45.b).

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan sıçanlarda ilk 8 hafta sadece çözücü uygulanan grubun striatum p62 düzeyinin kontrole çözücü uygulanan gruba göre azaldığı ve kontrol grupları arasında da fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.45.c).

Son 8 hafta tedavi gruplarının striatum p62 düzeyleri değerlendirildiğinde a-sin enjeksiyon gruplarında hem rapamisin uygulanan grupta hem de sadece çözücü alan grupta hafif bir artış olduğu ancak kontrollerle aralarında fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.45.d). Ancak; rapamisin tedavisi alan kontrol grubunun striatum p62 düzeyinde kontrole göre azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.45.d).





Şekil 4.45. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta, (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve (C) ilk 8 hafta, (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda p62 düzeyine etkisi (* $p < 0,05$ a-sin son 8 rapa vs kontrol son 8 rapa, * $p < 0,05$ kontrol son 8 rapa vs kontrol, * $p < 0,05$ a-sin ilk 8 çöz vs kontrol ilk 8 çöz, ## $p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol son 8 rapa; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, , n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

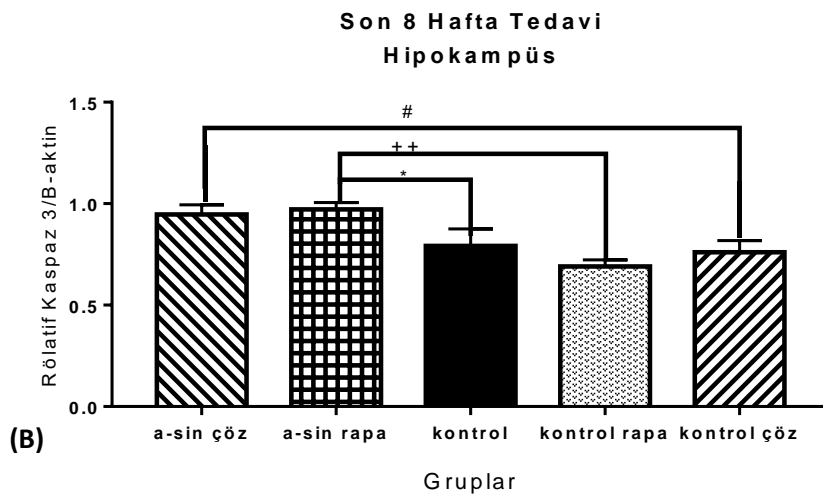
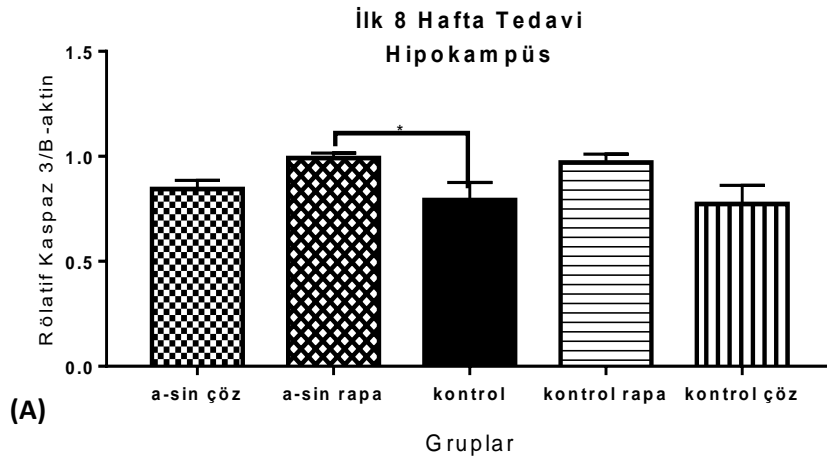
4.7.7. AAV-aracılı Alfa-sinüklein Aşırı İfadesi ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinde Rapamisin Tedavisinin Hipokampus ve Striatumda Kaspaz 3 Düzeyine Etkisi

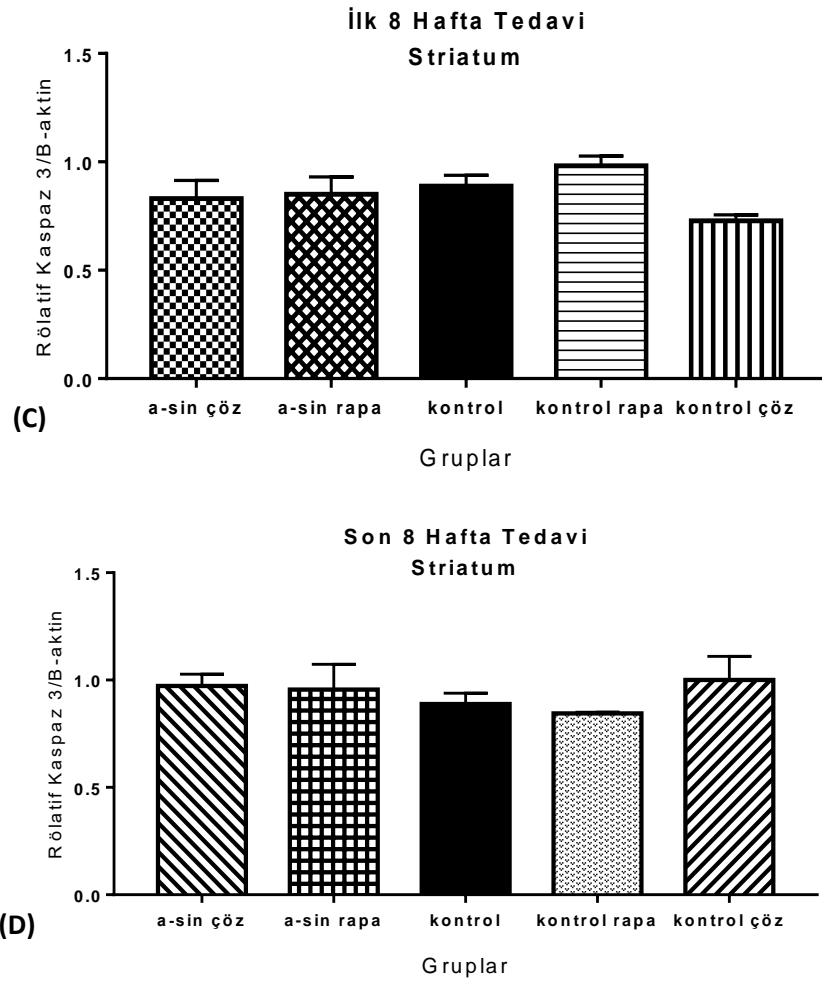
Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünde (apoptoz) rol alan önemli mediyatörlerdir. Kaspaz 3, sıklıkla aktive edilen ve pek çok anahtar hücre proteininin temizliğini başlatan ölüm proteazıdır (276). Bu nedenle; kaspaz 3, apoptoz belirteci olarak kullanılmaktadır.

Bilateral SN ve DG'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlarda ilk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının hipokampüste kaspaz 3 miktarında *naive* kontrole göre artışa neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4.46.a). Rapamisin uygulanması kontrol grubunda da kaspaz 3 miktarında artma eğilimi gösterse de kontrol grupları arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.46.a).

Son 8 hafta tedavi uygulanması sonucunda ise kontrol grupları arasında fark gözlenmezken, hem rapamisin uygulanan hem de sadece çözücü uygulanan a-sin enjeksiyon gruplarında kontrol gruplarına göre hipokampus kaspaz 3 seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.46.b). Aynı artış kontrol grubuna rapamisin uygulanması sonucu gözlenmemiştir (Şekil 4.46.b).

Bilateral SN ve DG’de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanlara ilk 8 hafta rapamisin tedavisi ya da sadece çözücü uygulanmasının striatumda kaspaz 3 düzeyinde kontrol gruplarına oranla bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.46.c). Benzer şekilde son 8 hafta rapamisin ya da sadece çözücü uygulanmasının a-sin enjeksiyon grupları ile kontrol grupları arasında fark yaratmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.46.d).





Şekil 4.46. Sıçanlarda rapamisin tedavisi (A) ilk 8 hafta, (B) son 8 hafta uygulandığında hipokampüste ve (C) ilk 8 hafta, (D) son 8 hafta uygulandığında striatumda etkisi kaspaz 3 düzeyine etkisi (* $p < 0,05$ a-sin ilk 8 rapa vs kontrol, * $p < 0,05$ a-sin son8 rapa vs kontrol, ++ $p < 0,01$ a-sin son 8 rapa vs kontrol son 8 rapa, # $p < 0,05$ a-sin son 8 çöz vs kontrol son 8 çöz; veriler Ort \pm SH olarak ifade edilmiştir. n_{a-sin} ilk 8 çözücü=5, n_{a-sin} ilk 8 rapa=4, n_{a-sin} son 8 çözücü=5, n_{a-sin} son 8 rapa=5, $n_{kontrol}$ ilk 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ ilk 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ son 8 çözücü=3, $n_{kontrol}$ son 8 rapa=3, $n_{kontrol}$ =6; Rapa: Rapamisin, Çöz: çözücü kısaltması olarak kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ardından *post hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır).

5.TARTIŞMA

Parkinson hastalığının temel motor belirtilerinin yanında hem premotor dönemde hem de geç dönemde motor dışı semptomlar hastalığa eşlik eder. Parkinson hastalığının altta yatan mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte a-sin proteininin yanlış katlanması ve agregat oluşturmasının önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (95, 128, 134). Ayrıca yapılan genetik çalışmalar ile a-sin geninde meydana gelen mutasyonlarında hastalık patolojisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (3, 154, 277). Hastalığın altında yatan mekanizmanın anlaşılabilmesi için hayvan modellerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Günümüzde var olan modellerin hastalığın nörodejeneratif karakterini yansıtmada, motor ve motor dışı semptomları bir arada çalışmada çeşitli kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bu nedenle de yeni modellerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada öncelikle AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi bilateral SN ve DG’de birlikte sağlanarak ve 18 hafta beklenerek a-sin agregat yükünün patolojik boyutlarda artması ile PH’de görülen motor ve motor dışı semptomların birlikte oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca patolojide rol oynadığı bilinen a-sin’i moleküler düzeyde araştırmak, sinaps ve nöronlardaki etkisini daha detaylı olarak hem motor hareketlerden sorumlu bölgelerde hem de kognitif fonksiyonlardan sorumlu bölgelerde incelemek hedeflenmiştir. Modelin karakterizasyonu tamamlandıktan sonra ise otofaji indüksiyonuna neden olan rapamisin tedavisi uygulanarak nöroprotektif/nörorestoratif yolların PH tedavisindeki yerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Parkinson hastalığını çalışmak için en sık kullanılan hayvan modelleri toksin kaynaklı modellerdir. Bu modeller değişen oranlarda nöron ölümü ve motor bozukluğa neden olmakta ancak a-sin patolojisi çoğunlukla oluşmamakta veya yetersiz gözlenmektedir (95). A-sin agregatlarının PH’nin patolojik belirteci olması hem transgenik hayvan modelleri hem de viral vektör aracılı a-sin aşırı ifadesi ile sağlanan hayvan modelleri geliştirilmesine neden olmuş ve pek çok farklı *promoter* kullanılarak transgenik hayvan modeli oluşturulmuştur. *Promoter*’ın türüne bağlı olarak beynin pek çok yerinde a-sin aşırı ifadesi sağlandığı gözlenmiştir (158). İlk üretilen fare modellerinden birinde, *promoter* aracılı nöronal sitoplazmada, bazı çekirdeklerde ve gliada a-sin agregat oluşumu gözlenmiştir (278). Aynı şekilde kullanılan Thy1

promoter ile nöronal agregat gözlenirken, glial bir birikme gözlenmemiştir (158, 279). Her ne kadar beyinde bir miktar a-sin birikimi gözlenirse de, şu ana kadar hiçbir transgenik fare modeli PH'de beklenen bütün özellikleri gösterememiştir (128). Bazı farelerde a-sin agregatları gözlenip, hücre ölümü gözlenmezken; bazı farelerde hücre ölümü, motor bozukluk gözlenmesine rağmen protein agregatları gözlenememiştir (278, 280-283). Bu modellerde esas sorun belirli bir bölgede özgül olarak a-sin aşırı ifadesi sağlamanın zorluğu ve Lewy cisimciği benzeri patolojinin nadiren oluşturulabilmesidir (158). Ayrıca, PH'de görülen ilerleyici nitelikte nörodejeneratif hasarı toksin kaynaklı modellerde göstermek oldukça zordur (95). Viral vektör aracılı oluşturulan modeller, PH'nin doğasına uygun olarak; enjekte edilen belirli bir bölgede ve ilerleyici nitelikte aylar içerisinde gerçekleşen nöronal hasara neden olur (161, 163, 255). Transgenik modellerden farklı olarak sadece farelerde değil, diğer hayvan türlerinde ve embriyonik dönemden itibaren değil, yetişkin dönemde de çalışılmasına olanak sağlar. Ayrıca, viral vektör aracılığıyla tek taraflı a-sin aşırı ifadesi sağlanarak, aynı hayvanın karşı tarafının iç kontrol olarak kullanılmasına izin vermektedir (158, 284).

AAV-aracılı bilateral SN ve DG'ye birlikte a-sin enjeksiyonu ilk defa gerçekleştirilen bu modelde enjeksiyon sonrası a-sin aşırı ifadesi hem SN'de hem de DG'de başarı ile sağlanmıştır. Enjeksiyon sadece SN ve DG bölgelerine yapılmış olmasına rağmen, a-sin geninin bağlantılı bölgelere transferi sağlanmış, striatumda, tüm hipokampüste, kısmen korteksin bazı bölgelerinde, VTA'da da aşırı ifade ve agregat oluşumu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak hipokampus ve striatumda sinaptik kayıp görülmesinin yanı sıra nöronal kayıp eğilimi de gözlenmiştir. Elde edilen patolojik bulgular ile birlikte oluşturulan bu model ile PH'nin motor ve motor-dışı belirtilerinin birlikte değerlendirilmesi imkanı bulunmuştur. Viral vektör aracılı a-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan bu modelde yine ilk defa rapamisin tedavisi uygulanarak; rapamisin aracılı nöroprotektif/nörorestoratif mekanizmaların hastalığın patolojik ve davranışsal bulgularına etkisi ile patolojik a-sin yükü üzerine etkisi değerlendirilebilmiştir. Bu modelde görülen sinaptik kayıp, motor ve motor-dışı bulgular daha önce yapılmış viral vektör aracılı çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (161, 163, 255, 258, 271).

SN'de AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin motor fonksiyonda bozukluğa yol açtığı gösterilmiştir (160, 285). Bu tez çalışması kapsamında meydana gelen motor değişiklikleri değerlendirmek için ilk etapta başlangıçtan itibaren hafta hafta açık alan lokomotor aktivite değerlendirildi. Katedilen mesafenin ve horizontal aktivitenin ilk haftalarda düştüğü ancak daha sonrasında toparlanma göstererek harekette artış eğilimi olduğu gözlemlendi. Böylece; a-sin aşırı ifadesi sağlanmasının zamansal olarak motor aktiviteye etkisi, hafta hafta harekette meydana gelen değişiklikler ölçülerek değerlendirilebilmiştir. 7. haftadan sonra a-sin enjekte edilmiş hayvanların motor performansında toparlanma olsa da ikinci etapta karakterizasyon için planlanan deneylerin lokomotor aktivite test sonuçları ile benzer performans gösterdikleri ve *naive* kontrollerden daha az hareket ettikleri gözlemlenmiştir. İmmünoablottlama sonuçları değerlendirildiğinde ise 16. haftada striatumda hem TH kaybı hem de sinaptofizin kaybı olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum 16 haftanın a-sin aşırı ifadesine bağlı patolojinin oluşması ve motor kayıp gözlenmesi için yeterli bir süre olabileceğini düşündürmektedir. Ancak sadece lokomotor aktiviteyi zamansal olarak değerlendirmek SN'de a-sin aşırı ifadesinin motor performansı etkilediğini söylemek için yeterli değildir.

Silindir testi, unilateral nigral enjeksiyon yapılan PH hayvan modellerinde motor asimetriyi değerlendirmede oldukça sık kullanılır. Ancak bu modelde bilateral nigral enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle motor asimetriyi değerlendirmek mümkün değildir. Bunun yerine nigral enjeksiyona bağlı gerçekleşen motor bozukluklar rotatod testi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada; bilateral SN ve DG a-sin enjeksiyonu gerçekleştirilen hayvanların üç günlük deneme sonrasında rodta kalma süresinin diğer gruplara göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. A-sin enjekte edilmiş grupta gözlenen bu azalma nigral nöronal hasara bağlı beklediğimiz bir azalmadır ve daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (286, 287).

Tedavi grupları değerlendirildiğinde ise rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon gruplarının hem ilk 8 hafta da hem de son 8 hafta da rodta kalma sürelerinde *naive* kontrol grubuna göre azalma gözlemlenmiştir. Son 8 hafta çözücü alan a-sin grubu motor fonksiyonunda kontrole göre azalma eğilimi varken, ilk 8 hafta çözücü alan a-sin grubu motor fonksiyonunda değişiklik gözlenmemiştir. Son 8 hafta rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda da rod üzerinde kalma süresinde *naive*

kontrol grubuna göre azalma olması bu etkinin kronik rapamisin tedavisine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Rapamisin, hücre metabolizmasında önemli rolü olan bir mTORC1 inhibitörüdür. Bir çalışmada uzun süreli rapamisin kullanımının vücut kitle indeksinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (288). Son 8 hafta rodta kalma süresinde rapamisin tedavisi ile meydana gelen bu düşüş hayvanların metabolizmasında meydana gelen değişikliğe bağlı olarak kas güçsüzlüğünden kaynaklı olabilir. Nitekim son 8 hafta çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunda kontrole göre azalma varken, bu azalma çözücü alan kontrol grubunda görülmemektedir. Fakat rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda da rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubuna benzer oranda rodta kalma süresinde azalma görülmektedir. Bunun sebebi yine rapamisin tedavisinin metabolizma üzerindeki etkisi olabilir (288). Enjeksiyondan hemen sonra rapamisin tedavisi başlanmış olması ve 8 hafta boyunca tedavinin devam ettirilmesi iyileşme sürecindeki hayvanların kontrol grubundaki hayvanlara göre daha güçsüz kalmalarına neden olmuş olabilir. A-sin enjeksiyonu ile birlikte çözücü tedavisi başlanan grupta motor fonksiyon bozukluğunun görülme sebebi kullanılan çözücünün etkisi olabilir. Her ne kadar çözücünün her hangi bir etki göstermemesi beklense de rapamisini çözmek için kullanılan tween 80, PEG400 ve etil alkolün uzun süreli uygulanması, a-sin agregat yükünü değiştirmeden, patolojisini etkilemiş olabilir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada; tween 80'in safra tuzlarının antimikrobiyal etkisini safra tuzları ile misel oluşturarak, onların bakteri ile temasını engelleyip, inhibe ettiği gösterilmiştir (289). Biyokimyasal çalışmalarda PEG400'ün proteini, virüsü ve virüs benzeri partikülleri ayırmada kullanılabileceği gösterilmiştir (290, 291).

Hareketlerde azalma ve yavaşlama PH'de iyi karakterize edilmiş motor fonksiyon bozukluklardan biridir ve nigrostriatal yolaktaki dopaminerjik nöron kaybına bağlı olarak görüldüğü daha önce gösterilmiştir (138, 139, 292). Bu tez çalışmasında hem açık alan bazal lokomotor aktivite değerlendirilmiş hem de apomorfin ile indüksiyonu sonrası lokomotor aktivitede meydana gelen artış değerlendirilmiştir. Bazal aktiviteye bakıldığı zaman a-sin, GFP ve SF grubunda, *naive* kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. Ancak bu fark SF grubunda en azdır. Var olan bu fark cerrahi işlem sonrası meydana gelen mekanik hasara bağlı olabilir. Bilateral GFP enjeksiyonu yapılmış olan hayvanlarda da a-sin enjeksiyonu yapılmış

hayvanlara benzer şekilde harekette azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın sebebi, GFP'nin nöronlar üzerinde toksik etkisi olabilir. Nitekim immünoiblota ile GFP enjeksiyon grubunda da striatumda rölatif TH ve sinaptofizin seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bu durum bazal lokomotor aktivitede meydana gelen azalmayı açıklayabilir. Tedavi gruplarının bazal lokomotor aktiviteleri ise; ilk 8 hafta çözücü ya da rapamisin tedavisi uygulanan a-sin enjeksiyon grubu, kontrol grubuna göre daha az hareket etmiştir. Ancak kontrol grupları arasında fark gözlenmemiştir. Son 8 haftada ise a-sin enjeksiyon gruplarının bazal hareketleri kontrollerden az olsa da, gruplar arasında fark gözlenmemiştir. Bu durum rapamisin tedavisi uygulanmasının motor harekette bir iyileşme sağlamadığını göstermektedir. Rapamisinin ilk 8 hafta uygulandığında da motor hareketlerde kötüleşmeye neden olmasının sebebi henüz agregat oluşmamışken otofajinin indüklenmesi hastalığın ilerleyişini engelleyememesi, ancak son 8 haftada rapamisin uygulandığında oluşan agregatların otofaji aracılı temizlenmesi ile hastalığın ilerleyişinin durdurulmasına aracılık etmesi ve böylece motor hareketlerde bozukluğun görülmemesi olabilir.

Yanlış katlanmış ve agregat oluşturmuş proteinlerin birikimi nörodejeneratif hastalıkların ortak özelliklerinden biridir ve bu birikimin mTORC1 aracılı protein sentezi ve otofaji disfonksiyonu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle rapamisin aracılı protein sentezinin baskılanmasının ve otofaji indüksiyonunun proteinlerden agregat oluşumunu azaltacağına ya da önleyeceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (214, 245). Ayrıca; rapamisinin yaşlanma karşıtı etkilerinin olması, onun yaşa bağlı ortaya çıkan pek çok nörodejeneratif hastalıkta da koruyucu etki gösterebileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. İlk olarak oral uygulanan rapamisinin, transgenik Alzheimer fare modelinde hafıza kaybının başlangıcından kısa bir süre sonra uygulanması durumunda hafıza kaybını önlediği ancak çok yoğun plak oluşumu ve birikimi olduktan sonra, geç dönemde uygulandığında etkili olmadığı gösterilmiştir (293). Bu çalışma sonuçları desteklemektedir. Patolojinin oluşma aşamasında, henüz daha agregat oluşmamışken rapamisin daha az etkili iken, patolojinin oluşmaya başladığı ancak çok yoğun olmayan nöron ölümü ve agregat oluşumu gözlenen yine erken bir dönemde rapamisin tedavisinin etkili olduğu gözlenmiştir.

Apomorfinin düşük dozlarda presinaptik D2 reseptör aracılı hareketlerde azalmaya neden olurken, yüksek dozlarda post sinaptik D1 reseptör aracılı

hareketlerde artışa sebep olduğu gözlenmiştir (294, 295). Bu çalışmada 0,5 mg/kg dozunda apomorfın subkütan olarak enjekte edilmiştir. AAV-aracılı bilateral a-sin enjeksiyonu gerçekleştirildiği için asimetric motor davranış beklenmemekte ancak dopaminerjik yolak hasarına bağlı olarak harekette artış beklenmektedir. Deney sonucunda karakterizasyon gruplarının hepsinde apomorfın enjeksiyonu sonrası harekette artış gözlenmekle beraber bu artış a-sin enjekte edilmiş grupta diğer gruplara göre daha fazla olarak gözlenmiştir. Bu durum beklenen bir durumdur ve literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (271). Tedavi uygulanan gruplarda ise kontrol grupları arasında fark gözlenmezken, hem ilk 8 hafta hem de son 8 haftada a-sin enjekte edilmiş olup rapamisin ya da çözücü tedavisi alan grupların apomorfın enjeksiyonu sonrası hareketliliklerinde *naive* kontrol grubuna göre artış olduğu gözlenmiştir. İlk 8 hafta tedavi gruplarında a-sin enjeksiyonu sonrası hem çözücü alan grupta hem de rapamisin alan grupta apomorfın enjeksiyonu sonrası meydana gelen artış *naive* kontrol grubundan fazladır. Son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanması ise hem a-sin enjekte edilmiş grupta hem de kontrol grubunda apomorfın enjeksiyonu sonrası artışa neden olmuştur. Bu artış rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubunda en fazladır. A-sin enjeksiyonu sonrası meydana gelen SN patolojisine bağlı, apomorfın enjeksiyonu sonrası artış beklenirken bu artışın rapamisin tedavisi ile azalmak yerine daha da artmış olduğu gözlenmiştir. Kontrol gruplarında da hem ilk 8 hem de son 8 haftada rapamisin tedavisinin apomorfın sonrası hareketliliği artırması bu etkinin rapamisin kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Rapamisin otofaji inhibisyonuna neden olan mTORC1 inhibitörüdür ve bu sayede otofaji indüksiyonu yapar. mTOR yolu; nöronal hayatta kalma, hücre büyümesi, protein translasyonu, sinaptik plastisite gibi hücre için hayati önemi olan pek çok işlevde görev almaktadır (296, 297). Rapamisin aracılı mTORC1 inhibisyonu hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin düzenlenmesinde rol oynar. Hücre metabolizmasında değişiklik olduğu zaman hücreler ya otofajiye gider ya da nöronal plastisite gözlenir (296). Literatürde D1 reseptörü ile mTOR yolu arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (298-300). Bir çalışmada Parkinson modelinde L-DOPA'ya bağlı diskinezi oluşumunun D1 reseptör aracılı mTOR aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (298). Bir başka çalışmada ise mTOR yolunun rapamisin aracılı inhibisyonunun mezokortikal yolakta dopaminerjik sistemi etkileyerek kokain ile indüklenen lokomotor aktivite artışını

inhibe ettiği gösterilmiştir (301). Rapamisin tedavisinin hem ilk 8 haftada hem de son 8 haftada a-sin enjeksiyon grubu ve kontrol grubunda benzer etki göstermesi uzun süreli mTOR yolağının inhibisyonuna bağlı sinaptik plastisitede meydana gelen değişiklik ile ilgili olabilir. Rapamisin uygulanmasına bağlı apomorfin ile hareketliliğin artması D1 reseptör duyarlılığının artması ya da reseptör sayısının artması ile bağlantılı olabilir (301).

Başta AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan PH hayvan modeli olmak üzere pek çok hayvan modelinde motor fonksiyon bozuklukları çalışılmıştır (95, 160, 284, 285, 302). Ancak; PH'de motor belirtiler kadar, motor dışı belirtiler de yaşam kalitesi açısından önemli bir yere sahiptir. Kognitif kayıp, duygulanım bozuklukları, koku ayırt etme, denge ve uyku bozuklukları gibi motor-dışı belirtiler, büyük bir ihtimalle PH'de ortabeyin dopaminerjik sisteminden bağımsız bir işlev kaybını yansıtmaktadır. Parkinson hastalarının beyinlerinde yapılan nöropatolojik incelemeler ortabeyin dopaminerjik sisteminin dışında rafe çekirdeklerindeki serotonerjik nöronlar, lokus seruleustaki noradrenerjik nöronlar, bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlar ve diğer ön beyin çekirdekleri ile birlikte olfaktor bulbus ve kortikal alanlarda ilerleyici bir patolojiye işaret etmektedir (146). Literatürde bu alanda son zamanlarda yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; bilateral AAV-aracılı ventral tegmental dopaminerjik hücreler ve medial septal kolinerjik hücreler hedeflenerek a-sin aşırı ifadesi ile kognitif belirtiler geliştirmeye çalışılmış ve a-sin enjeksiyon grubu ile GFP enjekte edilen grup arasında belirgin bir nörodejenerasyon olmaksızın sinüklein patolojisine bağlı bazı kognitif bozukluklar geliştirilebildiğini gösterilmiştir (271). Bir başka çalışmada ise AAV-aracılı a-sin vagal sinire periferik olarak uygulanmış, beyin sapından itibaren kortekse kadar kaudo-rostral bir yayılım olduğu ortaya konulmuş ancak bunun davranışa yansımaları incelenmemiştir (303). Bu tez çalışması kapsamında; PH'nin klinik seyrini daha uygun bir şekilde yansıtmak üzere nigrostriatal ve hipokampal alanlarda bir arada a-sin patolojisi oluşturulması ve a-sin patolojisinin kognitif fonksiyonlara etkisinin incelenmesi, rapamisin tedavisinin model üzerinde iyileştirici etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

PH, motor bozukluğun yanında mezolimbik, mezokortikal yolakta; kolinerjik, noradrenerjik ya da serotonerjik sistemde görülen hafif lezyonlar sebebiyle anhedoni, apati, aksiyete, panik atak, sosyal fobi ve depresyon gibi motor dışı

bulgularla birlikte seyreder (304). Anksiyeteyi ölçmek için farklı yöntemler mevcut olsa da YAL en sık kullanılan yöntemlerden biridir (261, 262, 305). Anksiyetesi yüksek olan hayvanlar kapalı kollarda daha çok vakit geçirmeyi tercih ederken, anksiyete seviyesi azaldıkça açık kolda geçirilen süre artmaktadır (261, 262). Karakterizasyon deneylerinde bilateral a-sin enjeksiyonu gerçekleştirilen hayvanların açık kolda geçirdikleri sürenin diğer kontrol gruplarından daha fazla olduğu görüldü. Tedavi gruplarında ise hem ilk 8 hem de son 8 hafta çözücü uygulanan a-sin gruplarının açık kolda geçirdikleri sürelerin de benzer şekilde yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum karakterizasyon deneylerindeki bilateral a-sin enjeksiyon grubu ve kontrol grupları arasındaki ilişki ile paralellik göstermektedir. Hem ilk hem de son 8 hafta rapamisin tedavisi alan a-sin grupları ise, açık kolda daha az vakit geçirmişlerdir. Literatürde var olan çalışmaların bir kısmı da bu bulguları destekler niteliktedir. A-sin transgenik farelerde anksiyete benzeri davranışın azaldığı ve bu azalmanın zamanla birlikte arttığı gözlemlenmiştir (306, 307). Dopaminin anksiyete benzeri davranış ile ilişkili olduğu bilinmektedir (308). Dopaminerjik ve serotoninerjik sistemde a-sin aşırı ifadesi anksiyete benzeri davranışta azalmaya neden olmuş olabilir. Bir çalışmada, transgenik farelerin nükleus akumbens ve striatumlarında DAT ifadesinde azalma olduğu ve buna bağlı olarak da dopamin geri alımının azaldığı ve anksiyete benzeri davranışın da azaldığı gösterilmiştir (307). Bir başka çalışmada ise a-sin transgenik farelerde DAT ve serotonin transporter (SERT) ifadesinde artış olduğu ve anksiyete benzeri davranışta azalma olduğu ve bu azalmanın sebebinin dopaminerjik sistemin yanı sıra serotonerjik sistemde meydana gelen değişiklik ve SERT miktarının artışı olduğu belirtilmiştir (309). Ancak, bu konudaki bulgular tartışmalıdır. Literatürde, serotonin geri alımını inhibe eden ya da serotonin reseptör antagonisti olan moleküllerin anksiyolitik etki gösterdiğini öne süren çalışmalar da vardır (310-312). Anksiyete benzeri davranışı rodentlerde çalışmak oldukça zordur ve PH'de görülen anksiyete, deney hayvanlarında test edildiğinde sonuçlar tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda anksiyete benzeri davranış gözlenirken bazı çalışmalarda gözlenmemektedir (312-316). Bunun yanında alt sınıf primatlarda yapılan bir çalışmada ise a-sin aşırı ifadesinin anksiyete benzeri davranışa neden olduğu gösterilmiştir (317). A-sin'in anksiyete üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Ancak, bu tez çalışmasında a-sin enjekte edilmiş hayvanların açık kolda daha çok vakit geçirmesi

anksiyetenin azalmış olmasının yanı sıra PH'nin bir diğer bulgusu olan apati ile de ilişkili olabilir (21, 313, 318).

Yiyeceğe dayalı ödülün, dopaminerjik mezokortikolimbik yolağın VTA ve nükleus akumbens, amigdala ve frontal korteks ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (319, 320). Bu yolak, yiyecek ve içeceklerin tatlarının tercih edilme özelliklerine göre farklı doğal ödüller kullanılarak nükleus akumbensteki dopamin cevabı ölçülerek çalışılmıştır (321). Sükroz, sıçanlar için güçlü bir ödüdür (322). Pek çok çalışmada VTA'da seçici dopaminerjik nöron hasarının sükroz tüketiminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (319, 323). SN'ye a-sin enjeksiyonuna bağlı VTA'da ortaya çıkması beklenen dopaminerjik nöron kaybının fonksiyonel karşılığını değerlendirmek için sükroz tercih testi gerçekleştirilmiştir (304). Bu tez çalışmasında; a-sin enjeksiyon grubu ile diğer kontrol grupları arasında sükroz tüketiminde bir fark saptanmamıştır. Tedavi gruplarında ise ilk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının kontrol grubunda sükroz tüketimini azalttığı gözlenmiştir. Son 8 haftada hem rapamisin tedavisi hem de çözücü uygulanması ile a-sin grubunda sükroz tüketiminde artma olduğu gözlenmiştir.

Karakterizasyon için gerçekleştirmiş olduğumuz deneyler sırasında a-sin grubu ile diğer gruplar arasında fark olmaması, AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesine VTA'daki dopaminerjik nöronların SN'deki dopaminerjik nöronlardan daha dayanıklı olmasından kaynaklı olabilir (324). Bir çalışmada SN'ye 6-OHDA uygulanmasından sonra hipokampüste serotonin ve striatal dopamin azalması ile sükroz tercih arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (325). Yine bir başka çalışmada 6-OHDA, MPTP ve rotenon ile PH modeli oluşturulduğunda 21 gün sonra anhedoni görüldüğü gösterilmiştir (326). Toksin kaynaklı bir modele göre uzun bir süre sonra anhedoninin görülmesi belki de oluşturulan modelde bu sürenin VTA'da nöronal kayıp için yeterli olmadığını gösteriyor olabilir. Nitekim bir çalışmada da farklı zaman dilimlerinde alfasinükleinopati değerlendirildiğinde zamana bağlı olarak amigdalada Lewy cisimcikleri ve nöritlerinin miktarının arttığı ve özellikle de 43. haftadan sonra nöronal azalma olduğu gösterilmiştir (327). Literatürdeki süre ile ilgili bilgilerin yanı sıra protokol gereği kafeslerde tek başına barındırılan deney hayvanlarının tükettikleri sükroz miktarının ölçülmesi gerekmektedir (328). Ancak deneyler sırasında yeterli suluk ve kafesin olmamasından dolayı, sükroz tercih testinden sonra da davranış deneylerine devam edilecek olması ve tek başına kalmak hayvanlarda başlı başına bir

stres faktörü (sosyal izolasyon stresi) olduğu için, aynı deney grubundan 2, 3 ya da 4 sıçan bir arada tutuldu (329).

İleri dönem PH'de görülen öğrenme ve bellek bozukluklarının hipokampal yapılarla ve frontal korteks ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (330). YNT testi kısa ve uzun dönem belleğin değerlendirilmesi için yaygın kullanılan testlerden biridir (331-333). Herhangi bir bilişsel bozukluğu olmayan hayvanların eski nesneyi hatırlayarak yeni nesne ile daha çok vakit geçirmesi beklenmektedir. Deneyler sonucunda bilateral SN ve DG bölgelerine a-sin enjekte edilmiş grubun SF, GFP ve *naive* kontrol gruplarına göre yeni nesneyle, kısa dönem bellek değerlendirildiğinde, en az vakit geçirdiği gözlenmiştir. A-sin'in hipokampal bölgelerde yoğun yayılım göstermesi, sinaptik fonksiyon bozukluğu ve hafif nöronal kayba bağlı bellek bozukluğu görülmesi beklenen bir durumdur. Literatürde a-sin'in bilateral DG enjeksiyonuna bağlı kognitif bozukluk görüldüğüne dair daha önce yapılmış bir çalışma olmasa da toksin ve genetik PH hayvan modellerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (330). Tedavi gruplarında kısa dönem belleğin değerlendirilmesinde ise hem ilk 8 hem de son 8 hafta da çözücü uygulanmasının var olan patolojiyi değiştirmedeği ve *naive* kontrol grubuna göre yeni nesne ile geçirilen sürenin daha az olmasına neden olduğu gözlemlendi. İlk 8 hafta rapamisin uygulanması sonucunda da durumun değişmediği, rapamisin uygulanan sıçanların da yeni nesne ile daha az vakit geçirdiği, dolayısıyla rapamisin ilk 8 haftada a-sin patolojisinin ilerlemesine engel olmadığı gözlenmiştir. Son 8 hafta rapamisin uygulanması sonucu ise, a-sin grubunun kontrole yakın şekilde, yeni nesne ile daha çok vakit geçirdiği ve son 8 hafta rapamisin uygulanmasının bellek fonksiyonlarında düzelme sağladığı gözlenmiştir. YNT testinde kontrol gruplarına ilk ve son 8 hafta rapamisin ya da çözücü uygulanmasının *naive* kontrol grubundan farklı bir etkisi olmamıştır. Bu nedenle çözücü alan a-sin gruplarında hafızanın bozulmasının sebebinin a-sin patolojisi olduğu düşünülmektedir. Son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının hafızaya olumlu etkilerinin olması da a-sin agregat yoğunluğunun otofajik olarak temizlenerek nörodejenerasyonun ilerleyişinin engellenmesi olabilir. Nitekim immünoblotlama da bu sonuçları destekler niteliktedir ve a-sin grubuna son 8 hafta rapamisin uygulanması ile birlikte hipokampüste çözücü alan gruba göre, agregat yükünde azalma olduğu gösterilmiştir. Rapamisin aracılı a-sin agregat yükünde azalma olması literatür ile

tutarlılık göstermektedir. Bir çalışmada; hücre kültüründe yabancı, A30P ya da A53T a-sin yükünün rapamasin tedavisi sonrası azaldığı gösterilmiştir (206).

Uzun dönem belleğin değerlendirilmesi için 24 saat sonra yapılan YNT testinde ise karakterizasyon gruplarında ve tedavi gruplarında yeni nesne ile geçirilen süre açısından gruplar arasında bir fark bulunamamıştır. Hem kontrol gruplarının hem de deney gruplarının eski ve yeni nesne ile benzer süre geçirdikleri gözlenmiştir. Bu durum, 24 saat sonrasında bütün grupların nesnelere hatırlamada zorluk çektiğini ve hem yeni nesne hem de tanıdığı nesne ile benzer oranlarda ilgilendiklerini göstermektedir.

Hipokampus ve peririnal korteks, prefrontal korteks, entorinal korteks gibi kortikal yapılar bellek ve öğrenme de önemli rol almaktadır (334-337). Ayrıca dopaminerjik sistem dışında kolinerjik, serotoninerjik ve noradrenerjik sistemler de uzaysal ve uzaysal olmayan bellek fonksiyonlarında; yeni nesneyi tanıma, bulunduğu yeri hatırlamada vb. işlemlerde rol oynarlar (330, 338). Uzun dönem ve kısa dönem bellekte görev alan yapıların birbirinden farklı olması ve bilgilerin aktarılması sürecinin değişmesi, YNT testi ile uzun dönem bellekte değişiklik görmememizin temel nedeni olabilir. Nesnelere tanıma peririnal korteksin daha etkili olduğu ve hipokampusun daha ziyade uzaysal hafıza, içerik ile ilişkili olduğu literatürde gösterilmiştir (56, 62, 66, 332, 334, 339-342). Peririnal korteks 6 tabakalı neokorteks yapısı iken, hipokampus 3 tabakalı bir allokorteks yapısıdır. Birbirleri ile entorinal korteks aracılı bağlantılı ya da direkt olarak bağlantıları olduğu kadar farklı bölgeler ile de bağlantıları söz konusudur (336). Peririnal korteks ve hipokampus arasındaki bağlantılar hipokampal bir hasara bağlı olarak nesne tanıma bozukluğa neden oluyor ya da nesne tanıma bozukluğu hipokampal hasarı tetikleyebilir (336). Bu bağlamda, YNT testinin esas olarak nesnelere tanıma ve bilgiyi yeniden toplamayı ölçmekten ziyade benzerlik temelli ölçüm yaptığına dair yorumlar da bulunmaktadır (343, 344). Ancak bunun yanında YNT testi kullanarak, 24 saat sonrasında uzun dönem belleği değerlendiren ve anlamlı sonuç bulan çalışmalarda vardır (345, 346). Literatürdeki bilgiler ve sonuçlarımız değerlendirildiğinde AAV-aracılı DG'de a-sin aşırı ifadesinin başarı ile gerçekleştirilebildiği a-sin ifadesinin hipokampus ve ilişkili olduğu yapılarda da yayılım göstererek, kısa dönem bellekte

bozulmaya sebep olduğu ve gözlenen bilişsel bozukluğun son 8 hafta rapamisin tedavisi ile birlikte düzelme gösterdiği söylenebilir.

Hipokampüsün uzaysal, bağlamsal (*context*) hafıza ile ilgili olması AAV-aracılı DG'de a-sin aşırı ifadesine bağlı uzaysal hafızanın da bozulmuş olabileceğini düşündürmüştür. Uzaysal hafızanın değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri Morris su labirenti testidir (268, 330, 347). Bu testte öncelikle hayvanların öğrenibilme düzeyleri değerlendirilmiş ve daha sonrasında da prob testi uygulanarak uzaysal hafıza ve öğrenilen bilginin geri çağırılması değerlendirilmiştir. *Naive* kontrol hayvanlarının platformu bulma süresi 15 s'nin altına düştüğü zaman öğrenme denemeleri bitirilmiş ve 24 saat sonrasında platform tanktan çıkarılarak prob testi gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında; bilateral SN ve DG'de a-sin aşırı ifadesi sağlanan hayvanların, kontrol gruplarına göre, öğrenmede güçlük çektikleri gözlenmiştir. Kontrol grupları 12 s'den kısa sürede platformu bulurken, a-sin enjekte edilmiş grubun platformu bulma süresi 40 s civarındadır. Nitekim öğrenme eğrileri analiz edildiğinde kontrol gruplarının 1. ve 4. günler arasında platformu bulma sürelerinde anlamlı fark olduğu ve öğrenebildikleri gözlenirken a-sin grubunda bu farkın olmadığı ve öğrenemedikleri gözlenmiştir. Tedavi gruplarının öğrenme düzeyleri değerlendirildiğinde ise benzer şekilde bilateral SN ve DG'ye a-sin enjekte edilip daha sonrasında ilk 8 ya da son 8 hafta çözücü alan grupların platformun yerini öğrenmek için diğer gruplardan daha çok vakit harcadığı gözlenmiştir. İlk 8 hafta a-sin enjekte edilmiş gruba rapamisin uygulanması öğrenmede çözücüye göre daha başarılı olsa da platformu bulma süreleri kontrol gruplarına yakınlık göstermemektedir. Ancak; son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanmasının çözücü uygulanmasına göre etkili olduğu ve platformu bulma süresini kontrol gruplarına oldukça yaklaştırdığı gözlenmiştir.

Karakterizasyon grubuna prob testi uygulandığında; a-sin grubunun platformu bulmak için diğer kontrol gruplarına göre daha çok vakit harcadığı gözlenmiştir. Tedavi gruplarına prob testi yapıldığında ise hem ilk hem de son 8 hafta çözücü uygulanan a-sin grubunun, platformun daha önceden bulunduğu yeri hatırlamakta kontrol grubuna göre daha çok vakit harcadığı ve rapamisin tedavisi uygulanmasının bu süreyi kontrole oldukça yaklaştırıp aralarında anlamlı bir fark kalmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde kontrol gruplarına ne ilk ne de son 8 hafta çözücü ya da

rapamisin uygulanmasının platformun yerini hatırlamada *naive* kontrol grubuna göre bir fark yaratmadığı gözlenmiştir.

Literatürde bulunan hem Alzheimer hayvan modellerinde hem de transgenik a-sin modellerinde hipokampus ile ilişkili uzaysal hafızada bozukluk olduğu gösterilmiştir (293, 348). Bu durum; uzaysal öğrenme ve hafızadaki değişikliğin a-sin aşırı ifadesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Hem ilk 8 hem de son 8 haftada rapamisin tedavisi uygulanmasının testte platformun yerini hatırlamayı artırmış olması; rapamisinin a-sin patolojisini engelleyerek, hipokampus fonksiyonlarında koruyucu etkili olduğunu düşündürmektedir. Literatürde otofaji indüksiyonunun hafızayı güçlendirdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (349, 350). Otofaji spesifik inhibitörü olan Spautin-1 verilen hayvanlarda Beklin-1 inhibisyonu aracılı uzun dönem hafızada bozukluğa neden olduğu ancak öğrenmeyi etkilemediği gösterilmiştir. Bu durum otofaji inhibisyonunun hücre ölümü ya da nöronal aktivite inhibisyonuna neden olmadan, uzun dönem hafıza için gerekli olan sinaptik plastisitenin ve protein sentezinin etkilenmesi ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir (349). Biriken, yanlış katlanmış ya da işlevini kaybetmiş proteinlerin otofaji aracılı yıkımı sonrası yeni proteinlerin sentezi ve sinaptik plastisite uzuzaysal hafıza mekanizmasının altındaki neden olabilir. Rapamisin tedavisinin hem ilk 8 hem de son 8 haftada a-sin enjeksiyon grubunda uzaysal hafızayı geliştirmesi bu bulguları destekler niteliktedir.

AAV-aracılı bilateral SN ve DG'de a-sin aşırı ifadesi sağlanarak oluşturulan PH modelinde meydana gelen davranışsal değişikliklerin altında yatan patofizyolojik değişiklikler immünohistokimyasal boyama ile araştırılmıştır. Böylece; meydana gelen fizyolojik değişikliklerin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılması hedeflenmiştir. Bu amaçla hem SNpc'de hem de DG'de a-sin ve GFP aşırı ifadesinin sağlandığı her iki yöntemle teyit edilmiştir.

AAV-aracılı oluşturulan PH modelinde sıçanlarda meydana gelen kognitif değişikliklerin altında yatan mekanizmayı değerlendirmek ve var olan nöronal değişiklikleri gözlemleyebilmek için hipokampüste NeuN boyaması ve immünohistokimyasal boyama ile semi-kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon grubu değerlendirildiğinde a-sin enjeksiyonuna bağlı hipokampüste NeuN miktarında azalma eğilimi olduğu gözlenmiştir. Tedavi grupları değerlendirildiğinde ise NeuN

miktarında rapamisin tedavisi uygulanan a-sin enjeksiyon grubunda en yüksek oranda kayıp olduğu gözlenmiştir. Ancak bu fark son 8 hafta tedavi gruplarında gözlenmemiştir. A-sin aşırı ifadesine bağlı meydana gelen dopaminerjik nöron kaybını değerlendirmek için TH boyaması ve immünoablottama ile striatumda TH miktarının tespiti de gerçekleştirilmiştir. Ancak karakterizasyon için gerçekleştirdiğimiz deney grupları arasında TH miktarlarında fark bulunmamıştır. İlk 8 hafta tedavi grupları değerlendirildiğinde; a-sin enjeksiyon gruplarının kontrol gruplarına göre TH miktarının azaldığı ancak son 8 hafta tedavi grupları arasında çözücü uygulana a-sin grubunun TH miktarı en az olsa da anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Çözücü alan a-sin enjeksiyon gruplarının TH miktarında azalma olması ancak bu farkın anlamlı olmaması karakterizasyon grubuyla benzerlik göstermektedir. İlk 8 hafta rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubunun striatumunda TH ve hipokampusünde NeuN miktarının diğer gruplardan daha fazla azalmış olması, rapamisinin etkisi olabilir. Operasyon sonrası henüz tam iyileşememiş sıçanlara immünosupresif etkisi olan rapamisin verilmesi, enjeksiyon hasarını artırmış olabilir. İlk 8 hafta rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubu hariç diğer a-sin enjeksiyon gruplarında TH ya da NeuN ölçümlerine bağlı nöronal kayıp görülmemiştir. Bu durum, nöronal kayıp olmamasına rağmen devam eden nörodejeneratif süreçten kaynaklı olabilir. Nitekim viral vektör aracılı a-sin aşırı ifadesi ile gerçekleştirilen PH modellerinde, toksin kaynaklı oluşturulan ve çok daha kısa sürede çok daha yoğun olarak görülen nöronal hasar görülmemektedir (95, 158, 351, 352). Aslında viral vektör aracılı a-sin aşırı ifadesi ile yavaş gelişen nöronal hasar hastalığın var olan seyrine daha çok paralellik gösterir (3, 33, 162, 284). Ancak; a-sin enjeksiyonuna bağlı sıçanlarda meydana gelen davranışsal değişiklikler, a-sin'in hastalık patolojisinde önemli bir rolü olduğunu gösterir ve nöronal hasar yüksek oranlarda meydana gelmese dahi sinaptik fonksiyonları ya da benzer mekanizmaları etkileyerek değişikliklere neden olduğuna işaret eder.

Uzun dönem depresyon (LTD) ve uzun dönem potansiyasyon (LTP) gibi sinapslarda meydana gelen aktivite-bağımlı değişiklikler; motor kontrol, adaptasyon ve işlemsel hafıza için anahtar görevi gören hücresel bileşenlerdir. Ayrıca LTD ve LTP, nigrastriatal terminallerden gelen dopaminerjik aşırım ile düzenlenir ve kontrol edilir. Bu nedenle, striatumda yoğun dopaminerjik hasar ile karakterize olan PH'nin

motor ve bilişsel belirtilerinin başlangıç ve ilerleyiş sebeplerinden biri LTD ve LTP sinaptik plastisitelerinde meydana gelen yetersizlik olabilir (353). Kortikostriatal ve nigrostriatal nöronal uyarılabilirlikteki değişiklikler, sinaptik plastisite indüksiyonu için eşik değeri etkileyerek striatal sinaptik aşırım etkinliğini değiştirebilir ki bu da PH semptomlarının oluşumunda temel rol oynuyor olabilir (353). Sinaptofizin, beyinde presinaptik veziküllerin membranlarında yerleşim gösteren bir glikoproteindir. Aksonal patoloji ve sinaptik kaybı değerlendirmek için kullanılan biyobelirteçlerden biridir. Sinaptofizin'in LTP ve sinaptik plastisitede rol aldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (353-355).

Sinapslarda meydana gelen değişikliklerin PH'de rol oynadığı bilindiğinden (356, 357) a-sin aşırı ifadesine bağlı meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için hipokampus ve striatumda sinaptofizin immünohistokimyasal boyaması ve immünoiblota ile kantitizasyonu gerçekleştirildi. Karakterizasyon grubu değerlendirildiğinde a-sin enjeksiyon grubunun sinaptofizin miktarının hem hipokampüste hem de striatumda diğer gruplardan daha az olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, GFP enjeksiyonuna bağlı da azalma olduğu gözlenmiştir. A-sin enjeksiyon grubunda sinaptofizin miktarında meydana gelen azalma, beklenen bir bulgudur (357, 358). GFP aşırı ifadesinin striatumda sinaptofizin miktarını *naive* kontrol grubuna göre azaltması beklenmeyen bir durumdur. Ancak; genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde hem davranışsal olarak hem de moleküler olarak a-sin aşırı ifadesi kadar olmasa da GFP aşırı ifadesinin davranışsal ve moleküler düzeyde değişikliğe neden olduğu gözlenmektedir. Bu değişikliklerin SF enjeksiyon grubundan daha fazla olması var olan değişimin enjeksiyona bağlı mekanik hasardan değil, GFP toksisitesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Nitekim literatürde var olan çalışmalarda GFP'nin hücrel toksisitesi olabileceği fikrini desteklemektedir (359, 360).

Tedavi grupları sinaptik kayıp açısından değerlendirildiğinde ve hipokampüsteki sinaptofizin miktarlarına bakıldığında ilk 8 hafta rapamisin tedavisi ya da çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunda azalma olduğu ve bu azalmanın çözücü alan grupta daha fazla olduğu gözlenmektedir. Her ne kadar çözücü alan a-sin enjeksiyon grubu kadar sinaptik kayıp olmasa da rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubunun sinaptofizin miktarının *naive* kontrole göre azaldığı

bulunmuştur. Fakat bu durumun; son 8 hafta rapamisin uygulanan grupta farklı olduğu gözlenmiştir. Son 8 hafta çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunun sinaptofizin miktarının *naive* kontrol grubuna göre azaldığı gözlenirken, rapamisin tedavisi uygulanmasının sinapsları koruduğu ve çözücü alan gruptan daha yoğun sinaptofizin miktarı olduğu gözlemlendi. Striatumdaki sinaptofizin miktarları değerlendirildiğinde ise; hem ilk 8 hem de son 8 hafta çözücü uygulanan a-sin enjeksiyon grubunun sinaptofizin oranının en az olduğu hesaplanmıştır. İlk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanan a-sin enjeksiyon grubu ile *naive* kontrol arasında bir fark gözlenmezken, son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanan a-sin enjeksiyon grubunun striatal sinaptofizin miktarının *naive* kontrole göre azaldığı hesaplanmıştır. Bu durum hipokampüste gözlenen durumdan farklıdır. Hipokampüsteki ve striatumdaki nöron tiplerinin birbirinden farklı olması ve a-sin'in hücre tiplerine duyarlılığının farklı olması, sinaptik kaybın sebeplerden biri olabilir (146, 361, 362). Ayrıca bu durum rapamisinin striatal sinapslarda daha etkin olduğunu ya da son 8 hafta rapamisin uygulanmasının striatumdaki sinaptik kaybı engellemek için geç bir süre olduğunu düşündürmektedir. Aslında sinaptofizin miktarında meydana gelen azalma beklenen bir durumdur (356, 357). Davranış deneyleri değerlendirildiği zaman motor fonksiyon kaybının son 8 hafta rapamisin uygulanan grupta da kötü olduğu hatta rodta kalma sürelerinin çözücü alan gruptan daha kısa olduğu ve apomorfin enjeksiyonu sonrası lokomotor hareketlerdeki artışın daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum rapamisinin striatumdaki sinapsları korumada yeterli olmadığını düşündürmektedir.

PH patogenezinde nöroinflamasyonun da rolü olduğu bilinmektedir (363-365). Glial hücreler, beyindeki hücrelerin yaklaşık %50'sini oluşturur. Glial hücrelerin pek çok alt tipi olsa da en yaygın alt tiplerinden birisi astrositlerdir. Astrositlerin; yapısal ve metabolik destek sağlamada, sinaptik aşırımı düzenlemede, suyun taşınmasında ve kan akımında, glial kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gibi dopaminerjik nöronların gelişiminde ve hayatta kalmasında önemli olan nörotrofik faktörlerin üretiminde görev almak gibi pek çok fonksiyonu vardır (366-368). Ayrıca; mikroglia aracılı immün cevap oluşturulduğunda; astrositler, bölgenin etrafını sararak bir bariyer oluştururlar ve toksik sinyalin sağlıklı çevre dokulara yayılmasını engellerler (366). PH'de nöroinflamasyonun etkilerine dair literatürde yer alan önemli bulgulardan biri de SNpc'de bulunan reaktif astrositlerdir (367). Ayrıca, a-sin'in nöronlardan glial

hücrelere transfer olarak biriktiğini gösteren çalışmalarda mevcuttur (369). A-sin agregatlarının astrosit içerisinde birikimi, dopaminerjik ve motor nöronların büyük oranda kaybının gözleendiği orta beyin, beyin sapı ve omurilikte mikroglial aktivasyona neden olur. Mikroglial aktivasyonun engellenmesinin nöronların hayatta kalmasını artırması, astrosit aracılı mikroglial aktivasyonun nörodejenerasyonda doğrudan rolü olduğunu düşündürmektedir (370). Uzun bir zaman boyunca dopaminerjik nöronların ölümüne bağlı nöroinflamasyon görüldüğü düşünölmüştür ancak son zamanlarda nöroinflamasyonun hastalığın başlangıç patofizyolojisinde rolü olduğu düşünölmeye başlanmıştır (367, 371).

Bu tez çalışmasında, astrositlerin patofizyolojideki rolünü değerlendirmek için hem ilk 8 hem de son 8 haftalık tedavi gruplarında ALDH1L1 miktarı hipokampüste ve striatumda immünoblotlama ile semi-kantitatif olarak tespit edildi. İlk 8 hafta rapamisin tedavisi alan hem a-sin enjeksiyon grubunun hem de kontrol grubunun ALDH1L1 seviyelerinin hipokampüste arttığı ve bunun yanı sıra çözücü alan grupların ise ALDH1L1 seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir. Ancak striatumlarına bakıldığı zaman gruplar arasında fark yoktur. Son 8 hafta çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunun ALDH1L1 seviyesinin hipokampüste arttığı gözlenirken, rapamisin grubunda artış gözlenmemiştir. Striatumda ise a-sin enjeksiyonu sonrası ALDH1L1 seviyesinde artış olduğu ve bu artışın rapamisin uygulanan a-sin grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında, a-sin enjeksiyon gruplarında rapamisin tedavisi ile birlikte hem hipokampüste hem de striatumda ALDH1L1 seviyelerinin arttığı gözlenmektedir. Ancak bu artış ilk 8 hafta hipokampus hariç kontrol gruplarına rapamisin uygulandığında görölmemektedir. Bu durum ALDH1L1 seviyesindeki artışın a-sin aşırı ifadesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Yine ilk 8 hafta hipokampus hariç çözücü uygulanan a-sin enjeksiyon gruplarında da ALDH1L1 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu durumda ALDH1L1 seviyesinde meydana gelen artışın a-sin aşırı ifadesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bir çalışmada unilateral AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanması ve fibril enjeksiyonu yapılmasının başlangıçta glial aktivasyona neden olduğu ancak ilerleyen zamanda etkilenen nöronların ölmesi ya da parçalanması sonucunda aktif glial hücrelerin sayısının azaldığı gözlenmiştir (372). Bu tez çalışmasında; yoğun olarak a-sin agregatlarını görmekle birlikte hücre ölümünün aynı oranda yüksek olmadığı

gözlenmektedir. Bu nedenle a-sin enjeksiyonuna bağlı ALDH1L1 seviyesinin artmış olması literatür ile tutarlılık göstermektedir (367, 369, 370). Karakterizasyon grubunda meydana gelen glial değişiklikler değerlendirilmemiştir. Tedavi grubunda meydana gelen değişiklikler ise tam olarak tutarlılık göstermemektedir. Bu nedenle astrosit aktivasyonu ve nöroinflamasyonun histopatolojideki rolünü daha detaylı olarak incelemek için glial fibriller asidik protein (GFAP), mikroglial aktivasyonu değerlendirmek içinde Iba-1 gibi biyobelirteçler kullanarak da ölçüm yapmak ileride daha detaylı çalışmak için fayda sağlayabilir (373).

PH'de altın standart olarak kullanılan tedavi L-DOPA'dır. Şu ana kadar geliştirilmiş en iyi tedavi L-DOPA olsa dahi ciddi yan etkilerinin olması kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca; L-DOPA'nın dopaminerjik nöronlara toksik etkili olabileceği ve bu yüzden de uzun süreli kullanımının nigral hasarı artırdığı düşünülmüştür (374). Bu fikrin altında yatan temel sebepler; glutasyonun azalması, Fe^{+2} artması ve mitokondriyal kompleks 1 aktivitesinin azalması ve buna bağlı olarak da serbest oksijen radikallerinin artmış olması ve apoptotik ölüm yollarının orta beyin dopaminerjik nöronlarda aktif hale geçmesi olabilir (171, 375). Dopamin, metabolize olduğu zaman toksik hidroksi radikallerinin prekürsörü olan H_2O_2 meydana getirir. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte belirli bir miktar nigral hücrenin kaybindan sonra hayatta kalan hücrelerde dopamin metabolizması artar özellikle de glutasyon aktivitesinin kaybolduğu ve Fe^{+2} birikiminin arttığı koruyucu mekanizmaların olduğu çevrede serbest radikallerin artmasına ve nörodejenerasyonun ilerlemesine neden olur (376, 377). Bu nedenle de yeni tedavilere ihtiyaç vardır.

PH'nin henüz kesin bir tedavisi bulunmadığı için, var olan tedavilerdeki temel amaç; semptomların kontrolünü sağlamak, ilaç kullanımına bağlı yan etkileri azaltmak ya da ertelemektir. Günümüzde hastalığın ilerleyişini durduracak ya da nöroprotektif etki sağlayacak bir tedavi henüz bulunamamıştır. PH ile ilişkili henüz belirlenememiş pek çok genetik, çevresel ya da patolojik mekanizmanın bulunması; nöroprotektif tedavileri denemeye elverişli hastalığın ilerleyişini birebir gösteren bir hayvan modelinin eksikliği; PH'de hücresele patolojik mekanizmayı en iyi hedefleyen ilaç ve dozunun belirlenememiş olması; olası ilaç moleküllerinin test edilebileceği, kontrollü, plasebo kontrollü, çift kör ve çok merkezli çalışma yapmanın zorlukları; hastalığın ilerleyişinin yavaşladığına karar vermede kullanılan değerlerin yeterince hassas

olmaması; hastalığın hangi aşamada olduğunu gösteren biyobelirteçlerin yeterince tanımlanmamış olması önemli sebepler arasındadır (174).

Rapamisin ilk olarak antifungal bir ilaç olarak tanımlanmıştır. Ancak günümüzde esas olarak organ naklinde doku reddini önlemek için kullanılır ayrıca kanser hastalarında ve bazı metabolik hastalıklarda da faydalı etkileri olduğu gözlenmiştir. Rapamisin'in etkinlik derecesi çok güçlü değildir. Bunun sebebi; rapamisin'in mTORC1 sinyalini tamamen bloke edememesi ve geri bildirim döngüleri, telafi edici yolları da aktif hale geçirerek hücrenin hayatta kalma ve büyümeyi desteklemesi olabilir (245).

mTORC1, büyüme faktörleri, besin, enerji ve oksijen durumu gibi pek çok sinyali düzenler. Nöronlarda mTOR düzenleyici olarak görev yapmakta, beynin normal gelişiminde ve sinaptik plastisitede, hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında görev alır ve yetişkinlerde de önemli bir rol oynar. Bu nedenle kanser, genetik hastalıklar ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların altında yatan mekanizmasında mTORC1 yolağında meydana gelen bir bozukluğun sebep olduğu düşünülmektedir (218, 245).

Rapamisin, otofaji indüksiyonuna neden olan bir ilaçtır. Otofaji; bütün ökaryotik hücrelerde gerçekleşen birincil yıkım yolağıdır. Esas olarak, sitoplazmadaki eski proteinleri yıkarak yeniden kullanılmasını, stres altında enerji üretimini, hasar görmüş organellerin yıkımını ya da yeni besin ortamına adaptasyonunu, fazlalıkların atımını ve homeostazisi sağlar (378, 379). Ayrıca; otofaji, toksik proteinlerin birikimini önlemede, invazif mikroorganizmaların ve onların antijenlerinin yıkımı gibi bağışıklıktaki pek çok rolüyle hücrenin korunmasında da önemli bir rol oynar (378).

Bu tez çalışması ile AAV-aracılı oluşturulan PH modelinde ilk defa ilk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulayarak, patoloji öncesi otofaji indüksiyonunun hastalığın oluşmasında nöroprotektif etkisi değerlendirilmiştir. Son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanarak ise belirli bir miktar a-sin yükü oluştuktan sonra, var olan agregatların yıkımına ve agregatlardan temizlenmesine katkısı ve böylece, hastalığın ilerlemesine ya da durdurulmasına etkisi değerlendirilmiştir. Otofaji indüksiyonunu değerlendirmek için anti-LC3 I/II antikoruna ile anti-SQSTM1 (p62) antikoruna kullanılmıştır. LC3 esas olarak çift membranlı otofagozomun oluşumu için gerekli olan fagoforun uzaması aşamasında gereklidir. Atg4b enzimi proLC3'ün C terminalindeki glisinini ayırarak sitozolik LC3 I oluşumunu sağlar, bunu takiben

fosfotidiletonolamin (PE) ile LC3 I konjugasyonu membran-ilişkili LC3 II oluşumu meydana gelir (378). LC3 II otofagozom membranı ile ilişkili olduğundan LC3 II miktarında meydana gelen artış, otofajik aktivasyona işaret etmektedir. Memelilerde keşfedilen ilk seçici otofajik adaptör proteini p62'dir. p62 çok fonksiyonlu bir proteindir ve üzerinde LC3 bağlanma bölgesi bulunur (380). p62 ubikutinlenmiş kargoları spesifik bağlanma bölgeleri aracılığıyla otofajik yıkıma götürür (381). Otofajik yıkım sürecinde p62'nin de substrat gibi davranması nedeniyle otofajinin aktivasyonu, p62 ifadesinde azalmaya neden olur (382).

Otofaji aktivasyonunu değerlendirmek için enjeksiyon yapmış olduğumuz hayvanların sağ hipokampuslerinde; LC3 I/II ve p62 seviyeleri immünoiblota ile semi-kantitatif olarak ölçüldü. Buna göre; ilk 8 hafta tedavi uygulanan hayvanların hipokampuslerinde LC3 I seviyesinin; a-sin enjeksiyonu ardından rapamisin uygulanan grupta arttığı gözlenirken, kontrole rapamisin uygulanmasında ise bu artış gözlenmedi. İlk 8 hafta tedavi uygulanan grupların hipokampus LC3 II seviyeleri değerlendirildiğinde ise gruplar arasında fark gözlenmedi. Aktif otofaji genel olarak LC3 I'in, II'ye dönüşümündeki artış ile ölçülmektedir. Bu nedenle LC3 II/LC3 I oranı literatürde sıklıkla kullanılmaktadır (383). İlk 8 hafta tedavi gruplarında hipokampus LC3 II/LC3 I oranı değerlendirildiğinde; rapamisin tedavisi uygulanan grupta LC3 I seviyesi artarken, aynı artışın LC3 II'de gözlenmemesine bağlı olarak LC3 II/LC3 I oranında azalma olduğu gözlemlendi. Ancak çözücü alan a-sin grubunda bu azalma gözlenmemiştir. Ayrıca; rapamisin tedavisi uygulanan kontrol grubunda da değişiklik gözlenmemiştir. LC3 II/LC3 I oranında meydana gelen bu beklenmedik azalma otofajik yolda meydana gelen bir değişiklik ile ilişkili olabilir. Ancak literatürde bu alanda yapılan çok fazla çalışma bulunmamaktadır. A-sin enjeksiyonundan hemen sonra hayvanlarda immünosupresif etkili olduğu bilinen rapamisin tedavisi uygulanması, henüz iyileşme dönemindeki sıçanların a-sin aşırı ifadesi sağlanmasıyla birlikte hücre ölüm yollarından biri olan otofajik yolağın hasarına neden olmuş olabilir. Nitekim mTOR inhibisyonu yaparak otofajik yolağın aktivasyonuna neden olan rapamisin tedavisi ile LC3 II/LC3 I oranında artış olması beklenmektedir (274). Ancak; a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin uygulanan hayvanların hipokampuslerinde bunun tam tersi bir etki olarak artış yerine azalma meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra, rapamisin tedavisi alan a-sin grubu hariç, fark

gözlenmemekte ve *naive* kontrole de benzer sonuçlar gözlenmektedir. Ancak otofajiyi tek bir belirteç ile değerlendirmek yanlış sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle birden fazla belirteç ile sonuçların teyit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, p62 değerine de bakılmıştır. İlk 8 hafta tedavi uygulanan hayvanların p62 seviyeleri değerlendirildiğinde ise a-sin enjeksiyonundan sonra rapamisin uygulanan grubun hipokampus p62 seviyesinde diğer gruplara göre azalma eğilimi olduğu gözlemlendi. Bu bağlamda; otofajik aktivasyonun bir diğer belirteci olan p62 seviyesinde meydana gelen hafif azalma otofaji aktivasyonuna işaret ediyor olabilir (382). Ancak; ilk 8 hafta tedavi sonrası, tedavinin kesilerek 8 hafta daha hayvanların yaşatılmış olması ilacın belirli etkilerinin azalması ya da yok olması ile ilişkili olabilir.

Son 8 hafta tedavi uygulanan grupların hipokampus otofajik aktivasyonu değerlendirildiğinde ise; a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi uygulanan grupta da LC3 I miktarında ilk 8 haftaya benzer şekilde artış olduğu gözlemlendi. Hipokampus LC3 II miktarı değerlendirildiğinde ise a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grubun ve rapamisin tedavisi alan kontrol grubunun LC3 II miktarlarının azaldığı gözlemlendi. Hipokampus LC3 II/LC3 I oranına bakıldığında; a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun LC3 I seviyesinde meydana gelen artışın LC3 II'de gözlenmemesine bağlı olarak *naive* kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Benzer şekilde kontrole rapamisin ya da çözücü uygulanan gruplarda da bu oranda *naive* kontrole göre azalma saptandı. Son 8 hafta tedavi uygulanan hayvanların hipokampus p62 seviyeleri değerlendirildiğinde ise kontrole rapamisin uygulanan grubun p62 seviyesinde, *naive* kontrole ve a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi uygulanan gruba göre azalma olduğu gözlemlendi.

Son 8 hafta tedavi alan grupların hipokampus otofaji aktivasyonu sonuçları değerlendirildiğinde; a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun LC3 I seviyesindeki artışın ilk 8 hafta rapamisin uygulanmasına göre daha yüksek oranda olduğu ancak bu artışın LC3 II miktarına aynı oranda yansımadağı gözlenmiştir. A-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun LC3 I seviyesinde meydana gelen bu artış, kontrole rapamisin uygulanan grupta ya da çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunda gözlenmemiştir. LC3 I miktarı artarken, LC3 I'in aynı oranda LC3 II'ye dönüşmemesi ilk 8 hafta tedavi grubuna benzer şekilde otofajik yolağın aktivasyonunda bir değişiklik meydana geldiğini düşündürmektedir (274). A-sin

enjeksiyonu sonrası son 8 hafta rapamisin uygulanan grupta, ilk 8 hafta rapamisin uygulanan gruba göre LC3 I miktarının daha fazla artmış olması ve LC3 II'ye dönüşümünün aynı oranda olmaması bu yolaktaki bozukluğun a-sin agregatlarının belli bir yoğunluğa ulaşması ile ilişkili ya da rapamisin tedavisinin devam ediyor olmasından kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu artışın son 8 hafta çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunda gözlenmemesi, a-sin agregatlarının tek başına yolakta değişiklik yapmaya yeterli olmadığını ve son 8 hafta boyunca rapamisin tedavisi uygulanmasının a-sin aşırı ifadesine ek olarak bu değişikliklerle neden olduğunu düşündürmektedir. Son 8 hafta tedavi gruplarının hipokampüs p62 düzeylerine bakıldığında ise; kontrole rapamisin uygulanan grupta p62 miktarının azaldığı ancak aynı azalmanın a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin uygulanan grupta olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar tutarlılık göstermektedir ve a-sin enjeksiyonu sonrası otofajik yolakta bozukluk meydana gelmiş olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

İlk 8 hafta tedavinin striatumdaki otofajik etkilerini değerlendirmek için de LC3 I/II ve p62 düzeyleri immüno-blotlama ile değerlendirildi. Buna göre; a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin tedavisi alan grubun LC3 I miktarında hipokampüse benzer şekilde hafif bir artış olduğu gözlemlendi. LC3 II miktarlarında ise; a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü uygulanan grupta artış olduğu gözlemlendi. Aktif otofajiyi değerlendirmek için LC3 II/LC3 I oranına bakıldığında ise; a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grupta kontrole çözücü uygulanmasına göre artış olduğu gözlemlendi. Otofajinin bir diğer belirteci olan p62 düzeyine bakıldığında ise a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grupta p62 düzeyinde azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuçlar a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü uygulanan grupta LC3 II/LC3 I oranında artış meydana gelmesi ve bu artışın a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin uygulanan gruptan daha yüksek olması; tedavi uygulansa da a-sin aşırı ifadesi sağlanmasının striatumda otofaji aktivasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir. A-sin enjeksiyonu sonrası ilk 8 hafta rapamisin tedavisi uygulanması hipokampüste LC3 II/I oranında azalmaya neden olmuştur. Bu durum hipokampüste otofajik yolakta LC3 I'den II'ye dönüşümünde bir bozukluk meydana geldiğini düşündürmektedir. Ancak striatuma bakıldığında LC3 II/LC3 I oranında rapamisin tedavisi sonrası artış görülmüştür ki bu durum otofaji aktivasyonuna işaret etmektedir. Hipokampüs ile striatum arasındaki otofajik yolaktaki bu değişiklik, yapısal farklılıktan kaynaklanıyor

olabilir (361, 362). Bir çalışmada; korteks, hipokampus ve striatum karşılaştırıldığında striatumun nöronal oksidatif strese daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (384). Oksidatif strese duyarlılığın değişmesinin ise farklı beyin bölgelerinde mitokondrial enzim aktivitesinin farklı olması ve enzim aktivitesinin dışında kalsiyum stresine (eksitotoksisite) cevabın da değişmesi olduğu öne sürülmüştür (384, 385). Bunun dışında farklı nöron tiplerinin beynin farklı bölgelerinde değişen oranlarda bulunması ve nöronların stres faktörlerine cevabının değişmesi de yine sonuçların farklı bulunmasının sebebi olabilir (384). Ayrıca; hem immünohistokimyasal boyamalar hem de davranış deneyleri değerlendirildiğinde hipokampusun a-sin aşırı ifadesine daha duyarlı olduğu ve hipokampüste a-sin aşırı ifadesinin daha yoğun olduğu gözlenmektedir. Bu durumda striatumda otofajik aktivasyonun, daha başarılı bir şekilde a-sin agregatlarının yıkımını sağladığına ya da hipokampusun yapısal olarak a-sin aşırı ifadesine daha savunmasız olmasına işaret ediyor olabilir. İlk 8 hafta tedavi gruplarının p62 değerlerine bakıldığında ise çözücü alan a-sin enjeksiyon grubunda striatumda p62’de bir miktar azalma olduğu gözlemlendi. Bu durum tutarlılık göstermekte ve a-sin aşırı ifadesi sağlanmasının striatumda otofajik aktivasyonu artırdığına işaret etmektedir (85, 206, 386).

Son 8 hafta tedavinin striatumda otofajik etkileri değerlendirildiğinde; LC3 I seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. LC3 II seviyesinin a-sin enjeksiyonu sonrası çözücü alan grupta ve rapamisin tedavisi alan grupta hafif azaldığı gözlemlendi. LC3 II/LC3 I oranına bakıldığında ise; gruplar arasında fark gözlenmedi. Striatum p62 düzeyinin ise hem çözücü alan hem de rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubunda artış eğilimi gösterdiği ancak rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda ise striatum p62 düzeyinin azaldığı gözlemlendi.

Son 8 hafta tedavi gruplarının ise striatum LC3 oranları arasında fark gözlenmemesi ve p62 seviyesinin artma eğilimi göstermesi de otofajik yolda bir bozukluk olduğunu düşündürmektedir. Nitekim, LC3 I’den LC3 II dönüşümünde görülen eksiklik bu düşünceyi desteklemektedir (274). A-sin enjeksiyonu sonrası hem rapamisin tedavisi alan grupta hem de çözücü alan grupta kontrole göre p62 değerinde artma olduğu gözlenmektedir. Normal olarak rapamisin otofajik yolağı indükler ve bu durumda otofajik yolağın substratı olan p62 seviyesinin azalması beklenir (382) ki kontrole rapamisin uygulanan sıçanlarda bu azalma gözlenmektedir. A-sin

enjeksiyonu yapılan sıçanlarda bu azalmanın görülmemesi a-sin agregatlarının otofajik yıkımı engellediğini düşündürmektedir. Literatüre bakıldığı zaman a-sin aşırı ifadesi ile otofajik yolak hasarının ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (386-388). İlk 8 hafta tedaviden sonra sıçanların yaşatılmaya devam etmiş olması ve a-sin agregatlarının oluşmuş olması; otofajik yolağın patoloji öncesi aktive edilmesinin hastalığın oluşmasını önlemede ya da ilerleyişini durdurmada yeterli olmadığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra hipokampus ve striatumdan elde edilen sonuçların birbiri ile paralellik göstermemesi, örneğin striatumda rapamisin tedavisi sonrası a-sin enjeksiyon grubunda LC3 II/I oranında artış görülürken, hipokampüste azalma görülmüş olması; ayrıca hipokampüste rapamisin uygulanan a-sin enjeksiyon grubunda p62 seviyesi azalırken, striatumda azalma olmaması; iki yapı arasında otofajik yolak aktivasyonu ve mekanizması arasında fark olduğunu düşündürmektedir. Bu fark otofajik yolak aktivasyon farkından ziyade a-sin'in belirli dokuları daha fazla tutuyor olmasından kaynaklı da olabilir (146, 361, 362). Son 8 hafta tedavi gruplarına bakıldığında ise; yine a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin uygulanan grupta LC3 II/LC3 I oranında hipokampüste azalma görülürken, striatumda bu azalmanın görülmemesi de bu fikri desteklemektedir. Ayrıca bir çalışmada parkin geninde meydana gelen mutasyona bağlı sadece striatum ve SN'de p62 seviyesinde değişiklik olurken, bu değişikliğin hipokampus gibi diğer yapılarda görülmemesi de iki yapı arasında fark olduğunu düşündürmektedir (389). Bunun yanı sıra p62'nin özel otofajik yolaklardan biri olan mitofaji aktivasyonu ile de ilişkili olabileceği belirtilmiştir ve ayrıca otofajik yolaktaki dengesizliğin, p62 seviyesinde meydana gelen artışın, mitofaji kadar apoptoz yolağının aktive olması ile de ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (390). Bu durum davranış testlerinde hipokampus ve bilişsel fonksiyonlarda meydana gelen değişikliklerin striatum ve motor davranışlarda meydana gelen değişikliklerden daha belirgin görülmesinin de temel nedeni olabilir.

Apoptoz, hücre popülasyonunun düzenlenmesinde mitoz kadar gerekli fizyolojik bir süreçtir. Bunun dışında patojenik hücrelerin yok edilmesinde ve inflamatuvar hücreleri kaldırarak yaraların iyileşmesinde hayati bir öneme sahiptir. Organizma yaşlandıkça belirli hücrelerin apoptoz ile yıkımı hızlanır. Oksidatif stresin, serbest radikallerin birikerek mitokondriyal DNA hasarına neden olduğu ve bu nedenle yaş ile tetiklenen patofizyolojik apoptozda temel rol oynadığı

düşünülmektedir (391). Apoptozun çok sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Eğer apoptoza bağlı az ya da çok hücre ölümü görülürse, kanser, gelişimsel hasar, otoimmün hastalıklar ya da nörodejenerasyon gibi patolojiler gözlenebilir (227).

Nöronal ve nöronal olmayan hücre sistemlerinde yapılan *in vitro* çalışmalar ile aspartata özel sistein proteaz (kaspaz)'ların apoptozun etkin bileşenleri olduğu gösterilmiştir (392). Nöronlarda kaspaz-3, apoptozun infaz fazında önemli bir role sahiptir (229). Kaspaz-3 pek çok substratın ya tamamen ya da kısmen proteolizinden sorumludur. A-sin aşırı ifadesinin belirli bir süre sonra agregat oluşturduğu ve oluşan bu agregatların hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu süreç tam olarak aydınlatılamamıştır (86, 88, 95). Bu amaçla çalışmamızda a-sin aşırı ifadesine bağlı olarak, hem otofajik yolağın aktivasyonunun hem de apoptotik yolağın aktivasyonunun değerlendirilmesi planlanmıştır. Bu bağlamda; apoptotik yolağın hücre ölümündeki rolünü değerlendirmek üzere apoptoz biyobelirteci olan kaspaz 3 seviyesi hem sağ hipokampüste hem de sağ striatumda, ilk ve son 8 hafta tedavi gruplarında immünoiblottama ile semi-kantitatif olarak tayin edildi.

İlk 8 hafta tedavi grubunun hipokampus kaspaz 3 seviyesi ölçüldüğünde; hem a-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin alan grupta hem de rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda artış olduğu gözlemlendi. Son 8 hafta tedavi grubunun hipokampus kaspaz 3 seviyesi ölçüldüğünde ise a-sin enjeksiyonu sonrası hem çözücü alan grupta hem de rapamisin tedavisi alan grupta kaspaz 3 miktarının arttığı gözlemlendi. Ancak bu artış rapamisin tedavisi alan kontrol grubunda gözlenmedi. Striatumda meydana gelen apoptotik değişiklikleri değerlendirmek için yapılan kaspaz 3 ölçümlerinde ise ne ilk 8 hafta ne de son 8 hafta striatum kaspaz 3 düzeylerinde gruplar arasında bir fark gözlenmedi.

İlk 8 hafta rapamisin tedavisi ile birlikte kaspaz 3 seviyesinde meydana gelen artış, rapamisinin apoptotik yolağı erken dönemde aktive ettiğini düşündürmektedir (393). Ancak striatuma bakıldığında rapamisin uygulanan kontrol grubunda artma eğilimi var gibi gözükse de hipokampus kadar net bir aktivasyona işaret etmemektedir. Daha önce belirtildiği gibi iki bölge arasındaki yapısal farklılıklar ve a-sin aşırı ifadesine duyarlılığın farklı olması apoptotik yolağın aktivasyonunda meydana gelen farkın sebebi olabilir. Son 8 hafta tedavi gruplarının sonuçlarına bakıldığında ise a-sin enjeksiyonu sonrası hem çözücü alan grubun hem de rapamisin tedavisi alan grubun

hipokampus kaspaz 3 seviyelerinin artmış olması ve bu artışın çözücü ya da rapamisin alan kontrol gruplarında gözlenmemesi; a-sin aşırı ifadesine bağlı oluşan agregatların apoptotik yolak aktivasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir (91, 393). A-sin enjeksiyonu sonrası son 8 hafta çözücü ya da rapamisin tedavisi uygulanan grupların striatum kaspaz 3 seviyeleri değerlendirildiğinde ise yine *naive* kontrole göre fark olmadığı gözlenmiştir. Kontrole rapamisin uygulanmasının da striatumda değişiklikliğe neden olmaması, rapamisinin otofaji aktivasyonuna neden olduğunu, ancak apoptoz aktivasyonunun rapamisin tedavisinden ziyade a-sin aşırı ifadesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Literatürdeki çalışmalar arasında *abotzsis* olarak adlandırılan; kronik nörodejeneratif hastalıklarda apoptotik mekanizmaların dejeneratif süreçte rol oynadığı ve nöronların apoptozun aşamalarının tamamlanmayarak yıllar boyunca “hasta durumda” yaşadıkları gösterilmiştir (393-395). A-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan nörodejeneratif süreç, apoptoz öncesi proapoptotik bu süreci tetiklemiş olabilir. Bunun yanı sıra 6-OHDA ile oluşturulan PH modelinde rapamisin etkisi değerlendirildiğinde, rapamisinin anti-apoptotik etki gösterdiği ve rapamisinin nöronları koruyucu etkisinin apoptotik etkiden ziyade, antioksidan etkisinden kaynaklandığı belirtilmiştir (396).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesinin bilateral SN ve DG’de sağlanması ve buna bağlı meydana gelen patolojik değişikliklerin moleküler düzeyde incelenip, nöroprotektif ya da nörorestoratif etkisi olduğu düşünülen rapamisinin terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi bu çalışmanın temel amaçlarından. Elde edilen bulgular doğrultusunda AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi sağlanmasının SN’nin projeksiyon bölgesi olan striatumda ve DG’nin projeksiyon bölgesi olan hipokampüste sinaptik, nöronal ve glial olarak değerlendirilmiştir. Bilateral SN ve DG’de a-sin aşırı ifadesi ilk defa bu modelde birlikte sağlanmıştır. Model üzerinde son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulandığında a-sin agregat miktarının, çözücü uygulanan gruba göre daha az olduğu gözlenmiştir. Yoğun olarak nöronal bir kayıp görülmesine de; hem striatumda hem de hipokampüste a-sin aşırı ifadesine bağlı sinaptik kayıp olduğu gözlenmiştir. İlk 8 hafta rapamisin tedavisinin striatumda, son 8 hafta rapamisin tedavisinin ise hipokampüste sinapsları koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir.

A-sin aşırı ifadesinin bilateral olarak SN ve DG’de sağlanması sonucu öğrenme ve bellek fonksiyonlarında gerileme olduğu gözlenmiştir. Anksiyete değerlendirmek için yapmış olduğumuz YAL testinde a-sin enjeksiyon grubunun açık kolda daha çok vakit geçirdiği gözlenmiş ve bu durumun Parkinson hastalarında da görülen apati ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. A-sin enjeksiyonu sonrası rapamisin hem ilk 8 hem de son 8 hafta rapamisin tedavisi alan grupların uzaysal öğrenmelerinde düzelme olduğu gösterilmiştir. Ancak; hafızayı test etmek için uygulanan YNT testinde sadece son 8 hafta rapamisin tedavisi alan a-sin enjeksiyon grubunun denemelerden 1 saat sonra eski nesneyi hatırlamada ilerleme gösterdiği gözlenmiştir.

AAV-aracılı a-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan PH modelinde bilişsel fonksiyonlar kadar motor fonksiyonlarda da azalma gözlenmiştir. Yapılan rotarod testinde motor koordinasyonda kayıp, bazal ve apomorfın indüksiyonu sonrası lokomotor aktivite testinde hem bazal aktivite de azalma hem de apomorfine ile indüklenmiş hareketlilikte artışa bağlı dopaminerjik nöronal hasar gözlenmiştir. A-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan PH modelinin motor-dışı semptomlarında; rapamisin tedavisi başarı sağlamıştır. Ancak, uzun süreli rapamisin kullanımına bağlı hayvanlarda bir miktar kilo kaybı ve harekette azalma gibi olumsuz etkiler de

gözlenmiştir. Bu nedenle; rapamisin tedavisine bağlı otofaji indüksiyonu ile PH'nin motor semptomlarında beklenen ilerleme ya da düzelme gözlenmemiştir.

İlk defa gerçekleştirilen bilateral SN ve DG'ye AAV-aracılı a-sin enjeksiyonu ile uzun bir süreçte bölgesel olarak indüklenen agregat oluşumu, PH'nin motor ve motor-dışı belirtilerini çalışmak için iyi bir model oluşturmaktadır. A-sin aşırı ifadesi moleküler düzeyde incelenmiş, sinaptik kaybın nöronal kayıptan önce ve daha yoğun olarak meydana geldiği gözlenmiştir. Ancak, yeterli nöronal kayıp görülmesi dahi davranışta meydana gelen değişiklikler sinaptik kaybın da hastalık patolojisinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Sinaptik kaybı takiben meydana gelmesi beklenen agregat oluşumuna bağlı nöronal kaybın etkisinin daha detaylı incelenebilmesi için davranış öncesi daha uzun süre beklemek faydalı olabilir.

Rapamisin, otofaji indüksiyonu yapmaktadır. Bu çalışmada AAV-aracılı gerçekleştirilen PH sıçan modelinde ilk defa hem a-sin enjeksiyonu ile birlikte hem de a-sin enjeksiyonu sonrası agregat oluşumu beklenecek daha sonrasında rapamisin tedavisi uygulanması, rapamisinin nöroprotektif/nörorestoratif etkisini değerlendirmekte fayda sağlamıştır. Son 8 hafta rapamisin tedavisi uygulamasının, oluşan a-sin agregat yükünde azalmaya neden olması ve özellikle bilişsel fonksiyonlarda gelişme sağlamış olması; rapamisin tedavisinin PH'nin motor-dışı semptomları için iyi bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Ancak; tedaviye bağlı görülen yan etkiler ve motor performansta meydana gelen düşüş, kullanımı ile ilgili daha detaylı çalışma gerektirmektedir.

KAYNAKÇA

1. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;363(9423):1783-93.
2. Varma D, Sen D. Role of the unfolded protein response in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2015;75(1):1-26.
3. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):228-42.
4. Parkinson J. An essay on the shaking palsy (Printed by Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones). London; 1817.
5. Manyam BV, Sanchez-Ramos JR. Traditional and complementary therapies in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 1999;80:565-74.
6. Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a008862.
7. Lees AJ. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Mov Disord*. 2007;22 Suppl 17:S327-34.
8. Jankovic J, Aguilar LG. Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008;4(4):743-57.
9. Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJ, Barker RA. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs*. 2006;20(6):477-505.
10. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 1:318-24.
11. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40.
12. Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(1):49-60.
13. Sugeno N, Takeda A, Hasegawa T, Kobayashi M, Kikuchi A, Mori F, et al. Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. *J Biol Chem*. 2008;283(34):23179-88.
14. Duda JE, Giasson BI, Chen Q, Gur TL, Hurtig HI, Stern MB, et al. Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1439-45.
15. Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, et al. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*. 2001;7(10):1144-50.
16. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276(5321):2045-7.

17. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6469-73.
18. Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, et al. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology*. 1998;51(3):890-2.
19. Schrag A, Horsfall L, Walters K, Noyce A, Petersen I. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2015;14(1):57-64.
20. Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, Seppi K, Compta Y, Katzenschlager R, et al. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov Disord*. 2015;30(2):229-37.
21. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH, National Institute for Clinical E. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*. 2006;5(3):235-45.
22. Chaudhuri KR, Odin P, Antonini A, Martinez-Martin P. Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011;17(10):717-23.
23. Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Perry R, Wentzel-Larsen T, Lolk A, et al. The rate of cognitive decline in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2004;61(12):1906-11.
24. Apaydin H, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Dickson DW. Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Arch Neurol*. 2002;59(1):102-12.
25. Singh A, Althoff R, Martineau RJ, Jacobson J. Pramipexole, ropinirole, and mania in Parkinson's disease. *Am J Psychiatry*. 2005;162(4):814-5.
26. Pluck GC, Brown RG. Apathy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;73(6):636-42.
27. Brown RG, Pluck G. Negative symptoms: the 'pathology' of motivation and goal-directed behaviour. *Trends Neurosci*. 2000;23(9):412-7.
28. Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*. 2005;128(Pt 6):1314-22.
29. Diederich NJ, Goetz CG, Stebbins GT. Repeated visual hallucinations in Parkinson's disease as disturbed external/internal perceptions: focused review and a new integrative model. *Mov Disord*. 2005;20(2):130-40.
30. Moskowitz C, Moses H, 3rd, Klawans HL. Levodopa-induced psychosis: a kindling phenomenon. *Am J Psychiatry*. 1978;135(6):669-75.
31. Chaudhuri KR. Nocturnal symptom complex in PD and its management. *Neurology*. 2003;61(6 Suppl 3):S17-23.

32. Schenk CH, Bundlie SR, Mahowald MW. Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology*. 1996;46(2):388-93.
33. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
34. Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, Li ST, Holmes C, Dendi R, et al. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain*. 2004;127(Pt 4):768-72.
35. Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA, Torbey C, Sengupta A, Pfeiffer R, et al. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet*. 1995;346(8979):861-4.
36. Paradiso MA, Bear MF, Connors BW. *Neuroscience: exploring the brain*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 2007;718.
37. Shepherd GM. *The synaptic organization of the brain*: Oxford University Press; 2003.
38. Flaherty AW, Graybiel AM. Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *J Neurosci*. 1994;14(2):599-610.
39. Freund TF, Powell JF, Smith AD. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*. 1984;13(4):1189-215.
40. DiFiglia M, Pasik P, Pasik T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res*. 1976;114(2):245-56.
41. Kita H, Kosaka T, Heizmann CW. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res*. 1990;536(1-2):1-15.
42. Bolam JP, Clarke DJ, Smith AD, Somogyi P. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [³H]gamma-aminobutyric acid: combination of Golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *J Comp Neurol*. 1983;213(2):121-34.
43. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992;46(4):755-84.
44. Vincent SR, Johansson O, Hokfelt T, Skirboll L, Elde RP, Terenius L, et al. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol*. 1983;217(3):252-63.
45. Vincent SR, Satoh K, Armstrong DM, Fibiger HC. Substance P in the ascending cholinergic reticular system. *Nature*. 1983;306(5944):688-91.
46. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 1995;18(12):527-35.

47. Chang HT, Wilson CJ, Kitai ST. Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Science*. 1981;213(4510):915-8.
48. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *J Neural Transm Suppl*. 1992;36:43-59.
49. Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res*. 2002;43(2):111-7.
50. ÇAKMAKLI GY, ELİBOL B. Bazal Gangliyonların Fonksiyonel Organizasyonu: Güncel Anlayışlar ve Hareket Hastalıklarının Tedavisindeki Yansımaları. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics*. 2015;8(2):9-19.
51. Freeze BS, Kravitz AV, Hammack N, Berke JD, Kreitzer AC. Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J Neurosci*. 2013;33(47):18531-9.
52. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 1990;13(7):281-5.
53. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989;12(10):366-75.
54. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.
55. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116-21.
56. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*. 2002;35(4):625-41.
57. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436(7052):801-6.
58. Rebola N, Carta M, Mulle C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(4):208-20.
59. Dudek SM, Alexander GM, Farris S. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(2):89-102.
60. Hitti FL, Siegelbaum SA. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*. 2014;508(7494):88-92.
61. Knierim JJ. From the GPS to HM: Place cells, grid cells, and memory. *Hippocampus*. 2015;25(6):719-25.
62. Burwell RD. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;911:25-42.
63. Koehl M, Abrous DN. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011;33(6):1101-14.
64. Manns JR, Eichenbaum H. Evolution of declarative memory. *Hippocampus*. 2006;16(9):795-808.

65. Tulving E. Episodic and semantic memory. *Organization of memory*. 1972;1:381-403.
66. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971;34(1):171-5.
67. Lecture N. Internet 2014 [cited 2018 19/03/2018]. Available from: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2014/.
68. O'keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map*: Oxford: Clarendon Press; 1978.
69. Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, McNaughton BL, Witter MP, Moser MB, et al. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science*. 2006;312(5774):758-62.
70. Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser MB, Moser EI. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science*. 2008;322(5909):1865-8.
71. McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB. Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(8):663-78.
72. Fyhn M, Hafting T, Treves A, Moser MB, Moser EI. Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex. *Nature*. 2007;446(7132):190-4.
73. Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx*. 2004;1(1):139-54.
74. Cersosimo MG, Benarroch EE. Autonomic involvement in Parkinson's disease: pathology, pathophysiology, clinical features and possible peripheral biomarkers. *J Neurol Sci*. 2012;313(1-2):57-63.
75. Gai WP, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW. Age-related loss of dorsal vagal neurons in Parkinson's disease. *Neurology*. 1992;42(11):2106-11.
76. Surmeier DJ, Sulzer D. The pathology roadmap in Parkinson disease. *Prion*. 2013;7(1):85-91.
77. Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol*. 1988;76(3):217-21.
78. Jellinger KA. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004;111(10-11):1219-35.
79. Surmeier DJ, Schumacker PT, Guzman JD, Ilijic E, Yang B, Zampese E. Calcium and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;483(4):1013-9.
80. Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol*. 1998;44(3 Suppl 1):S110-4.
81. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2008;7(1):97-109.
82. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*. 1996;16(19):6125-33.

83. Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 1993;21(2):330-4.
84. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253(3):1285-92.
85. Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain.* 2008;131(Pt 8):1969-78.
86. Angot E, Steiner JA, Lema Tome CM, Ekstrom P, Mattsson B, Bjorklund A, et al. Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PLoS One.* 2012;7(6):e39465.
87. Victoria GS, Zurzolo C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol.* 2017;216(9):2633-44.
88. Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol.* 2010;9(11):1128-38.
89. Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(9):1835-49.
90. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron.* 2011;72(1):57-71.
91. Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):13010-5.
92. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 2008;14(5):504-6.
93. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, 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. *Prog Neurobiol.* 2001;65(2):135-72.
94. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 1970;24(3):485-93.
95. Gubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris).* 2015;171(11):750-61.
96. Delaville C, Chetrit J, Abdallah K, Morin S, Cardoit L, De Deurwaerdere P, et al. Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 2012;45(2):763-73.

97. 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.
98. Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem*. 1986;261(17):7585-7.
99. Gubellini P, Picconi B, Di Filippo M, Calabresi P. Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: from experimental models to neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(1):151-61.
100. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18 Suppl 1:S183-5.
101. Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(9):475-83.
102. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, et al. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(51):20766-71.
103. Ossowska K, Wardas J, Smialowska M, Kuter K, Lenda T, Wieronska JM, et al. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci*. 2005;22(6):1294-304.
104. Vaccari A, Saba PL, Ruiu S, Collu M, Devoto P. Disulfiram and diethyldithiocarbamate intoxication affects the storage and release of striatal dopamine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;139(1):102-8.
105. Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, et al. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci*. 2003;18(3):589-600.
106. Miller GW. Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. *Toxicol Sci*. 2007;100(1):1-2.
107. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1357-91.
108. Fernandes VS, Santos JR, Leao AH, Medeiros AM, Melo TG, Izidio GS, et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):154-63.
109. Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(1):a008888.
110. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392(6676):605-8.

111. Verstraeten A, Theuns J, Van Broeckhoven C. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet.* 2015;31(3):140-9.
112. Lu XH, Fleming SM, Meurers B, Ackerson LC, Mortazavi F, Lo V, et al. Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2009;29(7):1962-76.
113. Lazarou M, Narendra DP, Jin SM, Tekle E, Banerjee S, Youle RJ. PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *J Cell Biol.* 2013;200(2):163-72.
114. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 2004;56(3):336-41.
115. Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SM. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:683920.
116. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 2003;299(5604):256-9.
117. Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, et al. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron.* 2005;45(4):489-96.
118. Ramonet D, Daher JP, Lin BM, Stafa K, Kim J, Banerjee R, et al. Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One.* 2011;6(4):e18568.
119. Tong Y, Pisani A, Martella G, Karouani M, Yamaguchi H, Pothos EN, et al. R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(34):14622-7.
120. Gonzalez-Reyes LE, Verbitsky M, Blesa J, Jackson-Lewis V, Paredes D, Tillack K, et al. Sonic hedgehog maintains cellular and neurochemical homeostasis in the adult nigrostriatal circuit. *Neuron.* 2012;75(2):306-19.
121. Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, et al. Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci.* 2009;29(50):15923-32.
122. Haubenberger D, Reinthaler E, Mueller JC, Pirker W, Katzenschlager R, Froehlich R, et al. Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(2):302-7.
123. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 1988;8(8):2804-15.

124. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 1994;345(1):27-32.
125. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):11282-6.
126. Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, et al. Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(1):104-10.
127. Ueda K, Saitoh T, Mori H. Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(2):1366-72.
128. Eschbach J, Danzer KM. alpha-Synuclein in Parkinson's disease: pathogenic function and translation into animal models. *Neurodegener Dis.* 2014;14(1):1-17.
129. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature.* 2011;477(7362):107-10.
130. Lavedan C. The synuclein family. *Genome Res.* 1998;8(9):871-80.
131. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci.* 2016;21:29.
132. Sode K, Ochiai S, Kobayashi N, Usuzaka E. Effect of reparation of repeat sequences in the human alpha-synuclein on fibrillation ability. *Int J Biol Sci.* 2007;3(1):1-7.
133. Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* 2001;276(4):2380-6.
134. George JM. The synucleins. *Genome Biol.* 2002;3(1):REVIEWS3002.
135. Crowther RA, Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. *FEBS Lett.* 1998;436(3):309-12.
136. Scott D, Roy S. alpha-Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. *Journal of Neuroscience.* 2012;32(30):10129-35.
137. Diao J, Burre J, Vivona S, Cipriano DJ, Sharma M, Kyoung M, et al. Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife.* 2013;2:e00592.
138. Gaugler MN, Genc O, Bobela W, Mohanna S, Ardah MT, El-Agnaf OM, et al. Nigrostriatal overabundance of alpha-synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. *Acta Neuropathol.* 2012;123(5):653-69.

139. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25(1):239-52.
140. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*. 2002;22(20):8797-807.
141. Burre J, Sharma M, Sudhof TC. alpha-Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(40):E4274-83.
142. Peng X, Tehrani R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG. Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 15):3523-30.
143. Dettmer U, Newman AJ, von Saucken VE, Bartels T, Selkoe D. KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal alpha-synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(31):9596-601.
144. Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, et al. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9843-6.
145. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem*. 2007;103(1):17-37.
146. Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*. 2003;110(5):517-36.
147. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. 2006;396(1):67-72.
148. Rockenstein E, Nuber S, Overk CR, Ubhi K, Mante M, Patrick C, et al. Accumulation of oligomer-prone alpha-synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration in vivo. *Brain*. 2014;137(Pt 5):1496-513.
149. Villar-Pique A, Lopes da Fonseca T, Outeiro TF. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 1:240-55.
150. Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med*. 2012;209(5):975-86.
151. Osterberg VR, Spinelli KJ, Weston LJ, Luk KC, Woltjer RL, Unni VK. Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell Rep*. 2015;10(8):1252-60.

152. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998;18(2):106-8.
153. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004;55(2):164-73.
154. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(6):811-3.
155. Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P, et al. alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol.* 2013;125(5):753-69.
156. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004;364(9440):1169-71.
157. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA.* 2006;296(6):661-70.
158. Bezard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord.* 2013;28(1):61-70.
159. Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 2000;886(1-2):82-98.
160. Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci.* 2002;22(7):2780-91.
161. Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, Bjorklund A. Viral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 2010;184:89-111.
162. Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Bjorklund A. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis.* 2012;45(3):939-53.
163. Kirik D, Annett LE, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A. Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2884-9.
164. Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P. alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10813-8.

165. Yamada M, Iwatsubo T, Mizuno Y, Mochizuki H. Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2004;91(2):451-61.
166. Ordenstein L. Sur la paralysie agitante et la sclérose en plaques généralisée: A. Delahaye; 1868.
167. Hornykiewicz O. Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Mov Disord*. 2002;17(3):501-8.
168. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*. 1957;180(4596):1200.
169. Birkmayer W, Hornykiewicz O. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr*. 1961;73:787-8.
170. Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med*. 1969;280(7):337-45.
171. Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):213-46.
172. Pahwa R, Lyons KE. Treatment of early Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(4):442-9.
173. Pahwa R, Lyons KE, Hauser RA, Fahn S, Jankovic J, Pourcher E, et al. Randomized trial of IPX066, carbidopa/levodopa extended release, in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014;20(2):142-8.
174. Jankovic J, Poewe W. Therapies in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2012;25(4):433-47.
175. Shoulson I, Oakes D, Fahn S, Lang A, Langston JW, LeWitt P, et al. Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Ann Neurol*. 2002;51(5):604-12.
176. Jenner P, Langston JW. Explaining ADAGIO: a critical review of the biological basis for the clinical effects of rasagiline. *Mov Disord*. 2011;26(13):2316-23.
177. Calne DB, Teychenne PF, Claveria LE, Eastman R, Greenacre JK, Petrie A. Bromocriptine in Parkinsonism. *Br Med J*. 1974;4(5942):442-4.
178. Debono AG, Marsden CD, Asselman P, Parkes JD. Bromocriptine and dopamine receptor stimulation. *Br J Clin Pharmacol*. 1976;3(6):977-82.
179. 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. *Mov Disord*. 2011;26 Suppl 3:S2-41.
180. Adler CH, Sethi KD, Hauser RA, Davis TL, Hammerstad JP, Bertoni J, et al. Ropinirole for the treatment of early Parkinson's disease. The Ropinirole Study Group. *Neurology*. 1997;49(2):393-9.

181. Talati R, Baker WL, Patel AA, Reinhart K, Coleman CI. Adding a dopamine agonist to preexisting levodopa therapy vs. levodopa therapy alone in advanced Parkinson's disease: a meta analysis. *Int J Clin Pract.* 2009;63(4):613-23.
182. Antonini A, Tolosa E, Mizuno Y, Yamamoto M, Poewe WH. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2009;8(10):929-37.
183. Hughes AJ, Bishop S, Kleedorfer B, Turjanski N, Fernandez W, Lees AJ, et al. Subcutaneous apomorphine in Parkinson's disease: response to chronic administration for up to five years. *Mov Disord.* 1993;8(2):165-70.
184. Stocchi F, Borgohain R, Onofrij M, Schapira AH, Bhatt M, Lucini V, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of safinamide as add-on therapy in early Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 2012;27(1):106-12.
185. Rodnitzky RL. Upcoming treatments in Parkinson's disease, including gene therapy. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18 Suppl 1:S37-40.
186. Bronzova J, Sampaio C, Hauser RA, Lang AE, Rascol O, Theeuwes A, et al. Double-blind study of pramipexole, a new partial dopamine agonist, in early Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010;25(6):738-46.
187. Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(3):148-55.
188. Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2006;29(11):647-54.
189. Fuxe K, Ferre S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav.* 2007;92(1-2):210-7.
190. Hauser RA, Schwarzschild MA. Adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease: rationale, therapeutic potential and clinical experience. *Drugs Aging.* 2005;22(6):471-82.
191. Bibbiani F, Oh JD, Petzer JP, Castagnoli N, Jr., Chen JF, Schwarzschild MA, et al. A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2003;184(1):285-94.
192. Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, et al. Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol.* 1998;43(4):507-13.
193. Mela F, Marti M, Dekundy A, Danysz W, Morari M, Cenci MA. Antagonism of metabotropic glutamate receptor type 5 attenuates l-DOPA-induced dyskinesia and its molecular and neurochemical correlates in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2007;101(2):483-97.
194. Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, Golembiowska K, Wolfarth S, Pilc A. The role of striatal metabotropic glutamate receptors in Parkinson's disease. *Amino Acids.* 2002;23(1-3):193-8.

195. Mo JJ, Liu LY, Peng WB, Rao J, Liu Z, Cui LL. The effectiveness of creatine treatment for Parkinson's disease: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Neurol*. 2017;17(1):105.
196. Follett KA, Weaver FM, Stern M, Hur K, Harris CL, Luo P, et al. Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(22):2077-91.
197. Niethammer M, Tang CC, LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, et al. Long-term follow-up of a randomized AAV2-GAD gene therapy trial for Parkinson's disease. *JCI Insight*. 2017;2(7):e90133.
198. Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*. 2010;9(12):1164-72.
199. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, et al. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*. 2010;18(9):1731-5.
200. Allen PJ, Feigin A. Gene-based therapies in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2014;11(1):60-7.
201. OxfordBioMedica. Oxford BioMedica announces interim update on ProSavin® phase I/II study in Parkinson's disease. 2013 [Available from: <http://www.oxfordbiomedica.co.uk/press-releases/oxford-biomedica-announces-interim-update-on-prosavin-r-phase-i-ii-study-in-parkinson-s-disease/>].
202. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, Jr., et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*. 2003;60(1):69-73.
203. Parkinson Study G. Effect of deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 1989;321(20):1364-71.
204. Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF. Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol*. 1997;42(2):261-4.
205. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Mov Disord*. 2016;31(2):178-92.
206. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*. 2003;278(27):25009-13.
207. Venderova K, Park DS. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8).
208. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460-73.

209. Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol*. 2008;28(18):5747-63.
210. Lamark T, Kirkin V, Dikic I, Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*. 2009;8(13):1986-90.
211. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124-31.
212. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335:1-32.
213. Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol Dis*. 2015;84:39-49.
214. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
215. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2015;125(1):25-32.
216. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1981-91.
217. Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2009;84(3):431-48.
218. Bove J, Martinez-Vicente M, Vila M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(8):437-52.
219. Mavrakis M, Lippincott-Schwartz J, Stratakis CA, Bossis I. Depletion of type IA regulatory subunit (RI α) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Hum Mol Genet*. 2006;15(19):2962-71.
220. Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, et al. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol*. 2010;190(4):533-9.
221. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132-41.
222. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214-26.
223. Levine B, Abrams J. p53: The Janus of autophagy? *Nat Cell Biol*. 2008;10(6):637-9.
224. Hara-Kuge S, Fujiki Y. The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes. *Exp Cell Res*. 2008;314(19):3531-41.
225. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):245-53.

226. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
227. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
228. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*. 2003;171(9):4672-9.
229. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326 (Pt 1):1-16.
230. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
231. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;81(4):495-504.
232. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14(22):5579-88.
233. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandennebeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861-74.
234. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.
235. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549-54.
236. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*. 2004;23(10):2134-45.
237. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 2000;192(4):571-80.
238. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276(2):1071-7.
239. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*. 2003;40(5):481-95.
240. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):721-6.

241. Camardo J. The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation. *Transplant Proc.* 2003;35(3 Suppl):18S-24S.
242. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends Mol Med.* 2013;19(1):51-60.
243. Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest.* 2013;123(3):980-9.
244. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460(7253):392-5.
245. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 2014;19(3):373-9.
246. Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA. Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J Neurosci.* 2012;32(36):12396-405.
247. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 1994;370(6484):71-5.
248. Cai Z, Yan LJ. Rapamycin, Autophagy, and Alzheimer's Disease. *J Biochem Pharmacol Res.* 2013;1(2):84-90.
249. Lu Z, Liu F, Chen L, Zhang H, Ding Y, Liu J, et al. Effect of Chronic Administration of Low Dose Rapamycin on Development and Immunity in Young Rats. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135256.
250. Bell A, Grunder L, Sorisky A. Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture. *Obes Res.* 2000;8(3):249-54.
251. Chang GR, Chiu YS, Wu YY, Chen WY, Liao JW, Chao TH, et al. Rapamycin protects against high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J Pharmacol Sci.* 2009;109(4):496-503.
252. Chang GR, Wu YY, Chiu YS, Chen WY, Liao JW, Hsu HM, et al. Long-term administration of rapamycin reduces adiposity, but impairs glucose tolerance in high-fat diet-fed KK/HIJ mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009;105(3):188-98.
253. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2008;57(4):945-57.
254. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*, Acad. Press; 2006.
255. Ulusoy A, Sahin G, Bjorklund T, Aebischer P, Kirik D. Dose optimization for long-term rAAV-mediated RNA interference in the nigrostriatal projection neurons. *Mol Ther.* 2009;17(9):1574-84.

256. Chen L, Hu L, Dong JY, Ye Q, Hua N, Wong M, et al. Rapamycin has paradoxical effects on S6 phosphorylation in rats with and without seizures. *Epilepsia*. 2012;53(11):2026-33.
257. Zhao C, Yasumura D, Li X, Matthes M, Lloyd M, Nielsen G, et al. mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(1):369-83.
258. Maingay M, Romero-Ramos M, Kirik D. Viral vector mediated overexpression of human alpha-synuclein in the nigrostriatal dopaminergic neurons: a new model for Parkinson's disease. *CNS Spectr*. 2005;10(3):235-44.
259. Eren-Kocak E, Turner CA, Watson SJ, Akil H. Short-hairpin RNA silencing of endogenous fibroblast growth factor 2 in rat hippocampus increases anxiety behavior. *Biol Psychiatry*. 2011;69(6):534-40.
260. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1984;327(1):1-5.
261. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(8):1193-205.
262. File SE, Lippa AS, Beer B, Lippa MT. Animal tests of anxiety. *Curr Protoc Neurosci*. 2004;Chapter 8:Unit 8 3.
263. Stahl SM. *Essentials of Psychopharmacology*. second ed: Cambridge University Press; 2000.
264. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31(1):47-59.
265. Gross M, Pinhasov A. Chronic mild stress in submissive mice: Marked polydipsia and social avoidance without hedonic deficit in the sucrose preference test. *Behavioural Brain Research*. 2016;298:25-34.
266. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;93(3):358-64.
267. Rodriguez-Lopez C, Clasca F, Prensa L. The Mesoaccumbens Pathway: A Retrograde Labeling and Single-Cell Axon Tracing Analysis in the Mouse. *Front Neuroanat*. 2017;11:25.
268. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47-60.
269. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58.
270. Buitrago MM, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem*. 2004;81(3):211-6.
271. Hall H, Jewett M, Landeck N, Nilsson N, Schagerlof U, Leanza G, et al. Characterization of cognitive deficits in rats overexpressing human alpha-

- synuclein in the ventral tegmental area and medial septum using recombinant adeno-associated viral vectors. *PLoS One*. 2013;8(5):e64844.
272. Neef C, van Laar T. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of apomorphine in patients with Parkinson's disease. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37(3):257-71.
 273. Lee BR, Kamitani T. Improved immunodetection of endogenous alpha-synuclein. *PLoS One*. 2011;6(8):e23939.
 274. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-5.
 275. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171(4):603-14.
 276. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99-104.
 277. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364(9440):1167-9.
 278. Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*. 2000;287(5456):1265-9.
 279. Kahle PJ. alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 2008;115(1):87-95.
 280. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 2002;34(4):521-33.
 281. Richfield EK, Thiruchelvam MJ, Cory-Slechta DA, Wuertzer C, Gainetdinov RR, Caron MG, et al. Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol*. 2002;175(1):35-48.
 282. Tofaris GK, Garcia Reitböck P, Humby T, Lambourne SL, O'Connell M, Ghetti B, et al. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *J Neurosci*. 2006;26(15):3942-50.
 283. Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, et al. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8968-73.
 284. Decressac M, Mattsson B, Bjorklund A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2012;235(1):306-15.

285. Eslamboli A, Romero-Ramos M, Burger C, Bjorklund T, Muzyczka N, Mandel RJ, et al. Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain. *Brain*. 2007;130(Pt 3):799-815.
286. Hansen C, Bjorklund T, Petit GH, Lundblad M, Murmu RP, Brundin P, et al. A novel alpha-synuclein-GFP mouse model displays progressive motor impairment, olfactory dysfunction and accumulation of alpha-synuclein-GFP. *Neurobiol Dis*. 2013;56:145-55.
287. Oliveras-Salva M, Van der Perren A, Casadei N, Stroobants S, Nuber S, D'Hooge R, et al. rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener*. 2013;8:44.
288. Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, et al. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab*. 2013;17(3):456-62.
289. Li JY, Zhang LW, Du M, Han X, Yi HX, Guo CF, et al. Effect of tween series on growth and Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid production of *Lactobacillus acidophilus* F0221 in the presence of bile salts. *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):9138-54.
290. Asenjo JA, Andrews BA. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *J Chromatogr A*. 2011;1218(49):8826-35.
291. Knowles DB, Shkel IA, Phan NM, Sternke M, Lingeman E, Cheng X, et al. Chemical Interactions of Polyethylene Glycols (PEGs) and Glycerol with Protein Functional Groups: Applications to Effects of PEG and Glycerol on Protein Processes. *Biochemistry*. 2015;54(22):3528-42.
292. Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res*. 1983;287(2):173-96.
293. Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010;5(4):e9979.
294. Ichihara K, Nabeshima T, Kameyama T. Opposite effects induced by low and high doses of apomorphine on single-trial passive avoidance learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988;30(1):107-13.
295. Di Chiara G, Porceddu ML, Vargiu L, Argiolas A, Gessa GL. Evidence for dopamine receptors mediating sedation in the mouse brain. *Nature*. 1976;264(5586):564-7.
296. Macias M, Blazejczyk M, Kazmierska P, Caban B, Skalecka A, Tarkowski B, et al. Spatiotemporal characterization of mTOR kinase activity following kainic acid induced status epilepticus and analysis of rat brain response to chronic rapamycin treatment. *PLoS One*. 2013;8(5):e64455.
297. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci*. 2005;25(49):11288-99.

298. Santini E, Heiman M, Greengard P, Valjent E, Fisone G. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Sci Signal*. 2009;2(80):ra36.
299. Murer MG, Moratalla R. Striatal Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia: Common Mechanisms with Drug Abuse and Long Term Memory Involving D1 Dopamine Receptor Stimulation. *Front Neuroanat*. 2011;5:51.
300. Santini E, Feyder M, Gangarossa G, Bateup HS, Greengard P, Fisone G. Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32-kDa (DARPP-32)-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in experimental parkinsonism. *J Biol Chem*. 2012;287(33):27806-12.
301. Wu J, McCallum SE, Glick SD, Huang Y. Inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway by rapamycin blocks cocaine-induced locomotor sensitization. *Neuroscience*. 2011;172:104-9.
302. Ayton S, George JL, Adlard PA, Bush AI, Cherny RA, Finkelstein DI. The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. *Neurosci Lett*. 2013;543:105-9.
303. Ulusoy A, Rusconi R, Perez-Revuelta BI, Musgrove RE, Helwig M, Winzen-Reichert B, et al. Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections. *EMBO Mol Med*. 2013;5(7):1051-9.
304. Janakiraman U, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM, Barathidasan R, SaravanaBabu C, et al. Influences of Chronic Mild Stress Exposure on Motor, Non-Motor Impairments and Neurochemical Variables in Specific Brain Areas of MPTP/Probenecid Induced Neurotoxicity in Mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146671.
305. Bacchi F, Mathe AA, Jimenez P, Stasi L, Arban R, Gerrard P, et al. Anxiolytic-like effect of the selective neuropeptide Y Y2 receptor antagonist BIIE0246 in the elevated plus-maze. *Peptides*. 2006;27(12):3202-7.
306. George S, van den Buuse M, San Mok S, Masters CL, Li QX, Culvenor JG. Alpha-synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. *Exp Neurol*. 2008;210(2):788-92.
307. Graham DR, Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J Neurosci Res*. 2010;88(8):1777-83.
308. Pogorelov VM, Rodriguiz RM, Insko ML, Caron MG, Wetsel WC. Novelty seeking and stereotypic activation of behavior in mice with disruption of the *Dat1* gene. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(10):1818-31.
309. Yamakado H, Moriwaki Y, Yamasaki N, Miyakawa T, Kurisu J, Uemura K, et al. alpha-Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res*. 2012;73(2):173-7.
310. Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen J, Shekhar A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress*. 2005;8(4):233-46.

311. Stein DJ, Westenberg HG, Liebowitz MR. Social anxiety disorder and generalized anxiety disorder: serotonergic and dopaminergic neurocircuitry. *J Clin Psychiatry*. 2002;63 Suppl 6:12-9.
312. Prediger RD, Matheus FC, Schwarzbald ML, Lima MM, Vital MA. Anxiety in Parkinson's disease: a critical review of experimental and clinical studies. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):115-24.
313. Magnard R, Vachez Y, Carcenac C, Krack P, David O, Savasta M, et al. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? *Transl Psychiatry*. 2016;6:e753.
314. Caudal D, Alvarsson A, Bjorklund A, Svenningsson P. Depressive-like phenotype induced by AAV-mediated overexpression of human alpha-synuclein in midbrain dopaminergic neurons. *Exp Neurol*. 2015;273:243-52.
315. Cunha MP, Pazini FL, Lieberknecht V, Budni J, Oliveira A, Rosa JM, et al. MPP(+)-Lesioned Mice: an Experimental Model of Motor, Emotional, Memory/Learning, and Striatal Neurochemical Dysfunctions. *Mol Neurobiol*. 2017;54(8):6356-77.
316. Fortuna JTS, Gralle M, Beckman D, Neves FS, Diniz LP, Frost PS, et al. Brain infusion of alpha-synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson's disease-like symptoms in mice. *Behav Brain Res*. 2017;333:150-60.
317. Niu Y, Guo X, Chen Y, Wang CE, Gao J, Yang W, et al. Early Parkinson's disease symptoms in alpha-synuclein transgenic monkeys. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2308-17.
318. Aarsland D, Marsh L, Schrag A. Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009;24(15):2175-86.
319. Shibata R, Kameishi M, Kondoh T, Torii K. Bilateral dopaminergic lesions in the ventral tegmental area of rats influence sucrose intake, but not umami and amino acid intake. *Physiol Behav*. 2009;96(4-5):667-74.
320. Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(9):3306-11.
321. Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(1):R31-7.
322. Berridge KC. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24(2):173-98.
323. Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T. Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav Brain Res*. 2002;134(1-2):123-30.
324. Oades RD, Halliday GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res*. 1987;434(2):117-65.
325. Santiago RM, Barbiero J, Gradowski RW, Bochen S, Lima MM, Da Cunha C, et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly

- correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behav Brain Res.* 2014;259:70-7.
326. Santiago RM, Barbieiro J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MA. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010;34(6):1104-14.
 327. Flores-Cuadrado A, Ubeda-Banon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A. alpha-Synuclein staging in the amygdala of a Parkinson's disease model: cell types involved. *Eur J Neurosci.* 2015;41(1):137-46.
 328. Loney GC, Torregrossa AM, Smith JC, Sclafani A, Eckel LA. Rats display a robust bimodal preference profile for sucralose. *Chem Senses.* 2011;36(8):733-45.
 329. Ieraci A, Mallei A, Popoli M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast.* 2016;2016:6212983.
 330. Solari N, Bonito-Oliva A, Fisone G, Brambilla R. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. *Learn Mem.* 2013;20(10):592-600.
 331. Baudic S, Barba GD, Thibaudet MC, Smagghe A, Remy P, Traykov L. Executive function deficits in early Alzheimer's disease and their relations with episodic memory. *Arch Clin Neuropsychol.* 2006;21(1):15-21.
 332. Cohen SJ, Stackman RW, Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res.* 2015;285:105-17.
 333. Rajagopal L, Massey BW, Huang M, Oyamada Y, Meltzer HY. The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Des.* 2014;20(31):5104-14.
 334. Hopkins ME, Bucci DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2010;94(2):278-84.
 335. Warburton EC, Brown MW. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res.* 2015;285:131-9.
 336. Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci.* 2004;24(26):5901-8.
 337. Yonelinas AP, Aly M, Wang WC, Koen JD. Recollection and familiarity: examining controversial assumptions and new directions. *Hippocampus.* 2010;20(11):1178-94.
 338. Steckler T, Sahgal A. The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behaviour. *Behav Brain Res.* 1995;67(2):165-99.

339. Barker GR, Warburton EC. Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: a critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. *Cereb Cortex*. 2015;25(2):472-81.
340. Bird CM, Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(3):182-94.
341. Kim H, Cabeza R. Differential contributions of prefrontal, medial temporal, and sensory-perceptual regions to true and false memory formation. *Cereb Cortex*. 2007;17(9):2143-50.
342. Olarte-Sanchez CM, Amin E, Warburton EC, Aggleton JP. Perirhinal cortex lesions impair tests of object recognition memory but spare novelty detection. *Eur J Neurosci*. 2015;42(12):3117-27.
343. Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci*. 1999;22(3):425-44; discussion 44-89.
344. Bussey TJ, Barch DM, Baxter MG. Testing long-term memory in animal models of schizophrenia: suggestions from CNTRICS. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(9 Pt B):2141-8.
345. Cui Z, Feng R, Jacobs S, Duan Y, Wang H, Cao X, et al. Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci Rep*. 2013;3:1036.
346. Bonito-Oliva A, Pignatelli M, Spigolon G, Yoshitake T, Seiler S, Longo F, et al. Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. *Biol Psychiatry*. 2014;75(9):701-10.
347. De-Mello N, Souza-Junior IQ, Carobrez AP. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res*. 2005;158(2):263-8.
348. Masliah E, Rockenstein E, Mante M, Crews L, Spencer B, Adame A, et al. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One*. 2011;6(4):e19338.
349. Hylin MJ, Zhao J, Tangavelou K, Rozas NS, Hood KN, MacGowan JS, et al. A role for autophagy in long-term spatial memory formation in male rodents. *J Neurosci Res*. 2017.
350. Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, et al. Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain*. 2011;134(Pt 1):258-77.
351. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
352. Imai Y, Venderova K, Lim KL. Animal models of Parkinson's disease 2012. *Parkinsons Dis*. 2012;2012:729428.

353. Picconi B, Piccoli G, Calabresi P. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;970:553-72.
354. Gerfen CR. Synaptic organization of the striatum. *J Electron Microsc Tech.* 1988;10(3):265-81.
355. Janz R, Sudhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron.* 1999;24(3):687-700.
356. Schirinzi T, Madeo G, Martella G, Maltese M, Picconi B, Calabresi P, et al. Early synaptic dysfunction in Parkinson's disease: Insights from animal models. *Mov Disord.* 2016;31(6):802-13.
357. Bagetta V, Ghiglieri V, Sgobio C, Calabresi P, Picconi B. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(2):493-7.
358. Phan JA, Stokholm K, Zareba-Paslawska J, Jakobsen S, Vang K, Gjedde A, et al. Early synaptic dysfunction induced by alpha-synuclein in a rat model of Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):6363.
359. Ansari AM, Ahmed AK, Matsangos AE, Lay F, Born LJ, Marti G, et al. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev.* 2016;12(5):553-9.
360. Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;260(3):712-7.
361. Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(2):101-13.
362. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neurol.* 2016;524(6):1236-58.
363. Bassani TB, Vital MA, Rauh LK. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73(7):616-23.
364. Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18 Suppl 1:S210-2.
365. Vivekanantham S, Shah S, Dewji R, Dewji A, Khatri C, Ologunde R. Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair. *Int J Neurosci.* 2015;125(10):717-25.
366. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
367. Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 2017;40(6):358-70.
368. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993;260(5111):1130-2.

369. Lee HJ, Suk JE, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem*. 2010;285(12):9262-72.
370. Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain*. 2010;3:12.
371. Braak H, Sastre M, Del Tredici K. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2007;114(3):231-41.
372. Thakur P, Breger LS, Lundblad M, Wan OW, Mattsson B, Luk KC, et al. Modeling Parkinson's disease pathology by combination of fibril seeds and alpha-synuclein overexpression in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(39):E8284-E93.
373. Sharma N, Nehru B. Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochem Int*. 2015;87:92-105.
374. Fahn S. Is levodopa toxic? *Neurology*. 1996;47(6 Suppl 3):S184-95.
375. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*. 1992;32(6):804-12.
376. Olanow CW. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*. 1990;40(10 Suppl 3):suppl 32-7; discussion 7-9.
377. Ahlskog JE. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2005;20(3):271-82.
378. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014;24(1):24-41.
379. Cherra SJ, 3rd, Dagda RK, Chu CT. Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost? *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010;36(2):125-32.
380. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016;21:29.
381. Myeku N, Figueiredo-Pereira ME. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem*. 2011;286(25):22426-40.
382. Bitto A, Lerner CA, Nacarelli T, Crowe E, Torres C, Sell C. P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *Age (Dordr)*. 2014;36(3):9626.
383. Tanida I, Waguri S. Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol*. 2010;648:193-214.
384. Pickrell AM, Fukui H, Wang X, Pinto M, Moraes CT. The striatum is highly susceptible to mitochondrial oxidative phosphorylation dysfunctions. *J Neurosci*. 2011;31(27):9895-904.

385. Oliveira JM, Goncalves J. In situ mitochondrial Ca²⁺ buffering differences of intact neurons and astrocytes from cortex and striatum. *J Biol Chem.* 2009;284(8):5010-20.
386. Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, et al. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One.* 2010;5(2):e9313.
387. Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z, Rockenstein E, Masliah E, Hyman BT, et al. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2011;31(41):14508-20.
388. Koch JC, Bitow F, Haack J, d'Hedouville Z, Zhang JN, Tonges L, et al. Alpha-Synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1811.
389. Song P, Li S, Wu H, Gao R, Rao G, Wang D, et al. Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Protein Cell.* 2016;7(2):114-29.
390. Liu H, Dai C, Fan Y, Guo B, Ren K, Sun T, et al. From autophagy to mitophagy: the roles of P62 in neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr.* 2017;49(5):413-22.
391. Harman D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;673:126-41.
392. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2875-80.
393. Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, et al. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007;6(6):411-23.
394. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14376-81.
395. Jellinger KA. Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res.* 2006;3(4):377-91.
396. Jiang J, Jiang J, Zuo Y, Gu Z. Rapamycin protects the mitochondria against oxidative stress and apoptosis in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Med.* 2013;31(4):825-32.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

S. [REDACTED]
Sayı: 52338575

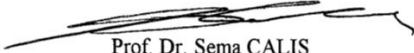
04 Eylül 2014

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 28.08.2014 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2014/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2014/51
KARAR NUMARASI	: 2014/51-08
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL, Uzm.Dr.Gül Yalçın ÇAKMAKLI, Uzm.Ecz.İnci KAZKAYASI, Ecz.Gökçen TELLİ, Ecz.Elif ÇINAR, Ecz.Sevgi Uğur MUTLUAY
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof.Dr.Bülent ELİBOL, Prof.Dr.Esen Saka TOPÇUOĞLU, Dr.Ayşe ULUSOY, Doç.Dr.A.C.Sinan YÜRÜKER, Doç.Dr.Samiye Yabanoğlu ÇİTÇİ ve Uzm.Bio.İpek BAYSAL
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 240 Adet Sıçan

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL'in araştırma yürütücüsü olduğu 2014/51 kayıt numaralı "Viral Vektörün Bilateral Enjeksiyonu ile Bazal Gangliyonlarda ve Limbik Kortekste Artırılmış Alfa Sinüklein İfadesinin Neden Olduğu Parkinson Hastalığı Modelinde Motor ve Davranışsal Değişikliklerin ve Rapamisinin Nörodejenerasyona Etkisinin İncelenmesi" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Elif ÇINAR

Doğum Yeri ve Tarihi Ankara, 18 Ocak 1989

Adres Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye-Ankara
Tel: (312) 305 2131,
Mobil: (0554) 230 23 88
E-posta: elif.cinar@hacettepe.edu.tr

Öğrenim Durumu ve İş Deneyimi

2003-2007 Kalaba Anadolu Lisesi

2007-2012 Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (BSc)

2012- Hacettepe Üniversitesi
Farmakoloji Programı Doktora (PhD)

2014- Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı ÖYP Araştırma Görevlisi

Üyesi olduğu bilimsel ve sosyal kuruluşlar

2012- Türk Farmakoloji Derneği

2014- Society for Neuroscience (SFN)

2014- Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinirbilimleri Derneği

2014- Federation of European Neuroscience Societies

Bilimsel ilgi alanları Santral Sinir Sistemi hastalıkları, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Davranış Deneyleri,

Araştırma deneyimleri

In vivo:

- Stereotaksik enjeksiyon
- Bilişsel davranış deneyleri
- Motor davranış deneyleri

In vitro:

- İmmünohistokimya
- İmmünofloresan
- İmmünoiblottama

Projeler:

2014-2017 **Proje adı:** Bazal ganglia ve hipokampüse unilateral AAV-aracılı alfa-sinükleinin enjeksiyonu ile oluşturulan Parkinson Hastalığı modelinin davranışsal ve patolojik olarak değerlendirilmesi

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Araştırmacı

Yürütücü: Yard. Doç Dr. Banu Cahide TEL

2015-2018 **Proje adı:** Bazal Gangliyonlarda Ve Limbik Kortekste Viral Vektör Aracılı Alfa Sinüklein Aşırı İfadesine Dayalı Parkinson Hastalığı Modelinde Motor Ve Davranışsal Değişliklerin Patoloji İle Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi Ve Bu Modelde Rapamisin Uygulamasının Etkisinin Araştırılması

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Araştırmacı

Yürütücü: Yard. Doç Dr. Banu Cahide TEL

2014-2017

Proje adı: Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Beyne Hedeflendirilmesi

Destek: TÜBİTAK, 1001 Projesi, Araştırmacı

Yürütücü: Prof. Dr. Gülberk UÇAR

Bildiriler

- **Çınar E.**, Kazkayası İ, Telli G, Mutluay SU, Yalçın-Çakmaklı G, Saka E, Ulusoy A, Elibol B, Tel BC. Adeno-İlişkili Viral Vektör Aracılı Parkinson Hastalığı Modeli: Alfa-Sinüklein Aşırı İfadesinin Neden Olduğu Motor Değişiklikler ve Histopatolojik Karşılıkları 22. TFD Ulusal Kongresi 4-7 Kasım 2013, Antalya
- Yalçın-Çakmaklı G., **Çınar E.**, Mutluay SU., Kazkayası İ., Telli G., Saka E., Ulusoy B., Elibol B., Tel BC Hipokampüste AAV-aracılı alfa-sinüklein aşırı ifadesi ile PH modelinde kognitif değişiklikler oluşturulabilir mi?. 12. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28-31 Mayıs 2014, İstanbul
- **Çınar E.**, Çakmaklı-Yalçın G., Mutluay S., Telli G., Kazkayası İ., Ulusoy B., Saka E., Elibol B., Tel BC. Adeno İlişkili Viral Vektör Aracılı Parkinson Hastalığı Modelinde Dentat Girusta Alfa- Sinüklein Aşırı İfadesine Bağlı Bilişsel Fonksiyon Değişikliklerinin Davranışsal ve Histopatolojik Değerlendirmesi 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 7-10 Eylül 2015, Ankara
- Yalçın Çakmaklı, G., **Çınar, E.**, Mutluay, S.U., Telli, G., Kazkayası, I., Tel , B.C., Ulusoy, A., Saka Topçuoğlu, E., Elibol, B., (2015). Does higher alpha-synuclein aggregate density lead to more severe dopaminergic cell loss in the AAV-mediated over-expression model of PD. Neurizons 2015 – Notes of an Orchestrated Brain 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.
- Tel BC, **Çınar E**, Mutluay SU, Baysal İ, Yalovac A, Gultekinoglu M, Ulubayram K, Yabanoglu-Ciftci S, Ucar G. “The Behavioral Changes Of

Donepezil-Loaded Plga-B-Peg Nanoparticles On Beta-Amyloid 25–35 Injected Rat Model Of Alzheimer’s Disease” 9th World Congress International Brain Research Organization, Temmuz 7–11, 2015, Rio de Janeiro, Brazilya

- Tel BC., Çakmaklı-Yalçın G., **Çınar E.**, Mutluay S., Telli G., Saka E., Ulusoy A., Elibol B. Cognitive dysfunction due to over expression of alpha-synuclein hippocampus by using viral vector based approach: Modeling cognitive decline in PD.The MDS 19th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 14-18 Jun 2015, San Diego, CA/USA
- Tel B C, Mutluay SU, **Çınar E.**, Yalçın-Çakmaklı G, Saka E, Ulusoy A, Elibol B. “Motor and cognitive changes in Parkinson's disease model induced by unilateral injection of AAV-mediated alpha-synuclein overexpression” 14th National Neuroscience Congress, 26-29 Mayıs, 2016, Ankara
- Tel B C, Mutluay S U, **Çınar E.**, Yalçın-Çakmaklı G, Saka E, Ulusoy A, Elibol B. Unilateral AAV-mediated a-syn overexpression model of Parkinson Disease’s to study motor and cognitive dysfunction (7th European Congress of Pharmacology-EPHAR-26-30 Haziran 2016, İstanbul
- **Çınar E.**, Yalçın-Çakmaklı G, Ulusoy A, Saka E, Tel BC, Elibol B. Hippocampal AAV-mediated alpha-synuclein overexpression leads to synaptic and neuronal loss with minor cognitive deficits as a Parkinson’s model in rats 10th FENS forum, 2-6 Temmuz 2016, Kopenhag, Danimarka
- **Çınar E.**, Yalçın-Çakmaklı G, Mutluay SU, Saka E, Ulusoy A, Tel BC, Elibol B. Hippocampal Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Alpha-Synuclein Overexpression: A Promising Model For Recapitulating Cognitive Involvement In Parkinson’s Disease 46th annual meeting of the society for neuroscience -12-16 November 2016, San Diego, USA
- **Çınar E.**, Yalçın-Çakmaklı G, Tel BC, Elibol B. Motor Dysfunction in AVV-mediated Alpha-Synuclein Overexpression Model of Parkinsonism in Relation to Synaptic Organization in Striatum (The 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders,AD/PD™ 2017” Kongresi, 29 Mart-02 Nisan 2017, Viyana, Avusturya