

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞI HÜCRESEL MODELİNDE İNFLAMASYONUN VE  
İNFLAMASYON SONRASI UYGULANAN N-ASETİLSİSTEİNİN H4  
HÜCRELERİNDEKİ LAG3 VE TLR2 RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Zeynep Bengisu KAYA**

**Histoloji - Embriyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2021**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞI HÜCRESEL MODELİNDE İNFLAMASYONUN VE  
İNFLAMASYON SONRASI UYGULANAN N-ASETİLSİSTEİNİN H4  
HÜCRELERİNDEKİ LAG3 VE TLR2 RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Zeynep Bengisu KAYA**

**Histoloji - Embriyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Pergin ATİLLA**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Pamela J. MCLEAN**

**ANKARA**

**2021**

**ONAY SAYFASI**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARKİNSON HASTALIĞI HÜCRESEL MODELİNDE İNFLAMASYONUN VE**  
**İNFLAMASYON SONRASI UYGULANAN N-ASETİLSİSTEİNİN H4 HÜCRELERİNDEKİ**  
**LAG3 VE TLR2 RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Zeynep Bengisu KAYA**

**Danışman: Prof. Dr. Pergin ATILLA**

**İkinci Danışman: Prof. Dr. Pamela J. MCLEAN**

Bu tez çalışması 22.01.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Histoloji ve Embriyoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Fevziye Figen Kaymaz*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Belgin Can*  
*Ankara Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Ayşe Nur Çakar*  
*TOBB Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** *Doç. Dr. Naciye Dilara Zeybek*  
*Hacettepe Üniversitesi*

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

01 Ocak 2021

*Prof. Dr. Diclehan ORHAN*

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.<sup>(1)</sup>
- ✓ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir.<sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.<sup>(3)</sup>

28.01.2020

Zeynep Bengisu Kaya

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

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir\*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

## ETİK BEYAN

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

*Dr. Zeynep Bengisu KAYA*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez sürecimde bilgi, birikim ve deneyimleri ile bana katkı sağlayan, her an yanımda olduğunu hissettiren çok değerli tez danışmanım Prof.Dr. Pergin Atilla'ya,

Çalışmamıza değerli görüşleri ile katkı sağlayan, sadece araştırmacı kimliğiyle değil, insani yönü ve düşünce tarzı ile de bana örnek olan Prof. Dr. Pamela J. McLean'e ve çalışma ekibine,

Benden desteklerini esirgemeyen Hacettepe Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, ve laboratuvarında bana yardımcı olan başta Bio. Tülay Gülizar Dağaçana'a ve diğer teknik ve idari ekibe,

Hacettepe Üniversitesinde geçirdiğim süre boyunca yanımda olan ve birlikte çalıştığım başta Dr. İlker L. Erdem ve Dr. Serkan Türeli olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Tezimle ilgili en zorlandığım noktalarda gece gündüz demeden her an bana yardımcı olan, ihtiyacım olduğunda desteğini esirgemeyip her zaman özverili olan arkadaşım Özkan İş'e,

Araştırma görevliliği sürecimin en büyük kazanımlarından olan, hem iyi hem kötü günlerde samimiyetle yanımda olan arkadaşlarım Dr. Işık Ünal ve Dr. Naz Güleray Lafcı'ya

Tıp fakültesinden beri her zaman yanımda olan ve bundan sonra da olacaklarını bildiğim kıymetli dostlarım Dr. A. Uğurum Yücemen ve Dr. Arda Erdut'a,

Lise yıllarımdan beri bir çok anı paylaştığım ve paylaşacağım, desteğini ve esprilerini esirgemediğim yüzümü hep güldüren, çok kıymetli dostum Emre Akyürek'e,

Burada adını yazamadığım, bu süreçte yanımda olan ve iyi dileklerini esirgemeyen herkese,

Son olarak; bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman sevgiyle beni kucaklayan, hayatın her anında yanımda olan ve arkamda duran, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, aileme ama en çok da sevgili annem, babam ve canım kardeşim Sinan'a,

En içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Kaya, Z.B., Parkinson Hastalığı Hücresel Modelinde İnflamasyonun ve İnflamasyon Sonrası Uygulanan N-Asetilsisteinin H4 Hücrelerindeki LAG3 ve TLR2 Reseptörleri Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji - Embriyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021.** Parkinson hastalığı, bir çok sistemin etkilendiği nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın prevalansı genel popülasyonda binde 2-3, 55 yaş üzerinde ise %1 oranındadır. Parkinson hastalığındaki patolojik değişiklikler substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların kaybı ve hücrelerin içinde Lewy cisimciği olarak adlandırılan, ağırlıklı olarak alfa-sinüklein ( $\alpha$ -syn) ve ubikülinlenmiş proteinler içeren küresel inklüzyon cisimciklerinin saptanması şeklindedir.  $\alpha$ -syn proteininin nöronlarda hatalı katlanmalar sonucu hücre içinde çeşitli yerlerde birikebildiği gibi hücre dışı alana da geçebildiği bilinmektedir. Hücre dışı alana geçen  $\alpha$ -syn proteini özellikle nöronlar ve glia hücreleri tarafından hücre içine endositoz yolu ile alınır. Endositozda TLR2 ve LAG3 reseptörlerinin rolünün açıklanabilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.  $\alpha$ -syn proteininin endositozu, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 başta olmak üzere çeşitli inflamatuvar sitokinlerin üretimine ve salınmasına sebep olmanın yanı sıra; hücre içinde mitokondriyal yolak üzerinden apoptoz ve mitofajiyi tetikleyerek hücre ölümünü yol açmaktadır. N-Asetilsistein (NAC), anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve anti-kanserojen etkilere sahip bir ilaçtır. Bu tez çalışmasında, inflamasyonun tetiklenmesi sonrası, LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin ekspresyonunda artış görülebileceği ve inflamasyon NAC ile kontrol altına alındığında, inflamasyonun sebep olduğu hasarın azalması ve hücre canlılığında artış görülebileceği hipotezlerinde bulunuldu. Bu varsayımları test etmek amacı ile; *in vitro* koşullarda deney ve kontrol grupları içeren bir çalışma planlandı.  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden insan nörogloma (H4) hücre hattı kullanılarak inflamatuvar bir Parkinson hastalığı modeli oluşturuldu. İnflamasyon, TNF- $\alpha$  ile tetiklendi ve NAC uygulanarak inflamasyon kontrol altına alındı. Çalışmada  $\alpha$ -syn protein ekspresyonu ve transkripsiyonu, Western Blot ve q-PCR metotları ile ölçüldü. Hücre canlılığı Toxilight testi ile, apoptoz Western Blot tekniği ile apoptoz belirteçlerinin ölçülmesi ve TUNEL immunofloresan işaretleme metodu ile değerlendirildi. TLR2 ve LAG3 reseptörlerinin transkripsiyonları q-PCR metodu ile ölçüldü. Reseptörlerin protein düzeyleri immunofloresan işaretleme ve Western Blot tekniği ile saptandı. Elde edilen veriler ışığında, NAC tedavisinin, TLR2 ve LAG3 reseptörlerinin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu değiştirerek inflamasyon aracılı toksisiteyi ve hücre ölümünü azalttığı belirlendi. Bu çalışma ile, NAC'nin Parkinson Hastalığında ortaya çıkan nöroinflamasyon süreci için umut vaat eden bir aday olduğu düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** Parkinson Hastalığı, İnflamasyon, Alfa-sinüklein ( $\alpha$ -syn), N-Asetilsistein (NAC), Apoptoz

**Destekleyen Kuruluş:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) (Hızlı Destek Projesi, Proje No: THD-2019-18110)



## ABSTRACT

**Kaya, Z.B., The Effect of Inflammation and Post-Inflammatory Administration of N-Acetylcysteine on LAG3 and TLR2 Receptors on H4 Cells in the Cellular (*In Vitro*) Model of Parkinson's Disease, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Histology - Embryology Program Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2021.** Parkinson's disease is a complex, multifactorial neurodegenerative disease that has prevalence of 1% over the age of 55. Pathological hallmarks of Parkinson's disease include the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the accumulation of inclusion bodies that contain predominantly alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn) and ubiquitinated proteins, called Lewy bodies. Although the formation of  $\alpha$ -syn occurs intracellular, it can also be translocated to extracellular space and then taken into the other cells via receptor mediated endocytosis. TLR2 is a well known receptor which detects extracellular  $\alpha$ -syn and modulates the uptake of the protein by other cells. Uptaken  $\alpha$ -syn is known to trigger expression and secretion of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 and IL-6 and induce neuroinflammation, apoptosis and mitophagy that results in cellular death. N-Acetylcysteine (NAC), an anti-inflammatory and anti-carcinogenic drug, has gained some focus to circumvent the detrimental effects of neuroinflammatory response. In this thesis, we hypothesized that, NAC treatment will result in anti-inflammatory response that restrict *in vitro* apoptotic and neuroinflammatory response by modulating transcription and expression of TLR2 and LAG3 receptors. In order to test this hypothesis, WT  $\alpha$ -syn overexpressing human neuroglioma (H4) cell line was treated with TNF- $\alpha$  to induce inflammation and NAC, as anti-inflammatory drug to recover from deleterious effects of TNF- $\alpha$  induced inflammation and apoptosis.  $\alpha$ -syn protein transcription and expression were validated by q-PCR and Western Blot, respectively. Cell viability was measured by Toxilight assay, and apoptosis was evaluated by Western Blot and TUNEL methods. We observed that NAC treatment diminishes inflammation mediated toxicity and cell death by altering transcription and expression of TLR2 and LAG3 receptors. Thereby, this study demonstrates NAC to be a promising candidate to recover from neuroinflammation that occurs in Parkinson's Disease.

**Key Words:** Parkinson's Disease, Inflammation, Alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn), N-Acetylcysteine (NAC), Apoptosis

**Supported by** Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project ID: THD-2019-18110)

## İÇİNDEKİLER

|  |          |
|--|----------|
| ONAY SAYFASI   | iii      |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI             | iv       |
| ETİK BEYAN   | iv       |
| TEŞEKKÜR   | vi       |
| ÖZET   | vii      |
| ABSTRACT   | viii     |
| İÇİNDEKİLER  | ix       |
| SİMGELER VE KISALTMALAR                                | xii      |
| ŞEKİLLER   | xv       |
| TABLolar   | xvii     |
| <b>1. GİRİŞ</b>  | <b>1</b> |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                               | <b>4</b> |
| 2.1. Sinir Sistemi Histolojisi                         | 4        |
| 2.1.1. Sinir Dokusunun Bileşenleri                     | 4        |
| 2.1.2. Merkezi Sinir Sistemi Histolojisi               | 6        |
| 2.2. Parkinson Hastalığı                               | 9        |
| 2.2.1. Lewy Cisimcikleri                               | 14       |
| 2.2.2. Sinükleinler ve $\alpha$ -syn                   | 16       |
| 2.2.3. Alfa sinüklein ( $\alpha$ -syn)                 | 17       |
| 2.3. Nöroinflamasyon ve Parkinson Hastalığındaki Rolü  | 25       |
| 2.3.1. Mikroglia Hücreleri ve Nöroinflamasyon          | 26       |
| 2.3.2. Astrositler ve Nöroinflamasyon                  | 27       |
| 2.3.3. T lenfositler ve Nöroinflamasyon                | 28       |
| 2.3.4. Nöroinflamasyonun Olumlu ve Olumsuz Yönleri     | 29       |
| 2.3.5. Nöroinflamasyonun Parkinson Hastalığındaki Rolü | 32       |
| 2.4. N-Asetilsistein ve Parkinson Hastalığı            | 33       |
| 2.4.1. Antioksidan ve Anti-inflamatuar Etkiler         | 34       |
| 2.4.2. Nörotransmisyon Üzerine Etkileri                | 35       |
| 2.4.3. Parkinson Hastalığı ile İlişkisi                | 36       |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>  | <b>40</b> |
| 3.1. İnsan H4 Nörogloma Hücre Hattı Kültürü  | 41        |
| 3.2. İnsan H4 Nörogloma Hücre Hattında İmmunositokimya Uygulaması  | 44        |
| 3.3. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Reseptör İfadelenmelerinin, Apoptoz Belirteçlerinin Düzeyinin ve İnflamasyonun Western Blot (WB) ile Değerlendirilmesi | 46        |
| 3.4. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri İle Oluşturulan Deney Gruplarında Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi   | 49        |
| 3.5. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri İle Oluşturulan Deney Gruplarında TUNEL uygulanması  | 50        |
| 3.6. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Reseptör Ekspresyonlarının q-PCR ile Değerlendirilmesi   | 52        |
| 3.6.1. RNA İzolasyonu  | 53        |
| 3.7. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi  | 54        |
| <b>4. BULGULAR</b>   | <b>55</b> |
| 4.1. İnsan H4 Nörogloma Hücre Kültürü  | 55        |
| 4.2. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinin İmmunositokimya ile İncelemesi  | 57        |
| 4.3. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Ekspresyonlarının, Apoptoz Belirteçlerinin Düzeyinin ve İnflamasyonun Western Blot (WB) ile Değerlendirilmesi          | 66        |
| 4.4. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri İle Oluşturulan Deney Gruplarında Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi   | 75        |
| 4.5. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri İle Oluşturulan Deney Gruplarında TUNEL Uygulaması ile Apoptozun Değerlendirilmesi   | 78        |
| 4.6. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Reseptör Ekspresyonlarının q-PCR ile Değerlendirilmesi   | 80        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>   | <b>84</b> |
| 5.1. Parkinson Hastalığı   | 84        |
| 5.1.1. Parkinson Hastalığı Patofizyolojisi   | 84        |
| 5.1.2. Parkinson Hastalığının Araştırılma Yöntemleri   | 84        |

|  |     |
|--|-----|
| 5.1.3. Parkinson Hastalığı Çalışmalarında Kullanılan <i>In vitro</i> Modeller          | 85  |
| 5.2. Transgenik Hücrelerde İnflamasyonun Tetiklenmesi ve Etkilerinin Değerlendirilmesi | 89  |
| 5.3. N-Asetilsisteinin Anti-inflamatuar Olarak Kullanılması                            | 91  |
| 5.4. N-Asetilsisteinin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi                   | 92  |
| 5.5. N-Asetilsistein Tarafından Etkilenen Yolakların İncelenmesi                       | 94  |
| 5.6. Parkinson Hastalığında Kullanılan Tedavi Yöntemleri                               | 98  |
| 5.6.1. Parkinson Hastalığında Kullanılan Medikal Tedaviler                             | 99  |
| 5.6.2. Parkinson Hastalığında Yeni Jenerasyon Tedavi Yöntemleri                        | 99  |
| 5.6.3. NAC' nin Parkinson Hastalığında Olası Terapötik Kullanımı                       | 100 |
| <b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>   | 102 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>  | 105 |
| <b>8. EKLER</b>  |     |
| EK 1. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul İzni                           |     |
| EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı   |     |
| EK 3. Dijital Makbuz   |     |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>   |     |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>aa</b>                     | : Aminoasit  |
| <b>AH</b>                     | : Alzheimer Hastalığı  |
| <b>AK</b>                     | : Adenilat kinaz   |
| <b>ALS</b>                    | : Amyotrofik Lateral Skleroz   |
| <b>AMPA</b>                   | : 2-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonat   |
| <b>BCA</b>                    | : Bisinkoninik asit ( <i>Bicinchoninic acid</i> )  |
| <b>BDNF</b>                   | : Beyin-türevli nörotrofik faktör ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )                         |
| <b>BSA</b>                    | : Sığır serum albümini ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )   |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>        | : Kalsiyum   |
| <b>CD</b>                     | : <i>Cluster of Differentiation</i>  |
| <b>cDNA</b>                   | : Tamamlayıcı DNA ( <i>complementary DNA</i> )   |
| <b>cm</b>                     | : santimetre   |
| <b>COMT</b>                   | : Katekol-O-metiltransferaz ( <i>Catechol-O-methyltransferase</i> )                                    |
| <b>Cu<sup>2+</sup></b>        | : Bakır  |
| <b>DAPI</b>                   | : <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>   |
| <b>DNA</b>                    | : Deoksiribo Nükleik asit  |
| <b>dUTP</b>                   | : <i>Deoxyuridine triphosphate</i>   |
| <b>EDTA</b>                   | : <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>   |
| <b>ETZ</b>                    | : Elektron Transport Zinciri   |
| <b>FBS</b>                    | : <i>Fetal Bovine Serum</i>  |
| <b>FDA</b>                    | : <i>Food and Drug Administration</i>  |
| <b>FITC</b>                   | : Floresan İzotiyosiyanat ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )  |
| <b>GABA</b>                   | : Gama aminobütirik asit   |
| <b>GSH</b>                    | : Glutatyon  |
| <b>HPRT1</b>                  | : Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz ( <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> ) |
| <b>HRP</b>                    | : <i>Horseradish Peroxidase</i> enzimi   |
| <b>IL</b>                     | : İnterlökin ( <i>Interleukin</i> )  |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | : İnterlökin-1 beta ( <i>Interleukin 1 beta</i> )  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>iPSC</b>          | : İndüklenmiş pluripotent kök hücre ( <i>Induced pluripotent stem cell</i> )               |
| <b>iv</b>            | : İntravenöz   |
| <b>K<sup>+</sup></b> | : Potasyum   |
| <b>KBB</b>           | : Kan-beyin bariyeri   |
| <b>LAG3</b>          | : <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>  |
| <b>LPS</b>           | : Lipopolisakkarit ( <i>Lipopolysaccharide</i> )   |
| <b>MAO-B</b>         | : Monoamin Oksidaz B ( <i>Monoamine oxidase B</i> )  |
| <b>ml</b>            | : Mililitre  |
| <b>mM</b>            | : Milimolar  |
| <b>MSA</b>           | : Multiple Sistem Atrofisi   |
| <b>MSS</b>           | : Merkezi sinir sistemi  |
| <b>NAC</b>           | : N-asetilsistein  |
| <b>NaCl</b>          | : Sodyum Klorür  |
| <b>NF-κB</b>         | : <i>Nuclear Factor kappa B</i>  |
| <b>ng</b>            | : Nano gram  |
| <b>NGS</b>           | : Normal keçi serumu ( <i>Normal Goat Serum</i> )  |
| <b>NK</b>            | : <i>Natural killer</i>  |
| <b>NMDA</b>          | : N-metil-d-aspartat   |
| <b>NSAİİ</b>         | : Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç  |
| <b>OKB</b>           | : Obsesif Kompulsif Bozukluk   |
| <b>PARP</b>          | : <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>  |
| <b>PBS</b>           | : <i>Phosphate Buffered Saline</i>   |
| <b>PFA</b>           | : Parafolmaldehit  |
| <b>PH</b>            | : Parkinson Hastalığı  |
| <b>PI</b>            | : Propidyum İyodür ( <i>Propidium Iodide</i> )   |
| <b>PKC</b>           | : Protein Kinaz C  |
| <b>PSS</b>           | : Periferik sinir sistemi  |
| <b>q-PCR</b>         | : Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ( <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> ) |
| <b>RA</b>            | : Retinoik asit  |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>RNA</b>                      | : Ribo Nükleik asit   |
| <b>RNS</b>                      | : Reaktif Azot Türleri ( <i>Reactive nitrogen species</i> )                 |
| <b>ROS</b>                      | : Reaktif Oksijen Türevleri ( <i>Reactive oxygen species</i> )              |
| <b>Rpm</b>                      | : <i>revolutions per minute</i>   |
| <b>RQ</b>                       | : <i>Relative quantification</i>  |
| <b>SN Pc</b>                    | : <i>Substantia Nigra Pars compacta</i>                                     |
| <b>SNCA</b>                     | : <i>Synuclein Alpha</i> (alfa sinüklein proteinini kodlayan gen)           |
| <b>TBS</b>                      | : Tris tamponlu salin ( <i>Tris-Buffered Saline</i> )                       |
| <b>TBS-T</b>                    | : %0,1 oranında Tween-20 içeren TBS solüsyonu                               |
| <b>TdT</b>                      | : Terminal deoksinükleotidil Transferaz                                     |
| <b>TEM</b>                      | : Geçirimli Elektron Mikroskobu ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> ) |
| <b>Tet</b>                      | : Tetrasiklin   |
| <b>TLR2</b>                     | : Toll Benzeri Reseptör 2 ( <i>Toll Like Receptor 2</i> )                   |
| <b>TNF- <math>\alpha</math></b> | : Tümör Nekroz Faktör Alfa ( <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i> )          |
| <b>TUNEL</b>                    | : <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>       |
| <b>UPS</b>                      | : Ubikutin Proteazom Sistemi  |
| <b>WB</b>                       | : <i>Western Blot</i>   |
| <b>WT</b>                       | : <i>Wild type</i>  |
| <b><math>\alpha</math>-syn</b>  | : alfa-sinüklein ( <i>alpha synuclein</i> )                                 |
| <b><math>\mu</math>g</b>        | : Mikrogram   |
| <b><math>\mu</math>l</b>        | : Mikrolitre  |
| <b><math>\mu</math>m</b>        | : Mikrometre  |

## ŞEKİLLER

| <b>Şekil</b>  | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| <b>2.1.</b> Merkezi sinir sisteminde yer alan çeşitli nöronlar ve glia hücrelerinin sembolize edilmiş hali  | 6            |
| <b>2.2.</b> Substantia nigra pars compacta (SN Pc) bölgesinin dopaminerjik nöronlar açısından normal bireyler ile Parkinson hastalığına sahip bireylerdeki farkını gösteren şema  | 9            |
| <b>2.3.</b> Nöroinflamasyonda rol oynayan ana hücreler ve nöroinflamasyon süreci  | 29           |
| <b>3.1.</b> Deney düzeneği ve zaman çizelgesi   | 44           |
| <b>3.2.</b> İmmunositokimya uygulaması deney düzeneği.  | 46           |
| <b>3.3.</b> ToxiLight deney düzeneği ve zaman çizelgesi   | 50           |
| <b>4.1.</b> H4 hücrelerinin monolayer kültür görüntüleri.   | 56           |
| <b>4.2.</b> H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenerek oluşturulmuş, $\alpha$ -syn proteinini eksprese etmeyen deney grupları.  | 56           |
| <b>4.3.</b> H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenmeden oluşturulmuş, $\alpha$ -syn proteinini eksprese eden deney grupları.  | 57           |
| <b>4.4.</b> H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenerek oluşturulmuş, $\alpha$ -syn proteinini eksprese etmeyen deney grupları.  | 59           |
| <b>4.5.</b> H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenmeden oluşturulmuş, $\alpha$ -syn proteinini eksprese eden deney grupları.  | 60           |
| <b>4.6.</b> (A) Tüm deney gruplarında (G1-G8) sadece LAG3 reseptörü için yapılan immunofloresan işaretlenmeyi (yeşil) gösteren mikrograflar görülmekte, x40. (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda LAG3 reseptörü için yapılan floresan yoğunluklarının analizi sonucunda elde edilen sütun grafikleri ve istatistik analizleri görülmektedir.    | 61           |
| <b>4.7.</b> H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenerek oluşturulmuş, $\alpha$ -syn proteinini eksprese etmeyen deney grupları.  | 63           |
| <b>4.8.</b> H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenmeden oluşturulmuş, $\alpha$ -syn proteinini eksprese eden deney grupları.  | 64           |
| <b>4.9.</b> (A) Tüm deney gruplarında (G1-G8) sadece TLR2 reseptörü için yapılan immunofloresan işaretlenmeyi (yeşil) gösteren mikrograflar görülmektedir, x40. (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda TLR2 reseptörü için yapılan floresan yoğunluklarının analizi sonucunda elde edilen sütun grafikleri ve istatistik analizleri görülmektedir. | 65           |



|              |  |     |
|--------------|--|-----|
| <b>4.10.</b> | $\alpha$ -syn protein ekspresyonuna ait Western blot bulgusu.  | 67  |
| <b>4.11.</b> | IL-1 $\beta$ inflamatuvar belirtecinin ekspresyonuna ait Western blot bulgusu.   | 69  |
| <b>4.12.</b> | Apoptoz belirteci olarak incelenen aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranlarına ait Western blot bulgusu. Kaspaz 9, Aktif kaspaz 9 ve endojen protein olan Vinkulin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi | 71  |
| <b>4.13.</b> | Apoptoz belirteci olarak incelenen kesilmiş PARP/PARP oranlarına ait Western blot bulgusu. PARP, kesilmiş PARP ve endojen protein olan Aktin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda kesilmiş PARP/PARP oranlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi                   | 72  |
| <b>4.14.</b> | LAG3 reseptörünün ekspresyonuna ait Western blot bulgusu.  | 73  |
| <b>4.15.</b> | TLR2 reseptörünün ekspresyonuna ait Western blot bulgusu.  | 74  |
| <b>4.16.</b> | Tüm deney gruplar için hücre ölümü değerlerini yansıtan Toxilight testinin AK lüminesans değerlerinin ölçümünü gösteren çizgi grafiği.   | 75  |
| <b>4.17.</b> | Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı hücre ölümü değerlerini yansıtan Toxilight testinin AK lüminesans değerlerinin ölçümünü ile elde edilen sütun grafikleri ve istatistik değerlendirmeleri.   | 77  |
| <b>4.18.</b> | Pozitif TUNEL immunofloresan işaretlenmesi mikrografları.  | 78  |
| <b>4.19.</b> | Tablo 2'de deney grupları için verilen apoptotik indeksleri yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı görülmektedir.   | 80  |
| <b>4.20.</b> | Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için $\alpha$ -syn proteininin transkripsiyonunu yansıtan q-PCR analizlerine ait sütun grafikleri görülmektedir.   | 81  |
| <b>4.21.</b> | Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için LAG3 reseptörünün transkripsiyonunu yansıtan q-PCR analizlerine ait sütun grafikleri görülmektedir.   | 82  |
| <b>4.22.</b> | Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için TLR2 reseptörünün transkripsiyonunu yansıtan q-PCR analizlerine ait sütun grafikleri görülmektedir.   | 83  |
| <b>6.1.</b>  | Tez çalışmasında elde edilen sonuçları özetleyen şematik çizim   | 103 |

**TABLolar**

| <b>Tablo</b> |  | <b>Sayfa</b> |
|--------------|--|--------------|
| <b>2.1.</b>  | Parkinson Hastalığındaki non-motor semptomlar  | 12           |
| <b>2.2.</b>  | Parkinson Hastalığı için Braak evrelemesi  | 13           |
| <b>2.3.</b>  | Parkinson Hastalığı için risk faktörleri ve koruyucu faktörler   | 13           |
| <b>2.4.</b>  | Nöroinflamasyonun olumlu ve olumsuz sonuçları  | 30           |
| <b>3.1.</b>  | Planlanan çalışmanın deney planı. Hücre hatlarına uygulanan ilaçlar ve süreleri gösterilmektedir.  | 41           |
| <b>4.1.</b>  | Western Blot uygulanarak değerlendirilen proteinler ve bant büyüklükleri   | 66           |
| <b>4.2.</b>  | TUNEL işaretleme yapılan deney gruplarında 20 alanda yapılan hücre sayımı tablosu. Tabloda her grup için yapılan sayım sonucunda elde edilen apoptotik hücre sayıları, toplam hücre sayıları ve hesaplanan apoptotik indeks değerleri görülmektedir. | 79           |

## 1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı, vücutta bir çok sistemin etkilendiği nörodejeneratif bir hastalıktır. Parkinson hastalığı yaklaşık %90 oranında sporadik olarak görülürken, yaklaşık %10 oranında ailesel geçiş göstermektedir (1). Parkinson hastalığında karakteristik olan başlıca patolojik değişiklik substantia nigra bölgesinin bir bölümü olan pars compacta'daki dopaminerjik nöronların sayıca azalmasıdır (2). Hücre içinde ise Lewy cisimciği olarak adlandırılan, ağırlıklı olarak alfa-sinüklein ( $\alpha$ -syn) ve ubikutinlenmiş proteinler içeren eozinofilik küresel inklüzyon cisimcikleri saptanmaktadır (3). Parkinson hastalığında etkilenen sisteme göre klinik belirtiler ortaya çıkmakla birlikte, hastalar en sık bradikinezi, rijidite, spontan tremor, postural instabilite ve gastrointestinal sistem şikayetleriyle kliniğe başvurmaktadır (4).

Parkinson hastalığının altında yatan hüresel mekanizmalar şu ana kadar sınırlı çalışılmış olmakla birlikte, en çok üstünde durulanlar mitokondriyal bozukluk, ubikutin proteazom sistemi disfonksiyonu, kalsiyum hemostazında değişim ve oksidatif streştir (5). Hastalığın altında yatan mekanizmayı açıklayan tek bir yolak olmamasına rağmen hüresel patolojilerden sorumlu ana mekanizmanın  $\alpha$ -syn proteininin agregasyonu ve bunu takip eden mitokondriyal işlev kaybı olduğu düşünülmektedir. Bir diğer önemli mekanizma ise hücre içinde gerçekleşen patolojik değişiklikler ile ilişkili nöroinflamasyondur (6).

Parkinson hastalığında  $\alpha$ -syn proteini nöronlarda hatalı katlanmalar sonucu hücre içinde çeşitli yerlerde birikebildiği gibi bu proteinin hücre dışı alana geçtiği de bilinmektedir (7). Hücre içinde sitozolde veya hücre zarı yapısına; mitokondriyon, endoplazma retikulumu ve çekirdeğe bağlı halde bulunabilir (7, 8). Hücre dışı alana geçen  $\alpha$ -syn proteini özellikle nöronlar, mikroglia hücreleri, astrositler ve oligodendrositler tarafından endositoz ile alınabilmektedir (9). Endositozda özellikle TLR2 (10) ve LAG3 (11) reseptörlerinin rol aldığı gösterilmiştir. Mikroglia hücreleri tarafından hücre içine alınan  $\alpha$ -syn proteini inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonuna sebep olmaktadır. Nöroinflamasyonda özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 rol almaktadır.  $\alpha$ -syn proteini hem nöroinflamasyonu, hem de mitokondriyal yolak üzerinden apoptoz ve mitofajiyi tetikleyerek nöronların ölümüne yol açmaktadır (10).

N-asetilsistein (N-asetil sistein, N-asetil-L-sistein veya NAC olarak da bilinir) uzun zamandır çeşitli klinik uygulamalarda yeri olan, iyi tolere edilebilen, minör yan etkileri olan, güvenli, FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir ilaçtır (12). NAC, L-sistein aminoasidinin N-asetil türevidir. Oral uygulamayı takiben emilir ve kan beyin bariyerini geçebilir (13, 14). NAC santral sinir sisteminde anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkieri gösterilmiş bir ajandır (15). Literatürde NAC'nin nörodejeneratif hastalıklarda tedaviye faydası olabileceğiyle ilgili umut vaat eden çeşitli yayınlar bulunmaktadır.

**Bu tez çalışması kapsamında varsayımımız**, Parkinson hastalığı çalışması için kurulacak hücre kültürü modelinde inflamasyonun tetiklenmesi sonrası,  $\alpha$ -syn proteininin santral sistemindeki hücreler tarafından endositozunda rol alan LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin ekspresyonunda artış görülebilir. İnflamasyon, anti-inflamatuar bir ilaç olan NAC ile kontrol altına alındığında, inflamasyonun sebep olduğu hasarın azalması ve hücre canlılığında artış görülmesi beklenmektedir.

Bu çalışmanın amacı oluşturulan nöroinflammatuar ortamda, inflamasyonun ve anti-inflamatuar NAC ilacının hücre ölümü üzerine, TLR2 ve LAG3 reseptörlerinin ekspresyonları üzerine ve hücrelerdeki apoptoz oranları üzerine etkilerinin incelenmesidir.

Bu amaç doğrultusunda belirlenen hedefler aşağıda belirtilmiştir.

- i. Lentivirus transfeksiyonu ile WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 insan nörogloma hücreleri ile inflammatuar Parkinson hastalığı modeli oluşturulması, bu modeli oluşturmak için hücre besiyerine eklenecek olan TNF-  $\alpha$  ilacının optimal dozunun belirlenmesi
- ii. WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 insan nörogloma hücrelerinin inflamasyon varlığında ve anti-inflamatuar ilaç uygulaması sonrası hücre ölüm oranlarının değerlendirilmesi
- iii. WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 insan nörogloma hücreleri ile oluşturulan inflammatuar modelde apoptoza giden hücrelerin belirlenmesi ve apoptoz belirteçlerinin değişimlerinin değerlendirilmesi

- iv. WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 insan nörogloma hücrelerinde LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin varlığının gösterilmesi ve inflamatuvar koşullar altında ekspresyonlarındaki değişimin ölçülmesi

Bu tez kapsamında, yukarıdaki hedeflere ulaşılarak WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 hücreleri ile başarılı bir şekilde inflamatuvar bir Parkinson Hastalığı modeli oluşturulmuştur. Bu modelde NAC'nin hücreler üzerindeki anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri gösterilmiştir ve hastalığın progresyonunu yavaşlatmada hücre sağ kalımını arttırıcı etki göstererek rol alabileceği sonucuna ulaşılmıştır. İnflamasyonun ve NAC uygulamasının, nöroinflamasyon sürecinde rol oynayan TLR2 ve LAG3 reseptörler ekspresyonları üzerine etkileri incelenmiştir. LAG3 ve merkezi sinir sistemi (MSS) hücrelerindeki işlevleri üzerinde yeterli çalışma bulunmaması bu çalışmanın sonuçlarını orijinal kılmaktadır. Literatürde NAC uygulamasının LAG3 reseptörü ile ilişkisini inceleyen bir çalışmaya da rastlanmamıştır ve bu da çalışmamızı orijinal ve güncel kılan bir diğer noktadır. Nöroinflamasyonun ve Parkinson Hastalığı ile ilişkisinin altında yatan mekanizmaları aydınlatmak ve LAG3'nin nöroinflamasyondaki rolünü anlayabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sinir Sistemi Histolojisi

Sinir sistemi vücudun en karmaşık sistemlerinden birisidir. Ana görevleri; vücudun hem içinde hem de dışında oluşan mekanik ve kimyasal uyarıları almak, analiz etmek, değerlendirmek ve yanıt oluşturmaktır. Sinir sistemi, organların ve vücuttaki tüm sistemlerinin faaliyetlerini kontrol eder, hepsinin bir bütün olarak çalışmasını sağlar (16).

Anatomik olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak ikiye ayrılır. MSS; beyin, beyincik ve omurilikten meydana gelir. PSS ise; ganglionlar, periferik sinirler ve sinir sonlanmalarından oluşur. Fonksiyonel olarak ise sinir sistemi, somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olarak sınıflandırılabilir. Otonom sinir sistemi; sempatik, parasempatik ve enterik sinir sisteminden oluşur (17).

#### 2.1.1. Sinir Dokusunun Bileşenleri

Sinir sisteminin temel işlevsel birimi nöronlar olarak isimlendirilen hücrelerdir ve bunlar çeşitli şekillerde nöroglia olarak bilinen hücreler (destek hücreleri) tarafından desteklenir (16) (Şekil 1).

#### Nöronlar

Nöron veya sinir hücresi, sinir sisteminin işlevsel birimidir. Çekirdeğin ve perinükleer sitoplazmanın bulunduğu hücre gövdesi ve çeşitli uzunluklarda sitoplazmik uzantılardan (dendritler ve akson) oluşur. Buldukları yerlere ve işlevlerine göre uzunlukları, büyüklükleri ve şekilleri farklılık gösterebilir (Şekil 2.1). Sinir hücreleri, diğer hücrelerden uyarıları alır ve elektriksel uyarılar halinde sistemin diğer hücrelerine iletir. Bir nörondan diğerine bilgi aktarımı sağlayan nöronlar arasındaki özel iletişim alanına sinaps adı verilir (16, 17).

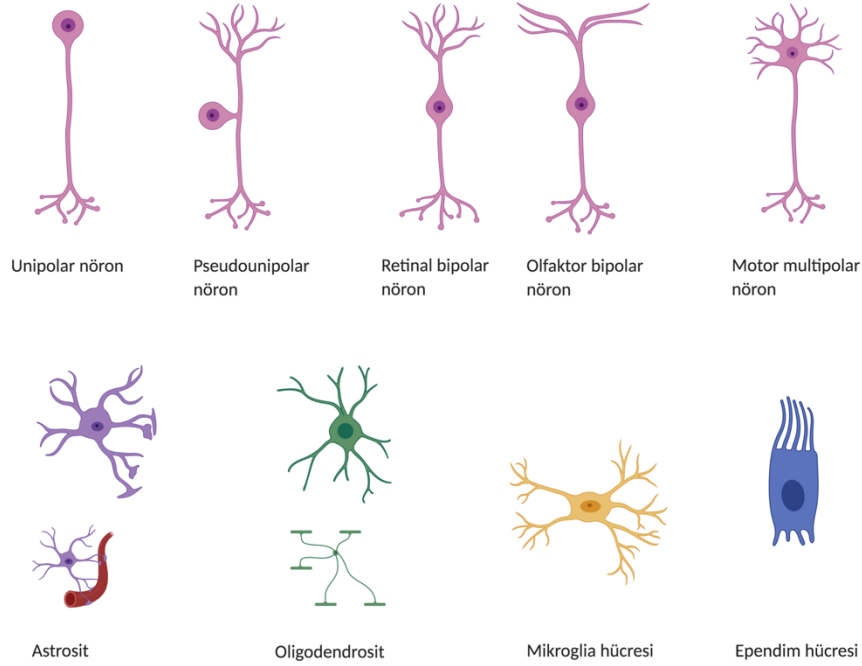
## Destek Hücreleri

Destek hücreleri, nöronlara yakın yerleşen ve iletken olmayan hücrelerdir. Bunlar nöroglial hücreler veya kısaca glia olarak adlandırılır. Sinir sisteminde nöronlardan yaklaşık 10 kat daha fazla nöroglia hücresi vardır. Nöronların bölünme yeteneği sınırlıyken, nöroglia hücreleri mitoz bölünme ile çoğalabilmektedir (16, 17).

MSS dört tip glia hücresi içerir. Bunlar; oligodendrositler, astrositler, mikroglia hücreleri ve ependim hücreleridir (Şekil 2.1). PSS'de, destekleyici hücreler ise; Schwann hücreleri, uydu hücreleri (satellit hücreler) ve enterik nöroglia hücreleridir. Morfolojik ve fonksiyonel olarak MSS ve PSS nöroglia hücreleri benzer özelliklere sahiptirler.

Nöroglia hücrelerinin genel fonksiyonları şu şekildedir (16, 17):

- Nöronlar için fiziksel destek (koruma)
- Nöron gövdeleri ve uzantılarının yalıtımı (miyelin yapımı, böylece iletimin hızlı olmasının desteklenmesi)
- Nöronal hasarın onarımı
- MSS'nin iç sıvı ortamının düzenlenmesi (beyin omurilik sıvısının üretimi ve emilimi)
- Nörotransmitterlerin sinaptik aralıklardan temizlenmesi
- Vasküler sistem ve nöronlar arasında metabolitlerin değişimi ve kan beyin bariyerinin (KBB) oluşumunda yapısal görev alma



**Şekil 2.1.** Merkezi sinir sisteminde yer alan çeşitli nöronlar ve glia hücrelerinin sembolize edilmiş hali (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

### 2.1.2. Merkezi Sinir Sistemi Histolojisi

Merkezi sinir sistemi, kraniyal boşlukta bulunan beyin ve ilişkili yapılar ile vertebral kanalda bulunan omurilikten oluşur. MSS, kafatası ve omurga tarafından korunur ve meninks adı verilen üç kat bağ dokusu ile çevrilidir. Beyin ve omurilik iki meningeal tabaka arasındaki boşluğu dolduran beyin omurilik sıvısı (BOS) ile sarıdır. MSS; beyin (*cerebrum*), beyincik (*cerebellum*) ve omurilik (*medulla spinalis*) ile bağlantıyı sağlayan beyin sapı kısımlarından oluşur (17).

MSS'deki organlar, beyaz madde ve gri maddeden meydana gelir. Beyaz madde çoğunlukla bazı miyelinsiz lifler ve nöroglia hücreleri ile birlikte miyelinli sinir liflerinden oluşur. Aksonları çevreleyen miyelin beyaz renkli olduğu için, beyaz madde olarak isimlendirilmiştir. Gri madde, nöron hücre gövdeleri, dendritler ve miyelinsiz akson kısımlarının yanı sıra nöroglial hücrelerden oluşur. Miyelinin yokluğu ve çok miktarda hücre çekirdeği içermesi bu bölgenin canlı dokularda gri renge



görünmesine neden olur. Aksonlar, dendritler ve nörogial hücre uzantıları nöropil adı verilen karışık bir nöral ağ oluştururlar (16).

Beyin sapı gri madde ve beyaz madde bölgelerine net olarak ayrılmamıştır. Bununla birlikte, bazı alanlarda kraniyal sinirlerin çekirdekleri (*nuclei*), beyaz madde alanları olarak görünür. PSS'de buna benzer yapılanmalar ise gangliyon olarak isimlendirilir. Gri madde beyin ve beyincikte korteksde bulunur ve daha derinde bazal ganglionları (bazal çekirdekler) oluşturur (17).

Omurilik, beyin sapından itibaren devamlılık göstermektedir. 31 segmente (8 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 sakral ve 1 koksigeal) ayrılır ve her segment bir çift spinal sinire bağlanır. Her bir spinal sinir, dorsal (posterior) veya ventral (anterior) kökten ilgili segmente bağlanır (17).

Beyin ve beyinciğin tersine, enine kesitte omurilik; santral kanal, santral kanalı çevreleyen kelebek şeklinde (veya H şeklinde) gri madde ve çevresinde (dış tarafta) beyaz maddeden oluşur. Beyaz madde sadece beyin ve omurilik arasında geçiş yapan miyelinli ve miyelinsiz aksonlardan ve bu aksonların arasında yerleşen glia hücrelerinden oluşur. Gri maddede ise glia hücreleri, nöron gövdeleri ve aksonlar yer alır (16, 17).

Çizgili kasları inerve eden efferent motor nöronların hücre gövdeleri, gri maddenin ventral (ön) boynuzunda bulunur. Efferent motor nöronlar rutin histolojik kesitlerde kolayca tanınabilen multipolar, büyük, bazofilik hücrelerdir (17, 18).

Duyu nöronlarının hücre gövdeleri ise, omuriliğin dorsal kök ganglionlarında bulunur. Duyu nöronları psödounipolardır ve afferenttir. Duyu nöronları, çevreden hücre gövdesine bilgi getiren bir uzantıya ve hücre gövdesinden omuriliğin gri maddesine bilgi taşıyan ayrı bir uzantıya sahip hücre gövdesinden oluşur (17, 18).

### **Kan-Beyin Bariyeri (KBB)**

Kan-beyin bariyeri, embriyoda erken dönemde glial astrositler ve kapiller endotel hücreleri arasındaki etkileşimle gelişmeye başlar (19). Bariyer, büyük ölçüde, kesintisiz kapiller endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile yapılan çalışmalarda bu sıkı bağlantılar detaylı bir

şekilde incelenmiştir; ek olarak, astrosit hücrelerinin ve bu hücrelerin son ayak şeklindeki uzantılarının endotel bazal laminası ile olan ilişkisi gösterilmiştir(20). Astrositlerin oluşturduğu bu yapıya perivasküler glia limitans adı verilir (17).

KBB, kan kaynaklı maddelerin MSS'ye serbest geçişini önleyen seçici bir bariyer olarak MSS'yi koruyan önemli bir yapıdır (20). KBB yapısına katılan astrositler, kapillerlerden nöronlara çeşitli metabolitlerin taşınmasına yardımcı olur, fazla potasyum ( $K^+$ ) ve nörotransmitterleri ortamdan uzaklaştırarak MSS ekstraselüler ortamının nörokimyasal dengesini korurlar (16).

Makromoleküller bu bariyeri geçemezken; oksijen, su ve karbondioksit gibi bazı maddeler kan-beyin bariyerini kolayca geçebilir. Yağda çözünen moleküller ve bazı ilaçlar gibi diğer küçük moleküller de KBB'yi geçebilir. Glikoz, amino asitler, bazı vitaminler ve nükleosidler spesifik taşıyıcı proteinler tarafından, çoğu kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla; iyonlar, taşıyıcı proteinler ile aktif taşıma yoluyla KBB boyunca taşınabilir. Aktif taşıma için enerji gereksinimi, endotel hücre sitoplazması içinde bulunan çok sayıdaki mitokondriyon ile sağlanır (16, 18).

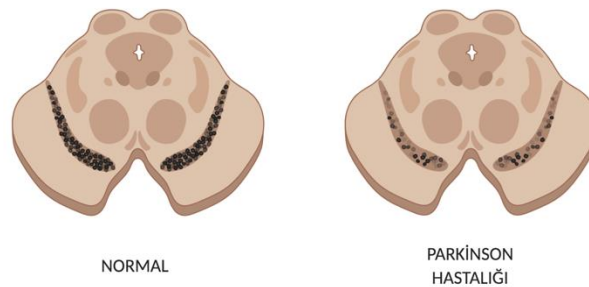
### **Bazal Ganglionlar (BG)**

Bazal gangliyonlar, ön beyin ve orta beyinde prefrontal korteks ve alt motor ve duyu bölgeleri arasındaki iletişimi ve organizasyonu sağlayan alanlardır. Bu çekirdeklerin, temel işlevleri olan hareketin kontrolünün yanı sıra dikkat, öğrenme, planlama, ödül davranışı gibi bilişsel işlevlerde de rolleri vardır. İstemli hareketin kontrolünde, korteks ve bazal ganglionlar arasındaki korteks-bazal ganglion döngüsü esastır. Korteksten kaynaklanan hareket kontrolü bilgisi, bazal ganglionlarda işlenir ve talamus üzerinden kortekse geri döner (21). Bazal gangliyonlarla ilişkili hastalıklar, ki bunlar Parkinson hastalığının da içinde bulunduğu hareket bozuklukları ve bazı nöropsikiyatrik hastalıklardır. Bazal ganglionların bu hastalıklardaki önemi ve hastalıkların patofizyolojileri kortiko-striatal-talamik nöronal döngüler ile ilgili çeşitli modeller geliştirilerek anlaşılmaya çalışılmaktadır (22).

Bazal ganglionlar; nukleus caudatus, putamen, globus pallidus, substantia nigra ve nukleus subthalamicus yapılarından oluşan bir organizasyona sahiptir. Bu

yapılardan substantia nigra özellikle Parkinson hastalığı etiolojisinde büyük öneme sahiptir. Substantia nigra, mezensefalonda krus serebri ile tegmentum arasında yer almaktadır. Pars kompakta kısmında dopaminerjik, pars retikulata kısmında ise GABA-erjik nöronlar sıklıkla yer almaktadır. GABA'nın inhibitör etki göstermesi sebebiyle, GABA-erjik nöronların aktivitesi sonucunda motor hareketlerde yavaşlama veya motor hareketlerin inhibisyonu ortaya çıkar. Dopaminerjik nöronların aktivitesi ile istemli hareketlerin aktif ve düzenli bir şekilde yapılması sağlanır (23).

Substantia nigranın pars compacta (SN Pc) parçasında yer alan dopaminerjik nöronların azalması ve daha az oranda da globus pallidus, putamen ve nukleus caudatusdaki nöronal dejenerasyon Parkinson hastalığı etiolojisinde büyük öneme sahiptir (21, 24) (Şekil 2.2). Dopaminerjik nöronlardaki kayıp sebebiyle ortamda yeterli dopamin olmadığına, GABA-erjik nöronların aktivitesi sonucu ortamda GABA artar. GABA baskınlığında istemli hareketlerde yavaşlama ve inhibisyon ortaya çıkar. Bu da Parkinson hastalığının bir hareket bozukluğu oluşunu açıklamaktadır (23).



**Şekil 2.2.** Substantia nigra pars compacta (SN Pc) bölgesinin dopaminerjik nöronlar açısından normal bireyler ile Parkinson hastalığına sahip bireylerdeki farkını gösteren şema (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

## 2.2. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) ilk olarak 1817'de Dr. James Parkinson tarafından "shaking palsy" olarak tanımlanmıştır (25). Bir çok sistemin etkilendiği nörodejeneratif bir hastalık olmakla birlikte, yaşa bağlı olarak en sık görülen motor hareket bozukluğudur. Toplumda Alzheimer hastalığını takiben ikinci en sık nörodejeneratif hastalıktır (26). Farklı ülke ve ırklarda yapılmış çalışmaların istatistiksel sonuçları, yılda 100 000 kişide 5 ila 35 yeni vaka olduğunu göstermektedir.

Bu geniş aralığın, çalışılan popülasyonlardaki demografik farklılıklara ve çalışma yöntemlerindeki değişikliklere bağlı olabileceği düşünülmektedir (27). Hastalığın prevalansı binde 2-3, 55 yaş üzerinde ise %1 civarındadır (28), başlangıç yaşı genellikle 50-60 yaş aralığında olup prevalansı ilerleyen yaşla artmaktadır. Hastalığa bağlı mortalite 20 yıllık hastalık sürecinden sonra artmaktadır. Yapılan çalışmalarda Parkinson hastalığının cinsiyete göre oranı K/E=2/3 olarak gözlenmiştir. Parkinson hastalığı genç yaşlarda da başlayabilir. Hastaların %5'inde hastalık 40 yaşından önce başlar, bu durumda genç başlangıçlı Parkinson hastalığından söz edilir. 20 yaşın altında hastalık başlayan hastalarda ise juvenil Parkinson hastalığından söz edilir (26-28). Parkinson hastalığı yaklaşık %90 sporadik olarak görülürken, yaklaşık %10 oranında ailesel geçiş göstermektedir. Sporadik Parkinson hastalığı çevresel etmenlere bağlı ortaya çıkmaktadır (5, 29).

Parkinson hastalığının altında yatan patolojik değişikliklerin temelinde ekstrapiramidal sistem bazal gangliyonlarından substantia nigraya ait pars compacta (SN Pc) alanında bulunan melanin içeren dopaminerjik nöronların sayıca azalması ve daha az oranda globus pallidus, putamen ve nucleus caudatusdaki nöronların etkilenmesi yer almaktadır (2, 30). Bazal gangliyonlar istemli hareket ve postürün düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (2, 25). Etkilenen nöronların hücre gövdesinde veya aksonlarında, ağırlıklı olarak alfa-sinüklein ( $\alpha$ -syn) ve ubikülinlenmiş proteinler içeren; eozinofilik, küresel inklüzyon cisimcikleri saptanmıştır. Bu cisimcikler yerleşimlerine göre; hücre gövdesinde olanlar Lewy cisimciği, aksonlarda yer alanlar ise Lewy nöriti olarak adlandırılmaktadır (3, 31).

Parkinson hastalığında  $\alpha$ -syn agregatları santral, otonom ve perifrik sinir sistemindeki nöronlarda birikerek, klinik olarak motor ve non-motor semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Non-motor semptomlar motor semptomlara göre hastalığın daha erken dönemlerinde ortaya çıkar ve olfaktör, otonom (gastrointestinal, ürogenital, kardiyak, respiratuvar), duyu, deri, uyku, görme, nöropsikiyatrik (kognitif, duyu durumu, demans) bozukluklar klinikte en sık karşılaşılan semptomlardır. Parkinson hastalığının motor semptomları dopaminerjik nigrostriatal sistemdeki nöronların etkilenmesiyle, hastalığın başlangıcından yaklaşık

20 yıl sonra ortaya çıkar. Motor semptomların ortaya çıkışı ancak %50-80 dopaminerjik nöron kaybından sonra olmaktadır. Parkinson hastalığının kardinal motor belirtileri bradikinezi, rijidite, tremor ve postüral instabilitedir (3, 4, 25).

**Bradikinezi:** Yeni bir hareketin başlatılmasında ve sürdürülmesinde güçlük çekilmesidir. Hareketler yavaş, yüz ifadesiz, ses tonu tekdüzedir. Yürürken kollar sallanmaz.

**Rijidite:** Kas tonusunda artış. Agonist ve antagonist kasların eşzamanlı olarak kasılmalarına bağlı olarak ortaya çıkar, pasif hareket sırasında direnç şeklinde kendini gösterir.

**Tremor:** Agonist ve antagonist kasların ardışık kasılmaları sonucu ortaya çıkar. Tremor yavaş olup, ekstremiteler dinlenmede iken belirginleşir. Uykuda ise kaybolur.

**Postural instabilite:** Hastalar ayakta dururken kambur ve kolları fleksiyondadır. Kısa adımlarla ayak sürüme tarzında yürür ve genellikle yürümeye başladıktan sonra yürümeyi sonlandıramaz ve düşmeye yatkındırlar. Oturdukları yerden desteksiz kalkmakta zorluk çekerler.

Motor ve non-motor semptomlar cinsiyet açısından incelendiğinde belirgin bir farklılık gözlenmemiş, yalnızca kadınlarda erken başlangıçlı ve tedavide geç kalınmış olgularda kognitif disfonksiyon ve depresyonun daha belirgin olduğu gözlenmiştir (4, 32). Parkinson hastalığında görülen hem motor hem de non-motor belirtiler striatumda dopamin eksikliği ile ilişkili ortaya çıkmaktadır (4, 33). Non-motor semptomların bazılarının özellikle PH'nin erken dönemlerinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğiyle ilgili son zamanlarda literatürde çeşitli çalışmalar yer almaktadır (4, 34). Tablo 2.1'de Parkinson hastalığında görülen non-motor belirtiler yer almaktadır.

**Tablo 2.1.** Parkinson Hastalığındaki non-motor semptomlar (4)

|                  |   |
|------------------|---|
| Olfaktör         | Hiposmi/Anosmi  |
| Sirkadyen ritim  | REM uyku bozukluğu<br>İnsomnia<br>Gündüz uyku hali<br>Huzursuz bacak sendromu   |
| Gastrointestinal | Disfaji<br>Konstipasyon<br>Yutma güçlüğü<br>Hipersalivasyon   |
| Genitoüriner     | Acil idrar yapma isteği<br>Noktüri<br>Artmış idrara çıkma<br>Eretil disfonksiyon  |
| Kardiyovasküler  | Ortostatik hipotansiyon<br>Senkop   |
| Deri             | Seboreik dermatit<br>Terleme/Kuruluk  |
| Solunum          | Dispne<br>Stridor   |
| Duyu             | Ağrı<br>Duyu bozuklukları   |
| Görme            | Diplopi<br>Bulanık görme<br>Okuma güçlüğü<br>Kuru göz   |
| Nöropsikiyatrik  | Anksiyete<br>Depresif ruh hali<br>Davranış bozuklukları<br>Yönetici işlev bozukluğu<br>Visuospatial bozukluk<br>Psikoz<br>Apati/Agresiflik<br>Disinhibisyon<br>Halusinasyon<br>Kognitif bozukluk (demans) |
| Diğer            | Işık hassasiyeti<br>Yorgunluk, enerji düşüklüğü<br>Duyma güçlüğü, Sağırlık  |

Parkinson hastalığı için oluşturulmuş çok yaygın bir evreleme bulunmamakla birlikte, Braak ve arkadaşlarının yaptığı evreleme kabul edilmektedir. Bu evrelemede Lewy cisimciklerinin yerleşimi temel alınmıştır ve periferik sinir sisteminden başlayarak, merkezi sinir sistemini beyinde kaudal-rostral doğrultuda etkileyen altı evre belirlenmiştir (2, 26, 27, 35). Tablo 2.2’de Braak ve arkadaşlarının evrelemesi görülmektedir.

**Tablo 2.2.** Parkinson Hastalığı için Braak evrelemesi (27, 35, 36)

| Evre        | Lewy cisimciklerinin bulunduğu bölge   |
|-------------|--|
| Evre 1      | Periferik sinir sistemi (otonom nöronlar), olfaktor sistem (olfaktor bulbus, anterior olfaktor çekirdek), medulla (vagus ve glossofaringeal sinirlerinin dorsal motor çekirdekleri)                |
| Evre 2      | Pons (locus ceruleus, reticular formation, posterior raphe çekirdekleri), medulla spinalisin gri maddesi   |
| Evre 3      | Pons (pedunculo pontin çekirdek), orta beyin (substantia nigra pars compacta), ön beyin (magnocellular çekirdekler), limbik sistem (amigdala)  |
| Evre 4      | Limbik sistem ( Stria terminalisteki interstitial çekirdekler, ventral casustum), talamus (intralaminar çekirdekler), temporal korteks (anteromedial temporal mesocortex, hipokampusun CA2 bölümü) |
| Evre 5 ve 6 | Multiple kortikal alanlar (insular korteks, asosiyasyon alanları, primer kortikal alanlar)   |

Parkinson hastalığının etiolojisine bakıldığında çeşitli risk faktörleri ve koruyucu faktörler tanımlanmıştır. Hastalığın %90 oranında sporadik olarak geliştiği göz önüne alındığında bu çevresel faktörler önem kazanmaktadır (37). Riski artıran faktörlerin başlıcaları; pestisit maruziyeti, geçirilmiş kafa travması ve kırsal bölgede yaşamaktır. Koruyucu olarak bilinen faktörlerden başlıcaları ise; kahve tüketimi ve nonsteroid anti-inflamatuar ilaç (NSAİİ) kullanımınıdır (30). Tablo 2.3'de Parkinson hastalığı için tanımlanmış çevresel risk faktörleri ve koruyucu faktörler görülmektedir.

**Tablo 2.3.** Parkinson Hastalığı için risk faktörleri ve koruyucu faktörler (37)

| Risk Faktörleri                       | Koruyucu Faktörler              |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Pestisit maruziyeti                   | Düşük miktarda alkol tüketimi   |
| Geçirilmiş kafa travması              | Tütün kullanımı                 |
| Kırsal bölgede yaşamak                | Kahve tüketimi                  |
| Beta-bloker kullanımı                 | Siyah çay ve yeşil çay tüketimi |
| Tarım alanlarında çalışmak            | Ürik asit (ürat)                |
| Aşırı su tüketimi                     | Düzenli fiziksel aktivite       |
| Süt ve süt ürünlerinin aşırı tüketimi | NSAİİ kullanımı                 |
| Metamfetamin kullanımı                | Kalsiyum kanal blokerleri       |
| Malign melanom tanısı almış olmak     | Meyve, sebze ve balık tüketimi  |
| Aşırı alkol tüketimi                  |                                 |

Parkinson hastalığının altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılammış olsa da şu ana kadar elde edilen bilgiler mitokondriyal ve lizozomal bozukluk, ubikutin proteazom sistemi (UPS) disfonksiyonu, kalsiyum (Ca)

hemostazında değişim ve oksidatif stresin hücre içindeki temel sebepler olduğunu göstermektedir (5, 27). Hücre içinde dopamin homeostazının bozulmasına bağlı olarak reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumu artar, bu durum mitokondriyal bozukluğa neden olur. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğuyla birlikte hücre içi oksidatif stres artar. Hastalığın altında yatan mekanizmayı açıklayan tek bir yolak olmamasına rağmen hücre patolojilerden sorumlu ana mekanizmanın  $\alpha$ -syn proteininin agregasyonu ve bunu takip eden mitokondriyal işlev kaybı olduğu düşünülmektedir (5, 38). Ayrıca bir diğer önemli mekanizma hücre içinde gerçekleşen bu patolojik değişiklikler ile ilişkili olarak ortaya çıkan nöroinflamasyondur (6).

### 2.2.1. Lewy Cisimcikleri

Fritz Jakob Heinrich Lewy (1885–1950), 1912 yılında Parkinson hastalığında karakteristik olarak hücre içinde yer alan inklüzyon cisimciklerini tanımlamıştır (39). Daha sonra Konstantin Nikolaevich Tretiakoff (1892-1956), 1919'da bu yapıları Lewy cisimleri olarak isimlendirmiştir. Lewy, hücre gövdesinde bulunan bu inklüzyonların yanı sıra sinir hücresi uzantılarında (aksonlar) yer alan inklüzyon cisimlerini de tanımlamıştır; ki bunlar da Lewy nöriti olarak bilinmektedir (36). Lewy cisimciği içeren hücrelerin hücre ölümüne gittiğinin gözlenmesi sebebiyle, Lewy cisimcikleri nöron dejenerasyonun belirteçleri olarak düşünülmektedir (36, 40).

Lewy cisimciklerinin yapısına bakıldığında pek çok farklı molekül içeren kompleks bir yapı olduğu görülmüştür. Gün geçtikçe yeni laboratuvar yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda Lewy cisimciklerinin yapısı her geçen gün biraz daha aydınlatılmakta ve içeriğinde yeni moleküller tanımlanmaktadır. Şu ana kadar elde edilmiş verilere göre Lewy cisimcikleri 90'dan fazla molekül içermektedir ve bunlar arasında en yoğun olarak bulunan  $\alpha$ -syn proteindir. Bunun yanı sıra, PH-ilişkili genlerin ürünleri (DJ-1, LRRK2, parkin ve PINK1), mitokondri ilişkili proteinler, ubikutin proteazom sistemi(UPS) ile ilişkili moleküller de yer almaktadır (40). Literatüre yeni katılan bir çalışma ise şu ana kadar bilinenlerden bir miktar farklı bir bulgu ortaya koymuştur. Bu çalışmada ileri elektron mikroskopi teknikleri kullanılmış ve tanımlanmış proteinlerin yanı sıra Lewy cisimciklerinde lipit bileşenler de



gözlenmiştir. Aynı çalışmada Lewy cisimciklerinin yapısında parçalanmış ve fonksiyonunu kaybetmiş organellere ait membran parçaları ve vezikül membranına benzer yapılar tespit edilmiştir. Bu bulgular Lewy cisimciklerinin lipit-protein karışımı bir yapıya sahip olabileceğine işaret etmektedir (41).

Yapılan araştırmalarda, hücrelerin içerisinde ilk olarak soluk, hafif eozinofilik birikimler ortaya çıktığı, daha sonra bu yapıların Lewy cisimciği şeklini aldığı gözlenmiştir (36, 40). Elektron mikroskobu ile yapılan daha detaylı incelemelerde, Lewy cisimciklerinin ve Lewy nöritlerinin 200-600 nm uzunluğunda ve 5-10 nm genişliğinde, çoğunlukla dallanma göstermeyen fibriler  $\alpha$ -syn proteinini içerdiği gözlenmiştir (36). İki tip Lewy cisimciği tanımlanmıştır: Beyin sapı tipi (klasik tip) ve kortikal tip (36, 40). Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, hematoksilen ve eozin ile boyanmış kesitlerde beyin sapı tipi Lewy cisimcikleri intrasitoplazmik, tek veya çoklu, küresel veya uzamış, yoğun bir çekirdeğe ve periferik halkaya sahip eozinofilik kitleler olarak izlenir. Kortikal tip, beyin sapı tipi kadar iyi tanımlanmamıştır. Kortikal tip Lewy cisimciklerinde, beyin sapı tipindeki gibi bir periferik halka gözlenmemiştir. İplik benzeri Lewy nöritleri etkilenen nöronların akson ve dendritlerinde bulunur. Kortikal Lewy cisimcikleri yine eozinofilik olmakla birlikte düzensiz şekilli, genellikle çekirdek ve periferik halka gözlenmeyen iyi tanımlanamayan yapılardır (40). Beyin sapı tipi ve kortikal tip Lewy cisimcikleri, ubikutin ve fosforile  $\alpha$ -syn ile güçlü bir immuno-işaretlenmeye sahiptir (36, 40).

Lewy cisimcikleri MSS'de yaygın olarak bulunabilmektedir. Yapılan çalışmalarda olfaktor bulbus (42), hipotalamus (43), hipofiz bezinin posterior lobu (44), substantia nigra, locus coeruleus, dorsal raphe nükleus, dorsal vagal nükleus (45), cerebellum (46) ve medulla spinaliste (47, 48) buldukları gösterilmiştir. Ayrıca amigdaloid nükleus ve serebral korteks nöronlarında, özellikle limbik sistemin derin tabakalarında (V ve VI) bulunabilmektedir (49, 50). Benzer inklüzyonların periferik sinir sisteminde (PSS) de pek çok yerde bulunduğu görülmüştür. Sempatik ganglion (51), enterik sinir sistemi (Meissner ve Auerbach pleksusları) (52-55), kalp (56), pelvik organlar (57), adrenal medulla (57, 58), submandibuler bez (59, 60) ve deride (61, 62) bu yapılara rastlanmıştır.

### 2.2.2. Sinükleinler ve $\alpha$ -syn

Sinükleinler, diğer pek çok proteinden farklı olarak yalnızca omurgalılarda bulunan, özellikle sinir dokusu ve bazı tümörlerde tespit edilen küçük, çözünebilen proteinlerdir (63, 64). Bu ailenin üç üyesi vardır:  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - sinüklein (63-65). Sinükleinler,  $\alpha$ -syn proteininin hem genetik hem nöropatolojik olarak Parkinson hastalığıyla bağlantısı kurulduktan sonra önem kazanmıştır.  $\alpha$ -syn'in Lewy cisimcikli demans, Multiple Sistem Atrofisi (MSA), Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmişken,  $\gamma$ -syn'in de özellikle bazı kanserlerle ilişkili olmanın yanı sıra, bazı nörodejeneratif hastalıklar ve göz patolojileriyle de ilişkili olduğu bilinmektedir (65, 66).  $\beta$ -syn'in hücre içinde  $\alpha$ -syn'e antagonist özellik göstererek hatalı katlanmasını ve hücre içi birikimini engelleyici işlev gördüğü düşünülmektedir (63, 64).

Sinüklein proteinleri birbirinden farklı içerikte üç bölgeye sahiptir. Bunlar; amino terminali bölgesi (N terminali), merkez bölgesi ve karboksi terminali bölgesi (C terminali)'dir (63, 67). Amino terminali bölgesi (N terminali), asidik lipidlerle bağlanan kısımdır, membran fosfolipidlerine bağlanma sırasında  $\alpha$ -heliks yapısının oluşumundan sorumludur ve türler arası korunmuş parçadır (63, 67, 68). Merkez bölgesi hidrofobik yapıdadır ve konformasyonel değişimden ve agregatların oluşumundan sorumludur (67, 69). Karboksi terminali bölgesi (C terminali) yüksek negatif yüklüdür ve türler arası değişkenlik gösteren kısımdır.  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve diğer katyonların bağlanma bölgesidir. Proteinin bu kısmının şaperon işlevi gördüğü ve hücre içinde diğer proteinlerle etkileşimi kontrol ettiği düşünülmektedir (67, 70).

Sinükleinler, fizyolojik koşullarda ve nötral pH'de hücre içinde katlanmamış halde bulunurken, sıcaklık artışı veya asidik pH ile konformasyonel değişiklikler gösterirler. Konformasyonel değişikliklerden fibrilasyon en çok  $\alpha$ -syn'de görülmekteyken,  $\beta$ -syn'de görülmemekte ve  $\gamma$ -syn'de ise daha yüksek konsantrasyonlarda ve daha yavaş görülmektedir (63, 67).

### 2.2.3. Alfa sinüklein ( $\alpha$ -syn)

İnsan  $\alpha$ -syn proteini SNCA geni tarafından kodlanan 140 aminoasit uzunluğunda, normalde katlanmayan bir proteindir (67, 71). SNCA geni 4q21 kromozunda yerleşiktir (63, 67).

$\alpha$ -syn proteininin insanda en çok beyin dokusunda özellikle de neokorteks, hipokampus, substantia nigra (SN), talamus ve beyincikte bulunduğu gösterilmiştir (72). Kalp, kas ve diğer dokularda ise daha az miktarlarda bulunmaktadır (66).  $\alpha$ -syn proteininin merkezi, otonom ve periferik sinir siteminde nöronlarda (sitoplazmada, çekirdekte, mitokondride, presinaptik terminallerde, sinapslarda) ve ekstraselüler alanda birikebildiği gösterilmiştir (7, 8, 73).  $\alpha$ -syn proteini, merkezi sinir sisteminde nöronlar dışında serebrospinal sıvıda da tespit edilmiştir (74). Yapılan çalışmalarda, kan-beyin bariyerini geçerek serebrospinal sıvı ve periferik kan arasında geçiş yaptığı da gösterilmiştir (75). Ayrıca trombositlerde ve lenfositlerde de  $\alpha$ -syn proteini bulunmaktadır (8).

$\alpha$ -syn'in *in vitro* koşullarda pek çok konformasyonda bulunabileceği gösterilmiştir. Normal koşullarda hücre içinde sentezlendiğinde katlanmamış monomer formda bulunmaktadır (31, 71). Parkinson hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalarda ise farklı konformasyonlarda (dimer, oligomer, protofibril ve fibril)  $\alpha$ -syn proteinlerine rastlanmıştır (25, 26, 71). Normalde hücre içerisinde bu farklı düzenlenimdeki  $\alpha$ -syn proteinlerinin belli bir dengede olduğu düşünülmektedir.  $\alpha$ -syn proteininin normal koşullarda hücre içinde çeşitli işlevleri olduğu bilinmektedir (31, 67, 71). Proteinin yapısında görülen konformasyonel değişiklikler Lewy cisimciklerinin oluşumunda önemlidir. Lewy cisimciklerinin temelini fibriler formdaki  $\alpha$ -syn proteini oluşturmaktadır (31, 67, 71).  $\alpha$ -syn proteininin, kısmen katlanmış veya oligomer yapısında olduğunda *in vitro* koşullarda nörotoksositeye de sebep olduğu gösterilmiştir (25, 31, 67, 71). Oligomerler  $\beta$ -sheet yapısındadırlar, agregatlara kıyasla çok daha küçüktür ve boyutları değişkendir. Oligomerler,  $\alpha$ -syn proteininin monomer ve fibriler formları arasında geçiş formu olabilir; fakat hücre içinde oligomer formda kaldıklarında toksisiteye sebep olmaktadır (25, 71).  $\alpha$ -syn proteininin toksisite mekanizmaları hala tam aydınlatılmamış olsa da şu ana kadar gösterilmiş ve

üzerinde en çok durulan mekanizma membran hasarına sebep olmasıdır (7, 63, 76). Oligomer yapıda olan  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonunun dopaminerjik nöronların kaybında artışa sebep olduğu, membranlarda gözenekler oluşturduğu ve artmış kalsiyum geçirgenliğine bağlı olarak hücre toksisitesine ve ölüme neden olabilecekleri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (26, 31, 77).  $\alpha$ -syn hatalı katlanmasının patofizyolojisinde endoplazma retikulumu stresi, oksidatif stres, kalsiyum dengesinin bozulması ve nöroinflamasyon yer almaktadır (26).

### **Alfa Sinüklein Proteininde Görülen Post-Translasyonel Değişiklikler**

$\alpha$ -syn proteininde, sentezlendikten sonra çeşitli post-translasyonel değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerle proteinin işlevleri düzenlenir, proteinin işlev göreceği farklı hücre içi alanlara yönlendirilmesi sağlanır ve bazı değişiklikler sonucunda da proteinin patolojik formları hücre içinde ortaya çıkar (67, 78). Lewy cisimciklerinin analizi sonucunda farklı formlarda değişmiş  $\alpha$ -syn proteinlerine rastlanmıştır. En çok rastlanan post-translasyonel değişiklikler; fosforilasyon, nitrasyon ve ubiquitinlenmedir. Glikozilasyon, enzimatik çapraz bağlanmalar, metionin oksidasyonu ve C terminalinden proteolitik kesilme de görülen diğer post-translasyonel değişikliklerdir (67, 78).

Fosforile  $\alpha$ -syn proteini, Parkinson hastalığı patogeneziyle yakından ilişkilidir. C terminalinde ek negatif yüke sahiptir. Hücre içinde özellikle mitokondriyonlarda yerleştiği gösterilmiştir ve mitokondriyonların iç zarına bağlanarak özellikle elektron transport zinciri (ETZ) kompleks l'de işlev bozukluğuna sebep olmaktadır. Çözünmeyen  $\alpha$ -syn proteinlerinin yaklaşık %90'ı fosforile formdadır (7, 79).

Nitrasyon, nörodejeneratif hastalıkların patogeneziinde önemli bir yere sahiptir. Nitrasyon gerçekleşmiş  $\alpha$ -syn proteininin, beyin dokularında sitoplazmik birikiminin sinükleinopatilerle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.  $\alpha$ -syn'in nitrasyona uğradığında amorf protein agregatları oluşturduğu gözlenmiştir (7, 69).

Ubikutinlenme, PH patogeneziinde yer alan önemli post-translasyonel mekanizmalardan biridir. Lewy cisimcikleri, pek çok farklı molekül içeren kompleks

bir yapıya sahiptir. Lewy cisimciklerinin kompleks yapısına bakıldığında, 90'dan fazla molekül içerdiği ve bunların ubikutinlenmiş  $\alpha$ -syn proteini başta olmak üzere, PH-ilişkili genlerin ürünleri (DJ-1, LRRK2, parkin ve PINK1), mitokondriyon ilişkili proteinler, ubikutin proteazom sistemi (UPS) ile ilişkili moleküller olduğu görülmüştür (40, 67). Ubikutinlenme, ubikutin substrat proteine bağlandığı bir post-translasyonel değişiktir.

Ubikutin, ardışık üç enzim aktivitesiyle diğer proteinlere bağlanan 76 aminoasit (aa) uzunluğunda bir proteindir (67, 80). Bağlantı genellikle ubikutin son aminoasidi olan glisin karboksi grubu (COO-) ile substrat proteinin lizin rezidüsündeki amino grubu (NH<sup>+</sup>) arasında gerçekleşir (67).

Ubikutinlenmenin 3 enzimatik basamağı; aktivasyon (ubikutin aktivasyon enzimleri-E1), konjugasyon (ubikutin konjugasyon enzimleri-E2) ve ligasyon (ubikutin ligazlar-E3)dur (67).

Ubikutinlenme, monoubikutinlenme veya poliubikutinlenme şeklinde olabilir. Monoubikutinlenmede substrat proteine tek ubikutin eklenir ve membran trafiği, endositoz ve lizozomal yıkım süreçlerini etkiler (67). Poliubikutinlenme ise, substrat protein üzerinde tek bir ubikutin zincirinin oluşmasıdır. Ubikutin kendisi de 7 lizin rezidüsü içermektedir ve ubikutinlenme ile poliubikutin zincirlerinin oluşumu gerçekleşir. Bu yapılar DNA tamiri, otofaji ve proteazom sistemleri ile protein yıkımı (degradasyon) süreçlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır (81).

Parkinson hastalığında, şu ana kadar, 10'dan fazla protein kodlayan gen mutasyonu saptanmıştır. Bunlardan UPS ile ilişkili olanlar; parkin, CHIP, TRAF6 ve UCHL1 mutasyonlarıdır. parkin, CHIP ve TRAF6 E3 enzimlerdir, UCHL1 ise ubikutini substrat proteinden ayıran bir deubikütinasyon enzimidir (81).

### **Alfa Sinükleinin Hücre İçinde Etkileştiği Diğer Proteinler**

$\alpha$ -syn proteini, hücre içinde veya Lewy cisimciklerinde çeşitli başka proteinlerle etkileşebilmektedir. Bu proteinlerden üzerinde en çok durulanlar; Sinfilin, Tubulin, Cysteine-string protein- $\alpha$  (CSP- $\alpha$ ), Rab, Agrin, histon proteinleri, şaperonlar, Tau proteindir (7, 63).

**Sinfilin**, Lewy cisimciklerinin içinde veya sitoplazmada yer alan ve  $\alpha$ -syn ile etkileşen bir proteindir. Yapılan ilk çalışmalarda,  $\alpha$ -syn proteininin agregatlar ve inklüzyon cisimcikleri oluşturma eğilimini arttırdığı düşünülmüş olsa da son yıllarda yapılan çalışmalar bu proteinin tam tersine nöroprotektif olduğunu ortaya koymaktadır (82, 83).

**Tubulin**, hücre iskeletinde yer alan bir proteindir. Yapılan çalışmalarda tubulinin,  $\alpha$ -syn'in polimerizasyonunu başlatarak  $\alpha$ -syn fibrillerinin oluşumunu arttırabileceği ve bazı epigenetik faktörlerin (ilaçlar, kimyasallar, çevresel toksinler, gıda katkı maddeleri gibi) tubulin üzerinden,  $\alpha$ -syn fibrilizasyonunu arttırabileceği gösterilmiştir (84). Ayrıca  $\alpha$ -syn'in tubulin ile etkileşmesi sonucunda hücre içinde mikrotübül şekillenmesinin inhibe olduğu gözlenmiştir (85).

**CSP- $\alpha$** , sinaptik veziküler bir proteindir. Son yıllarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla nöroprotektif olduğu gösterilmiştir. Nöroprotektif etkisini sinaptik işlevini koruyarak gösterdiği düşünülmektedir (86, 87).

**Rab proteinleri (Rab GTPazlar)**, hücre içinde vezikül trafiğinin ve hücrel membran dinamiğinin düzenlenmesinde rol alan bir protein ailesidir. Selektif olarak bazı Rab proteinleri (Rab3a, Rab5, Rab8, Rab7, Rab11a)  $\alpha$ -syn ile bağlanarak hücreleri  $\alpha$ -syn mutasyonu veya aşırı ekspresyonuyla oluşan hasardan korur (88).  $\alpha$ -syn mutasyonu olan veya fibriler formda  $\alpha$ -syn içeren ve  $\alpha$ -syn agregatları biriken hücrelerde, aksonal transportun da hasar gördüğü ve vezikül trafiğinin düzgün işlemediği gözlenmiştir (89).

**Aggrin**, bir proteoglikandır. PH olanlarda  $\alpha$ -syn ile beraber Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri içinde yer aldığı gösterilmiştir.  $\alpha$ -syn ile bağlanarak konformasyonel değişiklikleri tetiklemekte,  $\alpha$ -syn'in  $\beta$ -sheet ve protofibril yapılarını kazanmasına sebep olmaktadır. PH olanlarda agregat oluşumunda da etkili olduğu düşünülmektedir (90, 91).

**Histon proteinleri**, çekirdekte bulunur. Çekirdekte  $\alpha$ -syn proteininin histonlarla bağlanması,  $\alpha$ -syn'in asetilasyonunu ve agregasyonu artırır. Bunun sonucunda nörotoksisite artmış olur (92).

**Şaperonlar**, proteinlerin katlanarak üç boyutlu yapısını kazanmasında rol oynayan yardımcı proteinlerdir.  $\alpha$ -syn, Hsp27, Hsp70, Hsp90 başta olmak üzere çeşitli şaperonlarla etkileşir ve Lewy cisimciklerinde bunlarla birlikte yer alır. Şaperonlar, agregasyonda ve protein yıkımının engellenmesinde rol alırlar (7, 93).

**14-3-3 proteini**, şaperon işlevine sahip, hücre içi protein trafiğinin düzenlenmesinde rol alan ve sinir dokusu hücrelerinde yüksek miktarda eksprese olan bir proteindir (94). 14-3-3,  $\alpha$ -syn, parkin ve LRRK2 başta olmak üzere Parkinson hastalığında adı geçen proteinlerle etkileşime girmektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, Lewy cisimciklerinde  $\alpha$ -syn proteini ile birlikte işaretlenme göstermektedir (95). Literatürde,  $\alpha$ -syn proteinin hücreler arası geçişini azalttığını gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır (96). Ancak  $\alpha$ -syn'in hücre içinde oligomerizasyonunu ve hücre içi agregatların oluşumunu azalttığı gösterilememiştir (96).

**Tau proteini**, nörodejenerasyon sürecinde özellikle Alzheimer hastalığının patogeneğinde önemli olduğu bilinen bir proteindir. Parkinson hastalığında biriken  $\alpha$ -syn proteininin hücre içinde tau proteini ile de etkileşime girdiğini gösteren çalışmalar vardır.  $\alpha$ -syn'in, tau ile etkileşime girmesi tau fibrilizasyonunu başlatır. Bir diğer görüş olarak da, bu proteinlerin etkileşime girmeleriyle her ikisinin de birbirinin fibriler forma geçişleri için polimerizasyonu başlattığı yönündedir (97, 98).

### **Alfa Sinükleinin Hücre İçinde Yerleşimi**

$\alpha$ -syn proteini membran lipitleriyle bağlanabilme özelliğine sahiptir. Böylece hücre içerisinde hücre zarı yapılarıyla (mitokondriyon, endoplazma retikulumu, Golgi aygıtı ve çekirdek) bağlanabilir (63, 99). Bu yapılar arasında mitokondriyon zarına afinitesinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (63). Hücre zarı yapılarına bağlanma ile de hücre toksisitesi tetiklenmektedir. Toksikite mekanizmaları netleşmemiş olsa da ortak kanı membran hasarına yol açması sebebiyle olduğu yönündedir (100, 101).

### Hücre Çekirdeği

$\alpha$ -syn fizyolojik koşullarda çekirdeğe yönlendirilen bir protein değildir. Çekirdeğe translokasyonu monoubikütinlenme ve oksidatif stres ile tetiklenmektedir.  $\alpha$ -syn'in çekirdeğe geçmesi ile nörotoksisite tetiklenir. Bunu takiben DNA fragmentasyonu ve çeşitli yollar üzerinden hücre ölümü tetiklenir (63, 100). Çekirdeğe giren  $\alpha$ -syn histon proteinleriyle etkileşebilmektedir. Ayrıca bazı gen ekspresyonlarının düzenlenmesini de değiştirebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (63).  $\alpha$ -syn, transkripsiyonel olarak aktif ve histon içermeyen tek DNA zincirine doğrudan bağlanabilir ve DNA'nın stabilitesini ve konformasyonunu değiştirebilir (102, 103).

### Mitokondriyon

Mitokondriyon, hücre enerji metabolizmasının ve hücrede apoptotik yollarının ana düzenleyicisidir. Mitokondriyal oksidatif stres nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde büyük role sahiptir. Hücrel patolojilerden sorumlu ana mekanizma,  $\alpha$ -syn proteininin agregasyonu ve bunu takiben mitokondriyal işlev kaybıdır (104).  $\alpha$ -syn proteini özellikle mitokondriyon iç ve dış zar yapısında bulunan kardiyolipin ile bağlanmaktadır (68, 99).  $\alpha$ -syn'in kardiyolipine bağlanması membran potansiyelinden bağımsız olarak gerçekleşmektedir.  $\alpha$ -syn'in mitokondriyonlara bağlanmasında üzerinde durulan bir diğer mekanizma da  $\alpha$ -syn'in mitokondriyal dış zar translokaz kompleksinde (TOM) yer alan bir kanal olan TOM 40'a bağlanmasıdır (99). Ayrıca  $\alpha$ -syn proteininin, mitokondriyon zarında TOM 20'ye bağlanarak mitokondriyal protein içe alımını ihhabe ettiği de düşünülmektedir (105). *In vivo* ve *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda,  $\alpha$ -syn'in mitokondriyonlara bağlanmasıyla mitokondriyal fragmentasyon gerçekleştiği gösterilmiştir. Bunların yanı sıra  $\alpha$ -syn'in endoplazma retikulumu (ER) ve mitokondriyon arasındaki haberleşmeyi ve ER'den mitokondriyona kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) transferini arttırdığı düşünülmektedir.  $\alpha$ -syn, hücrel reaktif oksijen türlerini (ROS) mitokondriyonla olan bağlantısı üzerinden arttırabilir. Mitokondriyal ETZ enzim kompleksi I ve III ROS üretiminin birincil bölgeleridir. Özellikle, elektron transport zinciri (ETZ) enzim kompleksi I'de  $\alpha$ -syn



proteinine bağılı değişiklikler görölmektedir (99, 104). ROS artışı hücre içinde dopaminin oksitlenmesine de sebep olmaktadır (5). Okside dopamin mitokondriyal hasara ve dopaminerjik nöronların hassasiyetine sebep olan spesifik bir proteindir (1, 5). Mitokondriyon zarındaki yapısal değişiklikler ve ETZ sisteminin işlev kaybı sebebiyle hücrede ROS birikimi görölür (99). Hücre içi dopamin homeostazının bozulması ROS artışını tetikler. Bunun sonucunda mitokondriyal işlev bozukluğu tetiklenir ve olaylar hücre içi oksidatif stres artışıyla sonuçlanır. Mitokondriyal işlev bozukluğu sonucu hücre içinde ROS artmasıyla mitokondriyal hasar daha da tetiklenir. Hücre içi oksidatif stres artışıyla kısır bir döngü benzeri bu basamaklar tekrarlanarak hücrelerin ölümüne yol açar (5, 106).

### **Alfa Sinüklein Proteininin İşlevleri**

$\alpha$ -syn proteini fizyolojik koşullarda hücre içinde sentezlenen bir protein olmasına rağmen tüm işlevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Şu ana kadar gösterilebilmiş işlevlerinden en önemlileri; dopaminerjik nöronlarda protein kinaz C (PKC) aktivitesinin baskılanmasıyla apoptozun azaltılması (107), antioksidan olarak işlev görerek doymamış yağ asidi oksidasyonunun önlenmesi (108), presinaptik terminallerde sinaptik vezikül trafiğinin düzenlenmesi (109), SNARE kompleks oluşumuna katkıda bulunma (110, 111), klatrin bağımlı endositoza katkıda bulunma (112), Fosfolipaz D2 (PLD2) inhibisyonu (113), nöronal farklanmaya katkıda bulunmadır. Presinaptik terminaller, nörotransmitterlerin salınması ve nöronlar arası iletişimin sağlanması açısından önem taşımaktadır. Özellikle denge ve hareket kontrolünden sorumlu beyin bölgesi olan substantia nigrada dopamin salınımının düzenlenmesinde  $\alpha$ -syn'in yardımcı olduğu düşünölmektedir. Bunların yanı sıra,  $\alpha$ -syn kan glikoz seviyesinin düzenlenmesinde de rol almaktadır (72, 114).

$\alpha$ -syn proteininin hücreler arasında geçiş yaptığı gösterilmiştir.  $\alpha$ -syn proteini hücrede vezikül içine alınır ve ekzositoz ile hücre dışına geçer (5, 11).  $\alpha$ -syn salınımı, ER-Golgi transportu bloke edildiğinde de devam etmektedir, bu da konvansiyonel ekzositoz ile salınım olmadığını göstermektedir. Ekzositozun diğer türleri olan

eksozom salınımı ve ekzofaji ve otofagosom aracılı ekzositoz  $\alpha$ -syn salınımında temel mekanizmalar olarak araştırılmaktadır (5, 9).

### **Alfa Sinükleinin Hücre Dışına Geçişi Ve Diğer Hücreler Tarafından**

#### **Endositozu**

$\alpha$ -syn proteininin hücre dışı alandan hücre içine alınması endositoz ile gerçekleşmektedir. Hücre dışı alana ekzositoz ile geçen  $\alpha$ -syn, diğer nöronlar ve glia hücreleri (mikroglia hücreleri, astrositler, oligodendrositler) tarafından endositoz ile hücre içine alınabilmektedir (9, 115). *In vitro* koşullarda yapılan son çalışmalarda;  $\alpha$ -syn proteininin profibriler formunun hücre dışı alandan diğer nöronlara alınmasında LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) reseptörüne bağlanmasının önemli olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada astrositler ve mikroglia hücrelerinde LAG3 reseptörüne rastlanmamıştır, dolayısıyla LAG3 protofibriler  $\alpha$ -syn proteininin nöronlara alımında önem taşımaktadır.  $\alpha$ -syn proteininin LAG3 reseptörüne bağlanmasıyla hücre içine endositoz yolu ile alınmasının tetiklendiği gösterilmiştir (11). Bu çalışmada LAG3'ün ağırlıklı olarak nöronlar tarafından eksprese edildiği gösterilmiş olsa da, daha önce yayınlanmış bir çalışmada RNA sekanslama ile elde edilen veriler, glia hücrelerinde LAG3 reseptör ekspresyonu olduğunu ortaya koymuştur (116). Bu sonuçlar ışığında, LAG3 potansiyel bir ilaç hedefi gibi görünmekle birlikte insan MSS hücrelerindeki ekspresyonu ve PH ile ilişkisi ile ilgili daha fazla çalışmaya ve veriye ihtiyaç vardır.

$\alpha$ -syn proteininin endositozunda rol oynayan bir diğer reseptör de TLR2 (toll-like receptor 2)'dir. TLR2 reseptörü nöronlar ve glia hücrelerinde bulunmaktadır ve  $\alpha$ -syn 'in hem oligomer hem de fibriler formunun endositozunda rol almaktadır (10). Mikroglia hücrelerinde TLR2 aktivasyonu ile inflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımı gerçekleşmektedir (10, 115). İnflamatuvar sürecin tetiklenmesiyle nörotoksisite artmakta ve hücre dejenerasyonu hızlanmaktadır (9, 117). İnflamatuvar sitokinlerden özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  artarken, bunların yanı sıra IL-2 ve IL-6 da artmaktadır (118). TNF- $\alpha$ 'nın mitokondriyonda ROS üretimini ve ayrıca bir dış aktivatör olarak apoptozu tetiklediği bilinmektedir (118). İlginç olarak artmış TLR2 protein seviyeleri bazı çalışmalarda nöronlarda mikroglia hücrelerinden daha yüksek

bulunmuştur. Nöronal TLR2 aktive edildiğinde inflamatuvar sitokin üretiminde, oksidatif stresde ve endojen  $\alpha$ -syn proteininin birikiminde artışa neden olduğu görülmüştür (10).

### 2.3. Nöroinflamasyon ve Parkinson Hastalığındaki Rolü

Nöroinflamasyon, merkezi sinir sisteminin (MSS) patojenler, toksinler, travma ve dejenerasyon ile başa çıkmasını sağlayan mekanizmadır (119). Patolojik durumlara cevap sırasında; doğal ve edinilmiş bağışıklık sistemi vasküler hücreler, nöronlar ve glia hücreleri doku bütünlüğünü korumak veya yeniden düzenlemek için bir arada uyumla çalışırlar (119-121).

Organizmada bağışıklık sistemi, doğal ve edinilmiş bağışıklığı içermektedir. Doğal bağışıklık özgül değildir. Ekzojen ve endojen uyaranlara karşı spesifik olmayan yanıtta sorumludur. Doğal bağışıklıkta rol alan ana hücreler; makrofajlar, mast hücreleri ve dendritik hücrelerdir. Genellikle antijen sunumunu takiben, kompleman sisteminin aktivasyonu gerçekleşir ve hafiften şiddetliye kadar değişen oranda inflamatuvar yanıt ortaya çıkar (122).

Tam inflamatuvar yanıtta; vazodilatasyon, plazma bileşenlerinin ve kan hücrelerinin ekstrasvazasyonu ve bunlara bağlı olarak rubor (kızarıklık), calor (ısı artışı), tumor (şişme), dolor (ağrı/acı) ortaya çıkar. İnflamatuvar yanıtın ileri evrelerinde fagositoz ve nekroz sonrasında ise bu alanlarda yeni bağ dokusu (fibrozis) ve granülom oluşumu görülmektedir. Merkezi sinir sistemi ve periferik bağışıklık sistemi iletişim halindedir. Bunun kanıtıysa vücutta oluşan inflamasyona ateş, uyku artışı/halsizlik ve hiperaljezinin eşlik etmesidir (119, 121-126).

Merkezi sinir sisteminde görülen inflamasyonun periferik inflamasyondan bazı farklılıkları vardır. Öncelikle santral sinir sisteminde yer alan yapıları vücudun geri kalanından sınırlayan bir kan-beyin bariyeri vardır. Kan-beyin bariyeri sebebiyle küçük damarların ve kapillerlerin geçirgenliği vücudun geri kalanına göre düşüktür. Dolayısıyla, kompleman aktivasyonu ve lökositlerin MSS parankimasına geçişi zordur. Bunun yanı sıra, MSS parankimi yerleşik dendritik hücrelerden yoksundur; onların yerine perivasküler makrofajlar ve vasküler perisitler fonksiyon görmektedir. Bu

hücreler dışında, MSS'nin bağışıklık fonksiyonu gören ana hücreleri, yerleşik hücrelerinden mikroglia hücreleri ve astrositlerdir. Fizyolojik koşullarda bu hücrelerin immun aktiviteleri baskılanmaktadır, MSS patolojilerinin görüldüğü durumlarda ise aktifleşmektedirler. MSS, dendritik hücreler ve diğer edinilmiş bağışıklık hücrelerinden nispeten yoksul olduğu için bu hücrelerin immun yanıtları yeterince etkili değildir (121-125).

Nöroinflamasyon akut veya kronik olabilir ve kronikleşmesi doku hasarı, ödem ve hatta hücre ölümlerine yol açabilir (119, 120, 127). Bu süreç çeşitli sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türevleri (ROS) ve ikincil haberciler ile kontrol edilmektedir. Bu mediyatörler; mikroglia hücreleri, astrositler, endotel hücreleri ve perivasküler makrofajlar tarafından üretilir (6, 119, 121, 124, 128).

### **2.3.1. Mikroglia Hücreleri ve Nöroinflamasyon**

Mikroglia hücreleri nöroinflamasyonda rol alan ana oyunculardır. Mikroglia hücreleri MSS'de hem gri hem de beyaz cevherde yer almaktadır ve toplam hücre popülasyonunun yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (119, 126). Mikroglia hücreleri, vitellus kesesi, ilkel eritromyeloid öncül hücrelerinden köken alır, merkezi sinir sistemi gelişecek alana (nöroektoderme) göç eder (129).

Makrofajlarla aynı kökene sahiptir ve makrofajlarla benzer aktivite gösterirler, çeşitli sitokin ve kemokinlerin mikroglia hücreleri tarafından da üretildiği bilinmektedir (129). Yenilenme hızı düşüktür, dolayısıyla yaşlanma, stres ve çeşitli hasar durumlarında ortaya çıkan pro-inflamatuar etkilere karşı hassastır (126).

Aktif mikroglialar ve nöroinflamasyondaki sinyal yolları erken beyin gelişiminde de görülmektedir. Vitellus kesesinden köken alıp göç etmeye başlayan mikroglia hücreleri, bu sırada bazı değişiklikler gösterirler ve periferik makrofajlardan bazı farklı özellikler sergilerler (126, 130).

Erişkin merkezi sinir sistemindeki mikroglia hücreleri kompleks bir morfolojiye ve pek çok işleve sahiptir (126). Nöron aktivitesinin ve sinaptik işlevin düzenlenmesinde rol alırlar. Bu işlevlerini, sinapslara doğru uzantılar göndererek gerçekleştirirler (126). MSS gelişimde nöronlarda apoptozun düzenlenmesinde ve

fagositozda da görevleri vardır. Farklı MSS bölgelerinde mikroglialar ile tetiklenen apoptoz örnekleri tanımlanmıştır. Beyincikte süperoksit iyonlarının ortama salınmasıyla, retinada NGF (sinir büyüme faktörü) aracılığıyla, spinal kordda tümör nekroz faktörüyle (TNF- $\alpha$ ), neonatal farelerin hipokampusünde ise kompleman reseptörü 3 (CD3) ile apoptoz tetiklenmektedir (126).

Genel olarak mikroglia hücrelerinin aktive olması merkezi sinir sistemini ve organizmayı korumak açısından yararlıdır ancak; kronik veya yüksek düzeyde mikroglial aktivasyon, güçlü patolojik değişikliklere ve depresyon, kognitif disfonksiyon gibi klinik bulgulara yol açabilir (131). MSS ve bağışıklık sisteminin yakın ilişkide olmasından ötürü, mikroglia hücreleri periferde ortaya çıkan inflamasyona yanıtta da rol alır. Aktive olmalarıyla inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi gerçekleşir ve MSS'ye lökosit geçişi artar (131).

Makrofajlara benzer şekilde mikroglia hücrelerinin de M1 ve M2 olmak üzere iki alt tipi vardır. M1 mikroglia hücreleri pro-inflamatuvar özellik sergilerler. LPS/IFN- $\gamma$  ile indüklenirler, aktivasyonları ile inflamatuvar özellikteki TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$  , IL-6, IL-12, ROS, NO ortamda artar. M2 mikroglia hücreleri ise anti-inflamatuvar özelliktedir. IL-4,IL-13 ile indüklenirler. M1 antagonisti olarak immunosupresif etkilidirler, doku onarımını desteklerler, aktivasyonlarıyla ortamda IL-4, IL-13, IL-10 ve TGF- $\beta$  artar (132) (Şekil 2.3).

### **2.3.2. Astrositler ve Nöroinflamasyon**

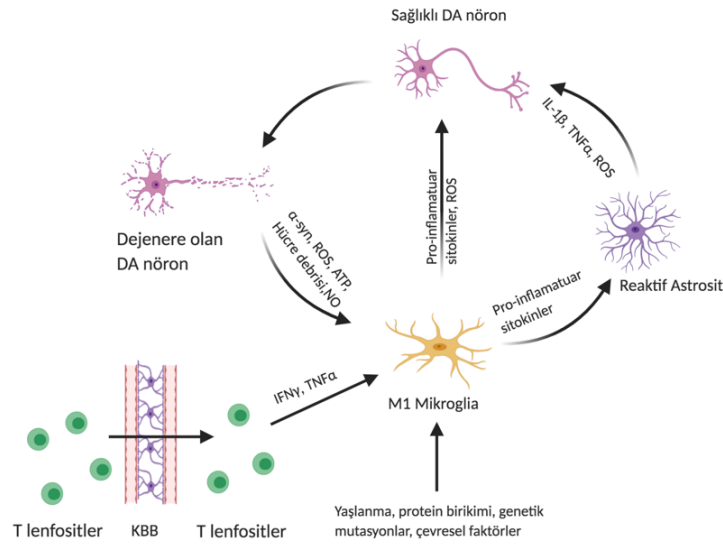
Mikroglia hücreleri nöroinflamasyonda rol oynayan ana oyuncular olmakla birlikte, son yıllarda bu süreçte astrositlerin işlevleri de araştırılmaya başlanmıştır. Mikroglia hücreleri gibi, astrositler de IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar uyarılara pro-inflamatuvar sitokinler üreterek yanıt verirler (133). Reaktif astrogliozis; hücrede hipertrofi, artmış uzantılar ve GFAP artışı ile karakterizedir (134). Astrosit cevabı mikroglial hücrelerin aktivasyonuna göre daha yavaş meydana gelmektedir. Bu sebeple, inflamatuvar yanıt önce mikroglia hücrelerinde başlar. Astrositler, aktif mikroglia hücrelerinden salınan pro-inflamatuvar mediyatörler ve çeşitli moleküller tarafından aktive edilir ve bu sinyaller astrositler tarafından güçlendirilir (134). Ayrıca

MSS'de hücreler arasında geçiş yapabilen  $\alpha$ -syn proteininin astrositlerde de birikerek nöroinflamasyon sürecine katkıda bulunduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur (6) (Şekil 2.3).

### 2.3.3. T lenfositler ve Nöroinflamasyon

Periferel bağışıklık sisteminin ana elemanlarından T hücreleri de nöroinflamasyon sürecinde rol oynamaktadır. Yardımcı T lenfositler (CD4+) ve sitotoksik (CD8+) T lenfositler, immün yanıtta rol oynarlar. CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin MSS'ye infiltrasyonu, post-mortem Parkinson hastalığı örneklerinde gözlenmiştir (135). Th1, Th17 ve CD4+ T lenfositler, mikroglia hücrelerinin nörotoksik M1 tip fenotip kazanmasına yol açarak nöroinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimine neden olurken; Th2, Treg ve bazı CD8+ T lenfositler, M2 tip mikroglia hücrelerinin artışı ve BDNF salınımını destekler (6).

**Özetle;** nöroinflamasyon sürecinde rol alan hücreler, aktif mikroglia hücreleri, astrositler, endotel hücreleri ve perivasküler makrofajlardır. Nöroinflamasyonda hücreler arasındaki sinyalleşmeden sorumlu başlıca sitokin ve kemokinler ise; pro-inflamatuar etkili sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ , kemokinlerden CCL2, CCL5, CXCL1, ikincil mesajcılar NO, prostaglandinler ve reaktif oksijen türevleridir (124) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Nöroinflamasyonda rol oynayan ana hücreler ve nöroinflamasyon süreci (133) (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

#### 2.3.4. Nöroinflamasyonun Olumlu ve Olumsuz Yönleri

Nöroinflamasyonun vücutta olumlu veya olumsuz sonuçları olabilir. Fizyolojik nöroinflamasyon, olumlu sonuçlar doğururken; patolojik nöroinflamasyonun sonuçları olumsuz olmaktadır (119, 136).

Fizyolojik nöroinflamasyonu açıklamaya yardımcı olacak bazı araştırmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan biri, nöroinflamasyon sırasında ortamda artan IL-1'in, mikroglia hücrelerinin lokal progenitör hücrelerden üretimini, yani mikroglia hücrelerinin kendini yenilemesini desteklediğini (136) göstermektedir. Doğal bağışıklık hücrelerinden T hücreleri üzerine yapılan bazı araştırmalarda, hipokampusta nörogenezin yetişkinlerde belli bir miktar devam ettiği gösterilmiştir. Post-travmatik nöral sağ kalım ve fonksiyonel iyileşme için MSS'ye T hücre geçişinin önemi büyüktür (135). Bazı durumlarda göç ederek yerleşen T hücreleri, mikroglia hücrelerinin işlevlerini nöral hücre sağ kalımını ve yenilenmesini destekleyecek şekilde şekillendirirler (137). Bu bilinenler ışığında T hücrelerinin nörodegeneratif hastalıklardaki rolü üzerine düşünölmeye başlanmıştır. T hücreleri, mikroglial aktivite ve hipokampal nörogenez arasındaki ilişki incelendiğinde, immun yetersizliği olan farelerde nörogenezin gerçekleşmediği görölmüştür (138). T hücreleri, BDNF gibi

faktörleri salgılayabilirler ve bu sitokinlerle MSS hücrelerinin (mikroglia hücreleri gibi) salgılarını düzenleyebilirler. BDNF, öğrenme, hafıza ve yetişkin nörojenezi de dahil olmak üzere birçok hipokampal aktivitenin önemli bir bileşenidir (139).

Tablo 2.4'te nöroinflamasyonun olumlu ve olumsuz sonuçları özetlenmiştir.

**Tablo 2.4.** Nöroinflamasyonun olumlu ve olumsuz sonuçları (119)

| Nöroinflamasyonun Olumlu Sonuçları                | Nöroinflamasyonun Olumsuz Sonuçları                            |
|---|--|
| Sitokin aracılı hastalık yanıtı                   | Stres ve depresyon artışı                                      |
| Gelişim, hafıza ve öğrenme üzerine olumlu etkiler | Yaşlanma   |
| Doku hasarı onarım sürecini etkileme              | MSS hücrelerinde hücre içi patolojik birikimlerin tetiklenmesi |

**Sitokin aracılı hastalık yanıtı:** Nöroinflamasyon gerektiği kadar ve kontrol altında olduğunda, özellikle enfeksiyonlara yanıt sırasında konağı koruyucudur. Ateş, artmış uyku ve azalmış fiziksel aktiviteden sorumludur. Mikroglia hücreleri ve astrositlerin kısa süreli ve geçici aktivasyonu sonucu olur. IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  ortamda artan başlıca sitokinlerdir. Kan beyin bariyeri korunur, periferik bağışıklık hücreleri MSS'ye geçmez ve nöropatoloji yoktur (119).

**Gelişim, hafıza ve öğrenme:** Beyin gelişimi, hafıza ve öğrenme süreçlerinde nöroinflamatuvar sinyal yolları etkindir. IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  bu süreçlerde rol alan ana sitokinlerdir. Motor öğrenme, motor korteksin gelişimi sırasındaki kortikal sinaptik bağlantılar ile ilişkilidir. Mikroglia hücrelerinden kaynaklanan BDNF sinaps oluşumunu destekleyerek öğrenmeye katkıda bulunur (119, 126, 130).

**Doku hasarı onarım süreci:** Doku hasarı inflamatuvar yanıtları ve onarım sürecini aynı anda uyararak aktif nöroinflamasyon ve aktif doku onarımının eş zamanlı gerçekleşmesine sebep olur. Hasar sonucunda ortaya çıkan ölü hücrelerin ve miyelinin fagositozu, onarım ve yeniden büyümeye yardımcı bir mikroçevre oluşması için gereklidir. Mikroglia hücrelerinin ve makrofajların aktivasyonu, intrinsik onarım için çok önemlidir ve bu hücreler fazla miyelinin ortamdaki uzaklaştırılması ve oligodendrosit rejenerasyonunu desteklemeye yardımcı olur. IL-4 ve IL-13 sitokinleri tarafından indüklenen M2 makrofajlar, onarım sırasında hem anjiyogenezi hem de



akson rejenerasyonunu arttırır (119). Ayrıca, TLR4 reseptörlerinin aktivasyonu ile oligodendrosit oluşumunu da arttırabilir (140).

Patolojik nöroinflamasyon; enfeksiyon, yaralanma, inme, nörodejeneratif veya otoimmün hastalıklar (Multiple Skleroz gibi) ile sıklıkla birlikte görülür (141). Bunun sonucunda; vasküler oklüzyon, iskemi, hücre ölümü ve sekonder inflamatuvar yanıt ortaya çıkabilir. Patolojik nöroinflamasyonda, MSS'de inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretiminde artış, periferik immün hücrelerin MSS'ye infiltrasyonu, ödem, artmış kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve hatta yıkımı ve glia hücrelerinin aktivasyonu görülür (142).

**Stres ve Depresyon:** Travmatik veya kronik stresörlere bağlı ortaya çıkan yanıtta mikroglia hücrelerinden inflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımı artmaktadır (143). Tekrarlanan sosyal deneylerde beynin strese duyarlı bölgelerinde (korku ve tehdit değerlendirme merkezleri) mikroglia hücrelerinde artan Iba-1 immunoreaktivitesi gözlenmiştir. Bu yanıt noradrenerjik sinyalleşmeye bağlanmıştır (144). Sempatik aktivasyon dolaşıma salınan pro-inflamatuvar monositlerin üretimini de arttırır. Kronik stresin ardından bu monositlerin MSS'ye geçişi, anksiyete benzeri davranışların gelişmesi ile ilişkilidir. Monosit salınımı veya MSS'ye geçişi engellendiğinde anksiyetenin gelişmediği gözlenmiştir (145). Ayrıca, majör depresif bozuklukta (MDB) ve şiddetli psikiyatrik hastalıklarda; periferde artan inflamatuvar sitokinlerle, intihar oranı arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir (146).

**Yaşlanma:** Yaşlanma ile hem periferik immün sistem hücrelerinde hem de MSS hücrelerinde bazı değişiklikler görülür. Yapılan çalışmalarda, yaşlı farelerin dentat giruslarındaki mikrogliaların sayısının kök / progenitör hücrelerin sayısı ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir (147). Mikroglialarda daha yüksek inflamatuvar profil bildirilmiştir. Bununla ilişkili olarak; MHC II, CD68, CD11b ve CD11c, TLR'ler ve CD86 artmaktadır (148-152). IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonları artarken, IL-10 ve IL-4 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonları ise azalmaktadır (153).

**MSS hücrelerinde hücre içi patolojik birikimlerin tetiklenmesi:** Multiple Skleroz (MS), Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) dahil olmak üzere

bir çok MSS patolojisinde hücre içi birikimler görülmektedir (154). MSS hücrelerinde nöroinflamasyonun indirekt etkilerine bağlı hücre fizyolojisini bozacak birikimler görülebilmektedir ve bunlardan en önemlisi demir birikimidir (154). IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ , demir taşıyıcılarının ifadenmesinde değişikliğe sebep olarak, nöronlar ve mikroglia hücrelerinde demir birikimini tetikler (155).

### 2.3.5. Nöroinflamasyonun Parkinson Hastalığındaki Rolü

MSS dejenerasyonu, fonksiyonel ve zihinsel bozukluklarla sonuçlanan, nöronlarda yapı ve işlevlerin kronik progresif kaybıyla karakterizedir. Nörodejenerasyon sıklıkla ileri yaşta ortaya çıkar ve toplumda en sık görülen örnekleri Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, MS ve ALS'dir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, nöroinflamasyon nörodejeneratif hastalıklardaki pek çok yolakta rol almaktadır (124). İnflamasyon ve ortamdaki nörotoksik faktörlerin miktarındaki artış, nörodejeneratif hastalıkların klinik seyrini ağırlaştırabilmektedir (156). Burada inflamasyonun kronikleşmesi ile eş zamanlı olarak anti-inflamatuar mekanizmaların yetersiz kalması da söz konusudur (124). Bu süreçte nörotoksik mediyatörler; protein derivasyonu, mitokondriyon disfonksiyonu, aksonal transportta bozulma ve apoptoza neden olmaktadır (124).

1988 yılında McGeer ve arkadaşları, post-mortem beyin dokusunda substantia nigra pars compactada reaktif mikroglia hücrelerinin varlığını gösterdiklerinde, ilk kez PH patogenezinde nöroinflamasyondan söz edilmiştir (157). Bunun üzerine yapılan ileri çalışmalarda TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  düzeylerinin de yükseldiği görülmüştür (133).

Hücre dışı alana çıkan  $\alpha$ -syn proteini, diğer nöronlar ve glia hücreleri (mikroglia hücreleri, astrositler, oligodendrositler) tarafından endositoz ile hücre içine alınabilmektedir. Literatürde nöroinflamasyonda rol oynayan reseptörler olarak üzerinde durulanlar, TLR reseptör ailesinden TLR2 (9), TLR4 (158) ve Parkinson hastalığındaki rolü yeni tanımlanmış olan LAG3 (11) reseptörleridir. Hücre dışı alandan diğer hücrelere endositozla geçen  $\alpha$ -syn proteini inflamatuvar sitokinlerin üretimini tetiklemekte ve böylece nöroinflamasyonun şiddetlenmesine neden olmaktadır (133). Bu süreçte başrolde özellikle mikroglia hücreleri ve astrositler

bulunmaktadır. Nöron hücrelerine alınan  $\alpha$ -syn ise hem inflamasyonu tetiklemekte hem de dopaminerjik nöronlarda hücre ölümünün tetiklenmesinde rol almaktadır (133).

#### **2.4. N-Asetilsistein ve Parkinson Hastalığı**

N-asetilsistein (N-asetil sistein, N-asetil-L-sistein veya NAC olarak da bilinir) uzun zamandır çeşitli klinik uygulamalarda yeri olan, iyi tolere edilebilen, minör yan etkileri olan, güvenli, FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir ilaçtır (12). İntravenöz (iv), oral veya inhaler formlarda farmasötik olarak uygulanabilir. Oral uygulama sonucunda diğer formlara göre göreceli olarak düşük biyoyararlanıma sahiptir (159, 160). Bunun sebebi, bağırsak mukozasında gerçekleşen N-deasetilasyon ve karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğramasıdır (160). NAC düşük toksisiteye sahiptir ve bulantı, kusma, burun akıntısı, kaşıntı ve taşikardi gibi hafif yan etkiler ile klinikte karşılaşılabılır (161).

NAC, mukolitik olarak klinikte sık kullanılmasının yanı sıra; asetaminofen (parasetamol) zehirlenmesi, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksikite, stabil anjina pectoris, iskemi-reperfüzyon kardiyak hasarı, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), bronşit, kemoterapi kaynaklı toksisite, radyokontrast ilaç kullanımıyla ilişkili nefropati, ağır metal toksisitesi, şizofreni, bipolar bozukluk ve bağımlılık gibi çeşitli psikiyatrik bozukluklarda kullanılmaktadır (159, 161, 162). Son yıllarda yapılan prelinik araştırmalara dayanarak, NAC'nin oksidatif stres, nörogenez, apoptoz, mitokondriyal disfonksiyon, nöroinflamasyon, glutamat ve dopamin nörotransmitter sistemlerinin disregülasyonu ile ilişkili olarak psikiyatrik ve nörolojik hastalıklarda rol oynayan patofizyolojik süreçleri değiştirebileceği üzerinde durulmaktadır (163). Bu çalışmaların ışığında psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarda daha çok denenmeye ve özellikle bazı nörodejeneratif hastalıklarda (AH ve PH gibi) klinik çalışmalar yürütülmeye başlanmıştır. Klinik çalışmaların bazıları tamamlanmış, bazıları ise hala devam etmektedir (12, 162, 163).

NAC, L-sisteinin aminoasidinin N-asetil türevidir. Oral uygulamayı takiben emilir ve kan beyin bariyerini geçebilir (13, 14). L-Sistein, beynin pro-oksidan

ortamında sistine oksitlenir. Sistin, sistin-glutamat antiport taşıyıcısının substratı olup, hücre dışı glutamat düzeylerini düzenler ve hücreye sistin girişini kolaylaştırır (160). Hücre içinde sistin sisteine indirgenir (160). Sistein, ana endojen antioksidan molekül olan glutatyonun (GSH) bileşenidir. GSH; glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) olmak üzere üç peptitten sentezlenir (160). Sistin-glutamat antiporterinin artmış aktivitesi, 2-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonat (AMPA) ve N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörleri üzerinde etkili olan hücre dışı glutamatın artmasına yol açar (14, 160).

#### **2.4.1. Antioksidan ve Anti-inflamatuar Etkiler**

NAC, antioksidan etkisini serbest radikalleri hücrede hasara sebep olmadan nötralize ederek gösterir. Hem sistin glutamat antiporter aktivitesini hem de GSH biyosentezini düzenleyerek antioksidan etki gösterir (164, 165). NAC'nin antioksidan aktivitesi, hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), azot dioksit ( $\cdot\text{NO}_2$ ), karbonat ( $\text{CO}_3^{(2-)}$ ) gibi radikallerle hızlı ve süperoksit anyonu ( $\cdot\text{O}^{2-}$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) ile nispeten yavaş etkileşimlerine bağlıdır (12). ROS hücrede lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonunda rol oynar ve hücre ölüm yollarının aktifleşmesini tetikler (12). ROS ve Reaktif Azot Türleri (RNS) bu mekanizmalar üzerinden nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde önemlidir (12, 165).

Yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki NAC; immun yanıtın erken dönemlerinde sitokin salınımını azaltabilmektedir. NAC kullanımı ile, septik şokta veya hemodiyaliz hastalarında TNF- $\alpha$ , IL-1, ve IL-6 gibi sitokinlerin miktarında azalma görülebilmektedir (166). Ayrıca bazı hayvan modellerinde ve hücre hatlarında, lipopolisakaritlerle indüklenen inflamasyonda, inflamatuvar sitokinlerin varlığı NAC uygulamasıyla azaltılabilmektedir (166, 167). Proinflamatuvar sitokinleri azaltmanın yanı sıra, inflamasyon sürecinde etkili yollardan biri olan NF- $\kappa\text{B}$  (Nuclear Factor kappa B) yolağı aktivasyonunu da engelleyerek yine anti-inflamatuar etki gösterir (12, 163).

### 2.4.2. Nörotransmisyon Üzerine Etkileri

NAC, glutamat ve dopamin nörotransmitterleri başta olmak üzere santral sinir sisteminde görev yapan, özellikle nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarda etkili bazı nörotransmitterler üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (12).

**Glutamat:** Glutamat sentezi, salınımı, sinaptik seviyeleri ve geri kazanılması sıkı bir şekilde kontrol edilen bir sistemdir ve bu sistemde bir işlev bozukluğu başta şizofreni ve bağımlılık olmak üzere bir çok psikiyatrik hastalığın patofizyolojisinde yer almaktadır (14). Ayrıca uyarıcı (eksitatör) etkili glutamatın epilepsi, travma, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Alzheimer Hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda rol aldığı da bilinmektedir (168). NMDA glutamat reseptörünün aşırı aktivasyonu, nöron hasarı ve dejenerasyon patolojileriyle ilişkili bulunmuştur (169). Sistin/glutamat antiporterı bu sistemin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır ve ağırlıklı olarak glia hücrelerinden astrositlerde ifade edilir (170, 171). NAC uygulaması, sistin/glutamat antiporterını merkezi sinir sistemine sistin sağlayarak aktive edebilir ve böylece glutamaterjik nörotransmisyonu modüle edebilir (14). Glutamat salınımının düzenlenmesine ek olarak; NAC, GSH veya türevleri aracılığıyla, NMDA aktivitesini modüle etme kapasitesine sahiptir. Bu etkiler NAC'nin glutamaterjik nörotransmisyonunda hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkili olduğunu göstermektedir (14). Bu yönleriyle ele alındığında NAC'nin nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarda töröpatik etkiye sahip olabileceği düşünülebilir (14, 163).

**Dopamin:** Dopamin, şizofreni ve Parkinson hastalığı gibi birçok nöropsikiyatrik bozukluğun patolojisinin temelini oluşturan mekanizmalarda yer almaktadır (172). Bu sebeple NAC'nin dopamin üzerine olan etkileri önem taşımaktadır. NAC, GSH ve L-sisteinin antioksidan etkileri üzerinden hücrenin redoks durumunu modüle ederek dopamin salınımını düzenleyebilir (14). Dopamin spontan oksitlenmeye yatkın bir moleküldür (173). Hidrojen peroksit ve serbest radikaller ile okside olabilir, bu durumda nörotoksisiteyi önemli ölçüde tetikler veya arttırır (173). Metamfetamin, güçlü bir şekilde dopamin salınımını ve nöronal apoptozu tetikleyen bir ajandır (174). NAC, metamfetaminin neden olduğu oksidatif stresi azaltır ve aşırı dopamin salınımı

sonucu ortaya çıkan dopamin taşıyıcısının down-regülasyonunu önler (175). Farmakolojik bir ilaç olarak MAO inhibitörlerinin kullanımı, oksitlenmiş dopamin ürünü olan DOPAL'ın endojen seviyelerini düşürmekte ancak dopaminin spontan oksidasyonunu arttırmaktadır (176). Ancak görülmüştür ki; NAC MAO inhibitörleriyle birlikte kullanıldığında, DOPAL seviyelerindeki düşüşü etkilemeden dopaminin spontan oksidasyonunu azaltmaktadır (176). Ayrıca NAC, presinaptik terminallerden dopamin salınımını glutamerjik nörotransmisyonu düzenleyerek etkilemektedir (177). Görülmektedir ki, NAC'nin bir GSH öncülü olarak oksidatif stres ve dominerjik yollar üzerinden terapötik etkileri mevcuttur (14, 163).

**Serotonin:** Serotonin (5HT) düzensizliği şizofreni, otizm, duygu durum bozuklukları, OKB, bağımlılık gibi pek çok psikiyatrik bozukluğun altında yatan mekanizmalarda yer alması nedeniyle pek çok psikofarmakolojik ajanın tedavi hedefi olmuştur (178). Serotonerjik nörotransmisyonda NAC'nin rolü henüz ayrıntılı olarak gösterilmemiştir (163). Literatürde NAC'nin, hayvanlar üzerinde oluşturulmuş bir psikoz modelinde serotonerjik reseptör 5-HT<sub>2A</sub>R agonistinin halüsinojenik etkisini bloke ettiği gösterilmiştir. Burada, sistein/glutamat antiporter aktivasyonu rol oynamaktadır (179). Bu da glutamaterjik ve serotonerjik nörotransmisyon arasındaki etkileşimi ve NAC'nin bu sistemler üzerinden etkisini yansıtıyor olabilir (179).

### 2.4.3. Parkinson Hastalığı ile İlişkisi

Parkinson hastalığının altında yatan hücrel mekanizmalara bakıldığında, özellikle nöroinflamasyon ayağı ele alındığında, inflamatuvar ve oksidatif süreçlerin hücrelerde ve hücrelerin içinde bulunduğu mikro çevrede ne kadar etkili ve önemli olduğu görülmektedir (125). Dopaminin hücre içi ve hücre dışı metabolizmasında bozukluklar ve bu bozuklukların oksidatif yollar üzerindeki önemi, ROS oluşumunda mitokondriyonların rolü, nörotransmisyonda görülen bozuklukların oynadığı roller, ve iyon dengesindeki değişimlerin bu süreçlerdeki etkileri açıklanmıştır. Bu patolojilerin çoğu yaşlanma ile ilişkili olduğundan yaşlanmanın PH etiolojisindeki yeri yadsınamayacak kadar büyüktür (125).

Klinikte PH için uygulanan tedaviler hastalıkta tam bir iyileşme sağlamamakla birlikte semptomların ilerleme hızını kontrol altına alma üzerine etkilere sahiptir (180). Sıklıkla dopamin kaybını yerine koymak amacıyla uygulanan Levodopa (L-dihidroksifenilalanin veya L-DOPA) ajanı tedavide kullanılmaktadır. Motor dalgalanmalar ve ilaca bağlı gelişen diskinezi, ilacın kullanımını kısıtlayan yan etkileridir. Bu yan etkilere rağmen klinikte sağ kalım sürelerini uzattığı bilinmektedir (181). Klinikte L-DOPA'ya ek olarak dopamin agonistleri de tedaviye eklenebilmektedir.

Hastalığın ilk dönemlerinde özellikle GSH azalması gözlenmektedir ve GSH eksikliği hastalığın ciddiyeti ile korelasyon göstermektedir (182). Bu süreçte ortaya çıkan ROS etkisiyle mitokondriyal hasara yatkınlık artmaktadır. ROS ve RNS oluşumundaki artış, GSH azalmasıyla ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda mitokondriyon zarında bulunan kompleks I'de inhibisyon ve buna bağlı olarak mitokondriyal disfonksiyon gelişmektedir (183).

Hücre için toksik olan  $\alpha$ -syn çeşitlerinin hücrelerde birikimi PH'de rol oynayan önemli patolojik değişikliklerden biridir. Oksidatif stres patolojik  $\alpha$ -syn proteininin birikimini ve hücre içinde dopaminin spontan oksidasyonunu arttırmaktadır. Oksidatif hasarın etkisi göz önüne alındığında klinik tedaviye bazı antioksidan ajanların eklenmesi daha önce de denenmiştir (184).

GSH'nin farmakolojik olarak tedaviye eklenmesi oldukça zor görünmektedir. Uygulama sonrası çok kısa (yaklaşık 3 dakika) yarı ömre sahip olması ve terapötik doza ulaşmak için çok yüksek miktarlara ihtiyaç duyulması kullanımını sınırlandırmaktadır (12). NAC, sistein öncülü olarak GSH üretimini arttırıcı etkiye sahiptir (160). Yaşlı fareler üzerinde yapılan bir *in vivo* deneyde, NAC kullanımında farelerin presinaptik terminallerinde bulunan mitokondriyonlar incelendiğinde kompleks I ve IV aktivitelerinde artış görülmüştür (185, 186). Bunun yanı sıra başka çalışmalarda farelerin beyinlerinde GSH seviyelerinde artış, oksidatif hasarın azalması, artmış beyin sinaptik ve sinaptik olmayan bağlantıları gözlenmiştir (12, 187, 188).

İnflamasyonda aktivitesi artan NF-kB yolağının da NAC uygulaması sonrası aktivitesinde azalma görülmüştür (189). Özellikle hastalığın erken dönemlerinde NAC kullanımının inflamasyonun önüne geçmede etkili olabileceği düşünülmektedir (190).

**Özetle,** NAC'nin Parkinson hastalığındaki etkileri dopamin metabolizmasının düzenlenmesi, nörotransmisyonunda meydana gelen değişiklikler sebebiyle ortaya çıkan hücresel stresin ve mitokondriyal disfonksiyonun azaltılması, mitokondriyadaki kalsiyum dinamiklerini düzenleyerek hücre içi Ca<sup>2+</sup>'nin düşürülmesi, mitokondriyal toksisiteyi önleyerek mitokondriyon disfonksiyonuna bağlı ROS üretiminin azaltılması, ROS ve RNS çeşitlerine bağlı oksidasyon ve patolojik  $\alpha$ -syn proteininin birikiminin azaltılmasına katkıda bulunma şeklindedir (12, 191).

### **Tezin Gerekçe ve Varsayımı**

Parkinson Hastalığı, bir çok sistemin etkilendiği motor ve non-motor klinik belirtilerle seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın ilerlemesinde rolü bulunan inflamasyon sürecinde özellikle alfa-sinüklein ( $\alpha$ -syn) proteinin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu protein hem hücre içinde sitoplazmada veya hücre zarı yapısına bağlı olarak, hem de hücre dışı alana geçerek hasara sebep olabilmektedir. Hücreler arası alana geçen  $\alpha$ -syn proteininin endositozunda rol aldığı bilinen reseptörlerden ikisi TLR2 ve LAG3 reseptörleridir. LAG3 reseptörünün bu işlevi literatürde yeni tanımlanmıştır ve bu rolü ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Oluşan nöroinflamasyonda özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 rol almaktadır.  $\alpha$ -syn proteini nöroinflamasyonu tetiklemenin yanı sıra, hücre içinde mitokondriyal yolak üzerinden apoptoz ve mitofajiyi tetikleyerek nöronların ölümüne yol açmaktadır. Günümüzde Parkinson hastalığının kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Klinik belirtileri hafifletmeyi ve hastalığın ilerleyişini yavaşlatmayı amaçlayan çeşitli tedavi protokolleri uygulanmaktadır.

Bu bilgiler ışığında çalışmanın hipotezleri aşağıdaki gibi oluşturulmuştur;

**1.** Parkinson hastalık modelinde  $\alpha$ -syn ve TNF- $\alpha$ 'nın ekstrasellüler alanda artışı,  $\alpha$ -syn'in endositozunu sağlayan LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır.



2. Parkinson hastalık modelinde  $\alpha$ -syn ve TNF- $\alpha$  ile tetiklenen inflamatuvar ve apoptotik süreç N-asetilsistein uygulamasıyla kontrol altına alınabilir, bunun sonucunda LAG3 ve TLR2 reseptörlerin ekspresyonları azalabilir ve hücre canlılığı arttırılabilir.

Kurulan hipotezler doğrultusunda çalışmanın amacı, *In vitro* ortamda inflamatuvar bir Parkinson hastalığı modeli yaratılarak, bu süreçte  $\alpha$ -syn proteininin endositozundan sorumlu reseptörlerin ekspresyonlarında değişim olup olmadığının incelenmesi, sonrasında NAC uygulamasıyla inflamasyonun kontrol altına alınması ve bu uygulamanın hücre canlılığına etkisi olup olmadığının değerlendirilmesidir.

Bu çalışma ile hastalığın inflamasyon sürecinin temelindeki mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılacaktır. Çalışma sonucunda hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanabilirse, Parkinson hastalığı için yeni *in vivo* ve *ifccn vitro* çalışmalara zemin oluşturulabilir ve henüz tedavisi bulunamamış bu hastalığın klinik tedavisine katkı sağlanabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması; Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora programı kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile Mayo Clinic Graduate School of Biomedical Sciences bünyesinde yer alan Prof. Dr. Pamela McLean'ın önderliğindeki McLean Laboratuvarına ait laboratuvar alt yapısı ve teknik donanım kullanılarak yurtdışı ortaklı bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Giriş bölümünde bahsedilen araştırma hedeflerini yanıtlamak amacıyla tanımlanan iş paketleri bu bölümde açıklanacaktır.

#### **Deney Tasarımı**

Bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda deney ve kontrol grupları içeren gözlemsel bir çalışma planlanmıştır. Yukarıda açıklanan hipotezleri test etmek amacıyla WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden insan nörogloma (H4) hücre hattı kullanılarak inflamatuvar bir Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuştur. Kullanılan hücre hattının özelliği WT  $\alpha$ -syn protein ekspresyonunun tetrasiklin (Tet) ile kontrol edilebilmesidir. Deney tasarımı çerçevesinde inflamasyon, TNF- $\alpha$  ile tetiklendiğinde  $\alpha$ -syn proteininin hücreye alımında rol oynayan reseptörlerde (LAG3 ve TLR2) artış olması beklenmektedir. İnflamasyon, anti-inflamatuvar bir ilaç olan NAC ile kontrol altına alındığında, inflamasyonun sebep olduğu hasarın azalması ve hücre ölümünün yavaşlaması beklenmektedir. Deney planı ve tasarlanan gruplar tablo 3.1'de görülmektedir.

**Tablo 3.1.** Planlanan çalışmanın deney planı. Hücre hatlarına uygulanan ilaçlar ve süreleri gösterilmektedir.

| Grup           | Hücre Hattı                                       | Tetrasiklin                                | TNF- $\alpha$<br>(75 ng/ml,<br>24 saat) | NAC<br>(2mM,<br>45 dakika) |
|----------------|---|--|---|----------------------------|
| Grup 1<br>(G1) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | +<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu baskılanmış | -                                       | -                          |
| Grup 2<br>(G2) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | -<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu aktif       | -                                       | -                          |
| Grup 3<br>(G3) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | +<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu baskılanmış | +                                       | -                          |
| Grup 4<br>(G4) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | -<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu aktif       | +                                       | -                          |
| Grup 5<br>(G5) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | +<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu baskılanmış | -                                       | +                          |
| Grup 6<br>(G6) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | -<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu aktif       | -                                       | +                          |
| Grup 7<br>(G7) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | +<br>$\alpha$ -syn ekspresyonu baskılanmış | +                                       | +                          |
| Grup 8<br>(G8) | WT $\alpha$ -syn overekspresyon eden H4 hücreleri | -  | +                                       | +                          |

### 3.1. İnsan H4 Nörogloma Hücre Hattı Kültürü

Literatürde nörodejeneratif hastalıkların altında yatan hüresel ve moleküler patolojilerin araştırılması, toksisite ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla planlanan in vitro deney modellerinde H4 hücre hattı sıklıkla kullanılmaktadır (70). Nörogloma hücre hattı ile primer nöron hücreleri karşılaştırıldığında, H4 hücre hattının primer nöronları taklit edebildiği ve ayrıca bu

hücre hattı ile biyokimyasal analizlerin yapılması, deneylerin tekrarlanması ve devamlılığı açısından daha avantajlı olduğu gözlenmiştir (192).

Ayrıca bu hücreler transfeksiyon yöntemi uygulanarak  $\alpha$ -syn proteinini aşırı sentezlemesi yönünde programlanabilmekte ve protein aşırı ekspresyonu tetrasiklin antibiyotiği uygulamasıyla kontrol edilebilmektedir (193). Bu tez çalışmasının deneylerinde kullanılmak üzere, McLean laboratuvarı bünyesinde üretilmiş stabil WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 hücre hattı Prof. Dr. Pamela J. McLean tarafından sağlanmıştır.

Hücreler, %10 fetal bovine serum (FBS), 200  $\mu$ g/ml Geneticin, 200  $\mu$ g/ml Hygromycin B içeren Opti-MEM (31985070, Gibco) besiyeri ile 37°C de %5 CO<sub>2</sub>, %95 hava sağlanan nemlendirilmiş inkübatörde takip edildi. Hücreler haftada bir kez pasajlandı ve düzenli aralıklarla mikoplazma kontaminasyonu açısından test edildi. Tabloda açıklanan grupların oluşturulması aşamasında bazı grupların takibinde (G1, G3, G5 ve G7)  $\alpha$ -syn proteininin ekspresyonunun durdurulması amacıyla besiyerine 0,1 $\mu$ l/ml tetrasiklin (Invitrogen) ilavesi yapıldı ve bu gruplardaki hücrelerin takibine tetrasiklin içeren besiyeri ile devam edildi. Hücreler deney süresince günlük olarak mikroskop altında görüntülenerek takip edildi. Görüntüleme Evos FL mikroskop (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) ile gerçekleştirildi.

### **TNF- $\alpha$ ve NAC Uygulamaları**

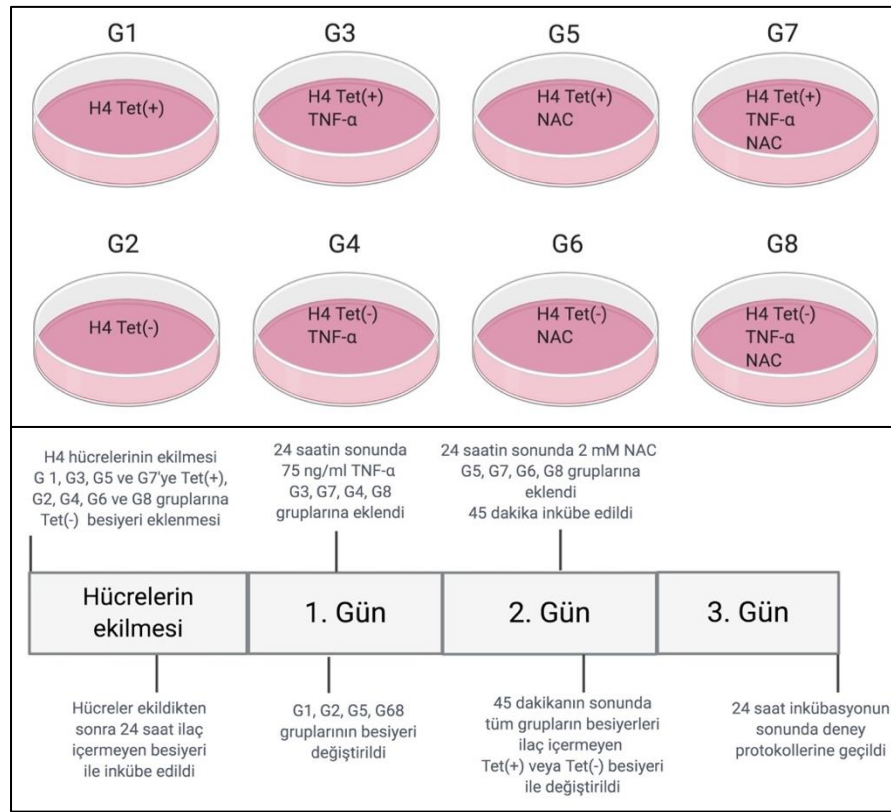
İnflamasyonu tetiklemek için kullanılan TNF- $\alpha$  ve anti-inflamatuar ilaç olarak uygulanan NAC'nin dozlarının belirlenmesi amacıyla literatür taraması yapıldı ve laboratuvarında optimizasyon testleri uygulandı.

Hücre kültürü ortamında toksisiteye sebep olmadan inflamasyonu tetikleyebilecek optimal TNF- $\alpha$  dozunu bulmak için hücrelere 25ng/ml, 50ng/ml, 75ng/ml ve 100ng/ml dozunda TNF- $\alpha$  uygulandı, 24 saat inkübe edildi ve AK testi (Toxilight testi) ile hücre ölümü değerlendirildi. Elde edilen veriler ışığında 75ng/ml dozunda TNF- $\alpha$ 'nın (Recombinant Human TNF- $\alpha$  #570106, Biolegend) besiyeri içerisinde uygulanmasına ve 24 saat inkübe edilmesine karar verildi. Yukarıdaki

tabloda belirtildiği üzere belirlenen dozda TNF- $\alpha$  uygulanan gruplar; Grup 3,4,7 ve 8'dir (Şekil 3.1).

Hücrelerde toksisiteye sebep olmayacak optimal NAC dozunu bulmak için H4 hücrelerine 1mM-10mM arasında artan dozlarda NAC 15 dakikadan 90 dakikaya kadar değişen sürelerde uygulandı. Hücre ölümünün değerlendirilmesi amacıyla AK testi (Toxilight testi) her doz için farklı sürelerin sonunda uygulandı. Elde edilen veriler ışığında NAC'nin (N-Acetyl-L-cysteine A9165, Sigma-Aldrich) besiyerinde 2mM konsantrasyonda çözülerek 30-45 dakika süre ile uygulanmasına karar verildi. Yukarıdaki tabloda belirtildiği üzere belirlenen dozda NAC uygulanan gruplar; Grup 5,6,7 ve 8'dir (Şekil 3.1).

Uygun NAC ve TNF- $\alpha$  dozuna karar verdikten sonra, TNF- $\alpha$  uygulaması sonrası NAC uygulandığında hücre cevabı için ne kadar beklenmesi gerektiğini optimize etmek amacıyla AK testi (Toxilight testi) uygulandı. H4 hücrelerine TNF- $\alpha$  uygulandıktan 24 saat sonra, 45 dakika süreyle NAC uygulandı, bu sürenin sonunda NAC içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve ilaç içermeyen hücre takip besiyeri kullanıldı. İlaç içermeyen takip besiyeri ile hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda Toxilight testi uygulanarak hücre ölümü değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre, NAC uygulandıktan sonra ilaç içermeyen besiyeri ile hücrelerin 24 saat takip edilmesinin yeterli olduğuna karar verildi. 48 ve 72 saat sonundaki verilere bakıldığında hücre ölümünün arttığı görüldü (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Deney düzeneği ve zaman çizelgesi (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

### 3.2. İnsan H4 Nörogloma Hücre Hattında İmmunositokimya Uygulaması

H4 hücrelerinde LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin gösterilebilmesi için, bu reseptörlerin ve  $\alpha$ -syn proteininin antikoru kullanılarak ikili işaretleme yöntemi ile immüno Floresan işaretleme yapıldı.

Flasklarda takip edilip konfluent olan H4 hücreleri PBS ile yıkanmayı takiben, tripsin (Trypsin-EDTA (0,25%)-25200056, Gibco) uygulaması sonrası 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelletten hücre sayımı yapıldı. 15 mm çapında cam coverslipler yerleştirilen 24 kuyucuklu plaklara her kuyucukta yaklaşık 5000 ( $5 \times 10^3$ ) hücre olacak şekilde hücreler transfer edildi. Her deney grubu için 2 coverslip yerleştirilen kuyucuk kullanıldı böylece deney sonunda gruplar için 2'şer örnek elde edildi. Hücrelerin tabana tutunması ve tetrasiklinin etkisinin tam olarak görülmesi için deney protokolüne başlanmadan önce hücreler, 24 saat uygun hücre kültürü koşullarında inkübe edildi. Sonrasında deney gruplarına ilk başlıkta açıklanan şekilde ilaçlar uygulandı ve deney protokolü tamamlandığında immüno sitokimya/

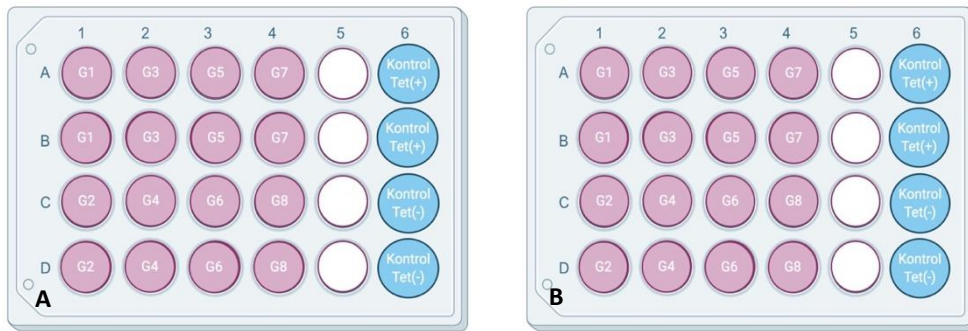
immünofloresan protokolüne geçildi. LAG3 ve  $\alpha$ -syn ikili işaretlemesi için ve TLR2 ve  $\alpha$ -syn ikili işaretlemesi için ayrı setler kuruldu ve aynı protokol izlendi (Şekil 3.2).

72 saatin sonunda kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücrelerin tespiti için kuyucuklara %4 paraformaldehit (PFA) eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika süreyle kimyasal fiksasyon uygulandı. Fiksasyon sonrası PBS ile 2 kere yıkanarak hücrelerden fiksatif uzaklaştırıldı. Uygulanacak antikörlerin permeabilizasyonunu sağlamak amacıyla hücelere 300  $\mu$ l PBS içerisinde hazırlanan %0,3 Triton X-100 eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Hücreler Triton X-PBS karışımı uzaklaştırılıp, PBS ile 2 kere yıkandı. Sonrasında primer antikör uygulaması öncesinde spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için hücreler 300  $\mu$ l PBS içerisinde hazırlanan %2 normal keçi serumu (NGS) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Anti-Lag3 antikoru (ab209236-Abcam, 1:200), Anti-TLR2 antikoru (ab16894-Abcam, 1:200), HRP anti- $\alpha$ -synuclein antikoru (807806-Biolegend, 1:1000),  $\alpha$ -synuclein antikoru (C-20) (sc-7011-Santa Cruz, 1:200) ve  $\alpha$ -Synuclein antikoru (CST #2628-Cell Signaling Technology, 1:400) belirtilen oranlarda %1 BSA içeren PBS içinde hazırlandı. Blok solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan primer antikörler her bir kuyucuğa 300'er  $\mu$ l olacak şekilde eklendi ve +4°C sıcaklığa sahip soğuk odada çalkalayıcı üzerinde gece boyunca bekletildi.

Ertesi sabah deney protokolüne devam edilmek üzere önce gece boyu primer antikör ile bekletilen hücreler PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı. Ardından 24 kuyucuklu plaklar floresan özellikli sekonder antikörler ile işaretleme yapılacağı için karanlık kutu içerisine aktarıldı. İkili işaretleme için farklı floresan ışımalara sahip Alexa Flour 488 (Primer antikörün farede üretilmiş olarak kullanıldığı deneylerde Goat anti-Mouse IgG, A-11001, ThermoFisher, 1:500 ve primer antikörün tavşanda üretilmiş olarak kullanıldığı durumlarda Goat anti-Rabbit IgG A-11008, ThermoFisher, 1:500) ve Alexa Flour 568 (Primer antikörün farede üretilmiş olarak kullanıldığı deneylerde Goat anti-Mouse IgG, A-11004, ThermoFisher, 1:500 ve primer antikörün tavşanda üretilmiş olarak kullanıldığı durumlarda Goat anti-Rabbit IgG A-11011, ThermoFisher, 1:500) sekonder antikörleri ile karışım hazırlandı. Oda sıcaklığında, 1

saat çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu sürenin sonunda hücreler PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı. 10 adet lama floresan ışımının solmasına karşı koruyucu DAPI (Vectasheild Mounting Medium with DAPI H-1200, Vector Laboratories) içeren kapama medyumunu damlatıldı ve coverslipler lamların üzerine yerleştirildi. İncelenmeden önce karanlık kutu içerisinde, oda sıcaklığında gece boyunca kurumaya bırakıldı. Ertesi gün immunofloresan işaretli örnekler ZEN yazılımına sahip inverted floresan mikroskop (Axio observer microscope, Carl Zeiss, Germany) ile görüntüledi. Görüntüleme sonrası incelenen alanlardan 13 tanesinde (en az 4 alan x 3 set), ImageJ (194) programı ile LAG3 ve TLR2 reseptörlerine ait floresan ışımaya yoğunlukları değerlendirildi. Floresan ışımaya yoğunlukları toplam alana oranlandı ve istatistiksel anlamlılık değerlendirildi.



**Şekil 3.2.** İmmunositokimya uygulaması deney düzeneği. A) LAG3 ve  $\alpha$ -syn ikili işaretlemesi, B) TLR2 ve  $\alpha$ -syn ikili işaretlemesi için oluşturulan düzenekler. (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

LAG3 ve  $\alpha$ -syn ikili işaretlemesi için ve TLR2 ve  $\alpha$ -syn ikili işaretlemesi için ayrı setler kuruldu ve aynı protokol izlendi. Kontrol kuyucularına primer antikor uygulanmadı, böylece primer antikorların doğru çalıştığı gösterildi.

### 3.3. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Reseptör

#### İfadelenmelerinin, Apoptoz Belirteçlerinin Düzeyinin ve İnflamasyonun Western Blot (WB) ile Değerlendirilmesi

H4 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında  $\alpha$ -syn proteininin, inflamasyon açısından IL-1 $\beta$  inflamatuvar belirtecinin, apoptoz açısından kaspaz-9, aktif kaspaz-9,



PARP ve kesilmiş PARP apoptoz belirteçlerinin, LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin ekspresyonlarının semikantitatif analizlerini yapmak amacıyla Western Blot yöntemi uygulandı.

Flasklarda takip edilip konfluent olan H4 hücreleri PBS ile yıkanmayı takiben, tripsin (Trypsin-EDTA (0,25%)-25200056, Gibco) uygulaması sonrası 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelletten hücre sayımı yapıldı. 6 cm çapına sahip petri kaplarına her kaptaki yaklaşık  $8 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücreler transfer edildi. Deney gruplarının oluşturulduğu kaplar 1. iş paketinde açıklanan zaman çizelgesine uyularak 72 saat takip edildi. Bu sürenin sonunda hücreler, western blot tekniği uygulaması için toplandı. Western blot tekrarları için farklı pasajlardan 4 set hazırlanıp çalışıldı.

72 saatin sonunda hücreler inkübatörden çıkarılarak buz üzerinde çalışılmaya geçildi. Petri kaplarındaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Sonrasında kaplara tekrar PBS eklendi ve hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla 1 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Hücreler  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatantın uzaklaştırılmasının ardından, pelletin üzerine %1 fosfataz inhibitörü ve %5 proteaz inhibitörü içeren lizis tamponu eklendi, 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu sürenin sonunda  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardaki total protein miktarını belirlemek için Pierce BCA Protein Assay kiti (23225, ThermoFisher) kullanıldı. Her bir sette bulunan her grup için total protein miktarı BSA-protein standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Jelde yürütülecek olan her bir örnek 10 µl örnek volümü ve totalde 26 µl yükleme hacminde olacak şekilde indirgeyici tampon ve distile su ile karıştırılarak ependorflar içerisinde hazırlandı. Örnekler, 5 dakika  $95^{\circ}\text{C}$ 'de ısıtma tablasında (heating blok) bekletildi. Ardından tüpler santrifüj edildi ve tüplerde bulunan 26 µl protein içeren örnekler Bis-Tris poliakrilamid jellere (NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris Gel, Novex, ThermoFisher) yüklendi. Protein bantlarının büyüklüklerini belirlemek amacıyla, her jelin ilk veya son kuyucuğuna 7 µl moleküler ağırlık belirteci olarak SeeBlue2 PreStained Protein Standart (LC 5925, Invitrogen, ThermoFisher) yüklendi. WB tanklarının içerisine 1x yürütme tamponu (NuPAGE MES SDS Running Buffer, NP0002,

ThermoFisher) ilave edildi ve 175 volt ile 45 dakika yürütüldü. Takiben, poliakrilamid jel blotlanmak üzere yükleme tankından çıkarıldı. Sonraki adımda blotlama pedleri, filtre kağıtları, jel ve nitroselüloz membran (Immobilon-P, Millipore) kullanılarak blotlama sandviçi hazırlandı. Bu sırada katmanlar arasında hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterildi. Hazırlanan sandviçler kasetlere yerleştirildi, uygun şekilde kapatıldı ve blotlama tanklarına aktarıldı. Tanklar hazırlanan transfer tamponu (NuPAGE Transfer Buffer NP0006, ThermoFisher) ile dolduruldu ve çevresine buz kasetleri yerleştirildi. Transfer 40 volt ile 1,5 saat sürede gerçekleştirildi. Transfer sonrası nitroselüloz membranlar, bloklama solüsyonu olarak yağsız süt tozu ile %5 oranında hazırlanan TBS-T (500 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween 20, pH 7.4) içerisinde çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda membranlar, bloklama solüsyonunun içerisinde hazırlanan primer antikolar ile +4°C sıcaklığa sahip soğuk odada çalkalayıcı üzerinde gece boyunca bekletildi.

Deneylerde primer antikor olarak; Anti-Lag3 antikor (ab209236-Abcam, 1:1000), Anti-TLR2 antikor (ab16894-Abcam, 1:1000), HRP anti- $\alpha$ -Synuclein antikor (807806-Biolegend, 1:2000), Anti-IL-1 beta antikor (ab9722-Abcam, 1:1000), TNF- $\alpha$  antikor (CST #3707-Cell Signaling Technology, 1:1000), Kaspas-9 antikor (CST #9502- Cell Signaling Technology, 1:1000), PARP antikor (CST #9542- Cell Signaling Technology, 1:1000), Anti-Actin (A5060-Sigma-Aldrich), Anti-beta-Actin (A 5316-Sigma-Aldrich), Anti-Vinculin (V 9131-Sigma-Aldrich) membranlara ayrı ayrı uygulandı.

Ertesi sabah deney protokolüne devam edilmek üzere önce gece boyu primer antikor ile bekletilen membranlar TBS-T ile 3 kere 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Sonrasında membranlar, bloklama solüsyonunun içerisinde hazırlanan sekonder antikolar ile oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor olarak Goat anti-Mouse IgG-HRP (101000, Bio-Rad, 1:5000) ve Goat anti-Rabbit IgG-HRP (4010-05, SouthernBiotech, 1:5000) kullanıldı. Bu inkübasyonun sonunda membranlar, tekrar 3 kez 5'er dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı.

Görüntüleme öncesinde görüntülemeye kullanılacak olan ECL solüsyonu (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, WBKLS0050, Millipore) kitin

içinde bulunan iki solüsyonun 1:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Bu solüsyon ile 30 saniye bekletilen membranlar ImageLab yazılımına sahip ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad, 170-01402, USA) ile görüntülendi. Görüntüleme ile elde edilen bantların yoğunluğu, ImageJ (194) programı ile her bir protein için ayrı ayrı hesaplandı. Normalizasyon diğer proteinlerin endojen kontrol olarak kullanılan aktin veya vinkulin proteinlerine oranlanmasıyla gerçekleştirildi.

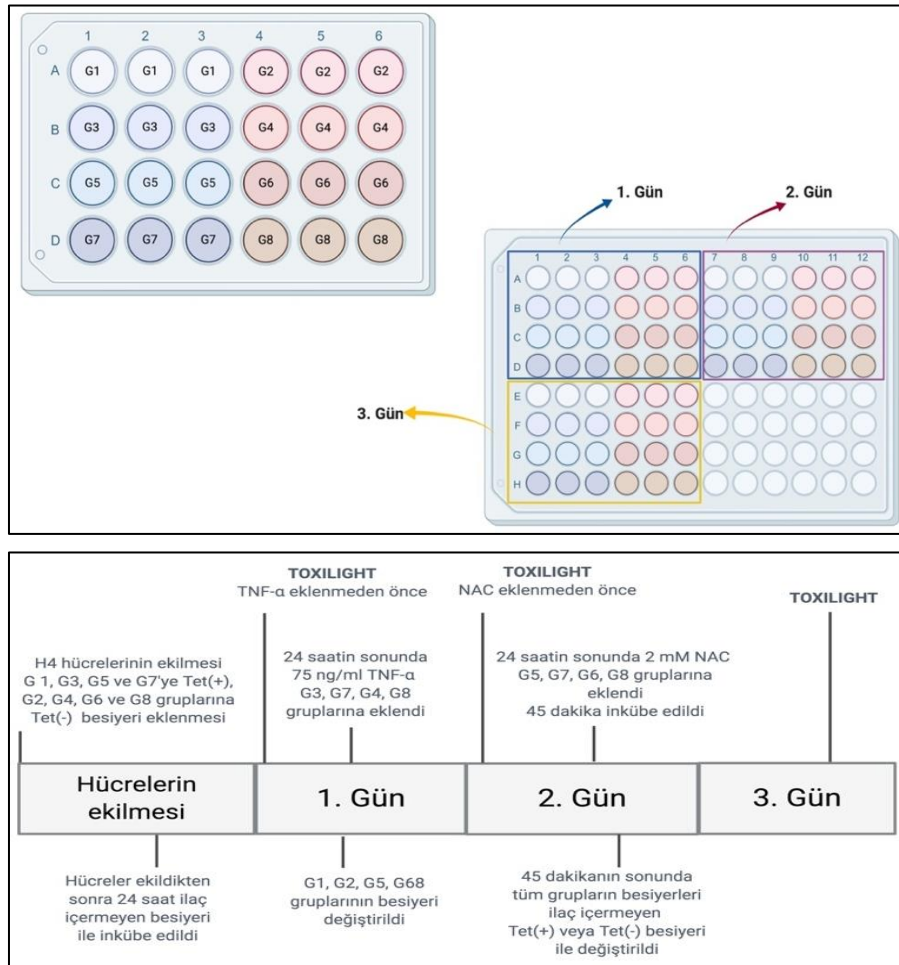
### **3.4. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri ile Oluşturulan Deney Gruplarında Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi**

İnsan H4 nörogloma hücrelerinde TNF- $\alpha$  ile oluşturulan inflamatuvar modelde, inflamasyonun ve anti-inflamatuvar ilaç olarak kullanılan NAC'nin hücre sağ kalımı üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla tüm deney gruplarına hücre ölümünü yansıtan Toxilight-AK testi (ToxiLight BioAssay Kit, LT07-117, Lonza) uygulandı.

Flasklarda takip edilip konfluent olan H4 hücreleri PBS ile yıkanmayı takiben, tripsin (Trypsin-EDTA (0,25%)-25200056, Gibco) uygulaması sonrası 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelletten hücre sayımı yapıldı. Toxilight deneyi için hücreler 24 kuyucuklu plaklara her kuyucukta yaklaşık 4000 ( $4 \times 10^3$ ) hücre olacak şekilde transfer edildi. Her deney grubu için 3 kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilerek gruplar oluşturuldu. Deney gruplarını içeren plaklar 1. iş paketinde açıklanan zaman çizelgesine uyularak 72 saat takip edildi, her gün hücre ölümünü değerlendirmek için Toxilight testi uygulandı. Toxilight testi deney gruplarındaki luminesansı ölçmeye dayalı bir test olduğu için, hücrelerin takibinde fenol kırmızısı içermeyen Opti-MEM besiyeri (11058021, Gibco) kullanıldı. Bu deneye ait zaman çizelgesi ve deney seti düzeneği Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Hücre canlılığı testi 4 set (her sette her grup için 3 tekrar olacak şekilde) tekrar edilerek çalışıldı.

Toxilight testi için AK test solüsyonu ürün kitinin kılavuzunda belirtildiği şekilde toz halde bulunan AK reaktifinin üzerine 20 ml tampon solüsyonundan eklenerek ve iyice çalkalanarak hazırlandı. Zaman çizelgesine uygun olarak her gün kuyucuklardan 100  $\mu$ l besiyeri örneği alınarak 96 kuyucuklu şeffaf tabanlı plaklara

aktarıldı ve üzerine hazırlanan Toxilight-AK solüsyonundan 100 µl eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda EnVision mikroplak okuyucuda (EnVision, PerkinElmer; Waltham, MA, USA) okutularak lüminesans değerleri elde edildi. Elde edilen değerlerin her set için ortalaması istatistik değerlendirme için hesaplandı ve istatistik testleri tüm gruplar için toplam 12 analiz (3 teknik replikasyon x 4 set) üzerinden gerçekleştirildi.



**Şekil 3.3.** ToxiLight deney düzeni ve zaman çizelgesi (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

### 3.5. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri ile Oluşturulan Deney Gruplarında

#### TUNEL uygulanması

TUNEL, hücrelerdeki aşırı DNA kırıklarını veya apoptotik hücrelerdeki internükleozomal DNA fragmantasyonunu tespit etmek amacıyla sık kullanılan

immünokimyasal bir işaretleme yöntemidir. Bu metotta, parçalanmış DNA'nın serbest 3'-hidroksil ucuna uygun işaretleyicilerin bağlanmasını katalizlemek için terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enziminden yararlanılır ve işaretli hücreler mikroskop altında incelenip değerlendirilebilir (195).

Bu iş paketinde, insan H4 nörogloma hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında, inflamasyonun tetiklenmesiyle ve anti-inflamatuvar ilaç eklenmesiyle gruplar arasında apoptoza giden hücre sayısı arasındaki farkın incelenmesi amaçlanmıştır. Bu iş paketini gerçekleştirmek için TUNEL deney kiti (TUNEL Assay Kit-FITC ab66108, Abcam) kullanıldı ve kitin talimatları izlenerek işaretleme gerçekleştirildi.

Flasklarda takip edilip konfluent olan H4 hücreleri PBS ile yıkanmayı takiben, tripsin (Trypsin-EDTA (0,25%)-25200056, Gibco) uygulaması sonrası 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelletten hücre sayımı yapıldı. 6 cm çapına sahip petri kaplarına her kapta yaklaşık  $8 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücreler transfer edildi. Deney gruplarının oluşturulduğu kaplar 1. iş paketinde açıklanan zaman çizelgesine uyularak 72 saat takip edildi. Bu sürenin sonunda hücreler, TUNEL işaretlemesi için toplandı.

Ependorflara alınan hücrelere fiksasyon için %1 paraformaldehit (PFA) eklendi ve buz üzerinde 15 dakika bekletildi. Ardından hücreler  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından hücreler arada santrifüj edilerek, PBS ile iki kere yıkandı. 0.5 ml PBS içerisinde çözülen hücrelere 5 ml  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında %70'lik etanol eklenip 30 dakika buz üzerinde bekletildi.  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjün ardından etanol uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1 ml yıkama tamponu (wash buffer) eklendi ve arada santrifüj edilerek 2 kere yıkandı. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Kitin talimatlarına göre hazırlanan boyama solüsyonundan hücrelerin üzerine 50  $\mu\text{l}$  eklendi ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu işlemi takiben hücrelerin üzerine 1 ml durulama tamponu (rinse buffer) eklendi ve arada santrifüj edilerek 2 kere durulandı. Sonrasında pellet 0.5 ml Propidium Iodide/RNase solüsyonu eklenerek süspanse edildi ve 30 dakika, oda sıcaklığında, karanlık ortamda bekletildi.

Hücre süspansiyonundan 50-100 µl lamlara damlatıldı ve üzerine cam coverslip kapatılarak karanlık kutu içerisinde, oda sıcaklığında gece boyunca kurumaya bırakıldı. Ertesi gün örnekler ZEN yazılımına sahip inverted floresan mikroskop (Axio observer microscope, Carl Zeiss, Germany) ile görüntülendi. Kullanılan kitin işaretlenme özelliklerine göre Propidium Iodide (PI) çekirdekleri kırmızı renkte, FITC-dUTP apoptotik hücreleri yeşil renkte işaretlemektedir ve hücre sayımı bu özelliklere göre gerçekleştirildi. TUNEL işaretlemesi 3 deney setinde tekrarlandı ve her grup için mikroskop altında en az 20 farklı alanda hücre sayımı yapıldı.

### **3.6. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Reseptör Ekspresyonlarının q-PCR ile Değerlendirilmesi**

H4 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında,  $\alpha$ -syn proteininin, LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin ekspresyonlarının kantitatif değerlendirilmesi amacıyla TaqMan metodu kullanılarak q-PCR deneyi gerçekleştirilmiştir. Her gruba ait hücre örneklerinde RNA izolasyonu yapıldı ve izolasyon sonrası örneklerden cDNA (complementary DNA) sentezlenerek q-PCR metodu uygulandı.

Flasklarda takip edilip konfluent olan H4 hücreleri PBS ile yıkanmayı takiben, tripsin (Trypsin-EDTA (0,25%)-25200056, Gibco) uygulaması sonrası 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelletten hücre sayımı yapıldı. 6 cm çapına sahip petri kaplarına her kapta yaklaşık  $8 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücreler transfer edildi. Deney gruplarının oluşturulduğu kaplar 1. iş paketinde açıklanan zaman çizelgesine uyularak 72 saat takip edildi ve bu sürenin sonunda hücreler q-PCR deney protokolünün uygulanması için toplandı. q-PCR tekrarları için farklı pasajlardan 4 set hazırlanarak 16 analiz (4 teknik replikasyon x 4 set) QuantStudio™ Real-Time PCR Software (Versiyon 1.3) kullanılarak gerçekleştirildi. TLR2 reseptörüne ait değerlendirmelerde 1 setin istatistik açıdan aykırı değerlere sahip olduğunun tespit edilmesi üzerine çıkarılmasına karar verildi. TLR2 için toplam 12 analiz (4 teknik replikasyon x 3 set) gerçekleştirildi.

### 3.6.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, Trizol RNA izolasyon protokolüne uyularak gerçekleştirildi. 72 saatin sonunda petri kaplarındaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Sonrasında kaplara tekrar PBS eklendi ve hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla 1 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Hücreler +4°C sıcaklıkta 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve ardından supernatant uzaklaştırıldı. Örneklerin üzerine 1 ml trizol (252709, Life Tech) eklenerek, oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Takiben, üzerlerine 200 µl kloroform eklenip çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilerek karışımın iki tabakaya ayrılması sağlandı. Sonrasında +4°C sıcaklıkta en yüksek hızda 10 dakika santrifüj edilip, üstte kalan RNA içeren şeffaf tabaka 500 µl izopropanol içeren yeni ependorf tüplere aktarıldı. Tekrar çalkalanıp, en yüksek hızda 10 dakika santrifüj edildi ve pellet elde edildi. Supernatant uzaklaştırılarak, 1 ml %75 etil alkol ile pellet yıkanıp, en yüksek hızda 10 dakika santrifüj edildi. Etil alkol uzaklaştırıldı ve örnekler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürenin sonunda örneklerin üzerine 80 µl Nuclease free H<sub>2</sub>O (Ambion am9937, Invitrogen) eklendi ve izole edilen RNA'ların miktar ve saflığı, NanoDrop spektrometre ile (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) 260/280 ve 230/260 nm dalga boylarında ölçüldü. Daha iyi sonuçlar alabilmek için RNA izolasyonunu takiben Qiagen RNeasy Mini Kiti (74104, Qiagen) ve Qiagen RNase-Free DNase Seti (79254, Qiagen) kitleri kullanılarak örnekler kitin talimatlarına uygun olarak yıkandı ve sonrasında yeniden RNA'ların miktar ve saflığı, NanoDrop spektrometre ile (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) 260/280 ve 230/260 nm dalga boylarında ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda örneklerin 1250 ng total RNA kullanmaya uygun olduğuna karar verildi.

### 3.6.2. cDNA Sentezi ve q-PCR Analizi

Taqman™ III Universal PCR mastermix (4305719, Applied Biosystems, Life Technologies) kitinin bileşenleri ile toplam hacim 10 µl olacak şekilde 2X reverse transkripsiyon master karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışım ile gruplara ait RNA miktarına göre hazırlanan 10 µl master karışımı birleştirilerek 20 µl 1X reverse

transkripsiyon master karışımı elde edildi. Thermal cycler cDNA cihazında (Eppendorf Mastercycler Pro, Hamburg) 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 4°C'de ∞ programı kullanılarak, örneklerde cDNA sentezi sağlandı. Elde edilen cDNA örnekleri q-PCR analizlerinde kullanıldı.

Her gruba ait cDNA örnekleri ile, normalizasyon için endojen kontrol gen olarak HPRT1 (Hs02800695\_m1, ThermoFisher), α-syn tespiti için SNCA (Hs00240906\_m1, ThermoFisher) bunların yanı sıra LAG3 (Hs00958444\_g1, ThermoFisher) ve TLR2 (Hs00152932\_m1, ThermoFisher) TaqMan problemleri kullanılarak total hacim 5 µl olacak şekilde reaksiyon karışımları PCR plaklarında hazırlandı.

Nükleik asitlerin amplifikasyonları Real-time PCR cihazı (QuantStudio 7, Applied Biosystems) kullanılarak 50°C 2 dakika, 95°C 10 dakika ve 40 döngü 95°C 15 saniye 60°C 1 dakika olacak şekilde ayar yapılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası farklılıkların hesaplanmasında  $\Delta\Delta Ct$  (comparative Ct) metodu kullanılarak ortalamalar karşılaştırıldı. Analizler tüm setlerdeki her bir grup için 4 kez tekrar edildi. Bu şekilde tüm gruplar için toplam 16 analiz (4 teknik replikasyon x 4 set) QuantStudio™ Real-Time PCR Software (Versiyon 1.3) kullanılarak gerçekleştirildi.

### **3.7. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

Çalışma kapsamında planlanan ve gerçekleştirilen iş paketlerinin istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism 8.0.0 (Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) istatistik programından yararlanıldı.

İş paketlerine ait deney sonuçlarının verileri değerlendirilirken grupların karşılaştırılması için tek yönlü varyant analizi (one way ANOVA), ikili karşılaştırmalar için ise t-testi (Unpaired t-test) kullanıldı. Veriler %95 güven aralığında değerlendirilerek,  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

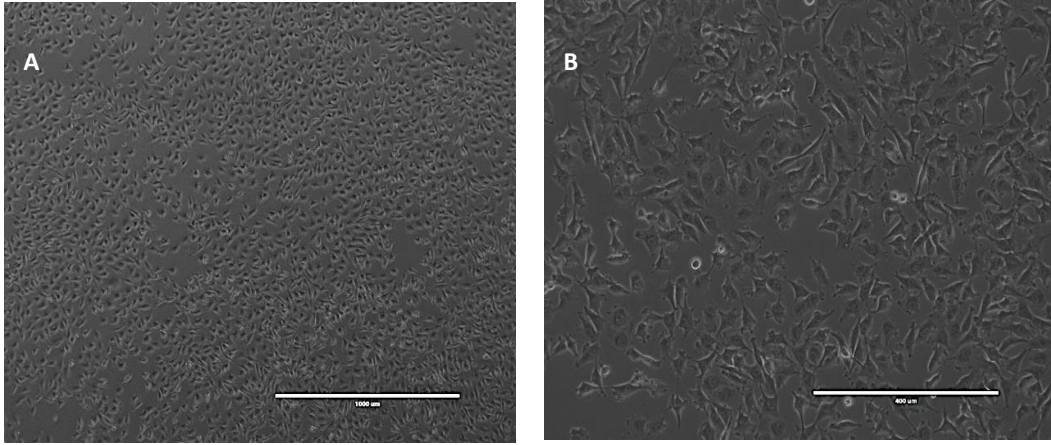


## 4. BULGULAR

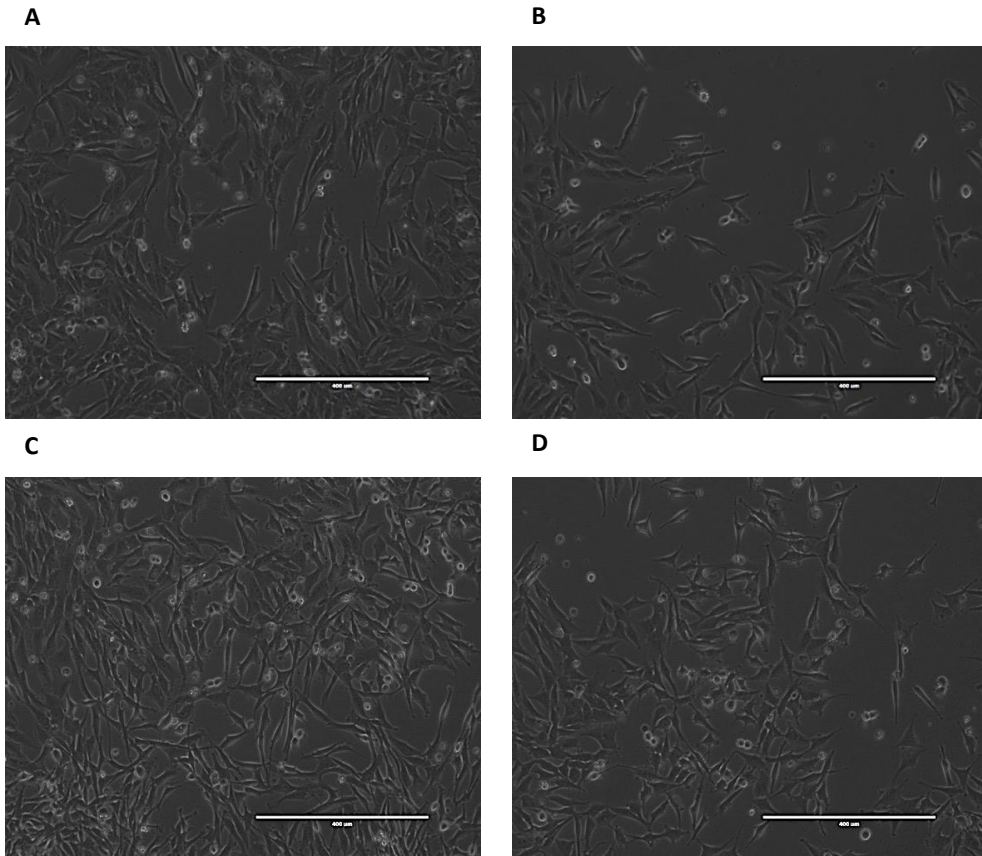
### 4.1. İnsan H4 Nörogloma Hücre Kültürü

WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden H4 insan nörogloma hücreleri, Prof. Dr. Pamela J. McLean'in araştırma laboratuvarında Parkinson Hastalığı çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu hücre hattı Dr. McLean ve ekibi tarafından plazmid DNA transfeksiyonu yöntemi ile üretilmiştir. İnsan nörogloma hücreleri, kültür ortamında plastik kültür kaplarına yüksek oranda tutunma özelliği gösteren adherent, epitel hücreleri karakteri sergileyen hücrelerdir. Kanser hücrelerinden elde edilen bir hat olması sebebi ile proliferasyon hızı oldukça yüksektir. Hücre morfolojisi tutunma aşamasında fuziformdan (iğsi) poligonale kadar değişiklik göstermekle birlikte, hücrelerin sitoplazmik uzantıları ve bu uzantıları sebebiyle yıldız şekli aldıkları görüldü. Hücrelerde mitotik figür, artmış çekirdek/sitoplazma oranı, pleomorfizm gözlemlendi. Şekil 4.1'de adherent insan H4 nörogloma hücreleri ve Şekil 4.2 ve 4.3'de bu hücreler ile oluşturulan Tet(+) ve Tet(-) deney gruplarına ait görseller görülmektedir.

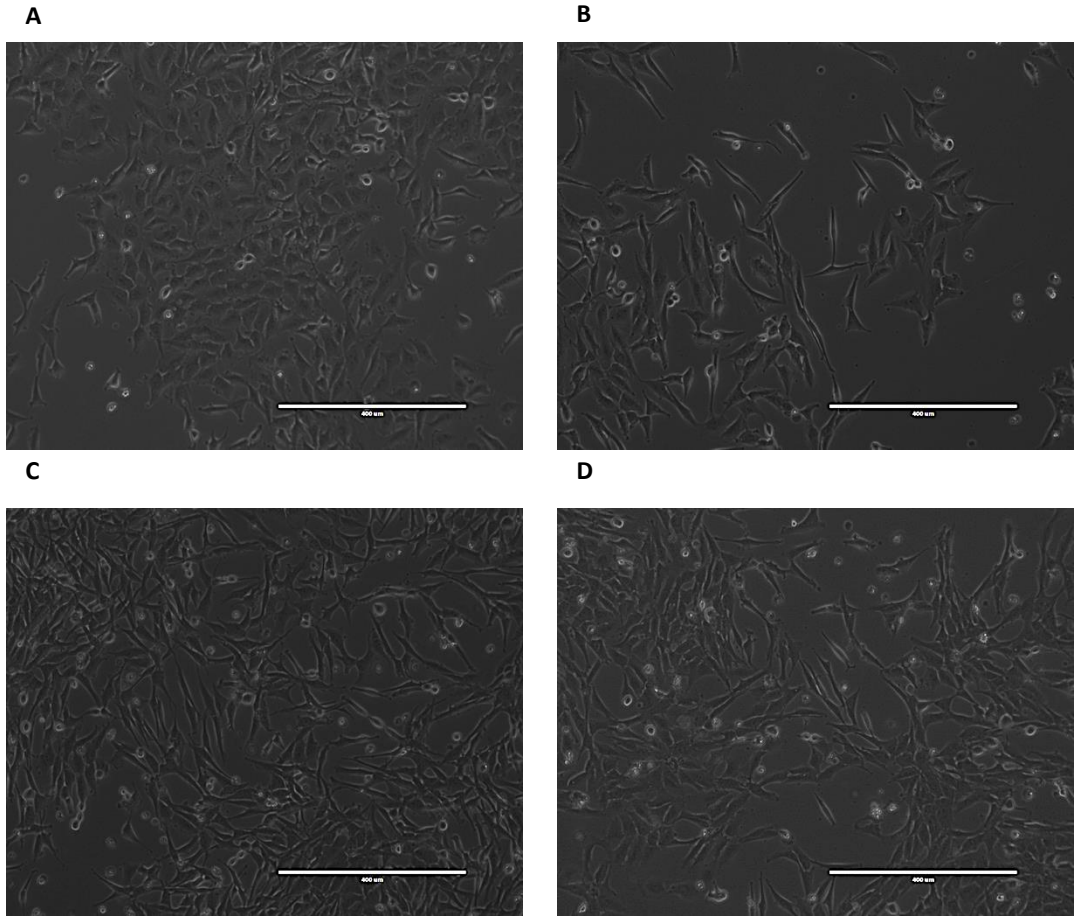
TNF- $\alpha$  ile 24 saat inkübe edilen gruplarda (G3, G4, G7 ve G8) hücrelerin tutunma özelliklerini kayb ettikleri ve kültür kaplarında tutunan hücre yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi. NAC ile 45 dakika inkübe edilip, sonrasında 24 saat hücre cevabı için bekletilen gruplarda ise (G5, G6, G7 ve G8) tutunan hücre yoğunluğunda artış olduğu gözlemlendi. Özellikle sadece NAC eklenen gruplar olan G5 ve G6'da kültür kaplarındaki tutunan hücre yoğunluğunun en fazla olduğu dikkat çekti.



**Şekil 4.1.** H4 hücrelerinin monolayer kültür görüntüleri. B) Hücrelerin ökromatik çekirdekleri, çekirdekçikleri ve sitoplazmadaki granülleri seçilmektedir. A: x4, B: x10



**Şekil 4.2.** H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenerek oluşturulmuş,  $\alpha$ -syn proteinini eksprese etmeyen deney grupları. (A) Grup 1, (B) Grup 3, (C) Grup 5, (D) Grup 7'yi göstermektedir. Grup 1 ve 3'e ait mikrograflar ikinci gün, Grup 5 ve 7'ye ait mikrograflar üçüncü gün fotoğraflanmıştır. x10



**Şekil 4.3.** H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenmeden oluşturulmuş,  $\alpha$ -syn proteinini eksprese eden deney grupları. (A) Grup 2, (B) Grup 4, (C) Grup 6, (D) Grup 8'i göstermektedir. Grup 2 ve 4'e ait mikrograflar ikinci gün, Grup 6 ve 8'e ait mikrograflar üçüncü gün fotoğraflanmıştır. x10

#### 4.2. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinin İmmunositokimya ile İncelemesi

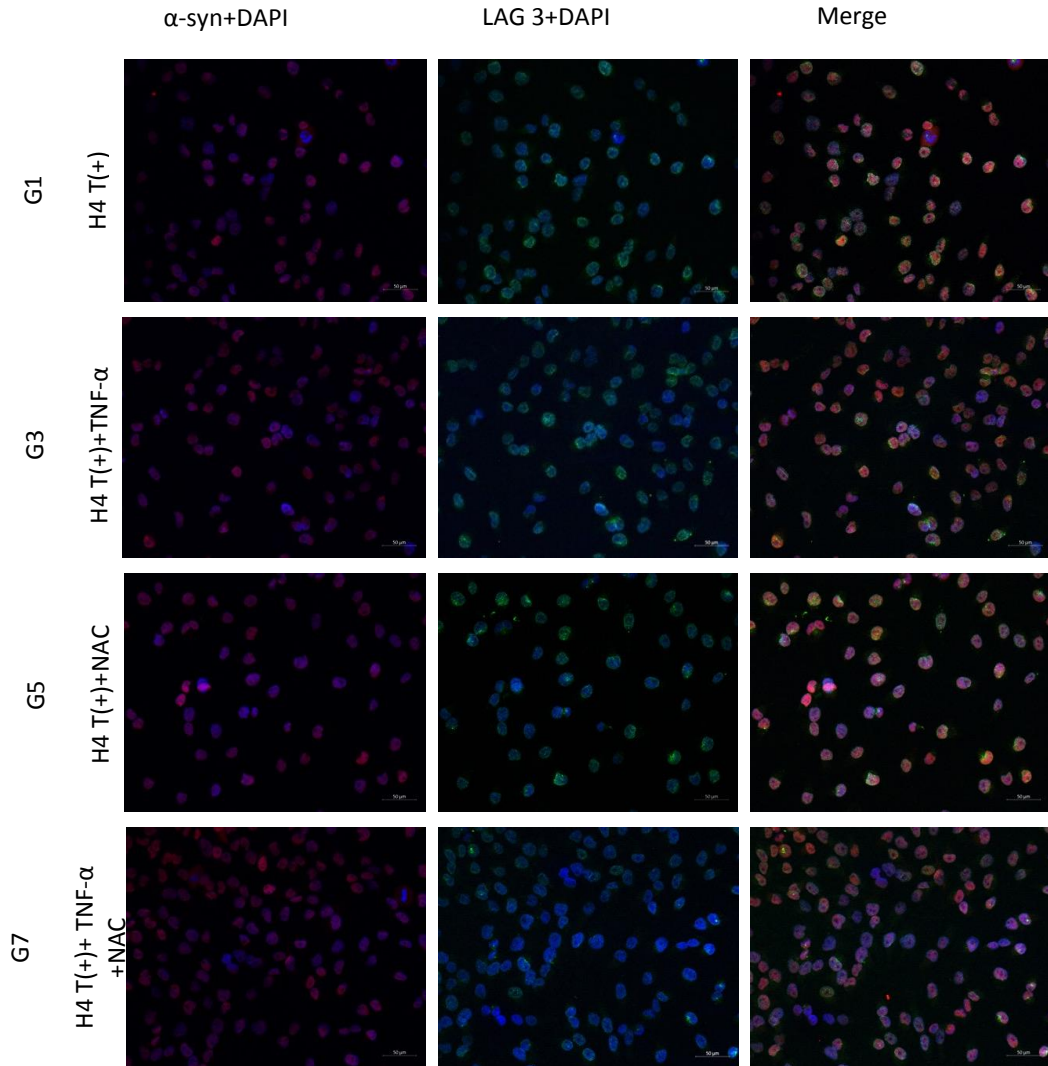
İmmunositokimya tekniği ile H4 nörogloma hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında LAG3, TLR2 ve  $\alpha$ -syn için işaretleme yapıldı. İkili işaretleme yöntemi ile hücreler LAG3 ve  $\alpha$ -syn için ve TLR2 ve  $\alpha$ -syn için işaretlendi. Her gruba ait örnekler en az 13 farklı alanda floresan mikroskobu altında incelendi. Hücrelerde kullanılan her üç antikor için de gruplar arası değişen yoğunluklarda pozitif işaretlenmeler mevcuttu. İncelenen alanlarda LAG3 ve TLR2 reseptörlerini yansıtan floresan ışımaya yoğunlukları ImageJ programı ile değerlendirildi.

LAG3 reseptörü incelemelerinde; hem tetrasiklin eklenen gruplarda (G1, G3, G5 ve G7) hem de tetrasiklin eklenmeyen gruplarda (G2, G4, G6 ve G8), TNF-  $\alpha$

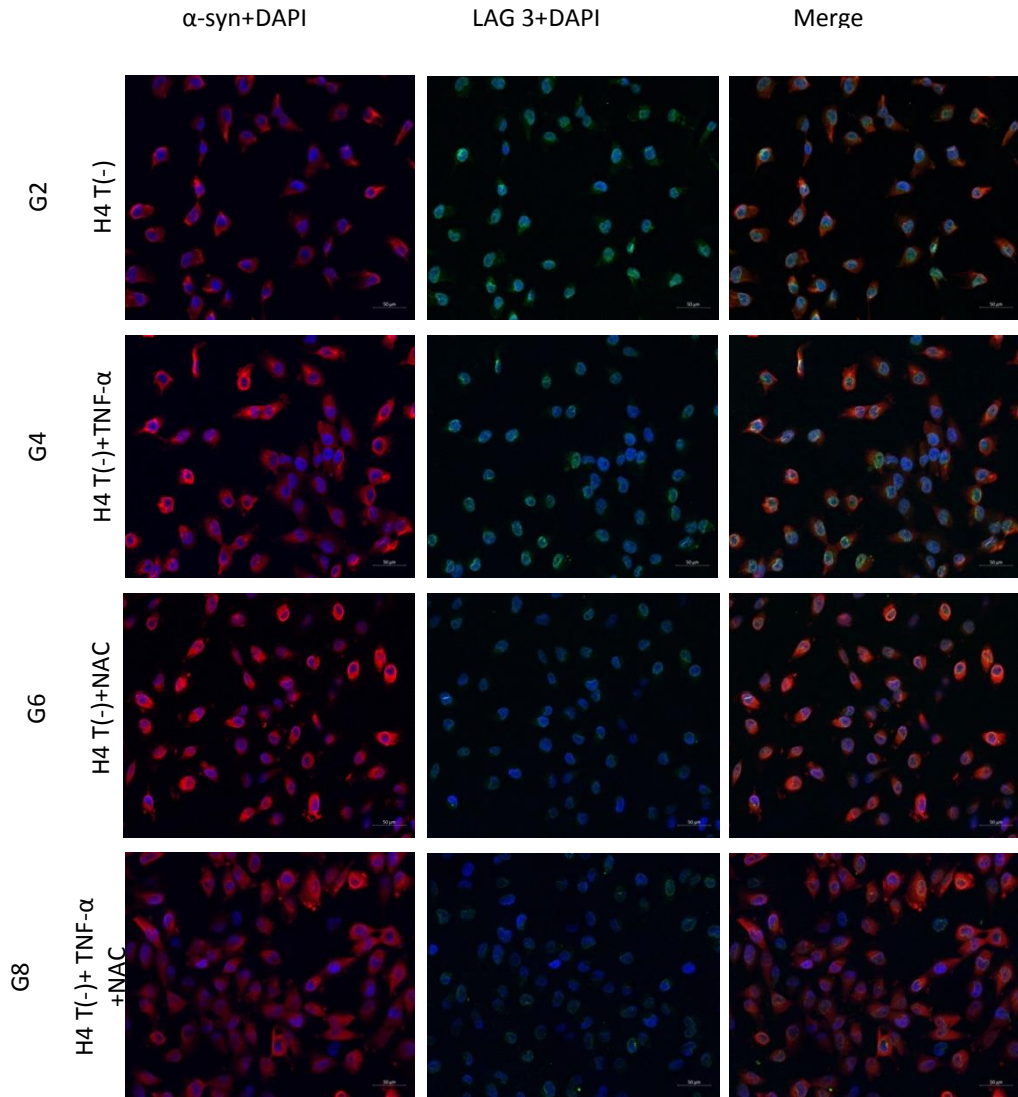
eklenen gruplardaki hücrelerin (G3 ve G4) göreceli olarak daha yoğun işaretlenmeye sahip olduğu, NAC eklenen gruplarda ise işaretlenmenin bu gruplara göre daha zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6A).

Image J programı ile yapılan analizlerde istatistiksel değerlendirme tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı yapıldı. Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için yapılan ANOVA değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

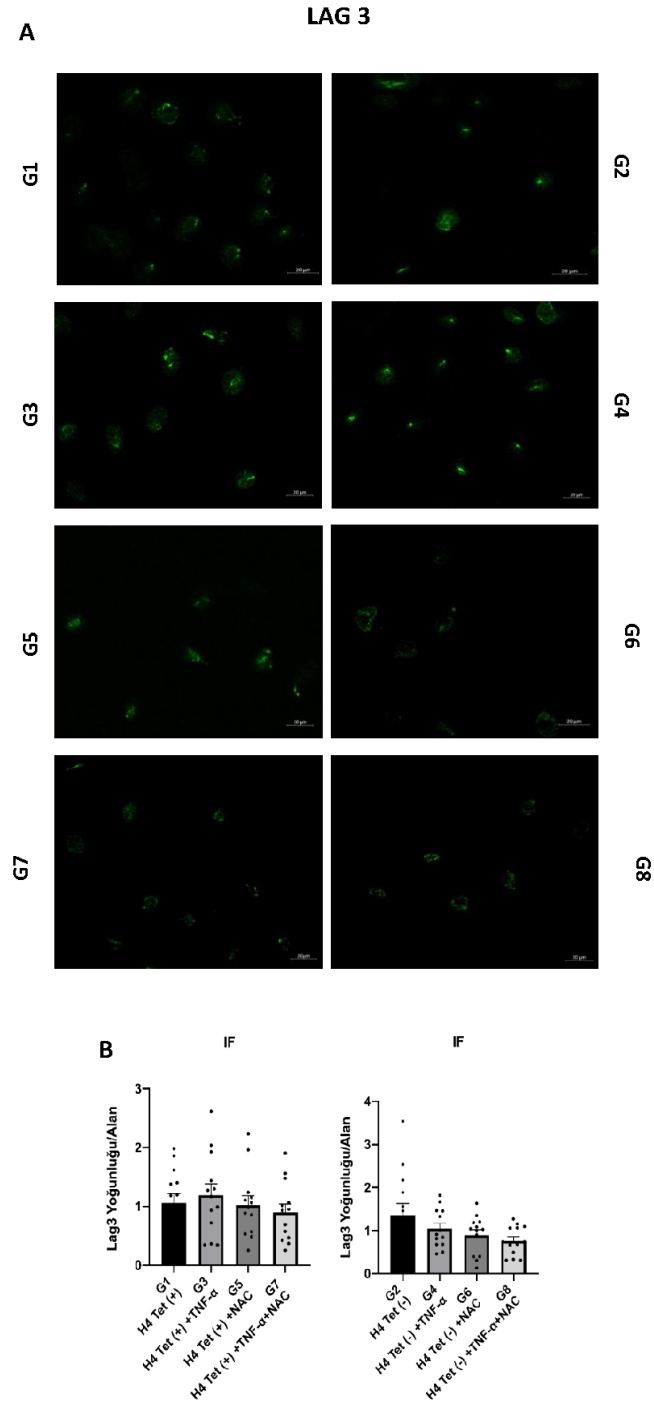
Tetrasiklin eklenen gruplardan G3'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G5'e sadece NAC uygulandı ve G7'ye ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin alan grupların ikili karşılaştırmalarında kullanılan t-testi sonuçları anlamlı bir farklılık göstermedi. Tetrasiklin eklenmeyen gruplar içerisinde G4'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G6'ya sadece NAC uygulandı ve G8'e ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin alan grupların ikili karşılaştırmalarında kullanılan t-testi sonuçları tetrasiklin alan grupların sonuçlarıyla benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. (Şekil 4.6B).



**Şekil 4.4.** H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenerek oluşturulmuş,  $\alpha$ -syn proteinini eksprese etmeyen deney grupları. 1. sütun  $\alpha$ -syn proteini ve çekirdek işaretlenmelerini (kırmızı:  $\alpha$ -syn, mavi: çekirdek), 2. sütun LAG3 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerini (yeşil: LAG3, mavi: çekirdek) ve 3. sütun  $\alpha$ -syn proteini, LAG3 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerinin birleştirilmiş halini göstermektedir. Sol tarafta 1. satırdan 4. satıra kadar G1, G3, G5 ve G7 gruplarının sıralaması görülmektedir. x20



**Şekil 4.5.** H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenmeden oluşturulmuş,  $\alpha$ -syn proteinini eksprese eden deney grupları. 1. sütun  $\alpha$ -syn proteini ve çekirdek işaretlenmelerini (kırmızı:  $\alpha$ -syn, mavi: çekirdek), 2. sütun LAG3 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerini (yeşil: LAG3, mavi: çekirdek) ve 3. sütun  $\alpha$ -syn proteini, LAG3 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerinin birleştirilmiş halini göstermektedir. Sol tarafta 1. satırdan 4. satıra kadar G2, G4, G6 ve G8 gruplarının sıralaması görülmektedir. x20



**Şekil 4.6.** (A) Tüm deney gruplarında (G1-G8) sadece LAG3 reseptörü için yapılan immunofloresan işaretlenmeyi (yeşil) gösteren mikrograflar görülmekte, x40. (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda LAG3 reseptörü için yapılan floresan yoğunluklarının analizi sonucunda elde edilen sütun grafikleri ve istatistik analizleri görülmektedir.

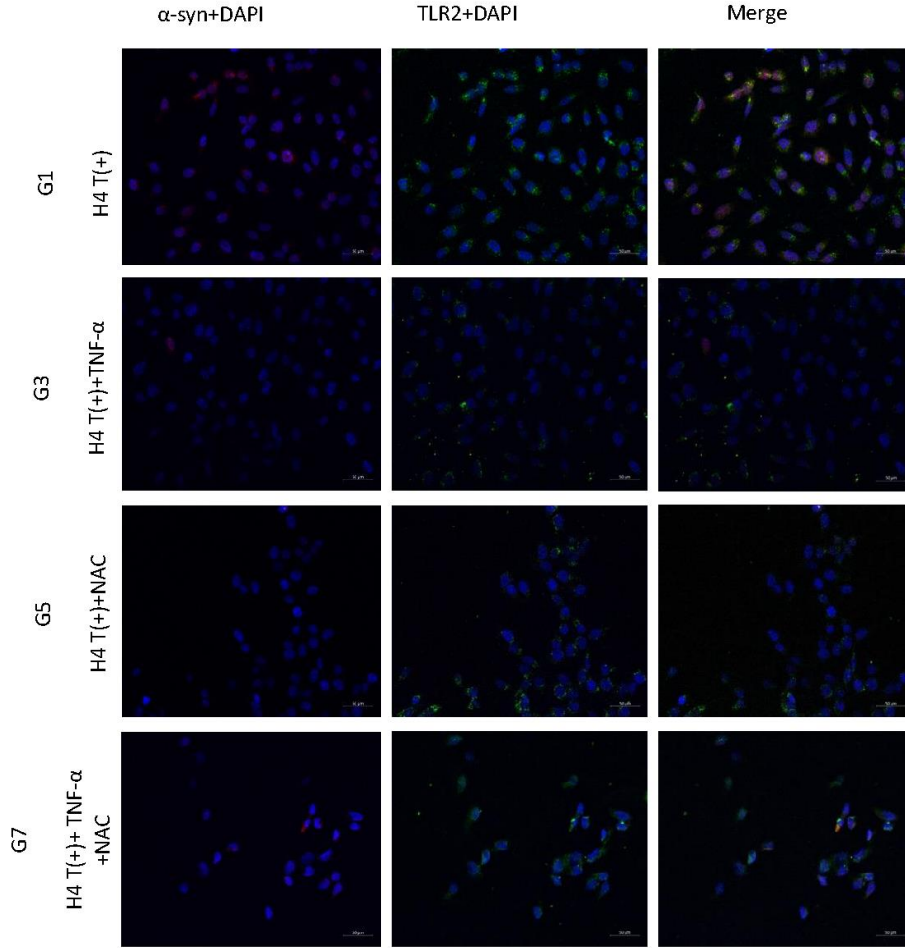
TLR2 reseptörü için mikroskop altında yapılan ilk incelemeleri sonucunda hem tetrasiklin eklenen gruplarda (G1, G3, G5 ve G7) hem de tetrasiklin eklenmeyen gruplarda (G2, G4, G6 ve G8) işaretlenmenin LAG3 reseptörü kadar kuvvetli olmadığı dikkat çekti. TNF- $\alpha$  eklenen gruplardaki hücrelerin (G3 ve G4) göreceli olarak daha yoğun işaretlenmeye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9A).

ImageJ programı ile yapılan analizlerde istatistiksel değerlendirme tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı yapıldı. Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için yapılan ANOVA değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tet (+)  $p=0,0007^{***}$  ve Tet (-)  $p=0,002^{**}$ ).

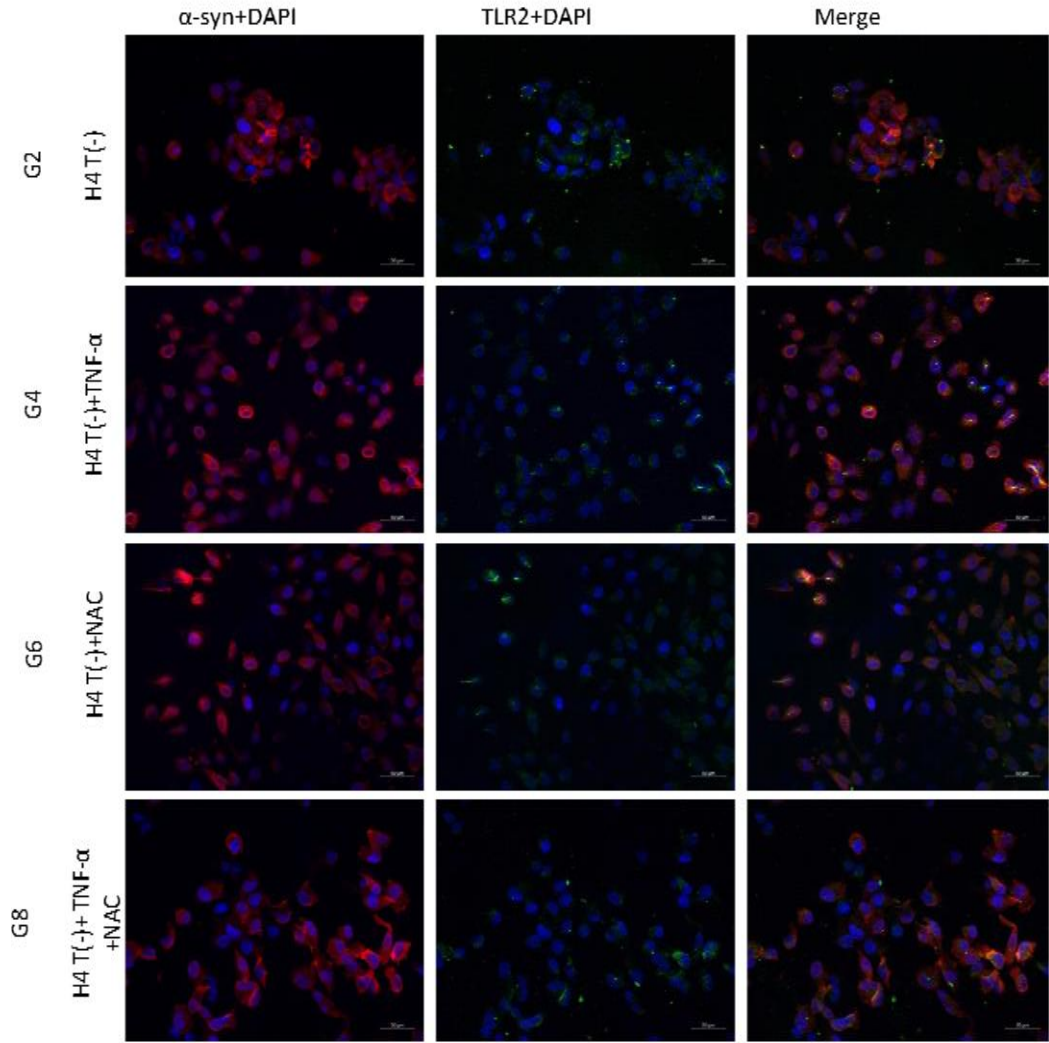
Tetrasiklin eklenen gruplardan G3'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G5'e sadece NAC uygulandı ve G7'ye ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin alan grupların ikili karşılaştırılmalarında kullanılan t-testi sonuçlarına göre; TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklendiği G3 grubu, hiçbir ilaç eklenmemiş G1 grubundan anlamlı şekilde yüksek TLR2 floresan yoğunluğuna sahipti (G1-G3  $p=0,01^*$ ). Kontrol grubunun (G1), NAC eklenen grup (G5) ve TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen grup (G7) ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. İnflamasyonun tetiklendiği grup (G3), inflamasyon tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G7) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi (G3-G7  $p=0,03^*$ ). Sadece anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G5) ile G7 grubu karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlıydı (G5-G7  $p=0,02^*$ ). Tetrasiklin eklenmeyen gruplar içerisinde G4'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G6'ya sadece NAC uygulandı ve G8'e ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin eklenmeyen grupların ikili karşılaştırılmalarında kullanılan t-testi sonuçlarına göre; TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklendiği G4 grubu, hiçbir ilaç eklenmemiş G2 grubundan anlamlı şekilde yüksek TLR2 floresan yoğunluğuna sahipti (G2-G4  $p=0,009^{**}$ ). Kontrol grubunun (G2), NAC eklenen grup (G6) ve TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen grup (G8) ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. İnflamasyonun tetiklendiği grup (G4), inflamasyon tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi (G4-G8  $p=0,004^{**}$ ).



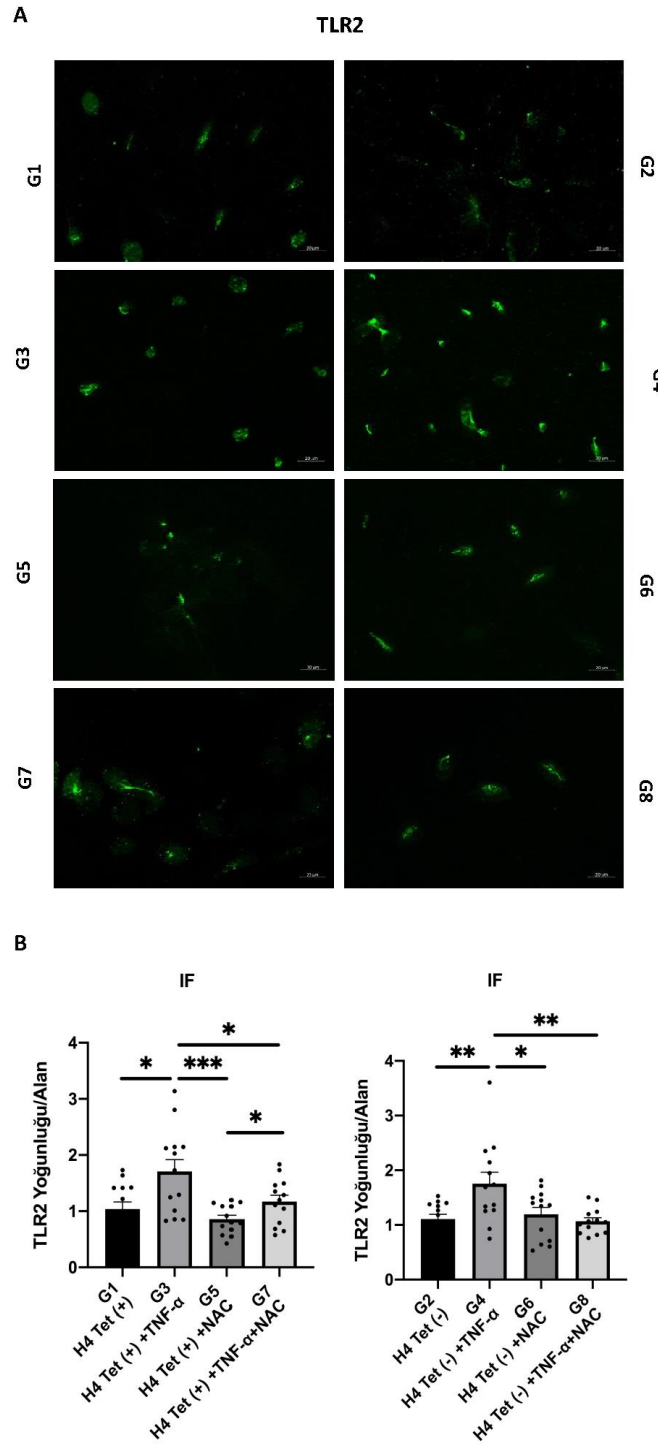
Sadece anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G6) ile G8 grubu karşılaştırıldığında arada anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.9B).



**Şekil 4.7.** H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenerek oluşturulmuş,  $\alpha$ -syn proteinini ekspres etmeyen deney grupları. 1. sütun  $\alpha$ -syn proteini ve çekirdek işaretlenmelerini (kırmızı:  $\alpha$ -syn, mavi: çekirdek), 2. sütun TLR2 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerini (yeşil: TLR2, mavi: çekirdek) ve 3. sütun  $\alpha$ -syn proteini, TLR2 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerinin birleştirilmiş halini göstermektedir. Sol tarafta 1. satırdan 4. satıra kadar G1, G3, G5 ve G7 gruplarının sıralaması görülmektedir. X20



**Şekil 4.8.** H4 nörogloma hücrelerine Tetrasiklin eklenmeden oluşturulmuş,  $\alpha$ -syn proteinini eksprese eden deney grupları. 1. sütun  $\alpha$ -syn proteini ve çekirdek işaretlenmelerini (kırmızı:  $\alpha$ -syn, mavi: çekirdek), 2. sütun TLR2 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerini (yeşil: TLR2, mavi: çekirdek) ve 3. sütun  $\alpha$ -syn proteini, TLR2 reseptörü ve çekirdek işaretlenmelerinin birleştirilmiş halini göstermektedir. Sol tarafta 1. satırdan 4. satıra kadar G2, G4, G6 ve G8 gruplarının sıralaması görülmektedir. X20



**Şekil 4.9.** (A) Tüm deney gruplarında (G1-G8) sadece TLR2 reseptörü için yapılan immunofloresan işaretlenmeyi (yeşil) gösteren mikrograflar görülmektedir, x40. (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda TLR2 reseptörü için yapılan floresan yoğunluklarının analizi sonucunda elde edilen sütun grafikleri ve istatistik analizleri görülmektedir.

### 4.3. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Ekspresyonlarının, Apoptoz Belirteçlerinin Düzeyinin ve İnflamasyonun Western Blot (WB) ile Değerlendirilmesi

H4 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında  $\alpha$ -syn proteininin, inflamasyon açısından IL-1 $\beta$  inflamatuvar belirtecinin, apoptoz açısından kaspaz-9, aktif kaspaz-9, PARP ve kesilmiş PARP apoptoz belirteçlerinin, LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin ekspresyonlarının semikuantitatif analizlerini yapmak amacıyla western blot yöntemi uygulandı. Western Blot tekrarları için farklı pasajlardan 4 set hazırlanıp çalışıldı. İlgilenilen proteinlere ait bant yoğunluğunun hesaplanması amacıyla normalizasyon, bu proteinlerin endojen kontrol olarak kullanılan aktin veya vinkulin proteinlerine oranlanmasıyla gerçekleştirildi. Tablo 4.1' de proteinler için ölçülen bant aralıkları gösterildi.

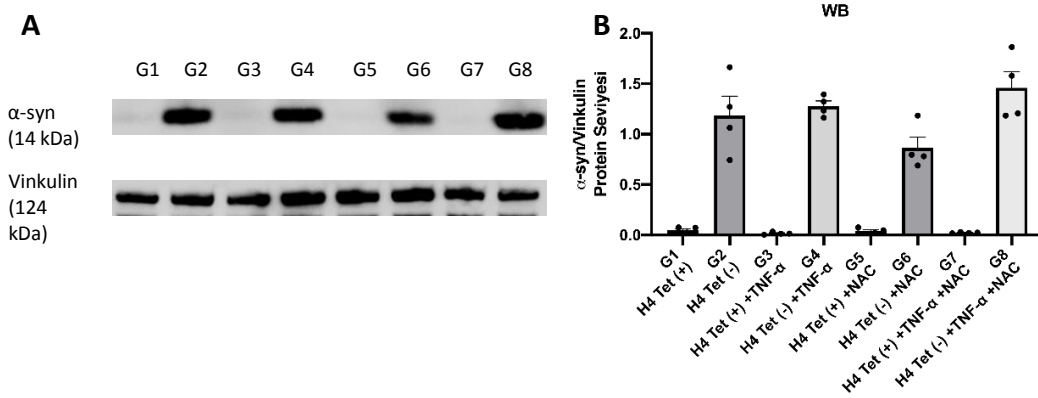
**Tablo 4.1.** Western Blot uygulanarak değerlendirilen proteinler ve bant büyüklükleri

| İlgili Protein | Bant Büyüklüğü     | Endojen Protein | Bant Büyüklüğü |
|----------------|--------------------|-----------------|----------------|
| $\alpha$ -syn  | 14 kDa             | Vinkulin        | 124 kDa        |
| LAG3           | 90 kDa*            | Aktin           | 42 kDa         |
| TLR2           | 89 kDa             | Aktin           | 42 kDa         |
| IL-1 $\beta$   | $\approx$ 55 kDa** | Vinkulin        | 124 kDa        |
| Kaspaz-9       | 47 kDa             | Vinkulin        | 124 kDa        |
| Aktif kaspaz-9 | 37 kDa             | Vinkulin        | 124 kDa        |
| PARP           | 116 kDa            | Aktin           | 42 kDa         |
| Aktif PARP     | 89 kDa             | Aktin           | 42 kDa         |

\*Beklenen moleküler ağırlık 57 kDa, tespit edilen bant büyüklüğü 90 kDa'dır (**Anti-LAG3 ab209236**)

\*\* Beklenen moleküler ağırlık 31 kDa, tespit edilen bant büyüklüğü  $\approx$ 55 kDa'dır (**Anti-IL-1  $\beta$  ab9722**)

Her sette gruplara ilk önce  $\alpha$ -syn proteininin miktarını ölçmek için WB yapıldı ve tetrasiklin ile etkili bir şekilde  $\alpha$ -syn ekspresyonunun G1, G3, G5 ve G7'de tetrasiklin eklenmeyen gruplara göre durdurulduğu gösterildi (Şekil 4.10).



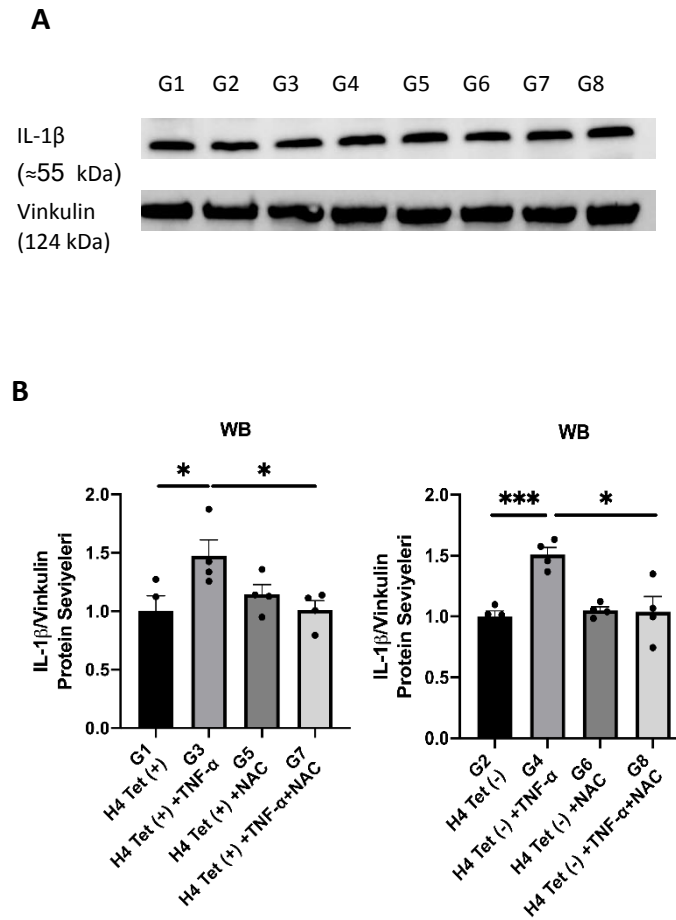
**Şekil 4.10.**  $\alpha$ -syn protein ekspresyonuna ait Western blot bulgusu. (A)  $\alpha$ -syn proteini ve endojen protein vinkulin için WB membran görseli, (B)  $\alpha$ -syn protein ekspresyonlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği görülmektedir.

Deney gruplarından bazılarında (G3 ve G4) inflamasyonu tetiklemek amacıyla TNF- $\alpha$  eklendi. İnflamasyonun değerlendirilmesi amacıyla IL-1 $\beta$  düzeyleri semikantitatif olarak ölçüldü. Normalizasyon sonrasında istatistiksel değerlendirme tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı yapıldı. Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen grupların ANOVA değerlendirmesi IL-1 $\beta$  için istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tet (+)  $p=0,03^*$  ve Tet (-)  $p=0,001^{**}$ ) (Şekil 4.11).

Tetrasiklin eklenen gruplar içerisinde G3'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G7'ye ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Dolayısı ile G3'ün inflamatuvar belirteç açısından en yüksek ekspresyona sahip olması beklenmekteydi. Tetrasiklin alan grupların ikili karşılaştırmalarında kullanılan t-testi sonuçları beklenen ile paralellik gösterecek şekilde istatistiksel olarak anlamlıydı. Buna göre; TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklendiği G3 grubu, hiçbir ilaç eklenmemiş G1 grubundan anlamlı şekilde yüksek IL-1 $\beta$  protein düzeyine sahipti (G1-G3  $p=0,04^*$ ). Kontrol grubunun (G1), NAC eklenen grup (G5) ve TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen grup (G7) ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. İnflamasyonun tetiklendiği grup (G3), inflamasyon

tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G7) ile karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı (G3-G7 p=0,02\*). Sadece anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G5) ile G7 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.11).

Tetrasiklin eklenmeyen gruplar içerisinde G4'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G8'e ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Dolayısı ile G4'ün inflamatuvar belirteçler açısından en yüksek ekspresyona sahip olması beklenmekteydi. Tetrasiklin eklenmeyen grupların ikili karşıtırlmalarında kullanılan t-testi sonuçları beklenen ile paralellik gösterecek şekilde istatistiksel anlamlılığa sahiptir. Buna göre; TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklendiği G4 grubu, hiçbir ilaç eklenmemiş G2 grubundan anlamlı şekilde yüksek IL-1 $\beta$  protein düzeyine sahipti (G2-G4 p=0,001\*\*). Kontrol grubunun (G2), NAC eklenen grup (G6) ve TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen grup (G8) ile karşıtırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. İnflamasyonun tetiklendiği grup (G4), inflamasyon tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G8) ile karşıtırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı (G4-G8 p=0,01\*). Sadece anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G6) ile G8 grubu karşıtırıldığında arada anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.11).



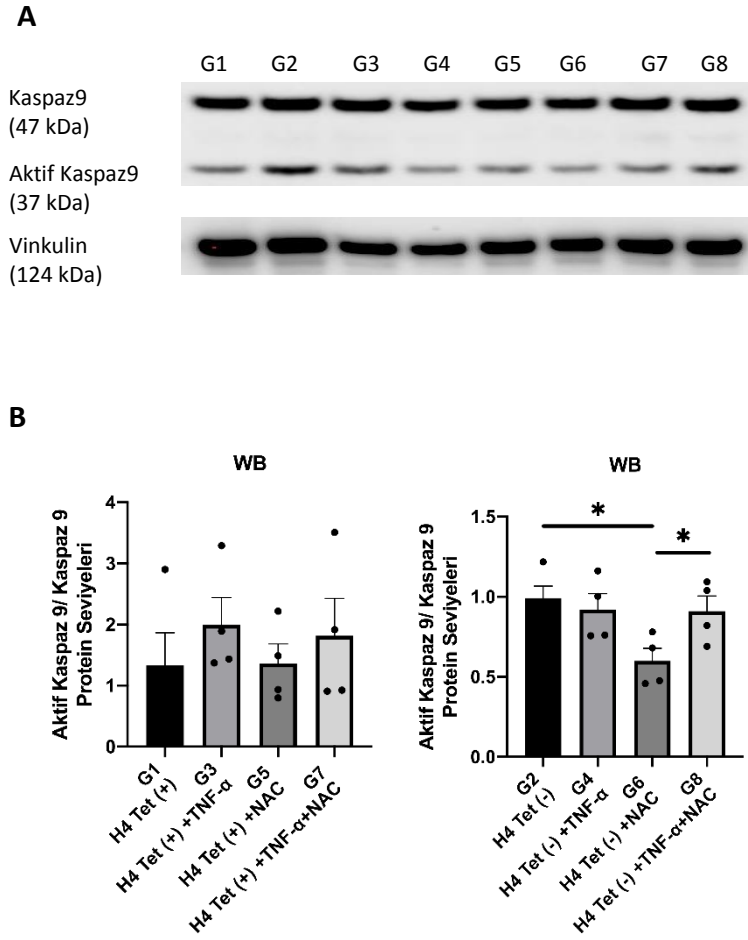
**Şekil 4.11.** IL-1 $\beta$  inflamatuvar belirtecinin ekspresyonuna ait Western blot bulgusu. (A) IL-1 $\beta$  ve endojen protein Vinkulin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda IL-1 $\beta$  ekspresyonlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi görülmektedir (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ )

Deney gruplarındaki hücrelerin apoptozis oranlarını karşılaştırmak için aktif kaspaz 9/kaspaz 9 ve kesilmiş PARP/PARP oranlarının düzeyleri semi kantitatif olarak ölçülerek elde edildi. Normalizasyon sonrasında istatistiksel değerlendirme tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı yapıldı. Tetrasiklin eklenen gruplar içerisinde G3'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G5'e sadece NAC eklendi, G7'ye ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin eklenmeyen gruplar içerisinde G4'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G6'ya sadece NAC eklendi, G8'ye ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi.

Aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranı tetrasiklin eklenen gruplarda ANOVA değerlendirmesi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Tetrasiklin eklenen gruplar arasında yapılan t-testi değerlendirmesinde aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranı, TNF- $\alpha$  eklenerek inflamasyonun tetiklendiği G3 grubunda diğer gruplara oranla daha yüksekti. NAC eklenerek inflamasyonunun baskılandığı G5 ve G7 gruplarında aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranı, G3 grubundan daha düşüktü (Şekil 4.12).

Aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranının tetrasiklin eklenmeyen gruplarda ANOVA değerlendirmesi istatistik olarak anlamlı bulundu ( $p=0,03^*$ ). NAC eklenen G6 grubunun apoptoz belirteçleri açısından en düşük orana sahip olması beklenmekteydi. Grupların ikili karşılaştırılmalarında kullanılan t-testi sonuçları beklenen ile paralellik gösterecek şekilde istatistiksel anlamlılığa sahipti. Buna göre; G6 grubu, hiçbir ilaç eklenmemiş G2 grubundan anlamlı şekilde düşük aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranına sahiptir (G2-G6  $p=0,01^*$ ). Kontrol grubunun (G2), TNF- $\alpha$  eklenen grup (G4) ve TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen grup (G8) ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. NAC eklenen grup (G6), inflamasyon tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G8) ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi (G6-G8  $p=0,04^*$ ). Sadece inflamasyonun tetiklendiği grup (G4), anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G8) ile karşılaştırıldığında arada anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.12).



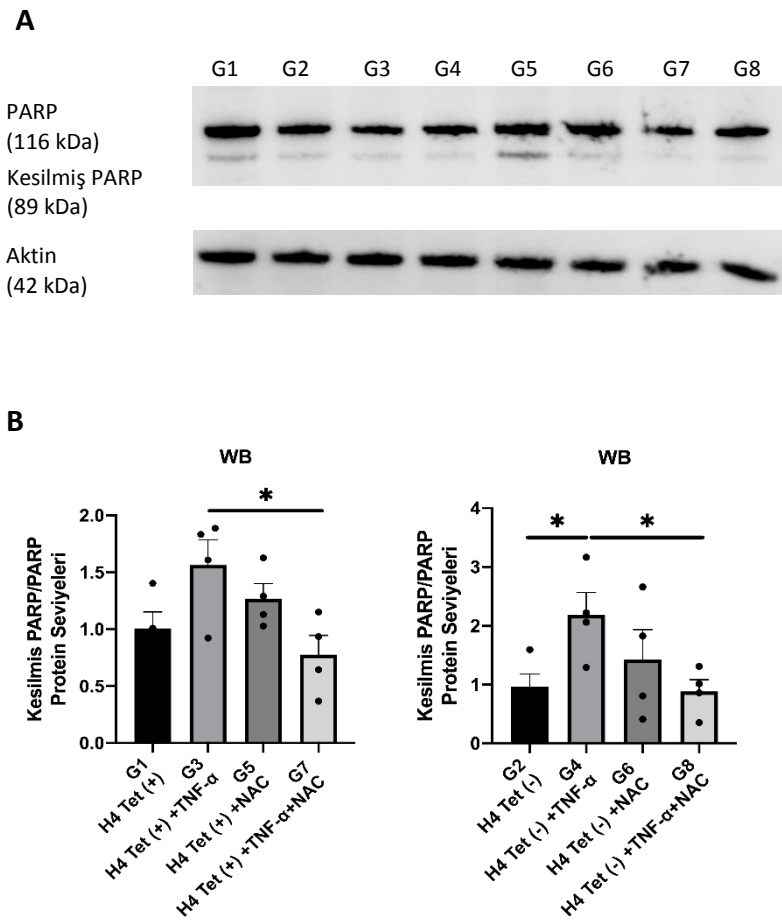


**Şekil 4.12.** Apoptoz belirteci olarak incelenen aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranlarına ait Western blot bulgusu. Kaspaz 9, Aktif kaspaz 9 ve endojen protein olan Vinkulin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda aktif kaspaz 9/kaspaz 9 oranlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ )

Kesilmiş PARP/PARP oranının tetrasiklin eklenen gruplarda ANOVA değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,03^*$ ). Sonuçların analizi ile elde edilen grafik incelendiğinde inflamasyonun tetiklendiği grup (G3) göreceli olarak en yüksek orana sahiptir. Grupların ikili karşılaştırılmalarında kullanılan t-testi sonuçlarına göre; G3 grubunda bu oran, TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen gruptan (G7) anlamlı derecede yüksektir (G3-G7  $p=0,03^*$ ) (Şekil 4.13).

Kesilmiş PARP/PARP oranının tetrasiklin eklenmeyen gruplarda ANOVA değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gruplar arası yapılan t-testi

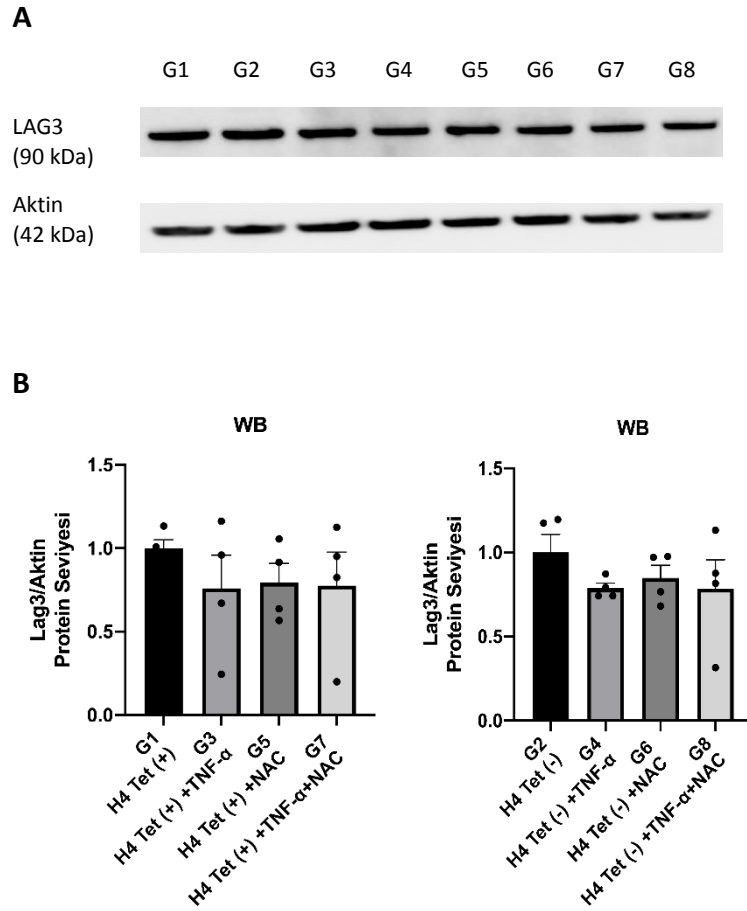
değerlendirmesinde beklenilenle paralellik gösterecek şekilde; G4 grubu, hiçbir ilaç eklenmemiş G2 grubundan anlamlı şekilde yüksek kesilmiş PARP/PARP oranına sahipti (G2-G4 p=0,03\*). Kontrol grubunun (G2), NAC eklenen grup (G6) ve TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen grup (G8) ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir fark görülmedi. TNF- $\alpha$  eklenen grup (G4), inflamasyon tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G8) ile karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (G4-G8 p=0,02\*) (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** Apoptoz belirteci olarak incelenen kesilmiş PARP/PARP oranlarına ait Western blot bulgusu. PARP, kesilmiş PARP ve endojen protein olan Aktin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda kesilmiş PARP/PARP oranlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi (\*p $\leq$ 0,05, \*\* p $\leq$ 0,01, \*\*\* p $\leq$ 0,001, \*\*\*\* p $\leq$ 0,0001)

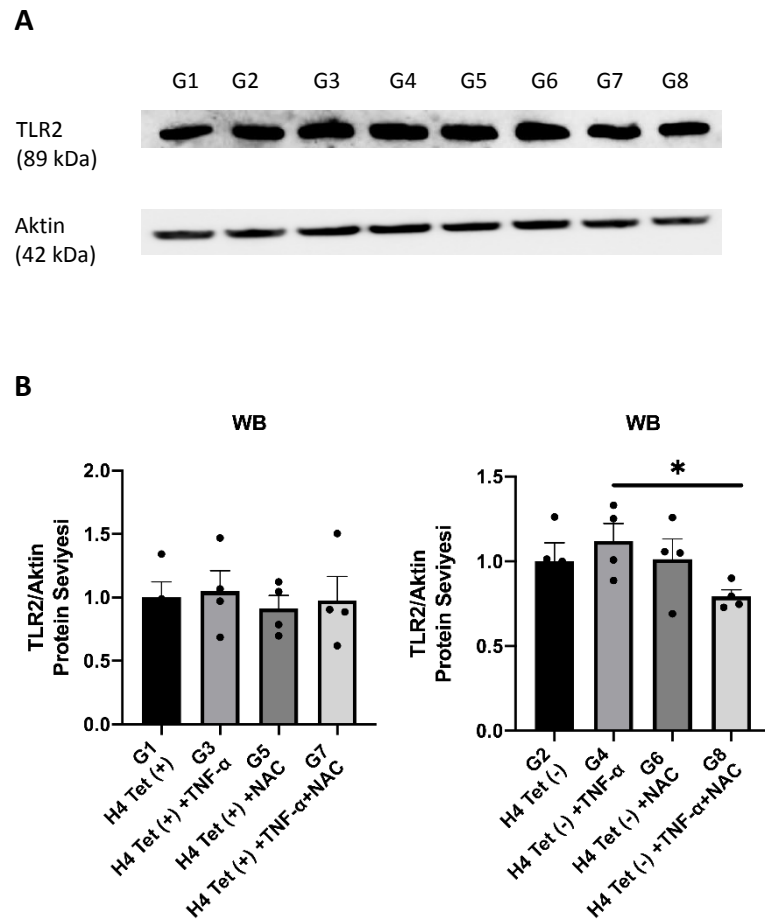
Her set için gerçekleştirilen LAG3 ve TLR2 reseptörleri ekspresyonlarının semi kantitatif değerlendirmesinde, normalizasyon sonrası değerler karşılaştırıldığında tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen grupların ayrı ayrı değerlendirmesinde her iki reseptör için de ANOVA test sonuçları istatistiksel olarak anlamlı değildi.

LAG3 reseptörü için tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda yer alan alt gruplar kendi içlerinde t-testi ile ikili olarak karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** LAG3 reseptörünün ekspresyonuna ait Western blot bulgusu. (A) LAG3 reseptörü ve endojen protein aktin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda LAG3 ekspresyonlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi görülmektedir.

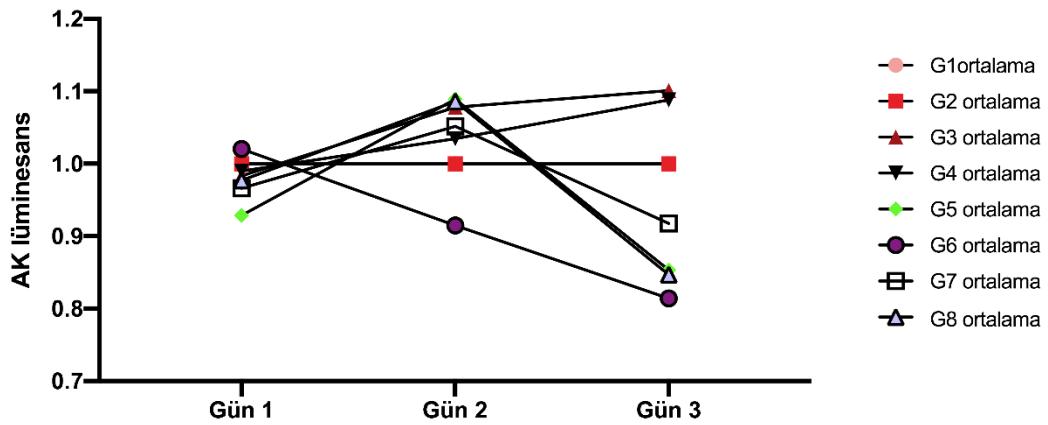
TLR2 reseptörü için tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda yer alan alt gruplar kendi içlerinde t-testi ile ikili olarak karşılaştırıldı. Tetrasiklin eklenen gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Tetrasiklin eklenmeyen grupların karşılaştırılması sonucunda, TNF- $\alpha$  eklenerek inflamasyonun tetiklendiği grubun (G4), inflamasyon tetiklendikten sonra anti-inflamatuar ilaç eklenen gruptan (G8) anlamlı derecede yüksek TLR2 reseptör proteinine sahip olduğu gözlemlendi (G4-G8  $p=0,02^*$ ) (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** TLR2 reseptörünün ekspresyonuna ait Western blot bulgusu. (A) TLR2 reseptörü ve endojen protein aktin için WB membran görseli, (B) Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda TLR2 ekspresyonlarının normalizasyon sonrası ortalamalarını yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi görülmektedir. (\* $p\leq 0,05$ , \*\*  $p\leq 0,01$ , \*\*\*  $p\leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p\leq 0,0001$ )

#### 4.4. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri İle Oluşturulan Deney Gruplarında Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

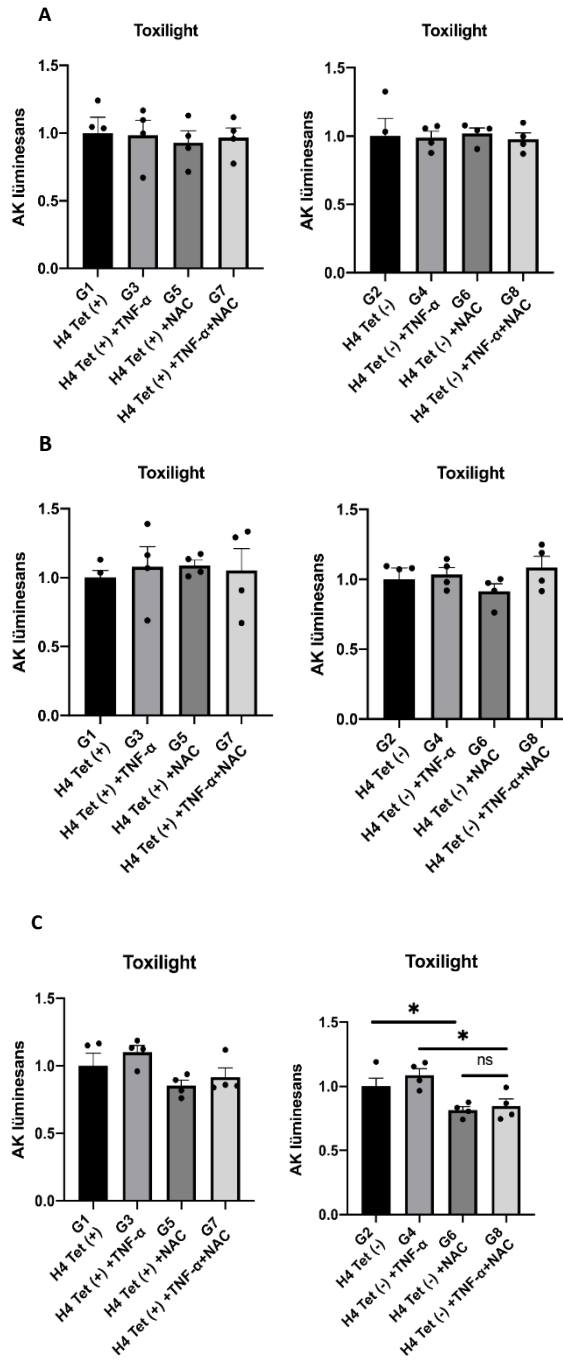
İnsan H4 nörogloma hücrelerinde TNF- $\alpha$  ile oluşturulan inflamatuvar modelde, inflamasyonun ve anti-inflamatuvar ilaç olarak kullanılan NAC'nin hücre sağ kalımı üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla tüm deney gruplarına hücre ölümünü yansıtan Toxilight-AK testi uygulandı. Toxilight testi tekrarları için farklı pasajlardan 4 set hazırlanıp, dördüncü iş paketinde açıklanan şekilde deney düzeneği kuruldu, belirtilen deney süresinin sonunda lüminesans değerleri ölçüldü. Elde edilen değerlerin her set için ortalaması istatistik değerlendirme için hesaplandı ve istatistik analizler bu 4 setten elde edilen ortalamalarla gerçekleştirildi (Şekil 4.16). İstatistiksel analizler ve değerlendirmeler tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda ayrı ayrı yapıldı.



**Şekil 4.16.** Tüm deney gruplar için hücre ölümü değerlerini yansıtan Toxilight testinin AK lüminesans değerlerinin ölçümünü gösteren çizgi grafiği.

Hücreler, 24 kuyucuklu plaklara aktarıldıktan sonra 24 saat tutunmaları ve tetrasikline cevap vermeleri için beklendi. 1. gün toxilight ölçümü ilaçlar eklenmeden önce, ilk baştaki hücre ölüm miktarını tespit etmek için gerçekleştirildi (Şekil 4.17A). Kuyucuklarda yer alan hücrelerin deney başında yaklaşık olarak eşit canlılığa sahip olduğu görüldü. 1. gün ölçümünün ardından G3, G4, G7 ve G8 gruplarının besi yeri TNF- $\alpha$  içeren besi yeri ile değiştirildi, diğer grupların besi yeri ise (G1, G2, G5 ve G6)

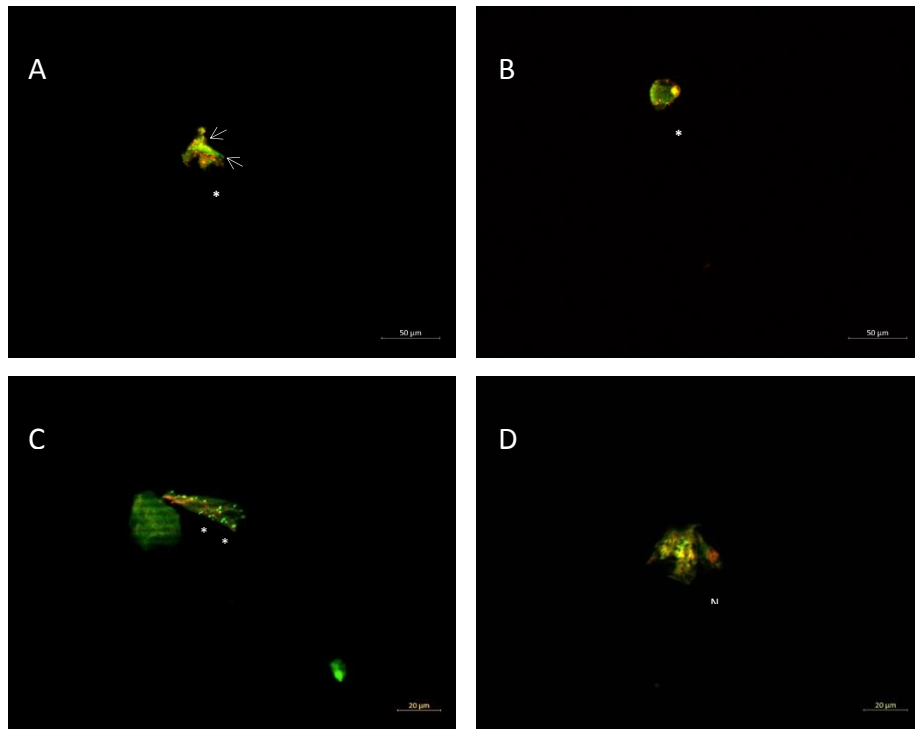
değişim ilaç içermeyen taze hücre besi yeri değiştirildi. Bu koşullar altında 24 saat daha inkübe edilen hücrelere inkübasyon süresinin sonunda 2. gün toxilight deneyi yapılarak lüminesans değerleri ölçüldü. İkinci gün yapılan ölçümlerin analizi sonucunda G4 ve G8 gruplarına ait lüminesans değerleri diğer gruplardan göreceli yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.17B). 2. gün ölçümlerinin ardından G1, G2, G3, G4 gruplarının besi yerleri ilaç içermeyen taze hücre besi yeri ile değiştirildi ve 24 saat daha inkübe edilmek üzere inkübatöre yerleştirildi. G5, G6, G7 ve G8 gruplarının besi yeri ise NAC içeren besiyeri ile değiştirildi ve 45 dakika inkübe edildi. 45 dakikanın sonunda bu grupların besi yeri de ilaç içermeyen taze hücre besi yeri ile değiştirildi ve hücrelerin anti-inflamatuar ilaca olan cevabının gözlenebilmesi için 24 saat daha inkübe edildi. 24 saatlik sürenin sonunda hücrelere 3. gün toxilight deneyi yapılarak lüminesans değerleri ölçüldü (Şekil 4.17C). Yapılan değerlendirmeler sonucunda tetrasiklin eklenen gruplarda (Tet (+) gruplar; G1, G3, G5 ve G7) hücre ölümünü yansıtan lüminesans değerlerine bakıldığında, TNF- $\alpha$  eklenen G3'de hücre ölümünün diğer gruplardan göreceli olarak daha yüksek olduğu, sadece anti-inflamatuar ilaç ile takip edilen G5'de ise hücre ölümünün göreceli olarak en düşük olduğu gözlemlendi. TNF- $\alpha$  eklenmesinin ardından NAC uygulanan G7 grubunun lüminesans ölçümlerinin G3 grubundan düşük, G5 grubu ile neredeyse aynı seviyede olduğu gözlemlendi (Şekil 4.17C). Tetrasiklin eklenmeyen gruplarda (Tet (-) gruplar; G2, G4, G6 ve G8) hücre ölümünü yansıtan lüminesans değerlerine bakıldığında, TNF- $\alpha$  eklenen G4'de hücre ölümünün kontrol grubundan göreceli olarak yüksek olduğu gözlemlendi. G4'de hücre ölümü, TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen gruptan (G8) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (G4-G8  $p=0,01^*$ ). Kontrol grubu ile (G2) anti-inflamatuar ilaç eklenen grup (G6) karşılaştırıldığında hücre ölümünün anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (G2-G6  $p=0,03^*$ ). G6 ve G8 gruplarının karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.17C).



**Şekil 4.17.** Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı hücre ölümü değerlerini yansıtan Toxilight testinin AK lüminesans değerlerinin ölçümünü ile elde edilen sütun grafikleri ve istatistik değerlendirmeleri. (A) Birinci gün uygulanan toxilight testine ait analizleri, (B) ikinci gün uygulanan toxilight testine ait analizleri ve (C) üçüncü gün uygulanan toxilight testine ait analizleri göstermektedir. (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , ns:  $p > 0,05$ )

#### 4.5. İnsan H4 Nörogloma Hücreleri İle Oluşturulan Deney Gruplarında TUNEL Uygulaması ile Apoptozun Değerlendirilmesi

H4 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hücre ölümünün karşılaştırılmasının yanı sıra, gruplar apoptoz açısından da değerlendirildi. TUNEL işaretlemesi 3 sette uygulandı ve her grup için toplamda en az 20 mikroskobik alan değerlendirildi (Şekil 4.18). 20 alanda yapılan hücre sayımı sonucunda her grup için apoptotik hücrelerin sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak apoptotik indeks hesaplandı (Tablo 4.2). Hesaplanan apoptotik indeksin gruplar arasındaki farklılığı istatistiksel olarak değerlendirildi.



**Şekil 4.18.** Pozitif TUNEL immunofloresan işaretlenmesi mikrografları. Apoptotik hücreler apoptozun karakteristik özelliklerini değişen evrelerde sergilemeleriyle diğer hücrelerden ayrılmaktadır (A, B, C ve D). Hücrelerin hacminde azalma, hücre membranında tomurcuk benzeri yapılanmalar (ok), DNA bütünlüğünün bozulması (DNA fragmentasyonu) ve apoptotik cisimler (yıldız) gözlenmektedir. Kullanılan kitin işaretlenme özelliklerine göre Propidium Iodide (PI) çekirdekleri (N) kırmızı renkte, FITC-dUTP apoptotik hücreleri yeşil renkte işaretlemektedir.



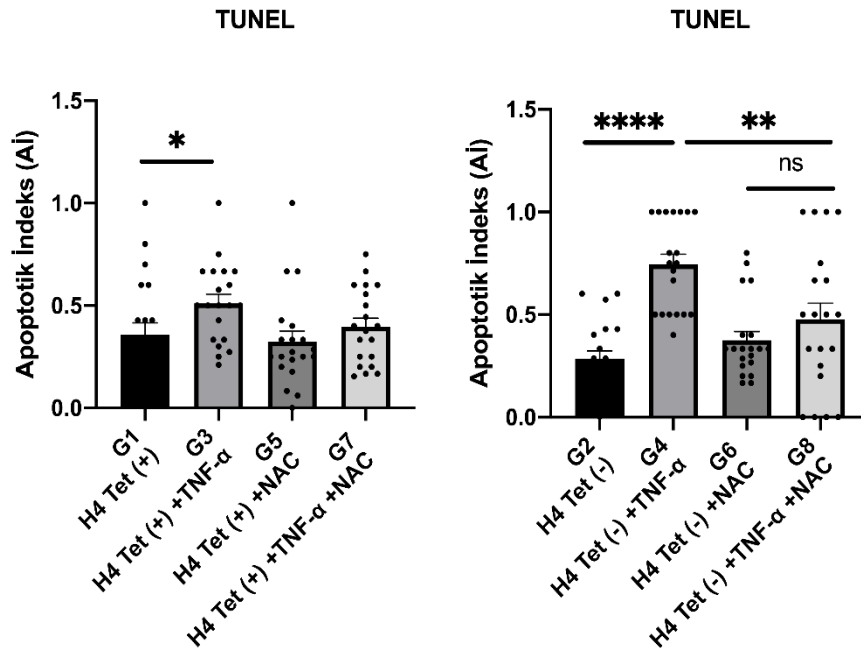
**Tablo 4.2.** TUNEL işaretleme yapılan deney gruplarında 20 alanda yapılan hücre sayımı tablosu. Tabloda her grup için yapılan sayım sonucunda elde edilen apoptotik hücre sayıları, toplam hücre sayıları ve hesaplanan apoptotik indeks değerleri görülmektedir.

| Deney Grupları | Apoptotik Hücre Sayısı | Toplam Hücre Sayısı | Apoptotik İndeks |
|----------------|------------------------|---------------------|------------------|
| G1             | 45                     | 132                 | 0.340909091      |
| G2             | 41                     | 162                 | 0.25308642       |
| G3             | 63                     | 141                 | 0.446808511      |
| G4             | 57                     | 79                  | 0.721518987      |
| G5             | 43                     | 200                 | 0.215            |
| G6             | 37                     | 107                 | 0.345794393      |
| G7             | 54                     | 149                 | 0.362416107      |
| G8             | 31                     | 64                  | 0.484375         |

Apoptotik indeks tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda, grupların kendi içerisinde değerlendirildi. Buna göre; hem tetrasiklin eklenen gruplarda (G1, G3, G5 ve G7) hem de tetrasiklin eklenmeyen gruplarda (G2, G4, G6 ve G8), TNF- $\alpha$  eklenen gruplarda (G3 ve G4) apoptotik indeksin daha yüksek olduğu görüldü. Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için yapılan ANOVA değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,04^*$  ve  $p<0,0001^{****}$ ).

Tetrasiklin eklenen gruplardan G3'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G5'e sadece NAC uygulandı ve G7'ye ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin alan grupların ikili karşılaştırılmalarında kullanılan t testi sonuçlarına bakıldığında apoptotik indeks G3 grubunda G1 kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksektir (G1-G3  $p=0,04^*$ ). G3 grubuna ait apoptotik indeks G7 grubundan görece olarak yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı (Şekil 4.19).

Tetrasiklin eklenmeyen gruplar içerisinde G4'e sadece TNF- $\alpha$  eklendi, G6'ya sadece NAC uygulandı ve G8'e ise TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklendi. Tetrasiklin eklenmeyen grupların ikili karşılaştırılmalarında kullanılan t testi sonuçlarına göre apoptotik indeks G4'de, kontrol grubu olan G2'den ve G8 grubundan istatistik olarak anlamlı yüksek bulundu (G2-G4  $p<0,0001^{****}$ , G4-G8  $p=0,06^{**}$ ). G6 ve G8 gruplarının karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Tablo 2’de deney grupları için verilen apoptotik indeksleri yansıtan sütun grafiği ve istatistik değerlendirmesi tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı görülmektedir. (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , ns:  $p > 0,05$ )

#### 4.6. İnsan H4 Nörogloma Hücrelerinde LAG3 ve TLR2 Reseptör

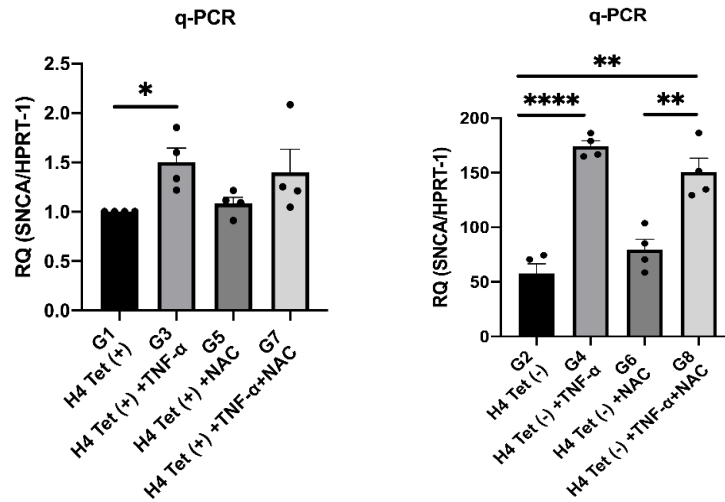
##### Ekspresyonlarının q-PCR ile Değerlendirilmesi

H4 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında  $\alpha$ -syn proteininin, LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin transkripsiyon düzeylerinin kantitatif tayini amacıyla, her grup ve set için miktarları belirlenmiş olan total RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve q-PCR yöntemi uygulandı. q-PCR tekrarları için farklı pasajlardan 4 set hazırlanıp çalışıldı. İlgilenilen genlere ait değerlerin normalizasyonu endojen kontrol olarak HRPT-1 geninin kullanılması ve RQ (Relative quantification) değerlerinin oranlanması ile gerçekleştirildi. Normalizasyon sonrasında istatistiksel değerlendirme tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için ayrı ayrı yapıldı. Deney gruplarından G1 ve G2 tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için kontrol gruplarıdır. G3 ve G4’e inflamasyonu tetiklemek amacıyla TNF- $\alpha$  eklendi. G5 ve G6’ya anti-inflamatuar ilaç olan NAC eklendi. G7 ve G8’e ise TNF- $\alpha$  ardından NAC eklendi.

Tetrasiklin eklenerek  $\alpha$ -syn proteininin aşırı sentezlenmesi durdurulurken, endojen  $\alpha$ -syn proteininin sentezlenmesi üzerinde bir blokaj etkisi söz konusu

değildir. Yani tetrasiklin antibiyotiği ile, transfeksiyon yöntemi uygulanarak  $\alpha$ -syn proteinini aşırı sentezlenmesi sağlanan hücrelerde bu sentez yeteneği durdurulmaktadır. Tetrasiklin eklenen gruplarda (G1, G3, G5, G7) yapılan ANOVA analizinde,  $\alpha$ -syn proteininin transkripsiyonu açısından gruplar arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Grupların kendi içlerinde yapılan ikili değerlendirmelerde, G1 ve G3 arasında istatistik açıdan anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir (G1-G3  $p=0,01^*$ ) (Şekil 4.20).

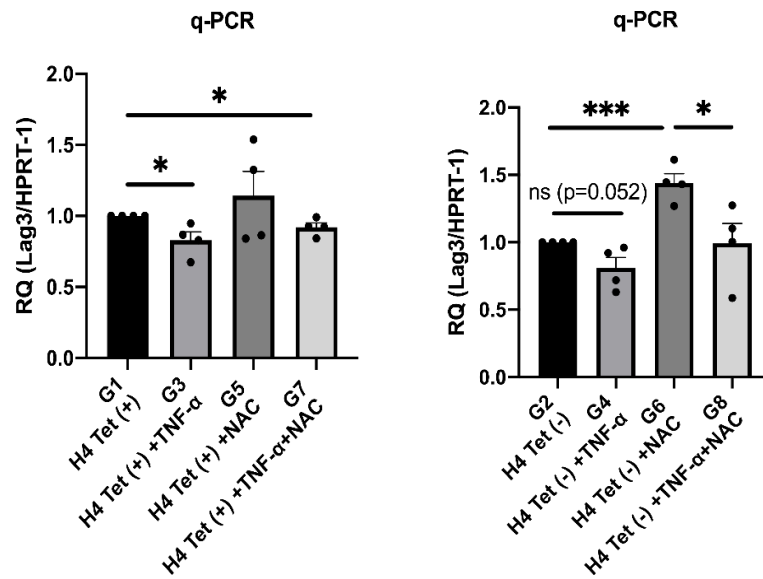
Tetrasiklin eklenmeyen yani  $\alpha$ -syn proteini aşırı sentezleyen gruplarda (G2, G4, G6, G8) yapılan ANOVA analizinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p<0,0001^{****}$ ). Grupların kendi içinde yapılan ikili değerlendirmelerde, G2 grubu ile G4 ve G8 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (G2-G4  $p<0,0001^{****}$ , G2-G8  $p=0,001^{**}$ ). Sadece NAC eklenen G6 grubu ile TNF- $\alpha$  ardından NAC eklenen G8 grubu arasında da anlamlı fark gözlemlendi (G6-G8  $p=0,004^{**}$ ) (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20.** Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için  $\alpha$ -syn proteininin transkripsiyonunu yansıtan q-PCR analizlerine ait sütun grafikleri görülmektedir. (\* $p\leq 0,05$ , \*\*  $p\leq 0,01$ , \*\*\*  $p\leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p\leq 0,0001$ )

LAG3 reseptörünün deney gruplarında transkripsiyon düzeylerinin değerlendirilmesi tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda ayrı ayrı yapıldı. Tetrasiklin eklenmeyen gruplar için ANOVA testi istatistik açıdan anlamlı bulundu ( $p=0,002^{**}$ ). Gruplar arası ikili değerlendirmede NAC eklenen G6 grubunun LAG3 transkripsiyon düzeyinin diğer gruplardan anlamlı derece yüksek olduğu dikkati çaktı (G2-G6  $p=0,0008^{***}$ , G6-G8  $p=0,03^*$ ) TNF- $\alpha$  eklenen G4 grubunda transkripsiyon düzeyleri kontrol grubundan düşük bulundu (G2-G4  $p=0,052$ ) (Şekil 4.21).

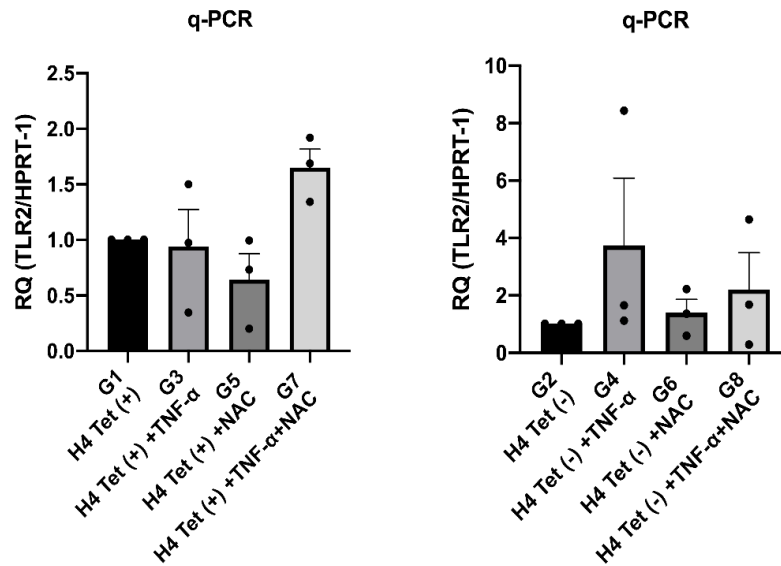
Tetrasiklin eklenen grupların ANOVA değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gruplar arası yapılan ikili değerlendirmelerde hem TNF- $\alpha$  eklenen G3 grubunun hem de TNF- $\alpha$  ve ardından NAC eklenen G7 grubunun kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük LAG3 transkripsiyonuna sahip olduğu gözlemlendi (G1-G3  $p=0,02^*$ , G1-G7  $p=0,03^*$ ) Sadece NAC eklenen G5 grubunda LAG3 transkripsiyon düzeyi diğer gruplardan göreceli olarak yüksek bulundu (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için LAG3 reseptörünün transkripsiyonunu yansıtan q-PCR analizlerine ait sütun grafikleri görülmektedir. (\* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , ns: $p > 0,05$ )

TLR2 reseptörünün deney gruplarında transkripsiyon düzeylerinin değerlendirilmesi tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplarda ayrı ayrı yapıldı. TLR2

reseptörü için yapılan transkripsiyon analizlerinin sonuçları şekil 4.22'deki grafikte görülmektedir. TLR2 reseptörü transkripsiyonu astrositlerde çok düşük düzeydedir. Çalışmamızda oluşturduğumuz 4 setten 1 sette değerlendirmeye alınabilecek sonuçlar elde edilemediği için çalışma dışı bırakıldı. Aynı sebeple, çalışmaya dahil edilen 3 sete ait verilerin çok geniş bir dağılıma sahip oldukları görüldü. Verilerin analizleri sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da; tetrasiklin eklenmeyen gruplarda TNF- $\alpha$  eklenerek inflamasyonun tetiklendiği grubun (G4), en yüksek transkripsiyona sahip olduğu gözlemlendi. Anti-inflamatuar ilaç uygulaması ile transkripsiyon düzeylerinin düştüğü görüldü.



**Şekil 4.22.** Tetrasiklin eklenen ve eklenmeyen gruplar için TLR2 reseptörünün transkripsiyonunu yansıtan q-PCR analizlerine ait sütun grafikleri görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Parkinson Hastalığı

#### 5.1.1. Parkinson Hastalığı Patofizyolojisi

Parkinson hastalığı yaşa bağlı en sık görülen motor hareket bozukluğudur (26). Parkinson hastalığındaki başlıca patolojik değişiklikler, melanin içeren dopaminerjik nöronların kaybı ve hücre içinde alfa sinüklein ( $\alpha$ -syn) ve diğer ubikutinlenmiş proteinleri içeren, Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan inklüzyon cisimlerinin oluşmasıdır. Bu şekilde oluşan, hatalı katlanmış  $\alpha$ -sinüklein oligomerleri ve agregatlarının hücre içinde birikimi sinükleinopatiler adı verilen nörodejeneratif hastalıkların ana belirteçidir. Bu hastalıklara örnek olarak, Parkinson Hastalığı, Lewy cisimciği ile ilişkili demans ve Multiple Sistem Atrofisi (MSA) verilebilir. Patogenez ve hastalığın ilerlemesinde çok önemli bir rol oynamasına rağmen,  $\alpha$ -syn proteininin işlevi ve  $\alpha$ -syn kaynaklı nörotoksisitenin altında yatan moleküler mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

#### 5.1.2. Parkinson Hastalığının Araştırılma Yöntemleri

Parkinson hastalığı, merkezi sinir sisteminin (MSS) bir bileşeni olan mezensefalunun Pars compacta kısmında bulunan dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterizedir (196). Bu sebepten, yaşayan insan dokusu üzerinde araştırma yapmak mümkün değildir. Bu etik kısıtlılık sebebiyle hastalığın altında yatan pek çok mekanizma henüz aydınlatılamamıştır. Bu eksik kısımları aydınlatmak, yeni tanı ve tedavi protokolleri geliştirebilmek amacıyla,  $\alpha$ -syn proteininin oligomerizasyon, toksisite ve hücreler arasındaki geçişin incelenmesi için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* deney modelleri araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Özellikle hücresel modeller, hastalığın patolojik sürecinin kavranabilmesi ve  $\alpha$ -syn toksisitesini modüle edebilen moleküllerin gözlenebilmesi açısından önemlidir. Aynı zamanda hücre modelleri, prelinik hayvan modelleri ve insan çalışmalarından önce anahtar yaklaşımlardır. Hücresel modellerin avantajları arasında hızlı ve tekrarlanabilir olması, düşük maliyetli oluşu, genetik modifikasyonlar ve farmakolojik manipülasyonların

yapılabilmesi iken, dezavantajları ise; nöron ağını tamamen gösteremeyen basit modeller oluşları ve hastalıkların karmaşıklığının tam modellenememesi olarak söylenebilir (197).

### 5.1.3. Parkinson Hastalığı Çalışmalarında Kullanılan *In vitro*

#### Modeller

##### Maya Hücresi

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kullanılan maya gibi tek hücreli organizmalar ve memeli hücre hatları, sinükleinopatilerin patofizyolojisi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Biyolojisi ve genetiği iyi bilinen tek hücreli bir maya olan *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*), özellikle protein katlanması ve parçalanmasında rol oynayan moleküler yolların ve proteinlerin prion benzeri davranışlarının nörodejeneratif hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmalar ile ilişkili olarak incelenmesinde büyük katkı sağlamıştır (197). Bu model,  $\alpha$ -syn sitotoksitesine bağlı hücre içi trafiğinde bozulma, lipit metabolizmasındaki değişikliklerin saptanması, oksidatif stres artışı mekanizmalarının araştırılmasında (198),  $\alpha$ -syn toksisitesi ve birikiminin altında yatan moleküler mekanizmaların incelenmesinde (199, 200) tercih edilmiştir. Günümüzde maya hücre modeli özellikle,  $\alpha$ -syn mutasyonlarının fenotipe etkisinin (201, 202) ve  $\alpha$ -syn proteininde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonların etkilerinin (203-206) incelenmesinde tercih edilmektedir.

##### Memeli Hücre Hatları

Araştırmalarda kullanılan bir diğer model olan memeli hücre hattı modelleri ise temel olarak iki gruba ayrılır. Bunlar; nöron kökenli hücre hatları ve farklı hücre tiplerinden köken alan nöron kökenli olmayan hücre hatlarıdır. Sinükleinopatilerde, hücrede  $\alpha$ -syn birikimi ve oligomer formlarının oluşmasını takiben, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, apoptoz ve oksidatif stres artışı, protein yıkım yolağında işlev kaybı başta olmak üzere pek çok hücre içi yolağın etkilendiği bilinmektedir (201, 207,

208). Bu yolların daha detaylı incelenebilmesi için  $\alpha$ -syn birikimi ve oligomer formlarının oluşumunu taklit edebilen hücrel modeller kullanılmaktadır.

### **Nöron Kökenli Hücre Hatları**

*In vivo* deneylerden elde edilen primer nöron kültürü, ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarına alternatif olarak düşünülebilecek bir modeldir. Embriyonik veya doğum sonrası erken dönemdeki fare veya sıçan yavrularından hazırlanır. Nöron ortamını çok iyi taklit eder ve buna bağlı fizyolojik olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Bunun yanı sıra, spesifik beyin bölgelerinden elde edilmek istenilen nöron tiplerinin çalışabilmesi konusunda avantaj sağlamaktadır. Parkinson hastalığı modellenmesinde, fare ventral mezensefalonundan primer dopaminerjik nöronların eldesi hastalığın patolojisi ve ilerlemesi konusunda detaylı bilgiler sağlamaktadır (209, 210). Aynı zamanda bu hücrelerde, WT veya mutant  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonu sağlanabilmektedir. Bunun için iki yöntem tercih edilebilir. Bunlar; normal model canlılardan izole edilen hücrelerde  $\alpha$ -syn ve izoformlarının transfeksiyon yolu ile ekspresyonunun sağlanması (211, 212) veya  $\alpha$ -syn transgenik hayvan modellerinden hücrelerin izole edilerek primer kültürünün yapılması (213) şeklindedir.  $\alpha$ -syn proteininin hücreden hücreye geçişine ait mekanizmaları ve bu süreçte etkili reseptör ve sinyal yollarını aydınlatmak amacı ile, son yıllarda prefibriler  $\alpha$ -syn (PFF) ile yürütülen çalışmaların bazılarında da primer nöron kültürü tercih edilmiştir. Hücreden hücreye geçişi modellemeyi temel alan bu çalışmalar, hücrelerde PFF sentezletmek ve agregat oluşumunu indüklemek amacıyla, hücrelerin rekombinant  $\alpha$ -syn ile transfekte edilmesi ile oluşturulmaktadır (214). Dış ortamda elde edilen PFF'lerin primer nöronlara uygulanması sonrasında endojen  $\alpha$ -syn, çözünmeyen, hiperfosforile, ubikutinlenmiş ve Lewy cisimciği benzeri agregatlar oluşturulabilir (215). Böylece  $\alpha$ -syn birikiminin erken dönemlerinden, hücreler arasında yayılmasına ve hücre ölümüne kadar geçen sürecin incelenmesine olanak sağlar (216).

Farklandırılmış ölümsüz dopaminerjik hücre hattı modelleri Parkinson hastalığı çalışmalarında kullanılan bir diğer *in vitro* model grubudur. Bu grupta sıklıkla insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) ve sıçan feokromositoma hücre hattı



(PC12) tercih edilmektedir (217, 218). Bu hücre hatlarına ait hücreler, PH'de etkilenen nöron popülasyonu ile birçok benzerlik taşımaktadır ve nörodejeneratif mekanizmaları anlamak için yaygın olarak kullanılırlar. PC12 ve SH-SY5Y hücreleri, retinoik asit (RA) ve beyin-türevli nörotrofik faktöre (BDNF) maruz kaldıktan sonra nöronlara farklanabilmektedir (217, 218). Primer nöron kültürüne olan avantajları ise, devamlı çoğaltılabilmeleri ve daha az iş yükü olmasıdır. Diğer bir avantajları ise,  $\alpha$ -syn ve izoformlarının aşırı ekspresyonunun sitotoksositeye yol açması ve hücre sağ kalımını etkilemesidir (219, 220). Yapılan çeşitli çalışmalarda, SH-SY5Y hücre kültürü modelinde agregatların ve Lewy cisimciklerinin oluşumunun da tetiklenebildiği gösterilmiştir (221, 222).

Son yıllarda üzerinde çokça durulan diğer bir model ise, hastalardan elde edilen hücreler ile kök hücreye farkedirilebilen hücre modelleri oluşturulmasıdır (223). Kişiselleştirilmiş tıp kapsamında, hastaya özgü hücre modellemesi yapmak amacıyla insan deri fibroblastları kullanılır. Spesifik pluripotensi regülatörlerinin aktarılması ile deri fibroblastları yeniden programlanarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerine (iPSC'ler) dönüştürülebilir (223, 224). Bu yöntem ile *in vitro* ortamda hastaya özgü her tür sinir hücresinin üretilmesi teorik olarak mümkündür. Böylece, hastalıkların etiopatolojisinin, hastalıkları hedefleyen yeni ilaçların ve hücresel tedavilerin kişiye özel olarak araştırılması mümkün olabilecektir (225). Ve hatta daha ileri çalışmalar ile beyin karmaşıklığını taklit eden 3-boyutlu organoidlerin geliştirilmesi mümkün olabilecektir (225). Bu ileri tekniklerin kullanımı ile özellikle çalışılması zor olan insan MSS araştırılmalarında, nörodejeneratif hastalıkların altında yatan mekanizmaların anlaşılması, genotip ile fenotip arasındaki ilişkinin aydınlatılması ve bu ilişkinin CRISPR-Cas9 genom düzenleme metotlarıyla modüle edilerek hastalığa neden olan mutasyonların rolünün aydınlatılmasının ve tedavi metotlarının geliştirilebilmesinin önünü açacaktır (226, 227). Teorikte çok yararlı görünen bu yeni jenerasyon modellerin de bir takım kısıtlılıkları mevcuttur. Başlıca engeller, MSS'de farklı görevleri olan çok farklı hücre tipleri bulunması ve bunların aynı kültür koşullarında yetiştirilmesinin zorlukları olarak sıralanabilir. Bunun yanı sıra nörodejeneratif hastalıklar genellikle ileri yaşlarda başlarken, iPSC uygulaması ile

hücreler embriyonik dönemdekine yakın bir duruma getirilmektedir. Bu uygulamaya bağlı olarak hücrelerin pluripotensi yeteneği kazanması, tümör oluşturma potansiyelini de beraberinde getirir (228, 229).

### **Nöronlardan Köken Almayan Hücre Hatları**

Nöron kökenli olmayan ölümsüzleştirilmiş hücre hattı modelleri arasında laboratuvarlarda en sık kullanılanlar insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) ve insan nörogloma (H4) hücre hatlarıdır. Bu hücrelere çeşitli yöntemlerle transfeksiyon uygulanarak, *WT (wild type)* veya mutant  $\alpha$ -syn proteini aşırı eksprese edebilen stabil ölümsüz hücre hatları elde edilebilmektedir (192, 202, 230). Bu hücreler ile oluşturan modellerde çeşitli kısıtlılıklar söz konusu olabilmektedir. Bu kısıtlılıklar başlıca;  $\alpha$ -syn ekspresyonunun hücrelere veya koşullara göre değişiklik göstermesi, her hücrede inklüzyonların oluşmaması, veya oluşan inklüzyonların Parkinson hastalarında post-mortem olarak saptanan inklüzyonlara benzerlik göstermemesi olarak belirtilebilir (197). Yine de bu modellerin çalışmalarda sağladıkları avantajlar dezavantajlarından daha üstün olduğu için pek çok araştırmacı tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Bu kısıtlılıkların üstesinden gelebilmek adına hücrelerde toksik ortamı sağlamak için çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Bunlardan bazıları; 1- metil-4-fenilpiridinyum (MPP+), rotenon veya proteazom inhibitörleri gibi toksinler ile inklüzyon yükünün arttırılması (192, 231) veya Synphilin-1 gibi  $\alpha$ -syn ile etkileşen proteinlerin  $\alpha$ -syn ile birlikte ekspresyonunun sağlanarak daha büyük agregatların elde edilmesi (192, 232) şeklinde sıralanabilir.

Literatürde yer alan bilgilere bakıldığında H4 hücre hattı, nörodejeneratif hastalıkların altında yatan hücresel ve moleküler patolojilerin araştırılmasında, toksisite ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla planlanan *in vitro* deney modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır (70). Nörogloma hücre hattı, biyokimyasal analizlerin yapılması, deneylerin tekrarlanması ve devamlılığı açısından primer nöronlara göre daha avantajlıdır (192).

### **Parkinson Hastalığında H4 Hücrelerinin Model Olarak Kullanılması**

H4 hücreleri, transfeksiyon yöntemi uygulanarak  $\alpha$ -syn proteinini aşırı sentezlemesi yönünde programlanabilmekte ve protein aşırı ekspresyonu tetrasiklin (tet) antibiyotiği uygulamasıyla kontrol edilebilmektedir (193, 207). Ancak tetrasiklin kullanımı, hücrelerde normal koşullar altında sentezlenen endojen  $\alpha$ -syn proteininin ekspresyonunu etkilememektedir (192). Böylece H4 hücreleri ile,  $\alpha$ -syn proteininin aşırı ekspresyonu ve hücre içinde birikimi ortak özelliğinin altında toplanan sinükleinopatiler için model geliştirmek ve hücre kültürü çalışmaları yapmak mümkündür.

**Bu tez çalışmasında** WT  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden insan nörogloma (H4) hücre hattı kullanılarak inflamatuvar bir Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuştur. Çalışmamızda kullanmayı tercih ettiğimiz bu model ile,  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese eden ve tetrasiklin uygulanarak  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese etmesi durdurulan kontrol grupları oluşturulmuştur. Tetrasiklin eklenen (tet +) ve eklenmeyen (tet -) gruplar arasında,  $\alpha$ -syn proteininin ekspresyonu açısından anlamlı fark olduğu immunofloresan ve Western Blot yöntemleriyle gösterilmiştir. Ayrıca bu bulgularla tutarlı olacak şekilde, q-PCR sonuçları da  $\alpha$ -syn protein transkripsiyonunun tet eklenen gruplarda azaldığını ve sadece endojen  $\alpha$ -syn transkripsiyonu olduğunu göstermiştir. Bu modelde inflamasyon dışarıdan kültür ortamına TNF- $\alpha$  eklenmesi ile tetiklenmiştir. Sonrasında anti-inflamatuvar ajan olarak N-asetilsistein (NAC) uygulanmıştır ve bu ilacın etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamız, nöroinflamasyon sürecine odaklanmaktadır. Nörogloma hücrelerinin astrositlerden köken alması ve astrositlerin nöroinflamasyonda rol oynaması, bu hücre hattını bu çalışma için uygun ve avantajlı hale getirmiştir.

### **5.2. Transgenik Hücrelerde İnflamasyonun Tetiklenmesi ve Etkilerinin Değerlendirilmesi**

TNF- $\alpha$ , uzun yıllardır bilinen güçlü bir pro-apoptotik ve pro-inflamatuvar sitokindir (233). TNF- $\alpha$ 'nın MSS'de hem fizyolojik koşullarda hem de nöroinflamasyonda aktif rol aldığı bilinmektedir (234). Sağlıklı MSS'de TNF- $\alpha$ , sinaptik

plastisite (235), öğrenme ve hafıza(236, 237), uyku (238), yiyecek ve su alımı (239) gibi önemli fizyolojik süreçler üzerinde düzenleyici işlevlere sahiptir. Patolojik koşullarda, astrositler ve esas olarak mikroglia hücreleri önemli miktarlarda TNF- $\alpha$  sentezler ve salgılar; ve bu süreç nöroinflamatuvar yanıtın önemli bir bileşenidir (240-242). Ortaya çıkan nöroinflamasyon, nörodejenerasyonda süreci tetikleyici ve arttırıcı etkilere sahiptir (142). Yapılan çalışmalarda, travmatik beyin hasarı (243), iskemi (244), Alzheimer Hastalığı (245), Parkinson Hastalığı (246, 247), Multiple Skleroz (248) ve Amyotrofik Lateral Skleroz'da (249) yüksek TNF- $\alpha$  seviyeleri tespit edilmiştir.

Çalışmamızda TNF- $\alpha$  eklendikten sonra hücre kültüründe inflamasyonun tetiklendiği, Western Blot tekniği uygulayarak IL-1 $\beta$  seviyelerinin artışı yolu ile kanıtlandı. Bunun yanı sıra TNF- $\alpha$  eklenerek inflamasyon tetiklenen gruplarda,  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak,  $\alpha$ -syn seviyelerinin literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumlu olarak arttığı gözlemlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda nöroinflamasyon varlığında hem ortamdaki TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi inflamatuvar sitokinlerin hem de hücre içi ve dışı  $\alpha$ -syn seviyelerinin doğru orantılı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (250, 251). Son yıllarda yapılan az sayıdaki çalışma ile benzer şekilde (252), çalışmamızda q-PCR deneyi ile bu artışın transkripsiyon düzeyinde de anlamlı olduğu görüldü. Oluşturduğumuz bu modelde, inflamasyonun tetiklenmesi ile  $\alpha$ -syn artışı arasında bir doğru orantı olduğunu gösterdik.

TNF- $\alpha$  aynı zamanda hücre zarında yer alan TNFR-1 reseptörüne bağlanarak ekstrinsik apoptoz yolağını tetiklediği bilinen bir sitokindir (233). Reseptörüne bağlanmasının ardından hücre içinde kaspaz yolağındaki düzenleyici moleküllerden kaspaz 8, kaspaz 3 ve PARP aktivasyonu ile apoptoza gidişi tetiklemektedir (233). Literatürdeki bu bilgiler ışığında çalışmamızda hücre ölümünü değerlendirmek için Toxilight testi, apoptozu değerlendirmek için ise TUNEL ve Western Blot deneylerinden yararlandık. Toxilight deneyi sonucunda en yüksek hücre ölümü, tet (-) ve TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklendiği grupta (G4) görüldü. Toxilight deneyinden elde edilen sonuçlarla paralel olarak, TUNEL deneyi sonucunda, TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklenmesi ile  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak apoptotik indeksin anlamlı şekilde arttığı saptandı. Western Blot deneyi ile iki apoptoz

belirtecinin (PARP ve kaspaz 9) seviyeleri ölçüldü. Kaspaz 9 intrinsik kaspaz yolağında rol alan bir molekülken, PARP aktif kaspaz 3'ün hedef molekülüdür. Son basamakta aktiflenen kaspaz 3 tarafından kesilerek aktif PARP oluşur ve apoptozu başlatır. Çalışmamızda aktif PARP/PARP düzeyleri TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptozu temsil ederken, kesilmiş kaspaz 9/kaspaz 9 düzeyleri mitokondriyon üzerinden tetiklenen hücre içi yolak ile aktive edilmiş programlı hücre ölümünü göstermektedir. Sonuçlara baktığımızda diğer deney sonuçları ile doğru orantılı olacak şekilde, tet (-) gruplardan inflamasyonun tetiklendiği G4 grubunda aktif PARP/PARP protein seviyeleri anlamlı şekilde yüksek bulundu. Kesilmiş kaspaz 9/kaspaz 9 seviyelerinde ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Özetle bu veriler, TNF- $\alpha$ 'nın H4 hücreleri ile oluşturulan bu modelde özellikle  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonu ile birlikteliğinde, hem inflamasyonu hem de hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir.

### **5.3. N-Asetilsisteinin Anti-inflamatuar Olarak Kullanılması**

NAC, klinik olarak minimal yan etkilere sahip, güvenli, iyi tolere edilen bir ilaçtır (160). L-sistein aminoasidinin N-asetil türevidir ve kuvvetli bir anti-oksidandır (160). Hücrelerde sistin glutamat antiporter aktivitesini ve glutatyon biyosentezini düzenleyerek anti-oksidan etki gösterir (164). NAC, kuvvetli bir anti-oksidan olmasının yanı sıra, anti-inflamatuar ve anti-kanserojen etkilere sahip bir ilaçtır (253). NAC'nin anti-inflamatuar etkileri üzerine yapılan bazı çalışmalar, bağışıklık yanıtının erken dönemlerinde TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 başta olmak üzere pro-inflamatuar sitokinlerin miktarında azalma olduğunu ortaya koymuştur (166). Bunun yanı sıra, inflamasyon sürecinde etkili NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) yolağının aktivasyonunu da engelleyerek anti-inflamatuar etki gösterdiği bilinmektedir (12, 163). Bu bulgulara dayanarak, NAC molekülünün TNF- $\alpha$  tetiklenmesiyle oluşan inflamasyon üzerine etkisinin gözlenmesi tez çalışmamızda hedeflenmiştir. Bu amaçla NAC, tetrasiklin eklenerek takip edilen gruplardan G5'e ve tetrasiklin eklenmeyen gruplardan G6'ya tek başına uygulanmıştır. Ayrıca inflamasyon sonrası etkilerini saptamak amacı ile NAC, tetrasiklin eklenerek takip edilen gruplardan G7'ye ve tetrasiklin eklenmeyen gruplardan G8'e TNF- $\alpha$  uygulaması sonrasında verilmiştir.

NAC'nin tek başına uygulandığı durumda hücreler üzerindeki anti-inflamatuar etkilerini saptamak amacıyla Western Blot tekniği ile IL-1 $\beta$  seviyeleri değerlendirildi. Sadece NAC uygulanan gruplar ile kontrol grupları arasında IL-1 $\beta$  seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu bulguya ek olarak, q-PCR testi ile yapılan değerlendirmede hem tet (+) hem de tet (-) gruplarda, NAC uygulanan gruplar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında  $\alpha$ -syn transkripsiyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Sadece NAC uygulanan gruplarda inflamasyonu arttıracak her hangi bir ek durum olmaması sebebiyle elde ettiğimiz bu veriler hipotezimizi desteklemektedir.

Sadece TNF- $\alpha$  uygulanan ve TNF- $\alpha$  uygulamasının ardından NAC eklenen gruplar IL-1 $\beta$  seviyeleri açısından Western Blot tekniği uygulanarak karşılaştırıldı. Daha önceki deneylerimizde, inflamasyonu anlamlı şekilde tetikleyebildiğimizi göstermemiz üzerine bu aşamada, inflamasyonun tetiklenmesinin ardından NAC uygulanmasının inflamasyonu kontrol altına aldığı gösterilmesi hedeflendi. Deney sonuçları değerlendirildiğinde,  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak TNF- $\alpha$  uygulamasının ardından NAC eklenen gruplarda, IL-1 $\beta$  seviyeleri NAC uygulaması sonrası anlamlı şekilde düşük bulundu. q-PCR testi ile yapılan değerlendirmede hem tet (+) hem de tet (-) gruplarda  $\alpha$ -syn transkripsiyonu açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Bu veriler, H4 hücreleri ile oluşturulan bu modelde TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklenmesini takiben NAC uygulanmasının inflamasyonu kontrol altına almada işlevsel olduğunu göstermektedir.

#### **5.4. N-Asetilsisteinin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi**

TNF- $\alpha$  uygulaması ile inflamasyonun, apoptoz yolağının ve hücre ölümünün anlamlı şekilde tetiklendiğini gösterdik. Sonraki aşamada NAC'nin, bu yolaklarla ilişkili olarak etkilerini saptamak amacı ile Toxilight testini, TUNEL ve Western Blot deneylerini uyguladık.

Sadece NAC eklenen gruplarda (G5 ve G6) Toxilight testi sonucunda hücre ölümünde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında azalma olduğu görüldü. Western Blot sonuçlarında ise tet (-) gruplarda kesilmiş kaspaz 9/kaspaz9 seviyeleri G6

grubunda daha düşük bulundu. Ancak aktif PARP/PARP protein seviyeleri G6 grubunda anlamlı bir farklılık göstermedi. TUNEL deneyi sonucunda, G5 ve G6 grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Apoptoz düzeyini karşılaştırmada yararlanılan bu deneylerde Toxilight testi sonuçlarıyla uyumlu veriler elde edildi. Ortamda yüksek düzeyde  $\alpha$ -syn proteini mevcutken apoptoz düzeylerinde de anlamlı düşüş görüldü. Apoptozda kaspaz 9 yolağı üzerinden daha belirgin bir düşüş bulunmaması beklenen bir bulgudur. PARP TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptoz yolağını temsil eder ve burada hücrelerde bu yolak tetiklenmemiştir. Bunun yanı sıra, oksidatif stresin hücrelerde mitokondriyonlar üzerinden intrinsik apoptoz yolağını tetiklediği ve apoptozun buna bağlı olarak arttığı bilinmektedir (254). NAC'nin kuvvetli bir anti-oksidan olması ve hücrelerde oksidatif strese yol açan moleküllerin birikimini engellemesine bağlı olarak, bu deneyde intrinsik yolağı temsil eden kaspaz 9 seviyelerinde anlamlı bir azalma saptandı. Oluşturulan deney modelinde bu sonuçlar ışığında, NAC uygulamasının  $\alpha$ -syn kaynaklı apoptozu, intrinsik apoptoz yolağı üzerinden azalttığı sonucuna ulaşıldı.

TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC eklenen gruplarda Toxilight deneyi sonucunda hücre ölümünün düşük olduğu gözlemlendi. Hücre ölümünde azalma,  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonu olan grupta (G8) daha belirgin ve anlamlı bulundu. TUNEL deneyi sonucunda, inflamasyonun tetiklendiği koşullarda  $\alpha$ -syn aşırı sentezi olan gruplarda daha belirgin olmak üzere TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC eklenen gruplarda apoptotik indeks daha düşük bulundu. Western Blot deneyi sonucunda,  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonundan bağımsız olacak şekilde, sadece TNF- $\alpha$  eklenen ve TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC eklenen gruplarda, kesilmiş kaspaz 9/kaspaz 9 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Aktif PARP/PARP protein seviyeleri ise,  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak, TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC eklenen gruplarda sadece TNF- $\alpha$  eklenen gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Ayrıca Toxilight deneyi sonucunda, ortamda yüksek düzeyde  $\alpha$ -syn proteini mevcutken NAC eklenmesi ile hücre sağ kalımındaki artış daha anlamlıdır. Western Blot deneyi sonucunda, TUNEL deneyi ile paralel şekilde, G5 ve G6 grupları

ile G7 ve G8 grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi. Bu sonuçlar, NAC'nin anti-inflamatuar ve anti-apoptotik olarak bu modelde etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Elde edilen bulgular bir araya getirildiğinde çalışmanın araştırma sorularından "NAC uygulamasından sonra inflamasyon ve apoptozda azalma oluyor mu?" sorusuna yanıt verdik. H4 hücreleri ile oluşturulan bu *in vitro* modelde TNF- $\alpha$  uyguladığımız deney gruplarında inflamasyonun tetiklendiği, TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC verilmesinin inflamasyonu başarılı bir şekilde kontrol altına aldığı gösterildi. Diğer bir araştırma sorumuz olan "NAC uygulamasından sonra hücre sağ kalımı artıyor mu?" sorusu da yanıtlandı. NAC uygulaması sonrası hücre sağ kalımının arttığı ve TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptozun azaldığı gösterildi.

### 5.5. N-Asetilsistein Tarafından Etkilenen Yolakların İncelenmesi

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), doğal bağışıklık sisteminin en önemli bileşenlerinden birisidir. Mikroorganizmalara karşı immun cevapta patojen ilişkili molekülleri tanıma reseptörleri olarak ve hasarlı veya ölü hücreleri tespit etmede görev alırlar (255). TLR2 (CD282) hücre zarında bulunan, insanlarda *TLR2* geni tarafından kodlanan bir transmembran proteindir (256). TLR2 belirgin olarak, nöronlar, mikroglia hücreleri, Schwann hücreleri, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, polimorfonükleer lökositler, B hücreleri, ve T hücrelerinde eksprese edilmektedir (257, 258). TLR'lerin, PH'nin de içinde yer aldığı nörodejeneratif hastalıklarda, hastalığın ortaya çıkmasında ve seyrinde yeri olan nöroinflamasyon sürecinde önemi büyüktür (257).

PH'de, nöronlardan hücre dışı ortama  $\alpha$ -syn geçişi olur ve nöronlar ve glia hücrelerinin hücre zarında yerleşen (özellikle mikroglia hücrelerinde) TLR2 ve TLR4 reseptörleri bu proteini tanıyarak bir yanıt başlatır (133, 259). TLR2 reseptörünün pro-inflamatuar yanıtta sorumlu olduğu gösterilmişken, TLR4 reseptörünün mikroglia hücrelerinde  $\alpha$ -syn yıkımını tetikleyerek hücre sağ kalımını arttırıcı rol oynadığını öne süren bazı çalışmalar mevcuttur (260). Buna rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar TLR4 reseptörünün de PH'de inflamasyonu arttırıcı yönde rol aldığını göstermektedir (158). TLR2 reseptörüne ligand bağlanması ile reseptör aktivasyonunu takiben hücre



içinde NF-kB sinyal yolağı aktive olur. Bunun sonucunda bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin çekirdeğe translokasyonu ile, inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonu ve ekspresyonu başlatılır ve inflamatuvar yanıt ortaya çıkar (261, 262). İnflamatuvar yanıtta özellikle mikroglia hücreleri ve astrositlerden ortama salınan NO (263), TNF- $\alpha$  (264) ve IL-1 $\beta$  (265) seviyelerinin artışı ile dopaminerjik hücre ölümünün paralel olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (133). Ayrıca, literatürde yer alan bir çalışmada Parkinson hastalarında TLR2 ekspresyonunun sadece merkezi sinir sisteminde bulunan hücrelerde değil, periferik dolaşımda bulunan monositlerde de arttığı; böylece Parkinson hastalarında inflamasyonun sadece merkezi sinir sistemi ile sınırlı kalmadığı gösterilmiştir (266).

*Lymphocyte-activation gene 3* (LAG3 veya CD223), hücre yüzeyinde bulunan bir transmembran proteindir. İnsanlarda LAG3 geni tarafından kodlanan immunoglobulin süper ailesine ait bir immun kontrol noktası reseptörüdür (267). İlk olarak periferik bağışıklık sistemine ait doğal öldürücü hücreler (NK hücreler), CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri, B hücreleri ve dendritik hücrelerde tanımlanmıştır. Merkezi sinir sisteminde yapılan araştırmalar sonucunda, mikroglia hücreleri ve nöronlarda da eksprese edildiği gösterilmiştir (268). Özellikle otoimmün hastalıklarda (269) ve kanserde (270) LAG3'ün rol oynadığına dair veriler olmasına rağmen, merkezi sinir sistemindeki işlevlerine ve nörodejeneratif hastalıklardaki rolüne ilişkin bilgiler oldukça kısıtlıdır (216). Son zamanlarda nörodejeneratif hastalıklar ve nöroinflamasyonda nasıl bir işlevi olduğuna dair araştırmalar yapılmaya başlanmıştır (268). LAG3'nin PH'nin nöroinflamatuvar sürecinde,  $\alpha$ -syn proteininin PFF formunun hücreden hücreye "prion benzeri" bir şekilde geçişini düzenliyor olabileceği üzerinde durulmaktadır (216, 271). Bunun yanı sıra, Çin'de Parkinson hastaları ile yürütülen bir klinik çalışma, ELISA metodu ile ölçülen serum sLAG3 (çözülebilir LAG3, soluble LAG3) düzeylerinin, yaş ve cinsiyet uyumlu esansiyel tremoru bulunan hastalarda kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir (272). Aynı çalışmada, inflamatuvar sitokinlerin de bazı non-motor ve motor semptomu olan hastalarda LAG3 seviyeleri ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir (272). Bu

bulgular üzerine sLAG3'ün PH için bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği akıllara gelmektedir.

Önceki çalışmalar, LAG3 reseptörünün nöroinflamasyonda rol oynayan ana hücrelerde eksprese edildiğini ortaya koymuştur. LAG3 seviyelerinde değişiklik Parkinson hastalarında tanımlanmış olmasına rağmen (272), PH ile ilişkili olarak etkilenen hücre tipine özgü sinyal yolları astrositlerde çalışılmamıştır. Hipotezimizde LAG3'ün nöroinflamasyonun başlıca astrositik düzenleyicilerinden biri olabileceği ve ekspresyon seviyelerinin, inflamatuvar TNF- $\alpha$ 'nın uygulanmasıyla uyarılabileceği ve astrositlerin TNF- $\alpha$  yoluyla artan proinflamatuvar yanıtının NAC uygulamasıyla azaltılabileceği öne sürüldü.

Bu amaçla, inflamasyon sürecinde üzerinde durduğumuz LAG3 ve TLR2 reseptörlerinin seviyelerindeki değişimi belirlemek için immunofloresan işaretleme, Western Blot ve q-PCR deneyleri gerçekleştirildi. Tet (+) ve (-) gruplar arasında reseptör ekspresyonları açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Elde ettiğimiz bu sonuç, tek başına  $\alpha$ -syn varlığının reseptör seviyelerinde değişime sebep olmadığını ve nöroinflamasyonun reseptör seviyelerindeki muhtemel değişimi göstermekte önemli bir etken olduğunu ortaya koymaktadır.

LAG3 reseptör düzeyleri, TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklelenmesini takiben,  $\alpha$ -syn protein aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak hem immunofloresan işaretleme analizleri sonucunda hem de Western Blot analizinde kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. q-PCR metodu ile LAG3 reseptör transkripsiyon düzeyleri değerlendirildiğinde, bu sonuçları destekleyecek şekilde,  $\alpha$ -syn protein aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak LAG3 transkripsiyonunun kontrol grubundan düşük olduğu saptandı. Bu sonuçlar öngörülenin aksine, bu modelde inflamasyon varlığında LAG3 reseptöründe düşüş olduğunu göstermektedir. TLR2 seviyeleri için yapılan aynı değerlendirmelerde ise, inflamasyon ile reseptör seviyelerinde artış gözlemlendi. TLR2 reseptör düzeyleri, TNF- $\alpha$  ile inflamasyonun tetiklendiği gruplarda,  $\alpha$ -syn protein aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak hem immunofloresan işaretleme analizleri sonucunda hem de Western Blot analizinde yüksek olarak saptandı. q-PCR metodu ile TLR2 reseptör transkripsiyon düzeyleri de belirlendi. TLR2 transkripsiyon

seviyelerindeki değişim, immunofloresan ve Western Blot sonuçlarını göreceli olarak desteklemesine rağmen, deney tekrarlarında dikkat çeken geniş dağılım sebebiyle oluşan bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu dağılım, TLR2 transkripsiyonunun astrositlerde düşük seviyelerde olmasına bağlandı.

Sadece NAC eklenen gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, q-PCR deneyi sonucunda,  $\alpha$ -syn proteinin aşırı eksprese olduğu gruplarda daha belirgin olmak üzere, LAG3 transkripsiyonun arttığı görüldü. Ancak bu değişim protein seviyelerini yansıtan immunofloresan ve Western Blot deneylerinin sonucunda gözlenmedi. TLR2 seviyeleri için yapılan aynı karşılaştırmada,  $\alpha$ -syn protein aşırı ekspresyonundan bağımsız olarak immunofloresan işaretleme analizleri ve Western Blot sonuçlarında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu sonuçları destekleyecek doğrultuda transkripsiyon düzeyinde de anlamlı bir farklılık bulunmadı.

TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC eklenen gruplarda, LAG3 için yapılan transkripsiyon ölçümleri, kontrol grubu ile benzer olmakla birlikte sadece NAC eklenen gruplardan düşük bulundu. İmmunofloresan ve Western Blot deneylerinin sonucunda ise protein düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmadı. TLR2 reseptör seviyeleri için yapılan karşılaştırmada,  $\alpha$ -syn aşırı ekspresyonundan bağımsız şekilde, TNF- $\alpha$  uygulamasını takiben NAC eklenen gruplarda, TLR2 reseptör seviyeleri immunofloresan işaretleme analizleri ve Western Blot sonuçlarında anlamlı derecede düşük bulundu. q-PCR analizi sonucunda elde edilen TLR2 transkripsiyon seviyelerindeki değişim, immunofloresan ve Western Blot sonuçlarını desteklemesine rağmen, q-PCR'da gözlenen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. TLR2 transkripsiyonunun astrositlerde düşük seviyelerde olmasının bu sonuçlara yol açtığı düşünöldü.

TLR2 reseptörü için elde edilen bu sonuçlar, NAC'nin anti-inflamatuar etkileriyle örtüşmektedir. TLR2 reseptörünün hücre içinde NF-kB sinyal yolağı üzerinden inflamasyonu arttırıcı yönde rol oynadığı, NAC'nin ise bu yolağı inhibe ederek anti-inflamatuar etki gösterdiği bilinmektedir (163). H4 hücreleri ile oluşturulan bu modelde, literatürdeki başka modeller ile yapılan sınırlı sayıda çalışma (273) ile doğru orantılı sonuçlar elde edildi ve astrositlerde de inflamatuvar yolakların

diğer hücreler ile benzer şekilde işlediği sonucuna ulaşıldı. TLR2 reseptörleri nöroinflamasyonda iyi bilinen reseptörler olmalarına rağmen; astrositlerdeki işlevleri ve inflamasyondaki rolleri üzerine çok fazla yayın bulunmamaktadır. Çalışmamız, astrosit kökenli nörogloma hücrelerinde TLR2 reseptörünün ekspresyonunun, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar değişimlerden etkilendiğini göstermesi ile literatüre katkı yapan, orijinal bir çalışmadır.

LAG3 reseptörünün nöroinflamasyon sürecindeki olası rolü üzerinde yeni yeni durulmaya başlanmıştır ve bu süreçte hangi hücrelerde nasıl bir rol oynadığı henüz tam olarak bilinmemektedir (268). Çalışmamızda, inflamasyon sonrasında LAG3 protein seviyeleri anlamlı bir değişim göstermezken transkripsiyon seviyesinde belirgin bir düşüş saptandı. Elde ettiğimiz bu bulgular üzerine yaptığımız literatür araştırmaları sonucunda inflamasyonun, hücre membranındaki ADAM10 ve ADAM17 metalloproteinazlarının aktifleşmesine sebep olarak LAG3 reseptörünün kesilmesine ve sLAG3 oluşumuna yol açtığı T hücrelerinde gösterilmiştir (269, 274). Bizim çalışmamızda da benzer mekanizmanın görev aldığı ve LAG3'de inflamasyon sonrası düşüşe sebep olduğu düşünüldü. Bu varsayımımız, Çin'de yapılan klinik çalışma ile de desteklenmektedir (272). Çin'de yapılan çalışmada, serum sLAG3 seviyeleri de muhtemelen bu mekanizmalar yoluyla artış göstermiştir. Bu sonuçların yanı sıra, NAC uygulamasının LAG3 üzerinde belirgin bir artışa sebep olması, anti-inflamatuvar etki ile ADAM10 ve ADAM17 aktivasyonunun engelleniyor olabileceği ihtimalini gündeme getirmektedir. LAG3 reseptöründe metalloproteinazlar ile yıkım gerçekleşmediği için ve/veya NAC'nin hücrelerdeki anti-inflamatuvar etkisine bağlı iyileşme sonucunda LAG3 seviyelerinde artış olduğu düşünüldü.

### **5.6. Parkinson Hastalığında Kullanılan Tedavi Yöntemleri**

Günümüzde Parkinson hastalığı için etkili, kesin bir tedavi mevcut değildir. Klinikte hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için çeşitli ilaç tedavileri ve cerrahi tedavi hastalara uygulanmaktadır (181, 275). Cerrahi tedavi uygulaması olan derin beyin stimülasyonu (DBS), PH için uzun vadede önemli ve etkili bir tedavi seçeneğidir. PH'li hastaların önemli bir kısmında Levodopa (L-DOPA) ile tıbbi tedaviye başladıktan sonra

birkaç yıl içinde diskinezi ve motor dalgalanmalar görülebilmektedir (276). Şiddetli diskinezi, medikal tedaviye dirençli tremor veya motor dalgalanmalar olan hastalar DBS adayı haline gelirler (277). Yapılan çeşitli çalışmalarda medikal tedaviden daha etkili olduğu gösterilmiş olsa da, cerrahiye bağlı komplikasyon görülme riski tedavide rutin olarak yer almasını sınırlandırmaktadır ve DBS hala elektif olarak uygulanmaktadır (278, 279).

### **5.6.1. Parkinson Hastalığında Kullanılan Medikal Tedaviler**

L-DOPA gibi dopaminerjik ilaçlar medikal tedavide en çok kullanılan ilaçlardır (275). İstirahat tremoru ve diğer birincil semptomları azaltmada çok etkili olmalarına rağmen, PH'nin ilerleyişini durdurmazlar (280). L-DOPA, kan beyin bariyerini geçebilir (281). L-DOPA dopamine dönüşerek, dopamin eksikliğini telafi etmede işe yaramaktadır (281). Hastalarda dopamin eksikliğine bağlı ortaya çıkan semptomlar gerileyebilir, motor fonksiyon geri kazandırılabilir ve yaşam kalitesi arttırılabilir. Ancak tüm hastalarda aynı yanıt alınamayabilir ve bazı hastalarda terapötik etkiler gözlenmez (275, 282). Ek olarak, L-DOPA'nın bazı yardımcı ilaçlarla kombine uygulanmasının veya uzun yıllar kullanımının hastalarda düşük tansiyon, bulantı, huzursuzluk, diskinezi, uyuşukluk ve kusma gibi yan etkiler ortaya çıkmasına sebep olabildiği görülmüştür (181, 282). L-DOPA'nın yanı sıra; COMT inhibitörleri (Katekol-O-metiltransferaz inhibitörleri), MAO-B inhibitörleri (Monoamin Oksidaz B inhibitörleri), dopamin agonistleri ve antikolinergik ilaçlar PH için kullanılan diğer tedavi ajanlarıdır (283).

### **5.6.2. Parkinson Hastalığında Yeni Jenerasyon Tedavi**

#### **Yöntemleri**

Görülmektedir ki, PH için uygulanmakta olan tedaviler semptomatik niteliktedir. Bu sebeple yeni ve etkili tedavi geliştirme çalışmaları tüm hızıyla devam etmektedir. Bunlara verilebilecek en güzel örnekler hücre transplantasyonları, moleküler ve genetik tedavi geliştirme çalışmalarıdır. Geliştirilmeye çalışılan hücresel tedavilerin amacı kayba uğrayan nigrostriatal dopaminerjik nöronların yerine

konulmasıdır. Dopamin üreten hücreler elde etmek için nöron kök hücrelerinin Parkinson hastalarının beynine transplantasyonu tedavide iyi bir seçenek gibi görünmektedir. Bu amaçla üzerinde çalışılan üç ana hücre tipi vardır. Bunlar; insan embriyonik kök hücreleri, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) ve insan fetal mezensefalik dokusudur (275, 284). Gen tedavileri, DNA düzeyinde hastalık tedavileri geliştirmeyi hedeflemektedir. Son yıllarda PH için birkaç gen tedavisi çalışması klinik olarak de denenmeye başlanmıştır. PH için üzerinde durulan gen tedavisi yöntemleri arasında AADC-TH-GCH gen terapisi, viral vektörler aracılı gen tedavileri, RNA interferans temelli tedavi ve CRISPR-Cas9 gen düzenleme sistemi yer almaktadır (275, 285).

Bunların yanı sıra, nöroinflamasyonun ve immünolojik yolların hastalığın patogenezindeki yeri üzerine her geçen gün yeni bulgular elde edilmesi ve böylece öneminin artması ile inflamasyon yollarını hedefleyen yeni tedaviler geliştirilmesinin de üzerinde durulmaktadır (275). Hastalarda inflamatuvar değişikliklerin birincil mi yoksa ikincil mi ortaya çıktığı konusunda bir fikir birliğine henüz varılamamış olmasına rağmen, inflamatuvar değişikliklerin  $\alpha$ -syn proteini ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (275, 286). Bu temelde araştırmacılar TNF- $\alpha$  antagonistleri, TLR inhibitörleri, COX inhibitörleri,  $\alpha$ -syn inhibitörleri, astrosit düzenleyicileri, monoklonal antikor tedavileri, glukokortikoidler ve NSAİ ilaçlar üzerinde çalışmalar yürütmektedir (287, 288).

### **5.6.3. NAC' nin Parkinson Hastalığında Olası Terapötik Kullanımı**

Çalışmamızda nöroinflamasyonda etkisini görmek için NAC kullanılması tercih edildi. NAC kan beyin bariyerini geçtiği bilinen, MSS hücrelerinde direkt etki gösterebilen bir anti-oksidandır (13). Bunun yanı sıra hücre içi ikincil sinyal yolları üzerinden anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri de olan bir ilaçtır. Diğer anti-inflamatuvar ilaçlar ve immün düzenleyicilere göre çok daha az yan etkisi vardır ve hastalar tarafından iyi tolere edilebilir. Ayrıca ucuz ve ulaşılması kolay bir ilaç olması da avantajları arasında yer almaktadır. NAC'nin PH'de denendiği klinik araştırma

alışmaları da mevcuttur (<https://clinicaltrials.gov/>). Bu çalışmalardan bazıları tamamlanmış olmakla birlikte bazıları hala devam etmektedir.

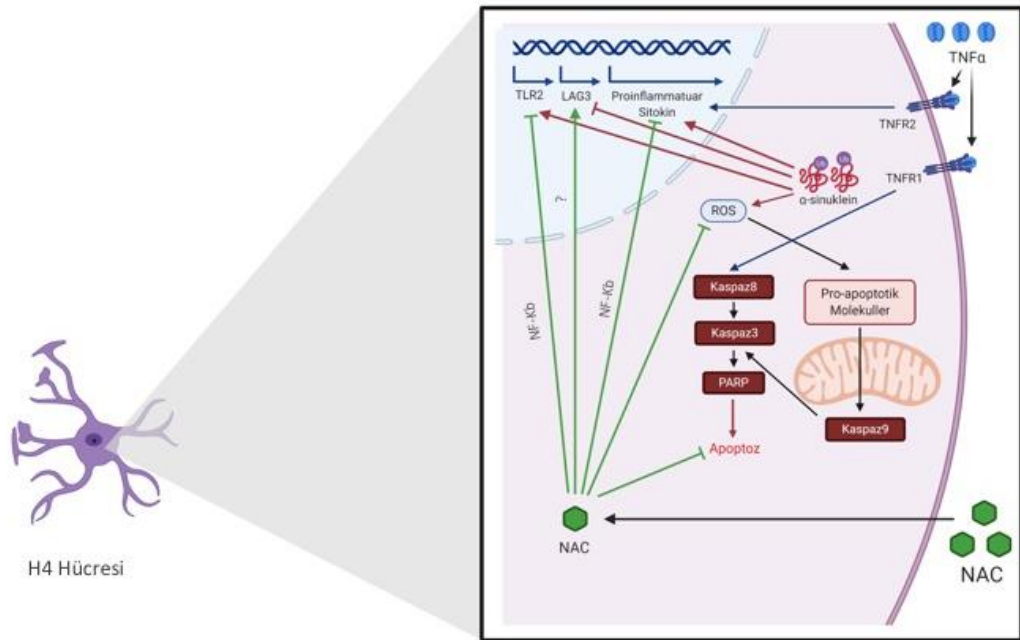
## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tüm bu etkiler göz önünde bulundurularak, çalışmamızda H4 hücreleri ile oluşturduğumuz inflamatuvar Parkinson hastalığı modelinde NAC'nin etkinliğini ve inflamasyonda rol oynadığı düşünülen TLR2 ve LAG3 reseptörleri ile olası etkileşimini incelemeyi amaçladık. Çalışmamız sonucunda NAC'nin hücreler üzerinde anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri olduğu gösterildi. Çalışmamızda, nöroinflamasyondaki rolü kanıtlanmış TLR2 reseptörünün bu hücrelerde düşük düzeyde de olsa eksprese edildiği gösterildi. Daha önceki çalışmalarda nöronlar ve mikroglia hücrelerinde TLR2 ekspresyonunun inflamasyon varlığında arttığı gösterilmiştir; bizim çalışmamızda ise astrosit kökenli hücrelerde TLR2 ekspresyonunun benzer şekilde artış gösterdiği görüldü. NAC ile inflamasyonun kontrol altına alınması sonucunda, TLR2 reseptörlerinde beklenildiği şekilde bir azalma görüldü. Çalışmamızda literatürde PH ile ilişkisi yeni çalışılmaya başlanan LAG3 reseptörünün de astrosit kökenli hücrelerde eksprese edildiği gösterildi ve inflamasyondaki rolü araştırıldı. Bu çalışmada H4 hücrelerinde LAG3 ekspresyonunun TNF- $\alpha$  uygulanarak inflamasyon tetiklendiğinde azaldığı, NAC uygulaması sonrası ise anlamlı şekilde arttığı gösterildi. LAG3 ve MSS hücrelerindeki işlevleri üzerinde yeterli çalışma bulunmaması bu çalışmanın sonuçlarını orijinal yapmaktadır. Dolayısı ile LAG3 ekspresyonundaki bu değişiminin altında yatan mekanizmaları aydınlatmak ve LAG3'ün nöroinflamasyondaki rolünü açığa çıkartmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Literatürde NAC uygulamasının LAG3 reseptörü ile ilişkisini inceleyen bir çalışmaya da rastlanmamış olması da çalışmamızı orijinal ve güncel yapan bir diğer noktadır.

**Sonuç olarak bu tez çalışması** *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup vücutta *in vivo* ortamdaki nöroinflamasyon mikroçevresine ait parametreleri bire bir yansıtılmamaktadır. Bu sınırlama nedeniyle *in vitro* koşullar çerçevesinde H4 hücreleri ile oluşturulan inflamatuvar Parkinson hastalığı modelinde, NAC'nin nöroinflamasyon varlığında anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri incelenmiş, TLR2 ve LAG3 reseptörleri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda NAC'nin hücreler üzerindeki anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri açıkça gösterilmiş ve hastalığın



progresyonunu yavaşlatmada hücre sağ kalımını arttırıcı etki göstererek rol alabileceği sonucuna ulaşılmıştır. TLR2 reseptörü NAC'ye ekspresyon ve transkripsiyon düzeyinde beklenildiği şekilde cevap verirken, LAG3 reseptöründe farklı değişiklikler olduğu görüldü (Şekil 6.1). NAC'nin nöroinflamasyonda rol oynayan reseptörler ve rolleri üzerine etkilerinin ileride yapılacak çalışmalar ile açığa kavuşturulmasıyla, NAC nöroinflamasyon sürecinde kullanıma uygun bir ilaç alternatifi olabilir. Hastalığın moleküler mekanizmalarının aydınlatılabilmesi, oldukça karmaşık olan nöroinflamasyon sürecinin anlaşılabilmesi ve olası yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.



**Şekil 6.1.** Tez çalışmasında elde edilen sonuçları özetleyen şematik çizim (Bu figür BioRender.com sitesinde oluşturulmuştur)

## Sonuçlar

1. Transfeksiyon uygulaması ile  $\alpha$ -syn proteinini aşırı eksprese etme yeteneğine sahip H4 insan nörogloma hücre hattı kullanılarak başarılı bir şekilde inflamatuvar bir *in vitro* Parkinson Hastalığı modeli oluşturuldu. TNF- $\alpha$  uygulamasıyla gruplarda inflamasyonun etkili bir şekilde tetiklenebildiği ve NAC uygulaması ile inflamasyonun kontrol altına alınabildiği gösterildi.

2. TNF- $\alpha$  uygulanarak inflamasyon tetiklendikten sonra NAC uygulanan gruplarda (tet(+)) G7 ve tet(-) G8) apoptoz önemli şekilde azalmıştı, bu azalma ortamda  $\alpha$ -syn proteini varlığında (G8 grubunda) daha da belirgindi. Apoptoz belirteçlerindeki değişimler incelendiğinde özellikle TNF- $\alpha$  ile ilişkili apoptozda anlamlı bir azalma tespit edildi.

3. NAC uygulaması sonrası hücre sağ kalımında artma görüldü. TNF- $\alpha$  uygulanarak inflamasyon tetiklendikten sonra NAC uygulanması ile elde edilen hücre sağ kalımı verileri, sadece NAC uygulanan gruplarla çok yakın seviyelerdedir ve aralarında anlamlı bir fark saptanmadı.

4. H4 hücrelerinde TLR2 reseptörünün eksprese edildiği gösterildi.  $\alpha$ -syn varlığında, TLR2 ekspresyonunun ve transkripsiyonunun TNF- $\alpha$  uygulaması ile anlamlı şekilde arttığı, NAC uygulaması sonrası ise azaldığı saptandı.

5. H4 hücrelerinde LAG3 reseptörünün eksprese edildiği gösterildi.  $\alpha$ -syn varlığında, LAG3 transkripsiyonunun TNF- $\alpha$  uygulaması sonrası azalırken, NAC uygulaması sonrası anlamlı şekilde arttığı saptandı. LAG3 için yapılan protein seviyesi incelemelerinde bu sonuçlarla paralellik gösteren göreceli azalma ve artışlar bulundu.

## 7. KAYNAKLAR

1. Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding dopaminergic cell death pathways in Parkinson disease. *Neuron*. 2016;90(4):675-91.
2. Dijkstra AA, Voorn P, Berendse HW, Groenewegen HJ, Bank NB, Rozemuller AJ, et al. Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2014;29(10):1244-51.
3. Cersosimo MG, Benarroch EE. Autonomic involvement in Parkinson's disease: Pathology, pathophysiology, clinical features and possible peripheral biomarkers. *Journal of the Neurological Sciences*. 2012;313(1):57-63.
4. Jellinger KA. Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease. *Journal of Neural Transmission*. 2015;122(10):1429-40.
5. Alberio T, Lopiano L, Fasano M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS Journal*. 2012;279(7):1146-55.
6. Kaur K, Gill JS, Bansal PK, Deshmukh R. Neuroinflammation-A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*. 2017;381:308-14.
7. Surguchov A. Molecular and cellular biology of synucleins. *International review of cell and molecular biology*. 2008;270:225-317.
8. Nam M-K, Han J-H, Jang J-Y, Yun S-E, Kim G-Y, Kang S, et al. A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of  $\alpha$ -synuclein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2015;1850(12):2497-505.
9. Chistiakov DA, Chistiakov AA.  $\alpha$ -Synuclein-carrying extracellular vesicles in Parkinson's disease: deadly transmitters. *Acta Neurologica Belgica*. 2017;117(1):43-51.
10. Dzamko N, Gysbers A, Perera G, Bahar A, Shankar A, Gao J, et al. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta neuropathologica*. 2017;133(2):303-19.
11. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam T-I, Yin X, Xiong Y, et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*. 2016;353(6307):aah3374.
12. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2018;23(12):3305.
13. Katz M, Won SJ, Park Y, Orr A, Jones DP, Swanson RA, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of N-acetylcysteine after oral administration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2015;21(5):500-3.
14. Berk M, Malhi GS, Gray LJ, Dean OM. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in pharmacological sciences*. 2013;34(3):167-77.

15. Smeyne M, Smeyne RJ. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;62:13-25.
16. Gartner LP. *Textbook of Histology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2015.
17. Pawlina W, Ross MH. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
18. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2015.
19. Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends in neurosciences*. 1990;13(5):174-8.
20. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature reviews neuroscience*. 2006;7(1):41.
21. Nambu A. A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*. 2005;252(4):iv1-iv4.
22. ÇAKMAKLI GY, ELİBOL B. Bazal Gangliyonların Fonksiyonel Organizasyonu: Güncel Anlayışlar ve Hareket Hastalıklarının Tedavisindeki Yansımaları. *Türkiye Klinikleri Neurology-Special Topics*. 2015;8(2):9-19.
23. Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2010;11(11):760.
24. Standring S. *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*: Elsevier Health Sciences; 2015.
25. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015;40(8):504.
26. Luna E, Luk KC. Bent out of shape:  $\alpha$ -Synuclein misfolding and the convergence of pathogenic pathways in Parkinson's disease. *FEBS letters*. 2015;589(24):3749-59.
27. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17013.
28. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement disorders*. 2014;29(13):1583-90.
29. Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and cellular probes*. 2016;30(6):386-96.
30. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2015;386(9996):896-912.
31. Marmolino D, Foerch P, Atienzar F, Staelens L, Michel A, Scheller D. Alpha synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2016;71:92-101.

32. Song Y, Gu Z, An J, Chan P, Group CPS. Gender differences on motor and non-motor symptoms of de novo patients with early Parkinson's disease. *Neurological Sciences*. 2014;35(12):1991-6.
33. Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *The Lancet Neurology*. 2009;8(12):1128-39.
34. Cooper CA, Chahine LM. Biomarkers in prodromal Parkinson disease: a qualitative review. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2016;22(10):956-67.
35. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Steur ENJ, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 2003;24(2):197-211.
36. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology*. 2013;9(1):13.
37. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*. 2016;15(12):1257-72.
38. Surmeier DJ, Guzmán JN, Sánchez-Padilla J, Goldberg JA. What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Progress in brain research*. 183: Elsevier; 2010. p. 59-77.
39. Engelhardt E, Gomes MdM. Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection. *Dementia & Neuropsychologia*. 2017;11(2):198-201.
40. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*. 2013;47(2):495-508.
41. Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, Navarro PP, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature neuroscience*. 2019;22(7):1099-109.
42. Ubeda-Banon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Argandona-Palacios L, Garcia-Munozguren S, Martinez-Marcos A.  $\alpha$ -Synucleinopathy in the human olfactory system in Parkinson's disease: involvement of calcium-binding protein-and substance P-positive cells. *Acta neuropathologica*. 2010;119(6):723-35.
43. Langston JW, Forno LS. The hypothalamus in Parkinson disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1978;3(2):129-33.
44. Homma T, Mochizuki Y, Mizutani T. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein immunoreactivity in the posterior pituitary lobe. *Neuropathology*. 2012;32(4):385-9.

45. Braak H, Rueb U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RA, Steur EJ, et al. Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta neuropathologica*. 2000;99(5):489-95.
46. Mori F, Piao Y-S, Hayashi S, Fujiwara H, Hasegawa M, Yoshimoto M, et al.  $\alpha$ -Synuclein accumulates in Purkinje cells in Lewy body disease but not in multiple system atrophy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2003;62(8):812-9.
47. Tamura T, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Lewy body-related  $\alpha$ -synucleinopathy in the spinal cord of cases with incidental Lewy body disease. *Neuropathology*. 2012;32(1):13-22.
48. Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta neuropathologica*. 2007;113(4):421-9.
49. Wakabayashi K, Hansen LA, Masliah E. Cortical Lewy body-containing neurons are pyramidal cells: laser confocal imaging of double-immunolabeled sections with anti-ubiquitin and SMI32. *Acta neuropathologica*. 1995;89(5):404-8.
50. Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J, et al. Amygdala pathology in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 1994;88(6):493-500.
51. Forno LS, Norville RL. Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion. *Acta neuropathologica*. 1976;34(3):183-97.
52. Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, Borghammer P. Pathological  $\alpha$ -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Annals of neurology*. 2016;79(6):940-9.
53. Mrabet S, Ben Ali N, Achouri A, Dabbeche R, Najjar T, Haouet S, et al. Gastrointestinal dysfunction and neuropathologic correlations in Parkinson disease. *Journal of clinical gastroenterology*. 2016;50(9):e85-e90.
54. Kuo Y-M, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani AK, Orrison BM, et al. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated  $\alpha$ -synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Human molecular genetics*. 2010;19(9):1633-50.
55. 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. *Neuroscience letters*. 2006;396(1):67-72.
56. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, et al. Axonal  $\alpha$ -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*. 2008;131(3):642-50.

57. Minguez-Castellanos A, Chamorro C, Escamilla-Sevilla F, Ortega-Moreno A, Rebollo A, Gomez-Rio M, et al. Do  $\alpha$ -synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study. *Neurology*. 2007;68(23):2012-8.
58. Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Kanemaru K, Sawabe M, et al. Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lewy body disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2007;66(5):354-62.
59. Vilas D, Iranzo A, Tolosa E, Aldecoa I, Berenguer J, Vilaseca I, et al. Assessment of  $\alpha$ -synuclein in submandibular glands of patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a case-control study. *The Lancet Neurology*. 2016;15(7):708-18.
60. Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2010;119(6):703-13.
61. Donadio V, Incensi A, Leta V, Giannoccaro MP, Scaglione C, Martinelli P, et al. Skin nerve  $\alpha$ -synuclein deposits A biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology*. 2014;82(15):1362-9.
62. Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, Haga R, Nishijima H, Suzuki C, et al. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 2010;469(3):357-9.
63. Surguchov A. Intracellular dynamics of synucleins: "here, there and everywhere". *International review of cell and molecular biology*. 320: Elsevier; 2015. p. 103-69.
64. George JM. The synucleins. *Genome biology*. 2001;3(1):reviews3002. 1.
65. Lavedan C. The synuclein family. *Genome research*. 1998;8(9):871-80.
66. Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in neurosciences*. 1998;21(6):249-54.
67. Kallman M. Synthesis and Evaluation of  $\alpha$ -Synuclein (6-36). 2013.
68. Shen J, Du T, Wang X, Duan C, Gao G, Zhang J, et al.  $\alpha$ -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability. *Brain research*. 2014;1591:14-26.
69. Liu Y, Qiang M, Wei Y, He R. A novel molecular mechanism for nitrated  $\alpha$ -synuclein-induced cell death. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3(4):239-49.
70. Masaracchia C, König A, Valiente-Gabioud AA, Peralta P, Favretto F, Strohäker T, et al. Molecular characterization of an aggregation-prone variant of alpha-synuclein used to model synucleinopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2020;1868(1):140298.

71. Dettmer U, Selkoe D, Bartels T. New insights into cellular  $\alpha$ -synuclein homeostasis in health and disease. *Current opinion in neurobiology*. 2016;36:15-22.
72. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2016;21.
73. Galvin JE, Schuck TM, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Differential expression and distribution of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -synuclein in the developing human substantia nigra. *Experimental neurology*. 2001;168(2):347-55.
74. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, et al. Full length  $\alpha$ -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience letters*. 2000;287(1):65-7.
75. Sui Y-T, Bullock KM, Erickson MA, Zhang J, Banks W. Alpha synuclein is transported into and out of the brain by the blood–brain barrier. *Peptides*. 2014;62:197-202.
76. Surguchev A, Surguchov A. Effect of  $\alpha$ -synuclein on membrane permeability and synaptic transmission: a clue to neurodegeneration? *Journal of neurochemistry*. 2015;132(6):619-21.
77. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(10):4194-9.
78. Oueslati A, Fournier M, Lashuel HA. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of  $\alpha$ -synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Progress in brain research*. 183: Elsevier; 2010. p. 115-45.
79. Liu C, Fei E, Jia N, Wang H, Tao R, Iwata A, et al. Assembly of lysine 63-linked ubiquitin conjugates by phosphorylated  $\alpha$ -synuclein implies Lewy body biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(19):14558-66.
80. McKinnon C, Tabrizi SJ. The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(17):2302-21.
81. Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, et al. Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Frontiers in aging neuroscience*. 2016;8:303.
82. Shishido T, Nagano Y, Araki M, Kurashige T, Obayashi H, Nakamura T, et al. Synphilin-1 has neuroprotective effects on MPP<sup>+</sup>-induced Parkinson's disease model cells by inhibiting ROS production and apoptosis. *Neuroscience letters*. 2019;690:145-50.
83. Liu J, Li T, Thomas JM, Pei Z, Jiang H, Engelender S, et al. Synphilin-1 attenuates mutant LRRK2-induced neurodegeneration in Parkinson's disease models. *Human molecular genetics*. 2016;25(4):672-80.



84. Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K, Izumiyama Y, Nakamura M, et al. Tubulin seeds  $\alpha$ -synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(3):2112-7.
85. Zhou R, Huang Y, Li X, Chen C, Shi Q, Wang G, et al. Molecular interaction of  $\alpha$ -synuclein with tubulin influences on the polymerization of microtubule in vitro and structure of microtubule in cells. *Molecular biology reports*. 2010;37(7):3183-92.
86. Burgoyne RD, Morgan A, editors. Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Seminars in cell & developmental biology*; 2015: Elsevier.
87. Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC.  $\alpha$ -Synuclein cooperates with CSP $\alpha$  in preventing neurodegeneration. *Cell*. 2005;123(3):383-96.
88. Shi M-m, Shi C-h, Xu Y-m. Rab GTPases: the key players in the molecular pathway of Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017;11:81.
89. Volpicelli-Daley LA. Effects of  $\alpha$ -synuclein on axonal transport. *Neurobiology of disease*. 2017;105:321-7.
90. Uversky VN, Eliezer D. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *Current Protein and Peptide Science*. 2009;10(5):483-99.
91. Liu I-H, Uversky VN, Munishkina LA, Fink AL, Halfter W, Cole GJ. Agrin binds  $\alpha$ -synuclein and modulates  $\alpha$ -synuclein fibrillation. *Glycobiology*. 2005;15(12):1320-31.
92. Jiang P, Gan M, Yen S-H, McLean PJ, Dickson DW. Histones facilitate  $\alpha$ -synuclein aggregation during neuronal apoptosis. *Acta neuropathologica*. 2017;133(4):547-58.
93. Outeiro TF, Klucken J, Strathearn KE, Liu F, Nguyen P, Rochet J-C, et al. Small heat shock proteins protect against  $\alpha$ -synuclein-induced toxicity and aggregation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;351(3):631-8.
94. Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2000;40(1):617-47.
95. Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, et al.  $\alpha$ -Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(14):5782-91.
96. Wang B, Underwood R, Kamath A, Britain C, McFerrin MB, McLean PJ, et al. 14-3-3 Proteins Reduce Cell-to-Cell Transfer and Propagation of Pathogenic  $\alpha$ -Synuclein. *Journal of Neuroscience*. 2018;38(38):8211-32.

97. Moussaud S, Jones DR, Moussaud-Lamodière EL, Delenclos M, Ross OA, McLean PJ. Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Molecular neurodegeneration*. 2014;9(1):43.
98. Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2003;62(4):389-97.
99. Nakamura K.  $\alpha$ -Synuclein and mitochondria: partners in crime? *Neurotherapeutics*. 2013;10(3):391-9.
100. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell biology and pathophysiology of  $\alpha$ -synuclein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(3):a024091.
101. Fusco G, Chen SW, Williamson PT, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by  $\alpha$ -synuclein oligomers. *Science*. 2017;358(6369):1440-3.
102. Vasudevaraju P, Guerrero E, Hegde ML, Collen T, Britton GB, Rao K. New evidence on  $\alpha$ -synuclein and Tau binding to conformation and sequence specific GC\* rich DNA: relevance to neurological disorders. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2012;4(2):112.
103. Hegde ML, Rao K. DNA induces folding in  $\alpha$ -synuclein: understanding the mechanism using chaperone property of osmolytes. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;464(1):57-69.
104. Ni H-M, Williams JA, Ding W-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology*. 2015;4:6-13.
105. Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, et al.  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*. 2016;8(342):342ra78-ra78.
106. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*. 2012;31(14):3038-62.
107. Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Yang Y, Anantharam V, Kanthasamy AG.  $\alpha$ -Synuclein negatively regulates protein kinase C $\delta$  expression to suppress apoptosis in dopaminergic neurons by reducing p300 histone acetyltransferase activity. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(6):2035-51.
108. Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M, Masliah E.  $\alpha$ -Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(13):11465-72.
109. Oaks AW, Sidhu A. Parallel mechanisms for direct and indirect membrane protein trafficking by synucleins. *Communicative & integrative biology*. 2013;6(6):e26794.

110. Rizo J, Südhof TC. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices—guilty as charged? *Annual review of cell and developmental biology*. 2012;28:279-308.
111. Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:509-47.
112. Vargas KJ, Makani S, Davis T, Westphal CH, Castillo PE, Chandra SS. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(28):9364-76.
113. Gorbatyuk OS, Li S, Nguyen FN, Manfredsson FP, Kondrikova G, Sullivan LF, et al.  $\alpha$ -Synuclein expression in rat substantia nigra suppresses phospholipase D2 toxicity and nigral neurodegeneration. *Molecular Therapy*. 2010;18(10):1758-68.
114. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*. 2013;79(6):1044-66.
115. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, et al. Triggering of Inflammasome by Aggregated  $\alpha$ -Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies. *PloS one*. 2013;8(1):e55375.
116. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(36):11929-47.
117. Béraud D, Hathaway HA, Trecki J, Chasovskikh S, Johnson DA, Johnson JA, et al. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013;8(1):94-117.
118. Prajapati P, Sripada L, Singh K, Bhatelia K, Singh R, Singh R. TNF- $\alpha$  regulates miRNA targeting mitochondrial complex-I and induces cell death in dopaminergic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(3):451-61.
119. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*. 2016;139(S2):136-53.
120. Chen X, Tansey MG. The role of neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neuroinflammation: Elsevier*; 2011. p. 403-21.
121. Molteni M, Rossetti C. Neurodegenerative diseases: The immunological perspective. *Journal of neuroimmunology*. 2017;313:109-15.
122. Boyko AA, Troyanova NI, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. Similarity and differences in inflammation-related characteristics of the peripheral immune system of patients with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12):2633.
123. Xanthos DN, Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(1):43.

124. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports*. 2016;13(4):3391-6.
125. Calabrese V, Santoro A, Monti D, Crupi R, Di Paola R, Latteri S, et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;115:80-91.
126. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*. 2014;158(1):15-24.
127. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology*. 2009;8(4):382-97.
128. Kielian T. Neuroinflammation: good, bad, or indifferent? *Journal of neurochemistry*. 2014;130(1):1-3.
129. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461-553.
130. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445.
131. Zhang Q-S, Heng Y, Yuan Y-H, Chen N-H. Pathological  $\alpha$ -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicology letters*. 2017;265:30-7.
132. Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*. 2016;53(2):1181-94.
133. Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*. 2015;4(1):19.
134. Colombo E, Farina C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends in immunology*. 2016;37(9):608-20.
135. González H, Pacheco R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11(1):201.
136. Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, et al. Genetic cell ablation reveals clusters of local self-renewing microglia in the mammalian central nervous system. *Immunity*. 2015;43(1):92-106.
137. Schetters ST, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: microglia and T cells get ready to tango. *Frontiers in immunology*. 2018;8:1905.
138. Olah M, Ping G, De Haas AH, Brouwer N, Meerlo P, Van Der Zee EA, et al. Enhanced hippocampal neurogenesis in the absence of microglia T cell interaction and microglia activation in the murine running wheel model. *Glia*. 2009;57(10):1046-61.

139. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience*. 2006;9(2):268.
140. Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, et al. Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. 2013;61(3):349-60.
141. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016;353(6301):777-83.
142. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru P, Selvakumar G, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and spine*. 2016;1(1).
143. Wohleb ES, McKim DB, Shea DT, Powell ND, Tarr AJ, Sheridan JF, et al. Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biological psychiatry*. 2014;75(12):970-81.
144. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*. 2016;233(9):1637-50.
145. Wohleb ES, Delpéch J-C. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2017;79:40-8.
146. Kim Y-K, Na K-S, Myint A-M, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016;64:277-84.
147. Gebara EG, Sultan S, Kocher-Braissant J, Toni N. Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Frontiers in neuroscience*. 2013;7:145.
148. Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009;64(1):110-22.
149. Stichel C, Luebbert H. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiology of aging*. 2007;28(10):1507-21.
150. Griffin R, Nally R, Nolan Y, McCartney Y, Linden J, Lynch MA. The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *Journal of neurochemistry*. 2006;99(4):1263-72.

151. Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiology of aging*. 2006;27(5):717-22.
152. Godbout J, Chen J, Abraham J, Richwine A, Berg B, Kelley K, et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. *The FASEB journal*. 2005;19(10):1329-31.
153. Von Bernhardi R, Eugenín-von Bernhardi L, Eugenín J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*. 2015;7:124.
154. Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. 1998;27(3):257-67.
155. McCarthy RC, Sosa JC, Gardeck AM, Baez AS, Lee C-H, Wessling-Resnick M. Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(20):7853-63.
156. Minghetti L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Current opinion in neurology*. 2005;18(3):315-21.
157. McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988;38(8):1285-.
158. Campolo M, Paterniti I, Siracusa R, Filippone A, Esposito E, Cuzzocrea S. TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in Parkinson's diseases in vivo model. *Brain, behavior, and immunity*. 2019;76:236-47.
159. Coles LD, Tuite PJ, Öz G, Mishra UR, Kartha RV, Sullivan KM, et al. Repeated-Dose Oral N-Acetylcysteine in Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Effect on Brain Glutathione and Oxidative Stress. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2018;58(2):158-67.
160. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(4):355-9.
161. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013;1830(8):4117-29.
162. Monti DA, Zabrecky G, Kremens D, Liang T-W, Wintering NA, Cai J, et al. N-acetyl cysteine may support dopamine neurons in Parkinson's disease: preliminary clinical and cell line data. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157602.
163. Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, Spielholz C, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: a systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015;55:294-321.

164. Van Laar VS, Roy N, Liu A, Rajprohat S, Arnold B, Dukes AA, et al. Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy. *Neurobiology of disease*. 2015;74:180-93.
165. Martínez-Banaclocha MA. N-acetyl-cysteine in the treatment of Parkinson's disease. What are we waiting for? *Medical hypotheses*. 2012;79(1):8-12.
166. Palacio J, Markert U, Martínez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflammation research*. 2011;60(7):695-704.
167. Lasram MM, Lamine AJ, Dhouib IB, Bouzid K, Annabi A, Belhadjhmida N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. *Life sciences*. 2014;107(1-2):50-8.
168. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(9):613-22.
169. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular neurobiology*. 2001;24(1-3):107-29.
170. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends in neurosciences*. 2004;27(12):735-43.
171. Ottestad-Hansen S, Hu QX, Follin-Arbelet VV, Bentea E, Sato H, Massie A, et al. The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is expressed in significant concentrations in a subpopulation of astrocytes in the mouse brain. *Glia*. 2018;66(5):951-70.
172. Seeman P, Niznik HB. Dopamine receptors and transporters in Parkinson's disease and schizophrenia. *The FASEB Journal*. 1990;4(10):2737-44.
173. Hastings TG. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2009;41(6):469-72.
174. Cadet JL, Jayanthi S, Deng X. Methamphetamine-induced neuronal apoptosis involves the activation of multiple death pathways. Review. *Neurotoxicity research*. 2005;8(3-4):199-206.
175. Kaushal N, Elliott M, Robson MJ, Iyer AKV, Rojanasakul Y, Coop A, et al. AC927, a  $\sigma$  receptor ligand, blocks methamphetamine-induced release of dopamine and generation of reactive oxygen species in NG108-15 cells. *Molecular pharmacology*. 2012;81(3):299-308.
176. Goldstein DS, Jinsmaa Y, Sullivan P, Sharabi Y. N-acetylcysteine prevents the increase in spontaneous oxidation of dopamine during monoamine oxidase inhibition in PC12 cells. *Neurochemical research*. 2017;42(11):3289-95.

177. Baker DA, Xi Z-X, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(20):9134-41.
178. Jacobs BL. Serotonin, motor activity and depression-related disorders. *American Scientist*. 1994;82(5):456-63.
179. Lee M-Y, Chiang C-C, Chiu H-Y, Chan M-H, Chen H-H. N-acetylcysteine modulates hallucinogenic 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist-mediated responses: Behavioral, molecular, and electrophysiological studies. *Neuropharmacology*. 2014;81:215-23.
180. Lawand NB, Saade NE, El-Agnaf OM, Safieh-Garabedian B. Targeting  $\alpha$ -synuclein as a therapeutic strategy for Parkinson's disease. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2015;19(10):1351-60.
181. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Cmaj*. 2016;188(16):1157-65.
182. Martin HL, Teismann P. Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. *The FASEB journal*. 2009;23(10):3263-72.
183. Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, et al. Glutathione Depletion in PC12 Results in Selective Inhibition of Mitochondrial Complex I Activity IMPLICATIONS FOR PARKINSON' S DISEASE. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(34):26096-101.
184. Etminan M, Gill SS, Samii A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *The Lancet Neurology*. 2005;4(6):362-5.
185. Banaclocha M. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Medical hypotheses*. 2001;56(4):472-7.
186. Banaclocha MMn. N-acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: implications for treatment of Parkinson's disease. *Brain research*. 2000;859(1):173-5.
187. Pocernich C, La Fontaine M, Butterfield D. In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. *Neurochemistry international*. 2000;36(3):185-91.
188. Banaclocha MM, Hernandez AI, Martinez N, Ferrandiz ML. N-acetylcysteine protects against age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain research*. 1997;762(1-2):256-8.
189. Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*. 2003;2(2):95-107.



190. Clark J, Clore EL, Zheng K, Adame A, Masliah E, Simon DK. Oral N-acetylcysteine attenuates loss of dopaminergic terminals in  $\alpha$ -synuclein overexpressing mice. *PLoS One*. 2010;5(8):e12333.
191. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior*. 2014;4(2):108-22.
192. McLean PJ, Kawamata H, Hyman B.  $\alpha$ -Synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience*. 2001;104(3):901-12.
193. Moussaud S, Malany S, Mehta A, Vasile S, Smith LH, McLean PJ. Targeting  $\alpha$ -synuclein oligomers by protein-fragment complementation for drug discovery in synucleinopathies. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2015;19(5):589-603.
194. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
195. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1996;44(9):959-68.
196. Raza C, Anjum R. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life sciences*. 2019;226:77-90.
197. Delenclos M, Burgess JD, Lamprokostopoulou A, Outeiro TF, Vekrellis K, McLean PJ. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of neurochemistry*. 2019;150(5):566-76.
198. Outeiro TF, Lindquist S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*. 2003;302(5651):1772-5.
199. Zabrocki P, Pellens K, Vanhelmont T, Vandebroek T, Griffioen G, Wera S, et al. Characterization of  $\alpha$ -synuclein aggregation and synergistic toxicity with protein tau in yeast. *The FEBS journal*. 2005;272(6):1386-400.
200. Zabrocki P, Bastiaens I, Delay C, Bammens T, Ghillebert R, Pellens K, et al. Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of  $\alpha$ -synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2008;1783(10):1767-80.
201. Lázaro DF, Rodrigues EF, Langohr R, Shahpasandzadeh H, Ribeiro T, Guerreiro P, et al. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS Genet*. 2014;10(11):e1004741.
202. Lázaro DF, Dias MC, Carija A, Navarro S, Madaleno CS, Tenreiro S, et al. The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation. *Acta neuropathologica communications*. 2016;4(1):1-15.

203. Shahpasandzadeh H, Popova B, Kleinknecht A, Fraser PE, Outeiro TF, Braus GH. Interplay between sumoylation and phosphorylation for protection against  $\alpha$ -synuclein inclusions. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(45):31224-40.
204. Mbefo MK, Fares M-B, Paleologou K, Oueslati A, Yin G, Tenreiro S, et al. Parkinson disease mutant E46K enhances  $\alpha$ -synuclein phosphorylation in mammalian cell lines, in yeast, and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(15):9412-27.
205. Kleinknecht A, Popova B, Lázaro DF, Pinho R, Valerius O, Outeiro TF, et al. C-Terminal tyrosine residue modifications modulate the protective phosphorylation of serine 129 of  $\alpha$ -synuclein in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS genetics*. 2016;12(6):e1006098.
206. Brás IC, Tenreiro S, Silva AM, Outeiro TF. Identification of novel protein phosphatases as modifiers of alpha-synuclein aggregation in yeast. *FEMS yeast research*. 2018;18(8):foy108.
207. Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, et al. Formation of toxic oligomeric  $\alpha$ -synuclein species in living cells. *PloS one*. 2008;3(4):e1867.
208. Klucken J, Poehler A-M, Ebrahimi-Fakhari D, Schneider J, Nuber S, Rockenstein E, et al. Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy*. 2012;8(5):754-66.
209. Dryanovski DI, Guzman JN, Xie Z, Galteri DJ, Volpicelli-Daley LA, Lee VM-Y, et al. Calcium entry and  $\alpha$ -synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(24):10154-64.
210. Gaven F, Marin P, Claeysen S. Primary culture of mouse dopaminergic neurons. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2014(91):e51751.
211. Hassink G, Raiss C, Segers-Nolten I, Van Wezel R, Subramaniam V, Le Feber J, et al. Exogenous  $\alpha$ -synuclein hinders synaptic communication in cultured cortical primary rat neurons. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193763.
212. Tönges L, Szegő ÉM, Hause P, Saal K-A, Tatenhorst L, Koch JC, et al. Alpha-synuclein mutations impair axonal regeneration in models of Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:239.
213. Li L, Nadanaciva S, Berger Z, Shen W, Paumier K, Schwartz J, et al. Human A53T  $\alpha$ -synuclein causes reversible deficits in mitochondrial function and dynamics in primary mouse cortical neurons. *PLoS One*. 2013;8(12):e85815.
214. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Lee VM. Addition of exogenous  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous  $\alpha$ -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nature protocols*. 2014;9(9):2135.

215. Polinski NK, Volpicelli-Daley LA, Sortwell CE, Luk KC, Cremades N, Gottler LM, et al. Best practices for generating and using alpha-synuclein pre-formed fibrils to model Parkinson's disease in rodents. *Journal of Parkinson's disease*. 2018;8(2):303-22.
216. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam T-I, Yin X, Xiong Y, et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*. 2016;353(6307).
217. Westerink R, Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiologica*. 2008;192(2):273-85.
218. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*. 2017;12(1):10.
219. Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA. Expression of A53T mutant but not wild-type  $\alpha$ -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(24):9549-60.
220. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Stefanis L. Inducible over-expression of wild type  $\alpha$ -synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(5):1348-62.
221. Xin W, Emadi S, Williams S, Liu Q, Schulz P, He P, et al. Toxic oligomeric alpha-synuclein variants present in human Parkinson's disease brains are differentially generated in mammalian cell models. *Biomolecules*. 2015;5(3):1634-51.
222. Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(31):13010-5.
223. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature reviews Drug discovery*. 2017;16(2):115-30.
224. Piper DA, Sastre D, Schüle B. Advancing stem cell models of alpha-synuclein gene regulation in neurodegenerative disease. *Frontiers in neuroscience*. 2018;12:199.
225. Bordoni M, Rey F, Fantini V, Pansarasa O, Di Giulio AM, Carelli S, et al. From neuronal differentiation of iPSCs to 3D neuro-organoids: Modelling and therapy of neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12):3972.
226. Calatayud C, Carola G, Consiglio A, Raya A. Modeling the genetic complexity of Parkinson's disease by targeted genome edition in iPS cells. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2017;46:123-31.
227. Cobb MM, Ravisankar A, Skibinski G, Finkbeiner S. iPS cells in the study of PD molecular pathogenesis. *Cell and tissue research*. 2018;373(1):61-77.

228. Vera E, Bosco N, Studer L. Generating late-onset human iPSC-based disease models by inducing neuronal age-related phenotypes through telomerase manipulation. *Cell reports*. 2016;17(4):1184-92.
229. Tagliafierro L, Zamora ME, Chiba-Falek O. Multiplication of the SNCA locus exacerbates neuronal nuclear aging. *Human molecular genetics*. 2019;28(3):407-21.
230. Tabrizi SJ, Orth M, Wilkinson JM, Taanman J-W, Warner TT, Cooper JM, et al. Expression of mutant  $\alpha$ -synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Human molecular genetics*. 2000;9(18):2683-9.
231. Lee H-J, Shin SY, Choi C, Lee YH, Lee S-J. Formation and removal of  $\alpha$ -synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(7):5411-7.
232. Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM. Aggresomes formed by  $\alpha$ -synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(6):4625-31.
233. Wu Y-d, Zhou B. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$  B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer*. 2010;102(4):639-44.
234. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.
235. Kaneko M, Stellwagen D, Malenka RC, Stryker MP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates one component of competitive, experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Neuron*. 2008;58(5):673-80.
236. Beste C, Baune BT, Falkenstein M, Konrad C. Variations in the TNF- $\alpha$  gene (TNF- $\alpha$ -308G $\rightarrow$ A) affect attention and action selection mechanisms in a dissociated fashion. *Journal of neurophysiology*. 2010;104(5):2523-31.
237. Baune BT, Wiede F, Braun A, Golledge J, Arolt V, Koerner H. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF-and its receptors. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2008;147(7):1056-64.
238. Krueger JM. The role of cytokines in sleep regulation. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(32):3408-16.
239. Plata-Salaman C. Cytokines and feeding. *International Journal of Obesity*. 2001;25(5):S48-S52.
240. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*. 2008;5(1):45.
241. A Frankola K, H Greig N, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2011;10(3):391-403.

242. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron*. 2002;35(3):419-32.
243. Goodman JC, Robertson CS, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *Journal of neuroimmunology*. 1990;30(2-3):213-7.
244. Liu T, Clark R, McDonnell P, Young P, White R, Barone F, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994;25(7):1481-8.
245. Fillit H, Ding W, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 1991;129(2):318-20.
246. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch E. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 1994;172(1-2):151-4.
247. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience letters*. 1994;165(1-2):208-10.
248. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  and disease progression in patients with multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1991;325(7):467-72.
249. Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*. 2000;287(3):211-4.
250. Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJ. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neuroscience research*. 2011;69(4):337-42.
251. Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cellular signalling*. 2010;22(7):977-83.
252. Angelova DM, Brown DR. Model senescent microglia induce disease related changes in  $\alpha$ -synuclein expression and activity. *Biomolecules*. 2018;8(3):67.
253. Szewczyk-Golec K, Czuzejko J, Tylzanowski P, Lecka J. Strategies for Modulating Oxidative Stress under Diverse Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018.
254. Wu C-C, Bratton SB. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(6):546-58.
255. McCabe K, Concannon RM, McKernan DP, Dowd E. Time-course of striatal Toll-like receptor expression in neurotoxic, environmental and inflammatory rat models of Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*. 2017;310:103-6.
256. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011;19(4):447-59.

257. Kouli A, Horne C, Williams-Gray C. Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and  $\alpha$ -synucleinopathies. *Brain, behavior, and immunity*. 2019;81:41-51.
258. Caplan IF, Maguire-Zeiss KA. Toll-like receptor 2 signaling and current approaches for therapeutic modulation in synucleinopathies. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:417.
259. Vezzani A, Maroso M, Balosso S, Sanchez M-A, Bartfai T. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(7):1281-9.
260. Stefanova N, Fellner L, Reindl M, Masliah E, Poewe W, Wenning GK. Toll-like receptor 4 promotes  $\alpha$ -synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *The American journal of pathology*. 2011;179(2):954-63.
261. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):1-14.
262. Kawai T, Akira S, editors. *TLR signaling. Seminars in immunology*; 2007: Elsevier.
263. Gao H-M, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Neuroinflammation and oxidation/nitration of  $\alpha$ -synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(30):7687-98.
264. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(37):9365-75.
265. Ferrari CC, Godoy MCP, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 $\beta$  in the substantia nigra. *Neurobiology of disease*. 2006;24(1):183-93.
266. Drouin-Ouellet J, St-Amour I, Saint-Pierre M, Lamontagne-Proulx J, Kriz J, Barker RA, et al. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2015;18(6).
267. Liu Y, Sorce S, Nuvolone M, Domange J, Aguzzi A. Lymphocyte activation gene 3 (Lag3) expression is increased in prion infections but does not modify disease progression. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-8.
268. Angelopoulou E, Paudel YN, Villa C, Shaikh M, Piperi C. Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) Protein as a Possible Therapeutic Target for Parkinson's Disease: Molecular Mechanisms Connecting Neuroinflammation to  $\alpha$ -Synuclein Spreading Pathology. *Biology*. 2020;9(4):86.


269. Hu S, Liu X, Li T, Li Z, Hu F. LAG3 (CD223) and autoimmunity: Emerging evidence. *Journal of Autoimmunity*. 2020:102504.
270. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA. LAG 3 (CD 223) as a cancer immunotherapy target. *Immunological reviews*. 2017;276(1):80-96.
271. Surguchev AA, Emamzadeh FN, Surguchov A. Cell responses to extracellular  $\alpha$ -synuclein. *Molecules*. 2019;24(2):305.
272. Guo W, Zhou M, Qiu J, Lin Y, Chen X, Huang S, et al. Association of LAG3 genetic variation with an increased risk of PD in Chinese female population. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16(1):270.
273. Kim C, Spencer B, Rockenstein E, Yamakado H, Mante M, Adame A, et al. Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating  $\alpha$ -synuclein transmission and neuroinflammation. *Molecular neurodegeneration*. 2018;13(1):1-18.
274. Li N, Wang Y, Forbes K, Vignali KM, Heale BS, Saftig P, et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *The EMBO journal*. 2007;26(2):494-504.
275. Jamebozorgi K, Taghizadeh E, Rostami D, Pormasoumi H, Barreto GE, Hayat SMG, et al. Cellular and molecular aspects of Parkinson treatment: future therapeutic perspectives. *Molecular neurobiology*. 2019;56(7):4799-811.
276. Fabbrini G, Brotchie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG. Levodopa-induced dyskinesias. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2007;22(10):1379-89.
277. Chan AK, McGovern RA, Brown LT, Sheehy JP, Zacharia BE, Mikell CB, et al. Disparities in access to deep brain stimulation surgery for Parkinson disease: interaction between African American race and Medicaid use. *JAMA neurology*. 2014;71(3):291-9.
278. Williams A, Gill S, Varma T, Jenkinson C, Quinn N, Mitchell R, et al. Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *The Lancet Neurology*. 2010;9(6):581-91.
279. Schuepbach W, Rau J, Knudsen K, Volkmann J, Krack P, Timmermann L, et al. Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(7):610-22.
280. Pinna A, Bonaventura J, Farré D, Sánchez M, Simola N, Mallol J, et al. L-DOPA disrupts adenosine A2A–cannabinoid CB1–dopamine D2 receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies. *Experimental neurology*. 2014;253:180-91.
281. Cools R, Barker RA, Sahakian BJ, Robbins TW. L-Dopa medication remediates cognitive inflexibility, but increases impulsivity in patients with Parkinson's disease. *Neuropsychologia*. 2003;41(11):1431-41.

282. Reichmann H. Modern treatment in Parkinson's disease, a personal approach. *Journal of Neural Transmission*. 2016;123(1):73-80.
283. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: targets for potential treatments. *Translational neurodegeneration*. 2017;6(1):28.
284. Lindvall O. Treatment of Parkinson's disease using cell transplantation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015;370(1680):20140370.
285. Bartus RT, Weinberg MS, Samulski RJ. Parkinson's disease gene therapy: success by design meets failure by efficacy. *Molecular Therapy*. 2014;22(3):487-97.
286. Aono H, Choudhury ME, Higaki H, Miyanishi K, Kigami Y, Fujita K, et al. Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus. *Glia*. 2017;65(11):1833-47.
287. Gao H-M, Liu B, Zhang W, Hong J-S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2003;24(8):395-401.
288. Joshi N, Singh S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. *Journal of neuroscience research*. 2018;96(3):379-90.



## 8. EKLER

## EK 1. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul İzni



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1445

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 03 KASIM 2020 SALI  
**Toplantı No** : 2020/18  
**Proje No** : GO 17/802 (Onay Tarihi: 10.10.2017)  
**Karar No** : 2020/18-56

Kurulumuzun 10.10.2017 tarihli toplantısında GO 17/802 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Pergin ATILLA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Uzm. Dr. Elif BİLİGİÇ, Arş. Gör. Mehmet ÖZCAN, Yrd. Doç. Dr. Füsün ÖZMEN, Yrd. Doç. Dr. Sevilay KARAHAN, Prof. Dr. Yasemin AKSOY, Prof. Dr. Esen Saka TOPÇUOĞLU ile birlikte çalışacakları ve Arş. Gör. Dr. Z. Bengisu KAYA'nın doktora tezi olan, GO 17/802 kayıt numaralı, "*Parkinson Hastalığı Hücre Modelinde İnflamasyonun ve İnflamasyon Sonrası Uygulanan N-Asetilsisteinin Nöronlardaki Lag-3 ve Tlr-2 Reseptörleri Üzerine Etkisi*" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 26.10.2020 tarihli süre uzatma, araştırmacı ve protokol revizyonu ile başlık değişikliği dilekçeniz Kurulumuzun 03.11.2020 tarihli toplantısında görüşülmüş ve uygun bulunmuştur. Çalışmanın başlığı "*Parkinson Hastalığı Hücre Modelinde İnflamasyonun ve İnflamasyon Sonrası Uygulanan N-Asetilsisteinin H4 Hücrelerindeki Lag-3 ve Tlr-2 Reseptörleri Üzerine Etkisi*" olarak değiştirilmiştir. Projenin yardımcı araştırmacılarından Arş. Gör. Mehmet ÖZCAN, Prof. Dr. Yasemin AKSOY, Doç. Dr. Füsün ÖZMEN ve Dr. Öğr. Üyesi Sevilay KARAHAN'ın proje ekibinden çıkarılması, Mayo Clinic Sinirbilim Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Pamela J. MCLEAN yardımcı araştırmacı olarak proje ekibine dahil edilmiş ve tüm değişiklikler kayıtlarımıza eklenmiştir. Projenin yeni sonlanım tarihi 04 Kasım 2021 olarak belirlenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

|                              |        |                                   |       |
|------------------------------|--------|-----------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN | Başkan | 7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR |       |
| 2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN  | (Üye)  | 8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK   | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK | (Üye)  | 9. Doç. Dr. Hande Gülneş DENİZ    | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER  | (Üye)  | 10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR     | (Üye) |
| 5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESE  | (Üye)  | 11. Av. Serap MORALIOĞLU          | (Üye) |
| İZİNLI                       |        |                                   |       |
| 6. Doç. Dr. Can Ebru KURT    | (Üye)  |                                   |       |

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

## EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

## PARKİNSON HASTALIĞI HÜCRESEL MODELİNDE İNFLAMASYONUN VE İNFLAMASYON SONRASI UYGULANAN N-ASETİLSİSTEİNİN H4 HÜCRELERİNDEKİ LAG3 VE TLR2 RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

### ORJİNALLIK RAPORU

|                   |                        |           |                  |
|-------------------|------------------------|-----------|------------------|
| <b>%4</b>         | <b>%3</b>              | <b>%2</b> | <b>%1</b>        |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET<br>KAYNAKLARI | YAYINLAR  | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| <b>1</b> | <b>adudspace.adu.edu.tr:8080</b><br>İnternet Kaynağı   | <%1 |
| <b>2</b> | <b>KAPLAN, Ayşe, ÇİFTÇİ AKALIN, Gülşen and KUTLU, Hatice Mehtap. "TİTANYUM DİOKSİTİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ", Anadolu Üniversitesi, 2017.</b><br>Yayın | <%1 |
| <b>3</b> | <b>sagliklimiyim.com</b><br>İnternet Kaynağı   | <%1 |
| <b>4</b> | <b>elifesciences.org</b><br>İnternet Kaynağı   | <%1 |
| <b>5</b> | <b>res.mdpi.com</b><br>İnternet Kaynağı  | <%1 |
| <b>6</b> | <b>toad.halileksi.net</b><br>İnternet Kaynağı  | <%1 |

### EK 3. Dijital Makbuz



## Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Zeynep Bengisu Kaya  
 Ödev başlığı: PARKİNSON HASTALIĞI HÜCRESE..  
 Gönderi Başlığı: PARKİNSON HASTALIĞI HÜCRESE..  
 Dosya adı: TEZ\_turnitin\_zeynepbengisukaya.d..  
 Dosya boyutu: 49.39M  
 Sayfa sayısı: 113  
 Kelime sayısı: 21,594  
 Karakter sayısı: 156,758  
 Gönderim Tarihi: 28-Oca-2021 01:43PM (UTC+0300)  
 Gönderim Numarası: 1496163461

