BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

SIÇANLARDA İNTRASEREBROVENTRİKÜLER PLAZMİD VE PREFORMED FİBRİL ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULAN ALFASİNÜKLEİNOPATİ PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE BRİMONİDİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ

HAZIRLAYAN

GÖKÇE ÇALIŞKAN

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

SIÇANLARDA İNTRASEREBROVENTRİKÜLER PLAZMİD VE PREFORMED FİBRİL ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULAN ALFASİNÜKLEİNOPATİ PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE BRİMONİDİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ

HAZIRLAYAN

GÖKÇE ÇALIŞKAN

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. Ş. REMZİ ERDEM

ANKARA - 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Gökçe ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 7/07/2023

Tez Adı: Sıçanlarda İntraserebroventriküler Plazmid ve Preformed Fibril Enjeksiyonu ile Oluşturulan Alfasinükleinopati Parkinson Hastalığı Modelinde Brimonidinin Olası Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)	**İmza**
……..……	..…… ……..
……	..……
…… ...…	……
……	……
……	……

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: … / … / …….

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORİJİNALLİK RAPORU

Tarih: 07 / 07 / 2023

Öğrencinin Adı, Soyadı: Gökçe ÇALIŞKAN

Öğrencinin Numarası:

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji

Programı: Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: Sıçanlarda İntraserebroventriküler Plazmid ve Preformed Fibril Enjeksiyonu ile Oluşturulan Alfasinükleinopati Parkinson Hastalığı Modelinde Brimonidinin Olası Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 60 sayfalık kısmına ilişkin, 07 / 07 / 2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %16'dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç

2. Alıntılar hariç

3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Bu tezi, tez döneminde kaybettiğim canım dedem

ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanma, yürütülme ve sonlandırılmasına kadar tüm aşamalarında bilimsel katkılarıyla ve sonsuz anlayışı ve sabrıyla bana destek olan değerli

Doktora eğitim hayatım özveri ve emekleriyle tam donanımlı şekilde mezun olmamızı sağlayan Başkent Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji bölüm hocalarım

Çalışmalarım konusunda her türlü ekipman desteği veren

Çalışmada kullandığım plazmid üretimi için

Çalışmada kullandığım rot-a-rod düzeneğinin üretilmesinde katkısı olan

Doktora tez dönemim boyunca bana destek veren, yardım eden ve motive eden arkadaşlarım

Çalışmada kullandığım etkin madde desteği için

Eğitim hayatımın başlangıcından şu ana dek her koşulda başarılı olacağıma inanan, beni her zaman destekleyen anneannem

Tez çalışmam sürecinde her türlü teknik destek sağlayan

Doktora eğitimim boyunca bana destek olan

Tüm zorluklarda pes etmememi sağlayan ve bana başarma gücü veren

Bizlere bu imkanları sunan her gün minnet duyduğum kahramanımız M. Kemal ATATÜRK'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ÇALIŞKAN G. ‘‘Sıçanlarda İntraserebroventriküler Plazmid ve Preformed fibril enjeksiyonu ile Oluşturulan Alfasinükleinopati Parkinson Hastalığı Modelinde Brimonidin’in Olası Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi’’, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2023.

Sıçanlarda santral alfa-sinüklein *pre-formed* fibril uygulamasının 6 ay sonra alfa-sinükleinopati oluşturduğu bildirilmiş ve sıçan Parkinson hastalığı modeli olarak önerilmiştir. Bu tez çalışmasında, sıçanlarda intraserebroventriküler alfa-sinüklein *pre-formed* fibril uygulamasından 4 hafta önce, aynı yoldan alfa-sinüklein proteinini kodlayan mRNA’yı içeren plazmid uygulaması ile alfa-sinükleinopati oluşma sürecinin kısalacağı hipotezi test edilmiştir. Süreç bir sıçan Parkinson hastalığı modelinden beklenen kognitif, motor ve motor-dışı belirtileri değerlendirmeye yönelik çeşitli nöropsikofarmakolojik yöntemlerle incelendi. Ayrıca ikincil amaç olarak bu model üzerinde, daha önce retinal ganglion hücrelerde nöroprotektif etkisi gösterilmiş olan α_2 adrenerjik reseptör agonisti brimonidin’in olası etkisi değerlendirildi. Bu tez çalışmasında her iki cinsiyetten, Sprague Dawley ırkı sıçanlar (250-300 g, 4 aylık, n=30) kullanıldı. Sıçanlar, cinsiyet dağılımı eşit olacak şekilde, 5 homojen gruba rasgele olarak dağıtıldı (n=6). Bu gruplar control, sham, alfa-sinüklein, alfa-sinüklein + brimonidine ve brimonidine grupları şeklinde oluşturuldu. Etkilerin zamana bağımlılığını değerlendirmek için davranış testleri enjeksiyonların bitiminden 2 ve 4 ay sonra yapıldı. Sıçanlarda anksiyete durumu açık alan (AA) ve yükseltilmiş artı labirent (YAL) testleri ile, öğrenme-bellek performansı yeni nesne tanıma (YNT) ve Morris su labirenti (MSL) testleri ile değerlendirildi. Motor koordinasyonun değerlendirilmesi için dikey tele tutunma (DDT) testi, yatay merdiven testi (YM) ve rot-a-rod testi kullanıldı. Motor-dışı otonomik disfonksiyonun değerlendirilmesi için *hot plate* testi kullanıldı. Alfa-sinüklein grubunda 2. ayda açık alan testi ile değerlendirilen anksiyete daha fazla olduğu halde YAL testi ile gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi. Alfa-sinüklein grubunda her iki zaman noktasında da YNT ve MSL ile değerlendirilen bellek performansının bozulduğu saptandı. DTT ve YM testleri alfa-sinüklein grubunda motor kooardinasyonun her iki zaman noktasında da kötüleştiğini gösterirken, rot-a-rod testi motor diskoordinasyonun özellikle 4. ayda kötüleştiğini kanıtladı. Ağrılı uyarana verilen tepki süresindeki gecikmeye dayanan *hot plate* testi bulguları yine alfa-sinüklein grubunda

otonomik disfonksiyon geliştiğini belirledi. Bu tez çalışmasında olası nöroprotektif etkisi değerlendirilen brimonidin otonomik disfonksiyon dışında alfa-sinüklein uygulamasına bağlı hiçbir kötüleşmeyi anlamlı olarak geri çevirmedi. Bu tez çalışması ile intraserebroventriküler plasmid ön-uygulamasının alfa-sinüklein ile oluşturulan olası alfasinükleinopatiye bağlı sıçan Parkinson hastalığı modelinin motor ve motor-dışı bulgular ile değerlendirilen oluşma sürecini kısalttığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, Alfa-sinükleinopati, Alfa-sinüklein *pre-formed* fibril, Brimonidin, Parkinson sıçan modeli.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (proje no: DA 20/15). Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir (proje onay tarihi 14.09.2020)

ABSTRACT

ÇALIŞKAN G. ‘‘Investigation of the Possible Neuroprotective Effect of Brimonidine in a Alphasynucleinopathy Parkinson's Disease Model Created by Intracerebroventricular Plasmid and Pre-formed Fibril Injection in Rats’’, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2023.

It was reported that central alpha-synuclein pre-formed fibril administration in rats caused alpha-synucleinopathy within 6 months and was suggested as a rat Parkinson's disease model. In this thesis, we hypothetized that alpha-synucleinopathy formation process would be shortened by the application of plasmid containing mRNA encoding alpha-synuclein protein 4 weeks before the application of intracerebroventricular alpha-synuclein pre-formed fibril in rats. In the process various neuropsychopharmacological tests to assess the cognitive, motor, and non-motor symptoms expected from a rat Parkinson's disease model were examine. In addition, as a secondary aim, the possible effect of the α2 adrenergic receptor agonist brimonidine, which has previously been shown to have neuroprotective effects on retinal ganglion cells, was evaluated on this model. In this thesis study, Sprague Dawley rats (250-300 g, 4 months old, n=30) of both sexes were used. Rats were randomly distributed into 5 homogeneous groups with equal sex distribution (n=6). These groups were formed as control, sham, alpha-synuclein, alpha-synuclein + brimonidine and brimonidine groups. Behavioral tests were performed 2 and 4 months after the end of the injections to assess the time dependence of the effects. Anxiety in rats was evaluated with open field and elevated plus maze tests, and learning-memory performance was evaluated with new object recognition and Morris water maze tests. Vertical grid test, horizontal staircase test and rot-a-rod test were used to evaluate motor coordination. The hot plate test was used to evaluate non-motor autonomic dysfunction. Although the anxiety assessed with the open field test was higher in the alpha-synuclein group at 2 months, it did not show a significant difference between the groups with the elevated plus maze test. In the alpha-synuclein group, memory performance as assessed by new object recognition and Morris water maze tests was found to be impaired at both time points. While vertical grid test, horizontal staircase test showed that motor coordination worsened in the alpha-synuclein group at both time points, rod-a-rod test showed that motor discoordination worsened especially at 4 months. Findings of the hot plate test based on the delay in the response time to the pain stimulus again determined

that autonomic dysfunction developed in the alpha-synuclein group. In this thesis study, brimonidine, whose possible neuroprotective effect was evaluated, did not significantly reverse any worsening due to alpha-synuclein administration, except for autonomic dysfunction. In this thesis, it was concluded that intracerebroventricular plasmid pre-administration shortened the formation process of the rat Parkinson's disease model due to possible alpha-synuclein-induced alpha-synucleinopathy, as assessed by motor and non-motor findings.

Keywords: Parkinson’s disease, Alpha-synucleinopathy, Alpha-synuclein pre-formed fibril, Brimonidine, Parkinson’s rat model.

This study was approved by Baskent University Animal Experiments Local Ethics Committee (project no: DA 20/15) and supported by Baskent University Research Fund (Project Approval Date: 14.09.2020).

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **ix**
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Parkinson Hastalığı Tarihçesi ve Epidemiyolojisi **3**
2.2. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi ve Patogenezi **3**
2.3. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri **4**
2.3.1. Nörotoksinler **5**
2.3.2. Genetik modeller **7**
2.4. Alfa-sinüklein **8**
2.4.1. Alfa-sinüklein yapısı **8**
2.4.2. Alfa-sinüklein ve Parkinson Hastalığı **9**
2.4.3. Alfa-sinüklein Pre-formed fibril ile oluşturulan PH modeli **10**
2.5. Parkinson Hastalığı Tedavi Yöntemleri **11**
2.5.1. Farmakolojik tedaviler **11**
2.5.2. Farmakolojik olmayan tedaviler **14**
2.6. Brimonidin **15**
3. GEREÇ VE YÖNTEM **18**
3.1. Deney Hayvanları **18**
3.2. Kullanılan madde ve ilaçlar **18**
3.3. Kullanılan Malzeme ve Gereçler **18**
3.4. Deney Grupları **19**
3.5. Deney Planı **19**
3.6. Plazmid enjeksiyonunun hazırlanması **21**
3.7. Alfa-sinüklein Pre-formed Fibril Hazırlanması **23**
3.8. Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması **23**
3.8.1. Stereotaksik cerrahi **24**

Sayfa

3.9. Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Uygulanması ... 25

3.10. Davranış Deneyleri ... 25

3.10.1. Açık alan (AA) testi ... 26

3.10.2. Yükseltilmiş artı labirent (YAL) testi ... 27

3.10.3. Yeni nesne tanıma (YNT) testi ... 28

3.10.4. Morris su labirenti (MSL) testi ... 29

3.10.5. Dikey tele tutunma testi ... 31

3.10.6. Yatay merdivende yürüme (YMY) testi ... 32

3.10.7. Rot-a-rod testi ... 33

3.10.8. *Hot plate* ... 34

3.11. İstatistiksel Analiz ... 35

4. BULGULAR ... 36

4.1. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Anksiyete Üzerine Etkisi 36

4.1.1. Açık alan testi ... 36

4.1.2. Yükseltilmiş artı labirent testi ... 37

4.2. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Öğrenme ve Bellek Üzerine Etkisi ... 38

4.2.1. Yeni nesne tanıma testi ... 38

4.3. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Öğrenme ve Uzaysal Bellek Üzerine Etkisi ... 40

4.3.1. Morris su labirenti testi ... 40

4.4. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Motor Koordinasyon Üzerine Etkisi ... 45

4.4.1. Dikey tele tutunma testi ... 45

4.4.2. Yatay merdivende yürüme testi ... 46

4.4.3. Rot-a-rod ... 49

4.5. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Otonomik Fonksiyonlar Üzerine Etkisi ... 50

4.5.1. *Hot plate* ... 50

5. TARTIŞMA ... 51

6. SONUÇ VE ÖNERİLER ... 58

Sayfa

KAYNAKLAR 61

EKLER

Ek 1: ETİK KURUL ONAYI

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar 19
Şekil 3.2. Plazmid enjeksiyonu sonrası immunohistokimyasal boyama ile alfa-sinüklein aşırı ifadesinin floresan mikroskopu ile gösterimi. 20
Şekil 3.3. Deney protokolü akış şeması. 20
Şekil 3.4. Sonikasyon sonrası alfa-sinüklein *pre-formed* fibril boyutlarının zeta potansiyeli (*zetasizer)* ölçüm sonucunu gösterir örnek trase. 23
Şekil 3.5. Cam kapiller tüp ile enjeksiyona hazır hale getirilmiş Hamilton enjektörü 25
Şekil 3.6. Davranış testlerinin şematik gösterimi 26
Şekil 3.7. Açık alan düzeneği 27
Şekil 3.8. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği: 28
Şekil 3.9. Yeni nesne tanıma testi düzeneği 29
Şekil 3.10. Morris su labirenti test düzeneği 29
Şekil 3.11. Morris su labirenti testi protokolünün şematik gösterimi. 31
Şekil 3.12. Dikey tele tutunma testi düzeneği 31
Şekil 3.13. Yatay merdivende yürüme testi düzeneği 33
Şekil 3.14. Rot-a-rod motor koordinasyon ve öğrenme testi cihazı 34
Şekil 3.15. Hot plate test düzeneği 34
Şekil 4.1. Açık alan testi ile anksiyetenin değerlendirilmesi. 36
Şekil 4.2. Yükseltilmiş artı labirent testi ile anksiyetenin değerlendirilmesi. 37
Şekil 4.3. Yeni nesne tanıma testi ile öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi. 39
Şekil 4.4. Morris su labirenti ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi. 41
Şekil 4.5. Morris su labirentinde *prob* testi ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi. 42
Şekil 4.6. Morris su labirentinde *prob* testi ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi. 43
Şekil 4.7. Morris su labirentinde retansiyon testi ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi. 44
Şekil 4.8. Dikey tele tutunma testi ile katalepsi benzeri etkinin değerlendirilmesi. 46
Şekil 4.9. Yatay merdiven testi ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi. 48
Şekil 4.10. *Rot-a-rod* ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi. 49

Şekil 4.11. *Hot plate* testi ile otonom disfonksiyonun değerlendirilmesi. Ağrı reaksiyonu süresi, ... 50

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

6-OHDA	6-hidroksidopamin
α-sin	alfa-sinüklein
AA	açık alan
Aa	amino asit
AP	antero- posterior
AVV	adeno-ilişkili viral vektör
DA	dopamin
DAT	dopamin taşıyıcısı
DBS	derin beyin stimülasyonu
DTT	dikey tele tutunma
DV	dorso-ventral
ER	endoplazmik retikulum
icv	intraserebroventriküler
i.p.	intraperitoneal
ko	*knock out*
L-DOPA	levodopa
LAT-1	l-nötral amino asit
LB	Luria-Bertoni
LC	Lewy cisimciği
LN	Lewy nöritleri
LRRK2	lösin açısından zengin tekrar kinaz 2
MAO-B	monoamino oksidaz
MAPT	mikrotübül-ilişkili protein tau
MFB	orta ön beyin demeti
MJFF	Michael J Fox Foundation
ML	medio-lateral
MPDP+	1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridinyum.
MPP+	1-metil-4fenilpiridinyum
MPPP	1-metil-4-fenil-4-propionoksipiperidin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSL	Morris su labirenti

MSS	merkezi sinir sistemi
NAC	*non amyloid beta component*
NMDA	n-metil-d-aspartat
PEİ	polietilenimin
PFF	*pre-formed* fibril
PH	Parkinson hastalığı
PI3K	fosfatidil inositol-3 kinaz
PINK1	PTEN indüklenmiş varsayılan kinaz 1
PSS	periferik sinir sistemi
RGH	retinal ganglion hücresi
s.c.	subkutan
SD	Sprague Dawley
SF	serum fizyolojik
SN	substansia nigra
SNpc	substantia nigra pars kompakta
VMAT	veziküler monoamin taşıyıcısı
YAL	yükseltilmiş artı labirent
YMY	yatay merdivende yürüme

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH) substansiya nigra pars kompaktada yer alan dopaminerjik nöron kaybı, nöron kaybına bağlı olarak striatal dopamin miktarının azaldığı, Lewy cisimciklerinin (LC) beyinde yaygın ifadesi ile karakterize, genellikle ileri yaşlarda görülen kronik ve ilerleyici bir hastalıktır. Klasik motor semptomlar olarak rijidite, istirahat tremoru, postural bozukluk, bradikinezi ve harekete başlamada zorluk görülür (1). Hastalığın tanısı çoğunlukla motor belirtiler üzerinden konulsa da, hastaların yaşam kalitesini en az motor bozukluklar kadar etkileyen motor dışı belirtiler de mevcuttur. Bu belirtiler; bilişsel bozukluklar, depresyon, anksiyete, uyku bozuklukları, otonomik disfonksiyon gibi anormalliklerdir.

PH'nın patofizyolojisi ve altta yatan mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. Parkinson hastalığının iki özgün patolojik özelliği Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleridir (LN) (2). İmmunohistokimyasal çalışmalar sonucunda alfa-sinüklein (α-sin) proteininin LC ve LN'lerin ana içeriği olduğu gösterilmiştir (3). Beyinde yaşa bağlı değişiklikler, genetik yatkınlık ve çevresel faktörler α-sin birikimine ve devamında nigrostriatal dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna sebep olur (4,5).

PH'nın patolojisini araştırmak için birçok hayvan modeli bulunmaktadır. En çok kullanılan modeller toksin modelleri, transgenik hayvan modelleri ve α-sin aşırı ifadesine bağlı modellerdir. Toksin modelleri PH'nın nigrostriatal dejenerasyon özelliğini gösterse de α-sin ve LC patolojisini göstermez (6). Bu modeller özellikle nigrostriatal dejenerasyonun sonuçlarının çalışıldığı çalışmalarda tercih edilir. Transgenik hayvan modellerinin çoğu da nigrostriatal dejenerasyon yapmaz ve tekrarlanabilir motor bozukluklar göstermez (6,7,8). α-sin aşırı ifadesi ile oluşturulan hayvan modelleri hastalığın yavaş ilerleyen doğal seyrini daha iyi taklit etmekte ve hastalarda izlenen patolojiye daha yakın bir patoloji oluşumuna neden olmaktadır.

Günümüzde PH'nın tedavisinde kullanılan ilaçların daha çok semptomatik tedavi sağlaması ve uzun dönemde tedaviye bağlı yan tesirlerin oluşması sebebiyle yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca hastalığın ilerleyiciliğini yavaşlatacak ya da

durduracak, nöron ölümünü engelleyecek bir tedavi bulunabilmesi hastaların hem yaşam kalitesini hem de yaşam süresini artıracaktır.

Brimonidin, glokom hastalarında kullanılan selektif α_2 adrenerjik reseptör agonisti olan bir ilaçtır. Brimonidinin retina ve optik sinirde nöroprotektif etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Brimonidinin nöroprotektif etkisinin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak anti-apoptotik fosfatidil inositol-3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz/Akt yolaklarını aktive ederek nöroprotektif etki oluşturduğu düşünülmektedir (9). Bu yolak proapoptatik sinyal molekülleri olan BAD ve kaspaz 9 moleküllerini inhibe ederek nöroprotektif etki göstermektedir (10). Bu antiapoptotik etkinin PH tedavisinde de faydalı olması muhtemeldir.

Bu tez çalışması iki amaca yönelik gerçekleştirilmiştir. Birincil amaç, literatürde yaklaşık 6 ayda geliştiği bildirilen, santral α-sin enjeksiyonu ile oluşturulan PH sıçan modelinde sürecin, α-sin mRNA'sını taşıyan plazmid ön-uygulaması ile kısalacağı varsayımını test etmek, ikincil amaç ise brimonidin tedavisinin olası nöron koruyucu etkisini bu tez çalışmasında kullanılan PH sıçan modeli üzerinde araştırmaktır. Bu amaçlarla, PH modellerinde bozulması beklenen çeşitli motor ve motor-dışı işlevler, nörokognitif değişiklikler ve protein ekspresyon değişiklikleri, sırasıyla çeşitli davranış testleri ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı Tarihçesi ve Epidemiyolojisi

PH yaklaşık 200 yıldır bu isimle bilinmesine rağmen bu hastalığın varlığının eski çağlara kadar uzanmakta olduğunu gösteren kanıtlar bulunmuştur (11). Antik Mısır papirüslerinde PH semptomlarından söz edilmektedir (12). Ancak günümüzdeki haliyle bu hastalık ilk defa 1817 yılında İngiliz hekim James Parkinson tarafından ‘’*An Essay on the Shaking Palsy*’’ adlı yayında tanımlanmıştır (13). Bu yayında Parkinson, istirahat tremoru, duruş ve yürüyüş bozukluğu, kas gücü kaybı ile karakterize ilerleyici bir hastalık olarak tanımlamıştır. O zamanlar İngiltere’de titrek felç olarak bilinen bu hastalığa ismini hastalıkta felç olmadığını saptayan Jean-Marie Charcot vermiştir.1912 yılında Frederich Lewy hastalardan alınan örnekler üzerinde çalışarak nöronlarda daha sonra Lewy cisimcikleri adı verilen patolojik bulguyu tanımlamıştır. Parkinson hastalığında etkilenen ana yapının substansiya nigra (SN) olduğunu ilk defa 1919’da Konstantin Tretiakoff bildirmiştir. Hastalığın dopamin ile ilişkisi 1950’li yıllarda Arvid Carlsson tarafından gösterilmiştir (14).

PH prevalansı yaşla birlikte artarak 60 yaş üstü popülasyonun %1’ini etkilemektedir (13). Kırk yaşın altındaki bireylerde nadiren görülürken 80 yaşın üzerinde bu oran %4’e yükselmektedir. Ortalama başlangıç yaşı yaklaşık 60 olmasına rağmen vakaların %10’u genç başlangıçlı olarak sınıflandırılmaktadır ve 20 ile 50 yaşları arasında görülebilmektedir (15). Erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (15).

2.2. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi ve Patogenezi

PH çoğu olguda idiyopatik olmakla beraber genetik, çevresel etkenler ve en önemlisi yaş etkeni, PH için tanımlanan risk faktörleri arasındadır (16). Çevresel faktörler arasında pestisitler, karbon monoksit gibi toksik ajanlara maruziyet, kırsal kesimde yaşamak ve kuyu suyu tüketimi PH ile ilişkisi gösterilen etkenlerdendir. Genetik faktörler değerlendirildiğinde ailesel PH olanlarda hastalığa yakalanma riskinin %5’ten fazla olduğu görülmektedir. PH ile ilgili bazı genler tanımlanmıştır. Örneğin, alfa sinükleini kodlayan *SNCA* genindeki N-terminal nokta mutasyonları ve α-sin lokusunu içeren genomik duplikasyonlar/triplikasyonlar yoluyla artan ekspresyon otozomal dominant olarak ailesel

PH'ya sebep olmaktadır. Ayrıca mikrotübül-ilişkili protein tau (MAPT), Parkinson hastalığı 16 (PARK16) V ve lösince zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2)'nin de içinde yer aldığı çok sayıda gen, riskli genler olarak tanımlanmıştır.

Substantia nigra pars kompaktadaki (SNpc) dopaminerjik nöronların %60- 80'inin kaybı PH belirtilerinden sorumlu en önemli patolojik özelliktir (17). Substantia nigradaki dopaminerjik nöronlar motor hareketlerin başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. PH'daki semptomlar hareketle ilgili olanlar ve hareketle ilgili olmayanlar şeklinde iki gruba ayrılır. PH'daki motor semptomlar esas olarak tremor, rijidite, bradikinezi ve postural instabilite olarak görülmektedir (18). PH'nın temel motor belirtileri bradikinezi, istirahat tremoru, kaslarda sertlik, duruş ve denge bozukluğudur. İkincil motor belirtiler ise konuşma bozukluğu, el yazısı bozulması, yutma zorluğu, göz hareketlerinin azalmasıdır (19). Motor semptomların ortaya çıkmasında striatal dopamin (DA) miktarının azalmasının yanı sıra, serotonerjik, glutamerjik ve kolinerjik sistemlerin de rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (20,21).

Motor olmayan semptomlar arasında kognitif bozukluklar, demans, psikoz, uyku bozuklukları, kabızlık, koku duyusunun kaybı, ağrı, depresyon ve anksiyete sayılmaktadır (18,22). Bu bulguların bir kısmı hastalığın erken evresinde motor belirtiler başlamadan da görülebilmektedir. Motor olmayan semptomların altında yatan nöropatolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (23).

Parkinson hastalığının en önemli patolojik bulgusu substantina nigradaki dopamin üreten nöronların kaybı ve Lewy cisimciklerinin varlığıdır (24). Lewy cisimcikleri büyük ölçüde yanlış katlanmış alfa-sinükleinlerden oluşmaktadır (25). Alfa-sinükleinin hastalıktaki rolü henüz tam olarak bilinmese de hastalığın patogenezinde önemli bir yere sahip olduğu açıktır.

2.3. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri

Geçerli ve güvenilir bir deneysel PH modeli hastalığın etyopatogenezinin daha iyi anlaşılması ve araştırılması, yeni tedavilerin geliştirilmesi, hastalığın ilerleyiciliğinin yavaşlatılabilmesi ya da durdurulabilmesi için hastalığın patofizyolojisini hayvanlar üzerinde taklit edebilme olanağını sağlamaktadır. Deneysel PH modelleri, yaşa bağlı ve

ilerleyici olmalı, DA nöronlarının kaybına ek olarak DA replasman tedavisine yanıt veren hareket yavaşlığı, katılık, dinlenme tremoru ve postural instabilite dahil olmak üzere motor işlev bozukluğu oluşturmalıdır. Ayrıca patolojide önemli bir rolü olan α-sin ve Lewy cisimcikleri bulunmalıdır (26). Deneysel PH modelleri kabaca nörotoksin hayvan modelleri ve genetik hayvan modelleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.3.1. Nörotoksinler

MPTP: Bir opioid olan meperidinin analoğudur. İlk olarak 1982 yılında bir grupta sentetik bir eroin türevi olan 1-metil-4-fenil-4-propionoksipiperidin (MPPP)'in intravenöz yoldan alınması sonrası PH belirtileri ortaya çıkmasıyla inceleme yapılmıştır ve kullanılan ürünün MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) ile kontamine olduğu saptanmıştır.

MPTP genellikle sistemik olarak uygulanmaktadır (subkutan, intraperitoneal ya da intramusküler). MPTP, diğer toksinlere göre yüksek oranda lipofiliktir bu sayede kan beyin bariyerini (KBB) geçmektedir. MPTP astrositlerde monoaminoksidaz enzimi (MAO) ile metabolize olur, aktif olan 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum (MPDP+) ve 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) toksik metabolitlerine dönüşmektedir. MPP dopamin taşıyıcısı (DAT) ile dopaminerjik nöronlara, veziküler monoamin taşıyıcısı (VMAT) ile de sinaptik veziküllere taşınmaktadır. MPP daha sonra mitokondriyal membran potansiyeli aracılığı ile mitokondri içine girerek elektron taşıma sisteminde kompleks 1 inhibisyonuna neden oluşmaktadır (27).

MPTP modeli en çok kullanılan deneysel PH modellerinden biridir. MPTP'ye maruz kalma fare, kedi ve primatlar başta olmak üzere birçok deney hayvanı türünde nigrostiatal dopaminerjik dejenerasyona neden olmaktadır ve hemen hemen tüm PH semptomlarını gerçeğe yakın biçimde taklit edebilmektedir. Fakat bilinmeyen bir nedenle sıçanlar bu toksine daha dirençlidir (27).

Bu modelin önemli kısıtlılıkları, Lewy cisimciklerinin oluşmasına yol açmaması, fazla toksik olması, dikkatli kullanılmazsa araştırmacıda PH'na neden olabilmesidir (28).

6-OHDA: Hidroksillenmiş bir DA analoğu olan 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ilk olarak 1959 yılında izole edilip, 1968 yılında SNpc'ya enjekte edildiğinde nigrostriatal

dopaminerjik hasara sebep olduğu saptanarak bir deneysel PH modeli olarak kullanılmaya başlanılmıştır (29). 6-OHDA, katekolaminerjik yolaklar üzerinde spesifik nörotoksik etkilere sahip olduğu keşfedilen ilk maddedir (30,31). 6-OHDA dopamin taşıyıcısı ile dopaminerjik nöronlara taşınarak yüksek miktarda dopaminerjik hücre kaybına sebep olur (28). KBB'ni aşamadığı için sistemik olarak kullanılamamaktadır. Stereotaksik olarak SNpc, orta ön beyin demeti (MFB) ya da striatuma enjeksiyon yapmak gerekmektedir (31,32). Genellikle SNpc ya da MFB'ye tek taraflı enjeksiyon yapılmaktadır. Tek taraflı enjeksiyonlar sonucu unilateral motor bozukluğa neden olur ve bu motor bozukluklar farmakolojik ajanlar ile test edilmektedir (31). Bilateral enjeksiyonu ile anksiyete, depresyon gibi motor dışı semptomlar da değerlendirilebilmektedir.

Bu toksin ile oluşturulan nöron hasarı başlıca oksidatif strese bağlı oluşmaktadır. Dopaminerjik nöron içine giren 6-OHDA mitokondrilerde kompleks 1 enzim sistemini inhibe etmektedir. Sonuç olarak süperoksit serbest radikalleri oluşmaktadır. Çeşitli çalışmalarda 6-OHDA ile oluşturulan modellerde nigrostriatal yolakta mikroglial etkinliğinin arttığı görülmüştür (33).

Fareler, sıçanlar, kediler ve primatlarda güçlü bir dopaminerjik nöron kaybı yapması ve Lewy cisimcikleri oluşumuna yol açmaması sebebiyle 6-OHDA da hastalığın tüm klinik ve patolojik özelliklerini taklit edememektedir.

Rotenon: Rotenon haşerelere karşı intektisit olarak, göllerde bazı balık türlerini öldürmek için ve toz halinde insan ya da hayvanlarda bit, pire, kene gibi dış parazitlere karşı akarisit olarak kullanılan ve bazı tropik bitki türlerinde doğal olarak bulunan bir maddedir. Rotenon lipofilik yapıdadır ve KBB'ni aşmaktadır. Rotenon mitokondrilerdeki kompleks 1 enzim sistemini inhibe ederek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve oksidatif stres meydana gelmesine ve nöron hasarına sebep olmaktadır (34). Rotenon modeli ile Lewy cisimciklerinin oluşması, maddenin KBB'ni geçebilmesi bir deneysel PH modeli oluşturmada avantaj olarak ifade edilebilse de deney hayvanlarında yüksek oranda ölüme sebep olması, dopaminerjik hasarın sonuçlarının deneyler arasında değişkenlik göstermesi bu modelin dezavantajları arasında sayılmaktadır (35).

Parakuat: MPTP'nin aktif metaboliti olan MPP'ye yapısal olarak benzeyen bir herbisittir. KBB'ni yavaş ve miktarda geçmektedir. Yüklü bir molekül olduğu için beyne L-

nötral amino asit (LAT-1) taşıyıcısı ile taşınmaktadır. Fizyolojik dozlarda etkisini redoks döngüsü üzerinden, yüksek dozlarda ise mitokondriyal kompleks 1 inhibisyonu üzerinden oluşturmaktadır (28). Ayrıca, proapoptotik proteinler Bax ve Bak'ın indüklenmesine yol açtığı, ardından sitokrom C salıverilmesine ve kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (36). Parakuat'ın çoklu enjeksiyonlarından sonra hücre kaybı %20-30'dur. Bu modelde SNpc'da alfa-sinüklein ekspresyonu ve agregasyonu tespit edilmiştir (37).

Maneb: Maneb ditiyokarbamat ailesinde yer alan bir fungisittir. Lipofilik yapısı sebebiyle kan beyin bariyerini geçmektedir (38). Lokomotor aktiviteyi azaltır ve MPTP'nin lokomotor aktivite ve katalepsi üzerindeki etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir (27,38). Maneb etkilerini, oksidatif stres, mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki kompleks III'ün inhibisyonu ile gösterir (39).

2.3.2. Genetik modeller

PH'nın çok küçük bir kısmı (%10) genetik mutasyona bağlı olarak görülmektedir (40). *SNCA* (A-sinüklein, *PARK1*), parkin (*PARK2*), DJ1(*PARK7*), *Pink1* (PTEN-indüklenmiş varsayılan kinaz 1, *PARK6*) ve son zamanlarda *LRRK2* (lösin açısından zengin tekrar kinaz 2, *PARK8*) gibi genlerin ailesel PH'da rol oynadığı ortaya çıkmıştır (41,42).

***SNCA*:** Alfa-sinüklein mutasyonları PH'da ilk keşfedilen genetik bozukluktur (43). İlk olarak Contursi isimli İtalyan kökenli bir ailede tanımlanmıştır (44). Otozomal dominant geçişli bir gendir. *SNCA* genindeki bugüne kadar tanımlanmış nokta mutasyonlar (A53T, A30P, E46K) ve multiplikasyonlar kalıtsal PH'da gösterilmiştir (45). Transgenik farelerde (A53T, A30P, E46K) beynin bazı bölgelerinde alfa-sinüklein agregatlarının varlığı bildirilmiştir ancak çoğunda önemli bir nigrostriatal dejenerasyon bulunamamıştır (26). Bu transgenik fare modellerinin aksine viral vektör aracılı α-sin modelleri α-sin patolojisini ve dopaminerjik nörodejenerasyonu net bir şekilde göstermiştir (26).

***PARKİN* (*PARK2*):** *Parkin* genindeki mutasyonlar otozomal resesif erken başlangıçlı PH'da bulunmuştur (46). E3 ubikutin ligaz aktivitesinde azalmaya yol açarak nörotoksik maddelerin birikmesine neden olmaktadır (47). Transgenik modellerde SN'da dopaminerjik nöronlarda anlamlı dejenerasyon bulunamamıştır (35,48).

***PINK1*:** Otozomal çekinik erken başlangıçlı PH'da bulunmuştur. İlk olarak Sicilya, İtalya ve İspanya'daki akraba evliliği bulunan 3 ayrı ailede tanımlanmıştır (49). *PINK1* geni mitokondriye özgü bir proteini kodlamaktadır. Transgenik modellerde mitokondriyal bozuklukların gözlendiği bildirilmiştir. *PINK1 knock out* (*k.o.)* farelerde striatal DA seviyelerinde orta dereceli bir azalma görülmüştür (50).

***DJ1*:** Otozomal çekinik erken başlangıçlı PH'da bulunmuştur. Transgenik farelerde lokomotor aktivitede ve striatal dopamin salıverilmesinde azalma görülmektedir. Ancak SN'da dopaminerjik nöron kaybı gözlenmemektedir (51,52).

***LRRK2*:** Bu gendeki mutasyonlar otozomal dominant geç başlangıçlı PH'nın önemli bir sebebidir. Transgenik hayvan modellerinde motor bozukluklarda artış, striatal dopamin salıverilmesinde azalma, SN'da dopaminerjik nöronların dejenerasyona uğradığı gösterilmiştir (53,54).

2.4. Alfa-sinüklein

2.4.1. Alfa-sinüklein yapısı

Alfa-sinüklein 140 aa'lik sinüklein ailesinden *SNCA* geni ile kodlanan bir proteindir (55). Beyinde yüksek oranda özellikle de presinaptik olarak ifade edilen nöronal bir proteindir (56). Sinir terminal uçlarında sinaptik veziküllere çok yakın bulunmaktadır (57). Merkezi sinir sisteminde (MSS) substantia nigra, kaudat çekirdek, amigdala ve hipokampusta yüksek miktarda bulunmaktadır (58).

Alfa-sinüklein ilk olarak *Torpedo californica'nın* kolinerjik veziküllerinden elde edilmiş ve 1988 yılında Manoteauix ve ark. tarafından rapor edilmiştir (59). Alfa-sinükleinin fonksiyonu henüz tümüyle aydınlatılmış olmasa da sinaptik transmisyonda, lipid metabolizmasında ve protein katlanmasında rolü olduğu gösterilmiştir (55). Ayrıca dopaminin biyosentezinde, veziküle taşınmasında ve salıverilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (58).

Doğal hali katlanmamış bir proteindir ve 3 kısımdan oluşmaktadır; N terminal bölgesi (+ yüklü bölge), NAC (*Non amyloid beta component*) bölgesi ve C terminal bölge (- yüklü

bölge). Pozitif yüklü N terminal bölge ile lipitlere bağlanmaktadır. Alfa-sinükleinin nokta mutasyonlarının tümü (A30P, E46K, A53T) bu bölgede meydana gelmektedir (60). NAC bölgesi, proteinin hidrofobik bölgesidir. İlk olarak Alzehimer hastalarında amiloid beta'ya sekonder ana bileşen olarak tanımlanmıştır. Bu kısım alfa-sinüklein agregatlarının oluşumuna sebep olan kısımdır. C terminal, negatif yüklü kısmıdır. Tyr 123,133,136 ve Ser 129 fosforilasyon bölgelerine sahiptir. (58,60). C terminal kısmı kesilmiş proteinlerde daha fazla agregat oluşumu görülmüştür, bu yüzden bu bölgenin NAC bölgesini engelleyip agregat oluşumunu inhibe ettiği öne sürülmüştür (61).

2.4.2. Alfa-sinüklein ve Parkinson Hastalığı

PH'nın nöropatolojik ayırt edici özelliği alfa-sinüklein proteininin Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri şeklinde anormal bir şekilde birikmesidir (62). Polymeropoulus ve ark. (1997) tarafından α-sini kodlayan *SNCA* genindeki mutasyonun tanımlanması ve proteinin Lewy cisimciklerinin ana bileşeni olduğunun gösterilmesi ile alfa-sinükleinin PH patogenezindeki önemi ilk kez gösterilmiştir (63).

Alfa-sinüklein monomerlerinin oligomerleşmesi ve/veya fibrilleşmesi hastalığın en belirleyici özelliklerinden biridir. Oligomer oluşumu protein monomerlerinin yanlış katlanması sonucunda görülmektedir. Oligomerlere daha çok monomer eklenmesi sonucu fibril oluşumu gerçekleşmektedir ve bu fibrillerin patolojik miktarda birikmesi sonucunda Lewy cisimcikleri oluşmaktadır (64).

Monomerik yapıdaki a-sin proteini toksik değildir (65), reseptör aracılı endositozu teşvik ederek NMDA'nın neden olduğu dopaminerjik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (66). A53T mutasyonu olmayan yabanıl tip (*wild type*) alfa-sinükleinin nöral hücrelerde antiapoptoptik etkiler gösterdiği ve hücreleri oksidatif stresten koruyabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (67).

Alfa-sinükleinin fibril halinde birikmesinin mitokondriyal disfonksiyona, oksidatif strese, endoplazmik retikulum (ER) stresine, otofaji-lizozomal fonksiyonda bozulmalara sebep olarak PH'ndaki dopaminerjik nöronların kaybına yol açtığı bilinmektedir (68).

Fibrillerin oluşmasına, genetik mutasyonlar ve proteinin aşırı ifadelenerek yanlış katlanmaları ve bu yanlış katlanmış proteinlerin temizlenmesini sağlayan protein temizleme mekanizmalarının bozulması sebep olmaktadır (69).

Oligomerik agregatlar daha çok aksonlarda ve presinaptik terminal uçlarında gözlenirken, fibril yapılar LC içinde nöron gövdelerinde bulunmaktadır (64). Alfa-sinüklein agregatları sinaptobrevin-2'ye bağlanarak sinaptik vezikül hareketliliğini ve DA salıverilmesini bozabilmektedir (70, 71). Oligomerler elektron taşıma sisteminin kompleks 1 alt birimini inhibe etmektedir (72). Alfa-sinüklein agregasyonu sonucu ubiquitin-proteazom sistemi ve otofajik süreçler inhibe olmaktadır. Bu süreçlerin bozulması alfa-sinükleinin prion benzeri yayılmasına ve hücresel toksisitenin artmasına sebep olmaktadır (73).

Parkinson hastalarının beyinlerinde SN dışında beynin diğer bölgelerinde de LC oluşumu görülmüştür. Lewy cisimcikleri hastalığın farklı evrelerinde farklı beyin bölgelerinde görülmüştür (74). Braak hipotezine göre patofizyoloji 6 aşamaya ayrılmaktadır; ilk olarak vagus sinirinin dorsal motor nükleusunda ve olfaktör bulbusta, ikinci aşamada locus coeruleus, raphe nükleusu ve retiküler sistemde, üçüncü aşamada bazal ön beyin, amigdala ve SNpc yapıları etkilenirken patoloji mezokorteksten preprontal duyusal assosiyasyon ve premotor alanları kapsayarak neokortekse yayılmaktadır.

Sadece MSS'de değil periferik sinir sisteminde de alfa-sinüklein agregatları görülemektedir. Alfa-sinüklein *pre-formed* fibrillerin pilor ve duedonum kas katmanlarına enjeksiyonunun dopaminerjik nöronlarda ilerleyici dejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (75).

2.4.3. Alfa-sinüklein Pre-formed fibril ile oluşturulan PH modeli

Alfa-sinüklein agragasyonu ile PH patolojisi arasındaki yakın ilişki göz önüne alındığında çeşitli hayvan modelleri üretilmiştir. Bunlar, transgenik modeller, viral vektör aracılı modeller ve α-sin *pre-formed* fibril (PFF) ile oluşturulan modellerdir.

Alfa-sinüklein PFF modelinde fibril intraserebral ya da sistemik olarak enjekte edilebilmektedir (23). PFF'ler belirlenen özel koşullar altında inkübe edilen monomerik

rekombinant α-sin proteinlerinden üretilmektedir (55). Bu monomer ve sonrasında fibrillerin üretilmesi ve kullanılması için *Michael J. Fox Foundation* tarafından özel protokoller geliştirilmiştir (76).

Alfa-sinüklein monomerleri PFF'lere dönüştürüldükten sonra -80°C'de alikotlar halinde saklanmaktadır. Üretilen fibrillerin etkinliği 1,5 yıl kadardır ancak patojenitesi zamanla azalmaktadır. Alfa-sinüklein *pre-formed* fibrili patojen hale getirmek için fibril uygun konsantrasyonda dilue edildikten sonra boyutu yaklaşık 50 nm veya altında olacak şekilde sonike edilmesi gerekmektedir (76).

PFF modeli α-sinin agrege olmasını indüklerken diğer modeller α-sin aşırı ifadelenmesini sağlamaktadır. Bu yüzden PFF modeli viral vektör ve transgenik modellere göre daha fizyolojiktir (77,78). Transgenik modellerde neredeyse hiç nigrostriatal dejenerasyon yoktur. Viral vektör aracılı modeller de kısa bir α-sin birikimine ve hızlı nigrostriatal dejenerasyona sebep olurlar (79).

2.5. Parkinson Hastalığı Tedavi Yöntemleri

PH'ında striatumdaki dopaminerjik-kolinerjik denge, kolinerjik taraf lehine bozulmuştur. Bu sebeple tedavide dopaminerjik etkinliği arttıran, kolinerjik etkinliği azaltan ilaçlar ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır. PH tedavi seçenekleri sınırlıdır. Şu anki mevcut tedavilerin çoğu dopaminin yerine konulması esasına dayanır ve hastalar için yalnızca semptomatik rahatlama sağlamaktadır (80). Semptomlar ilaçlar alındığı sürece düzelir ancak tedavi kesildikten sonra hastalık belirtileri yeniden ortaya çıkmaktadır. Hastalığın ilerlemesinin önlenmesi, durdurulması ve hastalığın altında yatan patolojinin tedavi edilmesi yönündeki araştırmalar devam etmektedir (81). PH için henüz kanıtlanmış nöroprotektif bir tedavi bulunmamaktadır ancak bu alanda yapılan çalışmalar umut vericidir.

2.5.1. Farmakolojik tedaviler

Levodopa: İlk olarak 1960'larda geliştirilmiştir. Tedavide DA öncülü olarak kullanılmaktadır (81). Dopamin KBB'ni geçemediğinden levodopa dopamin prekürsörü olarak kullanılmaktadır. Levodopa etkisini beyinde dopamine çevrilerek göstermektedir. PH tedavisinde altın standarttır, kaybedilen dopaminin yerine koyulması esasına dayanmaktadır.

Levodopa'nın periferde dopamine dönüşmesinin önlenerek beyne daha fazla geçebilmesi için dekarboksilaz inhibitörleri (benserazid, karbidopa) ile birlikte verilebilmektedir (82). Bu sayede periferik dopaminerjik yan tesirler (iştahsızlık, bulantı, kusma, ortostatik hipotansiyon gibi) kısmen engellenmektedir. Uzun süre levodopa tedavisi alan hastalarda doz sonu kötüleşmesi, diskinezi, distoni ve *on-off* fenomeni gibi, ilacın kullanımını sınırlayan motor bozukluklar ve risk değerlendirme yetisinde bozulmalar gibi santral etkiler görülebilmektedir (83).

MAO-B inhibitörleri: Selejilin ve rasajilin DA yıkımından sorumlu monoaminoksidaz-B (MAO-B) enzimini geri-dönüşsüz inhibe etmektedirler (84). Levodopa ile kombine halde kullanıldığında antiparkinson etki artmaktadır. Ayrıca levodopa dozunun azaltılmasına yardımcı olmaktadır (80). Rasajilinin selejiline göre yan tesirleri daha azdır (85). Bunlar arasında, bulantı, ağız kuruluğu, postural hipotansiyon, diskinezide artış, halisünasyonlar, işeme güçlüğü, canlı rüyalar, vb sayılmaktadır. *On-off* olaylarının sıklığını ve şiddetini azaltmaktadır, son doz kötüleşmesini hafifletmektedir. MAO-B inhibitörlerinin nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (84).

Dopamin agonistleri: Dopamin agonistleri PH tedavisinde levodopadan sonraki en güçlü ilaç grubudur. Genç başlangıçlı Parkinson hastalarında levodopa tedavisine başlamayı geciktirmek amacıyla monoterapide ilk seçenek olarak kullanılmaktadır (86). Nigrostriatal nöron kaybını yavaşlattığı gösterilmiştir (87). DA reseptör agonistleri iki ana sınıfta incelenir; bromokriptin, kabergolin, lisurid ve pergolid ergo türevi; apomorfin, piribedil, pramipeksol ve ropinirol ergo-olmayan DA agonistleridir. Genellikle D_2 dopaminerjik reseptör agonistik aktivite ile antiparkinsonik etki gösterimektedir. Hastalıkta görülen motor bozuklukları düzeltici etkileri levodopaya göre daha düşüktür.

Ergo türevi olan DA agonistleri miyokart enfarktüsüne, ciddi psikiyatrik rahatsızlıklara ve kardiyovasküler problemlere neden olabilmektedir. Uzun süreli kullanılmaları sonucunda akciğerde, perikardda ve retroperitoneal alanda fibrozis görülebilmektedir. Ergot-olmayan DA reseptör agonistleri ise bu etkiyi göstermez (88)

Levodopa ile karşılaştırıldığında dopamin agonistlerinin diskineziye neden olma oranı daha düşüktür (84). DA agonistleri uzun yarılanma ömürlerinden dolayı motor dalgalanmaların tedavisinde de etkilidir. Apomorfin subakut enjeksiyon ile *off* dönemlerini

atlatmak için hızlı etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır (89). Levodopaya göre daha fazla yan tesire (uyku hali, ortostatik hipotansiyon, bulantı, eritemin eşlik ettiği ayak bileği ve bacak ödemi) neden olmaktadır (84).

Santral Etkili Antikolinerjikler: Bu gruptaki ilaçlar biperiden, triheksifenidil, benztropin mezilat, bornaprin hidroklorür, dietazin, etoprazin, difenhidramin, klorfenoksamin ve orfenadrindir. Bu ilaçlar dopaminin azalması ile ortaya çıkan striatal dopamin-asetilkolin dengesizliğini düzelterek etki göstermektedirler. Striatumda kolinerjik kavşaklardaki muskarinik tipteki asetilkolin reseptörlerini bloke ederek artmış asetilkolin etkinliğini azaltmaktadırlar. Antikolinerjik ilaçlar özellikle tremora karşı etkilidirler ancak antiparkinson etkileri levodopa ve dopaminerjik reseptör agonistlerine göre daha azdır (84).

En önemli santral yan tesirleri unutkanlık, mental fonksiyonlarda yavaşlama, ajitasyon, halüsinasyonlardır (80). Bellekle ilgili yan tesirleri sebebiyle idiyopatik Parkinson hastalarında tercih edilmezler. Daha çok başlangıç aşamasındaki hafif PH olgularında tercih edilmektedirler. (88). Periferik yan tesirleri arasında ağız kuruluğu, kabızlık, üriner retansiyon, taşikardi, siklopleji, midriyazis, göz içi basıncı artması sayılmaktadır (84).

Katekol-O-metiltransferaz inhibitörleri: Levodopa ile kombine kullanılmaktadırlar. Levodopanın periferde yıkımını engellemektedirler. Bu gruptaki ilaçlar tolkapon ve entakapondur. Hepatotoksik etkisi nedeniyle tolkapon'un kullanımı birçok ülkede kısıtlanmıştır. Levopopa+dopa dekarboksilaz inhibitörü kombinasyon tedavisinin yetersiz olduğu, doz sonu kötüleşmesi gösteren hastalarda kombinasyona ek olarak kullanılmaktadır. Entakapon'un bulantı, kusma, diskinezi, sersemlik, ağız kuruluğu gibi yan tesirleri mevcuttur (88).

Amantadin: Amantadin esas olarak bir antiviral ajandır. Parkinson hastalığındaki etkisi tesadüfen bulunmuştur. Dopaminerjik sinir uçlarından DA salıverilmesini artırmak ve sinaptik aralıktan dopaminin geri-alımını engellemek suretiyle etki göstermektedir. Son yıllarda, NMDA reseptörlerini bloke ederek antiparkinson etkinliğe neden olduğu, özellikle de diskineziyi azalttığı gösterilmiştir. Tek başına kullanıldığında terapötik etkisi kısıtlıdır, bu yüzden levodopa ile kombine halde kullanılmaktadır (80).

Diğer ajanlar

Nikotin: Çeşitli çalışmalarda nikotinin yaşa bağlı oluşan bunamanın önlenmesinde rolü olduğu görülmüştür. Clarke ve ark. nikotinin mezolimbik kortikal nöronlarda DA salıverilmesini artırdığını göstermişlerdir (80). Ayrıca nikotinin nörotrofik fibroblast büyüme faktörü 2 salıverilmesini uyararak substantina nigradaki dopaminerjik nöronlarda nöroprotektif etki oluşturduğu gösterilmiştir (90).

Melatonin: Serbest radikal süpürücü etkiyle antioksidan özellik gösteren melatonin epifiz bezinden salıverilen bir hormondur. Dopaminerjik nöronlarda dejeneratif etki gösteren hidroksil serbest radikallerini azaltmaktadır (91).

İmmünoterapi: Son zamanlarda yaygın olarak kanser tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Kanserdeki immünoterapötik stratejiler bağışıklık sisteminin baskılanmasını en aza indirirken bağışıklık sistemini tümöre karşı bir yanıt oluşturacak şekilde geliştirmektedir (92). Parkinson hastalığında bağışıklık sistemi nörotoksisiteyi şiddetlendiren aktif bir durumdadır ve bağışıklığın baskılanması hastalıkta potansiyel faydalar sağlamaktadır.

Alfa-sinüklein patolojik formları prion benzeri şekilde hareket ederek patolojinin hücreden hücreye yayılmasına sebep olmaktadır. Alfa-sinükleinin bu patolojik yayılımını önlemek üzere α-sin proteinlerine yönelik antikorlar immünoterapötik ajan olarak kullanılabilir (93). Bu bağlamda immünoterapi erken evre Parkinson hastalarının tedavisinde umut vericidir.

Masliah ve ark. (2005) tarafından alfa-sinükleinin patolojik formlarına karşı aşı geliştirilmiştir. Prasinezumab alfa-sinükleinin C terminal bölgesini hedefleyen bir monoklonal antikordur. B11B054 (Biogen) de N terminal bölgesini hedefleyen ve patolojinin oluşmasını engelleyen bir moleküldür (80).

2.5.2. Farmakolojik olmayan tedaviler

Kök hücre tedavisi: PH'nda dejenere olanların yerine DA üreten nöronların transplantasyonu hastalığın tedavisi için umut verici bir yaklaşım olmuştur (80). Günümüzde kemik iliğindeki mezenkimal kök hücreler etkili bir kök hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler tirozin hidroksilaz üreten hücrelere farklılaşabilirler. Bu

yöntemdeki temel sorun transplantasyon sonrası transplante edilen hücrelerin potansiyel tümör oluşturabilme riskidir (94).

Gen tedavisi: Gen tedavisi DA biyosentezine aracılık eden genler aracılığıyla striatumdaki dopamin seviyelerini artırmak için kullanılabilir (81). Gen aktarımını sağlamak için çeşitli viral ve viral olmayan yöntemler mevcuttur (80). Tirozin hidroksilaz ve dopa dekarboksilaz enzimlerini kodlayan genleri içeren gen tedavileriyle ilgili çalışmalar mevcuttur (81).

Derin beyin stimülasyonu: Derin beyin stimülasyonu (DBS), levodopaya iyi yanıt veren ancak levodopanın sebep olduğu yan tesirlerin sorun yaratmaya başladığı PH hastalarında, dopamine bağlı motor semptomların giderilmesinde faydalı olan cerrahi bir tedavidir. DBS, subtalamik çekirdek ve globus pallidus internus dahil olmak üzere subkortikal yapıları uyaran elektrodların cerrahi implantasyonunu içermektedir. DBS ilerlemiş PH hastalarında motor semptomlarda ve dalgalanmalarda önemli gelişmeler sağlamaktadır ancak tremor dışındaki dopamine dirençli semptomlar üzerine etkisi zayıftır (81).

Bir hastaya DBS uygulanabilmesi için en az 5 yıldır PH tanısı almış olması, tedaviye yanıt vermeyen tremoru olması, hastayı zora sokan motor dalgalanmalar ve diskinezinin bulunması, levodopaya ya da dopamin agonistlerine hassasiyeti olması ve hastanın ameliyat için uygun olması gerekmektedir (95).

Bu tedavi cerrahi komplikasyonlara ek olarak kognitif ve nöropsikiyatrik yan tesirlere ve konuşma bozukluğuna neden olabilmektedir (81).

2.6. Brimonidin

Brimonidin tartarat glokom ve oküler hipertansiyon tedavisinde kullanılan, oldukça seçici α_2 adrenerjik reseptör agonisti bir ilaçtır (96).

Glokom: Glokom, retinal ganglion hücresi (RGH) kaybı ile karakterize, multifaktöriyel, optik sinirin nörodejeneratif bir hastalığıdır. Bu hastalığın patogenezinde RGH kaybı, hücre aksonlarının ve somalarının dejenerasyonu, artan gliozis ve mikroglial

hücre aktivasyonunun önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Mikroglial hücreler, nöronların hayatta kalması için yaşamsal rol oynamakla birlikte, bu dengeyi bozan herhangi bir uyarı ile bir dizi nörodejeneratif bozuklukta nedensel faktör olarak da ortaya çıkabilmektedirler. Nöronal sağkalımı risk altına sokabilecek stres koşulları altında mikroglial hücreler aktive olarak hasar gören hücrelerle etkileşime açık hale gelirler (97). Çeşitli çalışmalarda mikrogliaların multiple skleroz, Alzheimer hastalığı, PH gibi nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (98,99). Göz içi basıncını düşüren nöroprotektif tedaviler üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar, hücre ölümüne karşı korumaya odaklanmıştır.

Glokom tedavisinde kullanılan α_2 adrenoseptör agonisti brimonidinin nöroprotektif etki de gösterdiği bildirilmiştir (100). Brimonidinin nöroprotektif özellikleri deney hayvanlarında gösterilmiştir. Ancak, nöroprotektif etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (101). Mevcut bilgilere göre anti—apoptotik BCL-2 ve BCL-XL genlerininin *up-regüle* olmasını sağlamaktadır (102). Glutamat ile indüklenen nörotoksisiteyi inhibe etmektedir (103). Hidrojen peroksid aracılı hücresel hasarı engelleyip hücrenin oksidatif stres kaynaklı apoptozdan korunmasını sağlamaktadır (101). Brimonidinin sıçanlarda anti-apoptotik fosfatidil inositol-3 kinaz (PI3K) ve protein kinaz/Akt yolaklarının aktivasyonu ile nöroprotektif etki sağladığı da bildirilmiştir (104).

RASYONEL: Bu bilgiler ışığında brimonidinin sıçanlarda oluşturulacak geçerli ve güvenilir bir PH modeli üzerinde olası nöroprotektif etkisi aracılığıyla terapötik etki gösterebileceği düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, literatürdeki PH modellerinin kısıtlılıklarını içermeyen, görece daha kısa sürede oluşturulabilecek, geçerli ve güvenilir bir deneysel PH modeli olarak alfa-sinüklein mRNA'sını taşıyan plazmid ve alfa-sinüklein *pre-formed* fibril enjeksiyonun bir ay ara ile ardışık uygulandığı bir model önerilmektedir.

AMAÇ(LAR):

1) Sıçanlarda santral alfa-sinüklein *pre-formed* fibril enjeksiyonu ile yaklaşık 6 ayda oluşturulduğu gösterilen PH sıçan modelinde bu sürecin α-sin mRNA'sını taşıyan plazmid ön uygulaması ile daha kısa sürede oluşma ihtimalini çeşitli davranış deneyleri ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmak,

2) Önerilen yöntemle oluşturulan PH sıçan modeli üzerinde α_2 adrenoseptör agonisti brimonidinin olası nöroprotektif etkisini ve terapötik yararını çeşitli davranış deneyleri ile araştırmaktır.

HİPOTEZ(LER):

Alfa-sinükleinopati ile oluşturulan sıçan PH modelinde;

1) Model α-sin mRNA'sını taşıyan plazmid ön-uygulaması modelin oluşma süresini kısaltır.

2) Brimonidin tedavisi PH belirtilerini düzeltici etki gösterir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışması kapsamındaki deneylerde 4 aylık Sprague-Dawley (SD), 250-300 g ağırlığında, eşit sayıda dişi ve erkek sıçanlar (n=30) kullanıldı. Deneylere Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan izin alındıktan sonra başlandı (proje no: DA20/15, onay tarihi: 14.09.2020). Sıçanlar Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Sıçanlar deneylere başlanmadan 5 gün önce deney ortamına uyum sağlayabilmeleri için deneylerin yapılacağı laboratuvara getirildiler. Deneylerde kullanılan sıçanlar, sabit bağıl nem (%60) ve sıcaklık (22±2 °C), 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü koşulları sağlanan ortamda barındırıldılar. Deney öncesinde ya da deney sırasında herhangi bir yiyecek ve sıvı kısıtlaması yapılmadı, standart sıçan sıçan yemi ve çeşme suyu ile *ad libitum* beslendiler.

3.2. Kullanılan madde ve ilaçlar

Alfa-sinüklein *pre-formed* fibril (Kerafast, EGP018), fosfat tampon çözeltisi tableti (AppliChem, P100C0C), alfa-sinüklein protein kodunu içeren mRNA'yı taşıyan plazmid (Başkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarı), polietilenimin (25 kDa, Sigma-Aldrich), brimonidin tartarat (Vem ilaç Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi'inden bağış olarak alındı).

3.3. Kullanılan Malzeme ve Gereçler

Stereotaksi cihazı (RDW Life Science Co. Ltd), Hamilton enjektörleri (1 µL ve 10 µL), prob sonikatör (Sonopuls, 2 mm) (Şekil 3.1). Davranış testleri Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalınca Başkent Üniversitesi Üretim Araştırma Merkezi bünyesinde oluşturulan Davranış Laboratuvarında gerçekleştirildi. Yatay merdiven testi, rot-a-rod, dikey tel testi için kullanılan ekipmanlar literatüre uygun olarak kendi imkanlarımız ile üretildi.

(A) (B) (C)

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar
(A) Stereotaksi cihazı, (B) Hamilton enjektörleri, (C) Prob sonikatör

3.4. Deney Grupları

Çalışma için kullanılacak olan 4 aylık 30 adet Spraque Dawley (15 dişi, 15 erkek) ırkı sıçanlar rastgele gruplara ayrıldı. Deney grupları;

1-Kontrol grubu (n=6); Herhangi bir uygulama yapılmayan grup

2-Sham grubu (n=6); intraserebroventriküler (icv) fizyolojik tuzlu su (SF; 1 µL, 4 µL) uygulanan grup

3-Alfa-sinüklein grubu (n=6); icv plazmid ve alfa-sinüklein *preformed* fibril uygulanan grup

4-Alfa-sinüklein+brimonidin grubu (n=6); icv plazmid ve alfa-sinüklein *preformed* fibril uygulaması ile başlanan intraperitoneal (i.p.) brimonidin uygulanan grup

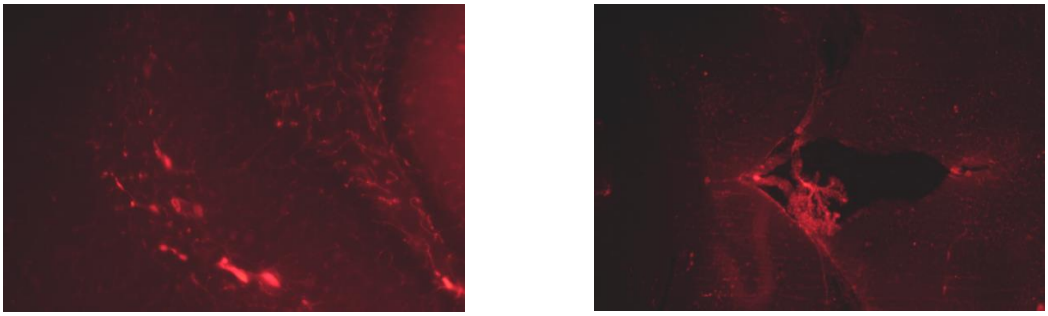
5-Brimonidin grubu (n=6); i.p. brimonidin uygulanan grup

şeklinde oluşturuldu.

3.5. Deney Planı

Yaptığımız ön çalışmada sıçanlara icv plazmid enjeksiyonu ile elde edilen alfa-sinüklein aşırı ifadelenmesi sonucundan yola çıkarak (Şekil 3.2), Alfa-sinüklein ve Alfa-sinüklein+Brimonidin gruplarına plazmid enjeksiyonu ve bundan 4 hafta sonra alfa-sinüklein *preformed* fibril enjeksiyonu yapıldı. Bunu yapmaktaki amacımız sadece fibril enjeksiyonu ile yaklaşık 6 ayda oluştuğu bilinen PH sıçan modelinin daha kısa süre içinde oluşacağı varsayımımızı sınamaktı. Enjeksiyonların ardından 2. ve 4. aylarda davranış

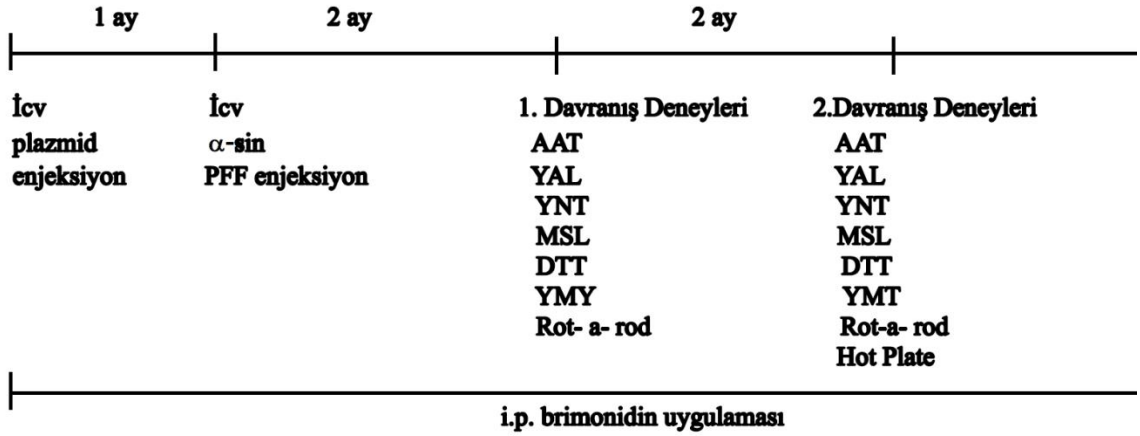
testleri gerçekleştirildi. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubundaki sıçanlara icv enjeksiyonun ilk gününden başlayarak beyinlerin izole edilmesine kadarki süre boyunca alfa-sinüklein aşırı ifadelenmesine bağlı olarak oluşabilecek nöronal kayıpları önleyeceği/azaltacağı varsayımını kurduğumuz alfa 2 adrenoseptör agonisti brimonidin tedavisi uygulandı (Şekil 3.3).



(A) (B)

Şekil 3.2. Plazmid enjeksiyonu sonrası immunohistokimyasal boyama ile alfa-sinüklein aşırı ifadesinin floresan mikroskopu ile gösterimi.
(A) Hipokampüs, (B) Lateral ventrikül; kırmızı: a-sinüklein ifadelenmesi (Cy3 işaretli anti-mouse sekonder antikor) (x4 büyütme).

Cerrahi girişimin, icv enjeksiyonun ve ilacın tek başına oluşturabileceği etkileri görebilmek için Sham ve Brimonidin grupları çalışmaya ilk ön-deneylerin başlamasından 7 ay sonra dahil edildi ve bu gruplar da tümüyle aynı deneysel tasarıma tabi tutuldu. Davranış testleri tüm gruplarda 2. ve 4. aylarda gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Deney protokolü akış şeması.
AAT; Açık alan testi, YAL; Yükseltilmiş artı labirent testi, YNT; Yeni nesne tanıma testi, MSL; Morris su labirenti testi, DTT; Dikey tele tutunma testi, YMY; Yatay merdivende yürüme testi

3.6. Plazmid enjeksiyonunun hazırlanması

Alfa-sinüklein proteinini kodlayan mRNA'yı taşıyan plazmid örneği kağıda emdirilmiş halde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilerek Başkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında çoğaltıldı. Plazmid çoğaltılması aşağıda belirtilen prosedüre uygun olarak yapılmıştır:

Kompetan hücre hazırlama

Hücre: *E. coli* DH5α

Solüsyonlar:

- Sıvı besiyeri NB/LB
- 50mM CaCl2 (steril, otoklav)
- Gliserol (steril, otoklav)

NOT: Protokol buz üstünde çalışıldı.

Protokol

1. *E. coli* hücreleri sıvı besiyerinde 37°C'de gece boyunca inkübe edildi.
2. Taze kültürden 0,3mL, 30 mL besiyerine alınarak 37°C'de inkübe edildi.
3. Her bir saat aralığında sıvı besiyerine karşı 600nm'de spektrofotometrik ölçüm al ındı.
4. OD600: 0.3-0.4 absorbans değeri elde edilene kadar inkübasyona devam edildi.
5. Kültür 15 dakika buzda bekletildi.
6. 4100 rpm, 4°C 12 dakika santrifüjleme yapılır ve süpernatan atıldı.
7. Pellete 3mL soğuk CaCl2 (50mM) eklenerek çözülür ve 30 dakika buzda bekletildi.
8. 4100 rpm, 4°C 12 dakika santrifüjleme yapılır ve süpernatan atıldı.
9. Pellet 510uL CaCl2 (50mM) içerisinde çözüldü.
10. Hücre süspansiyonuna 90uL steril gliserol eklenir ve hücre süspansiyonu 50uL (ya da 100uL) olarak 1,5mL'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Tüpler kısa dönem -20°C'de saklandı. Daha uzun süreli stoklamalar -80°C'de saklanıldı. Çözdürülen hücreler yeniden dondurulmaz.

Transformasyon

Plazmidler, plazmidlerin amplikasyonu için kompetan hücrelere aktarıldı.

- Plazmid stokları 100 ng/µL olarak seyriltildi.
- Seyreltilmiş plazmidin 1 µL'si 1,5 mL Eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 50 µL kompetan hücre eklendi.
- Buna ek olarak, kompetan hücrelerdeki kontaminasyonu kontrol etmek için negatif kontrol olarak başka bir Eppendorf tüpüne sadece 50 µL kompetan hücre konuldu.
- Tüpler buz üzerinde 15 dakika, daha sonra 42°C'de 90 saniye ve tekrar buz üzerinde 2 dakika inkübe edildi.
- Tüplere 950 µL *Luria-Bertoni Broth* (LB) ortamı eklendi. Tüpler 37°C'de 180 rpm'de bir saat boyunca çalkalandı.
- 200 µL karışım, LB agar plakaları içeren ampisilin üzerine yayıldı. Plakalar 37°C'de gece boyunca inkübe edildi.

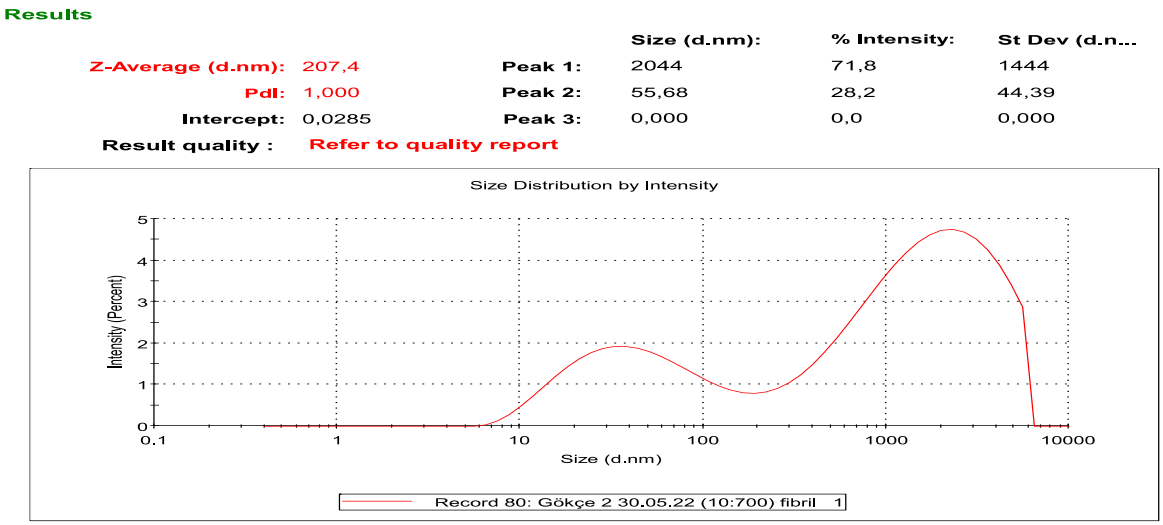
Plazmid İzolasyonu

- Agar plakalarında büyüyen bakteri kolonilerinden tek koloni seçildi ve ampisilin içeren 150 mL LB *Broth* içerisinde gece boyunca çalkalıyıcı'da 37°C'de büyütüldü. Hücreler santrifüjle çöktürülerek toplandı.

Derişimi 130 ng/µL olarak hazırlanan plazmid kullanım zamanına kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. İlgili literatürden yararlanarak, plazmid enjeksiyon öncesinde lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı olan polietilenimin (PEİ) ile kaplanarak verildi (105). Bunun için 0,1 M taze stok PEİ çözeltisi hazırlandı. 0,1 M stok PEİ çözeltisi için 45 mg 25-kD PEİ 8 mL distile su içinde seyreltildi. pH 7 olana kadar 1 N HCL eklenerek titre edildikten sonra distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak filtreden geçirildi (0,2 µm Millipore) (106).

3.7. Alfa-sinüklein Pre-formed Fibril Hazırlanması

Alfa-sinüklein PFF, kullanılanacağı güne kadar alikotlar içinde -80 ºC sıcaklıkta muhafaza edildi, kullanım gününde -80 ºC derin dondurucudan çıkartılarak üretici firmanın önerilerine ve literatür bilgilerine göre taze olarak hazırlandı. Bu işlemler sırasında öncelikli olarak kişisel koruyucu tedbirler alındı. Bunun için çift kat eldiven, kolları lastikli cerrahi önlük, deney gözlüğü ve çift kat cerrahi maske kullanıldı. Oda sıcaklığındaki alikot içinde fosfat tampon çözeltisi ile seyreltilerek istenilen 2 µg/µL konsantrasyonunda hazırlanan alfa-sinüklein *pre-formed* fibril çözeltisi hızlıca sonike edildi. Sonikasyon işlemi, ön-denemelerimiz sonucunda optimize edilen parametrelerle (%40 amplitüd, 60 saniye atış -1 sn açık, 1 sn kapalı-, 20 tekrar) prob sonikatör kullanılarak buz üzerinde yapıldı. Sonikasyon sonucu alfa-sinüklein *pre-formed* fibril boyutu *zetasizer* ile ölçüldü (Şekil 3.4). Sonikatör, başka proteinlerle kontaminasyonu önlemek için kullanılmadan önce her seferinde %70 etil alkol ile iyice temizlendi.



Şekil 3.4. Sonikasyon sonrası alfa-sinüklein *pre-formed* fibril boyutlarının zeta potansiyeli (*zetasizer)* ölçüm sonucunu gösterir örnek trase.
Yatay eksen: Boyut (nm), Dikey eksen: Yüzde (%).

3.8. Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması

PH modeli sıçanlara stereotaksik olarak icv yoldan dört hafta arayla, sırasıyla plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile oluşturuldu. α-sin proteini kodunu içeren mRNA'yı taşıyan plazmid Başkent Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında üretildi.

3.8.1. Stereotaksik cerrahi

Sıçanlar ketamin (70-80 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (7-8 mg/kg, i.p.) anestezisi altında, cerrahi saha arıtımı yapıldıktan ve derin anesteziye ulaşıldığı pençe kıstırma testi ile kontrol edildikten sonra stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Kafa derisi batikon ile temizlenip tıraş edildi. Kafa derisi açıldı, *cranium* eküvyon çubukları ile nazikçe etraf dokudan temizlendi, bregma noktası bulundu. İntraserebroventriküler enjeksiyon için Paxinos sıçan beyin atlasında belirtilen koordinatlar (AP -1,3; ML 1,5) stereotaksik olarak ayarlandı. Belirlenen noktada uygun matkap ucu ve motorlu *drill* ile 1-2 mm bir delik açılarak duramatere ulaşıldı. Stereotaksik aparata monte edilen bir Hamilton enjektörü (1 µL) vasıtasıyla açılan delikten (*burr-hole*) girilerek, tanımlanan derinliğe (DV -4,7) inildi. Hamilton enjektörüne yüklenen 0,44 µL plazmid ve 0,36 µL 0,1M PEİ üç dakika içinde yavaşça enjekte edildi, ardından bu pozisyonda üç dakika tutulduktan sonra iğne ventrikül içinden yine yavaşça çıkarıldı. Açılan delik diş akriliği ile kapatıldı ve kafa derisi 3/0 cerrahi iplik ile dikilerek kapatıldı. Dört hafta sonra, aynı stereotaksik koordinatlar kullanılarak 4 µL alfa-sinüklein *pre-formed* fibril enjeksiyonu yapıldı (2 µg/µL). Bunun için sıçanlar, ketamin (70-80 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (7-8 mg/kg, i.p.) anestezisi altında, cerrahi saha arıtımı yapıldıktan ve derin anesteziye ulaşıldığı pençe kıstırma testi ile kontrol edildikten sonra stereotaksik çerçeveye yerleştirildi ve uygun koordinat belirlendi. Kafa derisi açılıp daha önceki plazmid enjeksiyonu sırasında açılan delik üzerindeki akrilik tıpa dikkatli bir şekilde kaldırılarak alfa sinüklein PFF enjeksiyonu yapıldı. Fibril enjeksiyonu yapılırken, önceki çalışmalarda yapılan öneriler göz önüne alınarak, Hamilton enjektörünün ucuna, fibril yapışmasını önlemek amacıyla cam kapiller eklendi (Şekil 3.5) ve enjeksiyonlar cam kapiller aracılığıyla yapıldı. Enjeksiyon üç dakika içinde yavaşça yapıldı, ardından cam kapiller uç üç dakika boyunca ventrikül içinde bu pozisyonda bekletildikten sonra yine yavaşça çıkarıldı. Açılan delik diş akriliği ile kapatıldı ve kafa derisi 3/0 cerrahi iplik ile dikilerek kapatıldı.

Her iki icv enjeksiyon girişiminde de sıçanlara postoperatif olarak 1 mL subkutan (s.c.) serum fizyolojik (SF) çözeltisi verildi ve hayvanlar anestezinin etkisi geçene kadar ısıtıcı altında tutuldu. Cerrahi işlem sırasında ve anesteziden derlenene kadar kornealarında kuruma olmaması için göz üzerine belirli aralıklarla SF damlatıldı.

Şekil 3.5. Cam kapiller tüp ile enjeksiyona hazır hale getirilmiş Hamilton enjektörü

3.9. Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Uygulanması

Sıçanlara icv enjeksiyonun gerçekleştirildiği günden itibaren başlanarak, davranış deneylerinin sonuna kadar i.p. brimonidin enjekte edilerek etkisi değerlendirildi. Brimonidin distile su içinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı ve 1 mg/kg/gün dozunda ip yoldan uygulandı. Enjeksiyonlar bir gün sağ, bir gün sol alt abdominal kadrandan yapıldı.

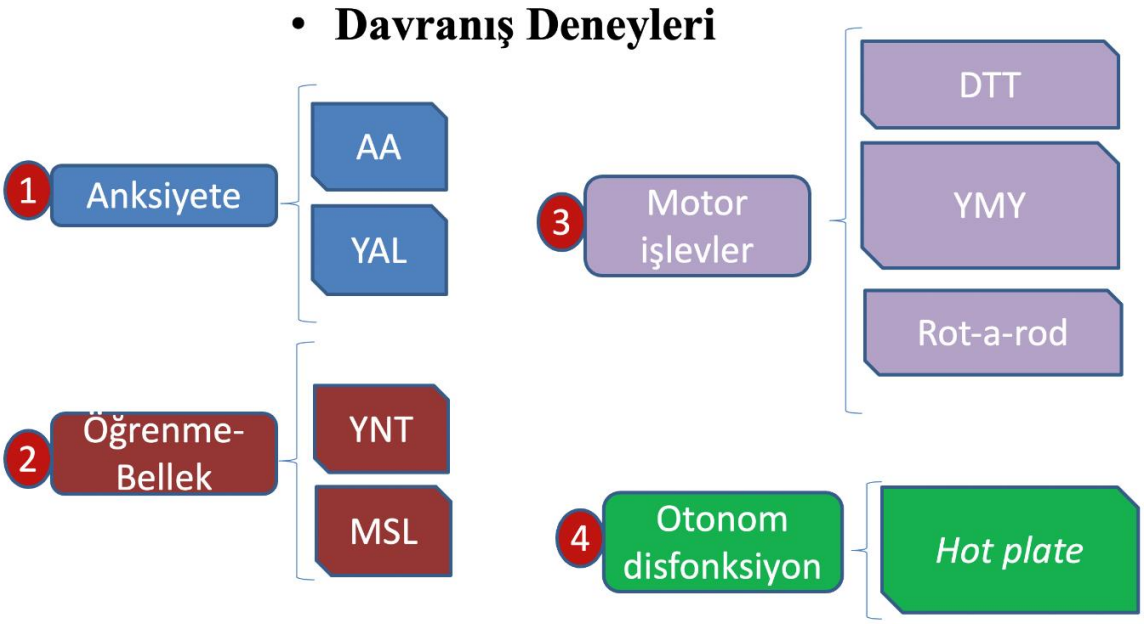
3.10. Davranış Deneyleri

Bütün sıçanlara α-sin aşırı ifadesine bağlı oluşan patolojinin motor ve non-motor işlevler üzerine etkisinin incelenmesi için davranış deneyleri yapıldı. Sıçanlar ortama alışmaları için deneye başlamadan 1 saat önce deneyin yapılacağı odaya getirildi.

İntraserebroventriküler plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu yapıldıktan sonra patolojinin oluşması için α-sin aşırı ifadelenmesi gerekmektedir. Bunun için sadece *pre-formed* fibril enjeksiyonu yapılan sıçan çalışmalarda bu sürenin 180 güne kadar uzayabildiği gösterilmiştir. Ancak bir çalışmada adeno ilişkili viral vektör (AAV) aracılı α-sin enjeksiyonu ile kombine olarak *pre-formed* fibril uygulanmasıyla patolojinin 30 gün sonra oluşabildiği göstermiştir (107). Bu çalışmadan yola çıkarak davranış deneylerine enjeksiyonlardan bir ay sonra başlanmasına karar verildi. Ancak deneylerin yapılacağı araştırma merkezinin taşınmasından dolayı deneylere enjeksiyondan 2 ay sonra başlanabildi.

Zamana bağlı değişimi görebilmek için deneyler aynı sıra ile enjeksiyondan 4 ay sonra tekrarlandı.

Anksiyetenin değerlendirilmesi için açık alan testi (AA), yükseltilmiş artı labirent testi (YAL); öğrenme-bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için yeni nesne tanıma testi (YNT), Morris su labirenti testi (MSL); motor koordinasyonun değerlendirilmesi için dikey tele tutunma testi (DTT), yatay merdivende yürüme testi (YMY), rot-a-rod; otonomik disfonksiyonun değerlendirlmesi için de *hot plate* testi yapılmıştır (Şekil 3.6).

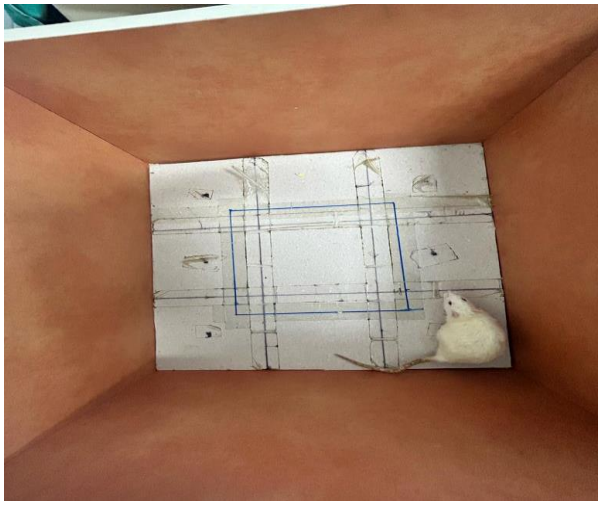


Şekil 3.6. Davranış testlerinin şematik gösterimi

3.10.1. Açık alan (AA) testi

Üstü açık küp şeklinde, 50x50x40 cm boyutlarında, şeffaf olmayan malzemeden üretilmiş bir düzenek kullanılarak yapılan ve yine anksiyete durumunu değerlendirmek için kullanılan bir testtir (Şekil 3.7). AA testinde sıçanlar bu düzeneğin orta bölgesine bırakılırlar ve davranışları değerlendirilir (108). Hayvanın anksiyete düzeyi düştükçe orta alanda geçirdiği zaman ve hareketliliği artmaktadır. AA testi 2 gün sürmektedir. Alıştırma amacı taşıyan ilk gün, sıçanlar 30 sn boyunca açık alana kondular. Asıl test ikinci gün gerçekleştirildi ve sıçanlar AA düzeneğinde 5 dakika süre ile değerlendirildi (109). Test kamera ile kaydedildi ve orta alanda geçirilen süre kronometre ile tespit edildi. Her sıçandan

sonra koku ipuçlarından arındırmak için düzenek önce %70 etanol, ardından su ile ıslatılmış bezler ile silindi ve kuru bez ile kurulandı.



Şekil 3.7. Açık alan düzeneği

3.10.2. Yükseltilmiş artı labirent (YAL) testi

Gruplar arasındaki anksiyete düzeyindeki farklılıklar YAL düzeneğinde değerlendirildi. YAL yerden 100 cm yükseklikte, artı şeklinde, 2 adet karşılıklı açık, 2 adet karşılıklı kapalı kolu ve ortada açık bir santral alanı olan bir düzenektir. Kapalı kollar 40 cm yüksekliğinde duvarlar ile çevrilidir. Kolların genişliği 10 cm'dir ve açık kollarda kayıp düşmeyi engellemek için dış kenarlarda 0,5 cm'lik çıkıntılar mevcuttur. Test için karanlık ortamda açık kollar aydınlatıldı. Düzenek tavana monte edilmiş bir kamera sistemi aracılığıyla izlendi ve kaydedildi. Deney sırasında sıçanlar tek tek yüksetilmiş artı labirentin orta noktasına yüzleri kapalı kollardan birine dönük olacak şekilde bırakıldı. Deney süresi 180 saniye olarak belirlendi. Her sıçandan sonra koku ipuçlarından arındırmak için düzenek önce %70 etanol, ardından su ile ıslatılmış bezler ile silindi ve kuru bez ile kurulandı. Hayvanların açık kolda daha fazla vakit geçirmeleri ve/veya kollar arasında sıkça geçiş yapmaları anksiyete düzeylerinin düşük olduğu, kapalı kollarda daha fazla vakit geçirmeleri ve/veya hareketsiz kalmaları ise anksiyete düzeylerinin yüksek olduğu yönünde değerlendirildi (Şekil 3.8).

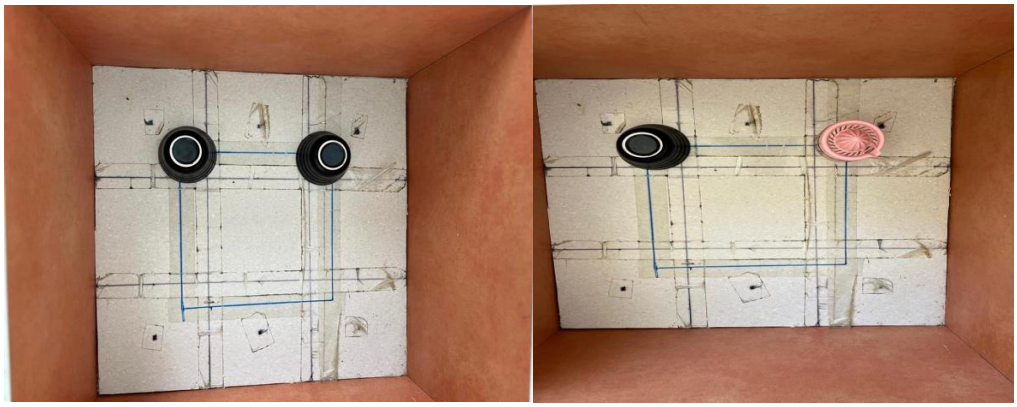
(A) (B)

Şekil 3.8. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği:
(A) Karşıdan, (B) Üstten

3.10.3. Yeni nesne tanıma (YNT) testi

YNT testi 50x50x40 cm boyutlarında üstü açık, ahşap bir kutudan oluşan bir düzeneğin kullanıldığı bir bellek testidir ve özellikle prefrontal korteks işlevinin değerlendirilmesine olanak verir. Test, kemirgenlerin spontan olarak yeni karşılaştıkları nesneler ile ilgilenme eğilimlerinin daha önceden tanıdıkları nesnelere oranla daha fazla olduğu gözlemi esas alınarak geliştirilmiştir (110). Yeni nesne ile daha çok ilgilenme tercihi öğrenme ve anımsama performansını yansıtan bir ölçüttür. Kullanılan nesneler benzer boyutlarda olup, çok karmaşık olmayan basit nesneler olması tercih edildi. Sıçanların kırmızı-yeşil renk körü olması nedeniyle, nesne seçiminde bu renklerin kullanılmasından özellikle kaçınıldı ve birbirinin eşi olan iki adet siyah nesne ve farklı şekil ve renkteki (pembe) bir adet nesne kullanıldı (Şekil 3.9). Nesneler düzeneğin kuzey yöndeki köşelerine yerleştirildi. İlk gün sıçanlar düzeneğe alışmaları için boş kutuya konularak 5 dakika zaman geçirmelerine izin verildi. İkinci gün yapılan tanıtma aşamasında birbirinin eşi olan 2 adet siyah nesneyi keşfetmeleri ve tanımaları için sıçanlara 10 dakika süre tanındı, bu aşama duvara sabitlenmiş bir kamera aracılığıyla kaydedildi. Tanıtma aşamasından 24 saat sonra siyah nesnelerden birisi düzenekten çıkartılarak yerine pembe renkli yeni nesne yerleştirildi. Test aşamasında nesnelerin konumlarında bir değişiklik yapılmadı ve sıçanlara yine 10 dakika süre tanındı. Her sıçanın nesnelerle ilgilenme davranışı (nesneye temas etmek, nesneyi koklamak, nesnenin üstüne tırmanma çabası) kamera aracılığıyla kaydedildi. Analiz sırasında her deney hayvanının yeni nesne ile göreceli ilgilenme oranı diskriminasyon indeksi formülü kullanılarak hesaplandı ([Yeni nesne ile ilgilenme süresi / Yeni ve Eski nesnelerle toplam ilgilenme süresi] x 100).

Tüm denemelerde her sıçandan sonra koku ipuçlarından arındırmak için düzenek önce %70 etanol, ardından su ile ıslatılmış bezler ile silindi ve kuru bez ile kurulandı.



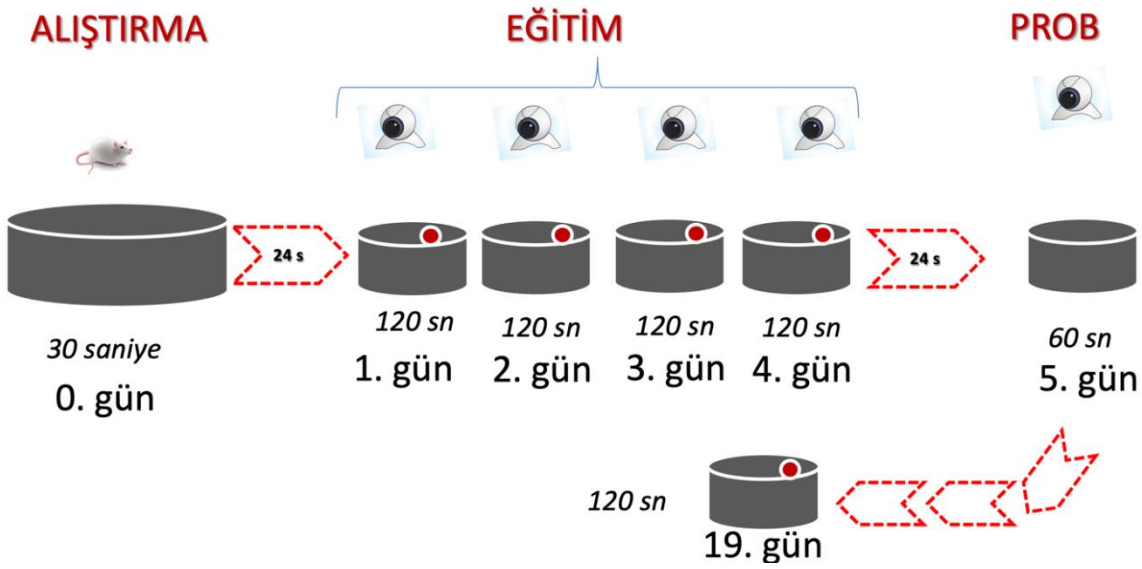
Şekil 3.9. Yeni nesne tanıma testi düzeneği

3.10.4. Morris su labirenti (MSL) testi

Özellikle hipokampal işlevin göstergesi olan uzaysal öğrenme-bellek performansını değerlendirmek için geliştirilen bir yöntem olan MSL 120 cm çapında, 60 cm yükseklikte, içinde 50 cm derinlikte su bulunan içi-dışı tamamen siyaha boyanmış silindir şeklinde bir düzenektir. MSL içerisine yerleştirilen 14 cm çapındaki kaçış platformu su seviyesinin 2 cm altındadır (Şekil 3.10).

Şekil 3.10. Morris su labirenti test düzeneği

Deney esnasında havuz suyu sıcaklığı 22±2°C olacak şekilde sabit tutuldu. Havuzun etrafındaki 4 duvara sıçanların oriyante olmalarına yardımcı olmak için farklı renk, şekil ve sayıda görsel ipuçları yerleştirildi. Test esnasında havuz çevresi alttan aydınlatıldı. Sıçanlar test sırasında, tavana monte edilmiş bir kamera aracılığı ile başka bir odadaki bilgisayar monitöründen izlendi ve görüntüler kaydedildi. Test başlamadan bir gün önce hayvanlar ilk kez su ile karşılaşacakları için düzeneğe alışmaları amacıyla 30 saniye boyunca havuzda yüzdürüldü. Alıştırma gününü takiben dört ardışık gün eğitim, beşinci gün de prob deneyi yapıldı. Eğitim protokolü için sağ alt kadranın orta hattında, havuz duvarından 35 cm uzaklığa kaçış platformu yerleştirildi. Prob deneyine kadar kaçış platformunun yeri sabit bırakıldı. Eğitim sürecinde sıçanlar yüzleri havuz duvarına bakacak şekilde her gün farklı bir kadrandan başlamak koşuluyla 4 farklı kadrandan nazikçe havuza bırakıldı. Bu işlem gün içerisinde 4 defa tekrarlandı. Her seansta *cut-off* süresi 120 saniye olarak belirlendi. Bu süre içinde kaçış platformunu bulamayan sıçanlar el ile nazikçe platforma yönlendirildi ve etraftaki görsel ipuçlarına oriyante olmaları amacıyla platform üzerinde 15 saniye tutuldu, ardından platformdan alınarak kurulandı ve sıraları gelince diğer kadranlardan tekrar suya bırakılıncaya kadar sıcak bir ortamda kendi kafesleri içinde tutuldu (111). Sonuçlar için her hayvanın günlük her dört kadrandan havuza bırakılmaları ile platformu bulmak için geçirdikleri ortalama süre (latans) hesaplandı. Dört günün sonunda, sonuçlar grafik olarak kaçış latansındaki gelişme olarak gösterildi. Dört günlük eğitimden sonra prob deneyi için kaçış platformu havuzdan çıkartıldı. Prob deneyinde izlem süresi 60 saniye ile kısıtlandı ve tek bir kadrandan, bir sefer olacak şekilde yapıldı. Prob deneyinde amaç, eğitim döneminde kaçış platformunun yerinin ne kadar iyi öğrenildiğinin ve anımsandığının saptanmasıdır. Deneyin bu aşamasında, deney hayvanlarının kaçış platformunun bulunduğu kadrana ilk giriş zamanı ve o kadranda geçirdiği göreceli süre oranı değerlendirildi. İzlem aşaması video kaydı üzerinden havuzun sadece ilgilenilen alanı görünür hale getirilerek gerçekleştirildi. Presipitasyon belleği performansını değerlendirmek amacıyla yapılan retansiyon seansı 14 gün sonra gerçekleştirildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Morris su labirenti testi protokolünün şematik gösterimi.

3.10.5. Dikey tele tutunma testi

Sıçanlardaki katalepsi benzeri donakalma davranışını değerlendirmek için dikey tele tutunma testi yapıldı (112). Bu testte her bir hayvan tele 4 pençesi ile tutunacak şekilde nazikçe yerleştirildi ve kronometre çalıştırıldı. Sıçan teldeki pençelerinden birini çektiği anda kronometre durduruldu ve bu süre kaydedildi (Şekil 3.12).

Şekil 3.12. Dikey tele tutunma testi düzeneği

3.10.6. Yatay merdivende yürüme (YMY) testi

Test düzeneği, ardışık basamaklar arasındaki mesafenin birbirinden farklı olacak şekilde düzenlendiği, ahşap malzemeden üretilmiş, 100 cm uzunluğundaki yatay bir merdiven kullanılarak gerçekleştirildi. Test aşamasından önce sıçanlar 4 gün boyunca düzeneğe alıştırıldı. Yürümedikleri zaman el ile nazikçe yönlendirildi. Alıştırma aşamasından başlanarak, düzenek, merdivenin sonu, sıçanların kafeslerine kendiliğinden girmelerine olanak sağlayacak şekilde kafesle bütünleşik biçimde tasarlandı. Düzenek bir sallanan platform (LAB-LINE, MAXI ROCKER-463) üzerine yerleştirilerek uygulama 3 farklı motor hızında (yavaş, orta, hızlı; sırasıyla, 20-30-40 rpm) tekrarlandı (Şekil 3.13). Ön denemelerde 30 ve 40 rpm ile yapılan deneylerde gruplar arasında yeterli ayırt ediciliğin saptanamaması ve bunun tutarlı biçimde yinelemesi nedeniyle asıl deneylerde 20 rpm hız esas alındı. Test günü sıçanlar teker teker düzenek üzerinde başlangıç noktasından bitiş noktasına yürütüldü, tüm süreç kamera ile izlendi ve kayıt altına alındı. Kamera kayıtları izlenerek merdiven üzerinde sıçanların yürüme sırasında yaptıkları hatalar değerlendirildi ve platformu bitirme süreleri ve hızları saptandı. Basamaklara pençe yerleştirme hataları; hafif kayma, derin kayma, boşa basma şeklinde kategorik olarak skorlandı (113).

Hafif kayma (1 puan): hayvanın pençesini bir basamağa yerleştirirken kayması ancak yürüyüşün bozulmaması

Derin kayma (2 puan): hayvanın pençesini bir basamağa yerleştirirken kayması ve yürüyüşün bozulması

Boşa basma (3 puan): hayvanın pençesinin bir basamağı tamamen kaçırarak yürüyüşünü bozacak şekilde boşluğa basması

şeklinde değerlendirildi.

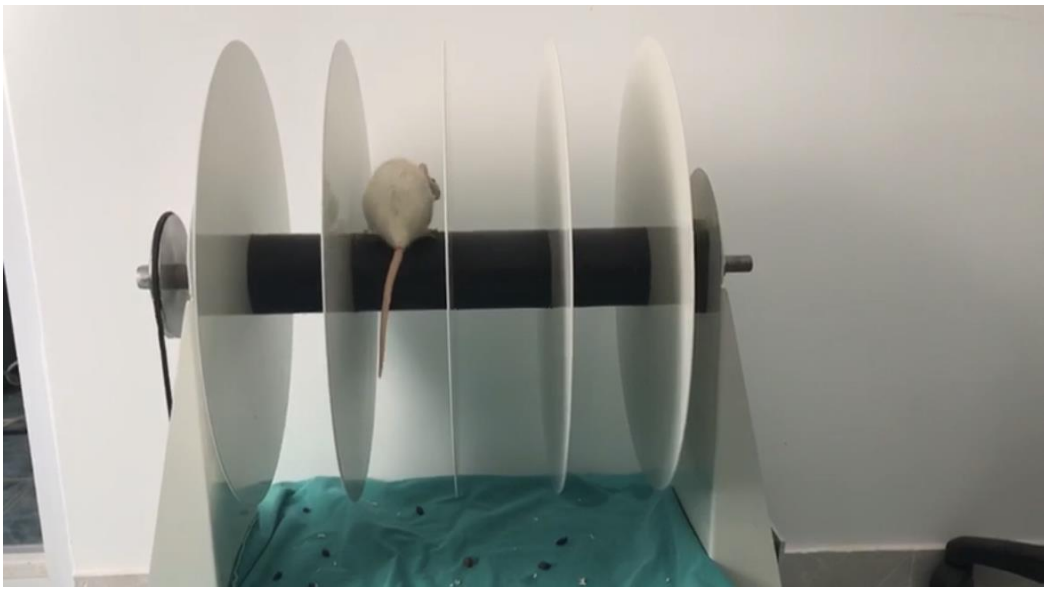
Her sıçandan sonra koku ipuçlarından arındırmak için düzenek önce %70 etanol, ardından su ile ıslatılmış bezler ile silindi ve kuru bez ile kurulandı.

Şekil 3.13. Yatay merdivende yürüme testi düzeneği

3.10.7. Rot-a-rod testi

Bir doğru akım motoru aracılığıyla belli bir hızda döndürülen bir milin üzerine yerleştirilen sıçanların mil üzerinde ne kadar süre düşmeden kalabildiği saptanarak motor koordinasyon ve motor öğrenme performansları test edildi. Cihaz, aynı anda dört sıçanın deneye alınmasına olanak verecek şekilde, her biri 10 cm aralığında 4 bölmeden (kulvar) oluşur. Her kulvar 40 cm çapında, plak şeklinde bölmeler ile birbirinden ayrıldı (Şekil 3.14). İlk 3 gün hayvanların mil üzerinde durmaya alışmaları için 5 rpm dönme hızında 10 dk ara ile dörder deneme yapıldı. Hayvanların dengede kalabilmeleri için yüzleri dönüş yönünün tersine bakacak şekilde milin üzerine yerleştirildi. 4. gün iki deneme 5 rpm hızda, iki deneme de test aşamasında uygulanacak olan 16 rpm hızda yapıldı (114).

Test günü, sıçanlar 16 rpm hızda dönen mil üzerine yerleştirildi. Her sıçan her biri 60 saniye olacak şekilde toplamda 3 kez rot-a-rod üzerinde yürütüldü ve tüm süreç kamera aracılığıyla kaydedildi. Kamera kayıtları izlenerek sıçanların düşme latansları kronometre ile ölçüldü. Tüm denemelerde her sıçandan sonra koku ipuçlarından arındırmak için düzenek önce %70 etanol, ardından su ile ıslatılmış bezler ile silindi ve kuru bez ile kurulandı.



Şekil 3.14. Rot-a-rod motor koordinasyon ve öğrenme testi cihazı

3.10.8. *Hot plate*

Test deney hayvanının, şeffaf bir silindir içinde, önceden ısıtılmış bir zemin üzerine bırakılması ile gerçekleştirildi. (Şekil 3.15). Zemin sıcaklığı 52-55°C olacak şekilde sabit tutuldu. Sıçanın sıcak zemine temas ettikten ne kadar süre sonra sıcaklıktan rahatsız olup pençesini yalaması/kaldırması/zıplaması için geçen süre kaydedildi. Hayvanın yaralanma riskini azaltmak için sıcak zemin üzerinde tutulma süresi maksimum 30 saniye olacak şekilde kısıtlandı (115).

Şekil 3.15. Hot plate test düzeneği

3.11. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) programının deneme sürümü kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edildi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk test ile test edildi. Tekrarlı ölçümlerin analizi çift yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey'in ya da Sidak'ın post-*hoc* çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren, tekrarlı olmayan ölçümler gruplar arasında tek yönlü ANOVA ve ardından uygulanan post-*hoc* Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel önem derecesi olarak belirlenen $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Tüm deneysel süreç içinde 2 hayvan kaybı gerçekleşti, bu da bazı davranış deneylerinde gruplardaki sıçan sayısının farklı olmasına yol açtı.

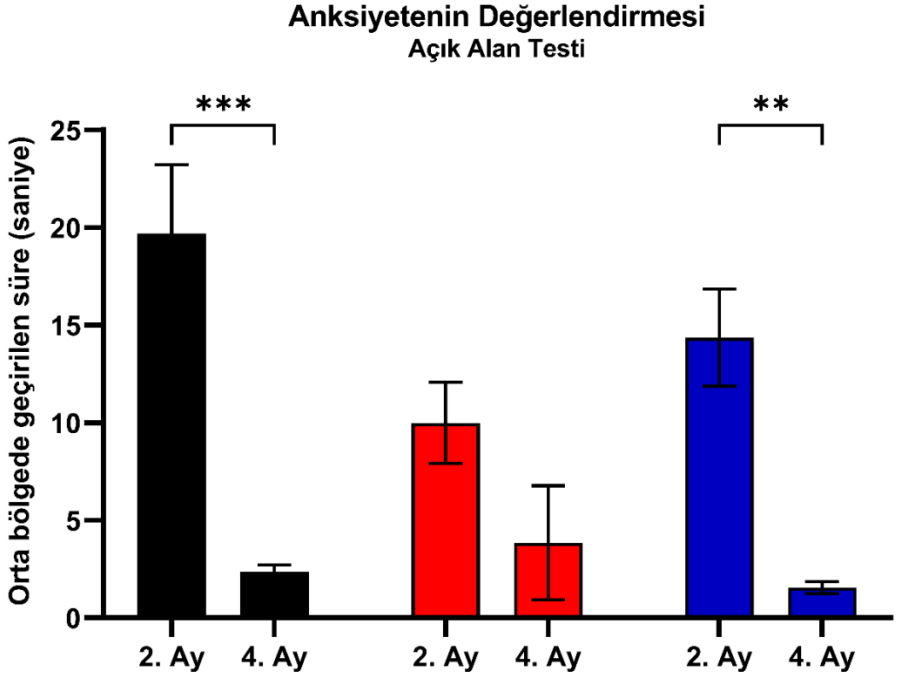
4. BULGULAR

4.1. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Anksiyete Üzerine Etkisi

İcv plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile oluşturulan PH modelinde brimonidinin anksiyete üzerine etkisi AA ve YAL testleri ile değerlendirildi.

4.1.1. Açık alan testi

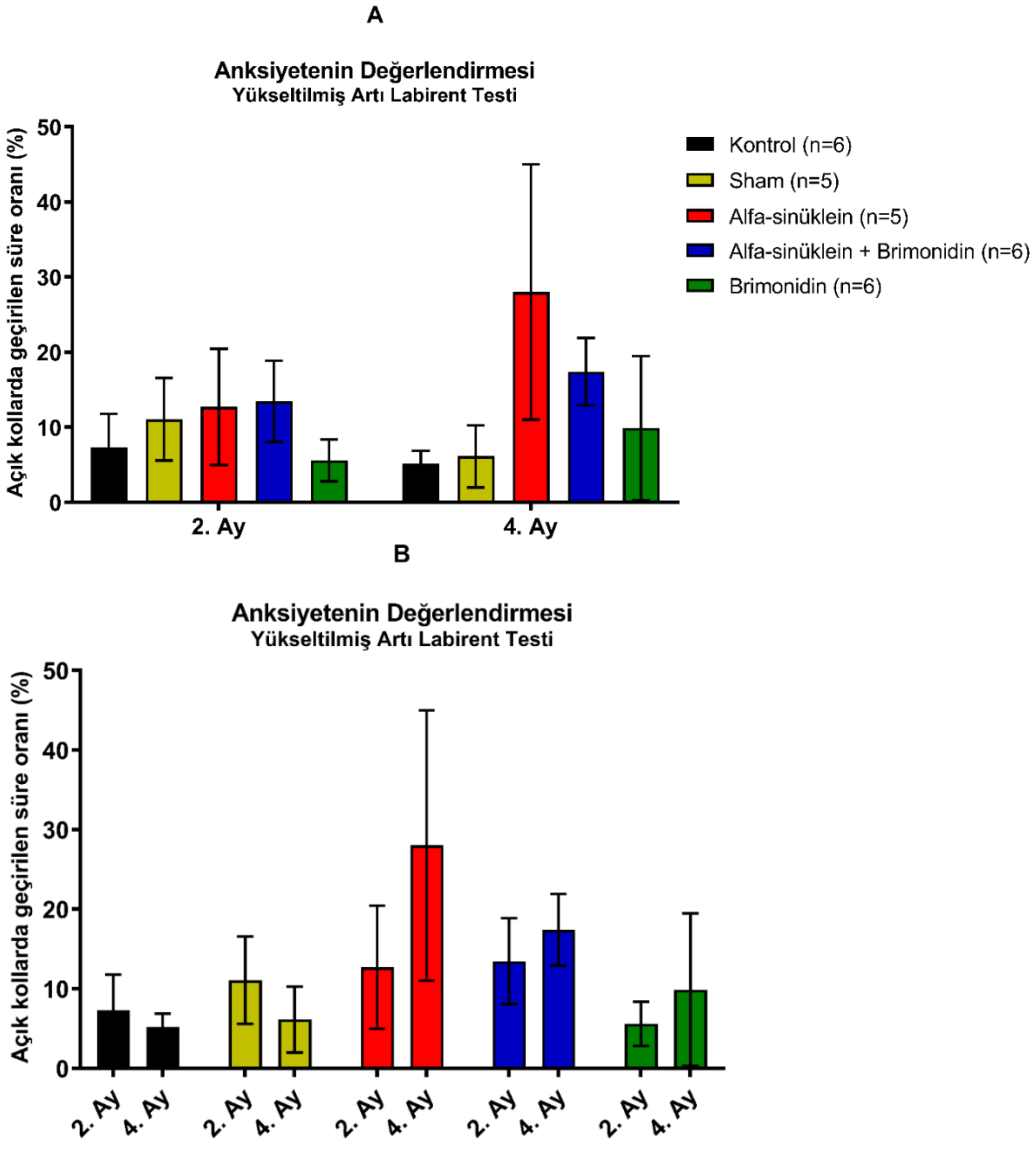
Açık alan testinde 2. ayda Kontrol grubu, Alfa-sinüklein grubuna göre orta alanda daha çok zaman geçirdi. Bu durum, Alfa-sinüklein grubundaki sıçanlarda anksiyetenin arttığı yönünde değerlendirildi. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunda, Alfa-sinüklein grubundaki sıçanlarda artmış olan anksiyetenin azalmadığı saptandı. Ancak 4. ayda gruplar arasında anksiyete bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Açık alan testi ile anksiyetenin değerlendirilmesi.
Orta bölgede geçirilen süre, gruplara ait ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) hata çubukları şeklinde saniye olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında P=0,2237; iki yönlü varyans analizi. * P<0,05; *post-hoc* test olarak gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesi için Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.1.2. Yükseltilmiş artı labirent testi

YAL testinde hem 2. ay hem 4. ayda açık kollarda geçirilen süre bakımından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.2A). Gruplar kendi içinde zaman bağlamında kıyaslandığında da 2. ay ve 4. aydaki veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.2B). Dolayısıyla, YAL ile değerlendirilen anksiyete bağlamında, Alfa-sinüklein grubunda gözlenen artış eğilimi, AA bulgularından farklı olarak, gruplar arasında ve zamana bağlı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



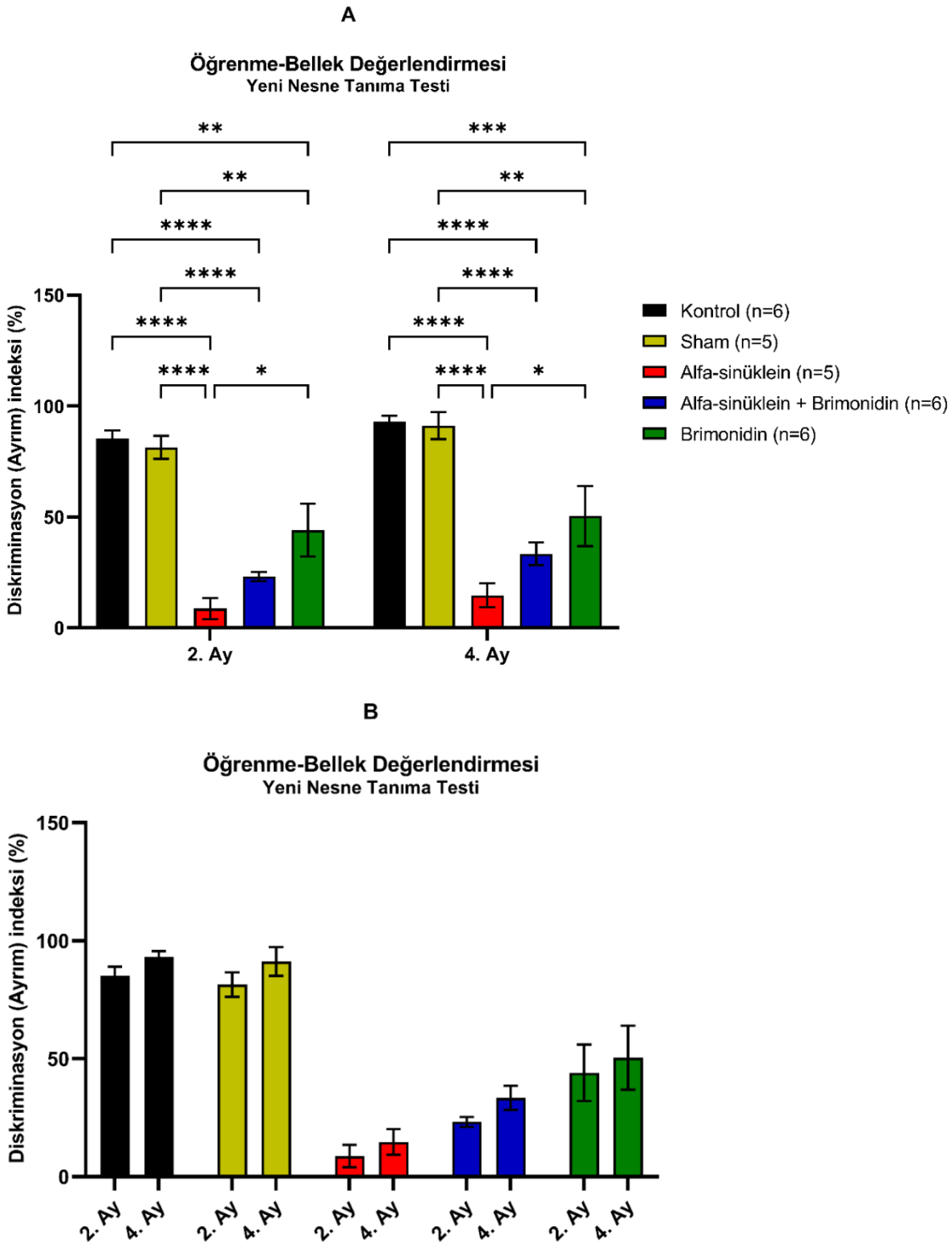
Şekil 4.2. Yükseltilmiş artı labirent testi ile anksiyetenin değerlendirilmesi.
Açık kollarda geçirilen süre oranı, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında P=0,3457; aylar arasında P=0,4343; iki yönlü varyans analizi. * P<0,05; *post-hoc* test olarak gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arasındaki farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.2. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Öğrenme ve Bellek Üzerine Etkisi

4.2.1. Yeni nesne tanıma testi

Deney grupları arasında hem 2. ayda hem 4. ayda istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlendi. Alfa-sinüklein grubunun, diskriminasyon (ayrım) indeksinde Kontrol ve Sham gruplarına kıyasla belirgin düzeyde düşük performans gösterdiği saptandı. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunda -her ne kadar daha yüksek bir diskriminasyon indeks değeri gösterse de- alfa-sinüklein grubundaki azalmış performans istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önlenemedi; söz konusu tedavi grubunun öğrenme ve bellek performansının Kontrol ve Sham gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde azalmış olduğu gözlendi. Brimonidinin tek başına etkisi ise hem Kontrol ile Sham gruplarından hem de alfa-sinüklein grubundan farklı bulundu. Brimonidin, YNT testinde öğrenme ve bellek performansını gösteren diskriminasyon indeksini azalttı (Şekil 4.3A).

Her grupta 2. ve 4. aylar kıyaslandığında diskriminasyon indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.3B).



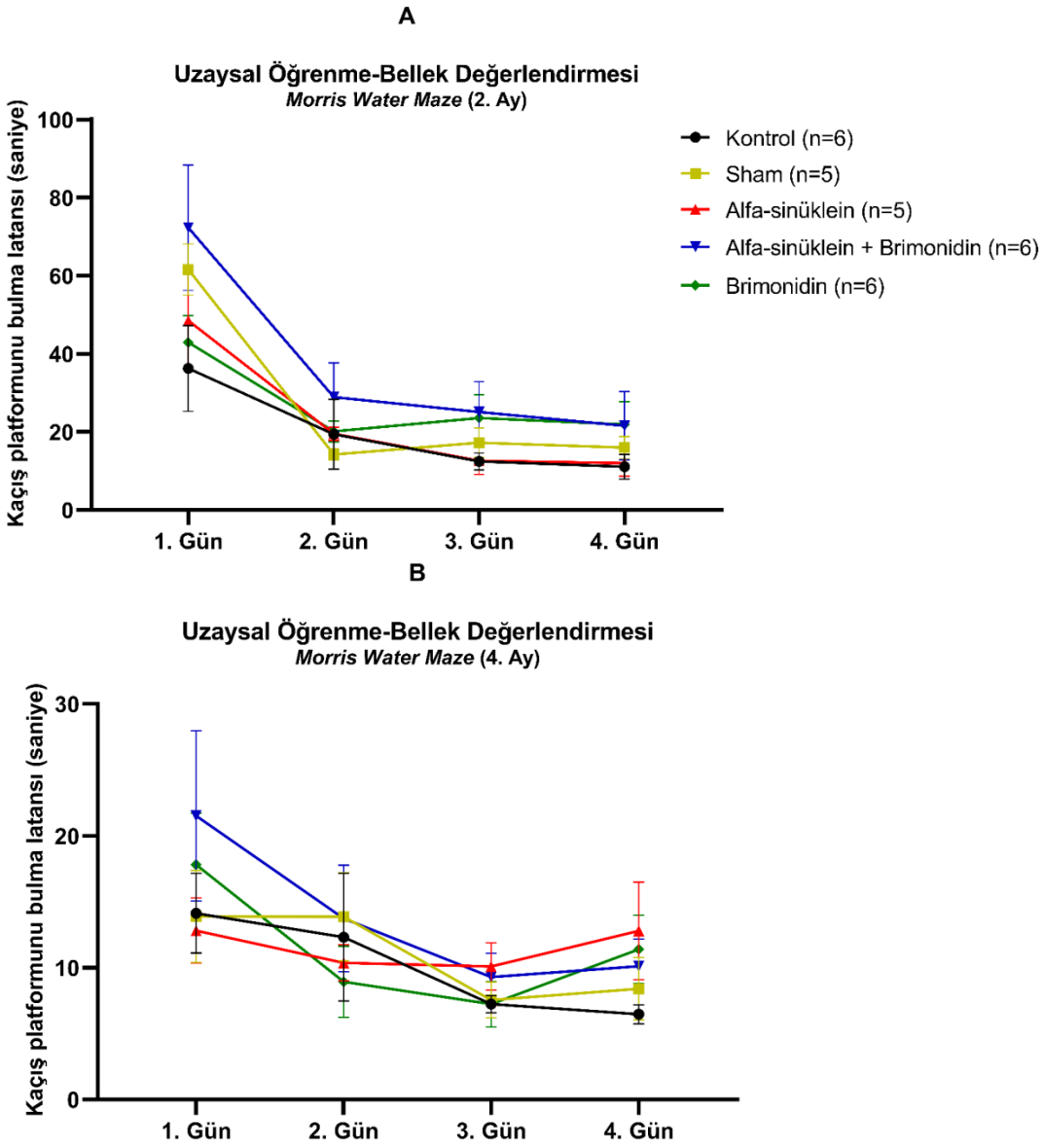
Şekil 4.3. Yeni nesne tanıma testi ile öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi.
Diskriminasyon indeksi, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında $P<0,0001$; aylar arasında $P=0,0904$; iki yönlü varyans analizi. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$; iki yönlü varyans analizi. * $P<0,05$; *post-hoc* test olarak gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arasındaki farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.3. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Öğrenme ve Uzaysal Bellek Üzerine Etkisi

4.3.1. Morris su labirenti testi

İcv plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile oluşturulan PH sıçan modelinde brimonidinin uzaysal öğrenme-bellek performansı üzerine etkisi MSL ile değerlendirildi.

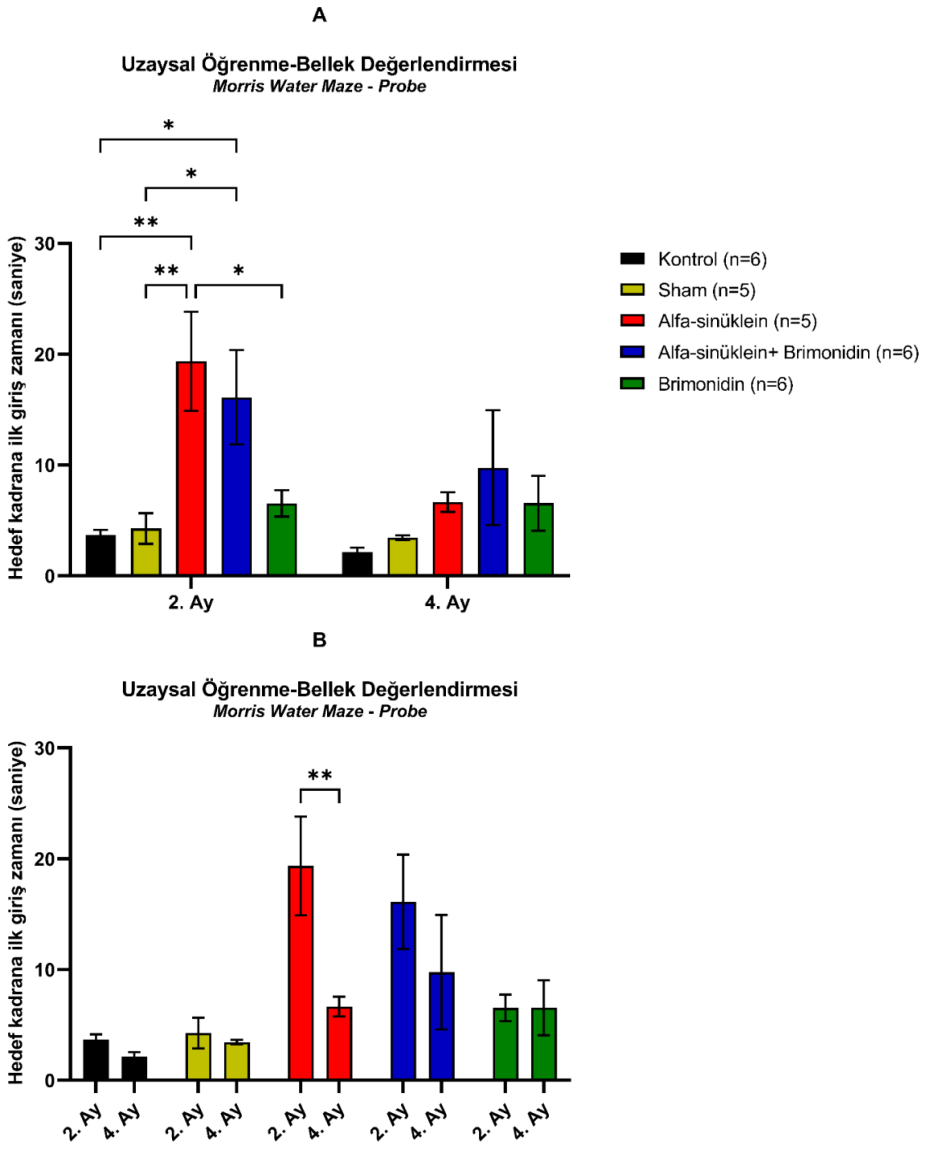
2. ve 4. aylarda alfa-sinüklein grubu da dahil olmak üzere tüm grupların platformunun yerini öğrendikleri, dolayısıyla kısa erimli öğrenme ve anımsama işlevlerinde bir fark gelişmediği saptandı (Şekil 4.4A-B). 4. aydaki deneyde dördüncü günde Alfa-sinüklein grubunun kaçış platformunu bulma latansındaki artış, yani performanstaki bozulma dikkate değer olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.4B).



Şekil 4.4. Morris su labirenti ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi.
Kaçış platformunu bulma latansı, 2. ayda (A) ve 4. ayda (B) grupların ortalama değerleri ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir.

5. gün kaçış platformunun kaldırılmasıyla yapılan prob testinde 2. ayda grupların hedef kadrana ilk giriş zamanları değerlendirildiğinde Alfa-sinüklein grubunun Kontrol ve Sham gruplarına göre kaçış platformunun olduğu bölgeye daha geç girdikleri gözlenmiştir. Alfa-sinüklein +Brimonidin grubunun Kontrol ve Sham gruplarına göre hedef bölgeye daha geç girdikleri saptandı. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunda hedef kadrana giriş süresi Alfa-sinüklein grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kısalmadı. Brimonidin grubundaki hayvanlar Alfa-sinüklein grubundaki hayvanlara göre hedef kadrana daha erken girdiler. 4. ayda platformun olduğu kadranı bulma sürelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.5A).

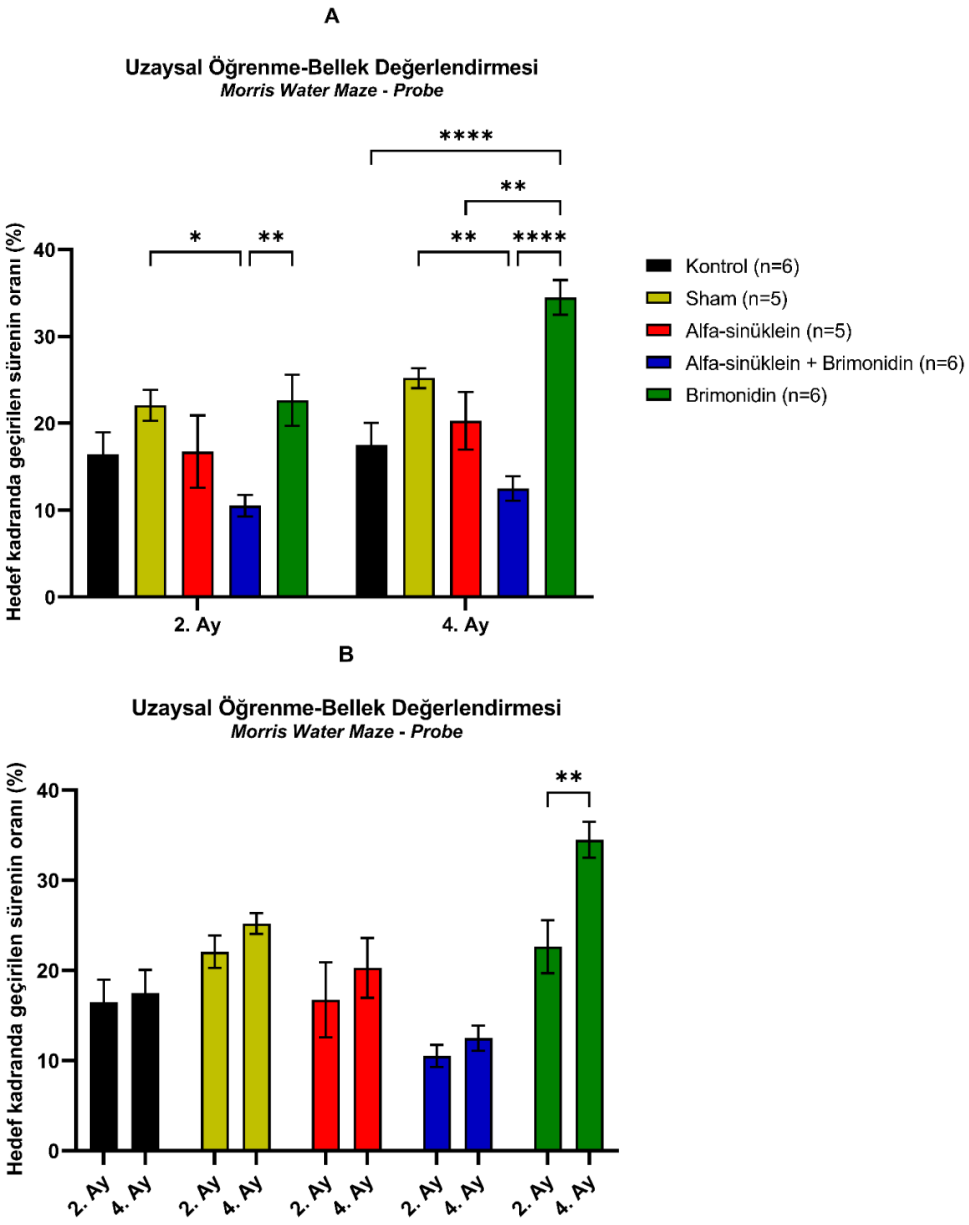
2. ay ve 4. aylar arasında grup-içi karşılaştırmalar yapıldığında Alfa-sinüklein grubunun 4. ayda hedef kadrana 2. aydakine göre daha erken girdiği belirlendi. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.5B).



Şekil 4.5. Morris su labirentinde *prob* testi ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi.
Hedef kadrana ilk giriş zamanı, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında P=0,0154; aylar arasında P=0,0019; iki yönlü varyans analizi. * P<0,05; ** P<0,01; *post-hoc* test olarak gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arasındaki farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Prob testinde grupların hedef kadranda geçirdikleri sürelerin yüzdesi de karşılaştırıldı. Alfa-sinüklein grubunun 2. ve 4. ayda Kontrol ve Sham gruplarına göre hedef kadranda geçirdiği süre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi. 4. ayda Brimonidin grubu Alfa-sinüklein, Alfa-sinüklein + Brimonidin ve Kontrol grubuna kıyasla platformun bulunduğu kadranda daha uzun süre geçirdi (Şekil 4.6A).

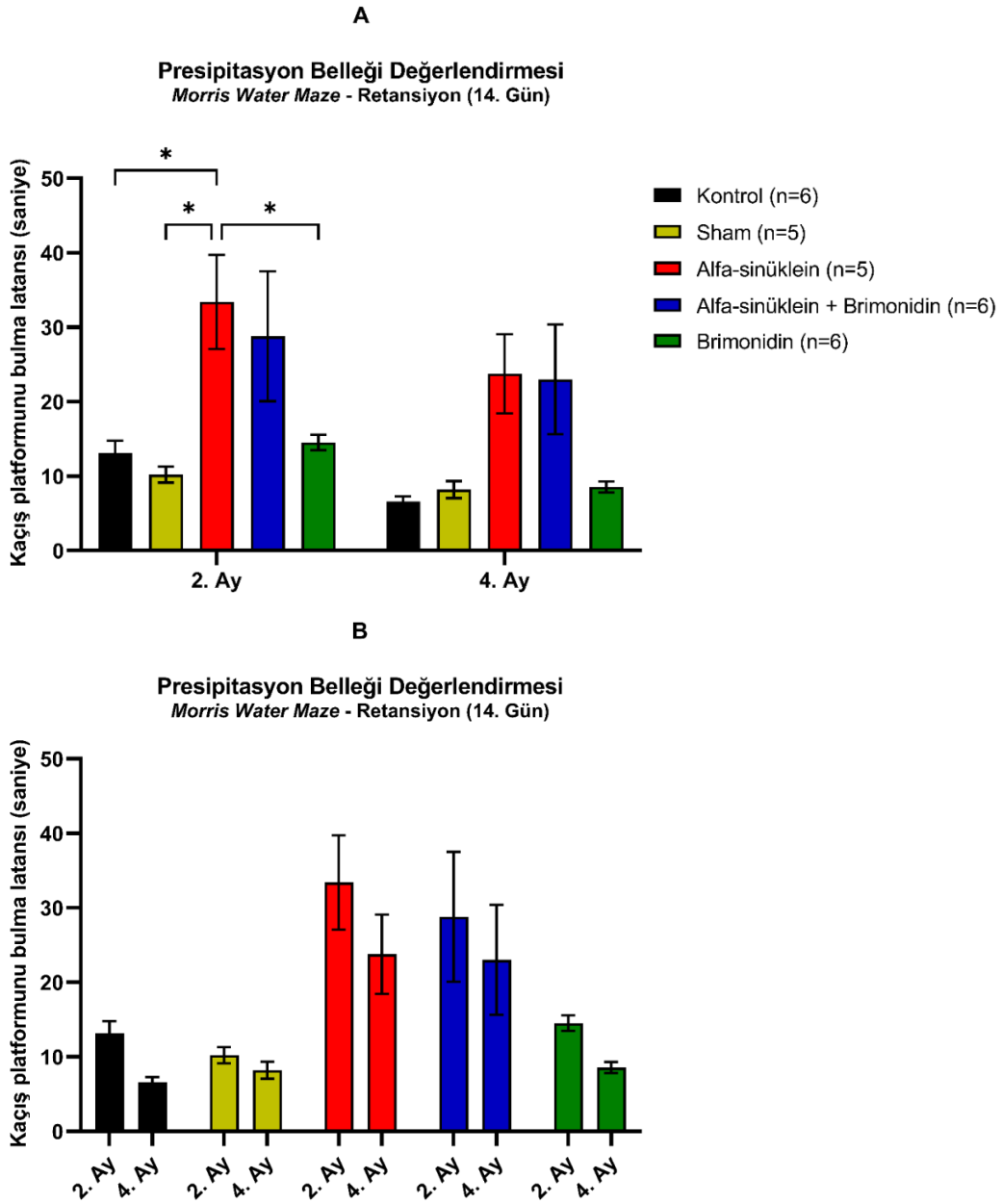
2. ve 4. aylar karşılaştırıldığında sadece Brimonidin grubunda 4. ayda hedef kadranda geçirilen sürenin istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4.6B).



Şekil 4.6. Morris su labirentinde *prob* testi ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi.
Hedef kadranda geçirilen sürenin oranı, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında $P<0,0001$; aylar arasında $P=0,0056$; iki yönlü varyans analizi. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$; *post-hoc* test olarak gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arası farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

14. günde hayvanların platformu bulma latansları değerlendirilmiştir. Alfa-sinüklein grubunun 2. ayda Kontrol, Sham ve Brimonidin gruplarına göre kaçış platformunu daha geç buldukları gözlendi. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir

fark saptanmadı (Şekil 4.7A). 2. ve 4. aylar kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.7B).



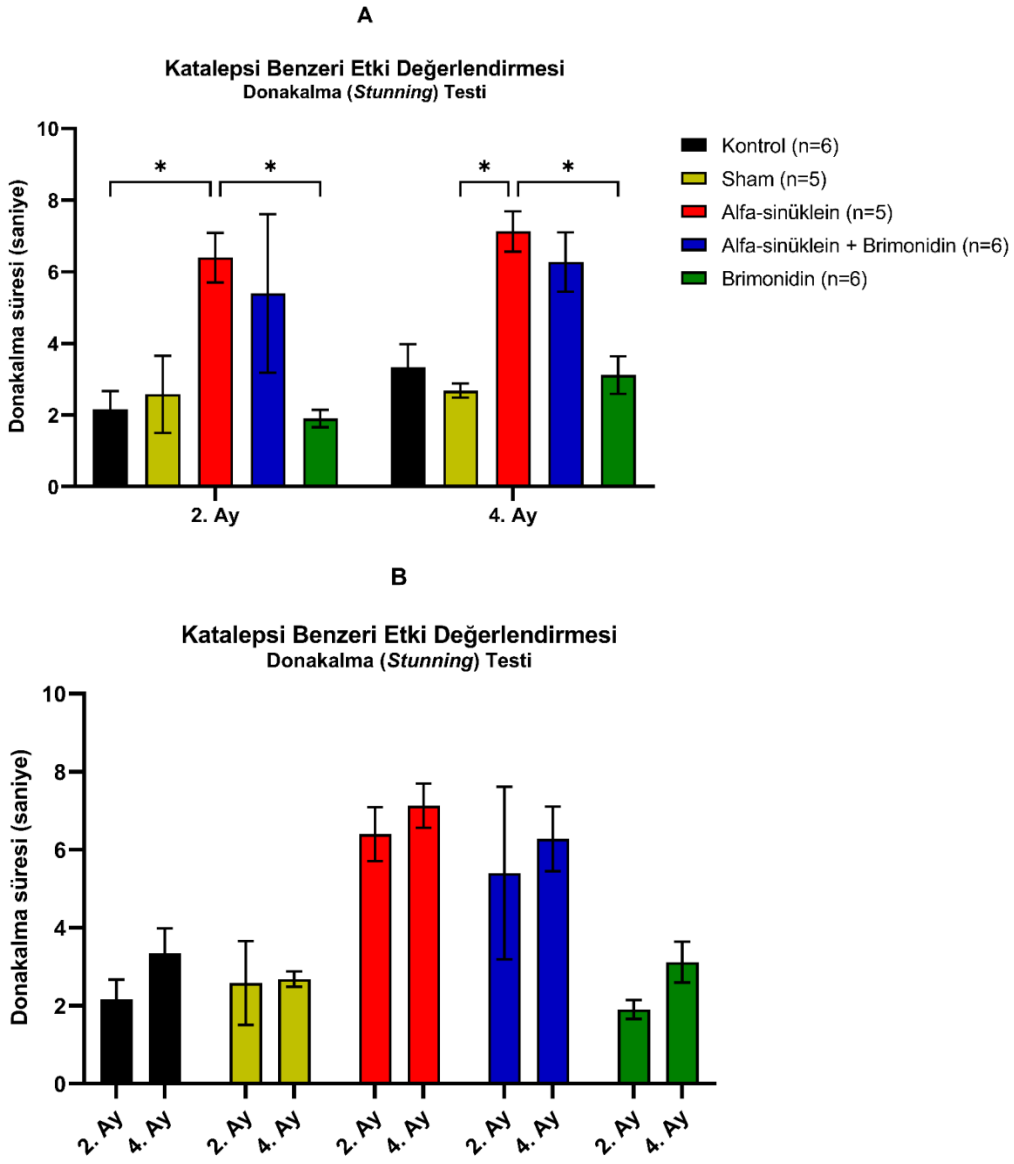
Şekil 4.7. Morris su labirentinde retansiyon testi ile uzaysal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi. Kaçış platformunu bulma latansı, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında P=0,0050; aylar arasında P=0,0024; iki yönlü varyans analizi. * P<0,05; *post-hoc* test olarak gruplar arasıdaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arasındaki farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.4. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Motor Koordinasyon Üzerine Etkisi

İcv plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile oluşturulan PH sıçan modelinde brimonidin'in motor koordinasyon üzerine etkisi dikey tele tutunma testi, yatay merdiven testi ve rot-a-rod testleri ile değerlendirildi.

4.4.1. Dikey tele tutunma testi

DTT ile sıçanların dikey bir tel üzerinde donakalma süreleri değerlendirildi. 2. ayda Alfa-sinüklein grubunun Kontrol ve Brimonidin gruplarına göre daha uzun süre hareketsiz kaldığı saptandı. Alfa-sinüklein grubunun donakalma süresinin 4. ayda da Sham ve Brimonidin gruplarına kıyasla daha uzun olduğu görüldü (Şekil 4.8A). Ancak 2. ve 4. aylarda donakalma sürelerinde grup-içi zamansal bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.8B).

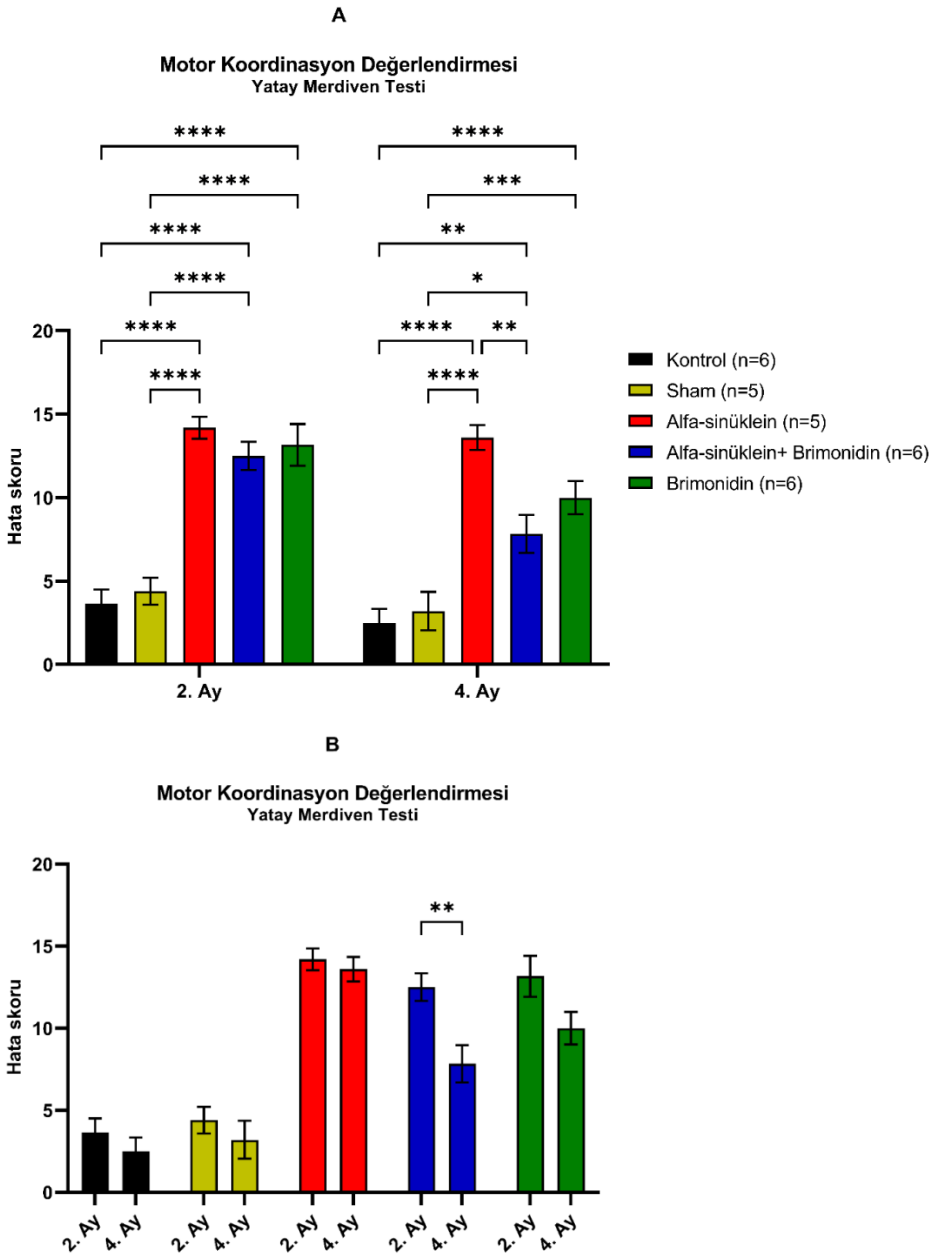


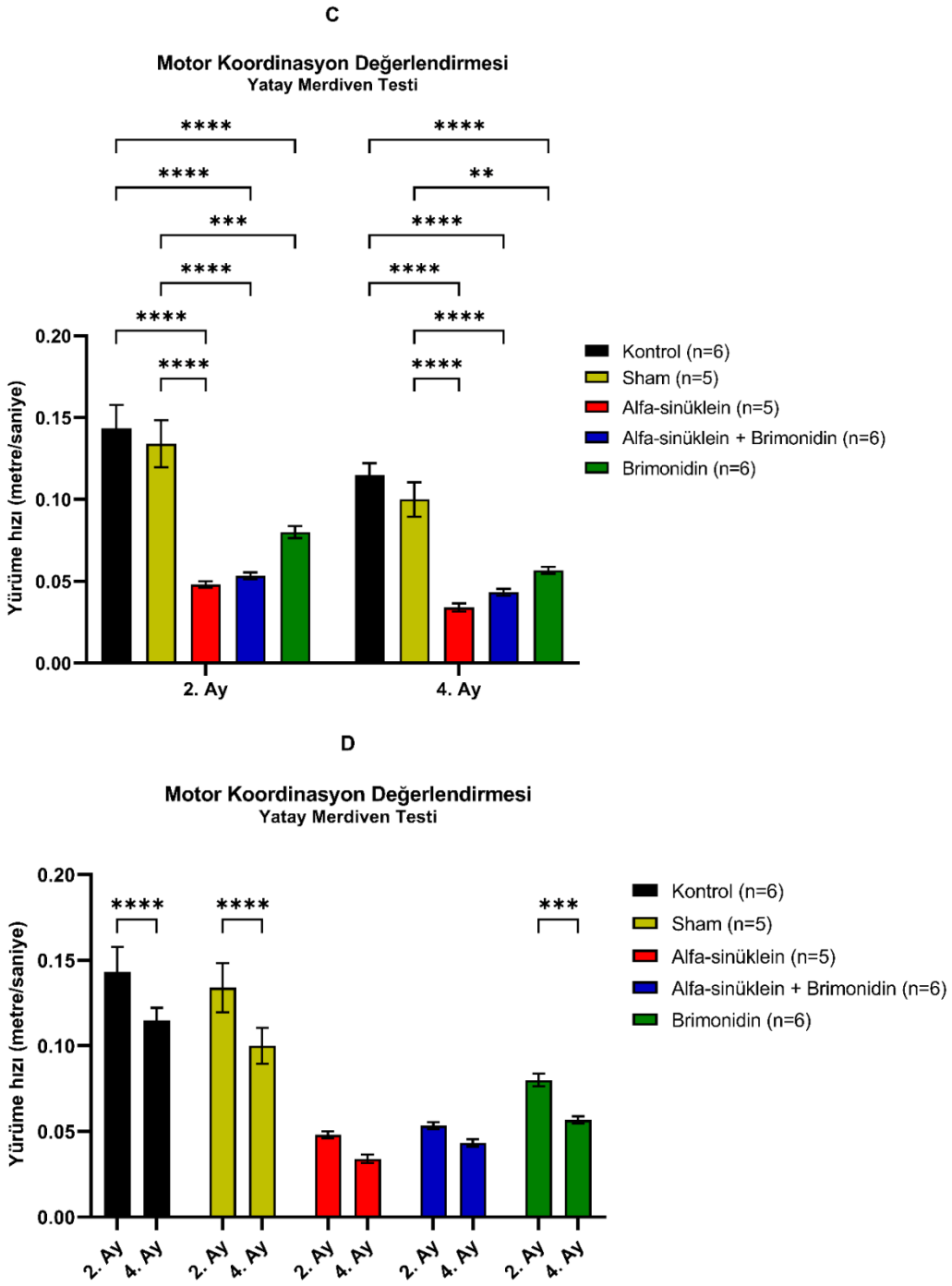
Şekil 4.8. Dikey tele tutunma testi ile katalepsi benzeri etkinin değerlendirilmesi.
Donakalma (*stunning*) süresi, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında P=0,0014; aylar arasında P=0,0964; iki yönlü varyans analizi. * P<0,05; *post-hoc* test olarak gruplar arası farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arasındaki farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.4.2. Yatay merdivende yürüme testi

Belli bir hızla hareket halindeki düzenekte hayvanların yatay merdiven üzerinde yürürken yaptıkları hata skorları değerlendirildi. Ayrıca hayvanların 1 metre uzunluğundaki parkurdaki yürüme hızları da değerlendirildi. 2. ve 4. ayda Alfa-sinüklein grubunun Kontrol ve Sham gruplarına göre daha fazla hata yaptığı belirlendi. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunun da her iki zaman noktasındaki (2. ve 4. aylar) hata skorlarının Kontrol ve Sham gruplarına göre daha fazla olduğu gözlendi. 4. ayda Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunun

hata skorunun Alfa-sinüklein grubuna göre daha düşük olduğu saptandı (Şekil 4.9A). 2. ve 4. ay arasında sadece Alfa-sinüklein + Brimonidin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ve 4. ayda hata skorunun azaldığı belirlendi (Şekil 4.9B). Parkuru tamamlarken yürüme hızı bakımından Kontrol ve Sham gruplarının hem 2. hem de 4. ayda Alfa-sinüklein, Alfa-sinüklein + Brimonidin ve Brimonidin gruplarına göre daha hızlı oldukları gözlendi (Şekil 4.9C). Kontrol, Sham ve Brimonidin gruplarının 2. ve 4. aylar arasındaki hızları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı. (Şekil 4.9D).

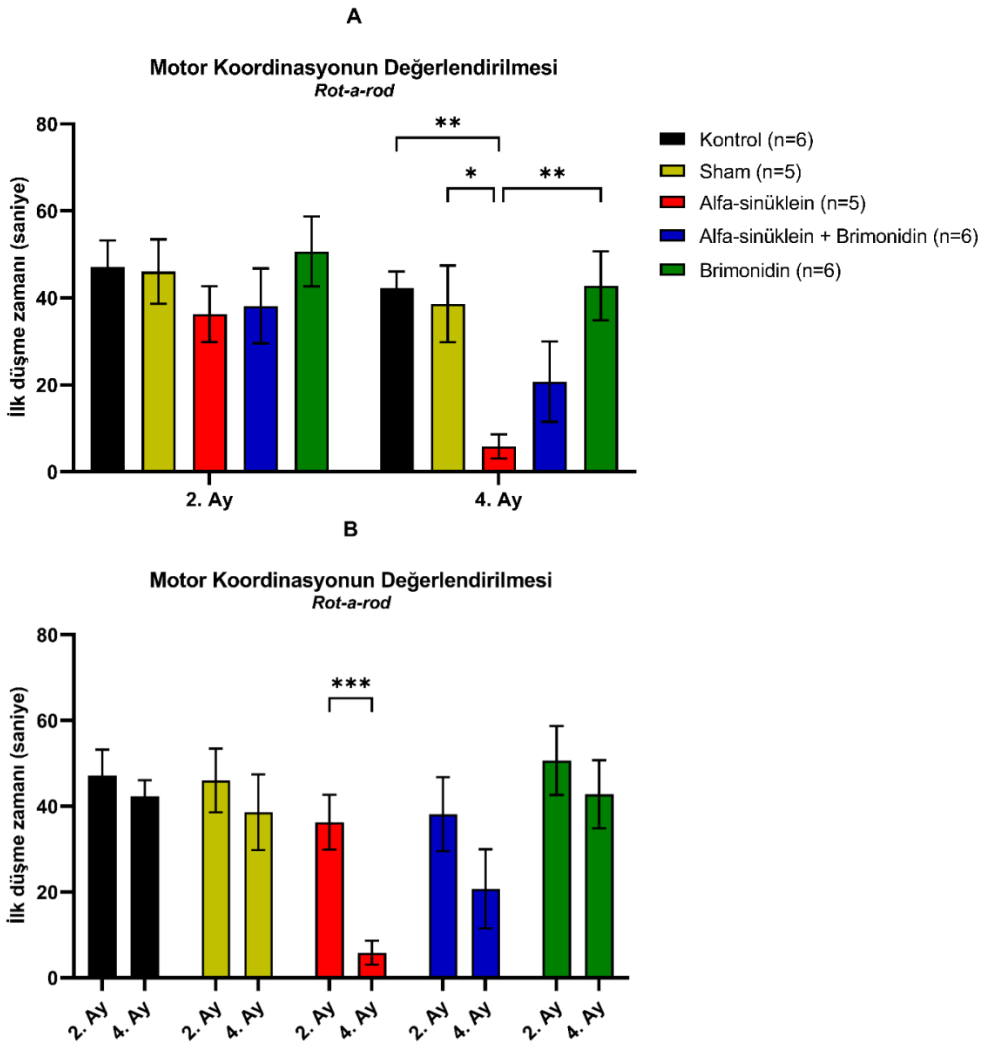




Şekil 4.9. Yatay merdiven testi ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi.
Hata skoru, gruplara göre (A) ve zamana göre (B), hızları gruplara göre (C) ve zamana göre (D) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Hata skoru gruplar arasında $P<0,0001$; aylar arasında $P=0,0019$, hız gruplar arası $P<0,0001$; aylar arasında $P<0,0001$, iki yönlü varyans analizi. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$; *post-hoc* test olarak gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arasındaki farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.4.3. Rot-a-rod

İlk 3 gün düşük hızlardan başlayarak döndürülen mil üzerinde dengede durmaya alıştırılan deney hayvanları 4. gün (test günü) 16 rpm hızında dönmekte olan rot-a-rod üzerinde 3 kere yürütülerek ilk düşme zamanlarının ortalamaları değerlendirildi. 2. ayda gruplar arasında ilk düşme zamanlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, 4. ayda Alfa-sinüklein grubunun Kontrol, Sham ve Brimonidin gruplarına göre döner mil üzerinde düşmeden daha kısa süre kalabildiği gözlendi (Şekil 4.10A). 2. ve 4. ay arasında sadece Alfa-sinüklein grubunda zamana bağlı değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu, bu grupta 4. ayda döner mil üzerinde kalma süresi azaldı (Şekil 4.10B).



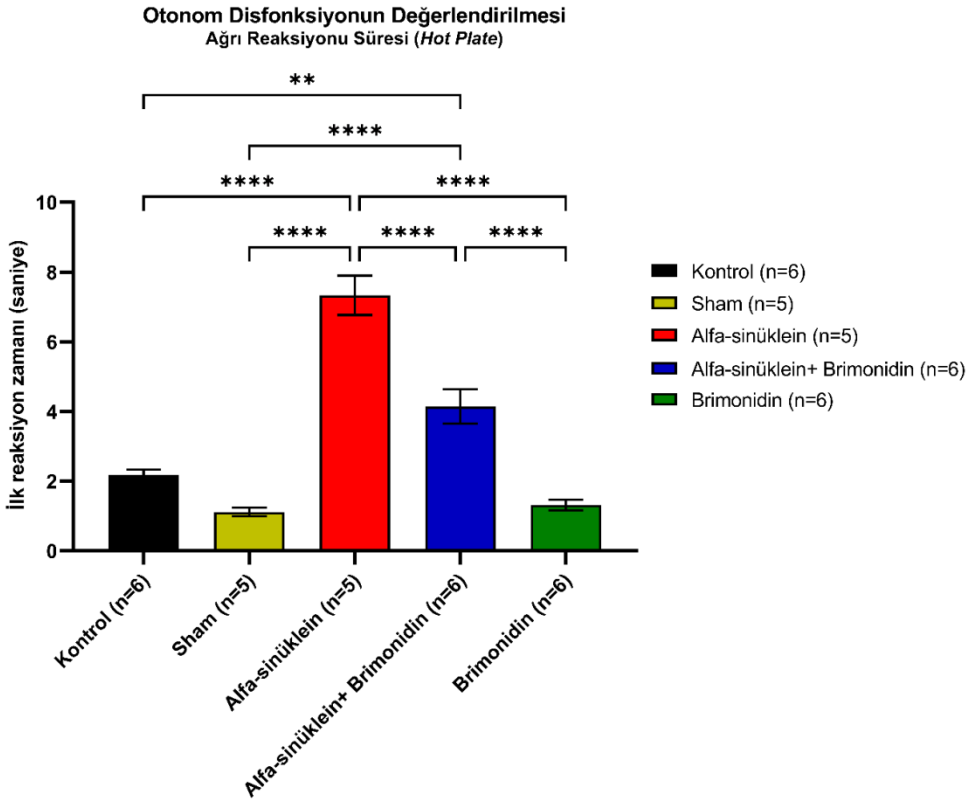
Şekil 4.10. *Rot-a-rod* ile motor koordinasyonun değerlendirilmesi.
İlk düşme zamanı, gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında P=0,0509; aylar arasında P=0,0001; iki yönlü varyans analizi. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; *post-hoc* test gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey, aylar arası farkı değerlendirmek için Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4.5. İcv Plazmid ve Alfa-sinüklein PFF Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Sıçan Modelinde Brimonidin Tedavisinin Otonomik Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

İcv plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile oluşturulan PH sıçan modelinde brimonidinin otonomik disfonksiyon üzerine etkisi *hot plate* testi ile değerlendirildi.

4.5.1. *Hot plate*

Daha önceden sıcaklığı 52°C olarak ayarlanmış zemin üzerine bırakılan hayvanların ağrılı uyarana karşı ilk reaksiyon verme zamanları karşılaştırıldı. Kontrol, Sham ve Brimonidin grupları Alfa-sinüklein ve Alfa-sinüklein + Brimonidin gruplarına göre ağrılı uyarana karşı daha kısa sürede tepki verdiler. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubu -Kontrol, Sham ve Brimonidin grupları kadar olmasa da- Alfa-sinüklein grubuna göre sıcaklık uyaranına karşı daha hızlı tepki gösterdi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Hot plate* testi ile otonom disfonksiyonun değerlendirilmesi. Ağrı reaksiyonu süresi, Gruplara göre (A) ve zamana göre (B) ortalama değerler ve ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında $P<0,0001$; tek yönlü varyans analizi. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$; *post-hoc* test olarak Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

5. TARTIŞMA

Parkinson hastalığı genellikle ileri yaşlarda görülen temel motor belirtilerin yanında motor dışı belirtilerin de eşlik ettiği bir hastalıktır. Hastalığın patolojisinde beynin özellikle nigrostriatal kısmındaki dopaminerjik hasar sonucu striatumda dopamin düzeyinde azalma olduğu görülür. Hastalığın altta yatan mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak α-sin proteinindeki yanlış katlanma ve agregatların oluşumunun önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (35, 116). Çevresel bazı toksinlere maruz kalma ve genetik faktörler de PH riskini arttırmaktadır (117,118).

Hastalığın altında yatan mekanizmaların anlaşılabilmesi için hayvan modellerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. PH çalışmalarında sıklıkla toksin kaynaklı hayvan modelleri kullanılmaktadır (35). MPTP ve 6-OHDA gibi nörotoksinlerle oluşturulan PH modelleri belirgin nitrostriatal kayıp ve motor bozukluklar oluşmasına neden olur. Ancak bu modellerde PH ile uyumlu bir ilerleyicilik yoktur (79, 119, 120, 121, 122). Transgenik modellerde α-sin oluşumu gözlenmektedir ancak bu modeller de nigrostriatal dejenerasyona yol açmazlar (123, 124, 122). Viral vektör aracılı α-sin hayvan modellerinde idiyopatik Parkinson hastalarına göre fizyolojik düzey üstünde α-sin seviyeleri ile nörotoksisite oluşur (125, 126). Alfa-sinüklein PFF ile oluşturulan PH hayvan modelinde α-sin fosforilasyonu, birikimi ve α-sin inklüzyonları fizyolojik seviyelerde oluşarak insan PH'ında görülene çok benzer şekilde nörotoksisiteyi oluşturur (79, 107). Alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile proteinin genetik manipülasyonuna veya aşırı ekspresyonuna ihtiyaç duyulmadan çoklu beyin bölgelerinde patoloji oluşturulabilir (127). Hem sıçan hem farelerde enjeksiyon bölgesinden uzağa yayılan inklüzyonlar gözlemlenmiştir. Sıçanlarda tek taraflı PFF enjeksiyonunun ipsilateral inklüzyonların oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (127, 128, 129).

Bu tez çalışmasında insan a-sinüklein PFF'leri icv olarak insan α-sin proteini mRNA'sını taşıyan plazmid ile kombinasyon halinde enjekte ederek tek başına fibril uygulanması ile 6 ayda oluşan modeli daha kısa sürede oluşturmak ve brimonidinin α-sin patolojisindeki olası nöroprotektif etkisini incelemek amaçlanmıştır. Modelin daha kısa sürede oluşup oluşmadığını değerlendirmek için deneyler 2. ve 4. aylarda yapılmıştır. Enjeksiyonun doğrudan striatuma değil icv olarak uygulanmış olmasına rağmen, yaptığımız

ön çalışmada icv olarak uygulanan plazmidin 4 hafta sonra hipokampüste de α-sin aşırı ekspresyonuna yol açtığını gözlemledik. Bu ön çalışmanın nesnel bulgularından yola çıkarak çalışmamızda icv enjeksiyon tercih edildi. Daha önceki çalışmalar da enjeksiyon noktasından uzak bölgelerde de α-sin aşırı ifadesi ve agregatlarının oluştuğu göstermiştir (128).

Bu tez çalışmasında deneysel PH modeli oluşturmak için önce icv olarak α-sin proteini kodlayan mRNA'yı taşıyan plazmid, ardından 4 hafta sonra alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu yapılmıştır. Ön çalışmamızda α-sin aşırı ifadesine neden olan dozda plazmid enjeksiyonu yapılmıştır. Bu tez çalışmasında uygulanan alfa-sinüklein PFF dozu da önceki çalışmalarda belirtilen dozlarla uyumlu olacak şekilde seçilmiştir (130, 131). İlk plazmid enjeksiyonu ile eş zamanlı olarak başlanan i.p. brimonidin tedavisinde kullanılan brimonidin dozu da önceki çalışmalarda nöroprotektif etki oluşturduğu belirlenen doz esas alınarak seçilmiştir (132). İcv enjeksiyonlardan sonra 2. ve 4. aylarda davranış deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu süreç boyunca tedavi gruplarına günlük olarak brimonidin enjeksiyonu yapılmıştır.

Bu tezde α-sin ifade artışı sağlanarak PH'ında görülen motor ve motor dışı bozuklukların değerlendirilmesine yönelik davranış testleri yapılmıştır. Motor fonksiyonların değerlendirilmesinde dikey tele tutunma testi, yatay merdivende yürüme testi ve rot-a-rod testi kullanılmıştır. Motor dışı fonksiyonların değerlendirilmesinde ansiyete üzerindeki etkilerin değerlendirilmesi için açık alan testi, yükseltilmiş artı labirent testi kullanılmıştır; prefrontal korteks- ve hipokampus-aracılı öğrenme-bellek işlevi üzerindeki etkisini değerlendirmek için sırasıyla yeni nesne tanıma testi ve Morris su labirenti testi kullanılmıştır. Otonomik fonksiyonlar üzerindeki etkinin değerlendirilmesi için *hot plate* testi uygulanmıştır.

PH sürecinde kolinerjik, noradrenerjik ve serotonerjik sistemlerdeki değişikliklerden dolayı apati, anksiyete, panik atak, sosyal fobi, depresyon gibi motor dışı bulgular da görülebilir (133, 134, 135,136, 137). Parkinson hastalığında ventral tegmental alanda ve lokus seruleusta belirgin nöron kaybı görülmektedir. Dopamin lokus seruleusta nöronal ateşlenmeyi inhibe eder. Parkinson hastalığındaki dopamin azalması sebebiyle bu inhibisyon oluşamaz. Parkinson hastalarında görülen anksiyete bozukluğu bu şekilde açıklanmaktadır (138). Anksiyete değerlendirmesi için yaptığımız açık alan testinde hayvanların orta alanda geçirdikleri sürenin artması hayvanların anksiyetelerinin düşük olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada 2. ayda Alfa-sinüklein grubu Kontrol grubuna göre orta alanda daha az vakit geçirmiştir. Bu bulgu Fortuna ve ark. bulguları ile uyumludur (139). Brimonidinin olası nöroprotektif etkisini incelemek için oluşturulan Alfa-sinüklein + Brimonidin grubu artmış olan anksiyete üzerinde azaltıcı bir etki oluşturamamıştır. 4. ayda yaptığımız deneylerde bütün hayvanların anksiyetelerinin artmış olduğunu görülmüştür. Bu bulgu açıklanması gereken bir bulgudur ve ileri araştırmalar ile incelenmelidir.

Anksiyeteyi değerlendirmek için kullanılan bir diğer düzenek de yükseltilmiş artı labirent testidir. Anksiyetesi yüksek olan hayvanlar kapalı kollarda daha çok vakit geçirmeyi tercih ederken, anksiyete seviyesi azaldıkça açık kollarda geçirilen süre ve hareketlilik artar. Bizim elde ettiğimiz bulgular bütün grupların her iki zaman diliminde de kapalı kollarda daha fazla zaman geçirdiğini ortaya koymuştur. Literatürdeki başka bir çalışmada da bu bulguya benzer olarak gruplar arasında açık kollarda geçirilen zaman açısından bir fark çıkmamıştır (122). Anksiyete-benzeri davranışı hayvanlarda değerlendirmek oldukça zordur, bazı çalışmalarda anksiyete benzeri davranış gözlenirken bazı çalışmalarda gözlenmemektedir (139,140).

Parkinson hastalığında öğrenme-bellek işlevlerinde bozukluk olduğu bilinmektedir. Öğrenme-bellek performansındaki bu bozulmanın hipokampal yapılar ve frontal korteks ile ilgili nöronal dejenerasyonla iilişkili olduğu bilinmektedir (141). Öğrenme-bellek bozukluğu görülen Parkinson hastalarında hipokampüs ve prefrontal kortekste atrofi görüldüğü bildirilmiştir (142,143). Yeni nesne tanıma testi özellikle prefrontal korteks işlevinin aracılık ettiği belleğin değerlendirilmesi için kullanılan bir testtir (144). Herhangi bir patolojisi olmayan deney hayvanın yeni nesneyi eski nesneden ayırt ederek, onunla daha çok vakit geçirmesi beklenir. Bu tez çalışmasında, Alfa-sinüklein grubundaki sıçanların 2. ve 4. aylarda Kontrol ve Ssham grubundaki sıçanlara göre yeni nesne ile daha az vakit geçirdikleri gözlenmiştir. Bu bulgu, literatürdeki çalışmaların bulguları ile uyumludur (145,146,147). Literatürdeki bilgiler ile bulgularımız karşılaştırıldığında öğrenme-bellek fonksiyonunun Alfa-sinüklein grubunda bozulmuş olması amaçladığımız alfa-sinükleinopati sıçan PH modelinin oluştuğunun bir göstergesidir. Modelin daha erken oluşup oluşmadığını anlayabilmek için iki ay arasındaki kıyaslamaya bakıldığında aylar arasında fark çıkmaması modelimizin prefrontal korteks üzerine etkisinin 2. ayda oluştuğunu göstermektedir. Tedavi grubundaki sıçanlar Alfa-sinüklein grubundaki sıçanlara göre yeni nesne ile daha fazla ilgilenme eğilimi gösterse de aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, dolayısıyla en

azından bu bağlamda brimonidin tedavisinin α-sin patolojisine engel olamadığı söylenebilir. Brimonidinin tek başına uygulandığı deney grubunun Kontrol ve Sham gruplarına göre yeni nesne ile daha az ilgilendiği gözlenmiştir. Bu bulguda alfa 2 adrenerjik reseptörlerinin rolü araştırılması gereken bir noktadır ve sebebi alfa 2 adrenerjik reseptörlerin otoreseptör fonksiyonlarından dolayı dopaminin salıverilmesini inhibe etmeleri olabilir.

Parkinson hastalığının bir diğer motor dışı fonksiyonun değerlendirilmesinde uzaysal öğrenme-bellek işlevi Morris su labirenti testi ile değerlendirilmiştir (141, 148, 149,150). Bu test belleğin hem edinilmesi hem de saklanmasını değerlendirmek için yararlı bir testtir (151). Bu testte öncelikle hayvanların platformun yerini öğrenebilme düzeyleri değerlendirilmiş, 24 saat sonra platform kaldırılarak yapılan prob testi ile uzaysal hafızaları, 14. günde yapılan retansiyon deneyi ile de öğrenilen bilgiyi pekiştirebilme yetileri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada 4. ayın 4. gününde Alfa-sinüklein grubunda latans değeri artmasına rağmen, bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı çıkmadığı için her iki zaman noktasında da bütün grupların görsel ipuçlarını kullanarak platformun yerini öğrendikleri sonucuna varılmıştır.

24 saat sonra yapılan prob testinde 2. ayda Alfa-sinüklein grubu Kontrol ve Sham gruplarına göre hedef kadrana daha geç girmişlerdir. Literatürdeki diğer α-sin modellerinde hipokampüs ile ilişkili zaysal hafıza bozukluğu gösterilmiştir (152). Bulgularımız ile kıyaslandığında oluşan uzaysal hafıza bozukluğunun alfa-sinükleinopatiye bağlı olduğu sonucuna varılabilir. Alfa-sinüklein + Brimonidin grubunun hedef kadrana ilk kez giriş zamanı Kontrol ve Sham gruplarına göre daha geç, Alfa-sinüklein grubuna göre ise daha erkendir, ancak aralarında anlamlı bir fark saptanamamıştır. 2. ayda Alfa-sinüklein grubundaki hayvanlar platformu bulmada başarısız olurken, 4. aydaki latans değerleri Kontrol ve Sham gruplarına göre daha fazla olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak brimonidin tedavisinin alfa-sinüklein enjeksiyonu ile oluşturulan patolojiyi tam olarak engelleyemediği söylenebilir. Prob deneyi ile hedef kadranda geçirilen göreceli süre değerlendirildiğinde 2. ve 4. aylarda Alfa-sinüklein grubu ile Kontrol ve Sham grupları arasında bir fark bulunamamıştır. Bunun sebebi Alfa-sinüklein grubundaki sıçanların yüzme hızlarının daha yavaş olması ya da hedef kadrana girdikten sonra hareketsiz bir şekilde kalmaları olabilir.

14. günde yapılan retansiyon deneyi ile hayvanların öğrendikleri bilgileri pekiştirebilme yetileri değerlendirilmiş olup 2. ayda Alfa-sinüklein grubundaki hayvanların Kontrol ve Sham gruplarına göre platformu bulmak için daha çok vakit harcadıkları gözlenmiştir. Bu sonuç daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (153). 4. ayda Alfa-sinüklein grubunun da kaçış platformunu bulma süresi daha fazla olmasına rağmen diğer gruplarla arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Alfa-sinüklein PFF ile oluşturulan hayvan modellerinde motor fonksiyonlarda bozukluk olduğu gösterilmiştir (154,155). Bu tez çalışması kapsamında meydana gelen motor değişiklikleri değerlendirmek için dikey tele tutunma testi (katalepsi benzeri etki), yatay merdivende yürüme testi ve rot-a-rod testleri yapılmıştır.

Katalepsi Parkinson hastalarında görülen ve harekete başlamadaki güçlük belirtisini yansıtan motor bozukluklardan biridir. Katalepsiye benzer donakalma davranışı ölçümleri için dikey tel testi sık kullanılan bir yöntemdir (156,157). Dikey olarak yerleştirilen tel üzerinde hayvanın hareket etmeden ne kadar süre kaldığı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada icv α-sin enjeksiyonu ile PH modeli oluşturulan hayvanlar 2. ay ve 4. ayda tel üzerinde daha uzun süre hareketsiz kalmışlardır. 6-OHDA ile oluşturulan PH modelinin kullanıldığı bazı çalışmalarda da bu tez çalışmasıyla uyumlu olarak katalepsi oluştuğu görülmüştür (158, 159). Striatumdaki dopaminerjik nöronlardaki hasarın katalepsiye yol açtığı düşünülmektedir (158). 2. ay ve 4. aylarda Alfa-sinüklein grubunda donakalma süresi açısından zaman bağımlı bir fark görülmemiştir ve bu da diğer bazı bulgularımızla uyumlu olarak modelin 2. aydan itibaren oluşmuş olduğu savını desteklemektedir. Tedavi grubunda donakalma süresi azalmış olsa da aradaki fark anlamlı bulunamamıştır. Brimonidin α-sin patolojisi üzerinde düzeltici bir etki göstermemiştir. Tedavi grubundaki bu bulgunun sebebi yeterli nöroprotektif brimonidine dozunun MSS'ne geçememiş olması olabilir. Çünkü tek başına Brimonidin grubundaki hayvanlarda donakalma süresi control grubuna göre farklı çıkmamıştır.

Motor fonksiyonların değerlendirilmesi için bu tez çalışmasında kullanılan bir diğer test yatay merdivende yürüme testidir. Bu testte hayvanların, belli bir hızda hareket eden düzenek üzerinde yürürken yaptıkları hataların skorları değerlendirilmiştir. Sağlıklı hayvanlar birkaç denemede düzeneğe uyum sağlarken motor bozukluğu olan hayvanlar daha çok hata yaparlar (160). Ön ve arka ayak yerleşimlerinin değerlendirilmesi bir puanlama

sistemi kullanılarak yapılmıştır (161). Ayrıca bu testte hayvanların parkuru bitirme süreleri ölçülerek hızları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada Alfa-sinüklein grubu 2. ve 4. aylarda Kontrol ve Sham gruplarına göre daha fazla hata yaparak yatay merdivende yürüme testinde başarısız olmuşlardır ve bu da motor fonksiyonlarında bozukluk olduğunu göstermektedir. Tedavi grubu 4. ayda Alfa-sinüklein grubuna göre daha az hata yapmış ancak Kontrol ve Sham grupları kadar da başarılı olamamıştır. Brimonidin grubu Kontrol ve Sham gruplarına göre bu testte daha çok hata yapmıştır. Bu bulgu brimonidinin MSS yan tesirlerinden (uyku hali, uyuşukluk vb) dolayı elde edilmiş olabilir. Hareketlerde yavaşlama PH'da görülen motor fonksiyon bozukluklarından biridir ve nigrostriatal yolaklarda dopaminerjik nöron kaybına bağlı olarak oluştuğu bilinmektedir (162,163,164). Bu testte hayvanların hızları da değerlendirilmiş, 2. ve 4. aylarda Alfa-sinüklein grubundaki hayvanların yürüme hızının Kontrol ve Sham gruplarına göre belirgin olarak azalmış olduğu görülmektedir. Brimonidin tedavisi hızdaki bu yavaşlamayı düzeltememiş, hatta tek başına brimonidin uygulamasının da hayvanların hızlarında azalmaya sebep olduğu saptanmıştır. 4. ayda 2. aya göre Kontrol ve Sham gruplarının yatay merdiven üzerinde yürüme hızlarında azalma olduğu görülmüştür. Bu azalmanın sebebi hayvanların düzeneği öğrenip daha temkinli bir şekilde yürümeleri olabilir.

Motor koordinasyonun değerlendirilmesi için yaptığımız bir diğer test rot-a-rod testidir. 3 günlük deneme testleri sonrasında döner mil üzerinde durma zamanları bakımından 2. ayda Alfa-sinüklein grubu ile Kontrol ve Sham grupları arasındaki fark anlamlı çıkmamıştır. Ancak 4. ayda Alfa-sinüklein grubu Kontrol ve Sham gruplarına göre mil üzerinde daha kısa süre kalabilmiştir. Bu durum bazı çalışmalarda 6. ayda gözlenmiştir (121, 122, 165). Diğer çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında icv alfa-sinüklein PFF uygulaması ile oluşturulan PH modelinde 6. ayda görülen motor bozukluğun 2. ayda olmasa da 4. ayda gözlenmesi ile modelin plazmid kombinasyonu ile daha hızlı oluştuğunu göstermektedir. Tedavi grubu 4. ayda döner mil üzerinde Alfa-sinüklein grubuna göre daha uzun süre kalmış olsa da bu fark anlamlı bulunmamıştır.

Son olarak α-sin patolojisi oluşturulan hayvanlarda otonomik fonksiyon değerlendirmesi *hot plate* testi ile hayvanların ağrılı uyarana verdikleri reaksiyonun zamanı değerlendirilmiştir. Sadece 4. ayda yapılan bu test Alfa-sinüklein grubunun ağrılı uyarana Kontrol ve Sham gruplarına göre daha geç tepki verdiğini göstermiştir. Tedavi grubu Kontrol ve Sham grupları kadar olmasa da Alfa-sinüklein grubuna göre daha hızlı tepki vermiştir.

Glokom tedavisinde kullanılan brimonidin retinal ganglion hücrelerde nöroprotektif etkisi olduğu gösterilen bir α-2 adrenerjik reseptör agonistidir (166, 167). Brimonidinin nöroprotektif etkisi altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Ancak olası nöroprotektif etkiye apoptotik kaskadın inhibisyonu, ekstraselüler glutamat toksisitesinin azaltılması, NMDA reseptör blokajı, glial kaynaklı nöroinflamasyonun azaltılması suretiyle neden olduğu gösterilmiştir (102, 103,168,169,170,171). Diğer bazı çalışmalarda da reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek hücreleri oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir (172, 173). Ancak plazmid + alfa-sinüklein-aracılı PH sıçan modelinin oluşturulduğu bu tez çalışmasında brimonidinin nöroprotektif etkisi kanıtlayan net bulgular elde edilememiştir. Bunun nedenleri arasında uzun süreli brimonidin tedavisinden kaynaklı ortaya çıkan MSS depresyonu, uyku hali, uyuşukluk, hipotansiyon gibi yan tesirlerin de yer alabileceği düşünülmüştür (174, 175). Ayrıca KBB'ni geçebildiği gösterilmiş olan brimonidinin belirlenen nöroprotektif dozun MSS'ne daha az miktarda geçerek yetersiz kaldığı düşünülmüştür (176, 177).

Kısıtlılıklar

1) Bu tez çalışmasında kullanılan sıçanların barındırıldığı ve çoğu davranış deneylerinin yapıldığı Üretim ve Araştırma Merkezinin deneylere başlandıktan sonra taşınmış olmasından dolayı hayvanlara icv enjeksiyonların ve davranış deneylerinin farklı yerlerde ve koşullarda yapılmak zorunda kalınması. Taşınma tarihindeki ertelemeler nedeniyle davranış deneylerine enjeksiyonların bitiminden 1 ay sonra başlanacakken 2 ay sonra başlanabilmiş olması.
2) Taşınmanın, özellikle anksiyete deneylerini olumsuz etkilemiş olması.
3) Ön çalışma olarak başlayan çalışmanın, yaşanan zorunlu kısıtlılıklardan dolayı (pandemi) tezin tamamlanabilmesi için süre sorunu oluşması nedeniyle tez çalışmasına evrilmek zorunda kalınması, Sham ve Brimonidin gruplarının sonradan eklenmesi, hayvan sayısının görece sınırlı olması nedeniyle cinsiyet etkisinin değerlendirilememiş olması.

4)İmmunohistokimyasal değerlendirme yapmak için siparişi verilen antikorun zamanında temin edilememesi nedeniyle α-sin modelinin oluşup oluşmadığının şimdilik sadece davranış testleri ile değerlendirilebilmiş olması. Ancak çıkarılacak beyin dokularında, antikor temin edildiği zaman boyamalar yapılabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında alfasinükleinopati oluşumunu icv kombine plazmid ve alfa-sinüklein PFF enjeksiyonu ile daha kısa sürede gerçekleşmesi ve alfa 2 adrenerjik reseptör agonisti olan brimonidinin bu patolojiye karşı olası nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Önerilen modelin geçerliliği anksiyete, öğrenme-bellek işlev bozuklukları, motor diskoordinasyon ve otonomik disfonksiyonların değerlendirilmesine yönelik davranış deneyleri ile test edilmiştir.

Kombine modelle oluşturduğumuz alfasinükleinopati sonucunda yapılan açık alan testinde anksiyetede artış olduğu gözlenmiştir. Zamanla anksiyete bütün gruplarda artmıştır. Ancak YAL testinde alfasinükleinopati oluşturulan grupta diğer gruplardan farklı bir anksiyete oluşumu gösterilememiştir. Bu sonuçlardan deneylerin yapıldığı davranış laboratuvarının taşınmasının yarattığı ortam değişikliğinin bütün gruplarda anksiyeteyi arttırdığı düşünülmüştür.

Alfasinükleinopati ile oluşturulan PH sıçan modelinde öğrenme-bellek fonksiyonlarında da gerileme olduğu söylenebilir. Hafızayı test etmek için uygulanan YNT'nde eski nesneyi hatırlamada başarısız oldukları gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar modelin oluşturulmasından sonra 2. ayda da gözlenmiştir. Uzaysal hafıza üzerindeki etkiyi değerlendirmek için yapılan MSL testinde platformun yerini bütün gruplar öğrenirken *prob* testinde alfasinükleinopati oluşturulan grup platformun yerini hatırlamada başarısız olmuştur. Ayrıca 14. günde yapılan retansiyon deneyinde presipitasyon belleği değerlendirildiğinde de başarısız oldukları gözlemlenmiştir.

Alfasinükleinopati ile oluşturulan PH modelinde bilişsel bozukluklar gibi motor fonksiyonlarda da azalma gözlenmiştir. Katalepsi benzeri donakalım için yapılan dikey tel testinde α-sin patolojisine sahip hayvanların tel üzerinde daha uzun süre hareketsiz kaldıkları görülmüştür. Bu sonuçlar da modelin oluşturulmasından sonraki 2. ayda gösterilebilmiştir. Hayvanların motor koordinasyonlarının değerlendirildiği yatay merdivende yürüme testinde patolojinin oluşturulmasıyla daha çok hata yaptıkları ayrıca hızlarında da azalma olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu da yine 2. ayda gözlenmiştir. Rot-a-rod testi ile de, patoloji oluşturulan grubun döner mil üzerinden daha çabuk düştüğü, motor

koordinasyonda bozulma olduğu gözlenmiştir. Rot-a-rod testinde bu sonuç 4. ayda oluşmuştur.

Otonomik disfonksiyon değerlendirilmesi için yapmış olduğumuz *hot plate* testinde de alfasinüklein patolojisinin ağrı reaksiyonuna verilen tepkiyi geciktirdiği gözlenmiştir.

Nöroprotektif etkisini beklediğimiz brimonidin tedavisi genel olarak alfasinükleinopatinin oluşturduğu bilişsel ve motor bozukluklardaki bozulmaları düzeltememiştir. Sadece otonomik difonksiyonun değerlendirildiği *hot plate* testinde ağrı reaksiyonuna verilen tepki süresini bir miktar kısalttığı gözlenmiştir.

Alfasinükleinopati ile oluşturulan PH modelleri motor ve motor dışı belirtileri çalışmak için iyi modellerdir. Tek başına alfa-sinüklein PFF uygulaması ile yaklaşık 6. ayda oluşturulan modelin α-sin proteinini kodlayan genin mRNA' sını taşıyan plazmid ile kombinasyon halinde uygulanması modelin daha kısa sürede oluştmasını sağlamıştır. Bu sürecin sadece davranış deneyleri ile değil, immunohistokimyasal boyamalarla kanıtlanması daha kesin sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

Alfa-sinüklein enjeksiyonunun striatum, SN gibi dopaminerjik nöron hasarının daha spesifik gerçekleşeceği bölgelere yapılması PH sıçan modeli için daha hızlı sonuçlar verebilir. Zamana bağlı patolojinin daha iyi değerlendirilebilmesi için daha çok deney hayvanı üzerinde çalışıp daha kısa periyodlarda davranış deneyleri ve immünohistokimyasal analizler yapılabilir.

Alfa-sinüklein aşırı ifadelenmesi dışında PH sıçan modelinin değerlendirilmesinde dopaminerjik denervasyon miktarını tespit etmek amacıyla immünohistokimyasal olarak tirozin hidroksilaz enzim düzeyi, NeuN proteini miktarı saptanabilir.

PH tedavisinde şu ana kadar geliştirilmiş en iyi tedavi L-DOPA tedavisidir. Ancak bu tedavinin de yarattığı yan tesirler bakımından olumsuzlukları mevcuttur. PH'nın henüz kesin bir tedavisi bulunmadığı için var olan tedavilerin amacı hastalığın semptomlarını gidermektir. Ancak bu hastalığın tedavisinde asıl amaç hastalığın ilerleyişini durdurmak ve nöroprotektif etki sağlayacak bir mekanizma olmalıdır. Bu sebeple nöroprotektif ajanların geliştirilmesine yönelik araştırmalara daha fazla önem verilmelidir.

Bu tez çalışmasının olumlu bir yönü de modeli cinsiyet faktöründen bağımsız elde edilen bulgularla test edilmiş olmasıdır. PH gibi her iki cinsiyeti de etkileyen bir hastalık için bu önemli bir avantajdır. Ancak her iki cinsiyet grubundan daha fazla sıçan üzerinde tekrar çalışmalarının yapılması ve bulguların cinsiyet faktörü özelinde değerlendirilmesi gereklidir. Bu durum belki de bazı verilerimizde hesaplanan yüksek standart sapma değerlerini önleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Raza C, Anjum R, Shakeel NA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. Life Sciences 2019; 226: 77-90.
2. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos Rai, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging 2003; 24: 197-211.
3. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 1997;388:839-840.
4. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Aging and Parkinson's disease: different side of the same coin. Mov Disord 2017;32(7):983-90.
5. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. Nat Rev Neurosci. 2011;12(6):359-366.
6. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 2012**;**18(1):183-185.
7. Lee Y, Dawson VL, Dawson TM. Animal model of Parkinson's disease: Vertebrate genetics. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2: a009324.
8. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. Front Neu- roanat 2014; 8: 155.
9. Marcic TS, Belyea DA, Katz B. Neuroprotection in glaucoma: amodelfor Neuroprotection in optic neuropathies. Current Opinion in Ophthalmology 2003;14:353–356.
10. Gao H, Qiao X, Cantor LB. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. Surv Opthalmol 2002;120:797-803.
11. Duvoısın R. Hıstory of Parkınsonısm. Pharmac. Ther 1987;32:1-17.
12. Garcia Ruiz PJ. Prehistory of Parkinson's disease. Neurologia 2004;19(10):735-737.
13. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. J Neural Transm 2017;124(8):901-905.
14. Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. Movement Disorders. 2008;23(3):497-508.

15. Dexter, DT, Jenner, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. FreeRadic. Biol.Med. 2013;62:132-144.
16. Dorsey ER, Elba A. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol 2018; 17: 939–53.
17. Dickson DW, Braak H, Duda JE ve ark. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refi ning the diagnostic criteria. Lancet Neurol 2009; 8: 1150–57.
18. Lardenoijea R, Iatroua A, Kenisa G ve ark. The epigenetics of aging and neurodegeneration. Prog Neurobiol. 2015; 131: 21–64.
19. Moustafa AA, Chakravarthy S, Joseph R. ve ark. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2016;68:727-740.
20. Bohnen N, Frey KA, Studenski S ve ark. Gait speedin Parkinson's diseae correlates with cholinergic degeneration. Neurology 2013;81(18), 1611-1616.
21. Fox SH. Non-dopaminergic treatments for motor control in Parkinson's disease. Drugs 2013;73(13),1405-1415.
22. W. Poewe, M.D. The natural history of Parkinson's disease. J Neurol 2006 ;253(7): VII/2–VII/6.
23. Benito MG, Granado N, García-Sanz P ve ark. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. Front. Pharmacol. 2020;11:356.
24. Aras B, Aras Ö, Kabay SC. İdyopatik Parkinson Tanılı Hastalarda Birleşik Parkinson Hastalığı DEğerlendirme Ölçeği (UPDRS) ve Denge Skorları Arasındaki İlişiğin İncelenmesi. TÜBAV Bilim 2009;2(2):239-242.
25. Pang SY, Ho PW, Liu HF ve ark. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. Pang et al. Translational Neurodegeneration 2019; 8:23.
26. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. Animal models of Parkinson's disease. 2014; 8:155.
27. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal Models of Parkinson's Disease. BioEssays 2002; 24:318.
28. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. FEBS Journal 2002;279:1156–1166. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x
29. Ungerstedt U. 6-hydroxy-dopamme reduced degeneratton of central monoamme neurons, European J. Pharmacol 1968;5: 107-110.

30. Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. Biochem Pharmacol 1975;24:1-8.
31. Perese DA, Ulman J, Viola J, ve ark. A 6-hydroxy-dopamine-induced selective Parkinsonian rat model. Brain Res 1989;494:285-293.
32. Przedborski S, Levivier M, Jiang H ve ark. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxy-dopamine. Neuroscience 1995:67:631-647.
33. Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. Parkinsonism Relat Disord 2008;14:124-129.
34. Testa CM, Sherer TB, Greenamyre JT. Rotenone induced oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra culture. Brain Res Mol Brain Res 2005;134:109-118.
35. Gubellini P, Kachidian P. Animals models of Parkinson's disease: An updated overview. Rev neurol(Paris). 2015;171(11):750-761.
36. Fei Q, McCarmack AL, Di Monte DA ve ark. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. J Biol Chem 2008; 283:3357-3364.
37. Manning-Bog AB, McCarmack DA, Li J, ve ark. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J Biol Chem 2002;277:1641-1644.
38. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disesase: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. Cell Tissue 2004;318:225-241.
39. Barlow BK, Lee DW, Cory-Slecha DA ve ark. Modulation of antioxidant defence systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. Neurotoxical 2005;26:63-75.
40. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. Parkinsonism and Related Disorders 2012;18(1): 183–185.
41. Zimprich A, Muller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, et al. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. Am J Hum Genet 2004; 74: 11-19.
42. Wintermeyer P, Kruger R, Kuhn W ve ark. Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. Neuroreport 2000; 11: 2079-2082.

43. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredicik, ve ark. 100 years of Lewy pathology. Nat Rev Neurol 2013;9:13-24.
44. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997;276:2045-2047.
45. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidau E ve ark. Pathological roles of α-synuclein in neurological disorders. Lancet Neurol 2011;10:1015-1025.
46. Kitada T, Asakawa S, Hattori N ve ark.Mutations in the parkins gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 1998;392:605-608.
47. Shimura H, Hattori N, Kubo S ve ark. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet 2000;25:302-305.
48. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V ve ark. Classic and New Animal models of Parkinson's disease. J Biomed Biotechnol 2012;2012:845618.
49. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V ve ark. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science 2004;304:1158-1160.
50. Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 Causes mithochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. Proc Natl Acad Sci 2008;105(32):11364-11369.
51. Goldberg MS, Pisoni A, Haburcak M ve ark. Nigrostriatal dopaminerjic decifits and hypokinesia caused by inactivation of familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. Neuron 2005;45:489-496.
52. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H ve ark. Hypersensitivity of DJ-1 deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrindine (MPTP) and oxidative stress. Proc Natl Acad Sci. 2005;102:5215-5220.
53. Li Y, Liu W, Oo TF ve ark. Mutant LRRK2R14416 BAC Transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. Nat Neurosci. 2009;12(7): 826-828.
54. Chen Y, Wang YH, Chien KY ve ark. (G2019S) LRRK2 Activates MKK4-JNK Patway and Causes Degeneration of SN Dopaminergic Neurons in a Transgenic Mouse model of PD. Cell Death Differ. 2012;19(10): 1623-1633.
55. Chung HK, Ho H, Perez-Acuna D ve ark. Modeling α-Synuclein Propagation with Preformed Fibril Injections. J Mov Disord 2019;12(3):139-151.
56. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. FEBS lett. 1994;345(1):27-32.

57. Clayton DF, George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegeneration disorders. J Neurosci Res. 1999;58:120-129.
58. Sun F, Anantharam V, Jin H. Neuroprotectıve and neurotoxıc propertıes of α -synucleın ın cell culture models of dopamınergıc degeneratıon. Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems 2008:475-490.
59. Goedert M. Alpha-synucleın and neurodegeneratıve dıseases. Neuroscıence 2001;2:492-500.
60. Guerrero-Ferreira R, Kovacik L, Ni D ve ark.. New insights on the structure of alpha-synuclein fibrils using cryo-electron microscopy. Current Opinion in Neurobiology 2020; 61:89–95.
61. Crowther RA, Jakes R, Spillantini MG ve ark. Synaptic filaments assembled from c-terminally truncated alpha-synuclein. FEBS Lett. 1998;436(3):309-312.
62. Xu L, Pu J. Alpha-synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. Parkinson's Dis. 2016;2016:1720621.
63. L. Stefanis. a-Synuclein in Parkinson's Disease. Cite this article as Cold Spring Harb Perspect Med 2012;4:a009399.
64. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A ve ark. The Many Faces of Alpha-synuclein: From structure and Toxicity to Therapeutic Target. Nat Rev Neurosci. 2012;14(1):38-48.
65. Neumann M, Müller V, Kretzchmer HA ve ark. Regional distribution of proteinase K-resistant α-synuclein correlates with Lewy body disease stage. J Neuropathol Exp Neurol. 2004;63:1225-1235.
66. Cheng F, Li X, Li Y ve ark. Alpha-synuclein promotes clathrin-mediated NMDA receptor endocytosis and attenuates NMDA-induced dopaminergic cell death. J Neurochem. 2011;119:815-825.
67. Belluccia A, Zaltieria M, Navarria L ve ark. From α-synuclein to synaptic dysfunctions: New insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. Brain Research 2012;1476: 183 – 202.
68. Fields CR, Bengoa-Vergniory N, Wade-Martins R. Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson's Disease. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2019;12:299.
69. Alegre-Abarrategui J, Brimblecombe KR, Roberts RF, ve ark. Selective vulnerability in α-synucleinopathies. Acta Neuropathol. 2019;138:681-704.
70. Burre J, Sharma M, Tsetsenis T ve ark. α-synuclein promotes SNARE-complex asembly in vivo and in vitro. Science. 2010;329:1663-1667.

71. Choi BK, Choi MG, Kim JY, ve ark. Large α-synuclein oligomers inhibits neuronal SNARE-mediated vesicle docking. Proc Natl Acad Sci. 2013;110:4087-4092.
72. Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, ve ark. α-synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. Sci Transl Med. 2016;8:342-378.
73. Wang W, Perovic I, Chittuluru J, ve ark. A soluble α-synuclein construct forms a dynamic tetramer. Proc Acad Sci. 2011;108:17797-17802.
74. Braak H, Rüb U,Gai WP ve ark. Idiopathic Parkinson's disease: Possible Routes by which Vulnerable Neuronal Types may be subject to Neuroinvasion by an unknown pathogen. J Neurol Transm. 2003;110(5):517-536.
75. Kim S, Kwan SH, Kam TI ve ark. Transneuronal Propogation of Pathologic α-synuclein from the Gut to the Brain models of Parkinson's Disease. Neuron. 2019;103(4):627-641.
76. Nicole K. Polinskia, Laura A. ve ark. 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: 303–322.
77. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Lee VM. Addition of exogenous α-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitments ofendogenous α-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. Nat Protoc.2014;9:2135-2146.
78. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, ve ark. Exogenous α-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. Neuron. 2011;72:57-71.
79. Pattersona JP, Duffya MF, Kemp CJ ve ark. Time course and magnitude of alpha-synuclein inclusion formation and nigrostriatal degeneration in the rat model of synucleinopathy triggered by intrastriatal α-synuclein preformed fibrils. Neurobiology of Disease 2019;130: 104525.
80. Singh N, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. Neurobiology 2007;81: 29–44.
81. Stoker TB, Barker RA. Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease. F1000Research 2020;9 :862.
82. Smith Y, Wichmann T, Factor SA ve ark. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. Neuropyschopharmacology. 2012;37(1):213-246.

83. Olanow CW, Agid Y, Mizuro Y. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. Mov Disord. 2004;19(9):997-1005.
84. Emre M,editör. Parkinson Hastalığı. GüneşTıp Kitapevi;2010.
85. Goetz CG, Poewe W, Rascol O ve ark. Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's diseae:2001 to 2004. Mov Disord. 2005;20(5):523-539.
86. Racol O, Brooks DJ, Korczyn AD ve ark. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. New England Journal of Medicine. 2000;342:1484-1491.
87. Whone AL, Watts RL, Stoess AJ ve ark Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: the REAL-PET study. Annals of Neurology. 2003;54:93-101.
88. Saygı M. Rotenon modeli ile Parkinson oluşturulan sıçanlarda davranışsal değişikliklerin değerlendirilmesi ve bu modelde yeşil çay polifenollerinin etkililiğinin araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul: İstanbul üniversitesi;2010.
89. Dewey RB, Hutton JT, LeWitt PA ve ark. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on subcutaneously injected apomorphine for parkinisonian off-state event. Archive of Neurology. 2001;58:1385-1392.
90. Maggio R, Riva M, Vaglini F ve ark. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotropic factors. J Neurochem. 1998;71(6):2439-2446.
91. Acuna-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M ve ark. Melatonin is protective aganist MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. Life Sci. 1997;60(2):23-29.
92. Schwab AD, Thurston MJ, Machhi J ve ark. Immunotherapy for Parkinson's disease. Neurobiology of Disease 2020;137: 104760.
93. Samis Mz. Metzdorf J, Ciftci E ve ark. Emerging Immunotherapies for Parkinson Disease. Neurol Ther 2019; 8:29–44.
94. Chyniak O, Dubenko O, Potapov O ve ark. Parkinson's Disease — overview of Modern Treatment Methods. EUMJ 2023;11(1):1-13.
95. Jankovic J, Poewe W. Therapies in Parkinson's disease. Curr Opin Neurol. 2012;25(4):433-447.
96. Cantor LB, Burke J. Brimonidine, Expert Opinion on Investigational Drugs, 1997;6(8): 1063-1083.

97. Acar SE, Sarıcaoğlu MS, Çolak A ve ark. Geçici Retinal İskemi Modelinde Brimonidinin Mikroglia Morfolojisi Üzerine Etkileri: Brimonidin Nöroinflamasyonu Baskılıyor mu? TOD53. Ulusal Kongre; 6-10 Kasım 2019; Antalya, Türkiye.
98. Platas T. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. Neuroinflammation 2014;11:12.
99. Ramirez AI, Hoz R, Garcia ES ve ark. The role of microglia in retinal Neurodegeneration: Alzheimer disease, Parkinson and glaucoma. Front Aging Neurosci. 2017;9:214.
100. Nilforushan N. Neuroprotection in Glaucoma. Journal of Ophthalmic and Vision Research 2012;7(1).
101. J. Cai, J. Li, W. Liu ve ark. Alpha2-adrenergic receptors in spiral ganglion neurons may mediate protective effects of brimonidine and yohimbine against glutamate and hydrogen peroxide toxicity. Neuroscience 2013;228: 23–35.
102. Lai RK, Chun T, Hasson D ve ark. Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. Vis Neurosci. 2002;19:175-185.
103. Donello JE, Padillo EU, Webster ML ve ark. α2- adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and perserve retinal function after transient ischemia. J Pharmacol Exp Ther. 2001;296:216-223.
104. Yukita M, Omodaka K, Machida S ve ark. Brimonidine Enhances the Electrophysiological Response of Retinal Ganglion Cells through the Trk-MAPK/ERK and PI3K Pathways in Axotomized Eyes. Current Eye Research 2017;42(1):125-133.
105. Tyan SW, Tsai MC, Lin CL ve ark. Serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances zif268 expression through the mediation of SRF and CREB1 associated with spatial memory formation. Journal of Neurochemistry 2008; 105: 820–832.
106. Abdallah B, Hassan A, Benoist C ve ark. A Powerful Nonviral Vector for In Vivo Gene Transfer into the Adult Mammalian Brain: Polyethylenimine. Human Gene Therapy 1996;7:1947-1954.
107. Thakura P, Bregera LS, Lundblada M ve ark. Modeling Parkinson's disease pathology by combination of fibril seeds and α-synuclein overexpression in the rat brain. PNAS 2017: E8284–E8293.
108. Koç A, Görmüş ZI. Deney Hayvanlarında Anksiyete Çalışmaları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2018; 11 (2): 51-57.

109. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors :a review. Eur J Pharmacol. 2003;463:3-33.
110. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behav Brain Res. 1988;1:83-92.
111. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 1984;11(1):4760.
112. Uzbay IT. L-NAME precipitates catatonia during ethanol withdrawal in rats. Behavioural Brain Research 2001;119:71–76.
113. Metz GA, Whishaw IQ. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. Journal of Visualized Experiments. 2009;12(28):1204.
114. Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoğlu A ve ark. Therapeutic Effects of Coenzyme Q10 and Remacemide in Transgenic Mouse Models of Huntington's Disease. The Journal of Neuroscience 2002;22(5):1592-1599.
115. Mulder GB, Pritchett K. Rodent Analgesiometry: The Hot Plate, Tail Flick and Von Frey Hairs. American Association for Laboratory Animal Science 2004:45(3):54-55.
116. Eschbach J, Danzer KM. Alpha-synuclein in Parkinson's disease: pathogenic function and translation into animals. Neurodegener Dis. 2014;14(1):1-17.
117. Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, ve ark. Ubiquinone (Coenzyme Q10) and Mitochondria in Oxidative Stress of Parkinson's Disease. BiolSignals Recept 2001; 10: 224–253.
118. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Lancet Neurol 2008; 7: 97-109.
119. Dauer, W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron 2003;39: 889–909.
120. Forno LS, DeLanney LE, Irwin I ve ark. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonsim and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. Adv. Neurol. 1993;60: 600–608.
121. Gordon R, Albornoz EA, Christie DC ve ark. Inflammasome inhibition prevent α-synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. Sci Transl Med. 2018; 10(465).
122. Luk KC, Kehm V, Carroll J ve ark. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. Science 2012;338:949–953.

123. Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S ve ark. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. Neurobiol. Dis. 2001;8, 535–539.
124. Nuber S, Harmuth F, Kohl Z ve ark. A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of alpha-synuclein in BAC-transgenic rats. Brain 2013;136: 412–432.
125. Su X, Fischer D, Li X ve ark. AlphaSynuclein mRNA is not increased in sporadic PD and alpha-Synuclein accumulation does not block GDNF signaling in Parkinson's disease and disease models. Mol. Ther. 2017;25: 2231–2235.
126. Duffy MF, Collier TJ, Patterson JR ve ark. Quality over quantity: advantages of using alpha-Synuclein preformedfibril triggered Synucleinopathy to model idiopathic Parkinson's disease. Front. Neurosci. 2018;12: 621.
127. Abdelmotilib H, Maltbie T, Delic V, ve ark. Alpha-Synucleinfibril-induced inclusion spread in rats and mice correlates with dopaminergic Neurodegeneration. Neurobiol. Dis. 2017;105:84–98.
128. Paumier KL, Luk KC, Manfredsson FP ve ark. Intrastriatal injection of pre-formed mouse alpha-synucleinfibrils into rats triggers alpha-synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. Neurobiol. Dis.2015; 82:185–199.
129. Duffy MF, Collier TJ, Patterson JR, ve ark. Lewy body-like alphasynuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. J. Neuroinflammation 2018;15(1):129.
130. Harms AS, Delic V, Thome AD. α-Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. Acta Neuropathologica Communications 2017; 5:85.
131. Rey NL, George S, Steiner JA ve ark. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α‑synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. Acta Neuropathologica 2018; 135:65–83.
132. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M ve ark. Neuroprotection of Retinal ganglion Cells by Brimonidine in Rats with Laser-Induced Chronic Ocular Hypertension. Investigative Ophthalmology Visual Science. 2001;42(12):2849-2885.
133. Janakiraman U, Manivasagam T, Thenmozhi AJ ve ark. Influences of chorinc mild stress exposure on motor, non-motor impairments and neurochemical variables in

specific brain areas of MPTP/Probenecid induced neurotoxicity in mice. PLos One. 2016;11(1):e0146671.

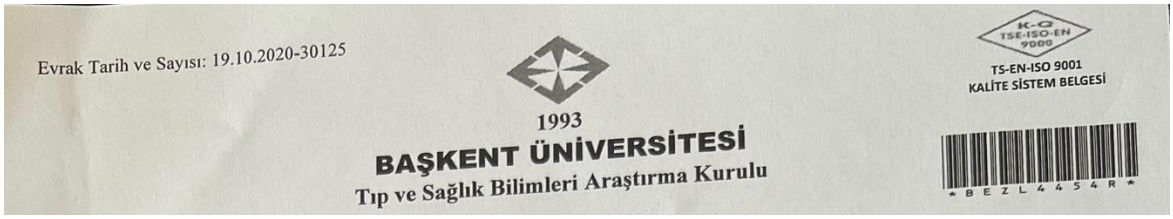
134. Tunç T, Emre U, Coşkun Ö. Parkinson Hastalığında Anksiyete Bozukluğu. Parkinson Hast. Hareket Boz. Der., 2007;10(1-2): 22-25.
135. Rossi M, Perez-Lloret S, Millar Vernetti P ve ark. Olfactory dysfunction evaluation is not affected by comorbid depression in Parkinson's disease. Mov. Disord.: Off. J. Mov. Disord. Soc. 2015;30(9):1275–1279.
136. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review. JAMA 2020;323 (6):548–560. https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360.
137. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. Lancet (London, England) 2015;386 (9996), 896–912.
138. Schrag A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease An Update. Neurol 2004; 251: 795–804.
139. Fortuna JTS, Gralle M, Beckman D ve ark. Brain infusion of α-synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson's disease-like symptoms in mice. Behav. Brain Res. 2017;333:150–160.
140. Prediger RD, Matheus FC, Schwarzbold ML ve ark. Anxiety in Parkinson's disease: a critical review of experimental and clinical studies. Neuropharmacology. 2012;62(1):115-124.
141. Solari N, Bonito-Oliva A, Fisone G ve ark. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. Learn Mem.2013;20(10):592-600.
142. Bruck A. Hippocampal and Prefrontal Atrophy in Patients with Early Nondemented Parkinson's Disease is Related to Cognitive Impairment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004;75(10):1467–9.
143. Palavra NC, Naismith SL, Lewis SJG. Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease: A Review of Current Concepts Neurology Research International, vol. 2013, Article ID 576091, 2013.
144. Franziska Richter F, Milos Stanojlovic M, Kaufer C ve ark. A Mouse Model to Test Novel Therapeutics for Parkinson's Disease: an Update on the Thy1‑aSyn ("line 61") Mice. Neurotherapeutics 2023;20:97.
145. Xie C, Prasad AA. Probiotics Treatment Improves Hippocampal Dependent Cognition in a Rodent Model of Parkinson's Disease. Microorganisms 2020;8:1661.

146. Bonito-Oliva A, Pignatelli M, Spigolon G ve ark. Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. Biol Psychiatry. 2014;75(9):701-710.
147. Cui Z, Feng R, Jacobs S ve ark. Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. Sci Rep. 2013;3:1036.
148. De-mello N, Souza-Junior IQ, Carobrez AP. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. Behav Brain Res. 2005;158(2): 263-268.
149. Tadaiesky, MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP ve ark. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. Neuroscience2008;156: 830–840
150. Campos F, Carvalho M, Cristovao A, ve ark Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor symptomatology. Front. Behav. Neurosci. 2013; 7:175.
151. Au-Nunez J. Morris Water Maze Experiment. J. Vis. Exp. 2008;19: 897.
152. Masliah E, Rockenstein E, Mante M ve ark. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. PLoS One. 2011;6(4):e19338.
153. Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S. Cognitive-Enhancing Effect of Quercetin in a RatModel of Parkinson's Disease Induced by 6-Hydroxydopamine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012;2012:823206.
154. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M ve ark. Prion-like spreading of pathological a-synuclein in brain. Brain 2013;136:1128–1138.
155. Kirik D, Rosenblad C, Burger C ve ark. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. J Neurosci. 2002;22(7):2780-2791.
156. Hoffman DC, Donovan H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. Psychopharmacology (Berl), 1995;120(2): 128-33.
157. Lorenc-Koci E, Wolfarth S, Ossowska K. Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity. Exp Brain Res, 1996; 109(2):268-76.
158. Rodriguez Diaz M. Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. Behav Brain Res, 2001;122(1): 79-92.

159. Srinivasan J, Schmidt WT. Intensification of cataleptic response in 6hydroxydopamine-induced neurodegeneration of substantia nigra is not dependent on the degree of dopamine depletion. Synapse, 2004;51(3): 213-218
160. Faraji J, Metz GA. Sequential bilateral striatal lesions have additive effects on single skilled limb use in rats. Behav Brain Res 2007;177:195-204.
161. Metz GA, Whıshaw IO. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopaminedepleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. Neuroscience 2002;.111(2): 325-33.
162. Gaugler MN, Genc O, Bobela W ve ark. Nigrostriatal overabundance of alpha-synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. Acta Neuropathol. 2012;123(5):653-669.
163. Abeliovich A, Schmit Y, Farinas I ve ark. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficist in the nigrostriatal dopamine system. Neuron.2000;25(1):239-252.
164. Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. Brain Res. 1983;287(2):173-196.
165. Jovanovic MZ, Stanojevic J, Stevanovic I ve ark. Intermittent Theta Burst Stimulation Improves Motor and Behavioral Dysfunction through Modulation of NMDA Receptor Subunit Composition in Experimental Model of Parkinson's Disease. Experimental Model of Parkinson's Disease. Cells 2023;12;1525.
166. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M ve ark. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2001;42(12:2849-2855).
167. Orii Y, Kunikane E, Yamada Y. ve ark. Ocular Distribution of Brimonidine and Brinzolamide after Topical Instillation of a 0.1% Brimonidine Tartrate and 1% Brinzolamide Fixed-Combination Ophthalmic Suspension: An Interventional Study. J. Clin. Med. 2023;12: 4175.
168. Kim HS, Chang YI,KIM JH ve ark. Alteration of retinal intrinsic survival signal and effect of [alpha]2–adrenergic receptor agonist in the retina of the chronic ocular hypertension rat. Vis. Neurosci.2007;24(2):127-139.
169. Hernandez M, Urcola JH, Vecino E. Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments. Exp. Eye Res. 2008;86(5):798-806.
170. Ma K, Xu L, Zhang H ve ark. Effect of Brimonidine on Retinal Ganglion Cell Survival in an Optic Nerve Crush Model. Am. J. Ophthalmol. 2009;147(2):326–331.

171. Yiğit U. An immunohistochemical analysis of the neuroprotective effects of memantine, hyperbaric oxygen therapy, and brimonidine after acute ischemia reperfusion injury. Mol. Vis.2011;17:1024–1033.
172. Knels L, Worm M, Wendel M ve ark. Effects of advanced glycation end products-inductorglyoxal and hydrogen peroxide as oxidative stress factors on ratretinal organ cultures and neuroprotection by UK-14. J Neuchem. 2008;106:1876-1887.
173. Ozdemir G, Tolun FI, Gül M ve ark. Retinal oxidative stress induced by intraocular hypertension in rats may be ameliorated by brimonidine treatment and N-acetyl cysteine supplementation. J Glaucoma. 2009;18:662-665.
174. Ma D, Rajakumaraswamy N, Maze M. α_2 Adrenoceptor agonists: shedding light on neuroprotection? British Medical Bulletin 2005;71:77-92.
175. Walters TR. Development and Use of Brimonidine in Treating Acute and Chronic Elevations of Intraocular Pressure: A Review of Safety, Efficacy, Dose Response and Dosing Studies. Survey of Ophthalmology 1996;41(1):19-26.
176. Enyedi LB, Freedman SF. Safety and Efficacy of Brimonidine in Children with Glaucoma. Journal of AAPOS. 2001;5(5):281-284.
177. Bowman RJC, Cope J, Nischal KK. Ocular and systemic side effects of brimonidine 0.2% eye drops in children. Eye 2004;18:24-26.

EK 1: ETİK KURUL ONAYI



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI		
TOPLANTI SAYISI	**KARAR SAYISI**	**KARAR TARİHİ**
07	20/12	14/09/2020