

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİTİN (DHA) nNOS
YOLAĞINA ETKİSİ**

Hande PARLAK

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİTİN (DHA) nNOS
YOLAĞINA ETKİSİ

Hande PARLAK

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysel AĞAR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje no: 2013.02.02.0122.011)

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

Antalya, 2015

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../.../2015

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye

:

Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye

:

Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye

:

Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye

:

Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



ONAY: Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../2015 tarih ve ... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

ÖZET

Parkinson hastalığı (PH), substansiya nigra'nın pars kompakta (SNpc) bölgesinde dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize olan ve Alzheimer hastalığından sonra en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıktır. Dokosaheksaenoik asit (DHA), beynin fosfolipid tabakasında bulunan ve hücre fonksiyonlarının devamı için gerekli temel çoklu doymamış yağ asidi (PUFA)'dir. Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-arjininden sentezlenen bir nörotransmitterdir. Oksidasyonu ile hücrede nitrozatif stresi meydana getiren reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. Oluşan radikaller hücrede lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. 1-metil-4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) ile deneysel parkinson modeli oluşturulan farelerde nNOS aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Çalışmamız, deneysel parkinson modelinde DHA uygulaması ile dopaminerjik nöron apoptozunu önlemede, nNOS fosforilasyonunun rolünü araştırmak üzere planlanmıştır.

3 aylık erkek C57BL/6 fareler rastgele 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol (K) grubu, DHA verilen grup (DHA), deneysel parkinson modeli oluşturulan grup (MPTP), DHA verilen ve deneysel parkinson modeli oluşturulan grup (DHA + MPTP). DHA (36 mg/kg/gün), 4 hafta boyunca DHA ve DHA+MPTP gruplarına gavaj yoluyla uygulanmıştır. Deneysel parkinson modeli 23.günde intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanan MPTP nörotoksini (4x20 mg/kg, 2 saat aralıklarla) ile oluşturulmuştur. Motor aktivite tayini; çubuk testi ile bradikinezi şiddetinin belirlenmesi, lokomotor aktivite testi ve rotarod testi ile değerlendirilmiştir. Substansiya nigra (SN) dokusu apoptoz belirteci kaspaz-3 aktivitesi, nitrozatif stres göstergesi nitrit/nitrat düzeyi ve lipid peroksidasyon 4-hidroksi nonenal (4-HNE) düzeyleri ticari kitler yardımıyla ölçülmüştür. SN'deki dopaminerjik hücre sayısı tirozin hidroksilaz (TH) enzimi ile, nNOS ve fosfo-nNOS enzim ekspresyonları spesifik NOS immünreaktif hücrelerin immünohistokimyasal analizi ile tespit edilmiştir.

Deneysel parkinson modeli oluşturulan farelerde bradikinezi şiddetini gösteren çubuk testinde geri dönüş ve total iniş sürelerinin uzadığı, DHA verilmesinin ise sürelerde kısalma neden olduğu görülmüştür. Locomotor aktivite testinde deneysel parkinson modeli oluşturulan grupta ambulatuvar aktivite, mesafe ve toplam lokomotor aktivitelerde azalma görülmüştür. DHA+MPTP grubu ile MPTP grubu karşılaştırıldığında, aktivitenin artmış olduğu izlenmiştir. Motor koordinasyonun ve dengenin göstergesi olan rotarod testinde 40 rpm düzeyinde MPTP grubunda dönen çubuk üzerinde kalma süreleri kısalırken DHA+MPTP grubunda sürenin uzadığı görülmüştür. Kaspaz-3 aktivite sonuçlarının MPTP grubunda kontrol grubuna kıyasla arttığı, DHA+MPTP grubunda ise MPTP grubuna göre önemli bir fark yaratmadığı bulunmuştur. Nitrit-nitrat ve 4-HNE düzeyleri MPTP grubunda artış göstermiştir. MPTP grubuyla karşılaştırıldığında, DHA+MPTP grubunda nitrit/nitrat ve 4-HNE düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. SN'de TH içeren nöron sayıları incelendiğinde birim alandaki TH+ hücre sayısı MPTP grubunda anlamlı şekilde azalmış, DHA verilen MPTP grubunda ise MPTP grubuna kıyasla artış göstermiştir. nNOS enzim ekspresyonları MPTP grubunda kontrole oranla artmış, DHA uygulanan MPTP grubunda ise belirgin şekilde azalmıştır. nNOS enzim fosforilasyonu değerlendirildiğinde, MPTP grubuna kıyasla DHA+ MPTP grubunda nNOS Serin 847 fosforilasyonunun arttığı görülmüştür. Bu durum, Serin 847 fosforilasyonu ile nNOS aktivitesinin azalarak dopaminerjik hücrelerin ölümünün engellendiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Parkinson, DHA, MPTP, nNOS, Lipid Peroksidasyon

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta (SNpc). PD is recognized as the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. Docosahexaenoic acid (DHA), which is the major polyunsaturated fatty acid (PUFA) found in the phospholipid fractions of the brain, is essential for normal cellular functions. Nitric oxide (NO) is a neurotransmitter synthesized from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). Oxidation of NO yields reactive oxygen species (ROS) causing nitrosative stress in cells by triggering lipid peroxidation. An increased neuronal NOS (nNOS) activity was reported in the experimental model of PD elicited by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice. The present study is designed to investigate the role of nNOS phosphorylation in the prevention of apoptosis by administration of DHA to the experimental PD model.

Three months old male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups as: Control (C), DHA-treated (DHA), MPTP-induced (MPTP), DHA-treated and MPTP-induced (DHA+MPTP). DHA was administered daily by oral gavage for four weeks (as 36mg/kg/day) to DHA and DHA+MPTP groups. Experimental PD model was utilized by consecutive intraperitoneal (ip) injections of the neurotoxin MPTP (4x20 mg/kg⁻¹ at 2-hr intervals) on the day 23. Motor activity of mice was evaluated by "pole test" (as a marker for the intensity of bradykinesia) as well as the tests of locomotor activity and rotarod. Using commercial kits, caspase-3 activity was measured as an apoptosis marker. Additionally, measurements of nitrite/nitrate and 4-HNE levels were performed as markers of nitrosative stress and lipid peroxidation, respectively. The number of the dopaminergic cells in substantia nigra (SN) was determined by immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase (TH)-immunopositive cells. Expression of the nNOS and phospho-nNOS enzymes was also determined in all tissue sections via immunohistochemical staining.

Pole test results showed an increased return and total down time in the MPTP-treated group, while DHA treatment decreased both parameters in the DHA+MPTP group. In MPTP-treated group, decreased ambulatory activity, distance and total locomotor activity were detected. These were restored by DHA treatment. As an indicator of motor coordination and balance, the rotarod test at 40 rpm showed that MPTP-treated animals exhibited shorter time on the rotating rod mill compared to the DHA+MPTP group. An increased caspase 3 activity was detected in the MPTP group compared to the control. However, it was not altered by DHA treatment. Nitrite/nitrate and 4-HNE levels were also significantly increased in SN of the MPTP-treated mice compared to the control. DHA treatment significantly attenuated these MPTP-induced alterations. Dopaminergic cell death in SNpc was significantly increased in the MPTP-treated group compared to the control. DHA treatment significantly diminished cell death in the DHA+MPTP group as compared to the MPTP-treated group. The expression of nNOS enzyme was significantly increased in the MPTP-treated group compared to the control. In addition, DHA treatment caused a significant decrease in nNOS expression in the DHA+MPTP group. Our immunohistochemistry results showed an elevated phosphorylation of nNOS on the serine 847 residue upon DHA treatment in the experimental PD model. Taken together, these results indicate that the phosphorylation at serine 847 may decrease the activation of nNOS which in turn protects dopaminergic neurons from death.

Key words: Parkinson, DHA, MPTP, nNOS, Lipid Peroxidation

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı ve Tarihçesi	3
2.1.1. Hastalığın Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Hastalığın Etiyolojisi	3
2.1.3 Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları	4
2.1.4. Dopamin ve Parkinson Hastalığı	5
2.1.5. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri	7
2.1.5.1. Bradikinezi	7
2.1.5.2. Tremor	7
2.1.5.3. Rijidite	8
2.1.5.4. Postural Bozukluklar	8
2.1.6. Parkinson Hastalığının Nöropatolojisi	8
2.1.7. Parkinson Hastalığı Deneysel Hayvan Modelleri	9
2.1.7.1. Parakuat ve Maneb	9
2.1.7.2. Rotenon	10
2.1.7.3. 6-OHDA	10
2.1.7.4. MPTP	10
2.1.8. Nöronların Dejenerasyonu	12

2.1.8.1.	Apoptoz ve Hücre Ölümü	12
2.1.8.1.1.	Apoptozun Mekanizmaları	13
2.1.8.2.	Protein Yanlış Katlanmaları, Çökelme ve Toksikite	14
2.1.8.3.	Oksidatif Stres	15
2.1.8.4.	Mitokondriyel Disfonksiyon	16
2.1.8.5.	Nöroinflamasyon	16
2.2.	Nitrik Oksit Sentaz (NOS)	17
2.2.1.	iNOS (NOS II)	18
2.2.2.	eNOS (NOS III)	19
2.2.3.	mtNOS (nNOS α)	19
2.2.4.	nNOS (NOS I)	19
2.2.5.	Reaktif Nitrojen Türlerinin Üretimi	21
2.2.6.	Nitrik Oksit ve Eksitotoksikite	21
2.2.7.	Nitrik Oksit ve DNA Hasarı	22
2.2.8.	Nitrik Oksit ve Protein Düzenlenmesi	22
2.2.9.	Nitrik Oksit ve Parkinson Hastalığı	23
2.2.10.	nNOS'un Fosforillenmesi	23
2.3.	EFA (Esansiyel Yağ Asitleri)	24
2.3.1.	DHA (Dokosaheksaenoik asit)	24
2.3.2.	Beyin PUFA Metabolizması	25
2.3.3.	PUFA'ların Beyin Plastisitesi Üzerine Etkileri	26
2.3.3.1.	Nöroenez	26
2.3.3.2.	Oksidatif Stres ve Apoptoz	26
2.3.3.3.	Nöroinflamasyon	27
2.3.4.	DHA'nın Etki Mekanizması	27
2.4.	Hipotez	28
GEREÇ VE YÖNTEMLER		29
3.1.	Gruplandırma	29
3.2.	Deney Protokolü	29

3.2.1.	DHA Uygulaması	29
3.2.2.	DeneySEL Parkinson Modelinin Oluşturulması	29
3.3.	Parametreler	29
3.3.1.	Ağırlık Takibi	29
3.3.2.	Motor Aktivite Tayini	29
3.3.2.1.	Bradikinezi şiddetinin Belirlenmesi	29
3.3.2.2.	Lokomotor Aktivite Testi	30
3.3.2.3.	Rotarod Testi	31
3.3.3.	Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların ıkarılması	32
3.3.4.	İmmünohistokimyasal Protokol	32
3.3.4.1.	Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	32
3.3.4.2.	İmmünohistokimya Yöntemi	33
3.3.5.	Biyokimyasal Parametreler	34
3.3.5.1.	Substansiya Nigra Nitrit/nitrat lümü	34
3.3.5.2.	Substansiya Nigra 4-HNE lümü	34
3.3.5.3.	Substansiya Nigra Kaspaz-3 Aktivite Tayini	35
3.3.5.4.	Protein Tayini	36
3.4.	Sonuçların Değerlendirilmesi	36
BULGULAR		37
4.1.	Genel Görünüm	37
4.2.	Ağırlık Değerışimi	37
4.3.	Motor aktivite Tayini	37
4.3.1.	Bradikinezi şiddetinin Değerlendirilmesi	37
4.3.2.	Lokomotor Aktivite Testi	38
4.3.3.	Rotarod Testi	40
4.4.	Biyokimyasal Parametreler	41
4.4.1.	SN Nitrit/Nitrat Sonuçları	40
4.4.2.	SN 4-HNE Sonuçları	42
4.4.3.	SN Kaspaz-3 Aktivite Sonuçları	43

4.5.	İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler	44
4.5.1.	TH içeren Nöron Sayısı	44
4.5.2.	Tirozin Hidroksilaz Ekspresyonu	45
4.5.3.	n-NOS (+) Nöron Sayısı	46
4.5.4.	nNOS Ekspresyonu	46
4.5.5.	p-nNOS (+) Nöron Sayısı	47
4.5.6.	p-nNOS Ekspresyonu	48
TARTIŞMA		50
SONUÇLAR		54
KAYNAKLAR		55
ÖZGEÇMİŞ		72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
6-OHDA	: 6-hidroksi dopamin
AA	: Araşidonik asit
ADP	: Adenozin difosfat
AH	: Alzheimer hastalığı
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AMPAR	: AMPA reseptörü
APO1	: Apoptoz antijen1
ASK1	: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1
ATP	: Adenozin trifosfat
BAD	: Bcl-2-associated death promoter
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
Bcl2A1	: B cell leukemia/lymphoma 2 related protein
BclXL	: B-cell lymphoma-extra large
BDNF	: Beyin türevli nörotrofik faktör
BH₄	: Tetrahidrobiyopterin
Bik	: BCL2-interacting killer
Bid	: BH3 interacting domain death agonist
Ca⁺²	: Kalsiyum
CaM-K	: Ca ²⁺ /kalmodulin bağımlı protein kinase
CaM-KIIα	: Kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz tip II alfa zinciri
CaM-KIV	: Kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz tip IV
CaM-KIα	: Kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz tip II alfa zinciri
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CD95	: Cluster of differentiation 95
cGMP	: Siklik guanozin mono fosfat
CIAP1	: Baculoviral IAP repeat-containing protein 2

CIAP2	: Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
COMT	: Katekol-O-metil transferaz
COX-2	: Siklooksijenaz 2
DA	: Dopamin
Daxx	: Death domain-associated protein 6
DHA	: Dokosahekzaenoik asit
DISC	: Disrupted in schizophrenia 1
DJ-1	: Protein deglycase DJ-1
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOPAC	: 3,4-Dihidroksifenil asetik asit
DR3	: Ölüm reseptörü-3
EFA	: Esansiyel Yağ asidi
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ER	: Endoplazmik retikulum
FABP	: Yağ asidi bağlanma proteini
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FADD	: Fas bağımlı ölüm altbirim proteini
Fas (CD95)	: Apoptoz antijen-1
Fat-1	: FAT atypical cadherin 1
FATP	: Yağ asidi transport proteini-1
FMN	: Flavin mono nükleotid
Gpe	: Globus pallidus eksterna
GSH	: Glutasyon
GSNO	: S-Nitrozoglutasyon
GTP	: Guanozin-5'-trifosfat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Hsp90	: Heat shock protein 90
HTRA2	: Htra serin peptidaz-2
IKK	: I κ B kinaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

iPLA2	: Kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2
JNK	: Janus kinaz
LA	: Linolenik asit
LB	: Lewy Body
LNA	: α -Linolenik asit
LOX	: Lizil oksidaz
LRRK2	: Lösin zengin tekrarlayan kinaz 2
LTP	: Uzun dönem potentiasyon
MAOB	: Monoamin oksidaz B
Mar1	: Maresin 1
MB	: Maneb
MFB	: Medial ön beyin demeti
MFSD2A	: Majör fasilitatör süper aile altbirim taşıyan protein 2A
MGLUR	: Metabolik glutamat reseptörü
MnSOD	: Manganez süperoksit dismutaz
MPDP⁺	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihdropiridinyum
MPP⁺	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
MPPP	: 1-methyl-4-phenyl-4-propion-oxypiperidine
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MS	: Multipl skleroz
MSA	: Multipl sistem atrofisi
MSS	: Merkezi sinir sistemi
mtNOS	: Mitokondriyel nitrik oksit sentaz
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NFκB	: Nuclear Faktör kappa B
NM	: Nöromelanin
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz

NPD1	: Nöroprotektin D1
NR2B	: N-metil-D-aspartat reseptör altbirim
Nrf-2	: Nükleer Faktör Eritroid 2
O₂⁻	: Tekil oksijen (Süperoksit radikali)
Oct-3	: Organik katyon taşıyıcısı 3
ONOO⁻	: Peroksinitrit
P38MAPK	: P38 mitojen-aktif protein kinaz
Pael-R	: Mikrotübül bağımlı protein
PARK1	: α-sinüklein
PARK6	: Parkinson disease 6
PARK7	: Parkinson disease 7
PARK8	: Parkinson disease 8
PARP	: Poliadenozindifosfat riboz polmeraz
PARP-1	: Poly (ADP-riboz) polimeraz 1
PC-12	: Pheokromositoma-12 hücresi
PDE	: Fosfodiesterazlarının
PE	: Fosfatidiletanolamin
PGE2	: Prostoglandin E2
PH	: Parkinson Hastalığı
PHÖ	: Programlanmış hücre ölümü
PINK1	: Pten-Induced Putative Kınase 1
PKA	: Protein kinaz A
PKGI	: Protein kinaz G1
PKGII	: Protein kinaz G2
PS	: Fosfatidilserin
PSP	: Progresif supranükleer palsi
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
RIP1	: Receptor-Interacting Serine/Threonine Kınase 1
Rvd5	: Resolvin D5
SN	: Substansiya nigra

SNARE	: Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SNCA	: Sinüklein alfa
SNpc	: Substansiya nigra pars kompakta
SNr	: Substansiya nigra pars retikülata
SOD	: Süperoksit dismutaz
TH	: Tirozin hidroksilaz
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptör
TRADD	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1-Bağımlı Ölüm Altbirim Proteini
TRAF2	: TNF receptor-associated factor 2
TRAF5	: TNF receptor-associated factor 5
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süperailisi,
VMAT	: Veziküler monoamin transporter
VMAT-2	: Veziküler monoamin transporter-2

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Bazal gangliyonların normal işleyiş mekanizmaları ve Parkinson hastalığı ile meydana gelen değişimler	5
2.2.	Beyindeki majör dopaminerjik yollar	6
2.3.	DA metabolizması	7
2.4.	Parkinson modeli oluşturmada kullanılan nörotoksinlerin işleyiş mekanizmaları	9
2.5.	MPTP ve MPP+'nin kimyasal yapısı	11
2.6.	MPTP metabolizmasının şematik gösterimi	11
2.7.	Apoptozda içsel ve dışsal yollar	14
2.8.	α -sinükleinin moleküler yapısı	14
2.9.	NO Sentezi	17
2.10.	NO sinyal yolağı	18
2.11.	NMDAR/PSD95/nNOS kompleksinin genel yapısı	20
2.12.	NO ve patojenik mekanizmaları	22
2.13.	DHA'nın kimyasal yapısı	25
2.14.	Memeli hücrelerindeki majör nöroprotektin ve resolvinlerin DHA'dan biyosentez mekanizması	28
3.1.	Pole "çubuk" testi	30
3.2.	Lokomotor aktivite testi	31
3.3.	Rotarod testi	32
4.1.	Çubuk testi geri dönme zamanı sonuçları	38
4.2.	Çubuk testi yere inme zamanı sonuçları	38
4.3.	Lokomotor aktivite testi ambulatuvar aktivite sonuçları	39
4.4.	Lokomotor aktivite testi mesafe sonuçları	39
4.5.	Lokomotor aktivite testi toplam lokomotor aktivite sonuçları	40
4.6.	Rotarod testi çubuk üzerinde kalma süreleri sonuçları	41
4.7.	Rotarod testi 40 rpm çubuk üzerinde kalma süreleri sonuçları	41
4.8.	SN Nitrit/Nitrat değerleri	42

4.9.	SN 4-HNE değerleri	43
4.10.	SN kaspaz-3 aktivite değerleri	43
4.11.	Birim alandaki TH+ hücre sayısı yüzdesi	44
4.12.	Deney gruplarında TH için gözlenen immünoreaktivite	45
4.13.	Birim alandaki nNOS (+) hücre sayısı yüzdesi	46
4.14.	Deney gruplarında nNOS için gözlenen immünoreaktivite	47
4.15.	Birim alandaki p-nNOS (+) hücre sayısı yüzdesi	48
4.16.	Deney gruplarında p-nNOS için gözlenen immünoreaktivite	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

4.1. Haftalara göre ağırlık değişimi

37

GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH) ilk kez 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından tanımlanmış, Alzheimer hastalığı'ndan sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır [1, 2]. Parkinson hastalığına 60 yaş üstünde daha sık rastlanır [3]. Erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir [4]. PH bir bazal ganglion hastalığıdır. Substansiya nigranın (SN) pars kompakta (SNpc) parçasında nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların %60-80 oranında azalması ile belirtileri görülmeye başlar. Bu bölgede dopamin miktarının azalması, diğer striatal yapılarda da dopamin azalışına neden olur [5]. Normal koşullarda SN'de üretilen dopamin kaudat nükleus ve putamene etki ederek motor hareketlerin koordinasyonunda rol oynar. PH'da SN'deki dopamin üreten nöronların kaybı sonucunda beynin motor hareketleri düzenleme kapasitesi azalır [6]. Bu sebeple PH'nın semptomları arasında; kaslarda rijidite, istirahat tremoru ve bradikinezi yer alır. [7] PH'nın sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte bazı travmalar [8], yaşlılık [9], α -sinüklein [10], genetik yatkınlık [11], yanlış katlanmış proteinler [11], mitokondriyal bozukluklar [12], inflamasyon [13] ve mikrogliaların aktiviteleri [14] gibi hipotezler öne sürülmektedir.

PH'da en önemli hipotezlerden biri serbest radikal artışıdır. Serbest radikallerin oluşması peptidlere, proteinlere, aminoasitlere ve lipidlere etki ederek protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır [15]. Nitrik oksit (NO), endotel hücrelerinde, glialarda ve bazı nöronlarda nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenmektedir. NOS'un dört tip enzim izoformunun olduğu bilinmektedir. İlki endotel hücrelerinde bulunan eNOS (NOSIII), nöronlarda ve glialarda bulunan formu nNOS (NOSI), indüklenebilir formu iNOS (NOSII), mitokondri iç membranında bulunan formu ise mtNOS'tur [16]. NO sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapmaktadır. Oksijen varlığında nitrit ve nitrat gibi nitrojen türevleri oluşturduğu ve radikal gibi davrandığı bilinmektedir [17]. Ayrıca, nitrik oksidin oksijen radikalleri ve süperoksitlerle reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturduğu saptanmıştır. (ONOO⁻), metal katalizinden bağımsız olarak hidroksil radikali üretebilmektedir [18]. NO'nun tiyol reaksiyonları ile etkileşimi sonucunda glutatyondan daha kuvvetli olan S-nitrozoglutasyon (GSNO) oluşturduğu saptanmıştır [19]. Bu bileşenin lipid peroksidasyonunu engellediği bilinmektedir [20]. Daha önce yapılan PH modeli çalışmalarında, iNOS ve nNOS aktivitelerinin arttığı, glutasyon miktarının azaldığı gösterilmiştir [21, 22]. nNOS ve iNOS inhibitörlerinin kullanılmasının nörodejenerasyonu azalttığı görülmüştür [23, 24]. Bu aktivite azalışında nNOS'un farklı rezidülerinden fosforilasyonunun farklı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. nNOS farklı enzimler tarafından fosforile olabilmektedir [25]. Serin 1412'den fosforile olması nNOS aktivitesini artırırken [26] serin 847'den fosforile olması nNOS aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır [27].

Normal hücrel fonksiyon için gerekli olan linoleik (LA, 18:2 n-6) ve α -linolenik (LNA 18:3 n-3) asitler esansiyel yağ asidi (EFA) sınıfına girer. Doymamış yağ asitleri için kullanılan "omega-6" ve "omega-3" kısaltmaları yağ asidi zincirinin distal ucundaki metil karbon atomundan sonra gelen ilk çift bağın yerini gösterir. Her iki temel EFA da uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) nın sentezi için gereklidir [28]. Diğer yandan esansiyel yağ asitleri hücre membranında fosfolipid tabakasının entegral komponenti olarak membran akışkanlığını ve lipid protein etkileşimlerini düzenler, taşıyıcı proteinlere, hormon ve nörotransmitter reseptörlerine etki eder [29-32]. Yapılan çalışmalarda, beyin fosfolipidlerinde temel çoklu doymamış yağ asidi'nin DHA (Dekosaheksaenoik Asit) olduğu

saptanmıştır [28]. DHA'nın dopamin taşıyıcılarının aktivitelerine etki ettiği bilinmektedir [33]. DHA'nın nNOS ve iNOS'a etki ettiği ise önceki çalışmalarda gösterilmiştir [24, 34].

Deneysel parkinson modelinde kullanılan MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) maddesinin farelere uygulanması ile SNpc'de iNOS ekspresyonunun ve nNOS aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir [21]. Yapılan çalışmalarda, SN'deki nöron ölümlerinde nNOS'un rolünün olduğu saptanmıştır [35]. DHA'nın parkinson modelinde nükleer faktör (NF)-KappaB aktivasyonuna etki ederek, tirozin hidroksilaz içeren nöronların ölümünü önlediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [34, 36]. Fakat deneysel parkinson modelinde oluşan apoptozun önlenmesinde nNOS ve fosforilasyonunun rolü ve bu rolün serin 847 üzerinden olup olmadığı bilinmemektedir. DHA'nın hücre membranındaki kanallara ve hücre içi sinyal moleküllerine etki ettiği bilinmektedir [33]. Önceki çalışmalarda apoptozu önlediği gösterilmiştir [37]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda lipid peroksidasyon göstergesi olan 4-HNE ve apoptoz göstergesi olan kaspaz 3 aktivitesi ölçülerek DHA'nın koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

DHA'nın koruyucu etkisinde nNOS'un, serin 847 bölgesinden fosforilasyonu ile nNOS inhibisyonunda rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Bu bilgilere dayanarak nNOS fosforilasyonunun rolünü belirlemek için bu çalışma planlanmış, biyokimyasal ve lokomotor parametrelerle desteklenmiştir.

Bu çalışmamız, çağımızın hastalığı olan PH'da DHA'nın koruyucu rolünün mekanizmasını aydınlatmak amacıyla planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı ve Tarihçesi

Parkinson Hastalığı (PH), ilk kez James Parkinson tarafından 1817 yılında “Essay on the Shaking Palsy” isimli monografisinde tanımlanmıştır [1]. Alzheimer hastalığından (AH) sonra en sık rastlanan yaş bağımlı nörodejeneratif hastalıktır [2]. Arvid Carlsson 1958’de memeli beyninde dopaminin varlığını göstermiştir [38]. Ardından, striatal dopamin (DA) eksikliğinin PH’ye yol açtığı [39] ve striatal DA’nın düşük dozda DA prekürsörü levodopa alımı ile yerine konarak semptomları hafiflettiği gösterilmiştir. Substansiya nigra pars kompakta (SNpc) nöronlarının nigrostriatal dopaminerjik yolağı oluşturduğunun keşfedilmesi ile PH’nin beyin (SNpc) bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ile meydana geldiği anlaşılmıştır [40].

Dopaminerjik nöronal kayıp ile birlikte DA reseptörleri de sayıca azalır. Bu durum PH’nin gelişimine neden olur [41]. DA reseptör agonisti verilen Parkinson hastalarında semptomların hafiflediği, 1974 yılında Calne ve ark. tarafından gösterilmiştir [42].

2.1.1. Hastalığın Epidemiyolojisi

Hastalığın prevalansı 160 vaka/ 100.000 kişi, insidansı ise 20 vaka/100.000 kişidir [43]. Parkinson hastalığının yaygınlığı yaşla birlikte artış gösterir [44]. PH 20 ile 80 yaşları arasında, ortalama 55 yaş civarında başlar ve kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülür [4].

2.1.2. Hastalığın Etiyolojisi

Çevresel etmenler, yaşlanma ve genetik yatkınlık geçerli nedenler arasında gösterilse de PH’nin nedeni henüz tam anlamıyla bilinmemektedir [45].

PH’nin başlangıcının genç yaşlara kadar gerilemesinin parakuat, herbisit veya pestisitlere maruz kalma gibi çevresel faktörlerden etkilendiği düşünülmektedir [46]. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) vb. çeşitli sentetik nörotoksinlerin de hızlı ve kalıcı parkinsonizme neden olduğu bilinmektedir [47]. Prenatal veya erken postnatal dönemde, MPTP benzeri herbisit parakuat veya fungusit manebe maruz kalmanın, erken gelişim döneminde SN dopaminerjik nöronlarında sayıca azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Aynı kişilerin yetişkinlikte de bu toksinlere maruz kalması, nörodejenerasyona olan duyarlılıklarının daha fazla olabileceğini düşündürmektedir [48].

Yaşla birlikte nigral hücre sayısında azalma meydana geldiği bilinmektedir. Yaşlanma ve PH ilişkisini inceleyen birçok çalışmaya göre hastalıkla birlikte motor semptomlarda artış, levodopa cevabında azalma, postürde bozulmalar, şiddetli bilişsel bozukluklar ve demans gelişmektedir [49].

PH vakalarının sadece %10’u ailesel yatkınlık gösterir. Parkinson hastalarının birinci derece yakınlarında hastalığın görülme ihtimali sağlıklı bireylerin birinci derece yakınlarına oranla 1.5-9.5 kez daha yüksek bulunmuştur [50]. Birçok genetik mutasyon da PH sebebi olabilir. Sinüklein alfa (SNCA), Parkinson disease 1 (PARK1 = 4) ve Leucine-Rich Repeat Kınase 2 (LRRK2), Parkinson disease 8 (PARK8) otozomal dominant mutasyonları PH oluşumuna neden olurken Parkin (PARK2), Pten-Induced Putative Kınase 1 (PINK1), Parkinson Disease 6 (PARK6), Oncogene DJ-1 (DJ-1), Parkinson Disease 7 (PARK7) ve

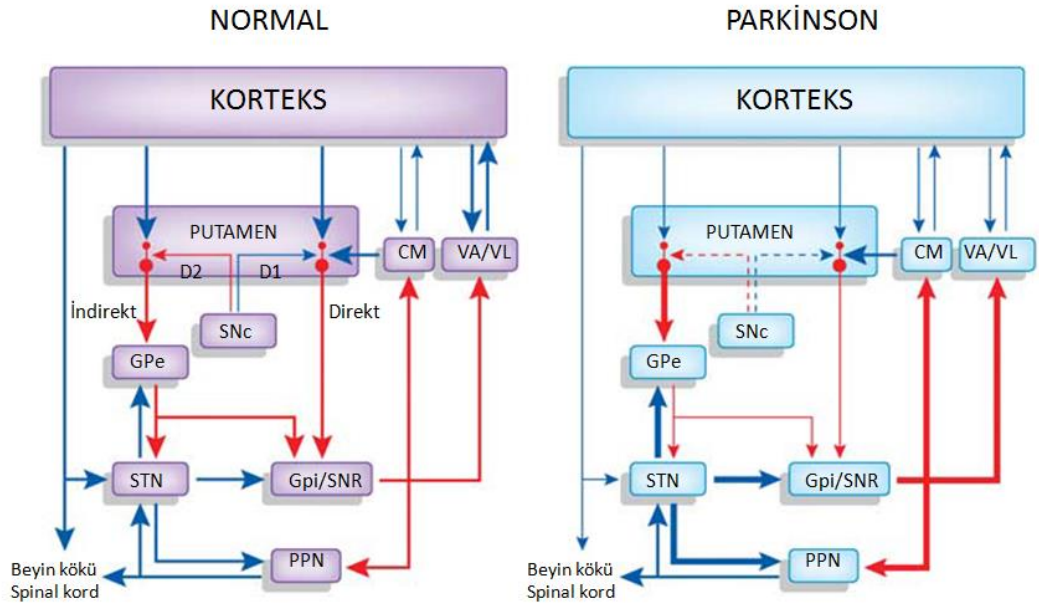
ATPase TYPE 13A2 (*ATP13A2*) genlerindeki otozomal resesif mutasyonlar da PH'nın nedenleri arasında gösterilmektedir [51]. Ek olarak son yıllarda Htra Serine Peptidase 2 (*HTRA2*) gen mutasyonları da PH ile ilişkilendirilmiştir [52].

2.1.3. Parkinson Hastalığı'nın Nöroanatomik Mekanizmaları

Bazal ganglionlar telensefalon, diensefalon ve orta beyine yayılan, birbirleri ile bağlantılı subkortikal nükleuslar topluluğudur [53]. Bazal gangliyonların 4 temel nükleusu bulunur. Bunlar; striatum (kaudat nükleus ve putamen), globus pallidus (globus pallidus eksterna (Gpe) ve globus pallidus interna (Gpi)), (substansiya nigra pars kompakta ve substansiya nigra pars retikülata) ve subtalamik nükleuslardır (STN) [54].

Bazal gangliyonların görevi hareketi kontrol etmek ve üzerinde ince ayarlamalar yapmaktır. Dolayısıyla bu görevi gerçekleştireceği bölgelerden afferent uyarılarla bilgiyi alır ve efferent uyarılarla bu bilgiyi iletirler. Bazal gangliyonların afferent girdilerinin büyük bir kısmı frontal korteksten, bir kısmı ise pariyetal korteksten gelir. Bu afferent sinyallerin bazal gangliyonlara giriş yaptığı yer striatumdur. Bazal gangliyonlarda işlenen bilgiler ise globus pallidus internus (Gpi) ve substansiya nigra pars retikülata (SNr) çıkış yapar. Gpi'den çıkan bilgiler talamusun ventral anterior segmentine gelir ve talamustan çıkan aksonlar motor kortekse bağlanarak döngüyü tamamlar. Bazal gangliyonların efferent sinyallerinin büyük bir kısmı Gpi üzerinden talamusa giderken küçük bir kısmı ise beyin sapındaki pedinkülopontin nükleusa gider [55].

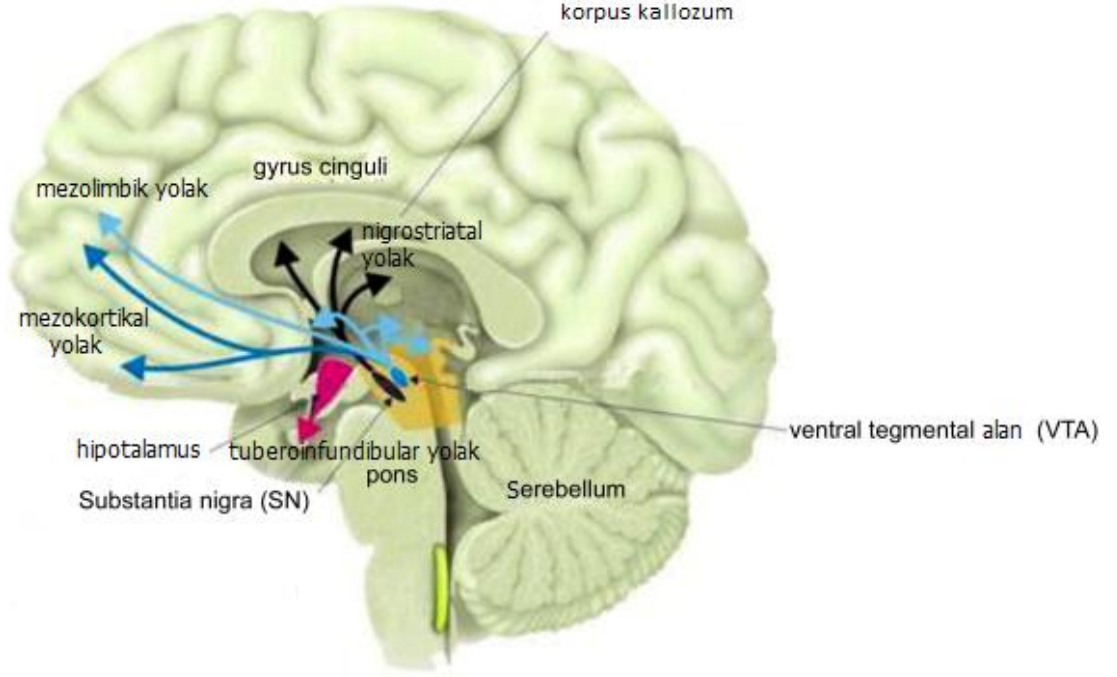
Serebral korteks ve bazal gangliyonlar arasında korteksin aktivitesini artıran direkt ve korteksin aktivitesini azaltan indirekt iki yol vardır [4]. Direkt yolda frontal ve pariyetal korteksten gelen bazal gangliyon afferent sinyalleri putamene girer ve doğrudan Gpi ve SNr'ye yönelerek talamus üzerinden kortekse geri döner. İndirekt yolda ise korteksten putamene gelen sinyaller Gpe ve STN'ye uğradıktan sonra Gpi ve SNr'ye yönelerek talamus üzerinden kortekse döner [56]. Direkt yol gabaerjiktir ve nöronları D1 tip reseptörleri eksprese eder. İndirekt yol da gabaerjiktir fakat nöronları D2 tip reseptörleri eksprese eder. Dopamin D1 tip reseptörlere bağlandığında uyarıcı, D2 tip reseptörlere bağlandığında ise inhibe edici etki gösterir. Dopamin direkt yolu uyarıp indirekt yolu baskılayarak talamokortikal çıkış sinyallerini her iki yolda artırarak korteksi aktive eder. Normal şartlarda bu iki yol birbiri ile dengededir. Ancak PH'da dopaminin azalmasıyla bu denge indirekt yolu destekleyecek şekilde bozulur. Talamus üzerinde indirekt yolun etkisi artar ve kortikal aktivasyon azalarak PH belirtileri ortaya çıkar [57].



Şekil 2.1. Bazal gangliyonların normal işleyiş mekanizmaları ve PH ile meydana gelen değişimler (Kaynak 58'den modifiye edilerek alınmıştır) [58]. **CM**, Sentromedyan nükleus; **Gpe**, Globus pallidus external segment; **Gpi**, Globus pallidus internal segment; **PPN**, Pedinkülopontin nükleus; **SNc**, Substansiya nigra pars kompakta; **STN**, Subtalamik nükleus; **VA/VL**, Ventral enteriyor, ventral lateral nükleus; **SNr**, Substansiya nigra pars retikülata.

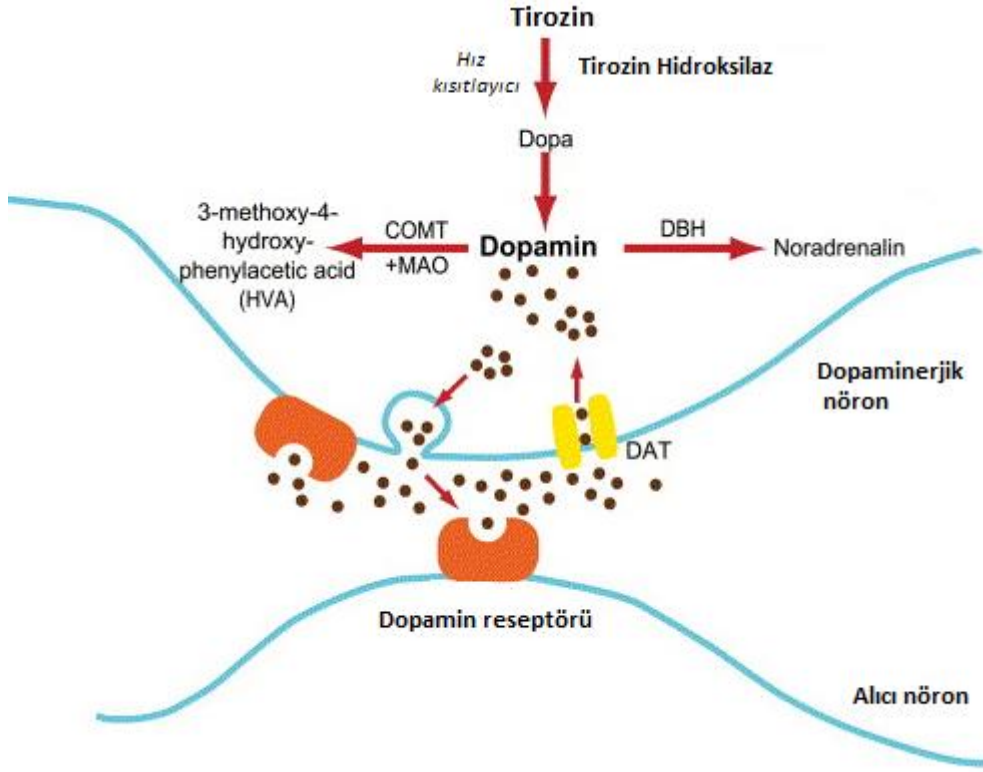
2.1.4. Dopamin ve Parkinson Hastalığı

DA, nigral nöronlarda üretilen endojen bir nörotransmitterdir [59]. Dopaminerjik nöronlar diensefalın, mezensefalın ve olfaktor bulbusta yer alırlar [60]. Mezensefalının ventralindeki dopaminerjik nöronlar, memeli merkezi sinir sisteminde DA'yı en fazla içeren hücre gruplarıdır ve beyindeki toplam dopaminerjik hücrelerin %90'ını oluştururlar. Mezensefalik dopaminerjik sistem içerisinde nigrostratal, mezolimbik, mezokortikal ve tuberoinfundibular sistemler yer alır. En çok bilinen ise nigrostriatal sistemdir. Substansiya nigra pars kompakta'da yer alır ve striatuma kadar uzanır. Nigrostriatal yolak bilinçli motor hareketleri düzenlemede önemli rol oynar [61].



Şekil 2.2. Beyindeki majör dopaminerjik yollar (Kaynak 62'den modifiye edilerek alınmıştır) [62].

DA sentezi birtakım enzimatik reaksiyonlar sonucu gerçekleşir. Tirozin amino asidi tirozin hidroksilaz (TH) enzimi ile L-DOPA'ya katalizlenir. L-DOPA, aromatik dekarboksilaz enzimi ile dekarboksillenir ve DA üretilir. DA, veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT) ile sinaptik veziküllere alınır. Stimulasyon ile sinir terminallerinden sinapsa ekzositoz yoluyla boşalır. Salınan DA dopamin reseptörüne bağlanınca postsinaptik hücrede cevap oluşur. Dopamin reseptörleri G protein eşleşmeli reseptörlerdir. 5 tane alttipi vardır ve 2 gruba ayrılırlar. D1 benzeri reseptörler D1 ve D5'i içerirler. Adenilat siklaz aktivasyonu ile siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimine neden olurlar. D2 benzeri reseptörler ise D2, D3 ve D4'tür. Gi/o proteinleri ile eşleşirler. Adenilat siklazı inhibe ederek cAMP üretimini baskırlar [63]. D1'ler uyarıcı iken D2'ler inhibe edici rol üstlenirler. D2 reseptörleri presinaptik bölgede dopaminerjik sistemin temel reseptörleridir [64]. DA presinaptik bölgede ya da sinaptik aralıkta monoamin oksidaz B (MAOB) ve katekol-O-metiltransferaz (COMT) ile enzimatik olarak parçalanır. Fakat enzimatik degradasyon DA'nın inaktivasyonu için yeterli olmaz. DA, aynı zamanda dopamin taşıyıcıları ile sinapstan geri alınıp presinaptik bölgeye taşınır. Taşınan DA veziküller halinde tekrar depolanır [65].



Şekil 2.3. DA metabolizması (Kaynak 66'dan modifiye edilerek alınmıştır) [66]. **COMT**, katekol O-metil transferaz; **MAO**, monoaminoksidad; **DBH**, dopamin beta hidroksilaz; **DAT**, dopamin taşıyıcısı

DA, bilişsel, hareketel ve ruhsal birçok fizyolojik ve davranışsal süreçte rol alır. Merkezi dopaminerjik sistemdeki anomaliler; hiperaktivite bozuklukları, şizofreni, bipolar bozukluklar, beslenme bozuklukları ve bağımlılık gibi durumlara neden olurken aynı zamanda PH gibi nörodejeneratif hastalıkların da sebebi olabilir [67].

2.1.5. Klinik Özellikleri

2.1.5.1. Bradikinezi

Hareketlerde yavaşlama anlamına gelen bradikinezi, PH'nın en karakteristik klinik bulgusudur. Hastalığın başlangıcında günlük hayatta performansa bağlı hareketlerde yavaşlama görülür [68]. Kişi motor kontrolü sağlamakta zorlanır. Hareketi planlama, başlatma ve yürütme ile ilgili zorluklar, sıralı ve eş zamanlı görevleri yerine getirmede sorunlar ortaya çıkar [69].

Bir hipoteze göre bradikinezi, azalan dopaminerjik fonksiyona bağlı olarak motor korteks aktivitesinde bozulma ile ortaya çıkar [70]. Anatomik olarak putamen ve globus pallidus'ta hasar meydana gelir. Böylelikle, hareketi başlatmak için gerekli kas gücünde azalma görülür [71].

2.1.5.2. Tremor

Dinlenme tremoru, PH'nın en genel ve en kolay fark edilir semptomudur. Tremor genellikle unilateraldir ve 4-6 Hz arasındaki frekanslarda meydana gelir. Ekstremitenin distalinde ortaya çıkar. El tremoru bir elden diğerine sıçrayabilir. Aynı zamanda dudaklarda, çenede ve ayaklarda da görülebilir. Dinlenme tremoru, hareket halinde veya uykudayken kesilir [7].

Hughes ve ark.larına göre hastalığın başlangıcında Parkinson hastalarının %69'unda tremor görülür. %75'inde ise hastalık süresince görülmeye devam eder. Hastaların %9'unda ise hastalığın geç döneminde tremor kaybolur [72].

2.1.5.3. Rijidite

Rijidite, ekstremitelerde hareket sırasında artış gösteren dirençle karakterize olur. Agonist ve antagonist kaslar eş zamanlı kasılır. Klinikte bu durum 'dişli çark belirtisi' olarak tanımlanır. Proksimalde (boyun, omuz, kalça) ve distalde (el ve ayak bileklerinde) belirir [7].

Ağrılı ve acılı omuzlar, PH'da rijiditenin başlangıç belirtisidir. Artirit, bursit gibi semptomlarla sıkça karıştırıldığı görülür [73]. Rijidite PH'ya özgü bir semptom olmamakla birlikte birçok hareket bozukluğuna bağlı hastalıkta ortaya çıkabilir. [74]

2.1.5.4. Postural Bozukluklar

Gövdedeki rijidite, bozulmuş aksiyal postüre neden olur. Postural bozulmalar bükük boyun ve gövde, bükük bilek ve dizler ile kendini gösterir. Eğilmiş postür ise hastalığın son dönemlerinde ortaya çıkar. Striatal ekstremitte bozuklukları (striatal el, striatal ayak parmağı), PH'nın başlangıç semptomları arasında gösterilebilir [75].

Postural dengesizlik ise PH'nın geç semptomları arasında gösterilir. Çekme (Pull) testi ile hastalar omuzlarından geri veya ileri çekilir, böylelikle ileri ve geri yürümedeki başarıları ölçülür. Geriye iki adımdan fazla atmak veya herhangi bir postural cevap oluşturamamak bozulmuş postural cevabı niteler. Postural dengesizlik, düşmelerin ve kalça çıkıklarının temel nedenidir [76]. Hastalığın başlangıcı ile ilk düşme arasında geçen sürenin uzunluğu PH'yı progresif supranükleer palsi (PSP) ve multipl sistem atrofisi (MSA) gibi diğer birtakım hastalıklardan ayırır [77]. Bir çalışmada hastalığın başlangıç semptomları ile ilk düşme arasında geçen süre PH'da 108 ay iken diğer hastalıklarda ortalama (PSP ve MSA) 16.8 ve 42 aydır [76].

2.1.6. Parkinson Hastalığının Nöropatolojisi

Beynin SNpc bölgesinde nöromelanin (NM) içeren dopaminerjik nöronların kaybı ve kalan hücrelerin gövdelerinde Lewy cisimciği (LC) olarak adlandırılan eozinofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı ile PH tanımlanır [78]. Dopaminerjik nöronlar nigrostriatal yola uzanır ve nöronal kayıp striatal dopaminde azalışa neden olarak hastalığın klinik fenotipini ortaya çıkarır. LC'ler çökelmiş halde α -sinüklein ve diğer proteinleri taşırlar [79].

Depigmentasyon, nöronal kayıp ve gliosis PH'da özellikle SNpc ve pontin lokus seruleusta görülen tipik anomalilerdir. Nöronal degradasyon aynı zamanda vagus dorsal nükleusta ve diğer beyin kökü nükleuslarında da görülür. SN pigment nöronlarının sayısı sağlıklı bireylerde 550.000 iken, PH'de %66 oranında azalış gösterir [80]. Ek olarak pigmentsiz nöronlar normalde 260.000 iken PH'de %24 oranında azalır. İlk PH semptomları görüldüğünde SNpc nöronlarının %60'ı kaybedilmiş durumdadır [81].

SNpc nöronlarının dejenerasyonuna ek olarak diğer nükleuslar da PH'den etkilenir. Bunlar globus pallidus interna, medyan parafaskiküler kompleks, pedinkülopontin tegmental nükleus ve glutamaterjik kaudal intralaminer talamik nükleustur [82]. Ek olarak parkinson hastalarında belirgin bir hipokampal atrofisinin de meydana geldiği bilinmektedir [83].

LC'ler yuvarlak, eozinofilik, intrasitoplazmik inklüzyonlardır ve nöronların nükleuslarında bulunurlar. 3-25 nm çapındadırlar. Temel olarak α -sinüklein ve ubiquitin proteinlerini içerirler. Ek olarak kalbindin, komplement proteinler, mikrofilament altbirimler, tübülün, parkin substrat protein ve mikrotübül bağımlı protein 1 ve 2 (Pael-R) taşırlar [84].

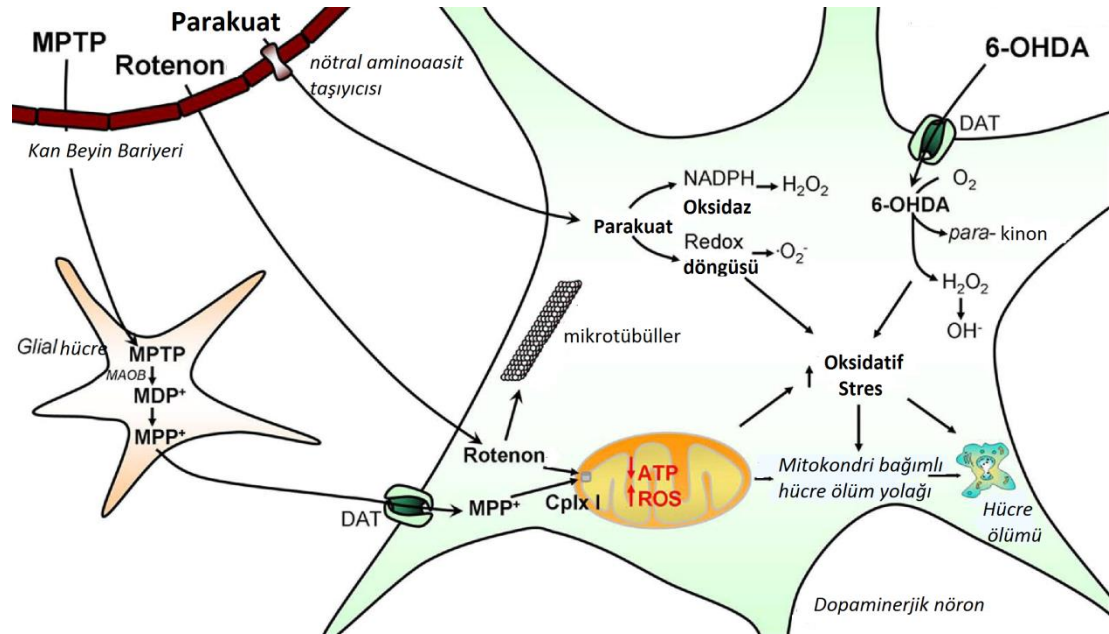
PH'de LC'ler SN'de Meynert bazal nükleusta, lokus seruleusta, serebral kortekste, sempatik ganglionlarda, dorsal vagal nükleusta, bağırsak miyenterik pleksusta ve kardiyak sempatik pleksusta da görülür [85]. LC'ler PH'ye spesifik değildir. Sağlıklı yaşlı bireylerin %10'unda veya diğer nörodejeneratif hastalıklara sahip bireylerde de bulunabilir [86].

LC inklüzyonları toksik kabul edilse de bazı çalışmalara göre nöroprotektif olabilecekleri söylenmektedir [85].

2.1.7. Deneysel Parkinson Modelleri

PH, toksin aracılı patolojik veya genetik hayvan modellemeleri ile çalışılabilmektedir.

6-Hidroksidopamin (6-OHDA), MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), parakuat, maneb ve rotenon gibi nörotoksinler dopaminerjik nörodejenerasyona neden olduklarından PH modeli olarak kullanılmaktadırlar. Fakat yalnızca MPTP insan parkinsonizmi ile açıkça ilişkilendirildiği için günümüzde en çok kullanılan PH modelidir [5].



Şekil 2.4. PH modeli oluşturmada kullanılan nörotoksinlerin işleyiş mekanizmaları (Kaynak 87'den modifiye edilerek alınmıştır) [87].

2.1.7.1. Parakuat ve Maneb

Herbisit parakuat (N, N2-dimetil-4,4'-bipiridinium) ve fungusit maneb (manganese ethylene-1,2- bisdithiocarbamate) toksik PH modeli oluşturmada kullanılmaktadır. Parakuat doğal çevrede bulunabilir ve 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP⁺)'ye yapısal olarak benzer özellikler gösterir. Parakuata maruziyet PH riskini artırır [88]. Parakuat kan-beyin bariyerini nötral aminoasit taşıyıcıları ile geçer ve nigrostriatal yolağı hedef alır. Mitokondriyel kompleks I'ı inhibe eder ve redoks döngüsü ile süperoksit oluşumuna neden olur [89]. Parakuatın toksisitesi süperoksit radikal oluşumu ile yönlendirilir [90]. Parakuatın farelere sistemik enjeksiyonu SNpc dopaminerjik nöron kaybına, α -sinüklein içeren inklüzyonların oluşumuna ve ön beyinde α -sinüklein immünboyanmasına neden olur [91]. Dolayısıyla α -sinükleinin nörodejenerasyondaki rolünü inceleyen çalışmalarda parakuat ile oluşturulan PH modeli aydınlatıcı olabilir [5].

Maneb (MB) manganez içeren etilen bis-dithiokarbonat fungusitidir. PH için çevresel bir risk faktörüdür [92]. Parakuatla birlikte etkisi artar [93]. Parakuat MB birlikteliğinin yarattığı toksisitenin mekanizması henüz tam anlamıyla netlik kazanmamıştır. Çünkü parakuat bir oksidandır ve ROS artışına neden olur. Maneb ise ROS'tan bağımsızdır. Nükleer Faktör Eritroid 2 (Nrf-2)'yi aktive eder, hücrel glutasyon (GSH) düzeyini artırır ve oksidatif stres yaratmadan proteinlerden tiyol kaybına neden olur. Proteinler ardından dimerize olur ve enzimatik aktiviteleri inhibe olur [94].

2.1.7.2. Rotenon

Rotenon, tropikal bitkilerin özütlerinden elde edilen doğal sitotoksik bileşiklerden olan rotenoid ailesine üye, haşerarla mücadelede kullanılan toksik bir maddedir. Oldukça lipofiliktir ve dolaşım ile organlara kolaylıkla ulaşabilir [95]. Rotenon MPP+ ile aynı bölgeye bağlanır ve mitokondriyel kompleks I'ı inhibe eder.

Düşük dozda rotenona intravenöz maruziyet sıçanlarda α -sinüklein pozitif LC benzeri inklüzyonların oluşumuyla nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda seçici dejenerasyona neden olur [96].

2.1.7.3. 6-OHDA (6-hidroksi dopamin)

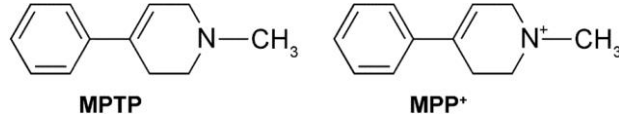
6-hidroksi dopamin (6-OHDA) ile oluşturulan PH modeli, 40 yıldan fazla süredir kullanılan ve SNpc dopaminerjik nöron ölümüne neden olduğu bilinen ilk yöntemdir [97]. 6-OHDA'nın kimyasal yapısı katekolaminlere oldukça benzerdir. 6-OHDA, katekolamin DA transport sistemini kullanarak seçici katekolaminerjik hücre ölümüne neden olur [98]. Hücre içine alındıktan sonra otooksidasyon ile reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine ve oksidatif strese neden olur [99]. Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidrosil radikalleri gibi toksik türler oluşur [100]. Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GPx)'in üretimi ise 6-OHDA'nın yıkıcı etkilerine karşı koruyucu özellik gösterir [101]. 6-OHDA kan beyin bariyerini geçemez ve dolayısıyla toksik etkisini gösterebilmesi için intraserebral uygulama yapılmalıdır [102]. Medial ön beyin demetine enjekte edilen 6-OHDA, dopaminerjik nöronları nekrozla ölüme götürür. Striatal enjeksiyonu ile meydana gelen ölüm mekanizmasının ise apoptoz olduğu düşünülmektedir [103]. Medial ön beyin demeti (MFB) modelinin ve striatal modelin kendi içinde farklı uygulamaları vardır. MFB modeli dopaminerjik nöron ölümünün sonuçlarını incelemeye ve motor semptomları önleyici tedavi yöntemlerini test etme amacıyla kullanılır. Striatal modelde ise PH'da yer alan dopaminerjik nöron ölüm mekanizmaları incelenir [104].

2.1.7.4. MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)

1982'de genç ilaç bağımlıları, narkotik meperidin (dimerol) analogu olan MPPP (1-methyl-4-phenyl-4-propion-oxypiperidine)'nin intravenöz uygulaması ile aniden gelişen parkinson benzeri semptomlarla karşılaşmışlardır [105]. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), yasadışı bir laboratuvarında MPPP üretimi yapılırken tesadüfen oluşmuş nörotoksik bir yan üründür. İnsanlarda ve maymunlarda MPTP, parkinson hastalığının tremor, rijidite, hareketlerde yavaşlama, postural bozulma ve donma gibi geri dönüşümsüz ve şiddetli birçok semptomunun görülmesine neden olur [5]. MPTP'nin en geçerli uygulama yöntemi sistemik uygulamadır ve en sık kullanılan hayvan modelleri fare ve maymundur. Sıçanlar ise MPTP'ye karşı göreceli olarak daha dayanıklıdır [106].

MPTP farelere iki şekilde uygulanabilir. Akut uygulamada (14-20mg/kg) dozda intraperitoneal olarak günde 2 saat aralıklarla 4 enjeksiyon yapılır. Bu yöntem ile 7. günün sonunda striatal DA'da %40-90 oranında azalma görülür. Kronik uygulamada ise 30mg/kg dozda intraperitoneal olarak 5 gün boyunca her gün 1 kez enjeksiyon yapılır. Akut uygulamada hücreler nekroza giderken ölüm oranı çok daha yüksektir. Kronik uygulamada ise apoptozla ölüm görülür [107].

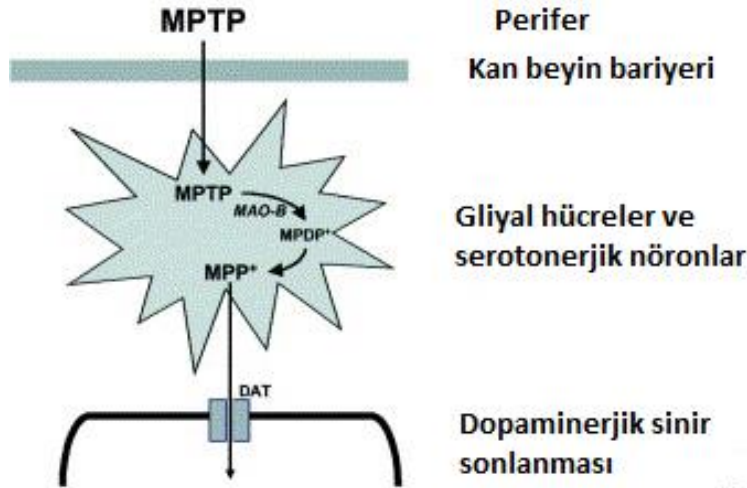
MPTP, mitokondriyel kompleks 1 inhibitörüdür. Lipofiliktir ve kan beyin bariyerini kolayca geçebilir. Toksisitesini gösterebilmesi için glia ve serotonerjik nöronlarda monoamin oksidaz B (MAO-B) enzimi ile 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium'a (MPDP+) çevrilmelidir. Hemen ardından oksidasyonla aktif ve toksik bir bileşik olan MPP⁺'ya dönüşür. MPP⁺ organik kation taşıyıcısı 3'lerle (Oct3) ekstraselüler aralığa salınır. Polar yapıdadır ve bu sebeple kolayca hücre içine giremeyeceğinden plazma membran taşıyıcılarına ihtiyaç duyar. MPP⁺ plazma membran dopamin taşıyıcıları, norepinefrin ve serotonin taşıyıcılarına yüksek afinite gösterir. Hücre içine alındığında ise birbirinden farklı 3 yol izler.



Şekil 2.5. MPTP ve MPP⁺'nin kimyasal yapısı [87].

- 1.) MPP⁺ veziküler monoamin transporter 2 (VMAT-2) ye bağlanarak sinaptosomal veziküllere taşınabilir. Bu koruyucu bir mekanizmadır. MPP⁺ veziküller içerisine hapsedilir ve mitokondriye ulaşım nörodejenerasyona yol açması engellenir.
- 2.) MPP⁺ mitokondriyel transmembran potansiyel mekanizması ile mitokondride konsantre edilebilir. MPP⁺ mitokondriye ulaştığında elektron transport zincirindeki multienzim kompleks 1'i inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozar. Striatum ve ventral orta beyin gibi MPTP'ye oldukça hassas beyin bölgelerindeki dokularda adenosin trifosfat (ATP) düzeyi azalır. Kompleks 1 inhibisyonunun diğer bir sonucu ise oksidatif stresdir. Kompleks 1 boyunca elektron akışının bozulması süperoksit veya nitrik oksit (NO) gibi ROS'ların üretimini artırır.
- 3.) MPP⁺ sitozolik enzimlerle karşılaşmak üzere sitozolde bekletilebilir.

MPTP nedenli mitokondriyel disfonksiyon, oksidatif stres ve enerji azalışı ile hücrel reaksiyonlar yavaşlayıp durur. Böylece açığa çıkan protein, lipid ve oluşan DNA hasarı dopaminerjik nöronlarda apoptoza neden olarak hücreleri ölüme götürür [108].



Şekil 2.6. MPTP metabolizmasının şematik gösterimi (Kaynak 109'dan modifiye edilerek alınmıştır) [109].

2.1.8. Nöronların Dejenerasyonu

PH'nın etiolojisinden bağımsız olarak nörodejenerasyonun patolojisi düşünüldüğünde, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve nekrozdan söz edilir [110, 111].

Apoptoz, sitoplazma ve kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, apoptotik gövdelerde hücre fragmentasyonu ve takiben lizozom aracılı fagositoz ile karakterize olan bir süreçtir. Hücre ölümünde diğer bir mekanizma ise otofajidir. Otofajik veziküllerin (otofagozomlar ve otofagolizozomlar) birikimi ile meydana gelir ve PH nörodejenerasyonunda önemli rol oynar [112].

PH'de nörodejenerasyonun kesin mekanizması tam anlamıyla bilinmese de bu süreçte birçok hücreyel yolağın devreye girdiği düşünülmektedir. Bunlar genetik faktörler ve protein üretiminde meydana gelen anomalilerdir. Bu süreçte oksidatif stres, mitokondriyel disfonksiyon, eksitotoksisite, inflamasyon, immün düzenleme, glial spesifik faktörler, trofik faktörlerin azalması vb. henüz bilinmeyen birçok mekanizmanın daha yer aldığı düşünülmektedir [113].

Bir hipoteze göre PH'de nörodejenerasyon, intraselüler veziküler transportta aksama ve mikrotübüllerin bütünlüğünde bozulma ile ortaya çıkar [114]. Bir diğer hipotez ise, nörodejenerasyonda astrositlerin rolünün olabileceği üzerinedir [115].

2.1.8.1. Apoptoz ve Hücre Ölümü

Hücreler, aldıkları ağır hasarlarda ya da içinde buldukları uygunsuz çevresel koşullarda birçok farklı mekanizma ile geleceğine yön verebilirler. Bu düzenleyici homeostatik fonksiyon genetik olarak programlandığı için bu sürece programlı hücre ölümü (PHÖ) denmiştir. Klasik nekrozdan farklı olarak PHÖ, ATP gerektiren ve gen ekspresyonlarında değişiklik oluşturan bir süreçtir. Bu yetenek, gelişim de dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte rol oynar ve bu hücre ölüm mekanizması PH gibi nörodejeneratif süreçlerde de yer alır [116].

Kerr 1972'de [117] apoptoz terimini kullanıncaya kadar tüm hücrelerin nekroz ile öldüğüne inanılmıştır. Daha sonra PHÖ terimi apoptozla eş anlamlı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bugün, apoptozun farklı hücre ölüm mekanizmalarından yalnızca bir tanesi olduğu bilinmektedir. Bir diğer PHÖ mekanizması ise otofajidir [116]. Bir uyarandan birden fazla hücre ölüm mekanizmasını aktive edebilir. Bu, uyarandan derecesine, süresine, bulunduğu bölgeye ve hücre tipine göre değişiklik gösterir [118]. Örneğin MPP+ ve diğer toksinler düşük dozda apoptozu tetiklerken yüksek dozda hücreleri nekroza götürebilirler [119]. Fakat aynı dokuda aynı anda birden fazla ölüm mekanizmasının birlikte görüldüğü nadirdir [120].

Apoptozda hücreler küçülür, membranlarda çıkıntılar oluşur ve hücre bölümlere ayrılır. Kromatinler yoğunlaşır ve DNA fragmentasyonu meydana gelir. Ölen hücreler hücre yüzey işaretçilerini eksprese ederler ve bu işaretçiler onları fagositoza yönlendirir.

Kaspazlar, sistein proteaz ailesidir ve hücrelerin hayatta kalabilmesi için gerekli proteinleri inaktive ederken proapoptotik proteinleri aktive ederler. Hedef substratların aspartat rezidülerinde spesifik alanlar açarlar. İki tip kaspaz vardır. Biri apoptotik hücre ölümünü başlatan başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8-9), diğeri ise devamını getiren sürdürücü kaspazlardır (Kaspaz 3-6-7). Başlatıcı kaspazlar sürdürücü kaspazları aktive eder. Kaspaz aktivasyonu oldukça iyi düzenlenmiş bir süreçtir. Başlatıcı kaspazlar proenzimler halinde eksprese edilip dimerizasyonla aktive olurlar. Sürdürücü kaspazlar ise hücrelerde dimer halde bulunurlar ve kesilerek molekül içi düzenlemelere uğrarlar [116].

2.1.8.1.1 Apoptozun Mekanizmaları

Birçok moleküler olay ya da çevresel uyarı apoptoza neden olabilir. Bu sebeple apoptoz çevresel etkilerle oluşan (dışsal yol) ve hücre içi moleküler nedenlerle oluşan (içsel yol) olarak iki yol izler. Bu iki yolak farklı başlatıcı kaspazları kullansa da olayın sürdürülmesinde yer alan kaspazlar her ikisinde de aynıdır [116].

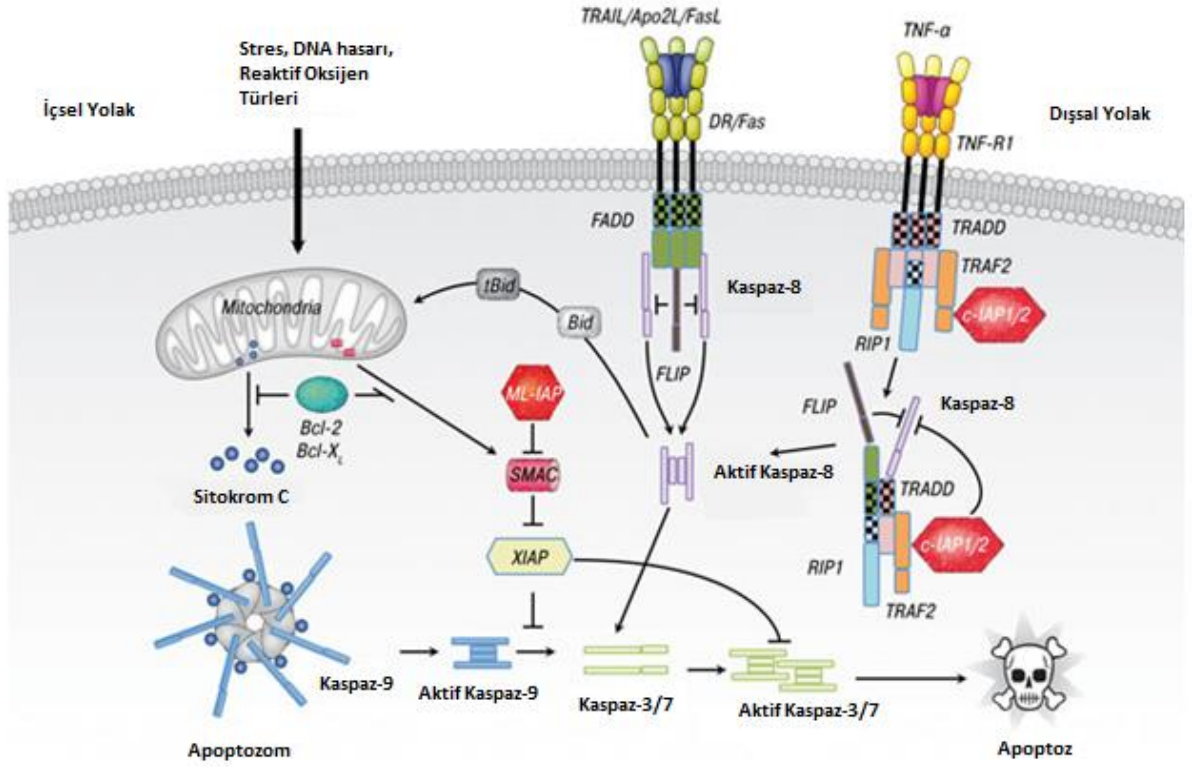
Dışsal Yol

Apoptoz, özelleşmiş trimerik hücre yüzey reseptörleri olan “ölüm reseptörleri”nin aktivasyonu ile tetiklenir. Bu reseptörler, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesinin üyeleridir ve tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNFR1), Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü (CD95 veya APO1), Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süperailisi Üye 25 (DR3), Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süperailisi Üye 21 (DR6), Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süperailisi Üye 10 (TRAIL) reseptörlerini içerirler. Ligandları ise Tümör nekroz faktör (TNF) süperailisinin üyeleri olan TNF, Tümör Nekroz Faktör Ligand Süperailisi Üye 10 (TRAIL) ve Fas ligandları (CD95)’dir ve ölüm ligandları olarak isimlendirilirler. Bu transmembran reseptörler hücre içi altbirimleri içerirler ve hücrelerde sensör görevi üstlenirler. Aktivasyonları ile konformasyonları değişir ve hücre içi alt birimleri sitoplazmik adaptör proteinleri ile birleşir. Bunlar Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1-Bağımlı Ölüm Altbirim Proteini (TRADD), Reseptör ilişkili serin/treonin kinaz 1(Rip1), Apoptoz Hücre İhhibitörleri (CIAP1, CIAP2), sinyal iletim proteinleri (TRAF2 ve TRAF 5)’dir. Fas-Bağımlı Ölüm Altbirim Proteini (FADD) prokaspaz 8/10’a bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. DISC sinyal kompleksi reseptöründen ayrılır ve sinyal kompleks II’yi oluşturarak kaspaz 8/10 aktivasyonuna neden olur [121]. Kaspaz pro-apoptotik proteinlerden (Bid)’i aktive edebilir. Bid, diğer pro-apoptotik proteinlerle beraber mitokondri dış zarında por oluşturur. Mitokondri membran geçirgenliği bozulur ve içsel yolak üzerinden kaspaz-3 aktive edilir [122]. Alternatif olarak Fas, ölüm reseptörü bağımlı protein 6 (Daxx) ile bağlanarak apoptoz sinyal kinaz (ASK1)’i aktive eder. ASK1, c-Jun N-terminal kinaz (JNK)’i aktive eder [123]. Bu alternatif yolak MPTP toksisitesi için de geçerlidir [124].

Ölüm reseptörlerinin yanında PH’de hücre ölümünde temel mekanizmanın içsel (mitokondriyel) yolak olduğu bilinmektedir [116].

İçsel Yol

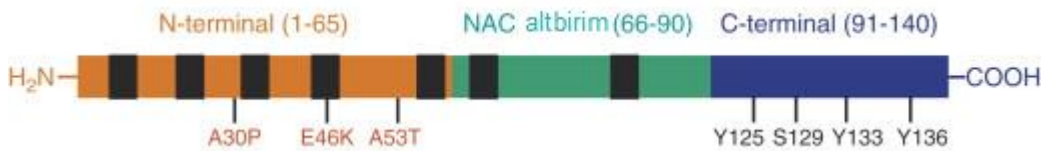
İçsel yolak (mitokondriyel), DNA hasarı, ROS’lar, trofik desteğin yitirilmesi gibi nedenlerle aktive olur. Mitokondri dış zarında Bcl-2 ailesine ait proteinler bulunur. Bunlar apoptoz oluşumunu sağlayan (proapoptotik) veya sağlamayan (anti apoptotik) proteinler olmak üzere ikiye ayrılır. Bu proteinler hücrelerin yaşam ve ölüm arası dengelerini düzenler. Bax vb. proapoptotik proteinler mitokondrinin membran geçirgenliğini bozarak sitokrom c’nin diğer çözünebilir moleküllerle birlikte mitokondri intermembran aralığından sitozole salınmasına neden olurlar. Sitokrom c dATP ve prokaspaz 9 ile apoptozom oluşturur. Apoptozom kaspaz 9’u aktive eder. Kaspaz 9 kaspaz 3’ün aktivasyonuna neden olur. Kaspaz 3’ün aktivasyonu ile poliadenozindifosfat riboz polimeraz (PARP) inaktive olur. Böylece DNA tamir edilemez ve çeşitli enzimlerle (DNA fragmantasyon faktör 40vb.) DNA fragmantasyonu ve hücre ölümü meydana gelir [116].



Şekil 2.7. Apoptozda içsel ve dışsal yollar (Kaynak 125'ten modifiye edilerek alınmıştır) [125]. **SMAC**; kaspazın ikincil mitokondriyel aktivatörü, **XIAP**; X kromozom bağlı apoptoz inhibitörü, **TRAF**; TNF reseptör ilişkili faktör.

2.1.8.2. Protein Yanlış Katlanmaları, Çökme ve Toksikite

Kromozom 4q21.3-q22 üzerinde α -sinüklein proteinini kodlayan gen bölgesinde oluşan mutasyonlar, nörodejenerasyonda meydana gelen hücre ölümünün nedenlerinden biridir. Bunlara genel anlamda sinükleinopatiler denir [126]. α - sinükleinler merkezi sinir sistemi (MSS)'ndeki total protein miktarının %1'ini oluştursa da fizyolojik rolleri henüz tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir [127]. α - sinüklein sentezinde meydana gelen anomalilerin PH patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir.



Şekil 2.8. İnsan α -sinüklein yapısı (Kaynak 128'den modifiye edilerek alınmıştır) [128].

α -sinüklein (SNCA) geninde oluşan mutasyonlar, yanlış katlanmış α -sinüklein proteinlerinin ve agregatlarının oluşumuna neden olur ve bu oluşum yaşla birlikte artar [129].

Çökmüş, çözünmeyen formdaki α -sinükleinler LC'lerin temel içeriğidir ve PH'nin patolojisini ifade ederler [130]. Yanlış katlanmış α -sinüklein formlarının hastalıklı nöronlardan sağlıklı nöronlara seyahat edebildiği gösterilmiştir. [131]

SNCA'nın hidrofobik bölgeleri fibriller protein agregatları oluşturabilir ve SNCA mutasyonları bu agregatların gelişimini artırabilir. SNCA protoagregatları veya oligomerleri, DA veziküllerine ve mitokondrilerin membranlarında por oluşumuna neden olarak onlara zarar verir [132].

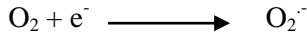
2.1.8.3. Oksidatif Stres

Mitokondriyel solunum ile moleküler oksijenin yaklaşık %100'ü tüketilir. Yan ürün olarak ise hidrojen peroksit ve süperoksit radikaller gibi güçlü oksidanlar üretilir. Kompleks 1 'in inhibisyonu, ROS süperoksit üretimini artırır. Bunun sonucunda toksik hidroksil radikaller veya süperoksitlerin nitrik oksitle (NO) reaksiyona girmesiyle perosinitrit (ONOO⁻) oluşur. Bu moleküller nükleik asitler, proteinler ve lipidlerle reaksiyona girip hücrel hasara neden olabilirler. Bu reaktif türlerin bir hedefi de elektron transport zincirinin kendisidir [133]. Birçok oksidatif hasar belirtecinin Parkinson hastalarının SNpc dokularında arttığı, [134] bir antioksidan olan glutatyonun ise azaldığı bilinmektedir [135].

ROS'lar serbest radikallerin dış orbital yörüngelerinde paylaşılmamış bir elektron ile bir oksijen atomu bulunan moleküllerdir. Oksijenin indirgenmesi ya da oksijene iyonize radyasyonun etkisi ile oluşurlar. En önemlileri O₂⁻ (süperoksit radikali) ve H₂O₂ (hidrojen peroksit)'dir.

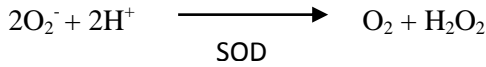
O₂⁻ (Süperoksit radikali)

Moleküler oksijenin bir elektron transferi ile indirgenmesinin ardından kararsız bir yapı olan O₂⁻ radikali oluşur. *In vivo* koşullarda adrenalın, flavin dinükleotidleri, tiyol içeren bileşikler, glukoz ile demir ve bakır gibi geçiş metallerinin etkisiyle meydana gelmektedirler.



H₂O₂ (Hidrojen peroksit)

Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. İki süperoksit molekülü, süperoksit dismutasyonu reaksiyonuyla iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar [136].



ROS'ların ortamda bulunması, yanlış katlanmış proteinlerin üretimini artmasına neden olarak, onları yoketmek üzere ubiquitin-proteazom sistemine olan talebi artırır. Dopaminerjik nöronlar ROS'ların üretimi için uygun bir ortam oluşturur ve DA metabolizması ile hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri oluşur. DA'nın otooksidasyonu ile DA-quinone açığa çıkar [137]. DA-quinone sistein rezidüleriyle reaksiyon verip proteinlerde hasara neden olur. Mitokondri bağımlı enerji düşüşü DA'nın veziküller içerisine depolanmasına engel olarak sitozolde konsantre halde DA birikimine neden olur. DA aracılı zararlı reaksiyonlar hücrel makromoleküllere zarar verir. DA, SNpc dopaminerjik nöronlarını oksidatif atağa hazır hale getirir [5].

2.1.8.4. Mitokondriyel Disfonksiyon

Mitokondride kompleks 1-IV arası elektron transportu iç mitokondriyel membranda bir dizi redoks reaksiyonunu içerir. Bu zincir reaksiyonlar ile mitokondri iç membranı boyunca protein gradienti yaratılır. Elektronlar kompleks 1'den kompleks II'ye geçerek kompleks IV'de oksijeni suya indirgerler. Proteinlerin mitokondriyel matriksten membranlar arası boşluğa geçmesi mitokondri iç membranında elektrokimyasal bir gradient yaratır. Bu gradient proton motive edici güçtür. Protonlar kompleks V ile matrikse geri döner, adenzin difosfat (ADP)'tan ATP sentezlenir. Bu sürece oksidatif fosforilasyon denir [138]. Kompleks I, elektronların solunum zincirine giriş yaptığı kapı görevindedir [139]. Kompleks I genlerindeki mutasyonlar ile Kompleks I hasarı PH'de kompleks I aktivitesinde fonksiyon kaybına neden olur. Bunun yanında MPP⁺, rotenon gibi toksinler, α-sinükleinin overekspresyonu, parkin, PINK1 ve DJ-1 mutasyonu ve ATP azalışı Kompleks I inhibisyonuna neden olabilir [138].

Nöronlar oksijenli solunum için ATP'ye ihtiyaç duyarlar. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri ise oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriden yan ürün olarak üretilirler. Mitokondriyel disfonksiyona neden olabilecek herhangi bir patolojik durumda ROS miktarı hücre içerisinde normal düzeyinin çok üzerine çıkar ve hücrel antioksidan mekanizmalar yetersiz hale gelir. Oksidatif stres mitokondride bulunan lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak sitozole sitokrom c salınımı ile apoptozu tetikler [140].

PH patogenezinde mitokondrinin rolü ilk kez MPTP ve parkinsonizm arasındaki ilişkinin keşfi ile açıklanmıştır. MPTP'nin oksidasyonu MPP⁺ üretimine neden olurken MPP⁺ dopaminerjik terminalden alınır ve mitokondriyel kompleks 1'in aktivitesini inhibe eder. Kalsiyum homeostazisini bozar ve endoplazmik retikulum (ER) stresini artırır. Hücre hasarı meydana gelir [141]. Sporadik PH'lı hastaların kompleks 1 aktivitelerinin sağlıklı bireylere göre %32-38 oranında azalması, mitokondriyel disfonksiyonu göstermektedir [142, 143].

Hücrede meydana gelen oksidatif stres, eksitotoksisite, DNA hasarı gibi nedenlerle sitozolik kalsiyum artışı, oksidatif radikaller ve aktive ettiği nükleer enzim poly (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1), poli (ADP-riboz PAR) oluşumuna neden olur. Mitokondriyel membran potansiyeli azalır, mitokondriyel permeabilite geçiş porları (PTP) açılır. NAD⁺'nın PTP'lerden çıkışı nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) azalışına neden olur. Mitokondriyel apoptoz başlatıcı faktörlerin salınımı, sitokrom c salınımını artırır. Kaspaz enzimi aktive olarak hücre apoptozu gider [29].

Parkin gen mutasyonu kompleks I aktivitesinde azalmaya neden olur [144]. Sitozolik α-sinüklein de mitokondriyel membranlarla iletişim kurup kompleks I'i inhibe edebilir [145].

2.1.8.5. Nöroinflamasyon

PH'de nöronal kayıp mikroglialarla yönlendirilen nöroinflamasyonla ilişkilidir. Mikroglial reaksiyon Parkinson hastalarında SN'de ya da MPTP hayvan modellerinde SN/striatumda görülür [146]. Mikroglialar hücrel hasar ya da savunma durumunda hücre kalıntıları ve patojenleri temizlemek üzere aktifleşirler. Aktif hale gelince NO, süperoksit vb. serbest radikaller meydana gelir. Bu ajanlar mikroçevrede oksidatif strese neden olurlar. Mikrogliaların kronik aktivasyonu nöroinflamatuvar cevabı başlatır, hücre dejenerasyona gider [147]. Hasarlı nöronlardan salınan inflamatuvar sinyaller bunu tetikler, nöromelanin ve α-sinüklein oluşur.

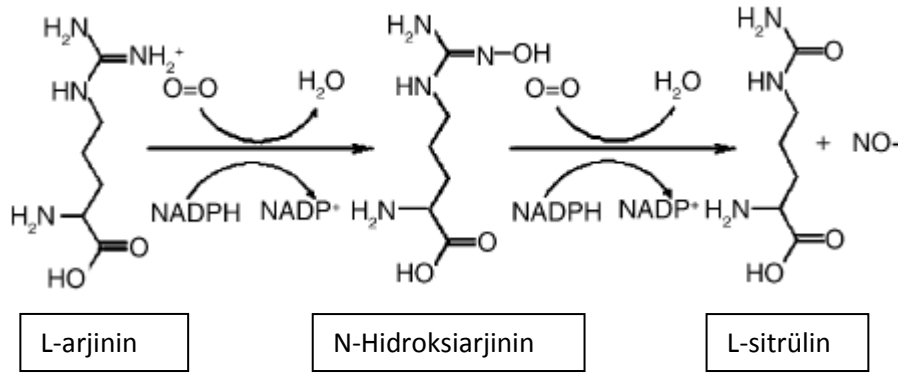
Nöromelanin DA oksidasyonu ile oluşan bir polimerdir ve substansiya nigraya koyu rengini verir. Çözülmeyen bu granüller juvenil ve idiyopatik Parkinson hastalarında [148] ve MPTP hayvan modellerinde gözlemlenmiştir [149]. Nöronların dejenerasyonu ile açığa

çıkan serbest nöromelanin, mikrogliaları aktive ederek SN'de nöronların kaybına neden olur. Kronik PH nöroinflamasyonundan sorumlu moleküllerden biridir [140].

Nöronlardan salınan α -sinüklein astrositleri stimüle ederek inflamatuvar mediatörlerin salınımı ile mikroglia kemotaksisini, aktivasyonunu ve proliferasyonunu sağlar [150]. α -sinükleinin nitrasyonu NO artışı ile olur ve nöroinflamatuvar süreç başlar [140].

2.2. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Nitrik oksit (NO), 1980'lerde endotel türevli gevşetici faktör olarak ilk kez kardiyovasküler sistemde tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalar, NO'nun aynı zamanda MSS'de fizyolojik ve patolojik önemli roller üstlendiğini kanıtlamıştır [151]. Nitrik oksitin difüzyon potansiyeli oldukça yüksektir ve sitoplazmik bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) ile L-arjininden nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve moleküler oksijen kullanılarak sentezlenir [152]. NO nörotransmisyon [153], vasküler tonus [154], gen transkripsiyonu [155], mRNA translasyonu [156] üzerine etki gösterirken proteinlerde post translasyonel modifikasyonlara [157] da neden olabilir. Süperoksit anyonu ile peroksinitrit (ONOO^-) oluşturarak proteinler, lipidler ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara, nitrasyona ve S-nitrozilasyonuna neden olur [158].



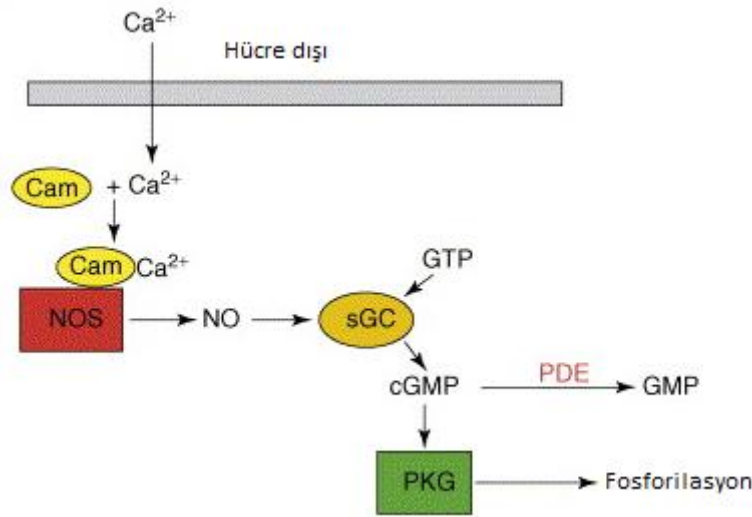
Şekil 2.9. NO Sentezi (Kaynak 159'dan modifiye edilerek alınmıştır) [159].

NOS'un 4 izoformu vardır, bunlar; nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve mitokondriyel NOS (mtNOS)'tur. nNOS ve eNOS baskın olan izoformlardır. iNOS ise hücrelerin enfeksiyona veya hasara karşı inflamatuvar cevabı sırasında eksprese olur [16]. İmmünohistokimyasal çalışmalar, nNOS'un MSS nöronlarına, retina, adrenal medullaya ve barsak nöronlarına lokalize olduğunu göstermiştir [35]. Beyinde eNOS, serebrovasküler endotel hücrelerde [160], iNOS ise astrosit ve mikroglialarda inflamatuvar uyarıya cevaben eksprese olur. eNOS ve nNOS nanomolar konsantrasyonda NO üretirken iNOS mikromolar düzeyde üretim yapar. Yüksek konsantrasyonlar ise nörotoksiktir. Hepsi NO üretse de, hücresel dağılımlarının farklılığı ve transkripsiyonel düzenlenmeleri ile fizyolojik ve patolojik süreçlerde farklı roller üstlenirler [161].

NOS enzimleri iki katalitik altbirim içerir. Bunlar N-terminal oksijenaz ve C terminal redüktaz altbirimlerdir. Oksijenaz altbirimi L-arjinin, heme ve tetrahidrobiopterin (BH4) için bağlanma bölgesi içerirken redüktaz altbirimi flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mono nükleotid (FMN) ve NADPH için benzer bağlanma bölgeleri içerir. Bu iki katalitik altbirim kalmodulin bağlanma bölgesi ile birbirine bağlıdır. Flavinler elektronların NADPH'den heme demirine geçişini düzenlerken L-arjininin L-sitruline oksidasyonu

sırasında NO üretimine neden olur. BH4 elektron geçiş sürecinde önemlidir çünkü NOS'un homodimerik konformasyonunu etkiler [162].

NO, guanilat siklaz (GC)'in merkezinde demir bulunan heme grubuyla reaksiyon verir ve konformasyonel değişimine neden olur. Bu değişim guanozin-5'-trifosfat (GTP)'nin siklik guanozin mono fosfat (cGMP)'a aktivasyonunu katalizler. cGMP ikincil bir habercidir ve protein kinazları aktive eder. Protein kinaz G 1 (PKGI) çözünebilirdir ve düz kas hücreleri ile serebellum purkinje hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese olur [163]. Protein kinaz G 2 (PKGII), membran bağlı bir proteindir ve beyinde, barsaklarda ve böbrekte bulunur [164]. PKGI'in temel rolü hücre içi kalsiyumun kontrolüken PKGII klor gibi anyonların akışını düzenler [165]. cGMP, siklik nükleotidlerin temel fosfodiesterazlarının aktivasyonunu da düzenler. cGMP düzenlemeli fosfodiesteraz 3 (PDEIII) inhibisyonu memeli kalbinde hücre içi cAMP düzeyini artırır [166] ve cAMP aktivasyon yolağındaki proteinleri aktive eder. cGMP aracılı fosfodiesteraz 2 (PDEII) stimülasyonu nöronal sıçan adrenal feokromasitoma hücre hattı (PC12) hücrelerinde ise tam tersi etkileri yönlendirir [167].



Şekil 2.10. NO sinyal yolağı (Kaynak 168'den modifiye edilerek alınmıştır) [168].
PDE;fosfodiesteraz.

2.2.1. iNOS (NOS II)

iNOS ilk kez makrofajlardan izole edilerek varlığı gösterilmiş, 130-131 kDa molekül ağırlığına sahip 1153 aminoasitten oluşmuş ve 17. Kromozomda lokalize olmuş sitoplazmik bir enzimdir [169]. Hücrelerde devamlı sentezlenmez. Ekspresyonu bakteriyel lipopolisakkaritler, sitokinler ve çeşitli ajanlarla tetiklenebilir. Temel olarak makrofajlarda tanımlanmış olsalar da uygun ajanlarla her doku ve hücrede eksprese olabilir [170]. Sentezlendikten sonra ise iNOS aktif hale gelir ve hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonundan etkilenmez. iNOS makrofajlarda yüksek düzeyde NO sentezler. Bu artış hücreler için sitotoksiktir [171]. Protein bağlı demire bağlanma isteği ile NO, katalitik merkezlerinde demir taşıyan birçok enzimi inhibe etme özelliğine sahiptir. Mitokondriyel enzimler kompleks I, II, ribonükleotid redüktaz (DNA replikasyonu), cis-asonitaz (sitrik asit döngüsü) enzimleri NO'nun hedefi haline gelebilir [172]. Makrofajlarca üretilen yüksek seviyedeki NO, hedef hücre DNA'larına etki ederek zincir kırıklarına veya fragmantasyona neden olabilir [171]. Tüm bu etkiler, parazitik mikroorganizmalarda ve tümör hücrelerinde sitostatik ve sitotoksik NO'nun etkilerini göstermektedir. İmmün olmayan hücrelerde de sitokinlerle uyarım sonucu çevre hücreleri etkileyecek kadar NO salınabilir. Sitokin ile

aktive olan endotelial hücrelerde örneğin tümör hücrelerini parçalamada [173], hepatositlerde malarya sporozoitlerini öldürmede iNOS aktivitesinin oldukça etkili olduğu bilinmektedir [174].

Aktif makrofajlarca üretilen yüksek düzey NO, mikrobiyal ajanlar, parazitler veya tümör hücreleri için toksik olmanın yanında yanlış bölgeden salındıklarında sağlıklı hücreler için de zararlı olabilirler. *In vivo* koşullarda hücre ya da doku hasarı NO radikalının tek başına etkisiyle oluşmanın yanında O₂ ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit oluşumuna bağlı olarak da meydana gelebilir. Makrofajlarca salınan NO, bu özelliğiyle çevre dokular için hasar verici olabilir [175].

2.2.2. eNOS (NOS III)

eNOS, varlığı ilk kez endotelial hücrelerde gösterilmiş 1203 aminoasitten oluşan 133 kDa molekül ağırlığına sahip 7. kromozda ve %90 oranında membrana lokalize olmuş halde bulunan bir enzimdir [169]. Yoğun olarak endotel hücrelerinde üretilir. İzo enzimi ise kalp miyositlerinde, beyin nöronlarında, insan plasenta trofoblastlarında ve böbrek tübüler epitel hücrelerinde bulunmuştur [170]. Ca⁺² ve kalmodulin eNOS aktivitesini düzenlemede etkilidir. Hücre içi Ca⁺² artışı ile eNOS'un aktivitesi artar. Ca⁺² kalmodulinin enzime bağlanmasını tetikler [176]. Örneğin hsp 90 (heat shock protein 90), enzimi aktive eden bir düzenleyici görevi görür [177].

eNOS serin, treonin, tirozin rezidülerinden fosforillenerek aktive olabilir. Ser 1177'nin fosforillenmesi redüktaz altbirimde elektron akışına neden olarak enzimin Ca⁺² duyarlılığını artırır [178].

eNOS kardiyovasküler fonksiyonları düzenlemede homeostatik birçok özellik gösterir. eNOS aracılı salınan NO, guanilat siklaz aracılığıyla ve düz kasta artan cGMP ile kan damarlarında dilatasyona neden olur [154]. Vasküler lümenine salınan NO platelet agregasyonunun ve vasküler duvara adezyonunun etkili bir inhibitörüdür [179]. Trombozisten korumasının yanında platelet türevli büyüme faktörü salınımını engelleyerek düz kasta proliferasyonu ve matriks moleküllerinin üretimini inhibe eder. eNOS, kan akımındaki kronik değişikliklere uyum sağlamada kritik öneme sahiptir [180].

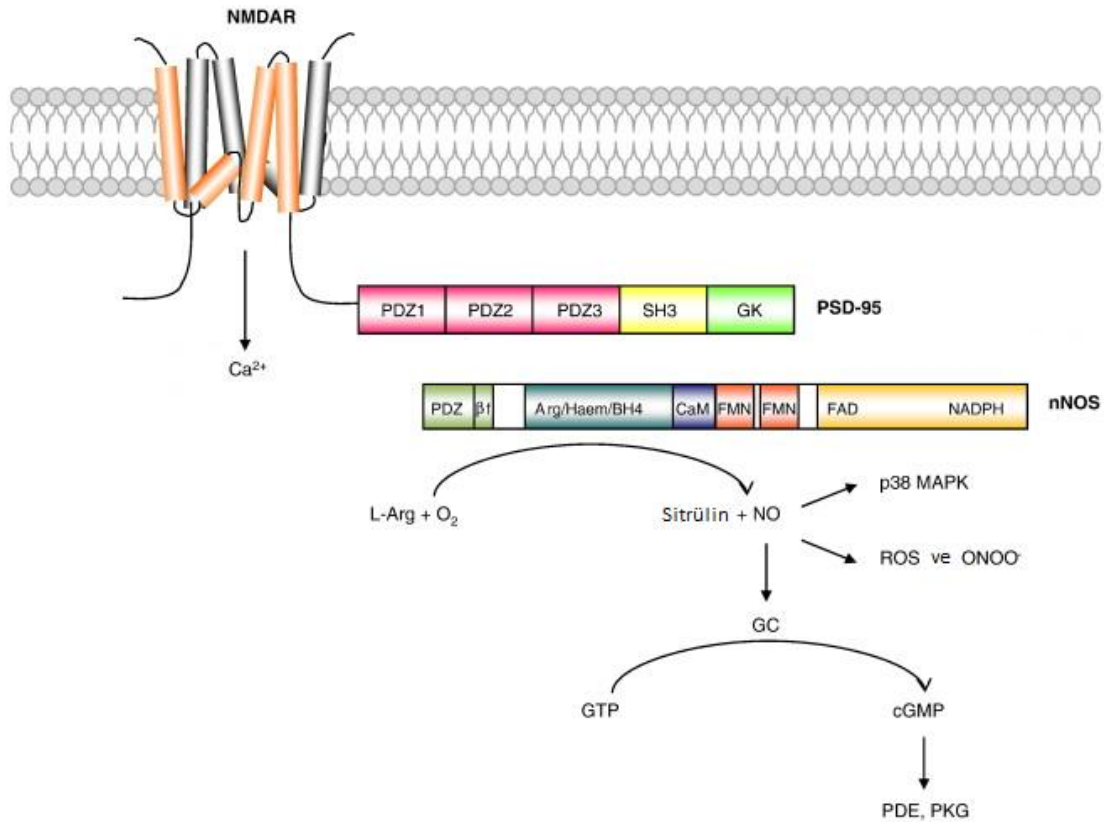
2.2.3. mtNOS (nNOS α)

Mitokondri iç membranında nNOS izoformu mtNOS yer alır [181]. Sıçan karaciğeri, böbrek, akciğer, testis, dalak, kalp, kas ve beyinde bulunur [182]. Mitokondrideki NO'nun fonksiyonu sitokrom c oksidazın inhibisyonu ile O₂ tüketiminin düzenlenmesiyle ilişkilidir [183]. mtNOS nNOS α izoformu olarak tanımlanır ve aynı nNOS geni ile kodlanır [182]. nNOS knockout farelerde mtNOS da bulunmamaktadır [184]. mtNOS, nNOS'tan farklı olarak iki tane daha post-translasyonel düzenlenme mekanizması içerir. Tetradekanoik asit ile açillenir ve c terminalinden fosforillenir [182].

2.2.4. nNOS (NOS I)

nNOS varlığı ilk kez beyinde gösterilmiş, 1434 aminoasitlik 160 kDa molekül ağırlığında 12. kromozoma lokalize membrana bağlı ya da sitozolde serbest bulunan bir proteindir [169]. nNOS beyinde spesifik nöronlarda eksprese olur. Enzim aktivitesi Ca⁺² ve kalmodulin ile düzenlenir. nNOS'un hücrede farklı yerleşim yerlerinin olması fonksiyonel olarak çeşitliliğine işaret eder. nNOS taşıdığı PDZ altbirimleri ile diğer proteinlerin PDZ altbirimleri ile etkileşime girebilir. nNOS beyinde, omurilikte, sempatik ganglionlarda ve salgı bezlerinde, periferde nitrejik sinirlerde, epitel hücrelerde, böbrek makula densa hücrelerinde, pankreatik adacıklarda ve vasküler düz kasta bulunur. Memelilerde iskelet kasında nNOS oldukça fazla miktarda bulunur [170, 185].

nNOS, öğrenme, hafıza ve nörogenez gibi fizyolojik fonksiyonları düzenlemede önemli rol oynar [185]. MSS’de nNOS sinaptik iletiyi uzun süreli düzenlemede (LTP) görev alırken akut nörotransmisyonunda nNOS tarafından üretilen NO’nun varlığı hakkında henüz yeterince kanıt bulunmamaktadır. Sinaptik bağlantılarda retrograd iletişimin hafıza oluşumunda rol aldığı, NOS inhibitörlerinin öğrenmeyi bozarak hayvanlarda unutkanlığa neden olduğu bilinmektedir [186]. nNOS aktivitesinin medulla ve hipotalamusta blokajı, sistemik hipertansiyona neden olur [187]. Periferde birçok düz kas dokusu nitrejik sinirlerle uyarılır ve nNOS aracılığıyla NO üretilir. Nitrejik sinirlerden salınan NO, NO duyarlı guanilat siklazı efektör hücrelerde aktive ederek kan damarları gibi birçok düz kas hücresinde tonusu azaltır. [170] Periferde vasküler tonusu düzenlemeden eNOS sorumlu gibi gözükse de seçici nNOS inhibitörü ile insanda yapılan çalışmalarda ön kolda ve koroner dolaşımında bazal kan akımının azaldığı görülmüştür. Bu etki L-arjinin ile geri alınabilmiştir. Bu özelliği, nNOS’un periferde vasküler tonusu düzenlemede önemli rol oynadığını göstermektedir [188].



Şekil 2.11. NMDAR/PSD-95/nNOS kompleksinin genel yapısı (Kaynak 189’den modifiye edilerek alınmıştır) [189].

Normal olmayan NO sinyalizasyonu nörodejeneratif birçok hastalıkta görülmektedir. Bunlara örnek felç, multipl skleroz (MS), Alzheimer ve Parkinson hastalıklarıdır [190]. Hiperaktif nNOS nöronlara Ca²⁺ girişi ile uyarılır ve serebrovasküler felçte N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör aracılı nöron ölümü olduğu izlenir [191]. NO bu koşullarda sitotoksisiteyi, Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve mitokondriyel geçiş porunun peroksinitrit aracılı aktivasyonunu oluşturur. Yüksek miktarda NO, mitokondriyel solunum ve glikolizin inhibisyonu ile enerji düşüşlerine neden olur [192].

2.2.5. Reaktif Nitrojen Türlerinin Üretimi

Nitrozatif stres terimi NO ve türevlerinin, proteinleri ve deoksiribonükleik asit (DNA)'i hasarlama yeteneğini ifade eder. Primer reaksiyon, NO'nun O₂ ile peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturmasıdır. Bu durum, NO'nun kullanılabilirliğini azaltır. Proteinlerin nitrozilasyonu ve nitrotirozinasyonu NO'nun fizyolojik rolü için önemlidir. Nitrozilasyon, NO'nun sisteinle reaksiyonu sonucu nitrozotiyol oluşturmasıdır. Nitrotirozinasyonu ise tirozinin ONOO⁻ ile 3-nitrotirozin oluşturmak üzere reaksiyona girmesidir [191].

NO/ONOO'nun bir diğer etkisi, hücre içi depolardan Zn⁺² salınımına neden olmaktır [195]. Serbest Zn⁺² solunumu bloklar, mitokondriyel geçiş porunu açar, sitokrom c salınımına neden olarak ROS üretimine ve p38MAPK aktivasyonu ile potasyum çıkışına, hücre hacim kaybına ve apoptoz benzeri hücre ölümüne neden olur [196].

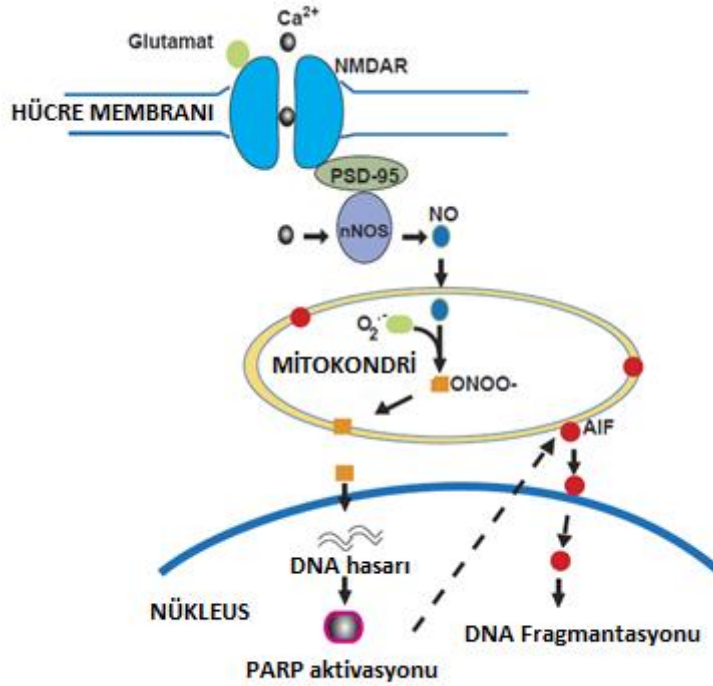
NO'nun nörodejeneratif hastalıklardaki patojenik mekanizmaları eksitotoksisite, DNA hasarı ve protein modifikasyonlarıdır.

2.2.6. Nitrik Oksit ve Eksitotoksisite

Eksitotoksisite, nörolojik hastalıkların temelinde yatan, glutamat ve reseptörleri ile yönlendirilen bir mekanizmadır. Nöronal eksitotoksisitede, N-metil-D-aspartat (NMDAR) reseptör aktivasyonu yer alır. NMDAR aktivasyonuna neden olan moleküler mekanizmalar henüz netlik kazanmasa da NO bu yolakta önemli bir yere sahiptir.

NO'nun NMDAR eksitotoksisitesinde yer aldığı ilk kez primer kültüre kortikal nöronlarda gösterilmiştir [193]. Bu nörotoksisite, NOS inhibitörü ile (N-monometil-L-arjinin) engellenmiştir. Kornau ve ark. NMDAR altbirimlerinin sitoplazmik kuyruklarının postsinaptik densite protein (PSD-95) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda PSD95 transkriptinin ekspresyon paterninin NMDAR'ye benzer olduğunu bulmuşlardır. Onlara göre PSD-95, NMDAR ve onun efektörleri arasında köprü görevindedir [194]. Brenman ve ark. nNOS'un N terminalinin PSD-95 ile bağlantılı olduğunu, nNOS ve PSD-95'in bir çok nöronal populasyonda birlikte eksprese olduklarını göstermişlerdir. PDZ domainsiz nNOS'un beyinde PSD-95 ile eşleşmediğini de göstermişlerdir [195]. Başka çalışmalar, PSD-95'in nNOS ve NMDAR'yi içeren protein kompleksini etrafında topladığını kanıtlamıştır. Bu kompleks, PSD95'in PDZ domaini tarafından yönlendirilir ve spesifik NMDAR altbirimlerinin karboksil terminallerine bağlanır. NMDAR'nin nNOS ile bağlantısı PSD-95 ile NMDAR aktivasyonu ve NO üretimi arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır [196].

Sottler ve ark.larına göre kültüre kortikal nöronlarda PSD95'in ekspresyonunun baskılanması, NMDAR aracılı eksitotoksisiteyi azaltmıştır. Fakat diğer glutamat veya kalsiyum iyon kanalı aktivasyonlarını engellememiştir. Yalnızca NMDAR aracılı kalsiyum aktiviteli NO üretimini bloklamıştır. PSD95'in down-regülasyonu ve NO üretimindeki azalma nöronların NMDA aracılı toksisiteye karşı direncini artırır. Tüm bu çalışmalar, nöronlarda PSD95 ile nNOS'un NMDAR'ye tutunduğunu ve NMDAR aktivasyonu ile NO'nun eksitotoksisiteye neden olduğunu gösterir. NMDAR'nin PSD95 ile ilişkisinin bozulması, sıçan nöronlarını eksitotoksisite ve iskemik hasara karşı korur [197].



Şekil 2.12. NO ve ve patojenik mekanizmaları (Kaynak 198'den modifiye edilerek alınmıştır) [198].

2.2.7. Nitrik oksit ve DNA hasarı

NO aracılı hücre hasarında peroksinitrit önemli bir faktördür. Hücreler oksidatif stres altındayken ROS'lar hücrelerde birikir, NO ile reaksiyona girerler ve peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit, diğer bileşiklerle reaksiyona girip daha toksik peroksinitrit ürünlerini oluşturur. Bu ürünler DNA hasarına yol açar ve kaspaz bağımlı veya bağımsız hücre hasar mekanizmalarını aktive eder [112]. Mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) ise mitokondrideki ROS'u süpüren majör enzimdir. Hücreleri NO toksisitesine karşı korur [113].

NO ve peroksinitrit aracılı DNA hasarı ve Poly (ADP riboz) polimeraz 1 (PARP 1)'in aktivasyonu, hücre ölümüne neden olan anahtar yollardır. NMDA ve NO, ADP ribozillenmesini sıçan beyinde uyarır. Benzamid ve PARP inhibitörleri NMDA'yı bloklayarak NO aracılı nörotoksititeyi engeller [112]. NMDA aynı zamanda fare beyinde PARP aktivasyonuna neden olur [113]. PARP-1'siz fare (major PARP izoformu) NMDA aracılı nörotoksititeye karşı çok daha dayanıklıdır. PARP'ın aktivasyonu, Nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) ve ATP'yi azaltarak majör enerji düşüşü ile hücre ölümüne neden olur [114]. PARP aktivasyonu, apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün mitokondriden nükleusa geçişine neden olur. AIF, PARP aracılı hücre ölümünde temel nedendir [100].

2.2.8. Nitrik Oksit ve Protein Düzenlenmesi

DNA hasarının yanında NO nitrozillenmesi ve nitrasyonu gibi protein düzenlenmeleri ile de hücre hasarı meydana gelebilir. Birçok protein, fizyolojik ve patolojik koşullarda NO tarafından reaktif sistein tiyollerini ile (S-nitrozillenmesi) düzenlenebilir [199]. Bu proteinler, NMDAR, P21ras, kaspaz 3-9, matriks metalloproteinazlar, Nükleer Faktör Kappa B (NfκB), inhibitör kappa B kinaz (IKK), Parkin vb.dir [200].

S-nitrozillenmesinin hücre ölüm yollarındaki rolü ilk kez 1993'te Lipton ve ark. tarafından gösterilmiştir [191]. NMDAR'nin S-nitrozillenmesinin NMDAR aktivitesini

azaltıp NMDA aracılı nöronal ölüme engel olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra, hücre ölüm yollarındaki enzimlerin S-nitrozillenmesinin (kaspaz ve doku translutaminaz) apoptoz ve nekroz arası dengeyi düzenlediği ortaya çıkmıştır [201].

Protein S-nitrozillenmesinin yanında protein nitrasyonunun da NO ve peroksinitrit aracılı fizyolojik ve patolojik yollarda yer aldığı bilinmektedir. Protein S-nitrozillenmesinde sistein rezidülerinin hedef olmasından farklı olarak nitrozyon, tirozin rezidülerinin aromatik halkasının iki karbonundan birine bir nitro (NO₂) grubunun eklenmesidir [202]. α -sinükleinin nitrozyonu, PH patogenezinde önemli rol oynar. DNA hasarı ve AIF translokasyonunun yanında, NO aracılı protein modifikasyonu da NO toksisitesinde yer alan bir diğer mekanizmadır [203]. PH'de Parkin'in S-nitrozilasyonu başlangıçta Parkin aktivasyonunu artırırken sonraları azalmasına neden olur. α -sinüklein sinaptik terminal proteindir. 4 tirozin altbirimden nitrozyona uğrar ve bu durum onun çökmesine neden olur [204].

2.2.9. Nitrik Oksit ve Parkinson Hastalığı

MPTP ile deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde NO'nun, MPP⁺ aracılı DNA hasarında, PARP-1 aktivasyonunda ve hücre ölümünde rolünün olduğu bilinmektedir [205]. NO inhibisyonunun koruyucu etkisi, azalan NO üretimi, dolaylı olarak daha az DNA hasarı ve PARP1 aktivasyonundan kaynaklanır [206]. nNOS veya iNOS tarafından üretilen NO, farklı görevler üstlenirse de MPTP nedenli nörotoksitede her ikisi de çok önemli rol oynar.

MPTP ile oluşturulan parkinson modelinde striatumda çok sayıda nNOS pozitif nöronlar ve sinir lifleri görülür. Bunların çok az bir kısmı orta beyinde yer alır [35]. MPTP uygulaması, SN'de belirgin bir iNOS aktivasyonuna neden olur. iNOS knock-out farelerde SN dopaminerjik nöronları, MPTP toksisitesine dirençli striatal dopaminerjik lifler değildir. MPTP aracılı striatal dopaminerjik liflerdeki hasar nNOS tarafından üretilen NO ile oluşturulurken, nigral dopaminerjik nöronlar çoğunlukla iNOS ile üretilen NO'ya duyarlıdır [205].

Nitrojenik sinyalizasyon yollarının hücrel ve moleküler hedefleri oldukça çeşitlidir. Uyarıcı glutamaterjik ve inhibitör GABAerjik sinapslarda presinaptik transmitter salınımında, postsinaptik α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit reseptör (AMPA) fosforilasyonunda ve trafiğinde, kalsiyum kanallarında ve diğer sinyal yolları ile iletişimde (MGLUR, endokanabinoid ve katekolamin) görev aldıkları bilinmektedir [190].

2.2.10. nNOS'un Fosforillenmesi

nNOS, farklı serin rezidülerinden protein kinaz A (PKA) [25, 207, 208], protein kinaz C (PKC) [25, 209] ve kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaM-K)'lerle [27, 210, 211] fosforillenebilir. 1999 yılında Hayashi ve ark. tarafından yapılan çalışmada, nNOS'un serin 847'den CaM-kinazlarla fosforilasyonunun *in vitro* koşullarda enzim katalitik aktivitesini azalttığı gösterilmiştir [210]. 1 yıl sonra Cam Kinaz II α 'nın (Cam-K II α) nNOS'u direkt olarak Ser847 bölgesinden fosforillediği ve nNOS aktivitesinin hücrelerde fosforilasyonla birlikte azaldığı açıklanmıştır. Saflaştırılmış CaM-KI α 'nın CaM-KII α ve CaM-K IV'ün Ser847 üzerinde fosforilasyon yeteneğini göstermek için substrat olarak sentetik peptid nNOS 836 kullanılmıştır. CaM-kinazların nNOS 836-859 için Vmax/Km oranları CaM-K II α için 100, CaM-K I α için 54.5, CaM-K IV için 9.1 bulunmuştur. Mutant nNOS (S847A) kodlayan hücrelerin ise fosforilasyona dirençli olduğu ve nNOS aktivitesinin azalmadığı görülmüştür. Sonuç olarak Ca⁺²'nin Cam-K ve nNOS arası sinyal iletimini düzenleyerek CaM-K II α 'nın nNOS'u Ser847'den fosforillediği, böylece ikincil bir haberci olan NO'nun nöronal hücrelerde azaldığı bilinmektedir [27].

nNOS'un C terminali S1412 için de fosforilasyon bölgesi içerir [26]. Fosfatidilinozitol 3 kinaz (PI3K) N-metil-D-aspartat reseptör altbirim (NR2B) tirozinine bağlanıp onu fosforiller. NMDA aracılı Ser1412 fosforilasyonu nNOS'un redüktaz altbiriminde meydana getirdiği elektron akışı ile nNOS'un Ca^{+2} /kalmoduline duyarlılığını artırır. CaM-KII NR2B altbiriminin C terminaline bağlanır. PI3 kinaz tirozin fosforile NR2B altbirimine bağlanır, fosfoinozitidler fosforillenir, Akt plazma membranında aktive olur ve nNOS fosforillenir [212, 213].

Ca^{+2} sinyallerinin hücre içi hedef proteinlere dağılımı ile Ca^{+2} /CaM bağımlı protein kinazlarla katalizlenen fosforilasyon gerçekleşir [214]. CaM-K II cAMP bağımlı kinazlar ve protein kinaz C'ye analog en iyi tanımlanmış multifonksiyonel kinaz enzimidir. CaMK I geniş bir doku ve filogenetik dağılım gösterir [215]. CaM-K II nöral dokularda çokça olmakla birlikte farklı birçok dokuda bulunabilir [216]. CaM-K IV ise beyinde, timusta ve testislerde nükleusa lokalize halde bulunur [217, 218]. Ca/Calm bağımlı enzimler olarak sınıflandırılırsalar da nNOS ve eNOS farklı birçok agonist ile hücre içi Ca^{+2} artışına bağlı olarak aktive olabilir [219]. eNOS'un katalitik aktivitesi ise insanda Thr495 ve Ser1179 bölgelerinden fosforilasyon ile düzenlenir [220].

2.3. EFA (Esansiyel Yağ Asitleri)

1929 yılında, linoleik (LA, 18:2w-3) ve α -linolenik (LNA, 18:3w-3) asitlerin hayvan hücrelerinde esansiyel yağ asitleri (EFA) olduğu keşfedilmiştir. Doymamış yağ asitleri için kullanılan "omega-6" ve "omega-3" kısaltmaları yağ asidi zincirinin distal ucundaki metil karbon atomundan sonra gelen ilk çift bağın yerini gösterir. Her iki temel EFA da uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'nin sentezi için gereklidir [28].

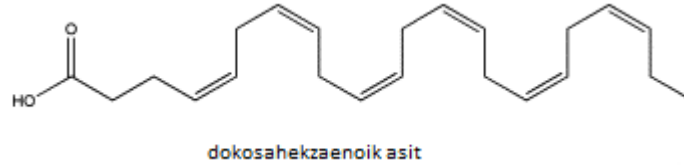
Beyin yapısında çok miktarda yağ asidi içerir. Bunların %50'sini ise PUFA'lar oluşturur. Temel omega-3 yağ asidi α -linolenik asittir (LNA). LNA mikrozomal enzimlerce bir dizi desatürasyon, uzama ve β -oksidasyon reaksiyonu sonucu eikosapentaenoik asiti (EPA) ve dokosaheksaenoik asiti (DHA) (22:6w-3) oluşturur [221]. LNA'nın desatürasyonu ile başlayan yolak hız kısıtlayıcı basamaktır ve onu eikosatetraenoik asite (20:4w-3) uzama basamağı takip eder. $\Delta 5$ Desatüraz ile desatürasyon EPA oluşumuna neden olur. EPA elongaz-2 ile uzatılarak önce dokosapentaenoik asit (DPA) ve ardından tetrakosapentaenoik asit (24:5w-3) üretilir. Tetrakosapentaenoik asit ikinci $\Delta 6$ desatürasyonuna uğrayarak tetrakosahekzaenoik asite çevrilir. (24:6w-3). Bu başlatıcı basamaklar ER'de oluşur fakat DHA sentezinin son basamağı translokasyonun ardından peroksizomda gerçekleşir. Peroksizomda tetrakosahekzaenoik asit açıl-koenzim A oksidaz, D-bifonksiyonel enzim, peroksizomal tiyolazlar ve β oksidasyon ile DHA'ya kısaltılır. Temel omega-6 yağ asidi ise linoleik asittir (LA) ve araşidonik asite (AA) (20:4w-6) parçalanır [221].

PUFA'lar hücre membranının bir parçasıdır ve fosfolipidlerin Sn2 bölgesinde esterifiye olurlar. Uzun karbon zincirleri ve çiftli bağ sayıları ile ilişkili olarak membrana spesifik özellikler kazandırır. DHA, yağ asidi 22 karbondan oluşan oldukça uzun bir yapı olduğundan membranı dinamik ve esnek hale getirir. Yapısındaki altı tane çiftli bağ ile yüksek derecede doymamışlık sergiler [222]. AA ve DHA beyinde plazmadaki depolarından temin edilir. Fakat astrositlerin de w-3 PUFA prekürsörlerinden PUFA sentezleyebildiği bilinmektedir [223]. Plazma depoları diyetle dışarıdan alımla veya karaciğerde LA ve LNA öncüllerinden sentezlenerek oluşturulmaktadır. AA ve DHA'nın çoğu beyin yapısına prenatal dönemin 3. trimestrinde ve erken postnatal dönemde katılır. Prenatal dönemde w-6 ve w-3 PUFA diyet takviyesi bu bakımdan oldukça önemlidir [224].

2.3.1. DHA (Dokosaheksaenoik asit)

İnsan beyninin kuru ağırlığının %60'ını lipidler oluşturur. DHA ise bu oranın büyük bir kısmını oluşturan yağ asidi türevidir [225]. Memeli serebral korteksinin primer yapısal içeriği olmakla birlikte, nöronal membran fosfolipidlerinin %50'sini oluşturur [226]. Omega

3 yağ asitleri membran akışkanlığını sağlamada elzemdir. Nöronal hücre adezyonunda, aksonların yönlendirilmesinde, sinaps bütünlüğünü sağlamada, dendrit oluşumunda ve nörotransmisyonun hızını korumada önemlidir [227]. DHA, biyolojik membranlarda bulunan en uzun ve doymamış yağ asididir. Oldukça esnek ve değişken bir yapısı vardır. Böylelikle membranın düzenini ve akışkanlığını, esneyebilirliğini, iyon geçirgenliğini ve füzyonu etkileyebilir [228, 229]. Nöronlar gibi hızlı vezikül oluşumu ve salınımını gerektiren hücre membranlarında fazlaca bulunduğu bilinmektedir [222].



Şekil 2.13. DHA'nın kimyasal yapısı [230]

Hücre altı düzeyde DHA en yoğun olarak mitokondri ve mikrozoim gibi sinaptik membranlarda bulunur. [231] Kolesterol ve sfingomiyelinle yapısal uyumsuzluğu sebebiyle DHA, membranın iç bölümünde ayrı lipid mikro altbirimleri oluşturabilir [232]. Bu ayırım, birçok reseptör, iyon kanalı, G proteini ve diğer membran bağlı proteinlerin aktivitesini düzenlemede etkilidir [233].

Omega 3 PUFA'nın bu kadar elzem olmasının ve beyin dokusunda çokça bulunmasının diğer bir sebebi nöroprotektif metabolitlere dönüşebilmesinden kaynaklanır. Bu metabolitler oksidatif strese, doku inflamasyonuna karşı mücadelede ve sinaptik bütünlüğü sağlamada etkilidir [234]. PUFA'lar anti-oksidatif stres, anti-inflamatuvar ve antiapoptotik etkileriyle yaşlı, hasarlı beyinlerde ya da Alzheimer hastalığında nöroprotektif etki gösterir [235]. DHA beyin nekrozunu hipoksik iskemik hasarın ardından azaltmıştır ve bunu membranın biyofiziksel özelliklerini, pre-post sinaptik bölge fonksiyonlarını düzenleyerek gerçekleştirir [236]. Örneğin doku stresinde DHA'nın membran fosfolipidlerinden salınıp 'resolvinler' denen bir içeriğe dönüşmesi inflamatuvar süreçlerin aktivasyonunun artışı ile NfκB aktivitesinde azalmaya neden olur [36].

2.3.2. Beyin PUFA Metabolizması

Beyin yüksek düzeyde palmitat (16:0), omega-6 PUFA araşidonik asit (AA) ve DHA içerirken diğer omega-3 PUFA'lardan özellikle EPA'yı daha düşük düzeyde içeren yağ asidi kompozisyonuna sahiptir [237]. Beyinde EPA düzeyleri DHA'dan 250-300 kat daha düşüktür. DHA beyindeki en önemli omega-3 PUFA'dır. EPA, DPA ve DHA'nın fosfolipid lokasyonları beyinde farklılıklar gösterir. Örneğin DHA ve DPA ağırlıklı olarak fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfatidilserinde (PS) bulunurken EPA fosfatidilinozitol esterifiye olur [238].

Doymuş veya tekli doymamış yağ asitleri beyinde sentezlenebilir fakat PUFA'lar dışarıdan diyetle alınmalıdır. LNA alındıktan sonra AA ve DHA prekürsörü olarak kullanılır. Beyin DHA ve AA sentezi için gerekli enzimleri eksprese eder. Kemirgenlerde beyinde PUFA sentezi dışarıdan alımdan çok daha azdır. Dolayısıyla beyin AA ve DHA'yı ağırlıklı olarak dolaşımdan temin eder [239].

PUFA'ların beyindeki dağılımı oldukça karışıktır. PUFA'lar beyine serbest yağ asidi ya da lipidlere esterifiye olmuş şekilde (lizofosfolipidler ve lipoproteinler) taşınabilir. Sıçan yavrularında PUFA'ların beyin için temel plazma kaynağı DHA taşıyan lizofosfolipidlerdir. Yetişkin sıçanlarda ise temel kaynak esterifiye olmamış serbest yağ asitleridir. Son zamanlarda keşfedilen DHA esterifiye lizofosfolipid taşıyıcısı, majör fasilitatör süper aile

altbirim taşıyan protein 2A (MFSD2A)'dır. Lipoprotein lipaz enzimi dolaşımdaki plazma lipoproteinleri hidrolize ederek esterifiye olmamış PUFA veya lizofosfolipid taşıyan PUFA'ların salınımına neden olur. DHA ve AA gibi yağ asitlerinin kan-beyin bariyeri ve diğer nöral olmayan hücrel membranlardan geçişi pasif difüzyonla gerçekleşir. DHA ve AA transportu birçok membran bağlı ve sitoplazmik proteinler yardımıyla olur. Bunlar yağ asidi-translokaz (FAT/CD36), plazma membran yağ asidi bağlanma proteini (FABP) ve yağ asidi transport proteini (FATP)'yi içerir. FABP DHA, EPA ve AA gibi doymuş ve doymamış uzun zincirli serbest yağ asitlerine bağlanır [240].

Beyindeki yağ asidi konsantrasyonları metabolizma sonucu düzenlenir. Örneğin EPA hızlıca β -oksidasyon, uzama ve desaturasyon ile DPA ya da DHA'ya dönüşebilir. Dolayısıyla beyin EPA konsantrasyonu DHA'dan oldukça düşüktür [241].

2.3.3. PUFA'ların Beyin Plastisitesi Üzerine Etkileri

PUFA'lar sinaps ve sinir oluşumu, gelişim ve rejenerasyonda önemli rol oynar. EPA ve DHA'nın nöronal uzantılar oluşumu ve sinaptogenezdeki rolü gelişimin farklı basamaklarında, farklı hücre tiplerinde çalışılmıştır. DHA'nın nöronal uzantı oluşumuna katkısı özellikle sıçan pheokromositoma-12 hücrelerinde (PC-12), [242] sıçan embriyonik hipokampal primer kültürlerde [243] ve sıçan embriyonik kortikal nöronlarında [244] çalışılmıştır. DHA'nın aynı zamanda sinaptogenezini artırarak sinaptik sinapsin ekspresyonunu ve sıçan hipokampal nöronlarında glutamat reseptörlerini artırdığı bilinmektedir [245].

DHA, vSNARE/tSNARE kompleks oluşumunu tetiklerken soluble NSF attachment protein receptor (SNARE)'ler sinaptik vezikül, plazma membranları ve nöronal uzantılarla ilişkili plastisiteyi sağlamada önemlidir [246]. DHA, SNARE kompleks protein sintaksin-3 ekspresyonunu etkiler [247]. DHA uygulaması sinaptozomal-ilişkili protein 25 (SNAP-25) ve sintaksin-3 ilişkisini ve birlikteliğini artırırken, membran ve sinaptik membrandaki dağılımını etkiler [248].

2.3.3.1. Nörogenez

Nörogenez, nöral kök hücreler ve progenitör hücrelerden yeni nöronların üretildiği süreçtir ve yetişkin beyninin iki bölgesinde meydana gelir. Bunlar subventriküler bölge ve hipokampal dentat gyrusta subgranüler bölgedir [249]. Yaşlanma ise nörogenezin en önemli negatif düzenleyicisidir [250].

Çalışmalar, DHA'nın öğrenme ve hafızada yer aldığını göstermiş fakat altında yatan hücrel ve moleküler mekanizmalar henüz tam anlamıyla anlaşılabilirliği değildir [251]. DHA'nın en bilinen koruyucu etkisi nöronal hayatta kalabilirliği artırması [252] ve nörogenezdir [243]. DHA fosfatidilserindeki temel PUFA'dır ve fosfatidilserin sentezini *in vitro* koşullarda artırdığı bulunmuştur. DHA'nın membranda azalması nörogenezini azaltmıştır. Yüksek dozda DHA ile beslenen farelerin beyinlerinde sinaptamid düzeyleri artmış ve bu artış nöral kök hücrelerden nöronal farklılaşmanın arttığını göstermiştir [253].

Miyelinizasyon sırasında beyin, miyelin kılıfla ilişkili oleik asit gibi yağ asitlerini biriktirme eğilimi gösterir. Gebeliğin son trimestrinde beyin özellikle DHA birikimini artırır [254]. DHA'nın beyin gelişim sürecindeki gerekliliğinin oldukça fazla olduğu bilinmektedir. Anne sütündeki DHA ve gelişim sürecindeki beyin DHA birikimi DHA'nın nörogelişimdeki önemini göstermektedir. DHA'dan yoksun beslenen yavruların, anne sütü ile DHA alan yavrulara göre nörogelişiminin düşük olduğu bilinmektedir [255].

2.3.3.2. Oksidatif Stres ve Apoptoz

w-3 PUFA'lar oksidatif stres, apoptoz gibi hücre sinyalizasyon mekanizmalarını düzenleme yeteneğine sahiptirler [256]. Oksidatif streste hücrel düzeyde ROS'larla

antioksidan kapasite arasında dengesizlik vardır. Bu durum lipidlerde peroksidasyona, proteinlerde denatürasyona veya fonksiyon kaybına neden olabilir. RNA veya DNA hasarı meydana gelebilir. w-3 PUFA'ların ise anti oksidatif özellikleri vardır. Bunu antioksidan glutasyon redüktaz enzim aktivitesini değiştirerek yaparlar [257]. w-3 PUFA'lar kaspaz modülasyonu ile anti apoptotik etkiler de gösterirler. DHA mediatörü olan nöroprotektin D1 (NPD1), anti apoptotik proteinlerden BCL2, BCLXL ve BCL-2 ilişkili protein A1 (BCL2A1) 'in yeniden düzenlenmesini artırırken pro apoptotik BAX, BAD, BID ve Bı proteinlerin azalmasına neden olur [258]. Ayrıca beyinde artan DHA düzeyi travmatik beyin hasarına maruz kalmış sıçanlarda beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) düzeyinin normal koşullara dönmesini sağlamıştır [259].

2.3.3.3. Nöroinflamasyon

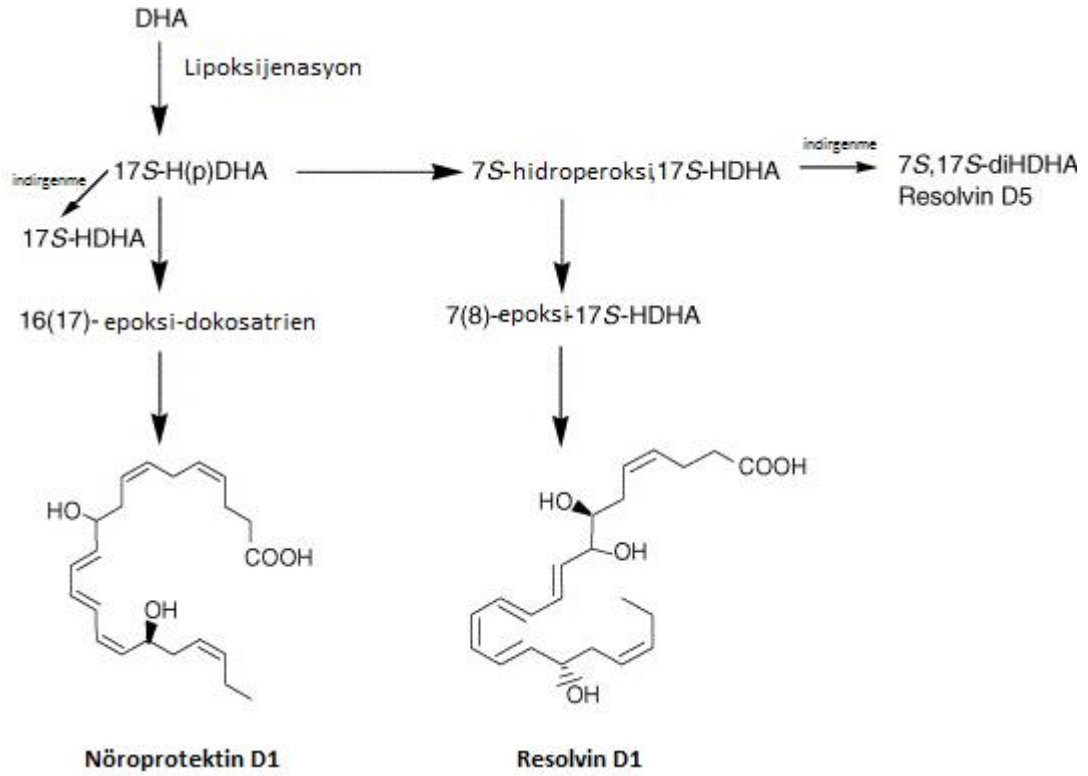
PH'de görülen nöroinflamasyonda w-3 PUFA'ların anti inflamatuvar etkileri iki şekilde gerçekleşir. w-3 PUFA'lar AA metabolizmasını siklooksijenaz (COX)'larla enzimatik olarak yarışarak engeller. Artan DHA/AA oranı, proinflamatuvar eikosanoidleri (prostoglandinler) azaltır. Diğer bir etkisi DHA-EPA türevli medaitörler aracılığıyla olur. Bu mediatörler resolvin ve protektin ailesine dahildirler ve anti-inflamatuvar etkilere sahiptirler [257]. Ayrıca lökosit infiltrasyonunu engeller, COX2 ve NfκB ekspresyonunu düşürürler [260]. Striatal astroglizis cevabı da DHA ile Fat-1 transgenik farelerde MPTP uygulamasının ardından azalmıştır [261]. Nigrostriatal yolda w-3 PUFA'ların birçok farklı işlevi olduğundan tek bir mekanizma üzerinden DHA'nın etkisini açıklamak mümkün değildir [262].

2.3.4. DHA'nın Etki Mekanizmaları

DHA vücutta kendiliğinden sentezlenemediği için dışarıdan diyetle alınmalıdır. w-3 PUFA kaynağı temel olarak balık yağlarıdır ve DHA prekürsörü α-linolenik asit (α-LNA) içerirler. Alımın ardından w-3 PUFA'lar beyne girer ve plazmalojen ve fosfatidilserin içeren fosfolipid gliserollerile sn-2 bölgesinden birleşir. DHA, plazmalojen seçici fosfolipaz A2 ve kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 (iPLA2) etkisi ile salınır. DHA salınımı kolinerjik ve serotonerjik reseptörlerin stimülasyonu ile gerçekleşir. AA ve DHA PUFA'lar biyoaktif mediatörlere çevrilir. PLA2'ye eş reseptörler aktive olunca PUFA mediatör sentezinde temel enzim COX'lar, LOX (lipoksijenazlar) ve sitokrom P450'dir [263]. Diğer dokulardan farklı olarak nöronlarda bazal COX2 ekspresyonu yüksektir. AA'nın prostoglandin E2 (PGE2)'ye dönüşümünü tetikler. PGE2 beyinde önemli bir sinyal molekülüdür [264].

Günümüzde beyin dokusunda sayıca çok az DHA türevli mediatör tanımlanabilmiştir. Bunlar, 17S-hidroksi-DHA (17-HDHA), nöroprotektin D1 (NPD1), resolvin D5 (RvD5), 14-HDHA ve maresin 1 (MaR1)'dir. NPD1, RVD5 ve MaR1 biyoaktiftir ve LOX yolağı ile üretilir. Glial hücrelerde de NPD1 üretiminin olduğu bilinmektedir [263].

DHA'nın koruyucu etkileri metabolik bir türevi olan NPD1 ile yönlendirilir [265]. NPD1 nöronları oksidatif strese, inflamasyona, hücre iskeletinin bozulmasına ve apoptotik sinyal yollarının oluşumuna karşı korur. DHA beyinde glutasyon redüktaz aktivitesini artırarak oksitlenmiş proteinlerin birikimini önler [266], lipid peroksitlerin ve reaktif O₂ türevlerinin miktarını azaltır [267]. DHA, kaspaz aktivasyon sinyal yollarını inaktive eder [268], taunun hiperfosforilasyonunu inhibe eder [269] ve PI3K/Akt yolağını düzenler [270]. DHA'nın diğer potansiyel koruyucu mekanizmaları arasında inflamasyonun, transkripsiyonun ve hücre membran özelliklerinin düzenlenmesi yer alır [271-273].



Şekil 2.14. Memeli hücrelerindeki majör nöroprotektin ve resolvinlerin DHA'dan biyosentez mekanizması (Kaynak 274'ten modifiye edilerek alınmıştır) [274].

2.4. HİPOTEZ

PH'da substansiya nigra bölgesinde apoptozun indüklendiği ve lipid peroksidasyonunun arttığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyon artışına neden olan önemli etmenlerden biri nitrik oksit üretiminin artışı ve peroksinitrit oluşumudur. Deneysel parkinson modelinde MPTP'nin iNOS ve nNOS ekspresyonununu artırdığı, DHA'nın ise apoptozu azalttığı ve lokomotor aktiviteyi etkilediği bilinmektedir. MPTP ile parkinson modeli oluşturulan hayvanlara verilen DHA'nın koruyucu etkisinin, nNOS aktivitesini azaltan serin 847'nin fosforilasyonu üzerinden olduğunu aydınlatmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji, Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ve Deneysel Hayvanlar Ünitesi'nde gerçekleştirilen çalışmalarda ortalama 25-30g ağırlığında, 3 aylık, erkek C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Fareler 6 tanesi bir kafeste tutulmak üzere polipropilen hijyenik kafeslerde, 23 ± 2 °C'lik sabit sıcaklıkta 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık sürelerin sağlandığı laboratuvar koşullarında barındırılmıştır. Tüm gruplardaki hayvanlar normal ticari kemirgen yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Çalışma süresince hayvanların yem ve su alımı serbest bırakılmıştır.

3.1. Gruplandırma

- 1) Kontrol Grubu (K) (n=30)
- 2) DHA diyeti uygulanan grup (DHA) (n=30)
- 3) MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson grubu (MPTP) (n=30)
- 4) DHA diyeti uygulanan + MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson grubu (DHA+MPTP) (n=30)

3.2. Deneysel Protokolü

3.2.1. DHA Uygulaması

DHA (Docosaheksaenoic acid, Sigma-D 2534), DHA ve DHA+MPTP gruplarına, mısır yağında çözülerek, 36mg/kg/gün dozda, 30 gün boyunca, 22 numaralı beslenme sondasının kullanıldığı gavaj yoluyla uygulanmıştır [275, 276]. DHA uygulanmayan K ve MPTP gruplarına ise mısır yağının olası etkilerini elimine etmek amacıyla aynı miktarda mısır yağı aynı şartlarda gavaj yoluyla verilmiştir.

3.2.2. Deneysel Parkinson Modelinin Oluşturulması

Gavaj uygulamasının 23. gününde MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride, Sigma-M 0896) toksini, MPTP ve DHA+MPTP gruplarına, serum fizyolojik (SF)'te çözülerek (3mg/ml), 4x20mg/kg dozda, 2 saat aralıklarla, intraperitoneal (i.p.) yolla uygulanmıştır [107, 277, 278]. Bu uygulama yalnızca 23. günde ve toplam 4 doz olacak şekilde yapılmıştır. MPTP uygulanmayan Kontrol ve DHA gruplarına ise diğer gruplarla aynı strese maruz bırakmak amacıyla aynı miktarda SF ile i.p. enjeksiyon yapılmıştır.

3.3. Parametreler

3.3.1. Ağırlık Takibi

Deneysel süresi boyunca haftada 1 gün hayvanların ağırlık değişimleri takip edilmiştir.

3.3.2. Motor Aktivite Tayini

3.3.2.1. Bradikinezi şiddetinin belirlenmesi

Deneysel Parkinson modeli oluşturulduktan 7 gün sonra, motor aktiviteyi belirlemek için PH'nın spesifik semptomlarından bradikinezi değerlendirilmiştir. Bradikinezinin

derecesini ölçmek için küçük modifikasyonlara uğratılmış [279] olan Ogawa ve arkadaşlarının [280] ‘Pole Test = Çubuk Testi’ metodu kullanılmıştır [276].

Kelime anlamı istemli hareketlerde yavaşlama olan bradikinezi, genellikle hareketin başlatılmasında gecikme şeklinde tanımlanmaktadır. Bu gecikme süresinin uzaması bradikinezi şiddetinin arttığını göstermektedir.

Test için yaklaşık olarak 0,8 cm çapında ve 50 cm uzunluğunda metal çubuk, sargı bezi ile sarılarak hayvanın daha iyi tutunabilmesi için uygun hale getirilmiştir. Fare çubuğun en üst noktasına başı yukarıya bakacak şekilde bırakılmış ve bu konumda iken tamamen geriye dönüp zemine doğru hareket etme anına kadar geçen toplam süre kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Pole (Çubuk) testi

3.3.2.2. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite, açık alan aktivite görüntüleyici sistem (MAY 9908 model Aktivite Görüntüleyici Sistem: Commat Ltd, Türkiye) ile ölçülmüştür [281]. Bu sistem, kızılötesi fotoseller ile donatılmış sekiz plastik cam kafesten (42 cm x 42 cm x 30 cm) oluşur. Kafeslerin yan bloklarında, yerden 2 cm yükseklikte ve 2,5 cm aralıklarla on beş yayıcı ve algılayıcı fotosel çifti bulunmaktadır. Diğer on beş fotosel çifti ise yerden 8 cm yukarıya yerleştirilmiştir. Deney hayvanının lokasyonu ise 0,1 s hassasiyetteki yazılım ile hesaplanmıştır. Genel lokomotor aktivite ve farenin kafes içindeki pozisyonu fotosel ışınlarının kesilmesi ile belirlenir. Eğer lokasyon tamamen değişirse bu kayıt ambulatuvar aktivite olarak kabul edilir. Dolayısıyla ambulatuvar hareket, deneğin kafes içinde dikilme

haricinde yaptığı her türlü yer değiştirme (gezinme) hareketidir. Diğer ölçümler ışınların kesilmesine bağlıdır, lokasyon değişimi gerekli değildir. Toplam lokomotor aktivite ise vertikal, horizontal ve ambulatuvar hareketlerin toplamı şeklinde ifade edilir. Parametreleri test etmek için deney hayvanı açık alanın tam ortasına koyulmuş ve 5 dakika boyunca kayıt alınmıştır. Bir sonraki hayvana geçmeden önce, deney hayvanına ait kokuyu gidermek amacıyla, açık alan %10'luk etanol çözeltisi ile silinmiştir.



Şekil 3.2. Lokomotor aktivite testi

3.3.2.3. Rotarod testi

Rotarod testi farelerde motor koordinasyonu ve dengeyi tespit etmek için kullanılmıştır [282, 283]. Hayvanlar 3 ardışık gün boyunca rotarod aletine (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy) alıştırmıştır. Her gün aynı saatte, deneye başlamadan 30 dakika önce, hayvanlar laboratuvara alınarak çevreyle ilişki kurmaları sağlanmış, 5 dakika arayla 2 ardışık ölçüm yapılmıştır. Hayvanlar bireysel bölmelerine, dönen çubuğun (7,3 cm çapta) tersi yönünde yerleştirildikten sonra çubuk üzerinde kalma süreleri tespit edilmiştir.

Değişen hızlarda (5-40 rpm (dakikada dönme sayısı)) ölçüm yapılmış ve rotarod performansı, çubuk üzerinde geçirilen toplam saniye cinsinden ifade edilmiştir. Hayvanlarda meydana gelebilecek stres ve yorgunluğu azaltmak amacıyla farklı hızlar arasında 5 dakika dinlenme periyodu uygulanmıştır. Rotarod sistemi dönen çubuk üzerinde kalma süresini kaydetmekte ve hayvan düştüğü zaman bu süreyi göstermektedir. Kayıt alma süresi 300sn olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Rotarod testi

3.3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması

Deney süresinin 30. günü, motor aktivite tayinini takiben aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır.

Hayvanlar (1 gr/kg) dozda intraperitoneal üretan çözeltisi uygulanması ile anesteziye alındıktan sonra orta hat kesisi yapılarak abdomeni ve göğüs kafesi açılmıştır. Aortanın iliak bölgesine yerleştirilen bir branül ile (26 numaralı) (1/1000) oranında serum fizyolojik (SF) ile seyreltilmiş heparinize SF çözeltisi verilerek dokuların perfüzyonu sağlanmıştır. Bu esnada sağ atrium kesilerek heparinize SF'in boşalması sağlanmıştır. Histolojik analizler için ayrılan hayvanlardan beyin izolasyonu hemen gerçekleştirilmiştir. Bu hayvanlar, heparinize SF'e ek olarak formaldehit ile perfüze edilmiştir. Biyokimyasal parametreler için alınan beyin dokuları hızla çıkarıldıktan sonra SN buz üzerinde izole edilmiş, sıvı nitrojene alındıktan sonra ölçüm gününe kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.3.4. İmmünohistokimyasal Protokol

3.3.4.1. Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi

Farelerden alınan beyinler %10'luk formalin fiksatifine içine alınarak 24 saat fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra dokular 2 saat akar suda yıkanmıştır. Ardından, dokular sırasıyla %70, %80'lik alkollerde 48 saat , %90'lık etil alkolde 24 saat ve %100'lük etil alkolde ise 3 saat tutularak dokulardan suyun uzaklaşması sağlanmıştır. Ksilol içinde üç defa üçer dakika bekletilerek şeffaflaştırılmıştır. 56°C 'ye ayarlanmış etüvde sıvı parafin serilerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlanmıştır.

3.3.4.2. İmmünohistokimya Yöntemi

Farelerin substantiya nigra dokularında nNOS, p-nNOS ve tirozin hidroksilaz proteinlerinin varlığını göstermek amacıyla immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Solüsyonlar

1X PBS (Phosphate Buffer Saline) (0,2M):

7,2 gr Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) (#1.06585.5000; Merck)
0,8 gr Potasyum Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (#1.05101.1000; Merck)
16 gr Sodyum Klorür (NaCl) (#1.06400.1000; Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözülmüş ve pH'sı 2N NaOH ile pH=7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Borik Asit Tamponu (0,3M):

2,1 gr Borik asit (H_3BO_3) (#1.00162.5000; Merck) 900ml distile su içerisinde çözülmüş ve pH'sı 2N NaOH ile pH=7-7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

%3'lük H_2O_2 Solüsyonu:

92 ml metanol (CH_3OH) (#1.06009.2500; Merck) ve 8 ml %35'lik H_2O_2 (#1.07961.0100; Merck) karıştırılarak şale içerisinde hazırlanmıştır.

Bloklama Solüsyonu: Ultra V Block (#TA-125-UB; Thermo Scientific/LabVision)

Antikor Dilüent Solüsyonu: Antibody Diluent Solution (#ab64211; Abcam)

Primer Antikor:

Rabbit nNOS Antikoru (Abcam ab106417)
Rabbit p-nNOS Antikoru (Abcam ab 58533)
Rabbit TH Antikoru (Abcam ab152)

Sekonder Antikor: Biotinli Anti-Tavşan IgG (keçide üretilmiş) (#BA-1000; Vector Laboratories)

Streptavidin Peroksidaz Kompleksi: Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) (scytek)

Kromojen: Diaminobenzidine tabletleri (#D4168; Sigma)

Mayer'in Hematoksileni: Mayer Hematoksilen (#1.09249.1000; Merck)

Kapatma Solüsyonu: Entellan (#1.07961.0100; Merck)

İmmünohistokimya boyaması için fare beyinlerinin substansiya nigra bölgesinden kesitler 5µm kalınlığında; süperfrost (manyetik olarak statik olan) lamlar üzerine alınmıştır. Bu kesitler 56°C'lik etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kesitlerin 2 defa 10'er dakika ksilol ve 5'er dakika azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) bekletilmesiyle deparafinize (parafinden kurtarma) olması sağlanmıştır. Alkol serilerinden sonra kesitler 5 dakika distile su içerisinde hidrate (suya indirme) edilmiştir. Hidrate edilen kesitler taze hazırlanmış borik asit (pH=7-7,4) tamponunda 56°C'lik etüvde gece boyu bekletilmiştir. Ertesi gün kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile oda ısısında 15 dakika bekletilerek yok edilmiştir. Kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, özgül olmayan bağlanımları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 7 dakika bloklanmıştır. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan aynı örnek

üzerine 1/200 oranında dilüe edilmiş nNOS, p-nNOS ve 1/800 oranında dilüe edilmiş TH antikoruna damlatılmıştır. Diğer örneklerden negatif kontrol olanına da antikor ile eşit oranda Ig (immünglobulin) içerecek şekilde hazırlanmış Ig, kurumaması sağlanmak amacıyla damlatılmıştır. Kesitler nemli muhafaza kutularına alınarak oda ısısında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda kesitlerdeki solüsyonlar uzaklaştırılmıştır. Primer antikorlarla inkübasyon tamamlandıktan sonra kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kesitler, 1/400 oranında dilüe edilmiş biotin ile işaretlenmiş anti-tavşan sekonder antikorları ile 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 40 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kesitler yine 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından DAB (Diaminobenzidin) substratı damlatılarak enzim substrat ilişkisi sonucunda oluşacak olan kahverengi boyanmalar gözlenmiştir. Mayer'in hematoksileninde zıt boyama yapılmıştır. Örnekler daha sonra artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirilerek dehidrate (sudan kurtarma) edilmiş, ksilolden geçirilmiştir. Daha sonra kesitler entellan ile kapatılmıştır. Zeiss Axioplan ışık mikroskopunda beyin dokularında nNOS, p-nNOS ve TH proteinlerinin dağılımları ve immunoreaktivite dereceleri Image J programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.3.5. Biyokimyasal Parametreler

3.3.5.1. SN Nitrit/Nitrat Ölçümü

Nitrik oksit, son ürünleri olan nitrit veya nitrate dönüşür. Nitrat direkt ölçülemez. Bu yöntemde nitrat, nitrat redüktaz enzimi yardımıyla nitrite indirgenir. Örnekteki nitrat nitrite dönüşeceğinden ortamdaki total nitrit miktarı ölçülerek nitrit ve nitrat düzeyi saptanmış olur. SN'deki nitrit/nitrat miktarı ticari bir kit yardımıyla (CAYMAN-780001) ölçülmüştür.

Reaktifler

1. Nitrit/nitrat ölçüm tamponu
2. Nitrat redüktaz enzim ve kofaktörü
3. Nitrit/Nitrat standardı
4. Griess reaktifleri (R1 ve R2)

Deneyin Yapılışı

SN dokuları tartılarak 20 ml/1gr doku oranında PBS ile buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 17500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınarak -80 C'de deney gününe kadar saklanmıştır. Deney gününde elde edilen doku süpernatantlarından protein tayini yapılmış ve kalan süpernatantlar Millipore marka (UFC503096) 30 kDa'luk cut-off filtreler kullanılarak 17500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Proteinden arındırılmış filtratlar ölçümde kullanılmıştır. Ölçüm öncesinde ölçüm tamponu, nitrat redüktaz, enzim kofaktör ve nitrat standardı çözeltileri kit prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan örnek tablosuna göre mikropak kuyucuklarının ilk iki sırasına kit prosedüründe belirtilen miktarlarda assay buffer ve nitrat standardı konmuştur. Diğer kuyucuklara 80 µl filtrat eklenmiştir. Ardından tüm kuyucuklara 10 µl enzim kofaktör ve 10 µl nitrat redüktaz karışımı ilave edilmiştir. Plak kapatılıp 3 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 50 µl R1 reaktifi ve hemen ardından 50 µl R2 reaktifi eklenmiştir. 10 dk oda ısısında inkübasyonun ardından örneklerin absorbansı microplate okuyucu (BioTek Elx808) ile 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

3.3.5.2. SN 4-HNE Ölçümü

Trans-4 hidroksi alkenaller veya trans-4-hidroksi-2,3-nonenal olarak isimlendirilen alkenaller membrandaki çoklu doymamış yağ asitlerinin ve lipoprotein fosfolipidlerin lipid

peroksidasyonları sonucu oluşan, bir takım genotoksik ve sitotoksik etkileri gösterilmiş son ürünlerdir. Fizyolojik koşullarda HNE, hücrede belirli seviyelerde bulunur. Bununla birlikte HNE yapımı pek çok patolojik durumu lipid peroksidasyonunun artışı ile ilişkili olarak tetikler. 4-HNE'nin hücre içi düzeylerinin kontrolü HNE'nin metabolize edilmesi ile düzenlenir. Hücre içi konsantrasyonundaki artış apoptotik sinyalleri tetikler. SN dokularındaki lipid peroksidasyon ticari bir kit yardımıyla değerlendirilmiştir. (OxiSelect HNE-STA-334)

Reaktifler

1. Anti-HNE-his antikor
2. HRP konjugat sekonder antikor
3. Ölçüm dilüenti
4. 10X yıkama tamponu
5. Substrat solüsyonu
6. Stop solüsyonu
7. Redüklenmiş BSA standardı
8. HNE-BSA standardı

Deneyin Yapılışı

SN dokuları tartılarak 20ml/1gr doku oranında PBS ile buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 17500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınarak -80° C'de deney gününe kadar saklanmıştır. Deney gününde elde edilen doku süpernatantlarından protein tayini yapılmıştır ve protein değerleri 10 µg/ml olacak şekilde PBS ile dilüe edilmiştir. Reaktifler ve standart eğri kit prosedüründe anlatıldığı üzere hazırlanmıştır. Redükte BSA ve HNE-BSA standartları ile çalışılan örnekler kittede önerildiği üzere 100 µl mikroplate kuyucuklarına ilave edilmiştir. + 4 °C'de gece boyu inkübasyonun ardından her kuyucuk 2x250 µl PBS ile yıkanıp kurutulmuştur. Tüm kuyucuklara 200 µl ölçüm dilüenti eklenmiş ve oda ısısında 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklar 3 kez 250 µl yıkama tamponu ile yıkanmıştır. 100 µl dilüe anti HNE-His antikorunu bütün kuyucuklara eklenmiş ve 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Ardından 3 kere 250 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanmış ve kurutulmuştur. Her kuyucuğa 100 µl dilüe sekonder antibody-HRP konjugat eklenmiş ve 1 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmış ve kurutulduktan sonra her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklenerek 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Renk değişimi yoğunlaştığında 100 µl stop solüsyonu ile reaksiyon durdurulmuştur. Vakit kaybetmeden 450 nm dalga boyunda microplate okuyucu ile okuma yapılmıştır.

3.3.5.3. SN Kaspaz-3 Aktivite Tayini

Interleukin-1β-converting enzyme (ICE/caspase-1) ICE ailesi proteaz/kaspazların (Kaspaz-1) aktivasyonu memeli hücrelerinde apoptozu başlatır. Kaspaz-3 DEVD (asp-glu-val-asp) aminoasit sekansını tanır. DEVD, kaspaz 3'ün Poli (ADP Riboz) polimerazı (PARP) kopardığı yerdeki aminoasit sekansıdır. Substrat olan DEVD-*pNA*, p-nitroanilide (p-NA) kromoforu ve sentetik bir tetrapeptid DEVD aminoasit sekansını içermektedir. DEVD-*pNA* substratının kaspaz-3 tarafından kırılması sonucu açığa çıkan serbest *pNA*, 405 nm'de absorban artışına neden olur. Bu artış apoptoz uyarımının yapılmadığı kontrol hücrelerinin kaspaz-3 aktivite seviyesi ile karşılaştırılarak belirlenir. Çalışmamızda SN dokularında apoptoz olup olmadığını belirlemek için kaspaz-3 aktivite kiti kullanılmıştır. (Millipore-APT165)

Reaktifler

1. 5X Hücre lizis tamponu (5ml)
2. 5X Ölçüm tamponu (10ml)

3. Kaspaz-3 substrat (Ac-DEVD-pNA) (1ml) 3mg/ml solüsyon
4. Kaspaz-3 inhibitör (50ml) (100uM) (0,05 mg/ml DMSO içinde)
5. pNA standart (250ul) (10mM DMSO içinde)

Deneyin Yapılışı

Substansiya nigra dokuları hücre parçalanmasını sağlayan özel tampon içinde homojenize edilmiştir. Ardından homojenatlar 10 dakika buz içinde inkübe edilmiştir. 10.000 g'de 5 dakika santrifuj edildikten sonra supernatantlar başka tüpe alınmıştır. Protein tayininin ardından alınan bu örnekler chemicon caspase -3 kolorimetrik kiti ile muamele edilmiştir. Örnekler plate okuyucuda 405 nm dalga boyunda okunmuştur.

3.3.5.4. Protein Tayini

SN dokusunda protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir kit ile yapılmıştır. [284]

Reaktifler:

1. Standart solüsyon: 2µg/µl sığır serum albumin (Albumin Bovine, Sigma, A-8022)
2. CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210)

Deneyin Yapılışı

1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1ml CPPA reaktifi eklenmiştir ve 595 nm dalga boyunda absorbansı spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise numune yerine artan konsantrasyonlarda (1:1000) sulandırma oranına sahip BSA kullanılarak yapılmıştır. Dokulardaki protein miktarları standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirmeler yapılarak sonuçlar \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Normallik dağılımına uyan veriler için parametrik "Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ikili karşılaştırmalar için "Tukey Post Hoc" testi kullanılmıştır. Normallik dağılımına uymayan veriler için ise parametrik olmayan "Kruskal Wallis Varyans Analiz" ve ikili karşılaştırmalar için "Mann-Whitney U" Testi kullanılmıştır.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney gruplarındaki hayvanların genel görünüm ve sağlık açısından birbirleri arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. MPTP ve DHA+MPTP gruplarında ise ölüm oranı yaklaşık olarak %30 düzeyine ulaşmıştır.

4.2. Ağırlık Değişimi

Deney gruplarındaki hayvanların deney süresince her hafta düzenli olarak ağırlıkları takip edilmiş ve gavaj yoluyla uygulanan mısır yağının ağırlık üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Haftalara göre ağırlık değişimi

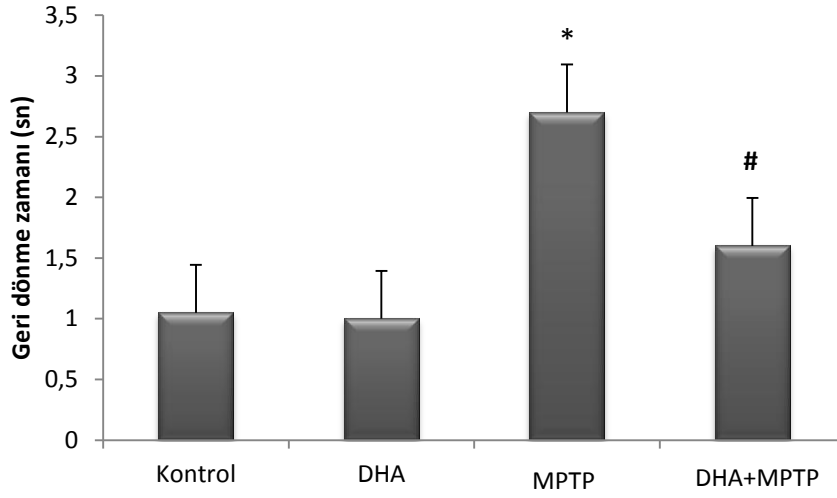
GRUPLAR	I.hafta (g)	2.hafta (g)	3.hafta (g)	4.hafta (g)
Kontrol (K)	27,6 ±1,6	27,3 ± 1,4	27 ± 1,2	27 ± 1,3
DHA (DHA)	28,3 ± 2,2	28,6 ± 2,5	28,5 ± 2,5	29,2 ± 2,5
Parkinson (MPTP)	30,6 ± 2,5	30,8 ± 2,2	29,8 ± 2,3	29,8 ± 2,2
DHA+Parkinson (DHA+MPTP)	32,3 ± 1,2	32 ± 0,9	31 ± 0,8	31,2 ± 1,4

4.3. Motor Aktivite Tayini

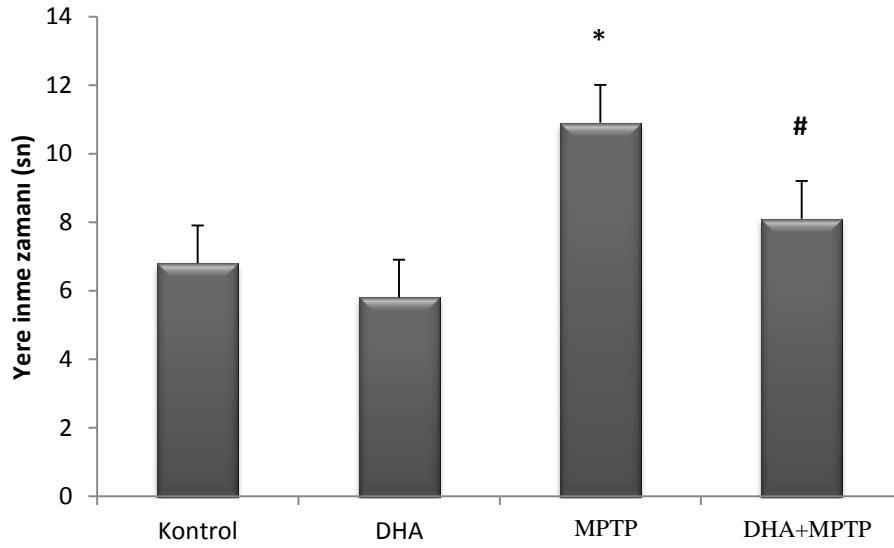
Hayvanlarda meydana gelen motor aktivite değişimlerini incelemek için çubuk testi, lokomotor aktivite testi ve rotarod testlerinden yararlanılmıştır.

4.3.1 Bradikinezi Şiddetinin Değerlendirilmesi

Motor aktivite tayini için kullanılan çubuk testinde harekete geçme zamanı (bradikinezi şiddeti) değerlendirilmiştir. Deney sonucunda DHA+MPTP grubunda MPTP grubuna oranla geri dönüş ve yere inme zamanında kısaltmalar meydana gelmiştir. Azalmalar kontrol düzeyine ulaşmamıştır ancak MPTP grubu ile karşılaştırıldığında motor aktivitede bir miktar düzelme meydana geldiği görülmüştür. Sonuçlar grafik halinde verilmiştir.



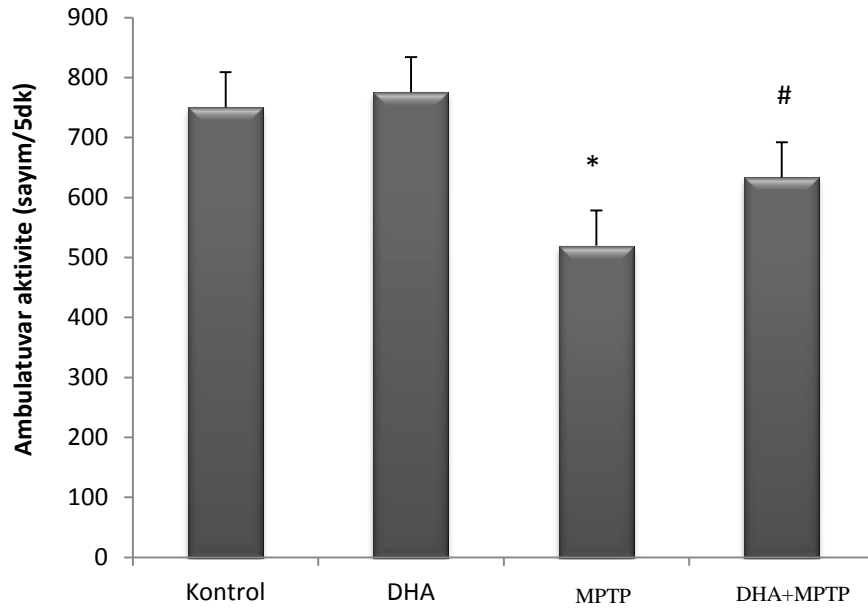
Şekil 4.1. Çubuk testi geri dönme zamanı sonuçları,
* Kontrol grubuna göre fark $p<0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p<0,05$



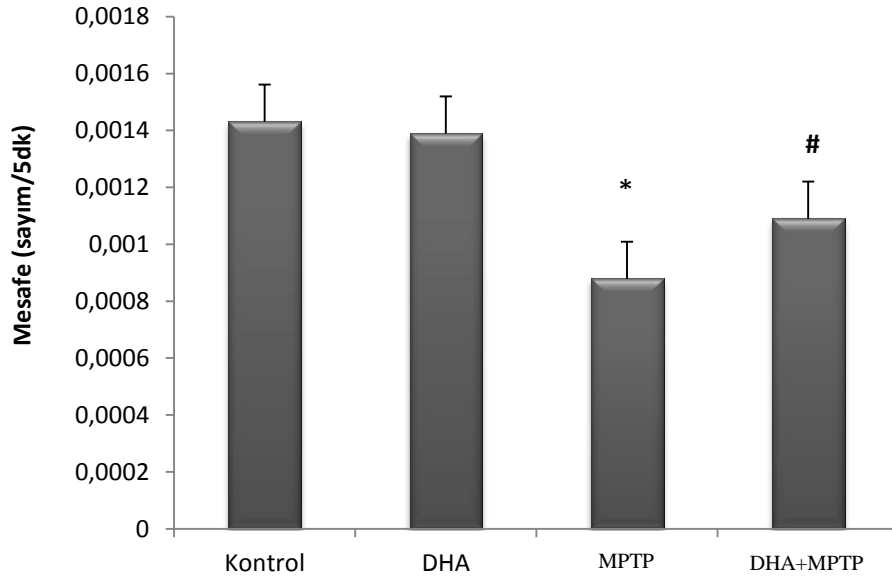
Şekil 4.2. Çubuk testi yere inme zamanı sonuçları,
* Kontrol grubuna göre fark $p<0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p<0,05$

4.3.2. Lokomotor aktivite testi

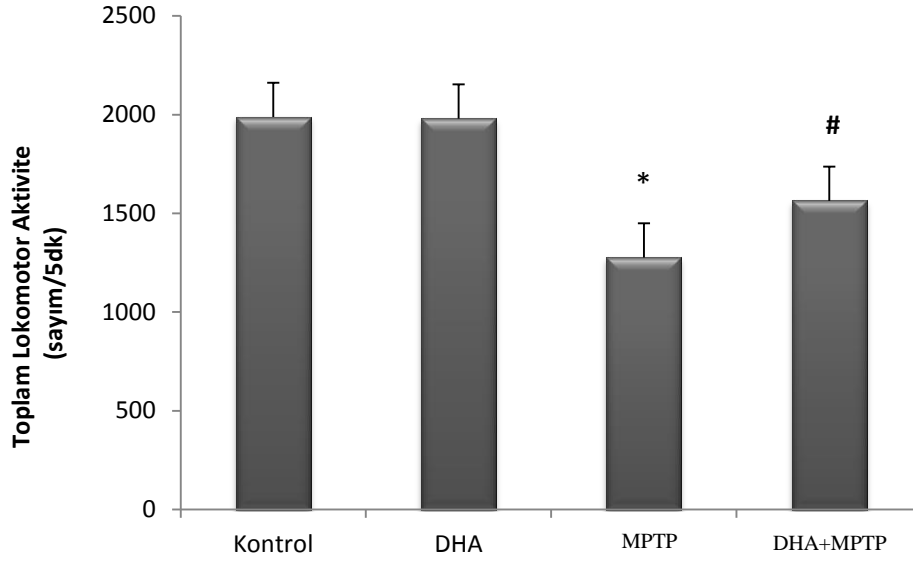
Lokomotor aktivite kafesinde ölçülen lokomotor aktivite mesafe ve toplam lokomotor aktivite değerleri incelendiğinde ambulatuvar aktivitenin MPTP grubunda kontrole göre azaldığı, DHA uygulaması ile birlikte MPTP grubunda arttığı görülmüştür. Lokomotor aktivite mesafenin MPTP grubunda Kontrole kıyasla azaldığı bulunmuştur. DHA uygulanan MPTP grubunda ise sürenin uzamasıyla birlikte mesafede artış olduğu tespit edilmiştir. Toplam lokomotor aktivitenin MPTP grubunda kontrole göre azaldığı, MPTP grubuna DHA uygulandığında ise aktivitenin düzeldiği görülmüştür. Kontrol grubuna ulaşmasa da MPTP grubuna göre önemli bir istatistiksel fark gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Lokomotor aktivite testi ambulatuvar aktivite sonuçları,
* Kontrol grubuna göre fark $p<0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p<0,05$



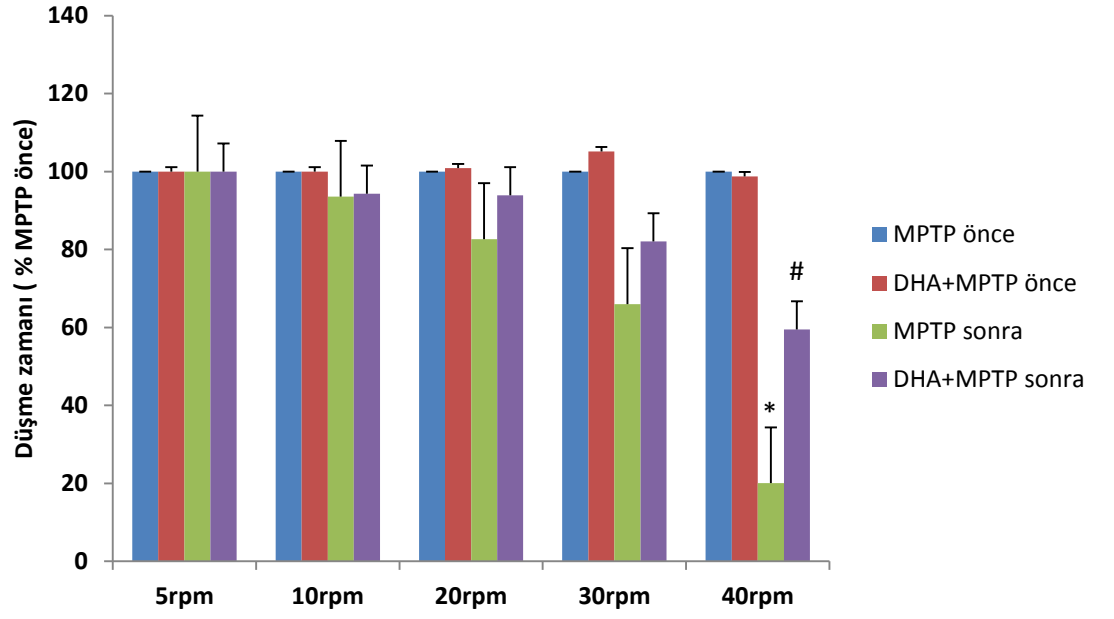
Şekil 4.4. Lokomotor aktivite testi mesafe sonuçları,
* Kontrol grubuna göre fark $p<0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p<0,05$



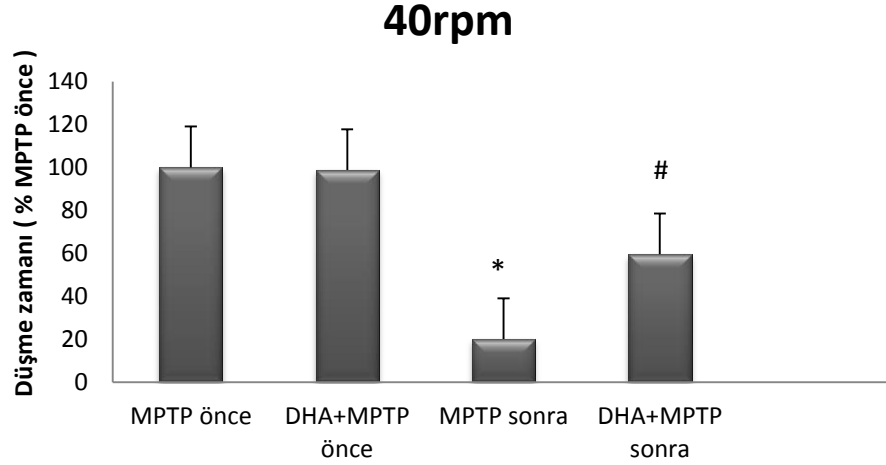
Şekil 4.5. Lokomotor aktivite testi toplam lokomotor aktivite sonuçları,
* Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p < 0,05$

4.3.3. Rotarod Testi

Motor koordinasyonun ve dengenin göstergesi olan rotarod testi 5, 10, 20, 30, 40 rpm hızları ile rotarod üzerinde kalış süreleri şeklinde gösterilmiştir. MPTP uygulaması yapılmadan hemen önce ve uygulamanın 7. gününde hayvanların rotarod test kayıtları alınmıştır. Sonuçlar kıyaslanırken MPTP önce grubu hayvanların düşme süreleri %100 kabul edilerek değerlendirme yapılmıştır. 5, 10, 20, 30 rpm düzeylerinde rotarod mili üzerinden düşme süreleri bakımından gruplar arasında fark görülmemiştir. 40 rpm'de ise MPTP grubunun dönen rotarod çubuğu (rod) üzerinde kalma süresinin kısaldığı, Kontrol grubuna oranla daha kısa sürede zemine düştüğü gözlenmiştir. MPTP grubunun DHA diyeti ile beslenmesi hayvanların rotarod çubuğu üzerinde kalış sürelerini uzatmıştır fakat değerlerin kontrol grubuna ulaşmadığı görülmüştür.



Şekil 4.6. Rotarod Testi çubuk üzerinde kalma süreleri sonuçları,
* MPTP önce grubuna göre fark $p<0,05$, # MPTP sonra grubuna göre fark $p<0,05$



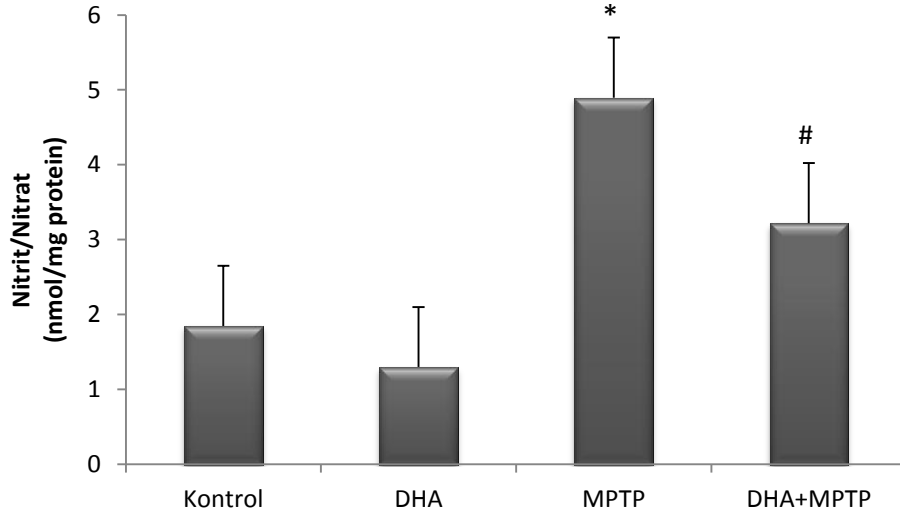
Şekil 4.7. Rotarod Testi 40 rpm çubuk üzerinde kalma süreleri sonuçları,
* MPTP önce grubuna göre fark $p<0,05$, # MPTP sonra grubuna göre fark $p<0,05$

4.4. Biyokimyasal Parametreler

Deney gruplarındaki hayvanların substansiya nigra dokularında, nitrit/nitrat düzeyi, 4-HNE seviyeleri ve kaspaz-3 aktivitesi ölçülerek oluşan değişiklikler grafiklerde sırasıyla verilmiştir.

4.4.1. SN Nitrit/Nitrat Sonuçları

Nitrik oksit parçalanma ürünü olan nitrit/nitrat değerleri substansiya nigra dokusunda tayin edilmiştir. Nitrit/Nitrat düzeylerinin MPTP uygulaması ile Kontrole göre arttığı saptanmıştır. DHA verildiğinde, DHA grubunda Kontrole göre fark bulunmamıştır. DHA uygulanan MPTP grubunda ise Nitrit/Nitrat düzeylerinin MPTP grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.

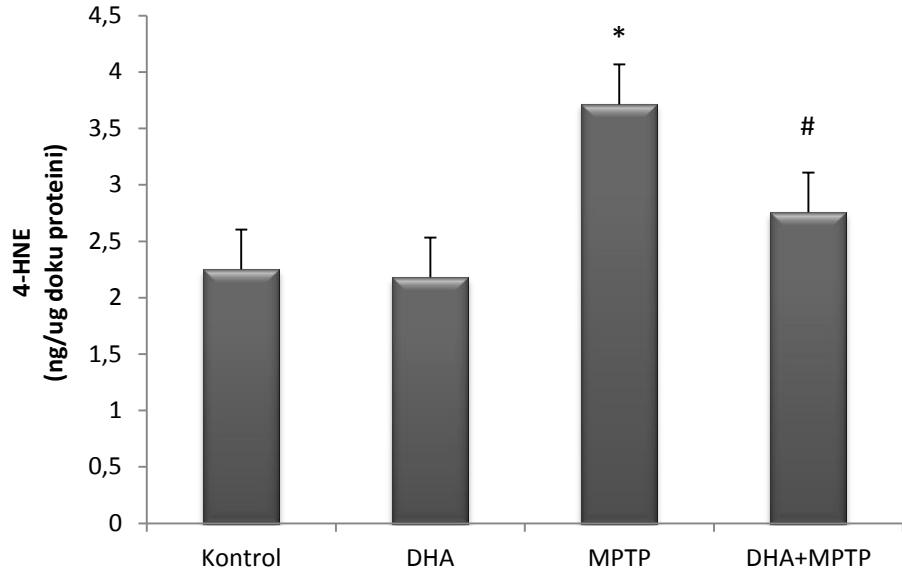


Şekil 4.8. SN Nitrit/Nitrat Değerleri,

* Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p < 0,05$

4.4.2. SN 4-HNE Sonuçları

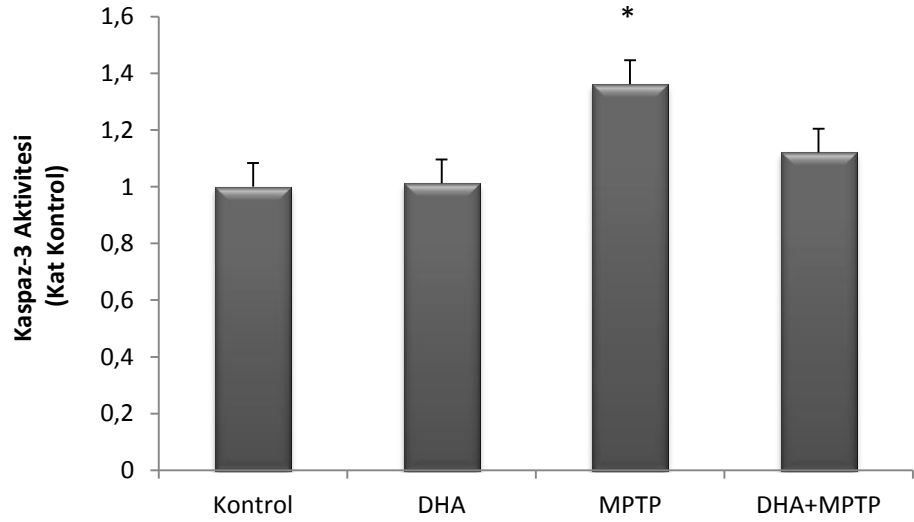
Lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan 4-HNE miktarının SN'de MPTP verilen grupta Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna oranla DHA grubunda önemli bir fark görülmemiştir. DHA+MPTP grubunda ise MPTP grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Fakat kontrol grubu ile aynı seviyeye inmediği görülmüştür.



Şekil 4.9. SN 4-HNE Değerleri,
* Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p < 0,05$

4.4.3. SN Kaspaz-3 Aktivite Sonuçları

SN'de kaspaz-3 aktivitesi şekilde gösterilmiştir. MPTP grubunda kaspaz-3 aktivitesinin arttığı, DHA verilen MPTP grubunda ise kaspaz-3 aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Fakat MPTP grubuyla karşılaştırıldığında bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

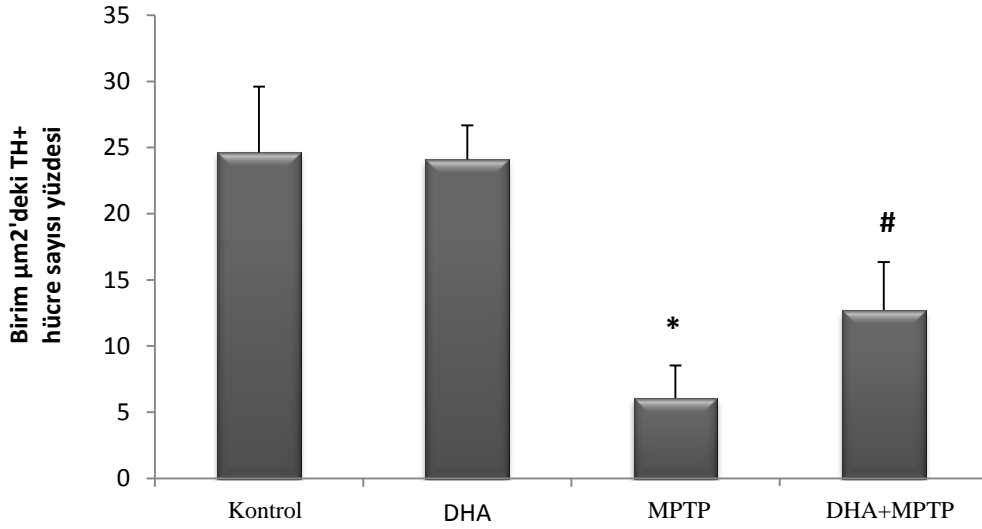


Şekil 4.10. SN Kaspaz-3 aktivite değerleri,
* Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$

4.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

4.5.1. TH İçeren Nöron Sayısı

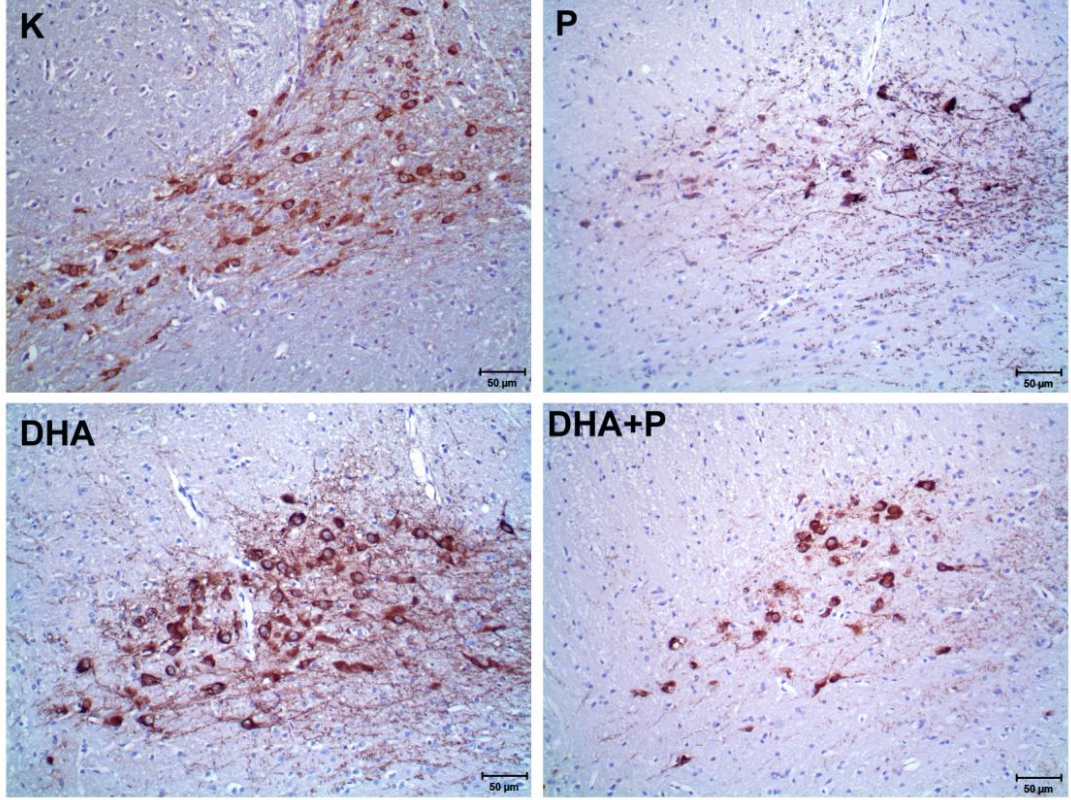
TH immünoreaksiyonlarının değerlendirilmesiyle, Kontrol grubunda SN alanında TH ile boyanan çok sayıda dopaminerjik nöron boynuz şeklindeki yapısını korurken, Parkinson modeli oluşturulan deney grubunda (MPTP), dopaminerjik nöron sayısının çok düştüğü hatta SN alanında boynuz yapısının tamamen kaybolduğu dikkati çekmektedir. DHA ile beslenip herhangi bir uygulama yapılmayan deney grubunda ise hasar oluşturulmadığından TH immün boyanmaları da kontrol gruplarındakilerle benzerdir. Ancak DHA uygulaması sonrasında deneysel olarak oluşturulan Parkinson modelinde (DHA+MPTP), MPTP gruplarına nazaran SN bölgesinde daha fazla sayıda dopaminerjik nöronun görüldüğü dikkati çekmektedir.



Şekil 4.11. Birim alandaki TH+ hücre sayısı yüzdesi,

* Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p < 0,05$

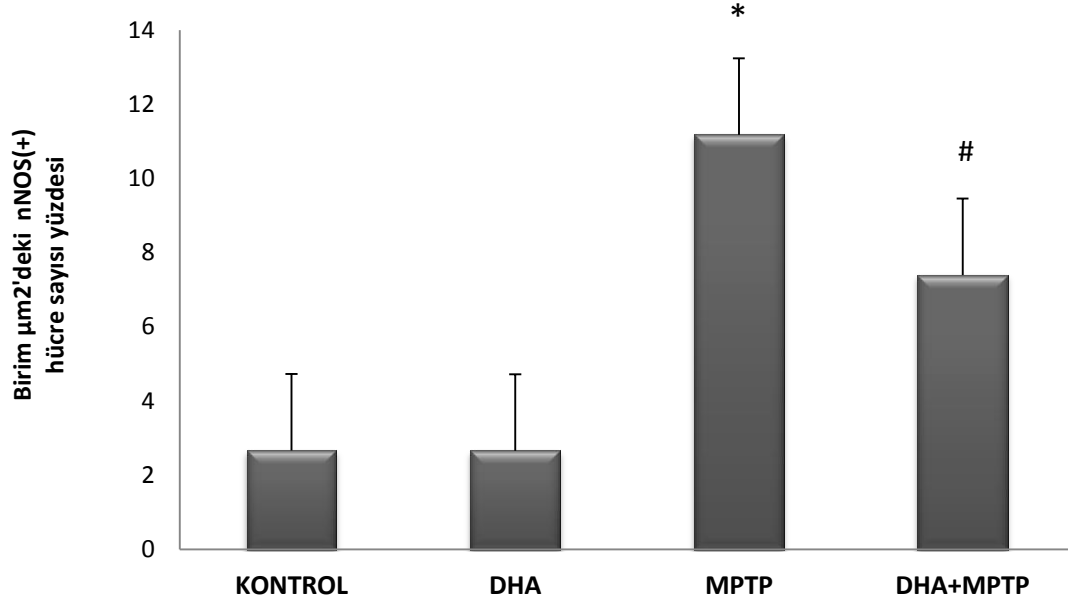
4.5.2. Tirozin Hidroksilaz Ekspresyonu



Şekil 4.12. TH immunohistokimyasıyla SN bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronların işaretlenmesi. Kontrol (K), deneysel Parkinson oluşturulan grup (P) (MPTP), Deneysel olarak parkinson oluşturulmadan DHA uygulanan grup (DHA) ve Parkinson öncesi DHA uygulanmaya başlanıp sonrasında da devam edilen grup (DHA+P) (DHA+MPTP)'tur. TH immunoboyanmasıyla uygulanan DHA'nın, dopaminerjik nöronları koruduğu, deneysel Parkinson grubunda da büyük bir çoğunluğunun öldüğü görülmektedir. Skala bar 50µm.

4.5.3. nNOS (+) Nöron Sayısı

Beynin SN bölgesinden alınan kesitlerde gruplar arası birim mm²'deki nNOS (+) dopaminerjik nöron sayıları incelendiğinde, MPTP grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış görülmüştür. DHA+MPTP grubunda ise MPTP grubuna oranla nNOS (+) nöron sayısında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

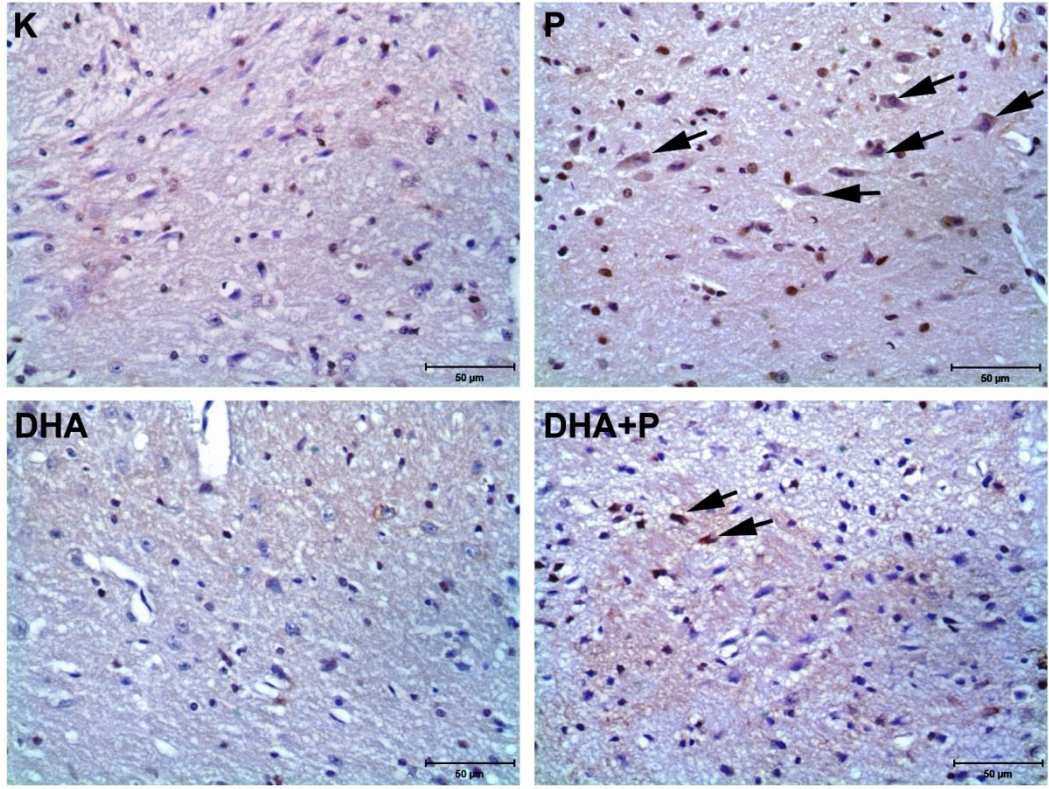


Şekil 4.13. Birim alandaki nNOS (+) hücre sayısı yüzdesi,
* Kontrol grubuna göre fark p<0,05, # MPTP grubuna göre fark p<0,05

4.5.4. nNOS Ekspresyonu

Kontrol ve DHA gruplarında herhangi bir hasar oluşturulmadığından nNOS immünoreaktivitesi görülmemektedir. Kontrol ve DHA gruplarında birkaç nöronun doğal seyrinde sitoplazmik olarak nNOS içerdiği görülse de bu alanda her iki grupta da dikkat çekici nöronal bir nNOS ekspresyonuna rastlanmamıştır.

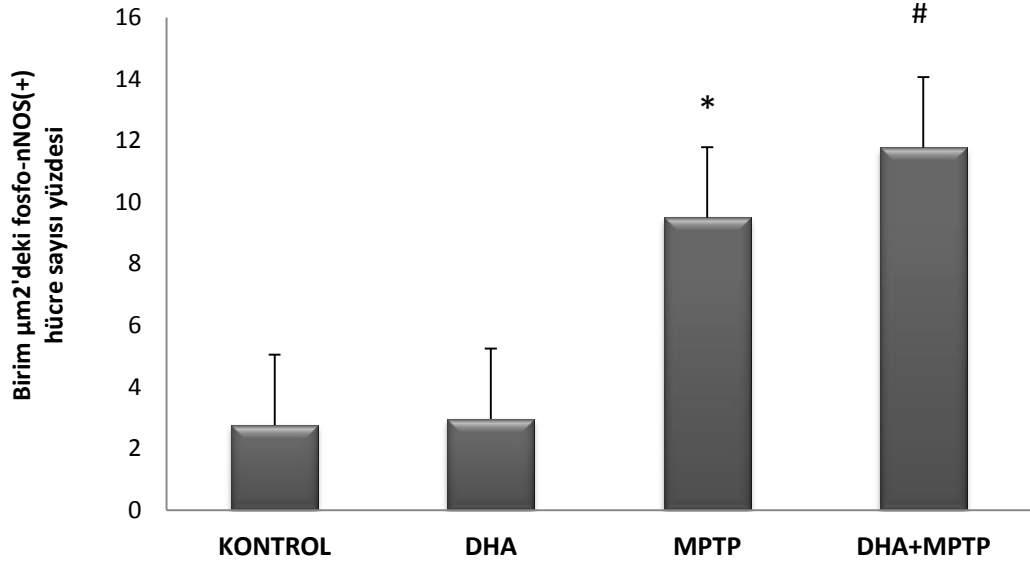
MPTP gruplarında, dopaminerjik nöron sayısı, kontrol gruplarına göre çok daha azalmıştır. Glial ekspresyon ise diğer gruplara göre çok daha yoğundur. DHA+MPTP gruplarındaki nNOS immünoreaktivitesi incelendiğinde, dopaminerjik nöronların çok az bir kısmının nNOS ekspresyonuna sahip olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 4.14. nNOS immunohistokimyasal reaksiyonunu göstermektedir. Gruplar arasındaki farka göre nNOS ekspresyonu ölüm yoluna girmiş hücrelerde gözlenmektedir. DHA+P (DHA+MPTP) gruplarında gözlenen nNOS ekspresyonu, MPTP grubundakinden daha az görünmekte olup, nöronun daha yavaş ve az sayıda ölüm yoluna girdiğinin bir göstergesidir. Skala bar 50µm.

4.5.5. p-nNOS (+) Nöron Sayısı

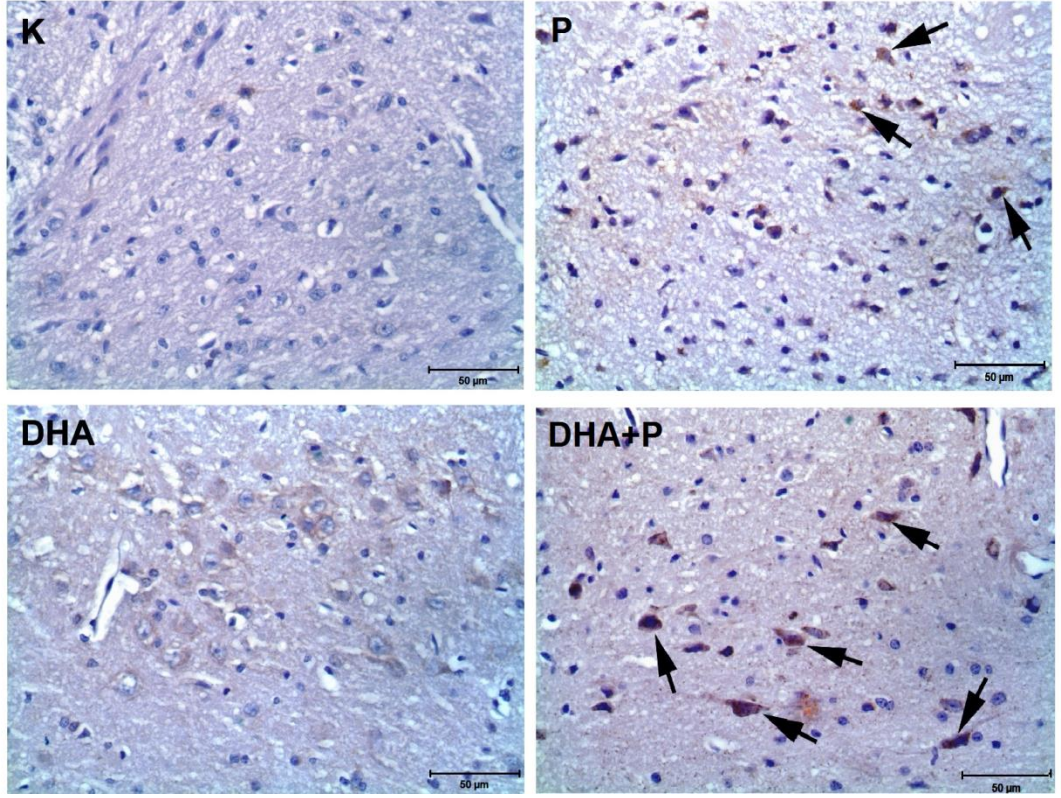
Beynin SN bölgesinden alınan kesitlerde gruplar arası birim mm²'deki p-nNOS (+) dopaminerjik nöron sayıları incelendiğinde, MPTP grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış görülmüştür. DHA+MPTP grubunda ise MPTP grubuna oranla p-nNOS (+) nöron sayısının daha da arttığı tespit edilmiştir. İki grup arasında meydana gelen bu fark istatistiksel olarak anlamlılık içermektedir.



Şekil 4.15. Birim alandaki p-nNOS (+) hücre sayısı yüzdesi,
 * Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$, # MPTP grubuna göre fark $p < 0,05$

4.5.6. p-nNOS Ekspresyonu

Kontrol ve DHA gruplarında herhangi bir immün reaksiyona rastlanmazken, MPTP grubunda Kontrol grubuna oranla artan p-nNOS immünoreaktivitesine rastlanmıştır. DHA+MPTP grubunda ise MPTP grubuna kıyasla fosfo-nNOS immünoreaktivitesinin çok daha fazla artış gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.16. SN alanında dopaminerjik nöronların fosfo-nNOS ekspresyonlarını göstermektedir. Aktif fosforile olan bu formun DHA+P (DHA+MPTP) ve P (MPTP) gruplarındaki noktasal işaretlenmeler şeklindeki ekspresyonları sitoplazma içerisinde yer yer aktive olduğunun bir göstergesidir. Skala bar 50µm.

TARTIŞMA

Sunulan çalışmamızda, MPTP verilerek oluşturulan deneysel parkinson modelinde meydana gelen lokomotor aktivite bozukluklarına DHA'nın etkisi incelenmiş ve düzeltici etkisinin olduğu bulunmuştur. Locomotor aktivitedeki bu düzeltici etkide nNOS'un ve fosforilasyonunun rolü incelenmiş, sonuçlar biyokimyasal ve immünohistokimyasal parametrelerle desteklenmiştir.

Dünyada en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri Parkinson hastalığıdır (PH) [2]. En çarpıcı belirtisi substansiya nigra (SN) bulunan nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların azalmasıdır [39]. Dopamin (DA), MSS'deki birçok görevinin yanında motor koordinasyonun sağlanması için de önemli bir nörotransmitterdir [6].

PH'yı ilaçla tedavi etmek mümkün değildir. İlaçlar genellikle semptomatiktir ve hastaların sürekli ilaç kullanımı gerekmektedir. Ayrıca yaşlı populasyonun artması, 65 yaş üzerinde sıkça görülen PH sıklığını da artırmaktadır [3]. İlaçların zamanla etkilerini kaybetmesi, yeni ilaçlar ve sublamik nükleusun uyarılması gibi yeni uyarılma tekniklerinin gelişimine neden olmuştur [285].

İnsanlarda deneysel parkinson modelinin oluşturulması mümkün olmadığı için çalışmalar ağırlıklı deney hayvanlarına yönelmiştir. Parkinson modelleri deney hayvanlarında oluşturularak değişik ilaçların modeller üzerinden test edilmesi yoluna gidilmiştir. Parkinson modeli oluşturmak amacıyla seçici olarak dopaminerjik nöronları tahrip ettiği bilinen nörotoksinler olan 6-OHDA, MPTP, parakuat, rotenon ve maneb kullanılmaktadır [5]. Hidroksillenmiş DA olan 6-OHDA, katekolaminerjik sinir uçlarında tahribata neden olarak DA sentezini bozmaktadır [98]. 6-OHDA'nın sistemik olarak uygulandığında, kan beyin bariyerini geçemediği bilinmektedir. Dolayısıyla 6-OHDA stereotaksik yöntemle uygulandığında unilateral veya bilateral serotonerjik ve noradrenerjik nöronları öldüren bir toksindir [102]. Parakuat, rotenon ve maneb tarımsal kimyasallardır. Sistemik uygulamalarında parkinson benzeri etkiler gösterirler. MPTP modeli daha çok primatlara uygulanırken insana en yakın PH modelini oluşturur [286]. Primatların bakımının zor ve pahalı olması çalışmaların kemirgenlere yönelmesine neden olmuştur. Yapılan çalışmalarda, MPTP'nin MPP⁺'ye dönüşerek mezensefalik dopaminerjik nöronları seçici olarak etkilediği bilinmektedir [287]. MPTP kemirgenlerde Lewy Cisimciği (LC) oluşturmamaktadır [288]. Deney hayvanlarına gavaj yoluyla veya stereotaksik enjeksiyonla verilebildiği gibi, en yaygın formu sistemik (subkutan, intravenöz, intraperitoneal ve intramusküler) uygulamasıdır. MPTP dozu, dopaminerjik hasarın seviyesini belirlemektedir. Sıçanlara uygulanan MPTP tekniği başarısız olurken farelerden C57BL/6 fare ırkının sistemik MPTP uygulamasına diğer ırklardan daha duyarlı olduğu bilinmektedir. MPTP altın standart olarak kabul edildiği için en yaygın olarak kullanılan PH modelidir. Bunun için bizim çalışmamızda da bu model tercih edilmiş ve hayvanlara literatüre uygun olarak (4x20mg/kg) dozda 2 saat aralıklarla intraperitoneal yolla uygulama yapılmıştır [277, 278].

Beyin dokusunda bulunan temel fosfolipidler EPA ve DHA'dır [225]. DHA'nın PH vb. nörodejeneratif hastalıklarda azaldığı bilinmektedir [28]. Beyin fonksiyonları için önemli olan DHA'nın dışarıdan verildiği durumlarda, beyin nöron membranlarında yağ asitlerini değiştirdiği gösterilmiştir [6, 28, 280]. DHA çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda kullanılmaktadır (10-100mg/kg/gün) [289]. Bizim kullandığımız konsantrasyon ise önceki çalışmalarımızda faydalı etkisini gördüğümüz dozdur (36mg/kg/gün) [290].

Hayvanlarda parkinsonun tespiti için lokomotor testler kullanılarak lokomotor aktivite, motor koordinasyon ve bradikinezi şiddetleri ölçülmüş, DHA'nın parkinson üzerinde düzeltici etkisinin olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla çok kullanılan testlerden biri rotarod testidir. Bu testte ivmeli veya sabit hızlarda (5,10,20,30,40 rpm) dönen çubuk (rod) üzerinde deney hayvanının düşmeden kalma süresi ölçülmektedir [282, 283]. Deneysel parkinson modeli oluşturulmadan 1 gün önce ve model oluşumunun ardından 7. günde hayvanlara rotarod testi uygulanmıştır. Çubukların üzerinde kalış sürelerinin 40 rpm'de MPTP grubunda kontrole karşılaştırıldığında azalmış olduğu bulunmuştur. MPTP modelinde rotarodda hayvanların kalış sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir [283, 291-296]. DHA verilmesi, parkinson modeli oluşturulan hayvanlarda 40 rpm çubukta kalış sürelerini anlamlı ölçüde uzatmış ve MPTP grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda Omega 3 verilmesinin rotarodda kalış sürelerini uzattığı bulunmuştur [296, 297]. PH'da oluşan motor koordinasyon bozukluğunu DHA'nın düzelttiği izlenmiştir.

Diğer bir parametre ise hayvanlarda lokomotor aktivitenin ölçümüdür. Hayvanlar model oluşumunu takiben 7. gün kafeslere konulmuş, otomatik olarak gezinmeleri ambulatuvar test, yürüme mesafeleri ve toplam lokomotor aktiviteleri ölçülmüştür. Hayvanların 5 dakikada bastıkları beam sayısı fotoseller ile algılanarak otomatik olarak alet tarafından sayılmaktadır. MPTP grubunda toplam lokomotor aktivite, ambulatuvar aktivite ve lokomotor mesafenin kontrole göre azaldığı bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda parkinson modellerinde total lokomotor aktivite ortalamasının azaldığı görülmüştür [298-301]. DHA ile tedavi edilen MPTP grubunda, total lokomotor aktivite, ambulatuvar hareket ve toplam mesafenin arttığı fakat kontrol seviyesine gelmediği görülmüştür. Aralarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Daha önceki çalışmalarda DHA uygulamasının diskineziyi azalttığı ve motor aktivite bozukluklarını düzelttiği gösterilmiştir [302, 303]. DHA'nın Parkinson modelinde lokomotor aktiviteyi düzelttiği bulunmuştur.

Bradikineziyi belirleyen diğer bir test ise çubuk testidir. [279, 280] MPTP grubunda hareketin başlamasında gecikme olduğu ve aşağıya iniş süresinde uzama olduğu gözlenmiştir. DHA'nın ise bradikineziyi düzelttiği saptanmıştır ve bu deneysel parkinson modelinin başarılı olduğunu gösteren önemli bir bulgudur.

Parkinson hastalığının oluş mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte serbest radikallerin artmasının önemli rolü olduğu bilinmektedir.[15] Serbest radikallerin oluşmasına yol açan birçok ajan içerisinde oldukça reaktif ve kararsız bir gaz olan NO'nun santral sinir sisteminde bazal gangliyonlarda bir nörotransmitter olduğu ve sentezinin PH'da arttığı bilinmektedir. Nitrik oksit sentezinde rolü olan iNOS ve nNOS aktivitelerinin PH'daki nörodejenerasyonda rolü olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [205]. iNOS'un ise fazla peroksinitrit üretimine neden olduğu bilinmektedir [304].

Peroksinitritin hücre içi hedef moleküllerinden biri tirozin hidroksilaz (TH) enzimidir. TH, katekolamin sentezinde hız kısıtlayıcı enzimidir. TH pozitif hücreler SN'de yoğunlaşmıştır ve uzantıları striatuma gider. TH genellikle dopaminerjik nöron sayımında fenotipik bir işaretleyicidir. Dopaminerjik nöron hasarının bir göstergesidir [192]. TH, 4 eş alt birimden oluşan tetramerik bir enzimidir. Her alt birimin katalitik aktivitesi vardır. Tirozin rezidüleri TH nitrasyonu/inaktivasyonunu belirlemede anahtar yapılardır. Nitrasyon için hedeftirler. Özellikle Tyr 225 nitrasyon için hedef gösterilen TH'nin önemli bir rezidüsüdür [193]. PH'da TH⁺ hücrelerde ölüm % 60-70 olduğunda klinik belirtiler görülür. Aynı zamanda bu kişilerin beyinlerinde TH enzim aktivitesinde azalma görülür [194].

Diğer yandan, son yıllarda PH'da hücre içi Ca⁺² homeostazisinin bozulduğu görülmektedir [305]. Hücre içi kalsiyumun artması kinaz enzimlerini aktif hale getirmektedir. Ca/CaMKII multifonksiyonel bir enzimidir ve aktivasyonuna cAMP, PKA ve

PKC'nin de etki ettiği bilinmektedir. Buna ilaveten nNOS'un fosforilasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir [27]. nNOS iki bölgeden fosforile olmaktadır. Bunlardan birincisi nNOS'un serin 1412'den fosforilasyonudur. PKA ve cGMP ile fosforile edilerek katalitik aktivitesinin arttığı kortikal nöronlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [26]. Diğer fosforilasyon yeri ise Ca/CaMKII tarafından fosforile edilen serin 847 rezidüsüdür. Bu bölgeden fosforile olması nNOS'un katalitik aktivitesini azaltır. nNOS'un serin 847 fosforilasyonu için sentetik serin 836-859 substratları kullanılmaktadır [27]. İnsanda üretilen serin 852 antikoronun farede serin 847 bölgesi ile eşleştiği bilindiğinden bu çalışmamızda fosforilasyonu belirlemek için serin 852 antikoru kullanılmıştır. Fosforilasyonun gerçekleşmesi nNOS katalitik aktivitesinin inhibisyonunu göstermektedir. Kontrol grubunda ve DHA grubunda nNOS fosforilasyonu görülmediği halde MPTP grubunda serin 847'den nNOS fosforilasyonunun DHA verilen MPTP grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. DHA'nın serin 847 fosforilasyonu ile nNOS'u inhibe ederek serbest radikalleri azalttığı görülmektedir.

DeneySEL Parkinson modeli oluşumunu destekleyen diğer bir bulgu tirozin hidroksilazla işaretlenmiş nöron sayısıdır [194]. Histolojik kesitler incelendiğinde PH'da SN'deki nöron sayıları %75 oranında azalırken DHA verilen grupta meydana gelen azalma %50 oranındadır. Bütün bu bulgular parkinson modelinin başarı ile oluşturulduğunun, uygulanan DHA'nın ise bu alanda yer alan birçok dopaminerjik nöronu ölüm yolağına girmekten koruduğunun bir göstergesidir. DHA'nın koruyucu etkisi, serin 847 fosforilasyonunu artırarak nNOS aktivitesini azaltmasıyla kısmi olarak açıklanabilir. Ayrıca DHA, hücre zarındaki voltaja bağımlı Ca^{+2} kanallarına etki ederek hücre içi kalsiyumu düzenler. [306] nNOS'un, hücre içi kalsiyum konsantrasyonuna bağılı olarak protein fosfataz 2A ile defosforile olduğu bilinmektedir. [307] nNOS nöronal hasarı göstermede önemli bir moleküldür. PH'da DHA'nın koruyucu etkisinin nNOS fosforilasyonu üzerinden olabileceğine dair yapılan bir çalışma yoktur. Bu bulgumuz orjinal yeni bir bulgudur.

nNOS ve iNOS aracılığıyla üretilen NO'nun yarı ömrü çok kısadır, ancak oksijen aracılığıyla nitrit ve nitrate dönüşebilmektedir [308]. Dokularda NO'nun direkt ölçümü zordur. Son yıllarda ölçüm yapan sensörler geliştirilmesine rağmen hala daha birçok çalışmada NO yıkım ürünü nitrit ve nitrat ölçülmektedir [309]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda NO indeksi olarak nitrit/nitrat kullanılmıştır. MPTP verilen Parkinson grubunda nitrit/nitrat miktarının arttığı görülmektedir. Bu bulgumuz MPTP'nin nNOS ve iNOS'u indüklediğini göstermiştir. Literatürde MPTP ve 6-OHDA verilen gruplarda nitrit/nitrat oranının arttığı bildirilmiştir. [310]. DHA'nın verilmesi ise nitrit/nitrat seviyesini azaltmıştır. Bu bulgu lokomotor aktivitenin düzelmesini açıklayacak niteliktedir. nNOS serin 847 fosforilasyonu yani ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olabilir. Özellikle iNOS ekspresyonunu DHA verilmesinin azalttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir [311]. Bunun genellikle iNOS üzerinden olabileceği üzerinde durulmuştur. Bu bulgu literatürle uyumludur [311]. Yukarıdaki çalışmaların hepsi DHA'nın iNOS üzerindeki etkisinin nitrit/nitrat seviyesi üzerinden olabileceğini veya L-arjininin hücre içine daha az girmesi nedeniyle NO sentezinin azalacağını, buna bağılı olarak da nitrit/nitrat düzeyinin azalmış olabileceğini göstermektedir. Bunun yanısıra, omega-3 yağ asitlerinin hücre içerisinde ikincil habercileri ya da enzimlerin yapılarını etkileyerek nNOS üzerinde düzenleyici etki gösterdikleri bilinmektedir [312]. PH'da yapılan postmortem çalışmalar serbest radikallerin arttığını göstermiştir [313]. ROS ve NO artışı mitokondrideki kompleks I aktivitesini azaltmıştır. NO süper oksit radikallerinin birleşmesiyle peroksinitriti oluşturmaktadır. NO üretimi azaldığı için peroksinitrit miktarı da azalmıştır. Dolayısıyla nöronların korunmasında bu yolağın rolünün olduğu vurgulanmaktadır. PH'da nNOS'un rolünün yanında DHA'nın koruyucu mekanizmasında nNOS inhibisyonunun rolünün olduğu ispat edilmiştir.

PH'da oluşan bu serbest radikal artışı hücrenin yapı taşları olan lipidlere, proteinlere, karbonhidratlar ve nükleik asitlere zarar verip hücreSEL fonksiyonları bozmaktadır. Santral

sinir sisteminde doymamış yağ asitleri fazla olduğundan sinir sistemini serbest radikallere duyarlı hale getirmiştir. Bu serbest radikaller membranda bulunan lipidlerin oksidasyonuna yol açarak lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturarak hücre fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açmaktadır [314]. Serbest radikallerin yarı ömürleri kısa konsantrasyonları düşük ve reaktif olmaları ölçüm şartlarını zorlaştırmaktadır [315]. Bu bilgi göz önüne alındığında oksidan stresin oluşturduğu ikincil ürünlerin ölçülmesine dayanan yöntemler kullanılmaktadır. Bu dolaylı yöntemlerden en çok kullanılanlardan biri TBARS yöntemidir [316]. Ancak önceki çalışmalarda TBARS'ın yeteri kadar duyarlı olmadığı ileri sürülmüştür [317]. Oksidatif hasarın oluşturduğu lipid peroksidasyonunu belirlemek için 4-HNE yöntemi kullanılmıştır. Oksidan stres lipid hidro peroksitlerin ayrılma reaksiyonları ile bozulmaları alkanlar, 2-alkenler, 2,4- alkenler ve 4-hidroksialenler gibi aldehitlerin oluşmasına yol açar. Oluşan heksenal ve 4-HNE sitotoksiktir [318]. Oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunun ikincil toksik mesajcıdır. PH'da lipid peroksidasyonunun arttığı ve SN 4-HNE seviyesinin yükseldiği bilinmektedir [319]. Bu yükselmenin kaspazların 3-8 aktivasyonunu artırarak apoptoza neden olduğu ayrıca 4-HNE'nin α -sinüklein agregasyonunu oluşturduğu ve DNA fregmantasyonuna yol açtığı bilinmektedir [185, 320, 321]. Çalışmamızda MPTP verilmesinin 4-HNE miktarını artırdığı saptanmıştır. Bu bulgular literatürle uyum içerisindedir [304]. Bu bilgilere dayanarak lipid peroksidasyonunun MPTP verilen grupta arttığı bulunmuştur. DHA kullanımının ise 4-HNE miktarını azalttığı gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda Omega-3 verilmesinin lipid peroksidasyonunu azalttığı bulunmuştur [312]. DHA beyinde glutatyon redüktaz aktivitesini artırarak oksitlenmiş proteinlerin birikimini önler [322]. DHA'nın lipid peroksitlerin ve reaktif oksijen türevlerinin miktarını azalttığı bildirilmiştir [322, 323]. Ayrıca 4-HNE artışının verilen DHA ile azaldığı ve bu azalmayı da Nrf-2'nin stimule ederek anti oksidanların yapımını artırarak hücrelerde koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir [324, 325].

MPTP mitokondride solunum zincirini inhibe ederek süperoksit oluşturur [287] ayrıca NOS'u aktive ederek nitrativ stres oluşturur [35]. Serbest radikallerin artması mitokondriyel sitokrom c salınımı meydana getirir. Salınan sitokrom-c apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) ve prokaspaz 9 ile kompleks oluşturmaktadır. Kaspaz-9 kaspaz-3 'ü aktive eder. Apoptoz göstergesi kaspaz-3 enzim aktivitesidir [326]. Bu apoptozun başlamasında serbest radikallerin yanısıra lipid peroksidasyonunun artışı da etkili olmaktadır [327]. Parkinson modelinde kaspaz-3 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. DHA verildiğinde, kaspaz-3 aktivitesi azalmıştır fakat bu azalma MPTP grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı değildir. Kontrolle karşılaştırıldığında ise farkın önemli derecede artmadığı görülmüştür. Bu da DHA'nın kaspaz-3 aktivitesini azalttığını vurgulamıştır. Bu sonuç, lokomotor aktivite düzeyi, 4-HNE düzeyi ve nitrit/nitrat düzeyindeki azalmayı desteklemiştir.

Sonuç olarak DHA'nın MPTP ile oluşan apoptozu, lipid peroksidasyonunu ve lokomotor aktiviteyi düzeltici etkisi olduğu ve bu etkide nNOS serin 847 fosforilasyonunun rolünün olduğu bulunmuştur. Fakat DHA etkisini sadece bahsedilen yollar üzerinden yapmamaktadır. Hücrede membranın özellikleri üzerine etkisi olduğu [222], transkripsiyonel faktörlere [328], retinoid x reseptörlere [271], hücre membranında bulunan DAT aktivitesine etki ettiği [261], voltaja bağımlı kalsiyum kanallarına müdahale ettiği bilinmektedir [329]. PUFA'nın MPTP'den MPP+'ya dönüşümü ve MAO-B aktivitesini azalttığı, nörotrofik faktörleri artırarak etkili olduğu gösterilmiştir [330]. DHA'nın tam koruyucu etki mekanizmasının aydınlatılması için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

1. MPTP grubunda koordinasyonun ve dengenin bozulduğu tespit edilmiştir. DHA verilmesinin 40 rpm'de motor koordinasyonu düzelttiği görülmüştür.
2. MPTP grubunda bradikinezi şiddeti ve lokomotor aktivitenin azaldığı, DHA uygulamasının bu parametreler üzerinde düzeltici etkisinin olduğu bulunmuştur.
3. MPTP grubunda SN'deki dopaminerjik nöron sayısı azalmıştır. DHA verilmesi, PH'da azalan nöron sayısını iki katına çıkarmıştır.
4. DHA verilmesinin nNOS serin 847 fosforilasyonunu artırarak nNOS aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir.
5. Nitrit/nitrat düzeylerinin deneysel parkinson modelinde arttığı, DHA verilmesinin nitrit/nitrat miktarını azalttığı saptanmıştır.
6. Deneysel parkinson modelinde SN'de lipid peroksidasyonun göstergesi olan 4-HNE düzeyi artmış, DHA verilmesi ile lipid peroksidasyonunun azaldığı görülmüştür.
7. SN'de Kaspaz-3 aktivitesi MPTP grubunda artmıştır. DHA verilmesiyle azalma görülmüş fakat bu fark anlamlı değere ulaşmamıştır.
8. Bu bulgular DHA'nın koruyucu rolünün olduğunu göstermektedir. DHA, nNOS serin 847 fosforilasyonunu artırarak nNOS aktivitesini azaltmıştır. Fakat sonuçlar, bu korumada diğer mekanizmaların da rolünün olduğuna işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Parkinson, J., *An essay on the Shaking Palsy*. Whiitngham and Rowland:London., 1817.
2. Przedborski, S., *Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2005. **11 Suppl 1**: p. S3-7.
3. Kuopio, A.M., et al., *Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland*. Neurology, 1999. **52(2)**: p. 302-8.
4. Gilroy, J., *Basic Neurology*. Third Edition. International Edition ed. 2000.
5. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39(6)**: p. 889-909.
6. Kidd, P.M., *Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management*. Altern Med Rev, 2000. **5(6)**: p. 502-29.
7. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79(4)**: p. 368-76.
8. Chase, A., *Parkinson disease: Traumatic brain injury increases the risk of Parkinson disease*. Nat Rev Neurol, 2015. **11(4)**: p. 184.
9. Reeve, A., E. Simcox, and D. Turnbull, *Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor?* Ageing Res Rev, 2014. **14**: p. 19-30.
10. Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky, *Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822(2)**: p. 261-85.
11. Verstraeten, A., J. Theuns, and C. Van Broeckhoven, *Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era*. Trends Genet, 2015. **31(3)**: p. 140-9.
12. Schapira, A.H., *Mitochondria in the etiology of Parkinson's disease*. Handb Clin Neurol, 2007. **83**: p. 479-91.
13. Dzamko, N., C.L. Geczy, and G.M. Halliday, *Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease*. Neuroscience, 2014.
14. Su, X., et al., *Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2008. **29(11)**: p. 1690-701.
15. Baraboi, V.A., *[The role of lipid peroxidation in the mechanism of stress]*. Fiziol Zh, 1989. **35(5)**: p. 85-97.
16. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, *Nitric oxide in neurodegeneration*. Prog Brain Res, 1998. **118**: p. 215-29.
17. Gutteridge, J.M., *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection*. Chem Biol Interact, 1994. **91(2-3)**: p. 133-40.
18. Tieu, K., H. Ischiropoulos, and S. Przedborski, *Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease*. IUBMB Life, 2003. **55(6)**: p. 329-35.
19. Clancy, R.M., et al., *Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91(9)**: p. 3680-4.
20. Rauhala, P., A.M. Lin, and C.C. Chiueh, *Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress*. FASEB J, 1998. **12(2)**: p. 165-73.

21. Liberatore, G.T., et al., *Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease*. *Nat Med*, 1999. **5**(12): p. 1403-9.
22. Siow, T.Y., et al., *In vivo evidence of increased nNOS activity in acute MPTP neurotoxicity: a functional pharmacological MRI study*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 964034.
23. Hantraye, P., et al., *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons*. *Nat Med*, 1996. **2**(9): p. 1017-21.
24. Aras, S., et al., *The role of nitric oxide on visual-evoked potentials in MPTP-induced Parkinsonism in mice*. *Neurochem Int*, 2014. **72**: p. 48-57.
25. Bredt, D.S., C.D. Ferris, and S.H. Snyder, *Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(16): p. 10976-81.
26. Adak, S., et al., *Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1244-52.
27. Komeima, K., et al., *Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 28139-43.
28. Youdim, K.A., A. Martin, and J.A. Joseph, *Essential fatty acids and the brain: possible health implications*. *Int J Dev Neurosci*, 2000. **18**(4-5): p. 383-99.
29. Yu, S.W., et al., *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor*. *Science*, 2002. **297**(5579): p. 259-63.
30. Roche, H.M., *Unsaturated fatty acids*. *Proc Nutr Soc*, 1999. **58**(2): p. 397-401.
31. Ehringer, W., et al., *A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers*. *Chem Phys Lipids*, 1990. **54**(2): p. 79-88.
32. Stillwell, W., W. Ehringer, and L.J. Jenki, *Docosahexaenoic acid increases permeability of lipid vesicles and tumor cells*. *Lipids*, 1993. **28**(2): p. 103-8.
33. Bourre, J.M., et al., *The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats*. *J Nutr*, 1989. **119**(12): p. 1880-92.
34. Komatsu, W., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(8): p. 1006-16.
35. Bredt, D.S., et al., *Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase*. *Neuron*, 1991. **7**(4): p. 615-24.
36. Weylandt, K.H., et al., *Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2012. **97**(3-4): p. 73-82.
37. Florent, S., et al., *Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers*. *J Neurochem*, 2006. **96**(2): p. 385-95.
38. Carlsson, A., et al., *On the presence of 3-hydroxytyramine in brain*. *Science*, 1958. **127**(3296): p. 471.

39. Ehringer, H. and O. Hornykiewicz, [*Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system*]. *Klin Wochenschr*, 1960. **38**: p. 1236-9.
40. Birkmayer, W. and O. Hornykiewicz, [*The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia*]. *Wien Klin Wochenschr*, 1961. **73**: p. 787-8.
41. Galvan, A. and T. Wichmann, *Pathophysiology of parkinsonism*. *Clin Neurophysiol*, 2008. **119**(7): p. 1459-74.
42. Calne, D.B., et al., *Bromocriptine in Parkinsonism*. *Br Med J*, 1974. **4**(5942): p. 442-4.
43. Rowland, L., *Merritt's Neurology*. Vol. 10. Baskı. 2000: LippincottWilliams&Wilkins.
44. de Rijk, M.C., et al., *Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. *Neurology*, 2000. **54**(11 Suppl 5): p. S21-3.
45. Alexander, G.E., *Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2004. **6**(3): p. 259-80.
46. Teravainen, H., et al., *The age of onset of Parkinson's disease: etiological implications*. *Can J Neurol Sci*, 1986. **13**(4): p. 317-9.
47. Snow, B.J., et al., *Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000. **68**(3): p. 313-6.
48. Cory-Slechta, D.A., et al., *Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype*. *Environ Health Perspect*, 2005. **113**(9): p. 1263-70.
49. Levy, G., *The relationship of Parkinson disease with aging*. *Arch Neurol*, 2007. **64**(9): p. 1242-6.
50. Vieregge, P. and I. Heberlein, *Increased risk of Parkinson's disease in relatives of patients*. *Ann Neurol*, 1995. **37**(5): p. 685.
51. Klein, C. and A. Westenberger, *Genetics of Parkinson's disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(1): p. a008888.
52. Unal Gulsuner, H., et al., *Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(51): p. 18285-90.
53. Albin, R.L., A.B. Young, and J.B. Penney, *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. *Trends Neurosci*, 1989. **12**(10): p. 366-75.
54. Fix, J.D., *Basal Ganglia and the Striatal Motor System". Neuroanatomy (Board Review Series) (4th ed.)*. Baltimore: Wulters Kluwer & Lippincott Williams & Wilkins. . 2008. 274–281.
55. .Mink, J.W., *Basal ganglia, Fundamental Neuroscience*. Vol. Chapter 34. 1999, U.S.A. : Academic press.
56. Sawle, G., *Movement Disorders in Clinical Practice. Lee Smith&PaulWilkinson of InPerspective Ltd*. 1999.
57. Cossette, M., D. Levesque, and A. Parent, *Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005. **11**(5): p. 277-86.
58. Smith, Y., et al., *Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. **37**(1): p. 213-46.
59. Liu, X., N. Yamada, and T. Osawa, *Amide-type adduct of dopamine - plausible cause of Parkinson diseases*. *Subcell Biochem*, 2014. **77**: p. 49-60.
60. Bjorklund, A., Hokfelt, T., Lindvall, O., *Dopamine-containing systems in the CNS, in Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, Part I*, A.H. Bjorklund, T, Editor. (in press): Amsterdam: Elsevier. p. 55-122.

61. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Dopaminergic neurons*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 942-6.
62. Buse, J., et al., *Neuromodulation in Tourette syndrome: dopamine and beyond*. Neurosci Biobehav Rev, 2013. **37**(6): p. 1069-84.
63. Kebabian, J.W. and D.B. Calne, *Multiple receptors for dopamine*. Nature, 1979. **277**(5692): p. 93-6.
64. Mercuri, N.B., et al., *Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice*. Neuroscience, 1997. **79**(2): p. 323-7.
65. Giros, B. and M.G. Caron, *Molecular characterization of the dopamine transporter*. Trends Pharmacol Sci, 1993. **14**(2): p. 43-9.
66. Huang, Y., et al., *Genetic contributions to Parkinson's disease*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **46**(1): p. 44-70.
67. Kienast, T. and A. Heinz, *Dopamine and the diseased brain*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2006. **5**(1): p. 109-31.
68. Cooper, J.A., et al., *Slowed central processing in simple and go/no-go reaction time tasks in Parkinson's disease*. Brain, 1994. **117** (Pt 3): p. 517-29.
69. Berardelli, A., et al., *Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease*. Brain, 2001. **124**(Pt 11): p. 2131-46.
70. Parr-Brownlie, L.C. and B.I. Hyland, *Bradykinesia induced by dopamine D2 receptor blockade is associated with reduced motor cortex activity in the rat*. J Neurosci, 2005. **25**(24): p. 5700-9.
71. Lozza, C., R.M. Marie, and J.C. Baron, *The metabolic substrates of bradykinesia and tremor in uncomplicated Parkinson's disease*. Neuroimage, 2002. **17**(2): p. 688-99.
72. Hughes, A.J., et al., *A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease*. Arch Neurol, 1993. **50**(2): p. 140-8.
73. Riley, D., et al., *Frozen shoulder and other shoulder disturbances in Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1989. **52**(1): p. 63-6.
74. Brodal, P., *The Central Nervous System: Structure and Function*. 2010: Oxford University Press.
75. Ashour, R. and J. Jankovic, *Joint and skeletal deformities in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy*. Mov Disord, 2006. **21**(11): p. 1856-63.
76. Williams, D.R., H.C. Watt, and A.J. Lees, *Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006. **77**(4): p. 468-73.
77. Wenning, G.K., et al., *Progression of falls in postmortem-confirmed parkinsonian disorders*. Mov Disord, 1999. **14**(6): p. 947-50.
78. CH, W., *Parkinson Hastalığının Tanısı ve Tedavisi*. 2000, İstanbul: Turgut Yayıncılık ve Tic. A.ş.
79. Eriksen, J.L., Z. Wszolek, and L. Petrucelli, *Molecular pathogenesis of Parkinson disease*. Arch Neurol, 2005. **62**(3): p. 353-7.
80. Pakkenberg, B., et al., *The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1991. **54**(1): p. 30-3.
81. Hornykiewicz, O., *The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain*. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 9-15.
82. Henderson, J.M., et al., *Degeneration of the centre median-parafascicular complex in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2000. **47**(3): p. 345-52.
83. Camicioli, R., et al., *Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy*. Mov Disord, 2003. **18**(7): p. 784-90.

84. Murakami, T., et al., *Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(3): p. 439-42.
85. Wakabayashi, K., et al., *The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates*. *Neuropathology*, 2007. **27**(5): p. 494-506.
86. Popescu, A., et al., *Lewy bodies in the amygdala: increase of alpha-synuclein aggregates in neurodegenerative diseases with tau-based inclusions*. *Arch Neurol*, 2004. **61**(12): p. 1915-9.
87. Bove, J. and C. Perier, *Neurotoxin-based models of Parkinson's disease*. *Neuroscience*, 2012. **211**: p. 51-76.
88. Liou, H.H., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan*. *Neurology*, 1997. **48**(6): p. 1583-8.
89. Kachroo, A., M.C. Irizarry, and M.A. Schwarzschild, *Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration*. *Exp Neurol*, 2010. **223**(2): p. 657-61.
90. Day, B.J., et al., *A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(22): p. 12760-5.
91. Manning-Bog, A.B., et al., *The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(3): p. 1641-4.
92. Drechsel, D.A. and M. Patel, *Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(11): p. 1873-86.
93. Hancock, D.B., et al., *Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study*. *BMC Neurol*, 2008. **8**: p. 6.
94. Roede, J.R. and D.P. Jones, *Thiol-reactivity of the fungicide maneb*. *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 651-5.
95. Talpade, D.J., et al., *In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone*. *J Neurochem*, 2000. **75**(6): p. 2611-21.
96. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
97. Ungerstedt, U., *6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons*. *Eur J Pharmacol*, 1968. **5**(1): p. 107-10.
98. Luthman, J., et al., *Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage*. *Behav Brain Res*, 1989. **33**(3): p. 267-77.
99. Cohen, G., *Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons*. *Neurotoxicology*, 1984. **5**(1): p. 77-82.
100. Saner, A. and H. Thoenen, *Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine*. *Mol Pharmacol*, 1971. **7**(2): p. 147-54.
101. Asanuma, M., H. Hirata, and J.L. Cadet, *Attenuation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic nigrostriatal lesions in superoxide dismutase transgenic mice*. *Neuroscience*, 1998. **85**(3): p. 907-17.
102. Javoy, F., et al., *Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system*. *Brain Res*, 1976. **102**(2): p. 201-15.
103. Mladenovic, A., et al., *6-Hydroxydopamine increases the level of TNFalpha and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats*. *Brain Res*, 2004. **996**(2): p. 237-45.

104. Rylander, D., et al., *A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys*. *Neurobiol Dis*, 2010. **39**(3): p. 352-61.
105. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. *Science*, 1983. **219**(4587): p. 979-80.
106. Giovanni, A., P.K. Sonsalla, and R.E. Heikkila, *Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(3): p. 1008-14.
107. Jackson-Lewis, V. and S. Przedborski, *Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(1): p. 141-51.
108. Przedborski, S. and T.M. Dawson, *The role of nitric oxide in Parkinson's disease*. *Methods Mol Med*, 2001. **62**: p. 113-36.
109. Serge Przedborski, M.V., *MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity*. *Clinical Neuroscience Research*, 2001. **1**: p. 407-418.
110. Savitt, J.M., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1744-54.
111. Atkin, G. and H. Paulson, *Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease*. *Front Mol Neurosci*, 2014. **7**: p. 63.
112. Pan, T., et al., *The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 8): p. 1969-78.
113. Fahn, S. and D. Sulzer, *Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease*. *NeuroRx*, 2004. **1**(1): p. 139-54.
114. Feng, J., *Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins*. *Neuroscientist*, 2006. **12**(6): p. 469-76.
115. Maragakis, N.J. and J.D. Rothstein, *Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease*. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006. **2**(12): p. 679-89.
116. Venderova, K. and D.S. Park, *Programmed cell death in Parkinson's disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(8).
117. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
118. Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. *Cancer Res*, 1997. **57**(10): p. 1835-40.
119. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
120. Perier, C., J. Bove, and M. Vila, *Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **16**(9): p. 883-95.
121. Lavrik, I.N. and P.H. Krammer, *Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(1): p. 36-41.
122. Favaloro, B., et al., *Role of apoptosis in disease*. *Aging (Albany NY)*, 2012. **4**(5): p. 330-49.
123. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. *Science*, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
124. Lee, K.W., et al., *Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates MPTP toxicity and regulates glial activation*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29935.
125. de Almagro, M.C. and D. Vucic, *The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy*. *Exp Oncol*, 2012. **34**(3): p. 200-11.

126. Maries, E., et al., *The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(9): p. 727-38.
127. Vekrellis, K., et al., *Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders*. Lancet Neurol, 2011. **10**(11): p. 1015-25.
128. Faneng Sun, V.A., Huajun Jin, Danhui Zhang, Arthi Kanthasamy, Anumantha G. Kanthasamy, *Chapter 36 – Neuroprotective and Neurotoxic Properties of α -Synuclein in Cell Culture Models of Dopaminergic Degeneration*. Parkinson's Disease Molecular and Therapeutic Insights From Model Systems. 2008: Academic Press.
129. Feany, M.B., *New genetic insights into Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2004. **351**(19): p. 1937-40.
130. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
131. Desplats, P., et al., *Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 13010-5.
132. Lashuel, H.A., et al., *Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils*. J Mol Biol, 2002. **322**(5): p. 1089-102.
133. Cohen, G., *Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **899**: p. 112-20.
134. Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., *ROS and Parkinson's disease: a view to a kill*. 2000: Free Radicals in Brain Pathophysiology. G. Poli, E. Cadenas, and L. Packer, eds. (New York: Marcel Dekker, Inc. 273–290.
135. Sian, J., et al., *Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia*. Ann Neurol, 1994. **36**(3): p. 348-55.
136. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
137. Graham, D.G., *Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones*. Mol Pharmacol, 1978. **14**(4): p. 633-43.
138. Winklhofer, K.F. and C. Haass, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(1): p. 29-44.
139. Brandt, U., *Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 69-92.
140. Hwang, O., *Role of oxidative stress in Parkinson's disease*. Exp Neurobiol, 2013. **22**(1): p. 11-7.
141. Selvaraj, S., et al., *Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1354-67.
142. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. Lancet, 1989. **1**(8649): p. 1269.
143. Greenamyre, J.T. and T.G. Hastings, *Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1120-2.
144. Palacino, J.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18614-22.
145. Devi, L., et al., *Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9089-100.

146. O'Callaghan, J.P., D.B. Miller, and J.F. Reinhard, Jr., *Characterization of the origins of astrocyte response to injury using the dopaminergic neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Brain Res, 1990. **521**(1-2): p. 73-80.
147. Qian, L., P.M. Flood, and J.S. Hong, *Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy*. J Neural Transm, 2010. **117**(8): p. 971-9.
148. Ishikawa, A. and H. Takahashi, *Clinical and neuropathological aspects of autosomal recessive juvenile parkinsonism*. J Neurol, 1998. **245**(11 Suppl 3): p. P4-9.
149. Langston, J.W., et al., *Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure*. Ann Neurol, 1999. **46**(4): p. 598-605.
150. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 138-45.
151. Davis, K.L., et al., *Novel effects of nitric oxide*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 203-36.
152. Bian, K. and F. Murad, *Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases*. Front Biosci, 2003. **8**: p. d264-78.
153. O'Dell, T.J., et al., *Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11285-9.
154. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
155. Khan, B.V., et al., *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9114-9.
156. Pantopoulos, K. and M.W. Hentze, *Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1267-71.
157. Pozdnyakov, N., et al., *Nitric oxide-regulated endogenous ADP-ribosylation of rod outer segment proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(2): p. 610-5.
158. Mikkelsen, R.B. and P. Wardman, *Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5734-54.
159. Guix, F.X., et al., *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain*. Prog Neurobiol, 2005. **76**(2): p. 126-52.
160. Dinerman, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4214-8.
161. Groves, J.T. and C.C. Wang, *Nitric oxide synthase: models and mechanisms*. Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(6): p. 687-95.
162. Panda, K., et al., *Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31020-30.
163. Butt, E., et al., *The cGMP-dependent protein kinase--gene, protein, and function*. Neurochem Res, 1993. **18**(1): p. 27-42.
164. Vaandrager, A.B. and H.R. de Jonge, *Signalling by cGMP-dependent protein kinases*. Mol Cell Biochem, 1996. **157**(1-2): p. 23-30.
165. French, P.J., et al., *Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 1995. **270**(44): p. 26626-31.

166. Ono, K. and W. Trautwein, *Potentiation by cyclic GMP of beta-adrenergic effect on Ca²⁺ current in guinea-pig ventricular cells*. J Physiol, 1991. **443**: p. 387-404.
167. Whalin, M.E., et al., *Phosphodiesterase II, the cGMP-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells*. Mol Pharmacol, 1991. **39**(6): p. 711-7.
168. Poulos, T.L., *Soluble guanylate cyclase*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(6): p. 736-43.
169. Smutzer, G., *Research tools for nitric oxide. A wide variety of reagent are available for nitric oxide research*. . The Scientist., 2001. **6**(15): p. 23-29.
170. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
171. Wink, D.A., et al., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1001-3.
172. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
173. Li, L.M., et al., *Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells*. Cancer Res, 1991. **51**(10): p. 2531-5.
174. Green, S.J., et al., *Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes*. Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 15-9.
175. Fehsel, K., et al., *Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide*. Diabetes, 1993. **42**(3): p. 496-500.
176. Hemmens, B. and B. Mayer, *Enzymology of nitric oxide synthases*. Methods Mol Biol, 1998. **100**: p. 1-32.
177. Garcia-Cardena, G., et al., *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90*. Nature, 1998. **392**(6678): p. 821-4.
178. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
179. Alheid, U., J.C. Frolich, and U. Forstermann, *Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets*. Thromb Res, 1987. **47**(5): p. 561-71.
180. Rudic, R.D., et al., *Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 731-6.
181. Tatoyan, A. and C. Giulivi, *Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11044-8.
182. Elfering, S.L., T.M. Sarkela, and C. Giulivi, *Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38079-86.
183. Brown, G.C. and C.E. Cooper, *Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase*. FEBS Lett, 1994. **356**(2-3): p. 295-8.
184. Kanai, A.J., et al., *Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14126-31.
185. Zhou, L. and D.Y. Zhu, *Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications*. Nitric Oxide, 2009. **20**(4): p. 223-30.
186. Holscher, C. and S.P. Rose, *An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick*. Neurosci Lett, 1992. **145**(2): p. 165-7.

187. Toda, N., K. Ayajiki, and T. Okamura, *Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase*. J Hypertens, 2009. **27**(10): p. 1929-40.
188. Melikian, N., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(8): p. 256-62.
189. Doucet, M.V., A. Harkin, and K.K. Dev, *The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression?* Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 218-29.
190. Steinert, J.R., T. Chernova, and I.D. Forsythe, *Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia*. Neuroscientist, 2010. **16**(4): p. 435-52.
191. Lipton, S.A., et al., *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds*. Nature, 1993. **364**(6438): p. 626-32.
192. Brown, G.C., *Nitric oxide and neuronal death*. Nitric Oxide, 2010. **23**(3): p. 153-65.
193. Dawson, V.L., et al., *Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6368-71.
194. Kornau, H.C., et al., *Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95*. Science, 1995. **269**(5231): p. 1737-40.
195. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains*. Cell, 1996. **84**(5): p. 757-67.
196. Christopherson, K.S., et al., *PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27467-73.
197. Aarts, M., et al., *Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions*. Science, 2002. **298**(5594): p. 846-50.
198. Zhang, L., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Role of nitric oxide in Parkinson's disease*. Pharmacol Ther, 2006. **109**(1-2): p. 33-41.
199. Stamler, J.S., et al., *S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 444-8.
200. Hess, D.T., et al., *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 150-66.
201. Melino, G., et al., *S-nitrosylation regulates apoptosis*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 432-3.
202. Gow, A.J., et al., *Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(2): p. L262-8.
203. Giasson, B.I., et al., *Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions*. Science, 2000. **290**(5493): p. 985-9.
204. Takahashi, H., *[Pathology of neurodegenerative diseases: with special reference to Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis]*. Rinsho Shinkeigaku, 2002. **42**(11): p. 1085-7.
205. Przedborski, S., et al., *Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4565-71.
206. Mandir, A.S., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5774-9.
207. Brune, B. and E.G. Lapetina, *Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(2): p. 921-6.

208. Dinerman, J.L., et al., *Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity*. *Neuropharmacology*, 1994. **33**(11): p. 1245-51.
209. Nakane, M., et al., *Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **180**(3): p. 1396-402.
210. Hayashi, Y., et al., *Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(29): p. 20597-602.
211. Song, T., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation*. *FEBS Lett*, 2004. **570**(1-3): p. 133-7.
212. Waxman, E.A. and D.R. Lynch, *N-methyl-D-aspartate receptor subtype mediated bidirectional control of p38 mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(32): p. 29322-33.
213. Rameau, G.A., et al., *Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death*. *J Neurosci*, 2007. **27**(13): p. 3445-55.
214. Edelman, A.M., D.K. Blumenthal, and E.G. Krebs, *Protein serine/threonine kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 567-613.
215. Haribabu, B., et al., *Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase*. *EMBO J*, 1995. **14**(15): p. 3679-86.
216. Braun, A.P. and H. Schulman, *The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 417-45.
217. Ohmstede, C.A., K.F. Jensen, and N.E. Sahyoun, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(10): p. 5866-75.
218. Jensen, K.F., et al., *Nuclear and axonal localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(7): p. 2850-3.
219. Bredt, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. *Nature*, 1991. **351**(6329): p. 714-8.
220. Matsubara, M., K. Titani, and H. Taniguchi, *Interaction of calmodulin-binding domain peptides of nitric oxide synthase with membrane phospholipids: regulation by protein phosphorylation and Ca(2+)-calmodulin*. *Biochemistry*, 1996. **35**(46): p. 14651-8.
221. Gregory, M.K., et al., *Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29662.
222. Stillwell, W. and S.R. Wassall, *Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*. *Chem Phys Lipids*, 2003. **126**(1): p. 1-27.
223. Williard, D.E., et al., *Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(9): p. 1368-76.
224. Denis, I., et al., *Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: body of evidence and possible mechanisms*. *Ageing Res Rev*, 2013. **12**(2): p. 579-94.
225. Crawford, M.A., *The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition*. *Am J Clin Nutr*, 1993. **57**(5 Suppl): p. 703S-709S; discussion 709S-710S.
226. Singh, M., *Essential fatty acids, DHA and human brain*. *Indian J Pediatr*, 2005. **72**(3): p. 239-42.

227. Innis, S.M., *Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain*. Brain Res, 2008. **1237**: p. 35-43.
228. Chapkin, R.S., et al., *Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(2): p. 466-71.
229. Smaby, J.M., et al., *Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol*. Biophys J, 1997. **73**(3): p. 1492-505.
230. Feller, S.E., *Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids*. Chem Phys Lipids, 2008. **153**(1): p. 76-80.
231. Scott, B.L. and N.G. Bazan, *Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2903-7.
232. Shaikh, S.R., et al., *Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation?* Biochemistry, 2003. **42**(41): p. 12028-37.
233. Wurtman, R.J., *Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents*. Metabolism, 2008. **57 Suppl 2**: p. S6-10.
234. Bazan, N.G., A.E. Musto, and E.J. Knott, *Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity*. Mol Neurobiol, 2011. **44**(2): p. 216-22.
235. Farooqui, A.A., *Beneficial Effects of Fish Oil on Human Brain*. 2009, Springer, New York.
236. Mayurasakorn, K., et al., *Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(2): p. 158-67.
237. Brenna, J.T. and G.Y. Diau, *The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007. **77**(5-6): p. 247-50.
238. Chen, C.T., et al., *Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **80**(2-3): p. 157-63.
239. Rapoport, S.I., *Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism in vivo*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(1): p. 79-85.
240. Utsunomiya, A., et al., *Localization of mRNA for fatty acid transport protein in developing and mature brain of rats*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. **46**(1-2): p. 217-22.
241. Chen, C.T. and R.P. Bazinet, *beta-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2015. **92**: p. 33-40.
242. Ikemoto, A., et al., *Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate or docosahexaenoate affect neurite outgrowth but not norepinephrine release*. Neurochem Res, 1997. **22**(6): p. 671-8.
243. Calderon, F. and H.Y. Kim, *Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons*. J Neurochem, 2004. **90**(4): p. 979-88.
244. Cao, D., et al., *Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(9): p. 538-46.
245. Cao, D., et al., *Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function*. J Neurochem, 2009. **111**(2): p. 510-21.

246. Walczewska, A., et al., *[The role of docosahexaenoic acid in neuronal function]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2011. **65**: p. 314-27.
247. Sharma, S., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *A pyrazole curcumin derivative restores membrane homeostasis disrupted after brain trauma*. Exp Neurol, 2010. **226**(1): p. 191-9.
248. Mazelova, J., et al., *Syntaxin 3 and SNAP-25 pairing, regulated by omega-3 docosahexaenoic acid, controls the delivery of rhodopsin for the biogenesis of cilia-derived sensory organelles, the rod outer segments*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 2003-13.
249. Ehninger, D. and G. Kempermann, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 243-50.
250. Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2027-33.
251. Fedorova, I. and N. Salem, Jr., *Omega-3 fatty acids and rodent behavior*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(4-5): p. 271-89.
252. Kim, H.Y., et al., *Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35215-23.
253. Kim, H.Y. and A.A. Spector, *Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(1): p. 121-5.
254. Kuipers, R.S., et al., *Fetal intrauterine whole body linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acid contents and accretion rates*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2012. **86**(1-2): p. 13-20.
255. Hadley, K.B., et al., *An assessment of dietary docosahexaenoic acid requirements for brain accretion and turnover during early childhood*. World Rev Nutr Diet, 2009. **99**: p. 97-104.
256. Lapillonne, A., S.D. Clarke, and W.C. Heird, *Polyunsaturated fatty acids and gene expression*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004. **7**(2): p. 151-6.
257. Bazan, N.G., *Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress*. Brain Pathol, 2005. **15**(2): p. 159-66.
258. Lukiw, W.J. and N.G. Bazan, *Docosahexaenoic acid and the aging brain*. J Nutr, 2008. **138**(12): p. 2510-4.
259. Rao, J.S., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(1): p. 36-46.
260. Boudrault, C., et al., *Cyclooxygenase-2 and n-6 PUFA are lower and DHA is higher in the cortex of fat-1 mice*. Neurochem Int, 2010. **56**(4): p. 585-9.
261. Bousquet, M., et al., *Transgenic conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids in a mouse model of Parkinson's disease*. J Lipid Res, 2011. **52**(2): p. 263-71.
262. Bousquet, M., F. Calon, and F. Cicchetti, *Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease*. Ageing Res Rev, 2011. **10**(4): p. 453-63.
263. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 92-101.
264. Bosetti, F., *Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models*. J Neurochem, 2007. **102**(3): p. 577-86.

265. Bazan, N.G., *Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S400-5.
266. Calon, F., et al., *Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model*. Neuron, 2004. **43**(5): p. 633-45.
267. Hashimoto, M., et al., *Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid beta-infused rats*. J Nutr, 2005. **135**(3): p. 549-55.
268. Calon, F., et al., *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(3): p. 617-26.
269. Green, K.N., et al., *Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels*. J Neurosci, 2007. **27**(16): p. 4385-95.
270. Akbar, M. and H.Y. Kim, *Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway*. J Neurochem, 2002. **82**(3): p. 655-65.
271. de Urquiza, A.M., et al., *Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain*. Science, 2000. **290**(5499): p. 2140-4.
272. Salem, M.L., et al., *N-3 polyunsaturated fatty acids accentuate B16 melanoma growth and metastasis through suppression of tumoricidal function of T cells and macrophages*. Anticancer Res, 2000. **20**(5A): p. 3195-203.
273. Jump, D.B., *Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(2): p. 155-64.
274. Hong, S., et al., *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005. **78**(1-4): p. 107-16.
275. Simopoulos, A.P., *Summary of the NATO advanced research workshop on dietary omega 3 and omega 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality*. J Nutr, 1989. **119**(4): p. 521-8.
276. Ozsoy, O., et al., *The effect of docosahexaenoic Acid on visual evoked potentials in a mouse model of Parkinson's disease: the role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa-B*. Neurotox Res, 2011. **20**(3): p. 250-62.
277. Date, I., D.L. Felten, and S.Y. Felten, *Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to aging: neurochemical and immunocytochemical analysis*. Brain Res, 1990. **519**(1-2): p. 266-76.
278. Beal, M.F., et al., *Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice*. Brain Res, 1998. **783**(1): p. 109-14.
279. Kobayashi, T., et al., *Effects of L-dopa and bromocriptine on haloperidol-induced motor deficits in mice*. Life Sci, 1997. **61**(26): p. 2529-38.
280. Ogawa, N., et al., *MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior*. Eur Neurol, 1987. **26 Suppl 1**: p. 16-23.
281. Kayir, H. and I.T. Uzbay, *Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **172**(1): p. 11-5.
282. Rozas, G., M.J. Guerra, and J.L. Labandeira-Garcia, *An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism*. Brain Res Brain Res Protoc, 1997. **2**(1): p. 75-84.
283. Rozas, G., et al., *The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism*. J Neurosci Methods, 1998. **83**(2): p. 165-75.

284. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
285. Benabid, A.L., et al., *Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2009. **8**(1): p. 67-81.
286. Bedard, P.J., et al., *Chronic treatment with L-DOPA, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP-parkinsonian monkeys. Correlation with [3H]spiperone binding*. Brain Res, 1986. **379**(2): p. 294-9.
287. Schober, A., *Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 215-24.
288. Shimoji, M., et al., *Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. **134**(1): p. 103-8.
289. Olson, M.V., et al., *Docosahexaenoic acid reduces inflammation and joint destruction in mice with collagen-induced arthritis*. Inflamm Res, 2013. **62**(12): p. 1003-13.
290. Hacıoglu, G., A. Agar, and P. Yargicoglu, *The role of docosahexaenoic acid on visual evoked potentials in one kidney-one clip hypertension*. Acta Ophthalmol Scand, 2006. **84**(4): p. 488-94.
291. Gambhir, H., R. Mathur, and M. Behari, *Progressive impairment in motor skill learning at 12 and 20 weeks post 6-OHDA- SNc lesion in rats*. Parkinsonism Relat Disord, 2011. **17**(6): p. 476-8.
292. Morroni, F., et al., *Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2013. **36**: p. 63-71.
293. Goes, A.T., et al., *Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine*. Neuroscience, 2014. **256**: p. 61-71.
294. Park, H.K., et al., *MPTP-induced model of Parkinson's disease in heat shock protein 70.1 knockout mice*. Mol Med Rep, 2012. **5**(6): p. 1465-8.
295. Petroske, E., et al., *Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment*. Neuroscience, 2001. **106**(3): p. 589-601.
296. Luchtman, D.W., Q. Meng, and C. Song, *Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease*. Behav Brain Res, 2012. **226**(2): p. 386-96.
297. Coluccia, A., et al., *Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats*. Int J Dev Neurosci, 2009. **27**(6): p. 599-605.
298. Grieb, B., et al., *Decomposition of abnormal free locomotor behavior in a rat model of Parkinson's disease*. Front Syst Neurosci, 2013. **7**: p. 95.
299. Fredriksson, A., et al., *Running wheel activity restores MPTP-induced functional deficits*. J Neural Transm, 2011. **118**(3): p. 407-20.
300. Litteljohn, D., et al., *Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat*. Neuroscience, 2009. **164**(4): p. 1894-906.
301. Ayton, S., et al., *The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability*. Neurosci Lett, 2013. **543**: p. 105-9.
302. Samadi, P., et al., *Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys*. Ann Neurol, 2006. **59**(2): p. 282-8.

303. Vinot, N., et al., *Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20491.
304. Levecque, C., et al., *Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(1): p. 79-86.
305. Lang, Y., D. Gong, and Y. Fan, *Calcium channel blocker use and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis*. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2015.
306. Danthi, S.J., J.A. Enyeart, and J.J. Enyeart, *Modulation of native T-type calcium channels by omega-3 fatty acids*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(2): p. 485-93.
307. Komeima, K. and Y. Watanabe, *Dephosphorylation of nNOS at Ser(847) by protein phosphatase 2A*. FEBS Lett, 2001. **497**(1): p. 65-6.
308. Curtis, E., et al., *Oxygen regulates tissue nitrite metabolism*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(7): p. 951-61.
309. Boo, Y.C., S.L. Tressel, and H. Jo, *An improved method to measure nitrate/nitrite with an NO-selective electrochemical sensor*. Nitric Oxide, 2007. **16**(2): p. 306-12.
310. Guo, S., et al., *Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway*. Biol Psychiatry, 2007. **62**(12): p. 1353-62.
311. Lu, D.Y., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids*. Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(11): p. 2238-48.
312. Sarsilmaz, M., et al., *Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**(4): p. 253-9.
313. Sofic, E., et al., *Antioxidant capacity in postmortem brain tissues of Parkinson's and Alzheimer's diseases*. J Neural Transm Suppl, 2006(71): p. 39-43.
314. Koutsilieris, E., et al., *Free radicals in Parkinson's disease*. J Neurol, 2002. **249** Suppl 2: p. II1-5.
315. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
316. Pryor, W.A., *The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out?* Am J Clin Nutr, 1991. **53**(1 Suppl): p. 391S-393S.
317. Janero, D.R., *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(6): p. 515-40.
318. Soulere, L., Y. Queneau, and A. Doutheau, *An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds*. Chem Phys Lipids, 2007. **150**(2): p. 239-43.
319. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. **10** Suppl: p. S18-25.
320. Ji, C., et al., *4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(8): p. 1090-6.
321. Hattoria, N., et al., *Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2009. **15** Suppl 1: p. S35-8.
322. Lee, H.J., et al., *Docosahexaenoic acid prevents paraquat-induced reactive oxygen species production in dopaminergic neurons via enhancement of glutathione homeostasis*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **457**(1): p. 95-100.

323. Arnal, E., et al., *Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex*. Neuroscience, 2010. **166**(1): p. 271-8.
324. Ishikado, A., et al., *4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69415.
325. Ishikado, A., et al., *Low concentration of 4-hydroxy hexenal increases heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **402**(1): p. 99-104.
326. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
327. Keller, J.N. and M.P. Mattson, *Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system*. Rev Neurosci, 1998. **9**(2): p. 105-16.
328. Narayanan, B.A., N.K. Narayanan, and B.S. Reddy, *Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells*. Int J Oncol, 2001. **19**(6): p. 1255-62.
329. Bonin, A. and N.A. Khan, *Regulation of calcium signalling by docosahexaenoic acid in human T-cells. Implication of CRAC channels*. J Lipid Res, 2000. **41**(2): p. 277-84.
330. Chalon, S., et al., *Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats*. J Nutr, 1998. **128**(12): p. 2512-9.

ÖZGEÇMİŞ

10.02.1987 tarihinde İstanbul Bakırköy’de dünyaya gelen Hande Parlak, ilköğretim ve lise öğrenimini İstanbul’un Üsküdar semtinde tamamladı. 2005 yılında Üsküdar Hüseyin Avni Sözen Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. 2006 yılında Ankara Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek öğrenimine başladı. 2011 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen burada araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Evlidir ve yabancı dili İngilizce’dir.