

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

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)İN
KORUYUCU ETKİSİNDE HEM OKSİJENAZ
ENZİMİNİN ROLÜ**

Ayşe ÖZKAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

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

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'İN
KORUYUCU ETKİSİNDE HEM OKSİJENAZ
ENZİMİNİN ROLÜ**

Ayşe ÖZKAN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysel AĞAR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013.02.0122.012)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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

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

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

Üye: Prof. Dr. B. Uğur YAVUZER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıda jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../2015 tarih ve .../... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Parkinson hastalığı (PH), substantia nigra (SN)'deki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile oluşan bir hastalıktır. Klinikte görülen belirtileri tremor, rijidite, bradikinezi ve postural bozukluktur. Dokosaheksaenoik asit (DHA) nöronların hücre zarında bulunan, nöron fonksiyonları için gerekli olan bir yağ asitidir. Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda yağ asitlerinin konsantrasyonunda azalma meydana gelmektedir. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde tedaviye yardımcı olarak DHA uygulamasının koruyucu etkisinde hem oksijenaz enzimlerinin rolünü tespit etmek amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

3 aylık C57BL/6 erkek fareler kontrol (K), DHA uygulanan (D), MPTP ile Parkinson modeli oluşturulan (P) ve DHA+MPTP verilen Parkinson modeli (DP) olmak üzere rastgele dört gruba bölünmüştür. DHA 36 mg/kg/gün dozunda mısır özü yağında çözümlenerek 30 gün boyunca tedavi (D ve DP) gruplarına gavajla uygulanmıştır. DHA uygulamasının 23. gününde ise MPTP toksini P ve DP gruplarına iki saat aralıklarla 4x20 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilmiştir.

Parkinson oluşturulmasının 7.gününde farelerin motor aktiviteleri lokomotor aktivite kafesi ve rotarod testleri ile değerlendirilmiştir. SN, biyokimyasal ve immunohistokimyasal parametreler için çıkarılmıştır. SN'deki tirozin hidroksilaz (TH) hücre kayıpları ise TH immunoreaktif hücrelerin immunohistokimyasal analizi ile tespit edilmiştir. Bcl-2, Bax, HO-2, Nrf-2 proteinlerinin yoğunluğu immunohistokimyasal analiz ile değerlendirilmiştir. HO-1 ve HO-2 protein miktarları western blot ile tespit edilmiştir.

Motor koordinasyon ve denge göstergesi olan rotarod testi 40 rpm'de Parkinson modelinde çubukta (rodta) kalma sürelerin kontrole göre kısaldığı, DHA uygulanan Parkinson grubunda ise bu sürenin uzadığı saptanmıştır. Locomotor aktivite göstergesi olan toplam lokomotor aktivite, ambulatuvar hareket ve toplam mesafenin Parkinson grubunda azaldığı, DHA uygulamasının ise bu parametrelere düzeltici etki gösterdiği bulunmuştur. Bradikinezinin şiddetini gösteren çubuk testinde hayvanların geri dönüş ve total iniş sürelerinin Parkinson modelinde uzadığı, DHA uygulamasının Parkinson modelinde uzayan süreleri kısalttığı bulunmuştur.

Kaspaz-3 aktivitesinin P grubunda kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. SN'de TH içeren nöron sayıları incelendiğinde TH pozitif hücre sayısı Parkinson grubunda %75 azalmış, DP grubunda ise bu azalmanın %50 olduğu gözlenmiştir. Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun P ve DP grubunda arttığı bulunmuştur. Nrf2 ekspresyonunun P grubunda arttığı DP grubunda ise azalma eğilimi gösterdiği görülmüştür. HO-1 ve HO-2 protein miktarlarının DP grubunda P grubu ile kıyaslandığında azaldığı bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonuçları MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde DHA uygulamasının dopaminerjik nöronları apoptoza karşı koruduğu, HO-1 ve HO-2 ekspresyon düzeylerinin bu korumada etkili olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Hem oksijenaz, Dokosaheksaenoik asit, Nükleer faktör-E2- ilişkili faktör 2, Parkinson

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by degeneration of the dopaminergic neurons in substantia nigra (SN). Its major clinical symptoms are tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability. Docosahexaenoic acid (DHA) is an essential fatty acid for neural functions that resides within the neural membrane. A decline in fatty acid concentration is observed in case of neurodegenerative diseases such as PD. The present study is designed to investigate the role of heme oxygenase enzyme in protective effect of DHA administration in experimental Parkinson model elicited by 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP).

Three-month old male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups as: Control (C), DHA-treated (D), MPTP-induced PD (P) and DHA-treated PD (DP). DHA dissolved in corn oil was administered daily ($36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) by oral gavage to D and DP groups for 30 days. On the 23rd day of the DHA administration, the neurotoxin MPTP was intraperitoneally injected at a dose of $4\times 20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ at 2-hr intervals.

Motor activities of mice were evaluated by locomotor cage and rotarod test on the 7th day of the utilization of Parkinson model. SN tissues were obtained for biochemical and immunohistochemical analyses. The loss of the cells in SN was detected by the immunohistochemical analysis of the tyrosine hydroxylase (TH)-immunopositive cells. The intensities of the Bcl-2, Bax, HO-2, Nrf-2 proteins were determined by immunohistochemistry, while HO-1 ve HO-2 protein levels were assayed by western blot.

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 which was significantly increased by DHA treatment in DP group. The total locomotor activity, ambulatory movement and total distance were decreased in P group; whereas, they were improved upon DHA treatment. The results of the pole test indicating the intensity of the bradykinesia showed that the return time and the total down time were increased in P group, while DHA treatment significantly shortened both parameters.

Compared to the control, increased caspase 3 activity was found in P group. The increased activity of caspase 3 was attenuated but not significantly decreased in DP group. The number of TH-positive cells in SN was significantly reduced in P group; whereas, the reduction was found to be 50% in cells DP group. The Bcl-2 and Bax expressions were increased in P and DP group. The upregulated expressions of Nrf2 was observed in P group; whereas, its expression was down-regulated in DP group. The increased HO-1 and HO-2 protein levels were detected in P group compared with DP.

The results of the present study indicate the protective effect of DHA administration on dopaminergic neurons in MPTP-induced experimental Parkinson model. Furthermore, the pathways of HO-1 and HO-2 are partly involved in this protective mechanism.

In apoptotic pathway, DHA has protective effects on dopaminergic neurons in MPTP-induced experimental Parkinson model. HO-1 and HO-2 expression levels could be effective on this mechanism of protection.

Key Words: Heme oxygenase, Docosahexaenoic acid, Nuclear factor E2- related factor 2, Parkinson

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Parkinson Hastalığı	4
2.1.1. Parkinson Hastalığının Patolojisi	5
2.1.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri	5
2.1.2.1. Tremor	5
2.1.2.2. Rijidite	5
2.1.2.3. Bradikinezi	5
2.1.2.4. Postural bozukluk	6
2.1.2.5. Demans	6
2.1.2.6. Depresyon	6
2.1.3. Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları	6
2.1.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi	7
2.1.4.1. Protein Yanlış Katlanması ve Agregasyonu	8
2.1.4.2. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu	8
2.1.4.3. Oksidatif Stres	9
2.1.4.4. Apoptoz	10
2.1.4.5. Demir Metabolizması	12
2.1.4.6. İnflamatuvar Mekanizma	12
2.1.4.7. Genetik	12
2.1.5. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri	13
2.1.5.1. Toksin Temelli Modeller	13
2.1.6. Dopaminerjik Sistem	16

2.1.6.1.	Biyokimyasal Mekanizması	16
2.1.6.2.	Beyinde Dopaminerjik Yolaklar	17
2.1.6.3.	Anatomi ve Fizyolojisi	18
2.1.7.	n-3 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (PUFA'lar	19
2.1.7.1.	Nörotrofik Faktörler	19
2.1.7.2.	Oksidatif Stres ve Apoptoz	20
2.1.7.3.	Nöroinflamasyon	20
2.1.8.	Hem oksijenaz Sistemi	22
2.1.8.1.	HO Sistem Elementleri	23
2.1.8.2.	Hem'in HO Sistemi Tarafından Degredasyonu	25
2.1.8.3.	Memeli Merkezi Sinir Sisteminde Bazal HO Ekspresyonu	26
2.1.8.4.	İnflamasyon	27
2.1.9.	Nükleer Faktör E2- İlişkili Faktör 2 (Nrf2)	27
2.1.10.	Hipotez	28
GEREÇ ve YÖNTEM		29
3.1.	DHA Uygulaması	29
3.2.	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.	Lokomotor Aktivite Testi	29
3.3.2.2.	Rotarod Testi	30
3.3.2.3.	Pole (Çubuk) Testi	30
3.4.	Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması	30
3.5.	Histolojik Analizler	30
3.5.1.	Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	30
3.5.2.	İmmünohistokimya Yöntemi	31
3.6.	Dokuların Homojenizasyonu	32
3.7.	Protein Tayini	32
3.8.	Western Blot Analizi	32
3.8.1.	Doku Örneklerinin Hazırlanması	32
3.8.2.	Elektroforez ve Blotlama İşlemleri	32
3.8.3.	Görüntüleme ve Değerlendirme	33

3.9.	Biyokimyasal Analizler	33
3.9.1.	Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini	33
3.10.	Sonuçların Değerlendirilmesi	34
BULGULAR		35
4.1.	Genel Görünüm	35
4.2.	Ağırlık Değişimi	35
4.3.	Motor Aktivite Tayini	35
4.4.	İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler	38
4.4.1.	Tirozin Hidroksilaz İmmunoreaktivitesi	38
4.4.2.	Bax ve Bcl-2 İmmunoreaktivitesi	40
4.4.3.	Nrf2 İmmunoreaktivitesi	44
4.4.4.	HO-2 İmmunoreaktivitesi	46
4.5.	Western Blot Değerlendirmesi	48
4.6.	Biyokimyasal Parametreler	49
TARTIŞMA		50
SONUÇLAR		54
KAYNAKLAR		55
ÖZGEÇMİŞ		72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-HHE	: 4-hidroksi-2-hekzenal
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
6-OHDA	: 6-hidroksi dopamin
8-OHDG	: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin
AADC	: Aromatik L-aminoasit dekarboksilaz
AIF	: Apoptoz indükleyen faktör
ALA	: α -linolenik asit
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive eden faktör
AP1	: Aktivatör protein 1
Apo2L (Apo3L)	: Tümör nekrozis faktör ligand superfamily
ARA	: Antioksidan response element
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-2	: B cell lymphoma 2
BH3	: Bcl-2 homology domain 3
BV	: Biliverdin
BDNF	: Beyin türevli nörotrofik faktör
DA	: Dopamin
DAT	: Dopamin taşıyıcısı
DBH	: Dopamin hidroksilaz
DDC	: DOPA dekarboksilaz
DEVD	: asp-glu- val- asp amino asit dizisi
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DIABLO	: IAP bağlayıcı mitokondriyal protein
DISC	: Ölüm indüklü sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNIC	: Dinitrozil demir-sülfür kompleksi
EPA	: Eikosapentaenoik asit
ETS	: Elektron taşıma zinciri

FADD	: Fas bağımlı ölüm domain proteini
FADH₂	: Flavin adenin dinükleotid
FasL	: FAS ligandı
FasR	: Fas reseptörü
Fe²⁺	: Ferröz demir
GABA	: Gama amino bütirik asit
GC	: Guanilat siklaz
GDNF	: Glial hücre türevli nörotrofik faktör
GP	: Globus pallidus
GP_e	: Globus pallidus eksterna
GP_i	: Globus pallidus internal
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₃BO₃	: Borik asit
HIF1-α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1- α
HO	: Hem oksijenaz
HO-1	: Hem oksijenaz 1
HO-2	: Hemoksijenaz 2
HRP	: Horseradish peroksidaz
IAP	: Apoptozu inhibe eden proteinler
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IFN-γ	: İnterferon-gama
IgG	: İmmunoglobulin G
KH₂PO₄	: Potasyum hidrojen fosfat
Keap1	: Kelch-like ECH-associated protein 1
L-DOPA	: 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LPS	: Lipopolisakkarit
LTP	: Long-term-potentialiation
MAO-B	: Monoamin oksidaz B
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MFB	: Orta ön beyin demeti

MnSOD	: Manganese süperoksit dismutaz
MPDP⁺	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium
MPP⁺	: 1-metil-4-fenil piridin
MPTP	: 1-metil 4-fenil 1,2,3,6- tetrahidropiridin
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NPD1	: Nöroprotektin 1
O₂	: Moleküler oksijen
PAH	: Fenilalanin hidroksilaz
PARK-1	: α sinüklein
PARK-2	: Parkin
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PD	: Parkinson disease
PET	: Pozitron emisyon tomografi
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PH	: Parkinson hastalığı
PIF	: Prolaktin-inhibe edici faktör
PIH	: Prolaktin-inhibe edici hormon
PIK	: Proteaz inhibitör kokteyli
PI3K	: Fosfoinozitol-3- kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PLA₂	: Fosfolipaz A2
PLP	: Piridoksal fosfat
PMAT	: Plazma membran monoamin taşıyıcısı
Pna	: p-nitroanilin
PNMT	: Feniletanolamin N-metiltransferaz
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
PVDF	: Poliviniliden diflorid
RNA	: Ribo nükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri

Smac	: İkincil mitokondri türevli kaspaz aktivatörü
SN	: Substantia nigra
SNpc	: Substantia nigra pars kompakta
SNpr	: Substantia nigra pars retikulata
SOD	: Süperoksit dismutaz
TGF- β	: Transformin büyüme faktörü-B
TH	: Tirozin hidroksilaz
THB	: Tetrahydrobiopterini
TLR	: Toll- like reseptör
TNF-α	: Tümör nekroz edici faktör- α
TNFR1	: Tümör nekroz edici faktör reseptör-1
VDAC1	: Dış mitokondriyal protein 1
VMAT2	: Veziküler mono amin taşıyıcısı
VTA	: Ventral tegmental alan

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Substantia Nigra'nın Anatomik Yapısı	4
2.2.	Bazal Ganglion Fonksiyon Modeli	7
2.3.	Hücre Ölümü Yolakları	11
2.4.	MPP ⁺ 'nin Hücre İçi Yolağı	15
2.5.	Dopamin Metabolizması	17
2.6.	PUFA Sentezi	21
2.7.	Çoklu Yağ Asitlerinin Metabolizması	22
2.8.	Hem Oksijenaz Genlerinin Yapısı	23
2.9.	HO-2 Enzimatik Aktivitesi Ürünlerinin Fizyolojik Etkileri	24
2.10.	Hemoksijenazın Enzimatik Reaksiyonu	24
2.11.	Hem Oksijenazın Katalitik Reaksiyonu	25
2.12.	CO'in Koruma Mekanizması	27
2.13.	Nrf2/ARE Sinyal Yolağı	28
4.1.	Yere İnme Zamanı	36
4.2.	Dönme Zamanı	36
4.3.	Ambulatuvar Hareket	37
4.4.	Mesafe	38
4.5.	Toplam İma	38
4.6.	Deney Gruplarında TH İçin Gözlenen İmmunoreaktivite	39
4.7.	Birim μm^2 'deki TH+ Hücre Sayısı Yüzdesi	40
4.8.	Deney Gruplarında Bax İçin Gözlenen İmmunoreaktivite	41
4.9.	Birim μm^2 'deki Bax+ Hücre Sayısı Yüzdesi	42
4.10.	Deney Gruplarında Bcl-2 İçin Gözlenen İmmunoreaktivite	43
4.11.	Birim μm^2 'deki Bcl-2+ hücre sayısı yüzdesi	44
4.12.	Deney gruplarında Nrf2 İçin Gözlenen İmmunoreaktivite	45

4.13.	Birim μm^2'deki Nrf2+ Hücre Sayısı Yüzdesi	46
4.14.	Deney Gruplarında HO-2 İçin Gözlenen İmmunoreaktivite	47
4.15.	Birim μm^2'deki HO-2+ Hücre Sayısı Yüzdesi	48
4.16.	HO-1 Ekspresyonu	48
4.17.	HO-2 Ekspresyonu	49
4.18.	Kaspaz-3 Aktivitesi	49

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	HO İzoenzimlerinin Özellikleri	26
4.1.	Haftalara Göre Ağırlık Değişimi	35
4.2.	Rotatodta Kalma Süresi	37

GİRİŞ

Parkinson hastalığı, (PH) 1817 yılında James Parkinson'un "Shaking Palsy" olarak isimlendirdiği substansiya nigra pars kompakta (SNpc) bölgesindeki nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize olan ilerleyici nitelikte bir nörodejeneratif hastalıktır [1]. Yaygın olarak görülen belirtileri tremor, rijidite, bradikinezi ve postural bozukluk olmakla birlikte demans ve depresyon da Parkinson hastalarında ilerleyen dönemlerde görülen semptomlardır [2]. Yaşa bağlı olarak SNpc'deki nöronal kayıp ve hücre ölümünün %50-60'ları geçmesi ile klinik belirtiler görülmektedir [3].

Parkinson hastalığının sebebi tam olarak bilinmemektedir. Ancak pek çok hipotez öne sürülmüştür. Bu hipotezlerden bazıları; ubiquitin-proteazom sistemi ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, eksitotoksisite, inflamasyon ve oksidatif strestir [4-8]. Oksidatif stres, parkinson hastalığının oluşmasında en önemli faktördür. Parkinson hastalarından alınan substansiya nigra doku örneklerinde yapılan postmortem incelemelerde, lipid peroksidasyonun aynı yaştaki kontrollere göre belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir [9]. Parkinson hastalarının bazal gangliyonlarında, antioksidan enzimlerin ve hücre içi indirgeyici maddelerin azalmış olduğu bilinmektedir [10-11]. Oksidatif stresi artıran nedenler arasında demirin aracılık ettiği fenton reaksiyonunun da yer aldığı bilinmektedir. Demirin en önemli kaynaklarından biri hem molekülüdür [12].

Hem, aerobik organizmalar için esansiyel olan bir moleküldür ve oksijen molekülüne yüksek afinitesi bulunan bir protoporfirin IX halkası ve bir ferröz (Fe^{2+}) demir atomu içermektedir. Hem halkasının ayrılması ile serbest kalan demir "aktif redoks demir"ini meydana getirmekte ve hücre içinde reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır [12]. Oluşan ROS, proteinlerde ve DNA'da hasara sebep olurken düşük yoğunluktaki lipoproteinleri okside ederek hücreyi apoptoza götürmektedir [13]. Hemoksijenaz (HO) enzim kompleksi ise bu ölümcül etkilere karşı hücreyi korumakla yükümlüdür [14].

HO enzimi (HO), üç molekül oksijen, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve sitokrom P450 redüktaz aracılığıyla hem molekülünü oksidatif olarak biliverdine (BV) parçalar. HO, karbonmonoksit (CO) ve demir (Fe^{2+})'in serbest kalmasını sağlayan biyokimyasal yoldaki hız sınırlayıcı enzimdir [14]. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünler normal şartlar altında fizyolojik görevler üstlenirken bunun yanı sıra çeşitli dokularda patolojik rolleri de bulunmaktadır [15]. HO, temel olarak üç farklı izoenzimden oluşmaktadır. Katalitik olarak aktif olan HO-1 32 kDa ağırlığında bir protein iken, diğer aktif form olan HO-2 36 kDa'luk bir proteindir. Üçüncü izoform olan HO-3 birçok dokuda eksprese olurken, ekspresyonunu uyaran ajanların neler olduğu henüz bilinmemektedir [16]. HO'nun iki ana izoformu olan HO-1 ve HO-2 insan beyninde bulunmaktadır. HO-2 yapısal olarak bulunmasına karşın, HO-1 ısı şok proteini 32 (HSP 32) olarak da bilinir, substratı olan hem, ağır metaller, UV ışını, endotoksin, inflamatuvar sitokinler ve prostoglandinler gibi stres ile ilişkili hücresel stimuluslarla indüklenebilmektedir [17]. Beyindeki nöronlarda ve diğer hücrelerde HO-1'in ekspresyonu nöronların korunması ve nöroplastisite için önemlidir [18-19].

HO-1'in katalizlediği reaksiyon sonunda oluşan CO, nitrik oksit (NO)'e benzer fizyolojik özellikler göstermektedir. Endojen CO sinir, kardiyovasküler ve immün sistemde çözünebilir guanilat siklaz (sGC)'ı uyararak pleitrofik etki göstermektedir. CO kan damarlarında vasodilatör etki göstermesinin yanı sıra hücrel iskemiyeye karşı koruma ve Na⁺/K⁺-ATPaz pompa aktivitesinin düzenlenmesi gibi görevleri üstlenmektedir [20]. HO-1 türevli CO antiinflamatuvar etki göstermekte iken diğer son ürün olan bilirubin potansiyel bir antioksidan olarak rol oynamaktadır [21]. Bunun yanı sıra lökosit infiltrasyonunu inhibe ederek, siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi proinflamatuvar molekülleri baskılayarak inflamatuvar cevabı azaltıcı etki göstermekte ve süperoksitlere karşı hücrelerin apoptoza gitmesini önlemektedir. Ayrıca HO-1 ekspresyonu ile sitoprotektif etki arasında doğru orantı bulunduğu bilinmektedir [22]. HO-1 ekspresyonunu arttıran en önemli transkripsiyon faktörü Nuclear factor E2-related factor (Nrf2)'dir. Antioksidan response element (ARE) aracılığı ile sitoprotektif genlerin ekspresyonunu düzenler. ARE bölgesi ise birçok detoksifiye edici ve sitoprotektif genin promoter bölgesinde bulunur. Özellikle nöronal dokularda HO-1, glutatyon S-transferaz (GST) ve NAD(P)H: quinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) gibi genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir [23].

Parkinson hastalarında yapılan postmortem immünohistokimyasal çalışmalarda kaudat, putamen, globus pallidus, hipokampus ve substansiya nigra'nın pars kompakta bölgesinde HO-1 boyanması gösterilmiştir [24]. HO-1 prooksidan olan hem'i parçalayarak antioksidan özellikli safra pigmentlerine dönüştüren bir enzimdir [25].

Nrf2 normal şartlar altında Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) ile bağlanarak sitoplazmada stabil bir şekilde bulunmaktadır [26]. Aktive olduğunda Keap1 ve Nrf2 arasındaki etkileşim bozulmaktadır. Nrf2 nükleusa geçerek ARE aracılığıyla transkripsiyonun düzenlenmesini sağlamaktadır [23].

Nrf2 oksidatif stres ajanları ve mitokondriyal toksinlere karşı nöroprotektif etki göstermektedir. Hidrojen peroksit (H₂O₂), 3-nitropropionik asit (3-NP), metilpiridinium iyonu (MPP⁺), 6- hidroksidopamin (6-OHDA) ve rotenon uygulanan primer nöronal hücre kültürlerinde Nrf2'nin nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir [27-32]. Ayrıca malonat, 3-NP, kainik asit ve MPTP'nin akut veya subkronik uygulanması ile nörotoksisite oluşturulan hayvanlarda Nrf2'nin aktive olduğu ve koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır [32-36].

Diğer yandan normal hücre fonksiyonları için gerekli olan linoleik asit (LA) ve α linolenik asitler (ALA) esansiyel yağ asitleridir. Doymamış yağ asitleri n-6 (omega-6) ve n-3 (omega-3)'tür. Her iki yağ asidi de araşidonik asit (ARA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi doymamış yağ asitlerinin (PUFA) sentezi için prekürsördür. Esansiyel yağ asitleri hücre membranında fosfolipid tabakasının entegral komponentidir ve membran akışkanlığında etkilidir. Diyet ile alınan DHA'nın antiinflamatuvar olduğu, sitokinleri azalttığı ve sitokinlere bağlı olarak oluşan nörodejenerasyonu önlediği tespit edilmiştir. Parkinson hastalığının gelişimi üzerine DHA'nın olumlu etkisi daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [37]. DHA'nın beyindeki oksidatif stresi ve inflamasyonu önleyici etkisinin HO-1 ekspresyonunu artırıcı etkisine bağlı olabileceğini ileri süren çalışmalar mevcuttur [38]. Yapılan çalışmalarda, mikrogliaların aktivitelerini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği, dışarıdan DHA verilmesinin Nrf2'yi stimüle ederek HO-1 yapımını arttırdığı, ayrıca mikroglialardan salınan sitokinlerin salgılanmasını önlediği bulunmuştur [39-41]. DHA'nın Parkinson'da apoptozisi azalttığı, COX-2 yolağı üzerinden etki gösterdiği bilinmektedir [42]. Bu bulgular, MPTP ile oluşturulan Parkinson hastalığında DHA'nın olumlu etkisinin HO-1 ekspresyonundaki artışa bağlı olabileceğini düşündürmüştür [38].

Bu çalışmamızda deneysel Parkinson modeli oluşturulan farelerde DHA'nın SN'deki HO-1, HO-2 ve Nrf2'nin ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. SN'deki hücre apoptozları

Tirozin hidroksilaz (TH) n6ron sayısı ve apoptoz g6stergesi olan kaspaz-3 aktivitesi 6l6ulerek değerlendirilmiştir. Antiapoptotik protein olan Bcl-2 ve apoptotik protein olan Bax proteinlerinin yoğunluğu immunohistokimyasal olarak analiz edilmiştir. HO-1, HO-2 ve Nrf2 semikantitatif immunohistokimyasal y6ntem ile saptanmış HO-1, HO-2 protein ekspresyonu western blot tekniği ile 6l66lm6řt6r. Bu parametreler lokomotor aktivite parametreleri ile desteklenmiştir.

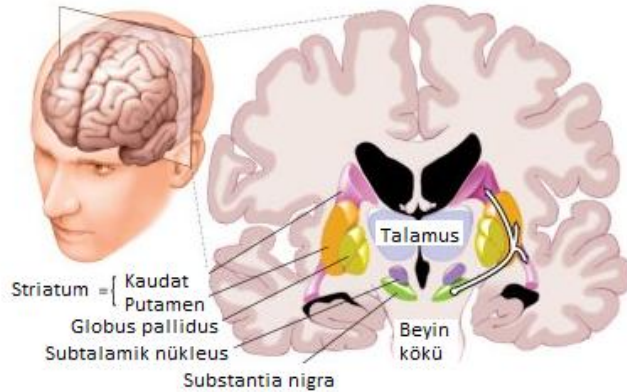
GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı (PH) Alzheimer hastalığından sonra gelen en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. 65 yaş üzeri populasyonun %1-2'sini etkilemekte ve yaşlılıkla birlikte insidansı artmaktadır [43-44]. PH'nin kesin sebebi bilinmemekle birlikte substantia nigra pars compacta (SNpc)'da bulunan dopaminerjik nöronların ölümü ile karakterize olmaktadır ve SN'de gözlenen bu nöronal apoptozda, mitokondriyal oksidatif stres, lizozomal ve proteazomal işlev bozukluğu gibi patolojik süreçlerin rol oynadığı bilinmektedir [45].

PH'de gözlenen motor fonksiyon bozuklukları SNpc'de başlayıp putamen ve kaudat nükleusta sonlanan nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların dejenerasyonu sonucu gerçekleşmektedir [46]. Bu nigrostriatal nöronların hücre gövdeleri SNpc'de olup putamene uzanmaktadır ve hastalık durumunda dopaminerjik nöronların kaybı SNpc'de %60 iken putamende %80'e kadar artış gösterebilmektedir [47].

Dopaminerjik nöronların ilerleyen kaybından başka var olan nöronlarda Lewy cisimcikleri denilen inklüzyonların oluşumu PH histopatolojik bulgularındandır [48-49]. Lewy cisimcikleri ilk kez 1912 yılında F. H. Lewy tarafından Parkinson hastalarının beyin sapında, SN'nin nöromelanin içeren nöronlarının sitoplazmasında saptanmıştır [50]. Eozinofilik boyanma gösteren, α -sinüklein, parkin ve ubiquitinli protein gibi agregatlardan ve nörofilamanlardan oluşan Lewy cisimcikleri, yoğun hyalin çekirdeğe ve 15 μ m'den daha büyük çapa sahip inklüzyonlardır [51-52].



Şekil 2.1. Substantia Nigra'nın Anatomik Yapısı

2.1.1. Parkinson Hastalığının Patolojisi

PH'de beyinde SNpc ve pontine locus ceruleus'ta depigmentasyon, nöronal kayıp ve gliosis gibi anormalliklere rastlanmaktadır. Nöronal dejenerasyon, vagusun dorsal motor nükleusunda ve diğer beyin sapı nükleuslarında bulunmaktadır.

Kantitatif metodlar kullanılarak yedi PH hastası ve yedi kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada normalde 550.000 olan substantia nigra'daki pigmentli nöronların sayısının PH hastalarında %66 azaldığı; normalde sayısı 260.000 olan pigmentsiz nöronların sayısının %24 azaldığı bulunmuştur [53]. PH ilk semptomları ortaya çıktığında SNpc'deki nöronların %60'ının kaybı söz konusudur [54].

SNpc'nin dejenerasyonuna ek olarak globus pallidus'un internal segmenti, pedunculo-pontine tegmental nükleus ve glutamaterjik kaudal intralaminar talamik nükleus gibi bölgeler de PH'nin patolojisinden etkilenmektedir [55]. Ayrıca, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) çalışmasıyla PH'de önemli bir hipokampal atrofi olduğu gösterilmiştir [56].

2.1.2. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri

PH kronik ve ilerleyen bir nörolojik hastalıktır. Dört önemli motor belirtisi bulunmaktadır. Bunlar; dinlenmede tremor, rijidite, bradikinezi (hareketin yavaşlaması) ve postural bozukluktur. Başlangıçta tüm hastalarda bu klasik belirtilerin hepsi bulunmamaktadır. Sadece 1-2 tanesi gözlenebilmektedir.

İlk şikayet sık olarak motor zayıflık veya sertliktir. Buna rağmen postural bozukluklar ve tremor daha sonra ortaya çıkmaktadır. PH'nin klinikteki teşhisi medikal geçmiş temeline ve nörolojik açıklamaya dayanmaktadır. Hiçbir laboratuvar testinin bulunmayışı teşhisi zorlaştırmaktadır. Dopamin kaybını tahmin edebilen nöroimaging cihazları ise rutin teşhiste çok pahalıdır. Sonuç olarak, önemli sayıdaki bireyde otopsi ile hastalığın histopatolojik belirteçleri gösterilmiştir [57-59].

2.1.2.1. Tremor (İstirahat Halinde İzlenen Titreme)

Tremor hastaların %70'inde görülen PH'nin en karakteristik özelliklerinden biridir [60]. Hastalarda görülen ilk motor belirti olup hareket sırasında ortadan kaybolur. Sıklıkla üst ekstremitelerde distalden unilaterale olarak başlar. Bazı hastalarda sadece tek bir parmağı etkileyebilir. Tremor sıklıkla işaret parmağı ve baş parmağın ritmik ve stereotipik para sayma hareketidir. Tipik frekansı 4-5 Hz düzeyinde seyredir. Tremor diğer belirtilere göre daha yavaş bir ilerleme göstermektedir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde yüz, dudaklar, dil ve çenede de tremor görülebilir. Tremor gün içinde değişen şiddetlerde aralıklı olarak ortaya çıkar, uyku durumunda kaybolup stres durumlarında artar.

2.1.2.2. Rijidite (Kas Katılığı)

Hastanın ekstremitelerde, boyun ve gövdesinin pasif hareketi sırasında hissedilen artmış dirençtir. Diğer bir ekstremitenin istemli ve aktif hareketi sırasında muayene edilen ekstremitenin rijiditesi artış göstermektedir. Tüm kas gruplarında (ekstremitelerde, aksiyel, fleksör, ekstansör) görülebilir. Rijidite istemli hareket hızını sınırladığı halde rijiditesi olan bazı hastalar motor işlevlerini rahat bir şekilde sürdürebilir.

2.1.2.3. Bradikinezi (İstemli Hareketlerde Yavaşlama)

Bazal ganglion fonksiyon bozukluğunun en karakteristik belirtisidir [58]. Motor aktivitenin azalması (hipokinezi ile başlayan PH, hastalığın ilerleyen zamanlarında bradikineziye, oradan da akineziye (hareket edememe) dönüşür. Akinezinin şiddeti hastalığın ilerlemesi ile doğru orantılı olarak artar. Bradikinezi ile birlikte assosiyasyon ve sinerjistik hareketler de bozulmaktadır.

2.1.2.4. Postural Bozukluk

PH'nin ilerleyen dönemlerinde hastalarda var olan dengesizliği düzeltmek ve ortadan kaldırmak için ekstremiteler ve gövde gerekli düzenlemeleri yapamaz ve böylece postur bozukluğu ortaya çıkar. Kambur bir postur ve denge kaybıyla karakterize edilebilir [47].

2.1.2.5. Demans (Bunama)

Demans PH'nin motor olmayan belirtilerinden biridir. Etkili bir semptomatik tedavisi bulunmamaktadır. Aarsland ve arkadaşları [61] PH hastalarının %28'inde demans görüldüğünü tespit etmiştir. Yaşla beraber prevalansı artmakta olup 85 yaş üstü hastaların %65'inde demans bulgularına rastlanmıştır [62].

2.1.2.6. Depresyon

Mayeux ve arkadaşlarının [63] yaptığı araştırmaya göre Parkinson hastalarının %47'sinde depresyon görülmüş olup, demans belirtileri gösteren hastalar arasında major depresyonun daha fazla izlenebileceği belirtilmiştir [61].

2.1.3. Parkinson Hastalığının Nöroanatomik Mekanizmaları

Bazal ganglion; SN, striatum (kaudat ve putamen), globus pallidus (GP), subtalamik nükleus (STN) ve talamusu içine alan ekstrapiramidal bir sistemi ifade etmektedir.

Prefrontal motor alandan bazal ganglion kortikal inputta amigdala ve hipokampus eksitatorydür ve bunu nörotransmitter glutamat aracılığı ile yapmaktadır. SNpc'deki nöronlar striatuma majör dopaminerjik inputu sağlamaktadır ve striatal output nöronlarda hem inhibitör hem de eksitatory etki göstermektedir. Afferent ve efferent yollar arasındaki etkileşim ana nörotransmitter olarak asetilkolini kullanan striatal internöronlar aracılığıyla olmaktadır.

Striatal output sistem, inhibitör nörotransmitter olan gama-amino-bütirik-asit (GABA) aracılığıyla olmaktadır. STN ve internal (medial) globus pallidus (GPi) arasında ayrıca STN ve lateral (eksternal) globus pallidus (GPe) arasındaki bağlantı eksitatorydür ve glutamat aracılı gerçekleşmektedir.

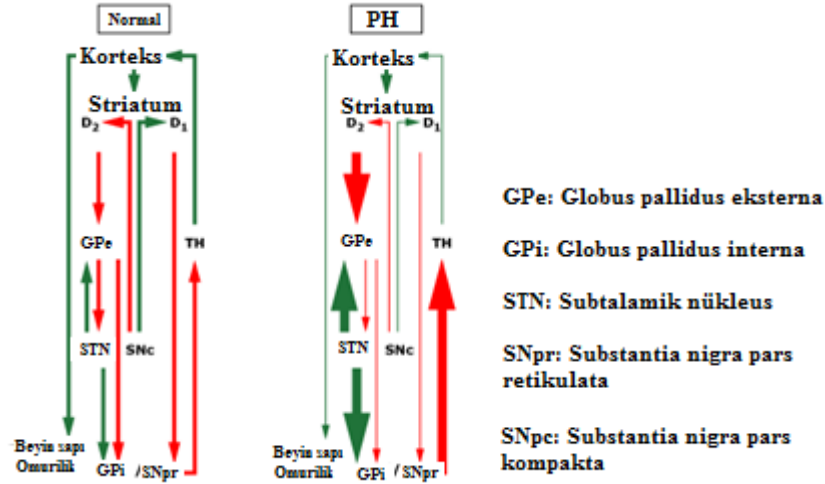
Bu zamana kadar limbik sistem ve bazal ganglion boyunca bulunan beş farklı dopamin reseptörü (D1-D5) klonlanıp karakterize edilmiştir. D1 ve D2 reseptörleri dorsal (motor) striatuma çok fazla bulunuyor olup PH'nin patofizyolojisi ile en ilişkili olanlardır. Çünkü kaudat ve putamende sonlanan ve SNpc'den kökenlenen dopaminerjik yolak ile aktive olmaktadır. D3 ve D4 reseptörleri beynin mesolimbik ve emosyonel bölümünde daha yoğun olarak bulunurken D5 hipokampus/hipotalamusta daha yüksek miktarda bulunmaktadır [64].

PH'de görüldüğü gibi nigrostriatal yolaktaki dopamin yetersizliği D1 ve D2 reseptörlerinin hipersensitivitesinde bozulmaya yol açmaktadır [65]. Kontrollerle kıyaslandığında dorsal putamendeki D2 reseptörleri Parkinson hastalarında %15 oranında artmışken, mezolimbik sistemdeki D3 reseptörleri %40-45 oranında azalmıştır [66]. Bu sonuçlar PH'de gözlemlenen nigrostriatal (D2) dopaminerjik reseptörlerin hipersensitivitesinin temelini açıklamaktadır.

Şekil 2.2'de görüldüğü gibi striatundan çıkan 2 output yolak bulunmaktadır: İndirekt yolak genellikle striatal D2 dopamin reseptörlerinde dopaminin inhibitör etkisi aracılığı ile olmaktadır. İndirekt yolakta, striatum GABA'dan yararlanarak eksternal GP (GPe)'deki nöronlara yansıtmakta iken dönüşte GPe STN'ye yansıtmaktadır. Sonuç olarak substantia nigra pars retikulata (SNpr) ve GP (GPi)'nin internal segmentine glutamat aracılığıyla eksitatory input sağlanmaktadır. GPi nöronları GABAerjik nöronlardır ve

talamusun ventrolateral nükleuslarında sinaps yapmaktadır. Korteksteki talamik inputlar ise eksitatördür.

Direkt yolak striatal D1 dopamin reseptörlerinde dopaminin eksitatör etkisi aracılığıyla olmaktadır. Direkt yolakta striatumdaki nöronlar direkt olarak GPi ve SNpr'ye projekte olmaktadır.



Şekil 2.2. Bazal Ganglion Fonksiyon Bozukluğu Modeli

PH'de nigrostriatal yolaktaki kaudat ve putamende ve SN'de dopamin üreten nöronların azalması dopamin depleksiyonuna neden olmaktadır. Bu, dönüşte indirekt yolağın aktivitesinin artmasına ve fonksiyonel olarak STN'de inhibisyonun ortadan kalkmasına yol açmaktadır. Direkt yolağın inhibisyonunun azalması output nükleusta ek inhibisyonun ortadan kalkmasına sebep olmaktadır. GPi'den artan output talamusun inhibisyonunda artışa ve motor kortekste eksitatör inputun azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak bradikinezi ve diğer PH belirtilerinin oluşmasına sebep olmaktadır.

Beyin presinaptik dopamin depleksiyonunu kompanse etmek için yaşayan nöronlarda dopamin sentezini artırır. Ayrıca, dopaminerjik denervasyon D2 reseptörlerinin proliferasyonu ve D1 ve D2 reseptörlerinin birlikte lokalize olmasıyla sonuçlanmaktadır [66]. Benzer şekilde, dopaminerjik denervasyondan sonra striatal nöronlar arasındaki hızlı iletişime izin veren gap junction'ların arttığı da görülmüştür [68].

Parkinson hastalarının beyinlerinde striatumdaki tirozin hidroksilaz (TH) ile boyanan nöronların sayısı kayda değer şekilde azalmaktadır [69]. Çünkü tirozin hidroksilaz dopamin sentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir ve yaşayan nöronlarda bulunmaktadır. Dopamin (DA) sentezi striatal nöronlarda artar, böylece presinaptik dopamin kaybı kompanse edilmiş olur [70-71]. Diğer kompanzasyon mekanizması ise dopamin taşıyıcılarının azaltılmasına bağlı olarak dopamin geri alınımı azalması ve sinaptik dopamin seviyesinin yükselmesidir [72].

2.1.4. Parkinson Hastalığı Patogenezi

PH'nin patogenezi SNpc'deki dopaminerjik nöronların ölümünde proteinlerin yanlış katlanması ve bunların agregasyonu, oksidatif stres, nöroinflamasyon, demir metabolizması ve apoptozun etkili olduğu düşünülmektedir [4-7].

2.1.4.1. Protein Yanlış Katlanması ve Agregasyonu

Hücrel protein homeostazisi moleküler şaperonlar, ubiquitin-proteazom yolağı ve otofaji-lizozomal yolağın koordineli bir şekilde çalışması ile yürütülmekte olup, yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılması veya tamiri ile gerçekleşmektedir [73]. Bu yolların bozulması veya inhibisyonu sonucu mutasyona uğramış α -sinüklein gibi hatalı katlanan proteinler agregat oluşturabilir ve hücre içindeki moleküler trafiği engelleyerek hücre ölümüne neden olabilir.

PH, demir iyon birikimi hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda α -sinüklein geninde meydana gelen mutasyon hücre ölümüne sebep olmaktadır. Merkezi sinir sistemindeki proteinlerin yüzde birini oluşturan α -sinüklein proteinin fizyolojik rolü henüz bilinmemekle birlikte, α -sinüklein birikiminin PH hastalığı patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir.

α -sinüklein (SNCA) genindeki mutasyon α -sinüklein proteininin yanlış katlanmasına, proteinin sekonder yapısının değişmesine ve ubiquitin ile işaretlenerek proteazomal degradasyona maruz kalmasına yol açmaktadır [74]. Yanlış katlanmış ve çözünmeyen protein agregatları gen ürününün anormal bir yapı kazanması ile olabileceği gibi yaşla ilişkili deformasyon sonucu da oluşabilmektedir [75]. Ayrıca α -sinüklein protein agregatları PH patolojik belirteçlerinden olan hücre içi inklüzyonlar olan Lewy cisimciklerinin bir komponentidir [76].

SNCA'nın hidrofobik kısmı fibriler protein agregatlarının şekillendirerek SNCA protoagregat veya oligomerlerini oluştururlar. Bu protoagregatlar dopamin vezikülü ve mitokondri membranı gibi membranlara zarar vermenin yanı sıra hücre membranında por oluşumuna sebep olmaktadır. Ayrıca bir çalışmada SNCA'nın protofibriler formunun fibriler formundan daha toksik olduğu gösterilmiştir [77].

Parkin, Pink1 ve DJ-1 (PARK7) proteinleri yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin degradasyonunu gerçekleştirmek amacıyla ubiquitin- proteazom sistem aracılığı ile birbirine bağlanarak bir kompleks şekillendirmektedir [78].

2.1.4.2. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu

Mitokondriler, solunum ve oksidatif fosforilasyon işlemi üzerinden Adenozin tri fosfat (ATP) üretmektedir ve böylece hücredeki enerjinin primer kaynağı olarak rol oynar. Oksidatif fosforilasyon mitokondri iç membranında hem redoks hem de fosforilasyon reaksiyonlarını içeren ve sonuç olarak etkili bir şekilde ATP sentezi sağlayan reaksiyondur. Bu işlem sırasında, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve flavin adenin dinükleotit (FADH₂)'den elektronlar kompleks I ve IV'ü içerecek şekilde iç mitokondri membranına doğru proton gradienti oluşturmak için elektron taşıma zincirine (ETS) transfer edilir. Mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa protonların hareket etmesiyle elektrokimyasal bir gradient oluşturulur. Bu elektrokimyasal gradient bir pH ve elektriksel gradientten oluşmaktadır. Bu gradientler ATP sentaz (kompleks V) enzimi aracılığıyla ADP (Adenozin di fosfat)'den ATP sentezini sağlar.

Mitokondri hücre içi oksidatif strese katkıda bulunan reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır [79]. Oksidatif fosforilasyon işleminde kompleks I (NADH-quinon oksidoredüktaz) mitokondriyal matriksten ETS içine elektronlar için bir giriş noktası oluşturur. ETS'de kompleks I ve kompleks III'ün küçük bir kısmının mitokondride ana reaktif oksijen türleri (ROS) üretim bölgesi olduğu düşünülmektedir. Süperoksit radikali solunum zincirinde oksijene tek bir elektron transfer edilerek oluşturulan mitokondrideki temel ROS'tur. Süperoksit dismutaz (SOD) veya manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) süperoksit radikalini hidrojen peroksit (H₂O₂)'e dönüştürmektedir. Fe²⁺ gibi metal iyonları bulunması durumunda hidrojen peroksit Fenton reaksiyonu sonucu çok reaktif hidroksil

radikaline çevrilebilir. Oluşan radikal hücrel komponentlerde oksidatif hasara sebep olabilir. Mitokondriyal kompleks I'de aşağıda belirtilen durumlar süperoksit radikali üretimine neden olmaktadır: [79]

- (i) azalmış koenzim Q havuzu, düşük ATP üretimi
- (ii) mitokondriyal matrikste yüksek NADH/NAD⁺ oranı.

Diğer yandan normal ATP üretimiyle mitokondriyal matrikste düşük NADH/NAD⁺ oranı oluşmakta ve süperoksit radikali üretilmektedir. Yukarıdaki şartlara ek olarak, kompleks I'de ROS oluşumu ters elektron taşıma işlemi sırasında önemli derecede artmaktadır. Ters elektron taşınımı ubiquinon havuzunda bir indirgenme olduğunda meydana gelmektedir [80].

ROS üretimine neden olan artmış endoplazmik retikulum stresi, PH'de dopaminerjik nöronların ölümüne neden olan ilk faktördür. Mitokondriyal kompleks I ROS'un primer kaynağıdır. İdiopatik PH'li hastaların postmortem substantia nigralarında protein seviyesi ve mitokondriyal kompleks I aktivitesindeki hastalık-spesifik indirgenme uzun zamandan beri bilinmektedir [81-82]. Parker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Parkinson hastalarının frontal korteksinde mitokondriyal kompleks I eksikliği olduğu gösterilmiştir [83]. Yine Parkinson hastalarının striatumunda [84], kortikal beyin dokusunda [83], fibroblastlarında [85], kan plateletlerinde [86-87], iskelet kasında [88] ve lenfositlerinde [89] kompleks I eksikliği veya kompleks I katalitik alt biriminin okside protein içerdiği tespit edilmiştir [90]. Parkinson hastalarının serebrospinal sıvılarında okside koenzim Q-10 ve 8-hidroksi-2'deoksiguanozin (8-OHDG) seviyesinin önemli derece yüksek olması PH patolojisinde oksidatif deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı ve mitokondriyal oksidatif hasarın rolü olduğunu göstermektedir [91]. Ayrıca, sporadik Parkinson hastalarının mitokondriyal DNA'larını içeren sitoplazmik hücre hatlarında kompleks I aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür [92].

Dopaminerjik nöronlar rotenon, 1-metil-4-fenil piridin (MPP⁺), paraquat gibi toksinlere oldukça duyarlıdır. Bu toksinler dopaminerjik hücrelerin ölümünü indüklemektedir ve kompleks I aktivitesindeki eksiklik bu toksinlere karşı hücreleri koruyamamaktadır. Bu toksinlerin kompleks I sistemi üzerine etkisinin yanı sıra mikrotübüller üzerine de etkisi olduğu bulunmuştur [93]. Bu bilgiler kompleks I eksikliğinin diğer toksik faktörlerin bulunması durumunda dopaminerjik nöronların ölümüne katkıda bulunduğunu göstermektedir.

2.1.4.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres hipotezi oluşan ROS üretiminin nörodejenerasyona sebep olduğunu öne sürmektedir [94]. İntranöronal nöromelanin katekolamin metaboliti, pestisit ve diğer oksidanların toksik birikimini önlemenin yanı sıra ölen nöronlardan serbest kalarak da kronik inflamasyona neden olmaktadır. Bu metabolik yollar hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyonları (O₂⁻) ve hidroksil radikalleri (OH⁻) oluşturarak membran lipidleri ile etkileşime girerler ve lipid peroksidasyona sebep olurlar. Nörotoksositeye sebep olan bu oksidatif ürünler PH gelişiminde önemli bir role sahiptir [94].

Buna ek olarak artan oksidatif stres proteinlerin yanlış katlanmasına da katkıda bulunmaktadır. Bunu PH beyinlerinde yüksek miktarda bulunmakta olan serbest bir radikal olan nitrik oksit, normalde proteinlerin taşınmasından sorumlu olan ve endoplazmik retikulumda lokalize olan agregasyon-önleyici bir şaperon protein olan disülfit izomeraza saldırarak yapmaktadır [95].

2.1.4.4. Apoptoz

Apoptoz, “programlanmış hücre ölümü” olarak tanımlanan farklı morfolojik karakteristikle tanımlanmış enerji bağımlı bir biyokimyasal mekanizmadır. Apoptoz normal hücre döngüsü, immün sistem fonksiyonu, embriyonik gelişim ve kimyasal bağımlı hücre ölümü gibi yollarda önemli bir bileşen olarak görev yapmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün hastalıklar ve bazı kanser tiplerini içeren durumlarda ise ya çok az veya çok fazla apoptoz görülmektedir [96-97].

İlk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılan apoptoz kelimesi daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla programlanmış hücre ölümü tanımını içine almıştır [98]. Çok kompleks ve enerji bağımlı bir moleküler olay olan apoptoz, esas olarak birbirleriyle bağlantılı olan iki ana yoldan oluşmaktadır. Bunlar dışsal yolak ve içsel yolak diye tanımlanmıştır.

İçsel yolak

Apoptozu başlatan içsel yolak reseptörlerden bağımsız olup hücre içi sinyaller tarafından başlatılır ve direkt olarak hücre içindeki hedefleri ve mitokondri başlangıçlı olayları uyarır. Bu sinyaller hormonlar ve sitokinler gibi apoptotik baskılanmayı kaldıran negatif sinyaller olabileceği gibi radyasyon, toksinler, hipoksi, serbest radikaller, viral enfeksiyonlar ve hipertermi gibi pozitif özellikte sinyaller de olabilir. Bu uyarıların tümü mitokondrinin iç membranındaki porların açılmasına neden olarak mitokondride transmembran potansiyellerin bozulmasına yol açar. Buna bağlı olarak iki grup pro-apoptotik protein membranlar arası boşluktan sitozole çıkar [99]. Sitokrom c, İkincil mitokondri türevli kaspaz aktivatörü (Smac)/apoptozu inhibe eden proteinler (IAP)'i- bağlayıcı mitokondriyal protein (DIABLO) ve serin proteaz HtrA2'den oluşan bu proapoptotik proteinler kaspazlara bağlı mitokondriyal yolağı aktifleştirir [100]. Sitokrom c prokaspaz-9'a bağlanmanın yanı sıra apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1)'ü de aktifleştirerek apoptozomu şekillendirmektedir [101-102]. Smac ve HtrA2 apoptozu inhibe eden proteinleri (IAP) baskılayarak apoptozu neden olmaktadır [103].

İkinci grup proapoptotik proteinler olan apoptozu indükleyen faktör (AIF), endonükleaz G ve kaspaz ile aktive olan DNAaz (CAD), apoptozun ilerleyen aşamalarında mitokondriden serbest kalmaktadır. AIF nükleusa geçip DNA'yı yaklaşık 50-300 kilobazlık parçalara ayırırken endonükleaz G de nükleusa geçerek nükleus kromatini parçalamaktadır [104]. Bu iki protein kaspazdan bağımsız çalışırken CAD, mitokondriden serbest kaldıktan sonra kaspaz 3 tarafından ayrılır ve nükleusa geçerek DNA fragmentasyonu ve kromatin kondensasyonuna neden olmaktadır [105].

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilmektedir [106]. Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederken aynı zamanda hem proapoptotik hem de antiapoptotik özellik göstermektedir. Bugüne kadar bu aileye ait 25 gen karakterize edilmiş ve bu gen ürünlerinden bazıları (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-W, BAG) antiapoptotik özellik; bazıları ise (Bax, Bcl-10, Bid, Bad, Bim, Bik) proapoptotik özellik göstermektedir. Bu proteinler apoptozun sürdürülmesinde veya durdurulmasında görev aldığı için özel bir öneme sahiptir [106].

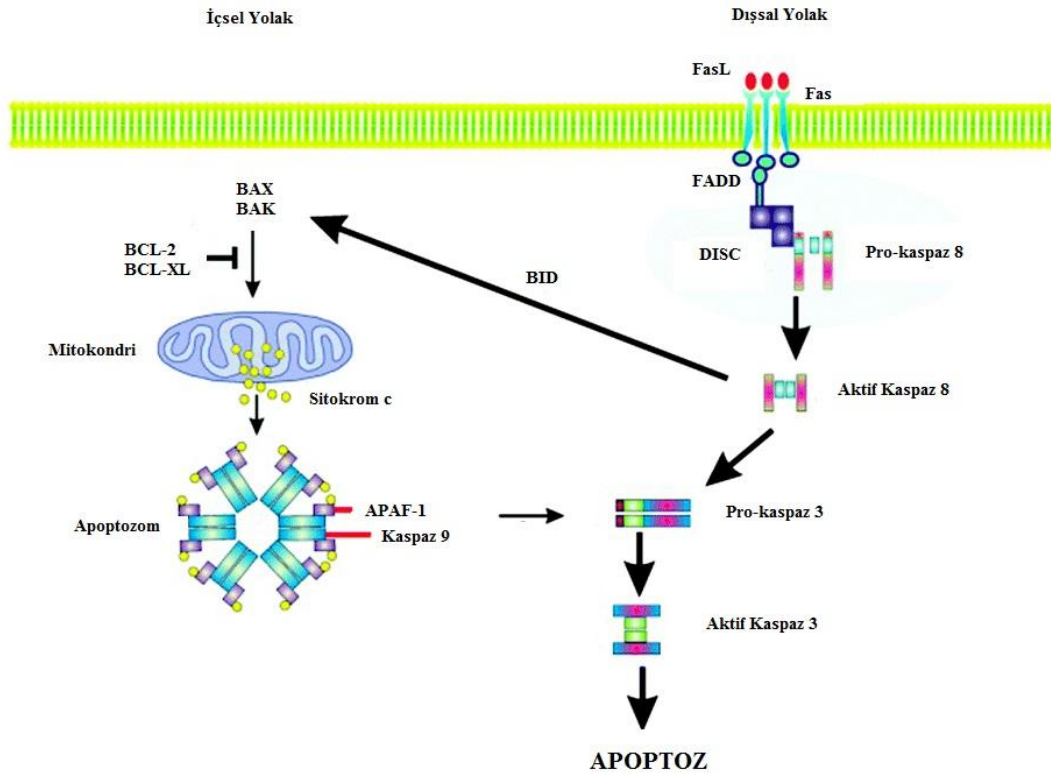
Oksidatif stres koşulları altında Bcl-2 homology domain 3 (BH3) domainine sahip Bcl-2 ailesi üyeleri Bcl-2 ve B cell lymphoma- extra large (Bcl-XL) ile heterodimerleşerek proapoptotik özellik gösteren Bcl-2 associated X protein (Bax) ve Bcl-2 antagonist killer (Bak) proteinlerini aktifleştirir. Bu proteinler sitoplazmadan mitokondriye lokalize olarak membran geçirgenliğini bozmakta ve mitokondriden sitokrom c'nin salınmasını sağlamaktadırlar [107]. Sitokrom c Apaf-1'e bağlanarak kaspaz 9 ile bir kompleks

şekillendirmektedir. Bu kompleks de diğer kaspazları aktifleştirerek hücrel ölüm yol açmaktadır [108].

Dışsal yolak

Dışsal sinyal yolağında apoptoz, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesinden olan transmembran reseptör aracılı etkileşimlerle başlamaktadır [109]. TNF reseptör ailesi üyeleri sisteyince zengin ekstrasellüler bir domain ve yaklaşık 80 amino asitten oluşan sitoplazmik bir “ölüm domaini”nden oluşmaktadır [110]. Bu ölüm domaini hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yolaklarına ölüm sinyalinin iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar en iyi karakterize edilen ligandlar ve reseptörleri Fas ligand (FasL)/Fas reseptör (FasR), TNF- α /tümör nekrozis faktör reseptör 1 (TNFR1), tümör nekrozis faktör ligand superfamily (Apo3L/Apo2L)/ tümör nekrozis faktör reseptör superfamily (DR3/DR4/DR5) olmuştur [111-113].

Bu yolda hücre dışından gelen sinyal molekülleri (TNF- α , FasL) reseptörüne (TNFR, FasR) bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks Fas bağımlı ölüm domaini (FADD) proteinine bağlanarak inaktif kaspaz-8'i kendine bağlar. Oluşan bu yapıya “Ölüm indüklü sinyal kompleksi” (DISC) denmektedir ve bu kompleks kaspaz-8'i aktive etmektedir. Aktifleşmiş kaspaz-8 proapoptotik bir protein olan BH3 interacting domain death agonist (Bid)'i bir membran hedefli ölüm ligandı olan tBid'e dönüştürerek mitokondrinin dış zarında diğer proapoptotik proteinlerle beraber por oluşturmaktadır [114]. Bundan sonra gerçekleşen olaylar içsel yolaktaki kaspazların aktive olması ile aynıdır.



Şekil 2.3. Hücre Ölümü Yolakları

Deneysel Parkinson oluşturulan hayvan modellerinde hastalığın patofizyolojisinde apoptozun önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tekrarlı MPTP enjeksiyonu ile oluşturulan

modelde, ventrotegmental alan'ın bir bölgesine enjekte edilerek oluşturulan 6- hidroksi dopamin (6-OHDA) modelinde ve kompleks I'in inhibe edildiği rotenon uygulamasında ATP üretimi azalmakta ve mitokondride meydana gelen ROS artmaktadır.

6-OHDA'nın intraserebral enjeksiyonu dopaminerjik nöronların ölümüne neden olmaktadır [115]. Buna ek olarak SN'de tirozin hidroksilaz (TH) immunoreaktivitesinde de hücre kaybı söz konusudur [116]. Ayrıca 6-OHDA ile Parkinson modeli oluşturulmadan önceki bir hafta boyunca Bcl-2 üreten vektörün SN'ye enjeksiyonu, lezyondan sonra SN'de nöronal sağ kalımın artmasını sağlamıştır [116].

SN'de dopaminerjik nöronların seçici dejenerasyonu ve yanı sıra DNA fragmantasyonuna neden olan MPTP ile oluşturulan Parkinson modelinde ise SNpc'de Bax mRNA ve protein seviyesinde önemli bir artış söz konusudur [118-119]. Bax knock out fareler yabancıl tipleri ile karşılaştırıldığında Bax olmayan hayvanların MPTP toksisitesine dirençli olduğu görülmüştür [118]. Bax'ın ekspresyonunun artmasına ters olarak bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin ekspresyonu ventral orta beyinde azalma göstermektedir [118].

Sonuç olarak MPTP enjeksiyonu ile oluşturulan Parkinson modellerinde apoptotik hücre ölümü gerçekleşmekte ve buna bağlı olarak Bax'ın ekspresyonunun artması ve Bcl-2'nin de ekspresyonunun azalması gerçekleşmektedir.

2.1.4.5. Demir Metabolizması

Demir, oksidatif metabolizmada kritik bir rol oynamanın yanı sıra nörotransmitterlerin sentezinde kofaktör olarak görev yapmaktadır [120]. Anormal demir metabolizması PH beyinlerinde kontrol gruplarına oranla %50 artış göstererek PH gelişimine katkıda bulunmaktadır [121-122]. Bir mikrotübül ilişkili protein olan Tau proteini eksik olan farelerde toksik demir birikimi ve substantia nigra'da nöron kaybı gerçekleşmektedir [123].

2.1.4.6. İnflamatuar Mekanizma

Proinflamatuar sitokinlerden olan TNF- α , interlökin1-beta (IL-1 β) ve interferon gama (IFN- γ)'nın PH beyinlerinde ekspresyonunun artması PH patogeneziinde inflamatuvar mekanizmanın bulunduğunu göstermektedir [124-125]. PH oluşturulmuş fare modellerinde nöronal hücre ölümüne CD4+ T hücrelerinin infiltrasyonu katkıda bulunmaktadır [126]. Ayrıca PH'daki mikroglial aktivitenin dopamin taşıyıcıların yoğunluğunun azalması ile ilişkili olduğu pozitron emisyon tomografi (PET) ile mikroglia ve dopamin taşıyıcıları markerları kullanılarak belirlenmiştir [127].

2.1.4.7. Genetik

Parkinson hastalığı çevresel ve genetik faktörlerin etkileşime girdiği bir hastalıktır ve PH olgularında hastalığın patogenezi ile ilgili genlerde önemli mutasyonlar bulunmasına rağmen olguların yaklaşık %15'i ailesel PH ile ilişkilidir. Bu durum olguların çoğunluğunda hastalığın sporadik (kalıtsal faktörlerden bağımsız) olarak gerçekleştiğini ve hastalığın patogeneziindeki diğer mekanizmaların etkisinin fazla olduğuna işaret etmektedir.

SNCA (Sinüklein)

SNCA otozomal dominant Parkinson hastalığına sebep olan bir genidir. Bu mutasyon sonucu oluşan Parkinson hastalığı 50 yaş öncesinde görülmeye başlamaktadır ve levodopa ilaç tedavisine olumlu yanıt vermektedir. Ona rağmen bu hastalık hızlı ilerlemekte ve sıkça demans, nadiren de merkezi hipoventilasyon ve myoklonus gibi atipik özellikler göstermektedir. Lewy cisimcikleri SN'de, locus ceruleus, hipotalamus ve serebral korteks boyunca yayılmaktadır [128].

LRRK2 (PARK8)

LRRK2 geninde gerçekleşen mutasyon sonucu oluşan PH en sık görülen geç-çıkışlı otozomal dominant ve sporadik hastalıktır [129]. Klinik olarak LRRK2-bağlantılı PH orta-geç çıkışlı, yavaş ilerleyen, levadopa terapisine yanıt veren hastalardan oluşan, demansın yaygın olmadığı bir modeldir. Nöropatolojik bulguları oldukça değişkendir. Hem Lewy cisimciği hem de Lewy cisimciği olmaksızın nigral dejenerasyon gerçekleşmektedir [130].

Parkin (PARK2)

Parkin geninin mutasyona uğraması sonucu oluşan PH, hastaların otuzlu kırklı yaşlarında görülmekle birlikte yavaş ilerleyen ve dopaminerjik tedaviye mükemmel sonuç veren bir türdür. Parkin'in klinik fenotipi PINK1, DJ-1-ilişkili Parkinson hastalığı fenotipine oldukça benzemenin yanı sıra postmortem çalışmalarda SN'de Lewy cisimciği olmaksızın nöronal kayıp ve gliosis görülmektedir [131].

PINK1 (PARK6)

PINK1, 581 amino asitten oluşan protein kinaz kodlayan bir genidir. Amino terminalinde 34 amino asitlik mitokondriyal hedef motifi, korunmuş bir serin-threonin kinaz domaini ve karboksil terminalinde de otoregülatör bir domain içermektedir [132].

DJ-1 (PARK7)

DJ-1 ilişkili sorun PH'nin en nadir görülenidir. DJ-1 geninin yedi ekzonluk bölümünden kodlanan 189 amino asit uzunluğundaki protein, oksidatif stresin hücrel sensörü olarak fonksiyon göstermektedir [133]. DJ-1 proteini fizyolojik şartlar altında dimerik yapı oluşturur. Mutasyona uğradığında ise hatalı katlanan, stabil olmayan ve hızlıca proteazomlardan yıkılan bir protein oluşmaktadır. Sonuç olarak nöroprotektif fonksiyonu ve antioksidan aktivitesi azalmaktadır [134-135].

ATP13A2 (PARK9)

ATP13A2 geninde meydana gelen nokta mutasyon Kufor-Rakeb sendromuna neden olmaktadır. Bu sendrom ergenlik başında hızlı bir ilerleme gösteren, demansın eşlik ettiği bir sendromdur. ATP13A2, 29 ekzondan oluşan 1180 amino asitlik protein kodlayan bir genidir. Bu protein lizozomal membranda lokalize olmakla birlikte 10 transmembran protein ve bir ATPaz domaininden oluşmaktadır. Bu gende meydana gelen mutasyon uçları kesilmiş stabil olmayan protein oluşumuna neden olup bu protein endoplazmik retikulumdan sonra proteazomlarda parçalanmaktadır [136].

2.1.5. Parkinson Hastalığı Hayvan Modelleri

2.1.5.1. Toksin Temelli Modeller

Dopaminerjik nöron dejenerasyonunun indüklenmesinde 6-hidroksidopamin (6-OHDA), MPTP, paraquat ve rotenon gibi nörotoksinler kullanılmaktadır.

MPTP

1970'lerin sonunda Amerika'da bir grup eroin kullanıcısı tarafından intravenöz olarak kullanılan akut ve geri dönüşümsüz parkinsonizme sebep olan ve yasa dışı olarak üretilen bir ilaçtır. Daha sonraları bunun meperidin analogunun sentezinde bir yan ürün olan MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) olduğu ve nörotoksik etkileri bulunduğu tespit edilmiştir [137]. Bu kişilerden birinin Lewy cisimcikleri olmaksızın SNpc'de dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve buna bağlı olarak Parkinson semptomlarının görülmesinin ardından iki yıl sonra öldüğü rapor edilmiştir [137]. Benzer gözlemler MPTP'nin parkinsonizm gelişimine yol açtığı ve böylece MPTP toksisitesine maruz kalan hastaların 3-16 yıl arasında öldüğü fark edilmiştir [138]. Yine çeşitli hayvan türlerinde

MPTP'nin sporadik PH semptomları oluşturduğu, primatlarda ise bu klinik ve patolojik semptomların tümünün görülmediği [139-142], farelerde ise dopaminerjik nöronların en az dejenerasyona uğradığı [143] belirtilmiştir.

Nöropatolojik çalışmalarla eş zamanlı olarak MPTP'nin moleküler mekanizması yoğun bir şekilde çalışılmıştır. MPTP glial hücrelerdeki monoamin oksidaz (MAO) ile lipofilik MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinium)'ye oksidize olarak kan beyin bariyerini aktif olarak geçebilir [144-145]. MPP⁺ dopaminerjik nöronlardaki dopamin transporterı (DAT) ile dopaminerjik nöronlara alınır ve mitokondrielerde biriktirilir. MPP⁺ elektron taşıma sistemindeki mitokondriyal kompleks I' i inhibe etmekte ve ATP üretimini azaltmakta, ROS oluşumunu arttırmaktadır. Sonuç olarak elektron akışını bozmaktadır [146-149]. Nöronal hücre ölümüne yol açan kompleks I inhibisyonunun nasıl olduğu henüz tamamen anlaşılmaş olup, mitojen aktivating protein kinaz (MAPK), Bcl-2 ailesi üyeleri, p53, kaspazları içeren proapoptotik yolağın olabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [148]. Kompleks I inhibisyonuna ek olarak MPTP, *in vitro*'da hücrel oksidatif stresi arttırarak mitokondriyal kompleks III ve IV' i inhibe etmektedir [150]. Ayrıca, MPP⁺ uygulaması *in vitro*'da mitokondriyal gen ekspresyonunu ve mitokondriyal aktiviteyi azaltırken; *in vivo*'da MPTP uygulaması sonrası benzer şekilde azalmış tirozin hidroksilaz ve mitokondriyal gen ekspresyonu görülmektedir [151]. MPTP'nin subtoksik konsantrasyonlarda hücrelere uygulanması şaperonlar, metabolik enzimler, oksidatif fosforilasyon-ilişkili proteinler, iç mitokondriyal protein (mitofilin) ve dış mitokondriyal protein 1 (VDAC1) gibi mitokondriyal proteinlerin değişimine sebep olduğu karakterize edilmiştir [152]. Bir diğer çalışmada beyindeki farklı bölgelerin total proteom analizi yapıldığında 518 protein ekspresyonunun MPTP sonrası fare beyinde değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Bunların arasında nigrostriatal yolak ile ilişkili 270 proteinin substantia nigrayı içeren beyin bölgesinde ve sadece striatumda değiştiği görülmüştür. Bu değişen proteinlerin mitokondriyal disfonksiyon, dopamin sinyali, ubiquitin sistem, kalsiyum sinyali, oksidatif stres cevabı ve apoptoz ile ilişkili olduğu görülmüştür [153]. Bu bulgularla uyumlu olarak MPTP *in vivo* DNA hasarına sebep olmaktadır [154]. Sonuç olarak MPTP nörotoksite ve nigrostriatal dopaminerjik nöronların kaybına yol açan mitokondriyal bozulmaya neden olmaktadır. Bu mekanizmaların PH'nin patolojik işlemine katkıda bulunup bulunmadığı belli değildir. Hatta MPTP toksisitesinden hem *in vitro*'da hem de *in vivo*'da dopaminerjik nöronları etkili bir şekilde koruyabileceği gösterilse de bunun klinik çalışmalarda PH'de nöroprotektif olarak kullanılmasına geçilmemiştir [155].

MPTP Metabolizması ve Parkinson Hastalığı Dejenerasyonu Seçiciliği

MPTP sistemik olarak alındığında yüksek lipofilik yapısıyla dakikalar içinde kan beyin bariyerini geçer [145]. Beyine geçer geçmez pro-toksin olan MPTP sadece glia ve serotonerjik nöronlarda bulunan monoamin oksidaz B enzimi ile (MAO-B) 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium'a (MPDP⁺) okside olur. Ardından MPDP kendiliğinden gerçekleşen bir oksidasyon reaksiyonu ile aktif toksik molekül olan MPP⁺'ye dönüşür. MPP⁺, DAT için yüksek afiniteli bir substrattır (ayrıca nörepinefrin ve serotonin taşıyıcısıdır) [156-157]. DAT'ın genetik delesyonu veya farmakolojik inhibisyonu MPTP'nin oluşturduğu dopaminerjik hasarı önlemektedir [156, 158].

Nöron içinde MPP⁺ 3 yol izler:

(1) veziküler monoamin transporter-2 (VMAT2)'ye bağlanarak sinaptosomal veziküller içine transloke olur [159].

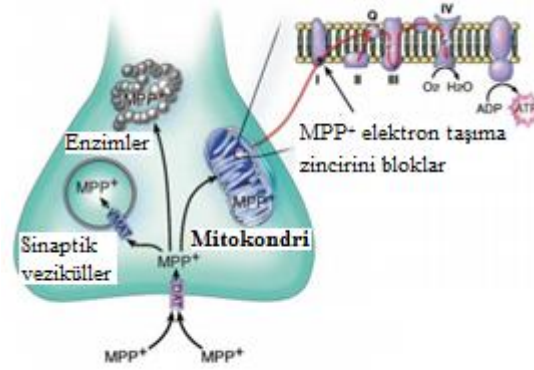
(2) mitokondriyal transmembran proteinleri ile mitokondri içinde konsantre edilir [160].

(3) sitozolde kalarak negatif yük taşıyan sitozolik enzimlerle etkileşime girer [161].

MPP⁺'nin veziküler taşınımı ve depolanması, mitokondri içine toksinin girmesini engelleyerek MPTP-bağımlı nörodejenerasyondan hücreyi korur. Yapılan bir çalışmada VMAT2 ekspresyonu olmayan heterozigot farelerin MPTP-bağımlı nörodejenerasyona hassasiyetlerinin arttığını gösterilmiştir [162].

MPP⁺ mitokondri içine girer girmez mitokondriyal ETS'nin kompleks I'ini inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozmaktadır [163]. Bu engelleme striatum ve orta beyin gibi MPTP'ye en hassas olan beyin bölgelerinde doku ATP içeriğinde düşüşe yol açmaktadır [147, 149]. Tüm beyinden izole edilen mitokondri deneylerinde kompleks I'in yaklaşık %70'inin inhibe olduğu [164]; Parkinson hastalarından elde edilen post mortem dokularda ise bu oranın %40 olduğu gösterilmiştir [81].

Kompleks I inhibisyonuna neden olan MPP⁺ kompleks I'deki elektron akışını bozarak oksidatif strese neden olmaktadır. MPP⁺, süperoksit gibi ROS'ların üretimini de uyarmaktadır [146, 165].



Şekil 2.4. MPP⁺'nin Hücre İçi Yolağı

6-Hidroksidopamin (6-OHDA)

6-OHDA, SN'deki dopaminerjik nöronların ölümüne neden olan, kan beyin bariyerini geçemeyen bir toksindir [166]. PH'den farklı bir patoloji oluştursa da yaygın olarak kullanılmaktadır. 6-OHDA seçici olarak monoaminerjik nöronlar üzerinde toksik etki oluşturur. Tuberoinfundibular nöronlar bu toksine tamamen dirençli iken en çok nöron kaybı substantia nigra da görülmektedir. Nöronların içinde 6-OHDA sitozolde birikir, ROS meydana getirir ve nükleofilik gruplara saldıran quinonları oluşturarak biyolojik makromolekülleri inaktive eder [167]. Kan beyin bariyerini geçemediğinden nigrostriatal yolu tahrip etmek için median forebrain bundle (MFB) veya striatuma substantia nigra içine toksinin enjeksiyonunun yapılması ile nörodejenerasyon sağlanmaktadır [168]. 6-OHDA'nın substantia nigra veya MFB içine enjeksiyonu sonrası 24 saat içinde dejenerasyon ve ölüm başlamaktadır fakat apoptotik morfoloji hemen görülmemektedir [169]. Striatum enjeksiyonu ise retrograd taşınmasının daha uzun süreli olmasından dolayı 1-3 hafta sonrasında nigrostriatal nöronlarda dejenerasyona sebep olmaktadır [148, 170].

Rotenon

Rotenon yıllardan beri organik tarımda, fidecilikte, balık populasyonlarında istenmeyenlerin kontrol edilmesi amacıyla kullanılan, organik bileşenlerden oluşan bir pestisitir. Spesifik bir kompleks I inhibitörüdür ve yüksek lipofilik özelliğiyle hiçbir taşıyıcısı veya reseptörü olmadan bağımsız bir şekilde biyolojik membranlardan ve kan

beyin bariyerinden hızlıca geçebilir. Bu toksin mitokondriyal kompleksi inhibe etme işini bu kompleksin indirgenme durumunu arttırarak ve süperoksit oluşturmak için oksijenle birleşerek elektronların sızmasına neden olarak yapar [171]. Rotenon ile kompleks I'in inhibisyonu oksidatif strese sebep olan ROS'un oluşumunu içeren zararlı etkilerin başlamasına yol açar [172]. Ratlara rotenonun kronik intravenöz uygulaması kompleks I aktivitesinde önemli derecede azalmaya ve SN'de dopaminerjik nöron kaybını seçici şekilde etkilemektedir [173]. Rotenon sonrası nörodejenerasyon striatumdaki sinir uçlarından başlar ve SN'deki hücre gövdelerine ilerlemesi ile sporadik PH'ye çok benzemektedir.

Paraquat

Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium diklorid) insan PH'sine benzer özellikler gösteren ve yapısal olarak MPTP'ye oldukça benzeyen bir herbisittir [174-176]. Sistemik olarak uzun bir yarı ömrü olmasının yanı sıra fare beyinde lipid peroksidasyona sebep olur [176]. Kan-beyin bariyerini kolayca geçememesine rağmen [178] SN'de dopaminerjik nöronların doz bağımlı ve seçici ölümünü gerçekleştirmektedir [179-180]. Paraquatın kronik uygulaması dopamin seviyesinin azalmasına ve dopaminerjik nöron kaybının artmasına neden olmaktadır [181]. Paraquat mitokondriyal kompleks I'in inhibitörüdür ve ROS oluşumuna neden olmaktadır. Dopaminerjik nöronlar üzerindeki toksisitesi DAT ve kompleks I inhibisyonundan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleşmektedir [182]. Paraquat mitokondride birikir [183] ve potansiyel bir redoks çeviricisi olarak görev yapar [184]. Paraquat ayrıca ROS oluşumunu arttırmasıyla birlikte antioksidan enzim ekspresyonunu azaltarak da etki göstermektedir [185].

2.1.6. Dopaminerjik Sistem

Dopamin ilk kez 1910 yılında George Barger ve James Ewens tarafından İngiltere'deki laboratuvarlarında sentezlenmiştir [186]. Dopamin kelimesi L-DOPA'dan sentezlendiği için seçilmiştir. Dopaminin nörotransmitter olarak fonksiyon gösterdiği 1958'de Arvid Carlsson ve Nils-Ake Hillarp tarafından bulunmuştur [187]. Dopaminin sadece nörepinefrin ve epinefrinin prekürsörü olmadığı ayrıca nörotransmitter olarak görev aldığı gösterdiği için Carlsson 2000 yılında Nobel Tıp ödülünü almıştır.

2.1.6.1. Biyokimyasal Mekanizması

Yapısal olarak dopamin feniletamin ve katekolamin sınıfının bir üyesidir. Biyolojik sistemde dopamin beyin ve adrenal hücrelerde L-DOPA'dan sentezlenir. Beyin hücrelerinde sinaptik veziküller içinde depolanan dopamin sinaptik aralığa döküldükten sonra presinaptik terminallerden yeniden kullanılmak üzere geri alınır, monoamin oksidaz (MAO) veya katekol-O-metil transferaz (COMT) enzimleri ile yıkılır [188].

Dopamin biyosentezinin metabolik yolu:

L-fenilalanin → L-tirozin → L-DOPA → Dopamin

Dopaminin direkt prekürsörü L-DOPA'dır fakat esansiyel bir amino asit olan fenilalaninden veya esansiyel olmayan tirozin amino asidinden de sentezlenebilir. Bu amino asitlerden özellikle tirozin, protein içeren yiyeceklerin sindirimiyle alınabilmektedir. Bu yüzden dopaminin nöronal fonksiyonları yerine getirebilmesi için beyinde sentezlenmesi gerekmektedir [188].

L-fenil alanin, fenilalanin hidroksilaz (PAH) enzimi aracılığı ile moleküler oksijen (O₂) ve tetrahidrobiopterini (THB) kofaktör olarak kullanarak L-tirozine dönüşür [188].

L-tirozin, tirozin hidroksilaz (TH) enzimi ile O₂, ferrik demir (Fe²⁺) ve yine THB'yi kofaktör olarak kullanarak L-DOPA'ya dönüştürür [188].

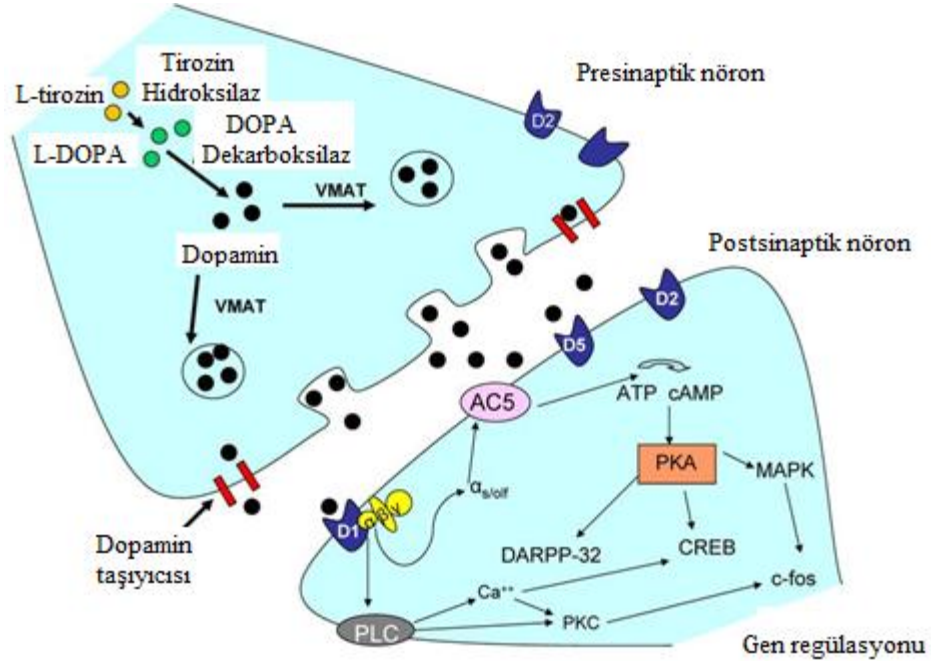
L-DOPA ise DOPA dekarboksilaz (DDC) olarak bilinen aromatik L-aminoasit dekarboksilaz (AADC) aracılığıyla piridoksal fosfatı (PLP) kofaktör olarak kullanıp dopamine çevrilmektedir [188].

Dopaminin kendisi ise nörepinefrin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin sentezi için prekürsör olarak kullanılır. L-askorbik asit ve moleküler oksijenin kofaktör olarak kullanıldığı durumda dopamin hidrosilaz (DBH) enzimi ile dopamin nörepinefrine dönüştürülmektedir. Yine nörepinefrinin feniletanolamin N-metiltransferaz (PNMT) enzimi ile S-adenozil-L-metionini kofaktör olarak kullanmasıyla epinefrin oluşturulmaktadır [188].

Beyinde nörotransmitter olarak görev yapan dopaminin fonksiyonu bir seri mekanizma ile kontrol edilir. Sentezlendikten sonra dopamin veziküler monoamin transporter 2 (VMAT2) ile sitozolden sinaptik veziküller içine taşınır. Aksiyon potansiyelinin oluşması ile veziküller içinde bulunan dopamin, aksiyon potansiyelinin etkisi ile sinaptik aralığa dökülür [188].

Salgılanan dopamin, hücre yüzeyindeki (otoreseptör) veya post sinaptik hedef hücrede lokalize olan reseptörüne bağlanmaktadır. Aksiyon potansiyelinden sonra dopamin molekülü hızlıca bağlı olduğu reseptöründen ayrılır ve yüksek afiniteli dopamin taşıyıcısı (DAT) ile veya düşük afiniteli plazma membran monoamin taşıyıcısı (PMAT) ile presinaptik hücre içine alınır ve veziküller içinde depolanır [188].

Dopamin, monoamin oksidaz (MAO) ve katekol-O-metil transferaz (COMT) gibi bir seri enzim ile aktif olmayan metabolitlerine parçalanır [188].



Şekil 2.5. Dopamin Metabolizması

2.1.6.2. Beyinde Dopaminerjik Yolaklar

Beyinde dopamin motor kontrol, motivasyon gibi temel görevlerin yanı sıra daha düşük seviyede laktasyon, mide bulantısı ve seksüel haz gibi görevleri yönetmektedir. Dopaminerjik nöronların hücre gövdeleri birbiri ile ilişkili küçük beyin bölgelerinde bulunurken projeksiyonları beynin diğer bölgelerine uzamaktadır ve hedefleri üzerinde güçlü etkiler ortaya koymaktadır. Dopaminerjik hücre grubu ilk kez 1964 yılında Annica

Dahlstrom ve Kjell Fuxe tarafından haritalanmış ve “A” harfi ile başlamak üzere etiketleme yapılmıştır [189]. Buna göre A1’den A7’ye kadar olan bölgeler nörepinefrin nörotransmitter’ini içermekte iken, A8 ve A14 arası dopamini içermektedir. Dopaminerjik alanların listesi şu şekildedir:

-Substantia nigra orta beyinde bulunan bazal gangliyonun bir komponentidir. Dopaminerjik nöronlar başlıca pars kompakta (A8 hücre grubu) ve yakınındaki A9 diye adlandırılan bölgelerde bulunmaktadır. Kemirgenlerde önemli projeksiyon bazal ganglion bölgeleri olan striatuma, globus pallidusa ve subtalamik nükleusa gitmektedir ve motor kontrolün sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Substantia nigra ismi Latince’de “siyah madde” anlamına gelmektedir ve dopaminerjik nöronların bu pigmentasyonu içermesinden dolayı bu isimle anılmaktadır. Bu nöronların büyük oranda zarar görmesi ile PH oluşmaktadır [190].

-Ventral tegmental alan (VTA) diğer bir orta beyin bölgesidir. Bu hücre grupları (A10) insan beyinde dopaminerjik nöronların en geniş grubunu oluşturmaktadır. Bu bölgedeki dopaminerjik nöronların projeksiyonları nükleus accumbens ve prefrontal korteks alanlarına gitmektedir [191]. Nükleus accumbens striatumun limbik parçasını oluşturmaktadır, motivasyon ve karar verme gibi motor davranışları kontrol etmektedir. VTA’nın bu motor kontrolü substantia nigra bölgesinin rolü ile yapısal olarak analogtur [192].

- Posterior hipotalamus. Buradaki dopaminerjik nöronların (A11 grubu) spinal korda projeksiyonu bulunmaktadır ama bunun rolü henüz tanımlanmamıştır. Patolojisine bakıldığında huzursuz ayak sendromunda rol oynadığı bulunmuştur [193].

-Hipotalamusun arkuat nükleusu (A12 hücre grubu) ve periventriküler nükleusu (A14). Bu dopaminerjik nöronlardan prolaktin hormonunun sekresyonunu etkileyecek şekilde hipofiz bezine projeksiyonu vardır. Dopamin ön hipofizden prolaktin sekresyonunun nöroendokrin inhibitörüdür. Arkuat nükleuslar tarafından üretilen dopamin hipofiz bezini besleyen median eminence’in hipotalamo- hipofizyal kan damarları içine sekrete olur. Prolaktin üreten laktotrop hücreler dopamin yokluğunda devamlı olarak prolaktin sentezler; dopamin bu sekresyonu inhibe eder. Yani prolaktin sekresyonunun düzenlenmesinde dopamin prolaktin-inhibe edici faktör (PIF), prolaktin-inhibe edici hormon (PIH) veya prolaktostatin olarak isimlendirilir [194].

-Zona incerta. Bu grup hücrelerin (A13) projeksiyonu dişi ve erkekte puberteyi takiben üreme sisteminin gelişmesinin gerekli görüldüğünde aktifleştirilmesini sağlayan gonadotropin-releasing hormonun kontrolünü sağlayan hipotalamusa kadar uzanmaktadır [195].

Ayrıca dopamin salgılayan retinada lokalize olmuş nöronlar, aksonu bulunmayan amakrin hücrelerdir. Hücreler arası ortama dopamin salgılayarak gün ışığında aktif, gece ise sessiz olurlar. Bu retinal dopamin çubuk hücrelerini baskılayarak retinadaki koni hücrelerinin aktivitesini artırırlar. Renk hassasiyetini arttırmanın yanı sıra parlak ışık durumunda kontrast sağlamaktadır [196].

2.1.6.3. Anatomi ve Fizyolojisi

Bazal ganglionun yapısı oldukça komplekstir ve buna bağlı olarak dopaminin rolü de komplekstir. Makroskobik olarak bakıldığında substantia nigra pars kompaktan striatuma major dopamin projeksiyonu bulunmaktadır. Dopamin inputları birçok nöron tipiyle ilişki kurmaktadır. Bazıları D1 reseptörleri aracılığıyla aktive olurken diğerleri D2 reseptörleri ile inhibe olmaktadır. Striatumdan yükselen sinyal akışının iki farklı yolu vardır; direkt ve indirekt yolak. Dopamin direkt yolağın upregülasyonu ile hareketi desteklerken indirekt yolağı baskılamaktadır [196].

Ayrıca bazal gangliondaki motor öğrenme striatumda gerçekleşen long-term-potential (LTP) şekillenmesini güçlü şekilde dopamin tarafından kontrol edilerek yapmaktadır. Diğer bir kelimeyle dopamin aktivitesi striatum içindeki sinaptik bağlantıların güçlendirilmesi veya zayıflatılmasını indüklemektedir [197].

2.1.7. n-3 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (PUFA): Tanımı ve Fonksiyonları

PUFA'lar terminal metil grubuna ait ilk çift bağın pozisyonuna göre iki farklı aileye ayrılmaktadır. α -linolenik (ALA) ve linoleik asit sırasıyla n-3 ve n-6 PUFA ailelerinin prekürsörünü oluşturmaktadır. *De novo* sentezlenemediği için insan için esansiyeldir.

Eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) başlıca balık yağında bulunan iki önemli n-3 PUFA'dır. Araşidonik asit (ARA); prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler gibi birçok proinflatuar mediatörün prekürsörü olan önemli bir n-6 PUFA'dır. Karaciğer ve beyinde ALA enzimatik reaksiyonlar ile DHA'ya dönüşmektedir. Daha spesifik olarak ALA başlangıçta Δ -desaturaz enzimi ile desaturasyona uğradıktan sonra uzama reaksiyonuna ve EPA oluşturmak için ise ikinci bir desaturasyon olayına (Δ -5 desaturaz) maruz kalmaktadır (**Şekil 2.6**) [198].

Yağ asitleri kanda trigliseritlerle, fosfolipidlerle, kolesterol esterleri ile birleşmiş halde veya albumin gibi plazma proteinlerine bağlı olarak bulunurlar. Sonrasında ise ayrılarak kan beyin bariyerinden geçerler (**Şekil 2.7**) [199-201]. Karaciğerde ALA dönüşümü beyinden daha yüksek kapasitede gerçekleşmektedir ve diyetle alınmayan DHA'nın ana kaynağı olarak bulunmaktadır [202].

EPA'nın ek desaturasyon ve uzama basamakları sonucu oluşan 24:6 n-3, DHA şekillendirmek için endoplazmik retikulumdan peroksizoma transfer edilerek β -oksidasyona uğramaktadır [202-206].

Fosfolipaz A2 (PLA2) membrandaki fosfolipidlerin hidrolizlenmesi ile yağ asitlerinin serbest kalmasını sağlayan bir enzim grubudur. PUFA'ların %90'ından fazlası hızlıca tekrar esterleşir ve fosfolipid tabakaya geri döner [207]. Serbest PUFA'ların bir kısmı β -oksidasyon reaksiyonu gibi özel degradasyon yolları aracılığı ile hücreye enerji sağlamanın yanında apoptoz, inflamasyon ve hücre proliferasyon işlemi gibi hücre içi sinyal kaskadını başlatıcı olarak görev yapar. Bu geniş spektrumlu aktivitelerinden dolayı n-3 PUFA'lar nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere hastalıklarla ilişkili durumların tedavisi ve önlenmesi için potansiyel ajan olarak görülmektedir [208-209].

Nöronal dejenerasyon üzerine n-3 PUFA'ların yararlı etkileri membran akışkanlığı üzerinedir. Bunun yanı sıra n-3 PUFA'ların hücre içinde serbest kalması nörotrofik faktör, oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyon mekanizmalarının gelişmesini sağlamaktadır [198].

2.1.7.1. Nörotrofik Faktörler

Rejenerasyonda nörotrofik faktörlerin önemli rolünden dolayı beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF)'de n-3 PUFA'ların modulator etkisi ilgi çekici olmuştur [210]. Örneğin; n-3 PUFA eksikliği bulunan sıçanlarda BDNF ekspresyonu p38 MAPK bağımlı bir yolk aracılığı ile azalmaktadır [211]. MPTP ile Parkinson oluşturulan farelerde n-3 PUFA ile beslenmenin yararlı etkilerinin altında yatan potansiyel mekanizma BDNF ve onun reseptörünün upregülasyonudur [212]. BDNF'nin düzenlenmesinde n-3 PUFA'nın rolü farelerin α -linolenik asit (ALA) eksik diyet ile beslenmesi ile gösterilmiştir. Bu diyet ile beslenen hayvanlarda striatal BDNF içeriği azalmıştır [213]. Parkinson hastalarının post mortem beyinlerinde de BDNF seviyesi azalmaktadır [214-215].

2.1.7.2. Oksidatif Stres ve Apoptoz

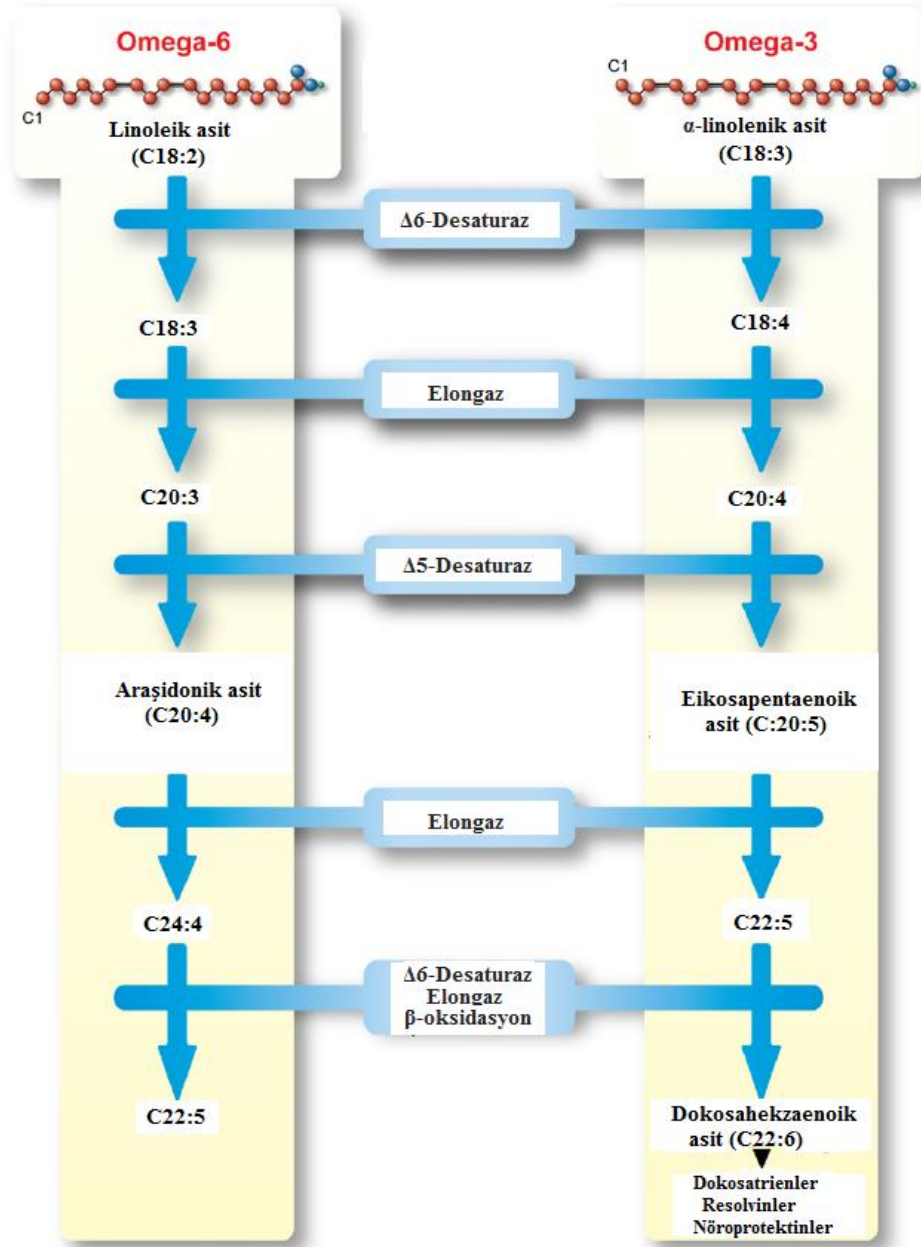
n-3 PUFA'lar oksidatif stres, apoptoz, hücre sinyali ve bölünme ile ilgili genlerin düzenlenmesini sağlamaktadır [216]. Oksidatif stres hücre içindeki ROS ve antioksidant kapasite dengesinin bozulması ile ortaya çıkar. Oluşan bu oksidatif stres lipidleri (peroksidasyon ve membran fonksiyonunun değişmesi), proteinleri (denaturasyon, fragmentasyon ve fonksiyon kaybı), ribo nükleik asit (RNA) ve hatta DNA'yı (oksidasyon ve mutasyon) etkilemektedir.

n-3 PUFA antioksidan bir enzim olan glutatyon redüktazın aktivitesini düzenler; okside protein, DNA hasarı ve ROS miktarını azaltır [217-219]. DHA ve onun yan ürünü (türevi) nöroprotektin-1 (NPD1), antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin ekspresyonunun artmasını sağlarken, proapoptotik Bax, Bid ve Bad proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olur [220]. n-3 PUFA'lar antiapoptotik özelliklerini kaspaz modülasyonu yoluyla da ortaya koymaktadır [217, 219].

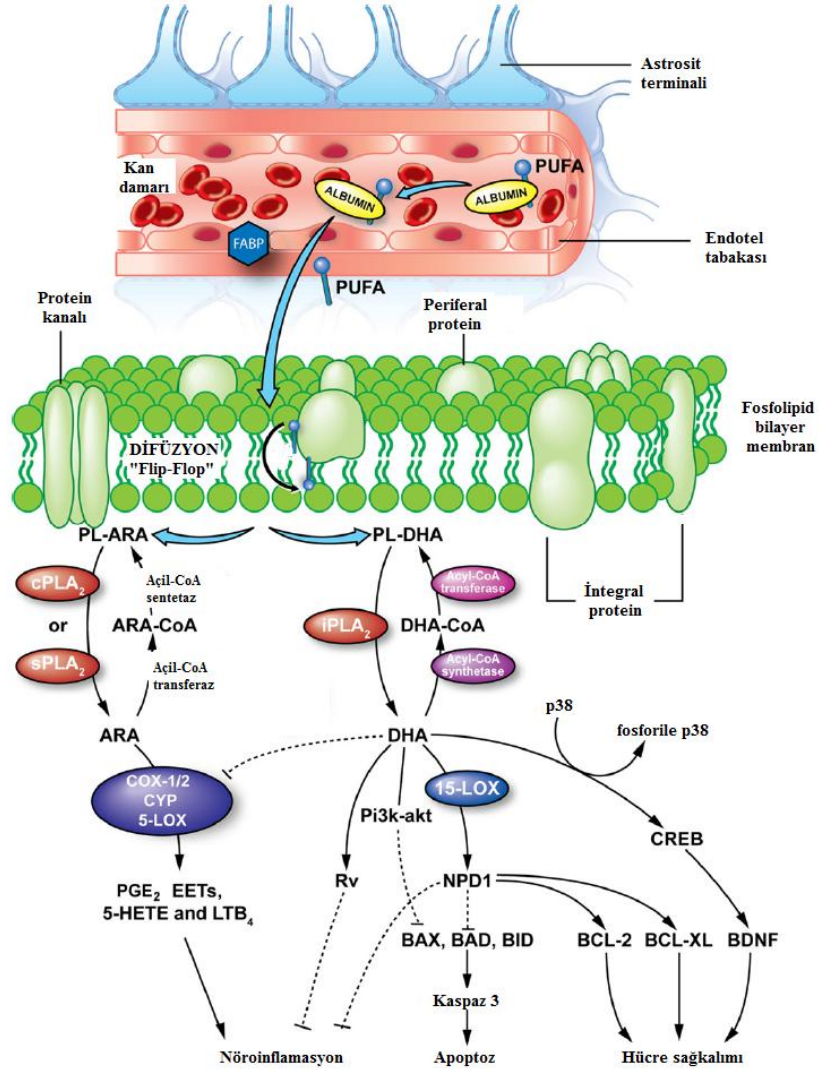
2.1.7.3. Nöroinflamasyon

Parkinson hastalığının da dahil olduğu nörolojik hastalıklarda anormal inflamatuvar cevaplar gözlenmektedir [221]. Parkinson'un nörodejeneratif sürecine inflamasyonun katkısı henüz açık değildir [124]. Parkinson hastalarının beyinlerinde ve serebrospinal sıvısında sitokinlerin ve prostaglandinlerin seviyesi artmaktadır [56, 125, 138, 221]. Ayrıca hastalığın erken döneminde aktifleşen mikroglialar geç evresine kadar aktifliğini sürdürmektedir [138, 222-223].

n-3 PUFA'ların antiinflamatuvar özellikleri iki aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak, n-3 PUFA'lar COX'lar (siklooksijenazlar) ile enzimatik olarak metabolizmayı önlemektedir. Böylece artan DHA:ARA oranı, prostaglandinler gibi proinflamatuvar eikosanoitlerin üretimini azaltmaktadır [224-226]. EPA, ARA oksijenasyonunu ve inflamatuvar mediatör üretimi inhibe etmektedir [227]. EPA ve DHA'dan orjinlenen resolvin ve prolektin aileleri anti inflamatuvar özellik göstermektedir [217, 228]. Bu mediatörler COX-2 ve nükleer faktör κ B (NF κ B) ekspresyonunu azaltırken lökosit infiltrasyonunu azaltmaktadır [229-230].



Şekil 2.6. PUFA Sentezi



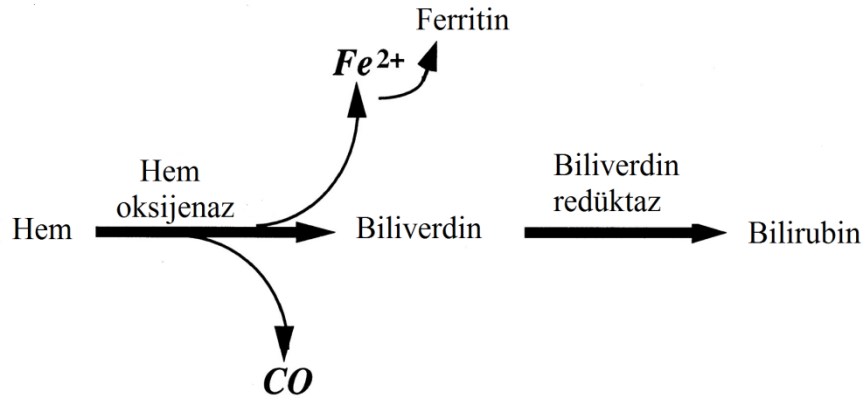
Şekil 2.7. Çoklu Yağ Asitlerinin Metabolizması

2.1.8. Hem Oksijenaz Sistemi

Hem, biyolojik sistemlerde önemli role sahip olan bir demir-protoporfirin kompleksidir. Oksijen depolama ve taşıma (hemoglobin ve myoglobin), elektron taşıma ve enerji üretimi (NADPH oksidaz, guanil siklaz ve sitokrom P450 ailesi) ve katalaz, peroksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), siklooksijenaz gibi enzimatik sistemlerde fonksiyonu bulunan bir enzim grubudur ve çeşitli patolojik durumlarda serbest hem'in zararlı etkileri olmaktadır. Hücre içi hem proteinlerinin serbest kalması ile ortaya çıkan hem, hücre hasarına ve doku harabiyetine sebep olmaktadır. Hem, yüksek hidrofobik yapısıyla mitokondri, endoplazmik retikulum, nükleus ve hücre membranı gibi çeşitli hücrel membranlara zarar vererek lipid peroksidasyona sebep olmakta ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olarak zararlı demir-bağımlı reaksiyonları başlatırlar. HO enzim kompleksi ise hem'in bu ölümcül etkilerine karşı hücreyi korumaktadır [231].

Hem oksijenaz sisteminin sitoprotektif rolü katalitik reaksiyonlar sırasında metabolitlerin meydana gelmesini ve hücrel serbest hem'in azaltılmasını kapsamaktadır. HO izoenzimleri endoplazmik retikulum içinde NADPH sitokrom P450 redüktaz ile birlikte bulunmaktadır ve hem'in tetrapirrol halkasını ayırarak biliverdin (BV), serbest demir (Fe^{+2})

ve karbon monoksit oluşturmaktadır. Oluşan biliverdin ise, biliverdin redüktaz enzimi ile bilirubine dönüşmektedir (Şekil 2.8) [232].



Şekil 2.8. Hem Oksijenazın Enzimatik Reaksiyonu

2.1.8.1. HO Sisteminin Elementleri

Hem oksijenaz sisteminin birinci izoformu ilk olarak 1974 yılında karakterize edilmiştir [233-234]. Sonraki yıllarda karaciğer mikrozomlarından saflaştırılan HO izoformlarının farklı aktivite gösterdiği, kobalt, kadmiyum, hematin, fenilhidrazin ve bromobenzen gibi maddelere karşı farklı cevap verdiği, ısıya dayanıklılığının ve saflaştırma basamaklarının birbirinden farklılık gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan bu enzimlere hemoksijenaz 1 (HO-1) ve hemoksijenaz 2 (HO-2) ismi verilmekle birlikte üçüncü bir izoformun da tanımlanması yapılmıştır [235]. Sıçanlardan izole edilen bu izoformun HO-2 transkriptlerinden türetilen bir pseudogen olduğu ortaya çıkmıştır [236].

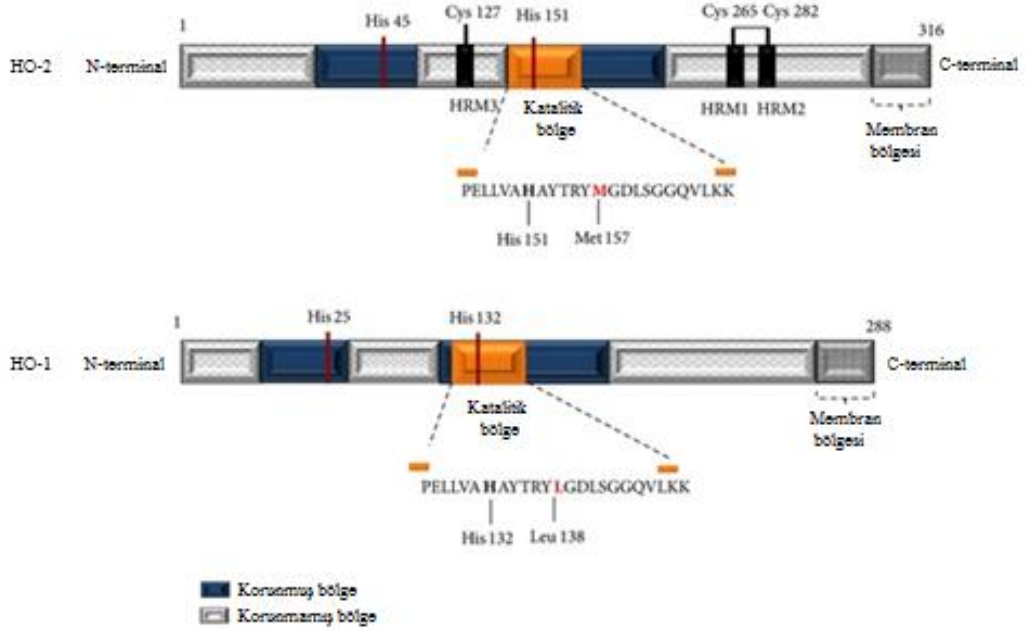
Hem oksijenaz izoenzimleri aynı reaksiyonu katalizleyen mikrozomal proteinlerdir ve bu iki izoform birbirinden bağımsız genlerin ürünleridir. İki enzim arasında gen yapısı, düzenlenmesi ve doku ekspresyon paterni açısından hiçbir benzerlik bulunmamaktadır [236]. HO-1, β -amiloid, H_2O_2 , dopamin, kainik asit, sitokinler, prostaglandinler, endotoksin, vazoaktif bileşenler ve hem gibi çok çeşitli uyarılarla indüklenebilir olduğu için uyarılabilir tip olarak sınıflandırılmaktadır. Bu enzim stressiz normal şartlarda dalakta eksprese olmaktadır [237] kemik iliği ve karaciğerin özelleşmiş retikuloendotelial hücreleri tarafından da parçalanmaktadır [14]. Fakat HO-1 stres uyarısı olmayan durumlarda beyin dokularında nadiren tespit edilmektedir [24].

Hem oksijenaz-2 enzimi ise yapısal (constitutive) tip olarak isimlendirilmekte ve testis, beyin, endotelial hücrelerde yüksek seviyede eksprese olmaktadır [238] [239]. Yetişkin sıçan beyinlerinde ön beyin, hipokampus, ortabeyin, bazal ganglia, serebellum, talamik bölgeler ve beyin kökünde bol miktarda bulunmaktadır [237].

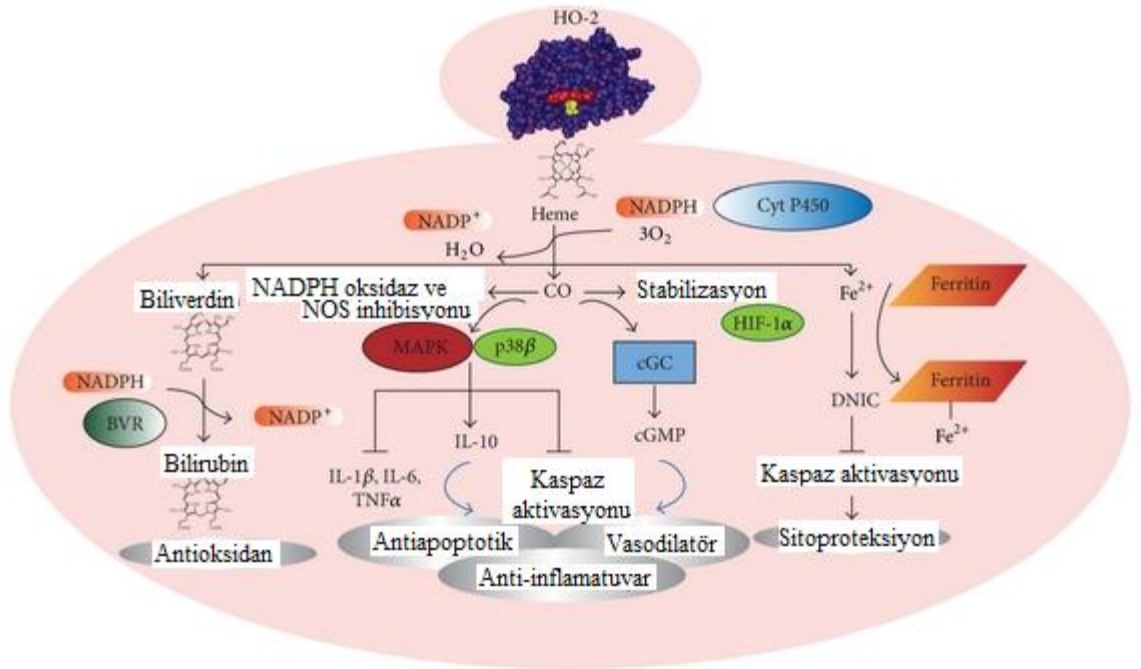
Hem oksijenaz izoformları farklı genlerin ürünleridir. *HMOX-1*, insan genomunda 22. Kromozomun q kolundan kodlanan, 5 ekzon içeren, 14 kb uzunluğunda ve translasyona uğradığında 32 kDa'luk bir protein oluşturan genidir [240]. *HMOX-2* ise 16. Kromozomda bulunan ve kompleks bir organizasyona sahip gen bölgesidir. 1994 yılında McCoubrey ve Maines *HMOX-2* geninin yapısal organizasyonunu ve sınıflandırmasını yapmışlardır [240].

HMOX-1 ve *HMOX-2* tek kopya genleridir. HO-1 proteininin tek bir izoformu bulunmaktayken HO-2 proteininin iki veya daha fazla ürünü bulunmaktadır. Memeli türlerinde çoğu dokuda ve hücre tipinde HO-2'nin 1.3 ve 1.8 kb uzunluğunda iki ürünü belirlenmiştir. İnsanda HO-2'nin iki transkripti (1.3 ve 1.7 kb) bulunmaktayken [241], farede HO-2a ve HO-2b diye isimlendirilen iki mRNA bulunmaktadır [242].

HO-1 ve HO-2 izoenzimleri aynı katlanma, farklı aktivite ve benzer diziye sahip homolog proteinlerdir. Bu iki izoform arasındaki amino asit benzerliği %45'i bulmaktadır. Her iki enzimin primer yapısındaki farklılıklar şekil 2.9'da görülmektedir.



Şekil 2.9. Hem Oksijenaz Proteinlerinin Yapısı

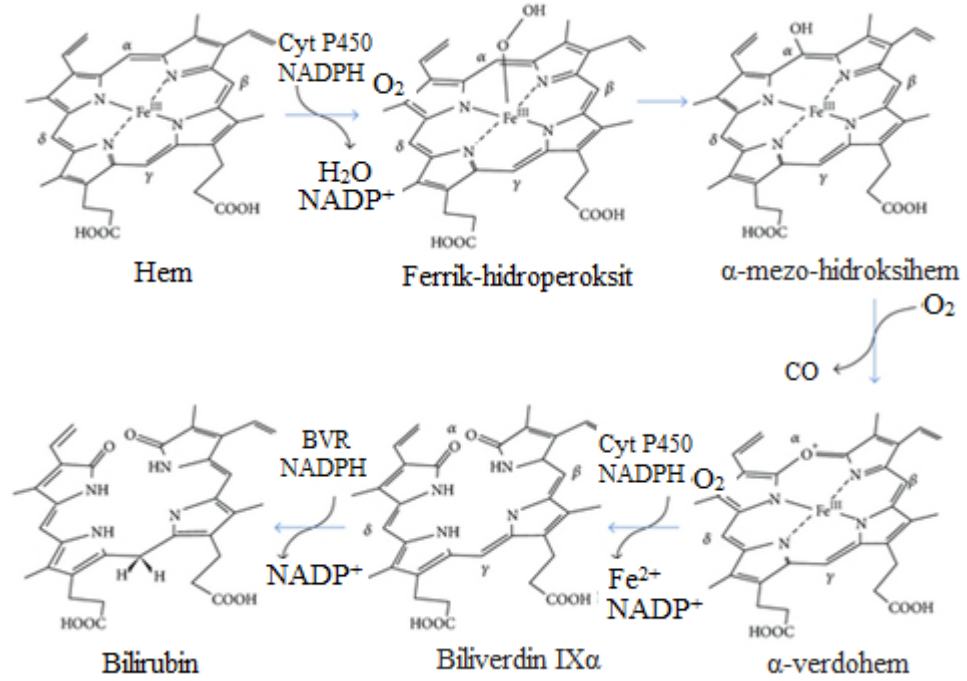


Şekil 2.10. HO-2 Enzimatik Aktivitesi Ürünlerinin Fizyolojik Rollerini

Hem, HO-2 enzimi ile eşit molekül sayısında CO, Fe⁺² ve BV oluşturmak üzere ayrılır. Bu enzimatik reaksiyon NADPH, sitokrom P450 ve O₂ gerektirmektedir. Oluşan CO p38/MAPK yolağı boyunca antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellik göstermektedir. CO ayrıca NOS ve NADPH oksidazı inhibe ederek ve hipoksi ile indüklenebilir faktör 1- α (HIF1- α)'nın stabilizasyonunu sağlayarak cGC/cGMP aracılığı ile vasküler tonusu düzenlemektedir. Biliverdin NAD(P)H: BVR ile metabolize edilirken Fe⁺² ise DNIC (dinitrozil demir-sülfür kompleksi) şekillendirmek için ferritin tarafından tutulmaktadır. Oluşan bu kompleks kaspaz aktivitesinin inhibisyonu aracılığıyla koruyucu etki göstermektedir [243].

2.1.8.2. Hem'in HO Sistemi Tarafından Degredasyonu

Reaksiyon ferrik hem-HO kompleksinin şekillenmesiyle başlamaktadır. Ferrik hem-demir, NADPH sitokrom P450 enzimi aracılığıyla NADPH'den ilk elektronun koparılması ve bu komplekse moleküler oksijenin bağlanması ile hidroperoksit ara ürünü (Fe⁺³-OOH) oluşturulmasından sorumludur. Fe⁺³-OOH'ın terminal oksijeni ferrik α -meso-hidroksihem şekillendirmek için porfirin halkasının α -meso karbonuna saldırmakta ve moleküler oksijen ile reaksiyona girerek ferröz Bak ve CO meydana getirmektedir. Oluşan biliverdin ara ürünü Fe⁺² ve biliverdini serbest bırakmak için redüktaz enzimi ile indirgenerek bilirubine dönüştürülmektedir. *In vitro* reaksiyonlarda enzimden BV'nin serbest kalması hız sınırlayıcı basamak olarak kabul edilmektedir [244].



Şekil 2.11. Hem Oksijenazın Katalitik Reaksiyonu.

Hem Oksijenaz 1 (HO-1)

Hem oksijenaz-1 beyin ve diğer dokularda hemin biliverdine oksidatif degradasyonunu katalizleyen protein ailesinin 32 kDa'lık bir üyesidir [245-246]. *HMOX-1* geninde bir ısı-şok korunmuş dizisi ve promotor bölgesinde AP1, AP2 ve NF κ B bağlanma bölgesi bulunmaktadır ve oksidatif stres, metal iyonları, amino asit analogları, sülfidril ajanları, pro-inflamatuvar sitokinler ve hipertermi ile hızlıca ekspresyonu artmaktadır [247]. Oksidatif strese cevapta HO-1'in aktivasyonu ile hem, biliverdin ve bilirubin gibi pigmentlere yıkılmaktadır [248]. HO-1 hipokampusta, nükleus kaudatusta, putamende, globus pallidus'ta bulunmaktadır. Ayrıca hem Parkinson hem de kontrol grupları substantia

nigra pars kompakta kısmında nöromelanin-içeren (dopaminerjik) nöronlarda immunohistokimyasal olarak HO-1 olduğu görülmüştür [24].

Hem oksijenaz ailesinden olan HO-1'in biyolojik fonksiyonu hücrel homeostazisin sürdürülmesi için oksidatif strese karşı adaptif ve savunucu bir rol üstlenmektedir. Oksidatif strese karşı korumada HO-1'in rolü knock out fare modelinde [249] ve kalıtsal HO-1 eksikliği bulunan insanlarda gösterilmiştir [250].

Hem oksijenaz sistemi ve NOS sistemi arasında bir ilişki bulunmaktadır [251]. Bu ilişki CO/HO sistemi ile NO/NOS sisteminin birbirini karşılıklı düzenlemesini içermektedir. HO birçok mekanizma aracılığı ile NO üretimini düzenleyebilmektedir [237, 252].

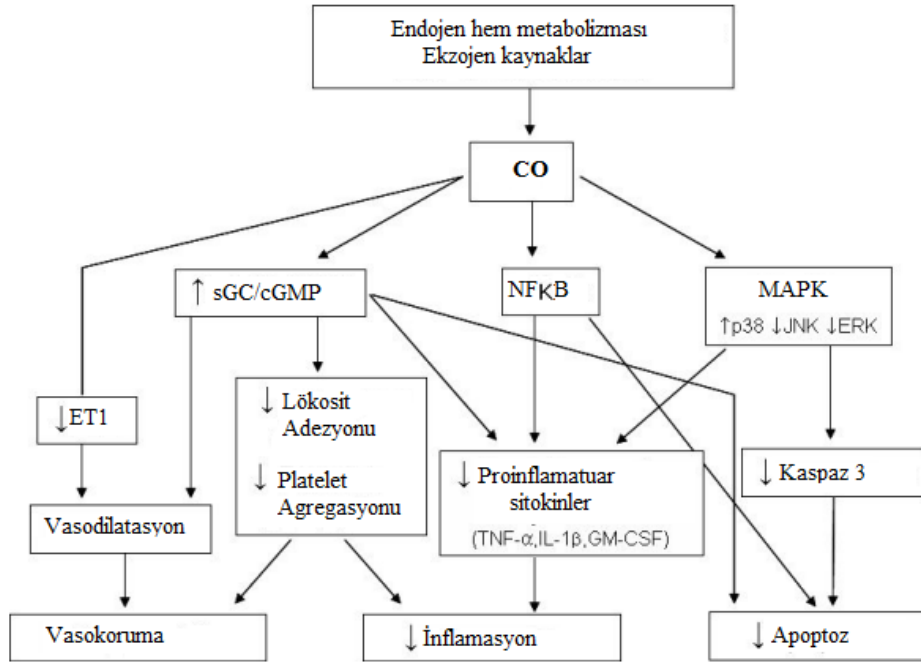
Hem oksijenaz-1 kardiyovasküler ve renal hastalıklarda, iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu rol oynamaktadır. Rhabdomyolisis, nefrotoksik nefrit oluşturulan hayvan modellerinde HO indüksiyonu renal fonksiyonlar üzerinde koruyucu etki göstermektedir [253]. Bununla birlikte HO-1'den kökenlenen CO akut böbrek hasarı ve hipertansiyon üzerinde iyileştirici etki göstermekteyken kandaki karboksihemoglobin seviyesini, renal kan akımını ve glomerular filtrasyonu da arttırmaktadır [254]. *In vivo* HO-1'in ekspresyonu iskemi/reperfüzyon hasarına uğrayan böbrekleri korumaktadır [255].

2.1.8.3. Memeli Merkezi Sinir Sisteminde Bazal HO Ekspresyonu

Hem oksijenaz-1 ekspresyonu normal ve stres olmayan koşullarda beyinde minimal seviyededir ve çoğunlukla nöroglialar olmak üzere, seyrek olarak da talamus, hipotalamus, beyin kökü, cerebellumun Purkinje hücreleri, hipokampal dentat gyrus ve serebral kortekste bulunmaktadır [256-260]. HO-2 mRNA ve proteini ise memeli beyinde ve spinal kord'ta geniş dağılım gösteren bir enzimdir. HO-2, hipokampal piramidal hücreler, dentat gyrus, olfaktor bulbus, serebellar granül ve Purkinje hücre tabakasında yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır [261-263]. Hem-türevli CO, guanilat siklazın fizyolojik bir uyarıcısı olarak görev yaparak, nöronal aktiviteyi şekillendirmekte ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) ikincil habercisinin hücre içindeki seviyesini yükseltmektedir [262].

	HO-1	HO-2	HO-3
HO-2 amino asit benzerliği	% 40	% 100	%90
Fizyolojik rolleri	Hem yıkımı Antioksidan savunma Nöral sinyalizasyon Anti-inflamatuar Vasküler tonusun düzenlenmesi Hem protein aktivitelerinin düzenlenmesi	Hem yıkımı Hem bağlanması Vasküler tonusun yönetimi Nöral sinyalizasyon	Hem'e bağlanma Hem bağımlı genlerin düzenlenmesi
Ekspresye olduğu dokular	Dalak, karaciğer, testis	Çoğu doku; beyin, testis, dalak, retina, akciğer, karaciğer, sinir sistemi, dolaşım sistemi, böbrek	Çoğu doku
Ekspresyon uyaranları	Oksidatif stres, sitokinler, ağır metaller, hem, ısı şoku, hipoksi, nitrik oksit	Adrenal glukokortikoid, opiatlar	Bilinmiyor

Tablo 2.1. HO İzoenzimlerinin Özellikleri



Şekil 2.12. CO'in Koruma Mekanizması

2.1.8.4. İnflamasyon

İnflamasyon doku hasarına veya enfeksiyona (bakteri) cevap olarak vücut tarafından başlatılan dinamik ve kompleks bir işlemdir. Makrofajlar, çeşitli sitokinleri ve büyüme faktörlerini üreterek inflamasyonun başlamasını, yürütülmesini, antijen sunumunu ve fagositozunu düzenlemektedir. Aktivasyon sinyallerini; ekstrasellüler matris proteinleri, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), diğer kimyasal faktörlerin yanı sıra interferonlar, tümör nekrosis faktör α (TNF- α), granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi sitokinler oluşturmaktadır. Makrofajlar patojenle ilişkili moleküler paternleri toll-like reseptörleri (TLR) aracılığıyla tanıyarak proinflamatuvar genlerin ekspresyonunun uyarıldığı sinyal yollarını aktifleştirmektedir [264].

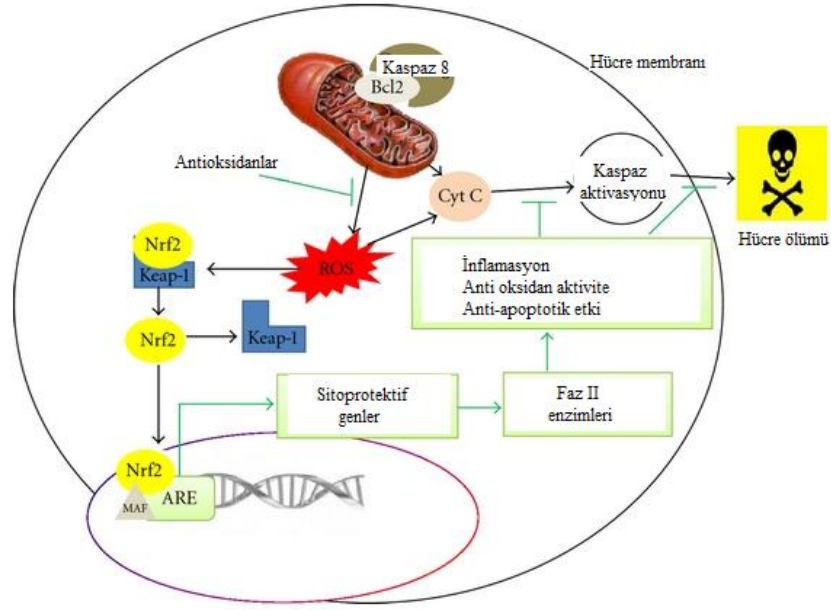
2.1.9. Nükleer Faktör E2-İlişkili Faktör 2 (Nrf2)

Oksidatif stres veya elektrofilik strese karşı hücrel savunmada en önemli mekanizma Nrf2 antioksidan cevap elementi sinyal yolağının aktivasyonudur. Bu sinyal yolağı detoksifikasyon ve reaktif oksijen türlerinin eliminasyonu için gerekli olan proteinlerin ekspresyonunu kontrol eder ve hücrel antioksidan kapasiteyi artırır. Moleküler seviyede Nrf2'nin aktivasyonu net bir şekilde anlaşılacak şekilde birlikte Nrf2 aktivitesi sitozolik bir protein olan Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) ile kontrol edilmektedir [265].

Reaktif kimyasal stresine cevapta birçok sitoprotektif enzim öncelikle transkripsiyonel seviyede düzenlenir. Bu transkripsiyonel cevap detoksifikasyon enzimlerinin promotor bölgesindeki cis-acting elementi olan antioksidan response element (ARE) ile kontrol edilir [265].

ARE'ye bağlanan proteinler, hücre içi redoks durumunu değiştiren elektrofillerin seviyesinin artması ve antioksidan kapasitenin azalması ile aktive olarak transkripsiyonel cevabı oluşturmaktadır. Fakat stres olmayan şartlar altında da ROS ve diğer endojen reaktif moleküller üretilmektedir. Bu yüzden ARE, dış (stresli) ve iç stres (stres bulunmayan) koşulları altında hücrel redoks homeostazisinin yürütülmesinden sorumludur [265].

Oksidatif strese, toksisiteye ve karsinojenlere karşı hücreSEL koruma hem oksijenaz 1'in de içinde bulunduğu faz 2 enzimleri tarafından yapılmaktadır. Faz 2 enzimlerinin ekspresyonu bir transkripsiyon faktörü olan Nüklear faktör E2-ilişkili faktör (Nrf2) ile düzenlenmektedir. Bazal şartlar altında Nrf2 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) ile baskılanır. Keap1, Nrf2 ve Cullin3-ilişkili E3 ligaza bağlanan sistein zengin sitozolik bir adaptör proteindir ve Nrf2'nin proteazomal degradasyonunu kolaylaştırmaktadır. Sistein nükleofilik yapıdadır ve elektrofillerle yüksek derecede reaksiyona girmektedir. Stres koşullarında Nrf2 indükleyicileri Keap1 sisteinleri ile reaksiyona girerek Nrf2 ile etkileşimi bozmaktadır. Ardından Nrf2 hızlıca nükleusa girmekte ve HO-1 gibi faz 2 enzimlerinin ekspresyonunu başlatmaktadır [265].



Şekil 2.13. Nrf2/ARE Sinyal Yolağı

2.1.10. Hipotez

Farelerde MPTP ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde DHA, SN'deki HO-1, HO-2, Nrf2, Bax, Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon ve immunoreaktivite düzeylerini etkileyerek koruyucu etki gösterir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 3 aylık, ortalama 25-30 gr ağırlığında, erkek C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen fareler, sıcaklığı 23 ± 2 °C olan ve 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulmuştur ve fareler ticari yem ile beslenmiştir.

Fareler çalışmanın başlangıcında rastgele olmak üzere dört gruba ayrılmıştır:

- a) Kontrol grubu (K) (n=23)
- b) DHA (D) (n=23)
- c) Parkinson (P) (n=23)
- d) DHA+Parkinson (DP) (n=23)

3.1. DHA Uygulaması

DHA (Docosaheksaenoic Acid, Sigma-D 2534) D ve DP gruplarına, mısır yağında çözülerek, 36 mg/kg/gün dozda, 30 gün boyunca, 22 numaralı beslenme sondası kullanılarak gavaj yoluyla uygulanmıştır. DHA uygulanmayan K ve P gruplarına ise mısır yağının olası etkilerini önlemek amacıyla aynı miktarda mısır yağı gastrik gavaj yoluyla verilmiştir [42-266].

3.2. Parkinson Hastalığının Oluşturulması

30 günlük gavaj uygulamasının 23.günü, MPTP toksini serum fizyolojikte çözülerek (3 mg/ml) hazırlanmış ve P ve DP gruplarındaki farelere 2 saat aralıkla günde 4 kez, 20 mg/kg dozda intraperitoneal olarak uygulanmıştır [267-268].

3.3. Parametreler

3.3.1. Ağırlık Takibi

Deney süresi boyunca haftada bir gün olmak üzere hayvanların ağırlıkları takip edilerek kaydedilmiştir.

3.3.2. Motor Aktivite Tayini

3.3.2.1. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite, kızıl ötesi fotoseller ile donatılmış sekiz plastik cam kafesten (42 cm x 42 cm x 30 cm) kafes içinde oluşan açık alan aktivite görüntüleyici sistem (MAY 9908 model Aktivite Görüntüleyici Sistem: Commat Ltd, Türkiye) aracılığıyla deney hayvanı açık alanın tam ortasına koyularak 5 dk süre ile tek bir kayıt alınmıştır [269]. Kafeslerin yan bloklarında bulunan yerden 4,5 cm yükseklikte ve 2,5 cm aralıklarla yerleştirilmiş on beş yayıcı, algılayıcı fotosel çifti ve yerden 11,5 cm yukarıya yerleştirilen on beş fotosel çifti ile kayıt alınmıştır. Fotosel ışınlarının kesilmesi IBM-uyumlu bir

bilgisayar sistemi ile belirlenmiş ve deney hayvanının lokasyonu 0,1 s hassasiyetteki yazılım ile hesaplanmıştır. Deney hayvanının lokasyonunun tamamen değişmesi ile oluşan aktivite ambulatuvar aktivite olarak kaydedilmiştir. Ambulatuvar aktivite deneğin kafes içinde dikilme haricinde yaptığı her türlü hareketi kapsamaktadır. Bu sistem ile ayrıca toplam lokomotor aktivite ve alınan mesafe de hesaplanmıştır. Toplam lokomotor aktivite ise hayvanın vertikal, horizontal ve ambulatuvar hareketlerinin toplamı olarak değerlendirilebilmektedir.

3.3.2.2. Rotarod Testi

Farelerin motor performans ve koordinasyonunu tespit etmek amacıyla kullanılan rotarod testinde hayvanlar ardışık üç gün boyunca bu cihaza (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy) alıştırmıştır [270-271]. Deney her gün aynı saatte yapılmış olup feda edilecek hayvanlar cerrahi işlemden 30 dk önce laboratuvara alınıp çevreyle ilişki kurmaları sağlanmıştır. Hayvanlar bireysel bölmelerine dönen çubuğun (7,3 çapta) tersi yönünde yerleştirildikten sonra çubuk üzerinde kalma süreleri tek bir kayıt ile tespit edilmiş ve hayvanlarda meydana gelebilecek stres ve yorgunluğu azaltmak amacıyla farklı hızlar arasında 5 dakika dinlenme periyodu uygulanmıştır. Değişen hızlarda (5-40 rpm) kayıt alınarak hayvanların çubuk üzerinde kalma süresi hesaplanmış ve toplam saniye cinsinden verilmiştir.

3.3.2.3. Pole (Çubuk) Testi

Deneyssel parkinson modeli oluşturulduktan 7 gün sonra, motor aktiviteyi belirlemek için PH'nın spesifik semptomlarından bradikinezi değerlendirilmiştir. Bradikinezinin derecesini ölçmek için küçük modifikasyonlara uğratılmış [272] olan Ogawa ve arkadaşlarının [273] "Pole Test=Çubuk Testi" metodu kullanılmıştır.

Bradikinezi şiddetinin tespiti için kullanılan bu test için 0,8 cm çapında ve 50 cm uzunluğunda metal çubuk sargı bezi ile sarılarak hayvanın daha iyi tutunabilmesi için uygun hale getirilmiştir. Parkinson modeli oluşturulduktan 7 gün sonra fare deneye alınarak çubuğun en üst noktasına başı yukarı bakacak şekilde bırakılmıştır ve bu konumda iken tamamen geriye dönüp zemine doğru hareket etme anına kadar geçen süre kaydedilmiştir.

3.4. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması

Deney süresinin 30.günü motor aktivitenin tayin edilmesinden sonra hayvanlar 1 gr/kg dozda ürethanın intraperitoneal uygulanması ile anesteziye alındıktan sonra orta hat boyunca kesilerek abdomeni ve göğüs kafesi açılmıştır. Aortanın iliak bölgesine yerleştirilen p26 numaralı kanül ile heparinli SF verilerek dokuların perfüzyonu sağlanmıştır. Histolojik analizler için ayrılan beyinlerden SN izolasyonu hemen gerçekleştirilirken diğer parametreler için kullanılan dokular -80°C'de saklanmıştır.

3.5. Histolojik Analizler

3.5.1. 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.

3.5.2. İmmünohistokimya Yöntemi

Farelerin substantia nigra dokularında HO-2, Nrf2, Bax, Bcl-2, TH proteinlerinin varlığını göstermek amacıyla antikorlar uygulanmıştır.

Kullanılan Solüsyonlar

- **1X PBS (Phosphate Buffer Saline) (0,2 M)**
7,2 gr Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) (#1.06585.5000; Merck)
0,8 gr Potasyum Dihidrojen 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 (0,3 M):**
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:**
Tavşan Anti-HO-2 Antikoru (OSA-200F, STRESSGEN)
Tavşan Anti-Nrf-2 Antikoru (NB100-91897, NOVUS)
Tavşan Anti-TH (ab152, ABCAM)
Tavşan Anti-Bax Antikoru (bs-0127R, BİOSS)
Tavşan Anti-Bcl-2 Antikoru (ab7973, ABCAM)
- **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 substantia nigra bölgesinden kesitler 5µm kalınlığında, süperfrost (manyetik olarak statik olan) lamalar üzerine alınmıştır. Bu kesitler 56°C'lik etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kesitlerin 2 defa 10'ar 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 bağlanmaları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 7 dakika bloklanmıştır. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan aynı örnek üzerine 1/500 oranında dilüe edilmiş HO-2, Nrf-2 antikoru, 1/100 oranında dilüe edilmiş Bax ve Bcl-2 antikoru ve 1/1000 oranında dilüe edilmiş TH antikoru damlatılmıştır. Diğer örneklerden de negatif kontrol olanına da antikor ile eşit oranda Ig (immünglobulin) içerecek şekilde hazırlanmış Ig kurumasını önlemek 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 bekletilmiştir. 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 HO-2, Nrf-2, Bax, Bcl-2 ve TH proteinlerinin dağılımları ve immunoreaktivite dereceleri Image J programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.6. Dokuların Homojenizasyonu

Hayvanlardan alınan beyin dokuları buz üstüne alınmıştır ve bir bisturi yardımıyla substantia nigra çıkarılarak üzeri isimlendirilmiş ependorflara aktarılmıştır. Herhangi bir işleme tabi tutulmayan dokular lizis tamponunda (0,1 M Tris (Merck; 1.08.387.0500), 100x Sodyum-ortofovanadate, pH: 7.4) sonikasyon yapılmıştır. Bu işlem 0.2 gr doku başına 600 µl lizis tamponu ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (PIK) ile yapılmıştır. Örnekler bir saat buz üzerinde bekletildikten sonra 15000 g'de 10 dakika, +4° C'de santrifüj edilip süpernatantlar yeni bir ependorfa aktarılmıştır. Numuneler bu şekilde -20°C'de saklanmıştır.

3.7. Protein Tayini

Homojenize edilmiş substantia nigra dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir prosedür ile yapılmıştır [274].

Reaktifler:

1. Standart solüsyon: 2 µg/µl bovin serum albumin (Albumin Bovine, Sigma, A-8022)
2. CPPA Reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce- 1856210)
3. 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm'deki absorbansı spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

Protein miktarının hesaplanması: Dokulardaki protein miktarları standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8. Western Blot Analizi

3.8.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

-20°C'de saklanan süpernatantlardaki protein miktarı ticari kit ile belirlendikten sonra [274] aynı miktarda protein içeren örneklere 5x Laemli (%4 SDS, %20 Gliserol, %10 2-merkaptoetanol, % 0,004 brom fenol blue, 0,125 M Tris-HCl, pH= 6,8) eklenmiştir ve 5 dk 95-100°C'lik suda kaynatılmıştır. Böylece örnekler yüklemeye hazır hale gelmiştir.

3.8.2. Elektroforez ve Blotlama İşlemleri

Örneklerin SDS-PAGE analizleri için Laemli [275] tarafından bildirilen yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır.

%10'luk toplama (alt) jeli iyice karıştırılmıştır ve daha önce hazırlanan iki cam arasında doldurulmuştur. Yukarıdan 2,5 cm boşluk bırakılmıştır. Oksijenle reaksiyonun engellenmesi için su eklenmiş ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için 20 dakika beklenmiştir. Ardından oksijenle tepkimeyi engelleyen su dökülmüş ve ayırıcı (üst) jel için

hazırlanan karışım camlar arasına eklenmiştir. İstenen sayıda kuyucuğa uygun tarak takılmış ve polimerizasyon işlemi için en az 25 dakika beklenmiştir. Kaynatılıp yüklenmeye hazır hale gelen örnekler moleküler ağırlık standardı başta olmak üzere her kuyucuğa 50 µg protein içerecek şekilde yüklenmiştir. 3 saat süresince 80 volt'ta elektroforez yapılmıştır. Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış proteinlerin poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transferi için membranlar kesilmiştir ve 10 dakika transfer çözeltisinde bekletilmiştir. Ardından proteinlerin membrana geçmesi için filtre kağıdı, membran, jel ve filtre kağıdı olmak üzere transfer sandviçi hazırlanmıştır. Transfer işlemi +4°C'de 32 voltta gece boyu akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin membrana transferinin tamamlanmasından sonra membran her biri onar dakika olmak üzere dört kez TBS-T (%0.1 Tween-20 içeren TBS) tamponu ile yıkanmıştır ve yine TBS-T'nin çözücülüğünde %5'lik süt tozu hazırlanarak membran oda ısısında bir saat inkübe edilmiştir. Ardından membranlar %5'lik süt tozu içeren 1:1000 oranında seyreltilmiş HO-1 (OSA-110F,STRESSGEN), HO-2 (OSA-200F,STRESSGEN) veya β-aktin (ab16039, ABCAM) ile içeren solüsyon ile gece boyunca, 4°C'de, çalkalayıcı üzerinde tutulmuştur. Gece boyu primer antikorla muamele edilen membran TBS-T ile 30 dakika boyunca dört kez yıkanmıştır ve 1:80000 oranında seyreltilmiş horseradish peroksidaz sekonder antikor (A2074, Sigma-ALDRICH; A0168, Sigma-ALDRICH) içeren TBS-T solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında membranlar tekrar TBS-T ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirilmiştir.

3.8.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin kemiluminesans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı ile muamele edilen membranlar 5 dk bekleme süresinin sonunda fotoğraf filmi kullanılarak görüntülenmiş ve spesifik antikor bağlanmalarının yeri film üzerinde tespit edilmiştir.

Bilgisayar ortamına aktarılan film paternlerinin İmage J paket programı ile yarı kantitatif analizi yapılmıştır. Sonuçlar HO-1/ β-aktin, HO-2/ β-aktin şeklinde β-aktin proteinine oranlanarak ayrı ayrı hesaplanarak ifade edilmiştir.

3.9. Biyokimyasal Analiz

3.9.1. Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini

Kaspaz-3 DEVD (asp-glu-val-asp) amino asit dizinini tanıyan bir enzimdir. Kullanılan yöntemde; DEVD-pNA substratının kaspaz-3 tarafından kırılması sonrası ortaya çıkan kromofor p-nitroanilin (pNA)'nın spektrofotometrik olarak belirlenmesi söz konusudur. Serbest pNA 405 nm'de absorban artışına neden olmaktadır. Bu artış kontrol hücrelerinin kaspaz-3 aktivite seviyesi ile karşılaştırılarak verilmektedir. Çalışmamızda SN dokularında apoptoz olup olmadığını belirlemek için kaspaz-3 aktivite kiti kullanılmıştır (Millipore-APT165).

Reaktifler

1. Lizis Tamponu (5 ml)
2. Reaksiyon Tamponu (10 ml)
3. Kaspaz-3 Substrat (1 ml): pNA kromoforuna konjuge edilmiş sentetik peptid.
4. pNA standardı (250 µl)

Deneyin Yapılışı

Hayvanlardan alınan beyin dokuları buz üstüne alınmıştır ve bir bisturi yardımıyla substantia nigra çıkarılarak üzeri isimlendirilmiş ependorflara aktarılmıştır. Herhangi bir

işleme tabi tutulmayan dokular 1 gr doku başına 20 ml Lizis Buffer ile homojenize edilmiştir. 10 dakika buz üzerinde inkübasyondan sonra 10.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantları toplanmıştır. Her 60 µl örnek için 10 µl distile su, 20 µl assay buffer ve 10 µl kaspaz-3 substratı konarak plate'e yüklenmiştir. 1 saat 37°C'lik su banyosunda inkübasyondan sonra 405 nm'de absorbansı kaydedilmiştir.

3.10. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme paket program kullanılarak yapılmış ve sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir, anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak belirlenmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır, normal dağılıma uyan parametrik veriler için 'Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)' ve 'Tukey Post Hoc Testi'; parametrik olmayan veriler için ise nonparametrik olan 'Kruskal Wallis Testi' ve takiben 'Mann-Whitney U Testi' kullanılmıştır.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deneye alınan hayvanlarda genel görünüm ve sağlık açısından herhangi bir farklılık izlenmemiştir.

4.2. Ağırlık Değişimi

Deney hayvanlarının haftalara göre ağırlık değişimi **Tablo 4.1**'de verilmiştir. Deney süresi boyunca tüm deney gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıkları takip edilmiş, grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

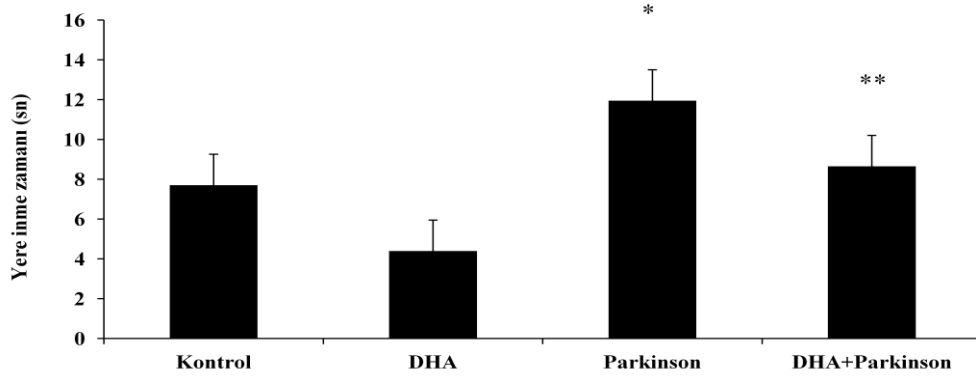
GRUPLAR	1.hafta (g)	2.hafta (g)	3.hafta (g)	4.hafta (g)
Kontrol (K)	22,1±1,49	22,8±1,65	23,50±1,8	22,3±1,67
DHA (D)	25,1±2,36	25,37±1,91	24,5±1,93	24,1±1,83
Parkinson (P)	29,1±2,09	27,5±2,30	28,1±2,47	27,8±2,18
DHA+Parkinson (DP)	27,5±2,06	25,8±1,84	26,2±1,68	26,0±2,09

Tablo 4.1. Haftalara Göre Ağırlık Değişimi

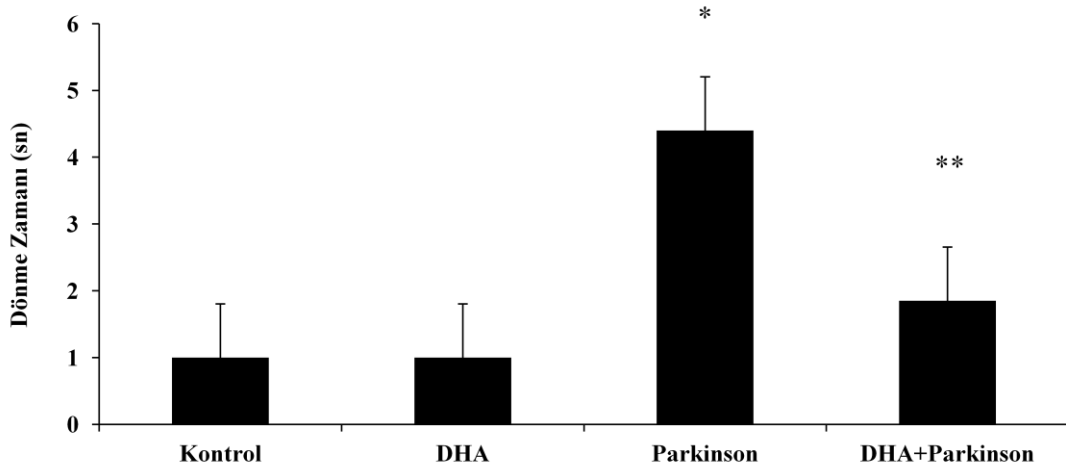
4.3. Motor Aktivite Tayini

Pole (Çubuk)Test

Bradikinezi şiddetinin belirlenmesi için yapılan çubuk testi sonucunda hayvanların yere inme zamanı (**Şekil 4.1**) ve dönme süresinin (**Şekil 4.2**) P grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede uzadığı görülmüştür. Ayrıca DP grubu ile P grubu arasında da anlamlı bir fark gözlenmiş olup sonuç olarak Parkinson hastalığının bradikinezi şiddetini arttırdığı, DHA verilen Parkinson grubunda ise bradikinezinin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Yere İnme Zamanı. *: $p < 0,001$ düzeyinde K grubundan fark; **: $p < 0,001$ düzeyinde P grubundan fark. (n=23)



Şekil 4.2. Dönme Zamanı. *: $p < 0,001$ düzeyinde K grubundan fark; **: $p < 0,001$ düzeyinde P grubundan fark. (n=23)

Rotarod Testi

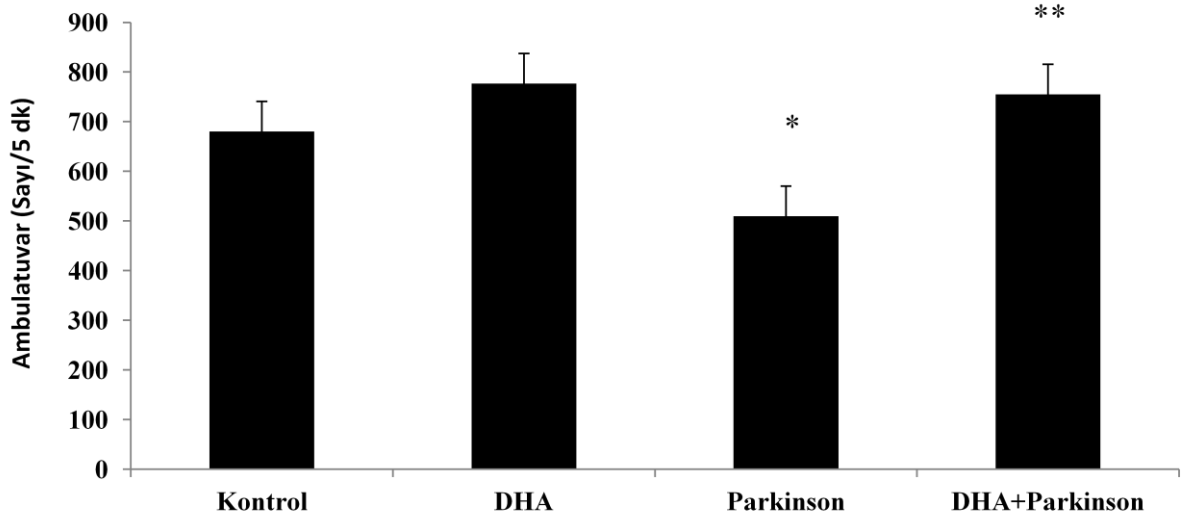
Hayvanların motor koordinasyonunu ve dengeyi tespit etmek amacıyla yapılan rotarod testinde değişen hızlarda (5-40 rpm) kayıt alınarak hayvanların dönen çubuk üzerinde kalma süreleri kaydedilmiştir. 5, 10, 20 ve 30 rpm'de rotarodta kalma süresi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermezken, 40 rpm'de P grubunda rotarodta kalma süresi kontrolle karşılaştırıldığında kısaldığı görülmüştür. Bununla birlikte DP grubunda P grubuna kıyasla dönen mil üzerinde durma yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (Tablo 4.2).

	Rotarodta kalma süresi ortalaması (sn)				
	5 rpm	10 rpm	20 rpm	30 rpm	40 rpm
Kontrol	300±0,01	300±0,01	239,2±32,4	123,1±34,7	139,2±23,8
DHA	300±0,01	300±0,01	236,9±30,6	92,3±19,0	124,8±30,2
Parkinson	300±0,01	300±0,01	173,9±31,4	49,2±18,0	26,7±6,7*
DHA+ Parkinson	300±0,01	300±0,01	224,7±23,9	112,8±34,5	82,9±20,2**

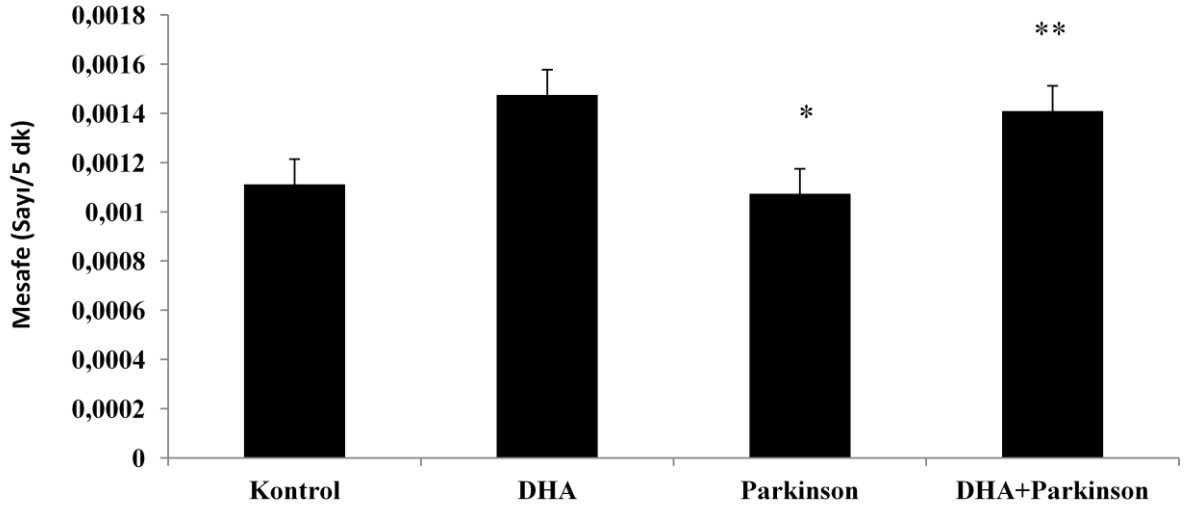
Tablo 4.2. Rotatodta Kalma Süresi (sn). *: p<0,001 düzeyinde K grubundan fark; **: p<0,05 düzeyinde P grubundan fark. (n=23)

Lokomotor Aktivite Testi

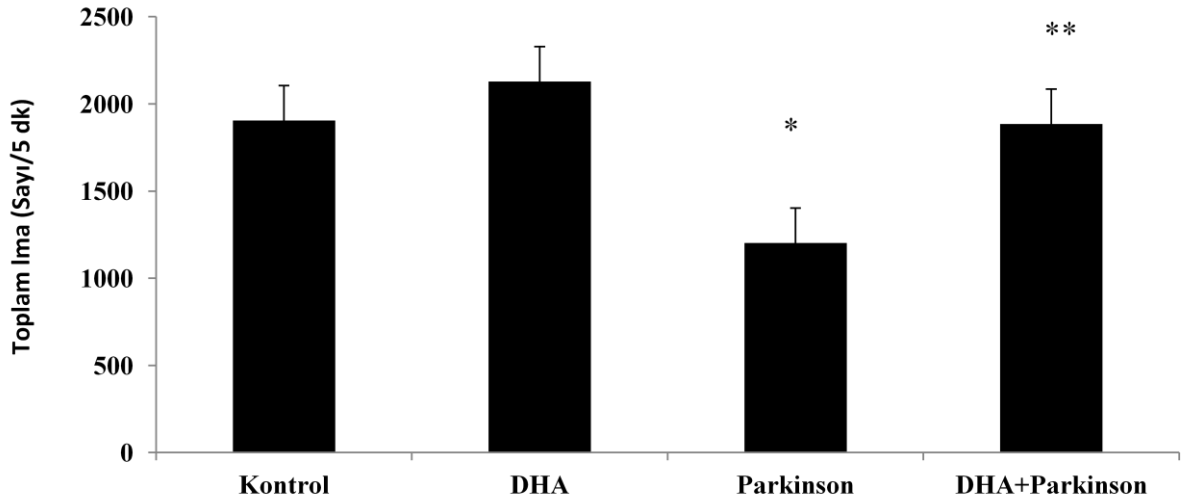
Lokomotor aktivite kafesine konulan hayvanların dolaşimleri ambulatuvar hareket olarak değerlendirilmiş, ambulatuvar hareketin Parkinson'da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı bulunmuş, DHA verilen Parkinson grubunda ise arttığı görülmüştür. Kafesin otomatik olarak verdiği toplam lokomotor aktivite ve toplam mesafeye bakıldığında Parkinson grubunda bu parametrelerin azaldığı, DHA verilen grupta ise lokomotor aktivite parametrelerinin düzeldiği bulunmuştur.



Şekil 4.3. Ambulatuvar Hareket. *: p<0,05 düzeyinde K grubundan fark; **:p<0,05 düzeyinde P grubundan fark. (n=23)



Şekil 4.4. Mesafe. *: $p < 0,05$ düzeyinde K grubundan fark; **: $p < 0,05$ düzeyinde P grubundan fark. (n=23)



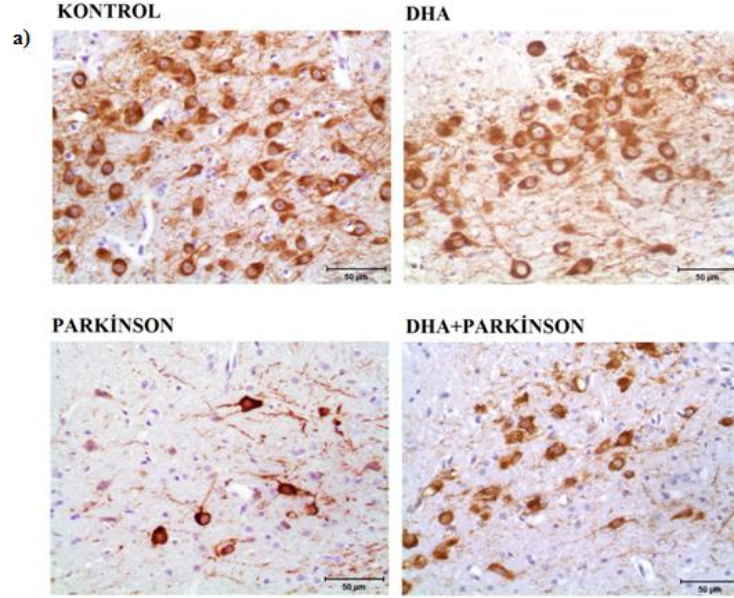
Şekil 4.5. Toplam İma. *: $p < 0,05$ düzeyinde K grubundan fark. **: $p < 0,05$ düzeyinde P grubundan fark. (n=23)

4.4. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

4.4.1. Tirozin Hidroksilaz İmmunoreaktivitesi

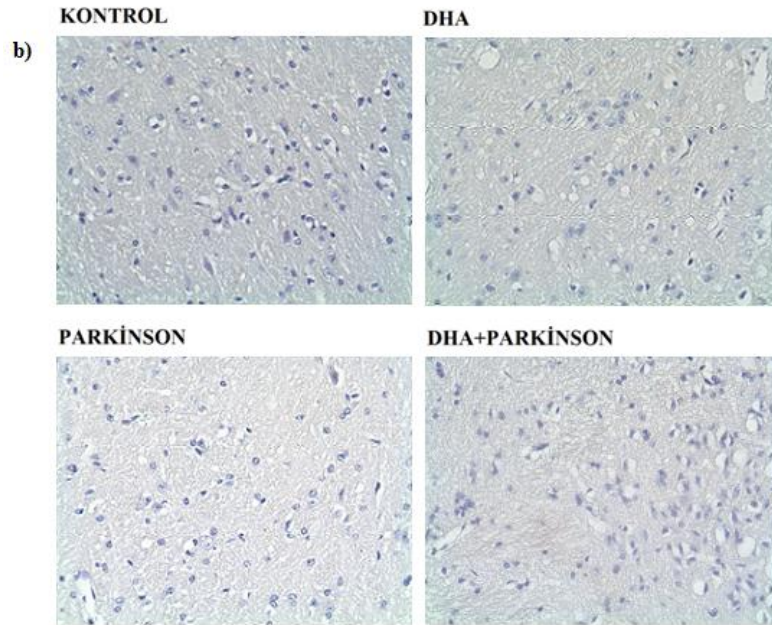
Parkinson hastalığında SN alanında dopaminerjik nöron ölümü gözlenmektedir. İmmunohistokimyasal olarak TH'nin dopaminerjik nöronları işaretlemesiyle hasarın varlığı görülmüştür. Yapılan TH immunoreaksiyonlarına göre, Kontrol ve DHA gruplarında, TH immun boyanmalarında SN alanında dopaminerjik nöron sayısının yoğun olduğu 40x objektif büyütmesinde çekilen resimlerde net olarak görülmüştür (Şekil 4.6). Daha önceki çalışmalarımızda da gösterdiğimiz gibi, Parkinson oluşturulan gruplarda hasara bağlı gözlenen dopaminerjik nöron ölümü, yapılan TH immunohistokimyasında net olarak gözlenmiştir. Aynı alandan çekilen resimlerde nöron sayısının azaldığı dikkati çekmiştir. Ancak DHA+Parkinson grubunda Parkinson gruplarına kıyasla daha fazla dopaminerjik nöronun TH ile boyandığı da dikkati çekmiştir (Şekil 4.6 DHA+Parkinson grubu).

Uygulanan DHA'nın alanda yer alan birçok dopaminerjik nöronu koruduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Parkinson modeli oluşturulan grupta nöron sayısının %75 azaldığı istatistiksel değerlendirmede kontrolle karşılaştırıldığında önemli olduğu bulunmuştur. Parkinson grubu ile karşılaştırıldığında DHA+Parkinson grubunda TH içeren nöron sayısında anlamlı artış olduğu bulunmuştur.

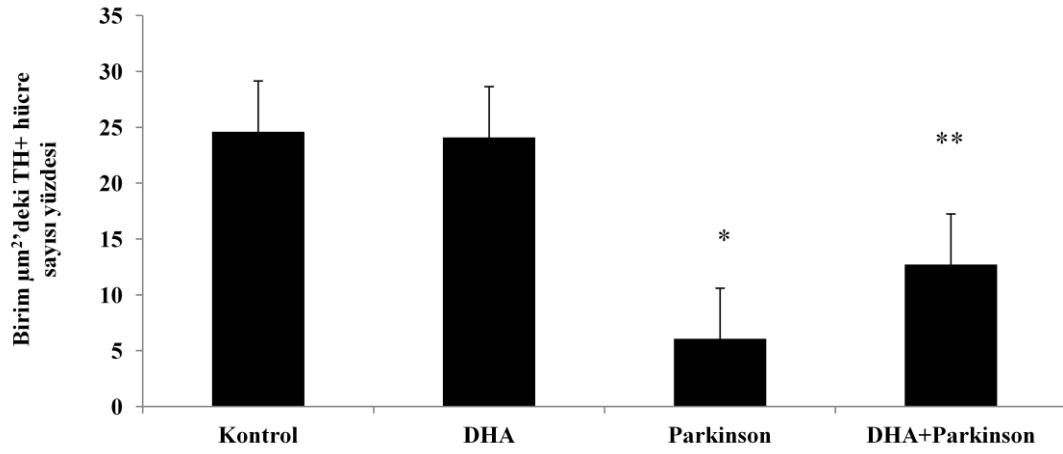


Şekil 4.6.

a) Deneç Gruplarında TH İçin Gözlenen İmmunoreaktivite. 40x büyütme. Ölçek: 50 µm.



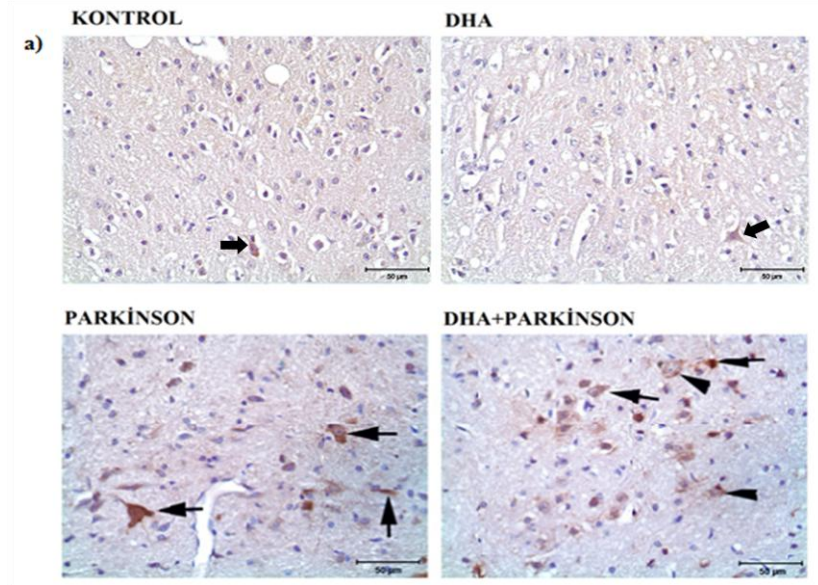
b) Anti-tavşan Ig G İle Saptanan İmmunoreaktivite. Negatif Kontrol Olarak Kullanılmıştır. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



Şekil 4.7. Birim μm^2 'deki TH+ Hücre Sayısı Yüzdesi. *: $p<0,05$ düzeyinde K grubundan fark; **: $p<0,05$ Düzeyinde P Grubundan Fark. Her Grupta 10 Alan Sayılmıştır.

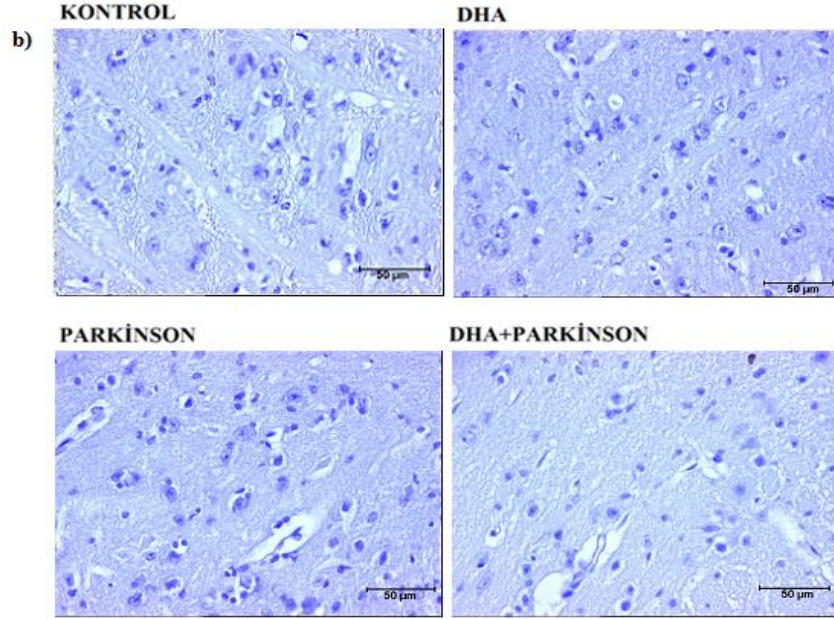
4.4.2. Bax ve Bcl-2 İmmunoreaktivitesi

Bax ve Bcl-2 apoptotik yolakta yer alan sinyal proteinleri olduğundan ekspresyonları da apoptozun tetiklendiğini göstermektedir. Bu anlamda kontrol ve DHA gruplarında; TH ile işaretlenen dopaminerjik nöronların bulunduğu SN alanında, Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarına az olarak rastlanmıştır. P ve DP gruplarında ise bu ekspresyonların arttığı gösterilmiştir.

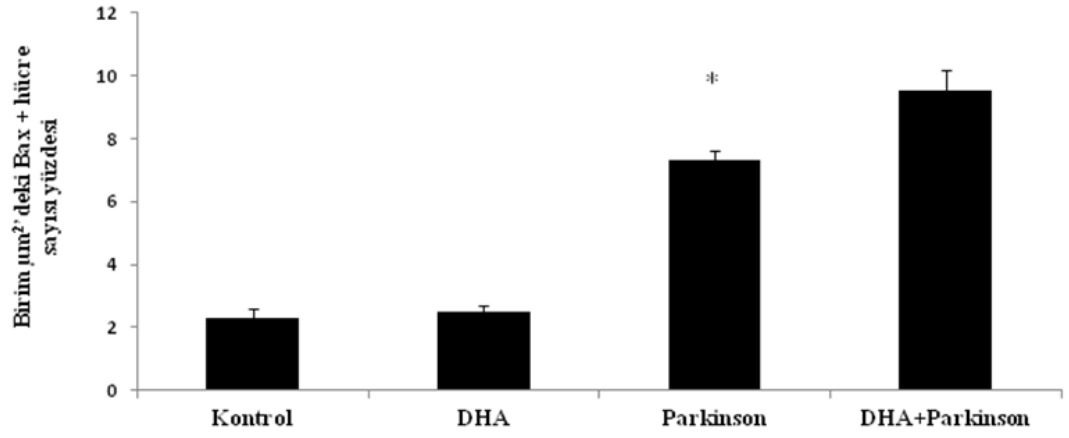


Şekil 4.8.

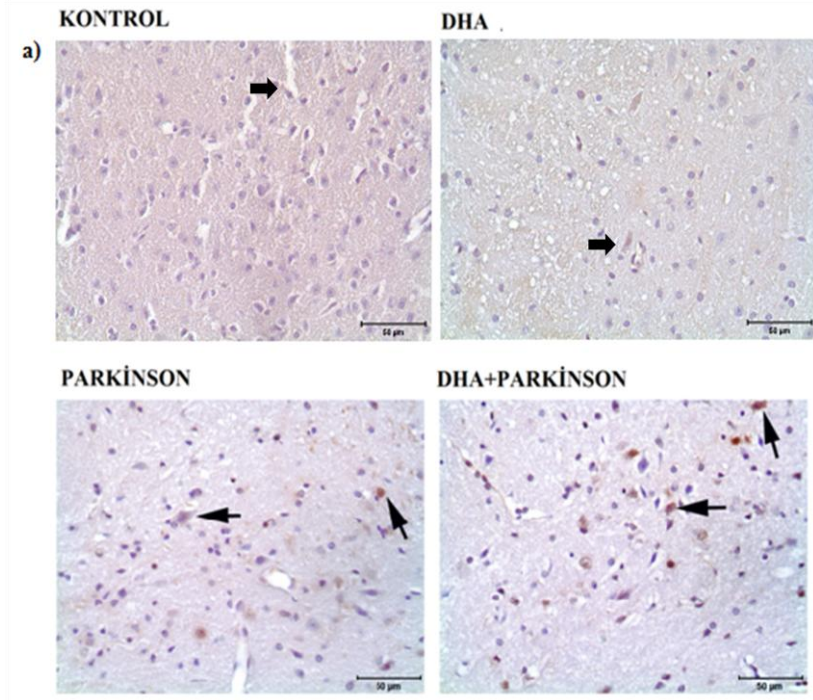
a) Deney Gruplarında Bax İçin Gözlenen İmmunoreaktivite. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



b) Anti-tavşan Ig G İle Saptanan İmmunoreaktivite. Negatif Kontrol Olarak Kullanılmıştır. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.

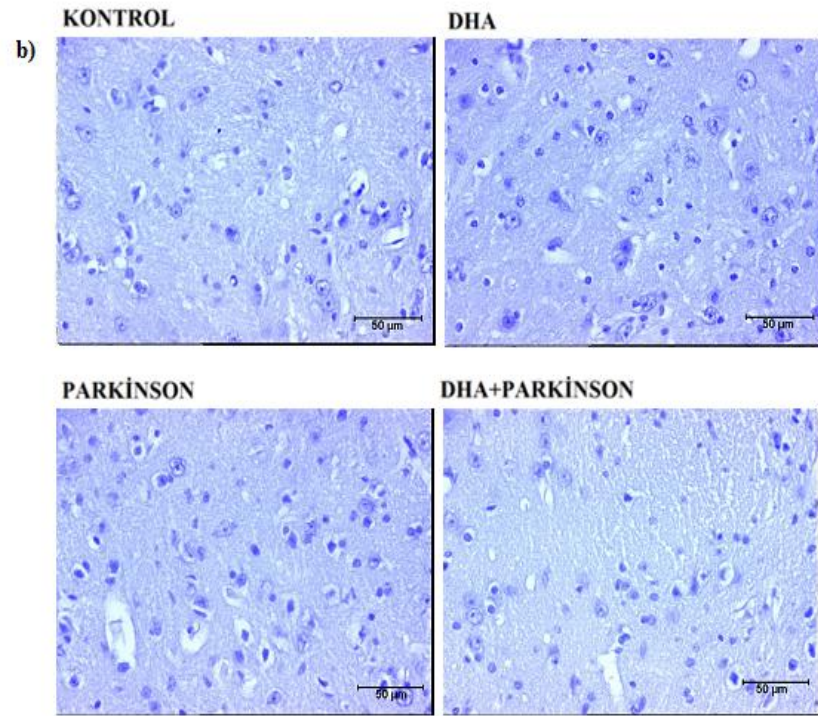


Şekil 4.9. Birim μm^2 'deki Bax+ Hücre Sayısı Yüzdesi. *: $p < 0,05$ Düzeyinde K Grubundan Fark. Her Grupta 10 Alan Sayılmıştır.

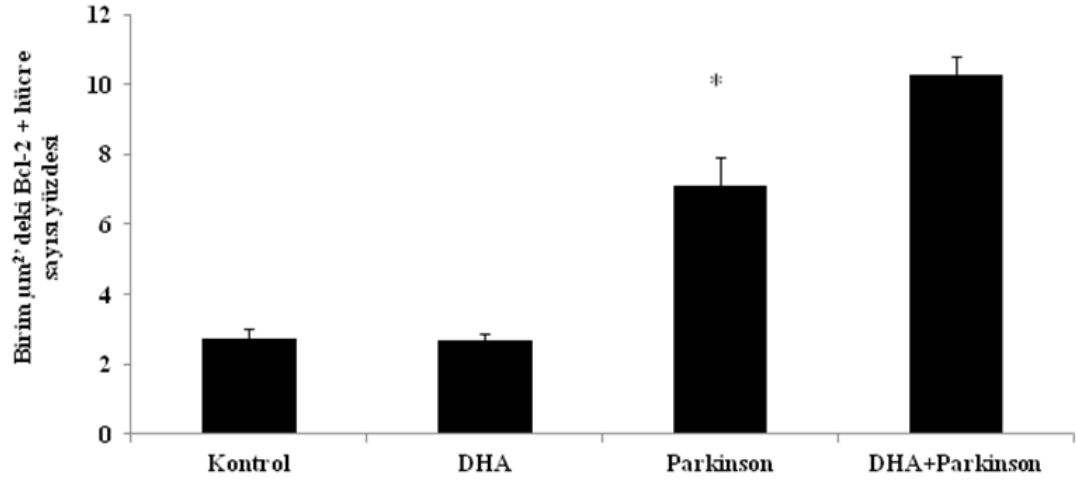


Şekil 4.10.

a) Deney Gruplarında Bcl-2 İçin Gözlenen İmmunoreaktivite. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



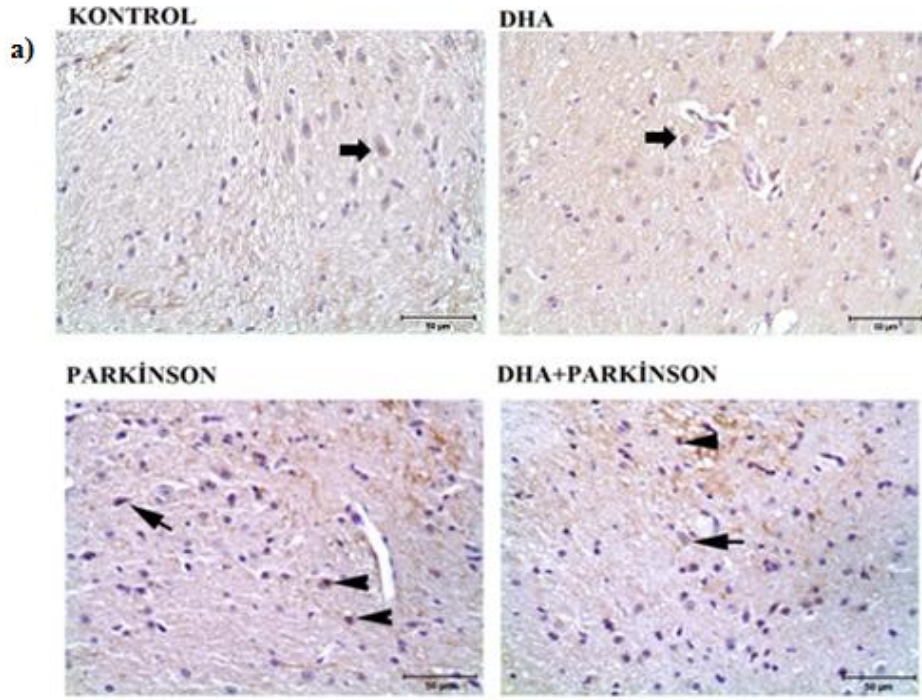
b) Anti-tavşan Ig G İle Saptanan İmmunoreaktivite. Negatif Kontrol Olarak Kullanılmıştır. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



Şekil 4.11. Birim μm^2 'deki Bcl-2+ Hücre Sayısı Yüzdesi. *: $p < 0,05$ Düzeyinde K Grubundan Fark. Her Grupta 10 Alan Sayılmıştır.

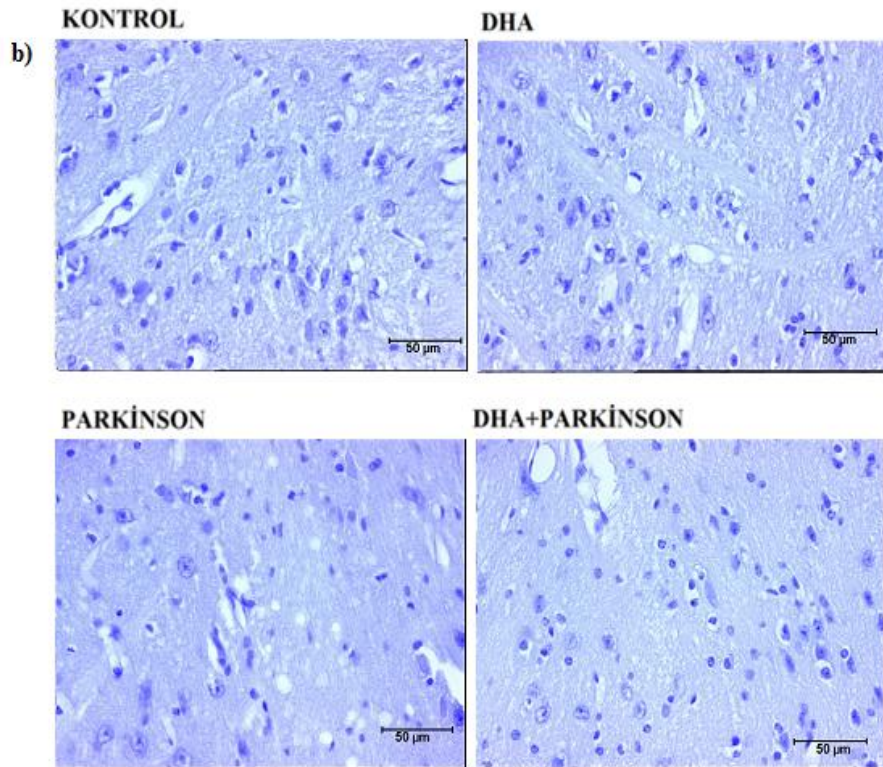
4.4.3. Nrf2 İmmunoreaktivitesi

Parkinson modelinde SN bölgesinde Nrf2 ekspresyonuna sahip nöron sayısının az olduğu görülmüştür. Bu ekspresyonun DHA ve kontrol gruplarında azken, Parkinson grubunda arttığı, DHA uygulanan Parkinson grubunda ise azaldığı fakat kontrolle karşılaştırıldığında artmış olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.12**)

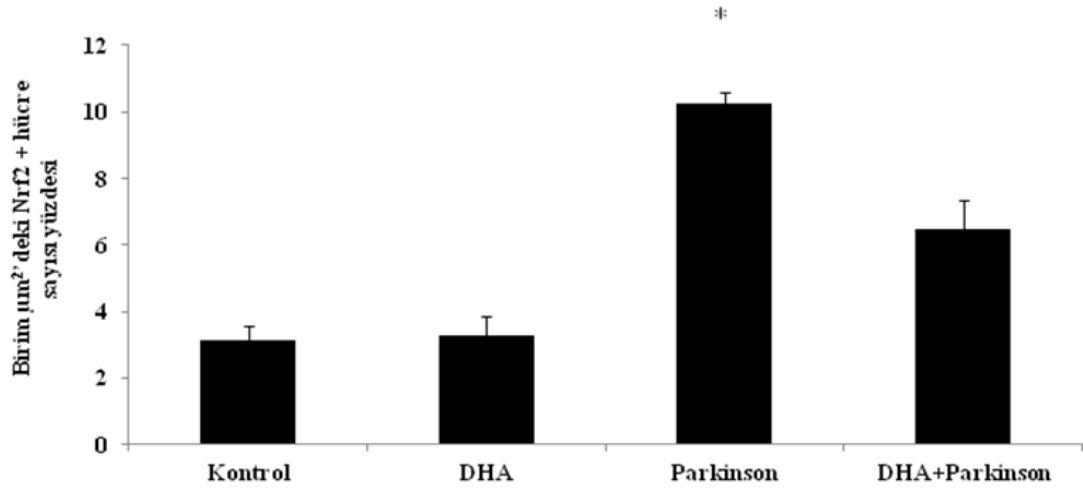


Şekil 4.12.

a) Deney Gruplarında Nrf2 İçin Gözlenen İmmünoaktivite. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm



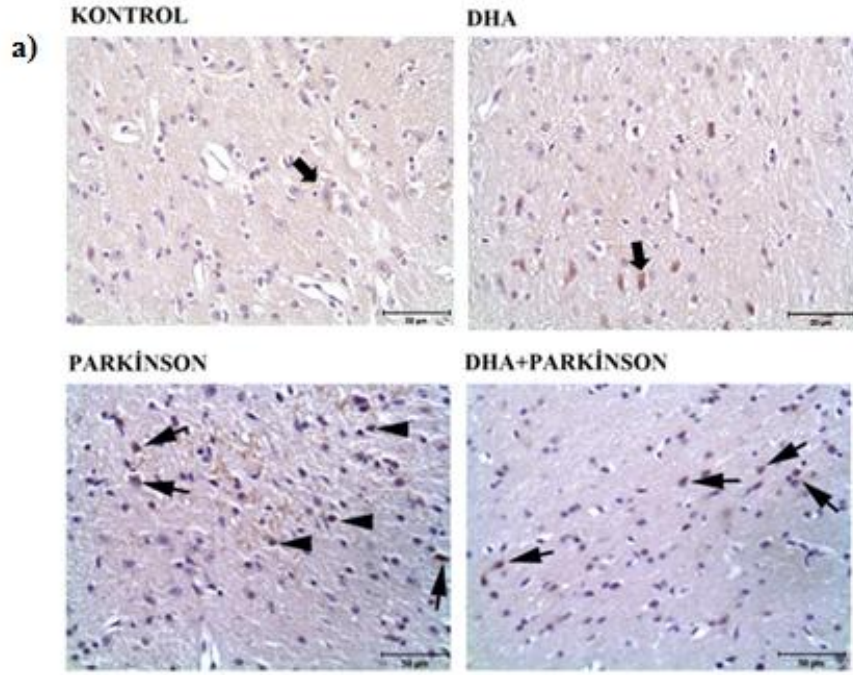
b) Anti-tavşan Ig G İle Saptanan İmmünoaktivite. Negatif Kontrol Olarak Kullanılmıştır. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



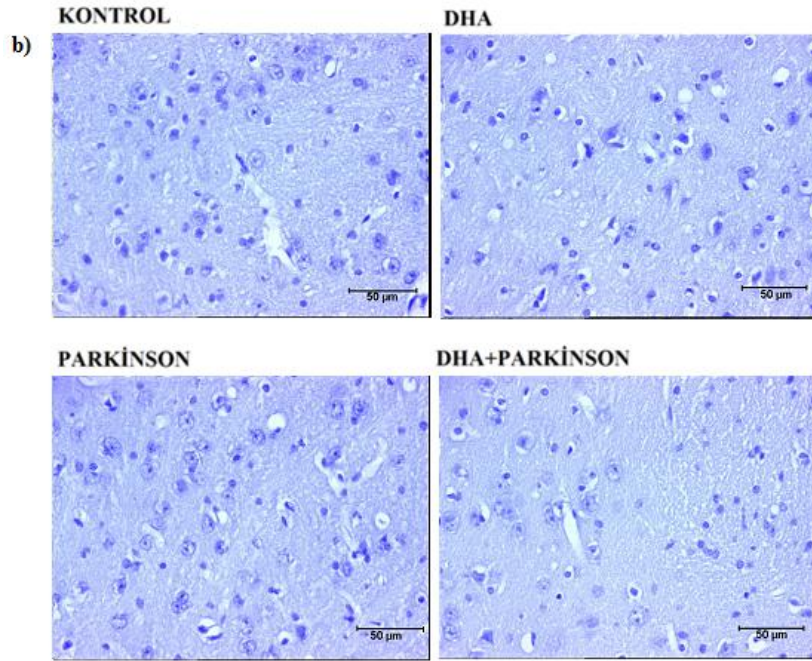
Şekil 4.13. Birim μm^2 'deki Nrf2+ Hücre Sayısı Yüzdesi. *: $p < 0,05$ Düzeyinde K Grubundan Fark. Her Grupta 10 Alan Sayılmıştır.

4.4.4. HO-2 İmmunoreaktivitesi

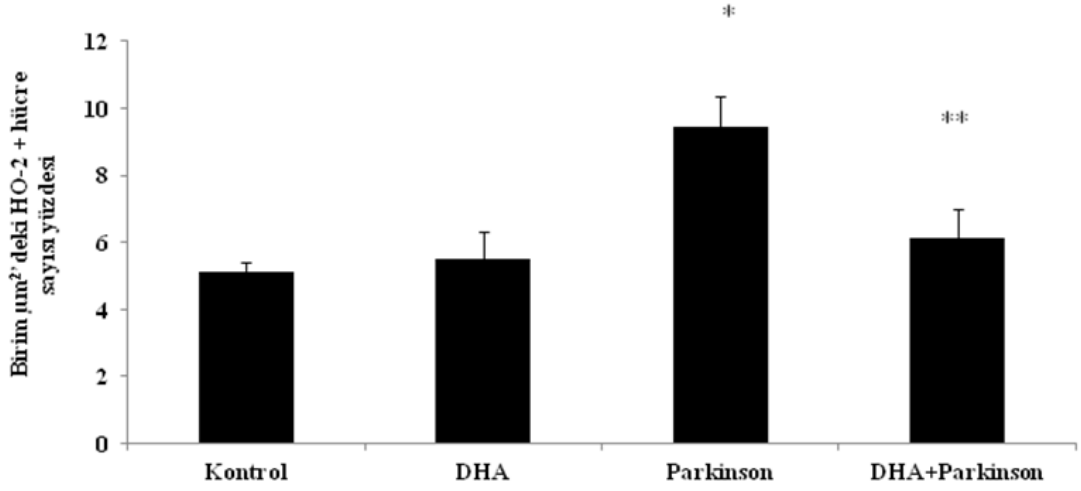
Parkinson gruplarında daha yoğun ekspresyon izlenmekte iken, DHA+Parkinson grubunda ise Parkinson grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (**Şekil 4.14.**)



Şekil 4.14.
a) Deney Gruplarında HO-2 İçin Gözlenen İmmünoreaktivite. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



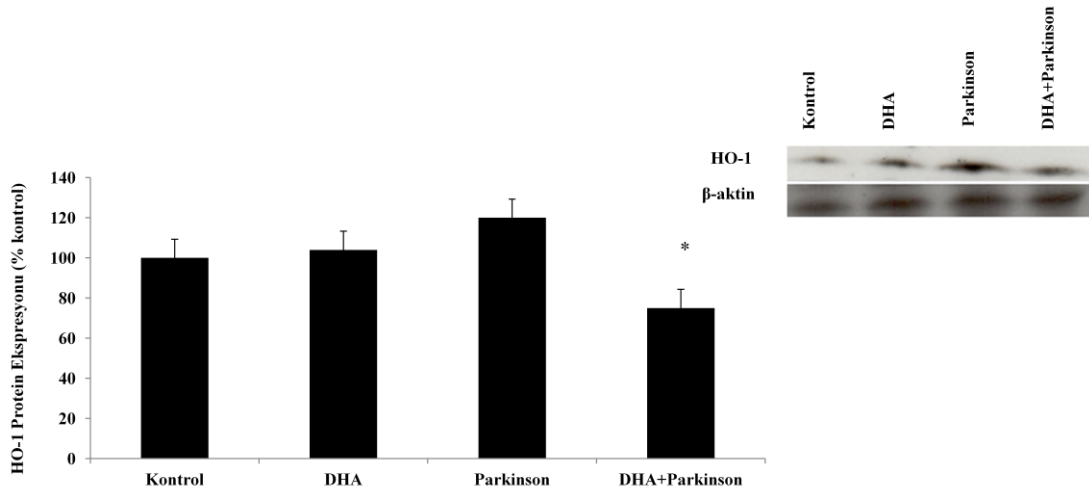
b) Anti-tavşan Ig G İle Saptanan İmmünoreaktivite. Negatif Kontrol Olarak Kullanılmıştır. 40x Büyütme. Ölçek: 50 µm.



Şekil 4.15. Birim μm^2 'deki HO-2 + Hücre Sayısı Yüzdesi. *: $p < 0,05$ Düzeyinde K Grubundan Fark; **: $p < 0,05$ Düzeyinde P Grubundan Fark. Her Grupta 10 Alan Sayılmıştır.

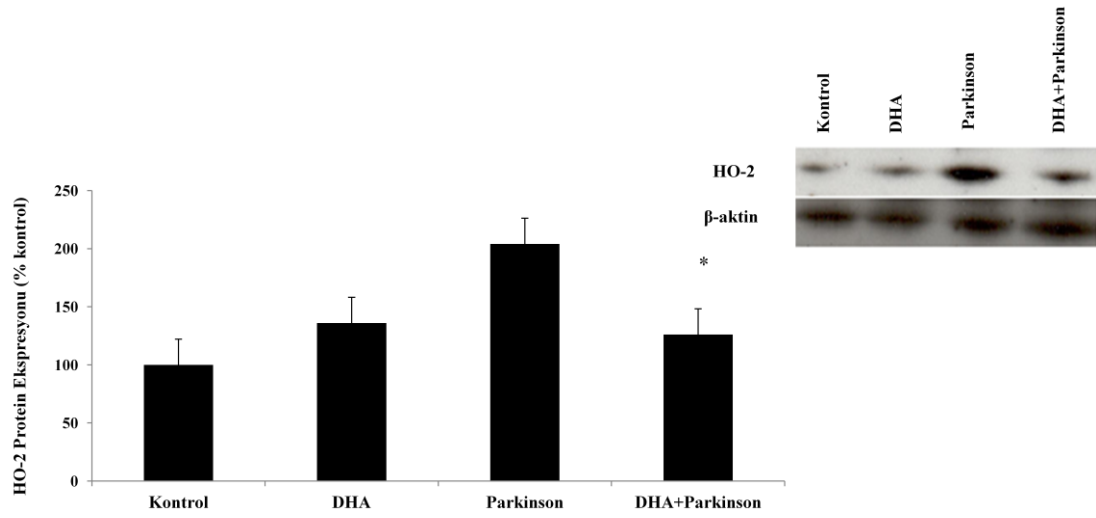
4.5. Western Blot Değerlendirmesi

HO-1 Parkinson grubunda artma eğilimi göstermekle birlikte kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık derecesine ulaşmamıştır. DHA verilen Parkinson grubunun kontrol grubundan farkı bulunmadığı saptanmıştır, Parkinson grubuyla karşılaştırıldığında ise anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (**Şekil 4.16**).



Şekil 4.16. HO-1 Ekspresyonu. *: $p < 0,05$ Düzeyinde P Grubuna Göre Fark. (n=6)

HO-2 Parkinson grubunda artış gösterdiği kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı, DHA verilen Parkinson grubunda ise kontrolden farksız olduğu, Parkinson grubuyla kıyaslandığında ise anlamlı ölçüde azaldığı bulunmuştur (**Şekil 4.17**).



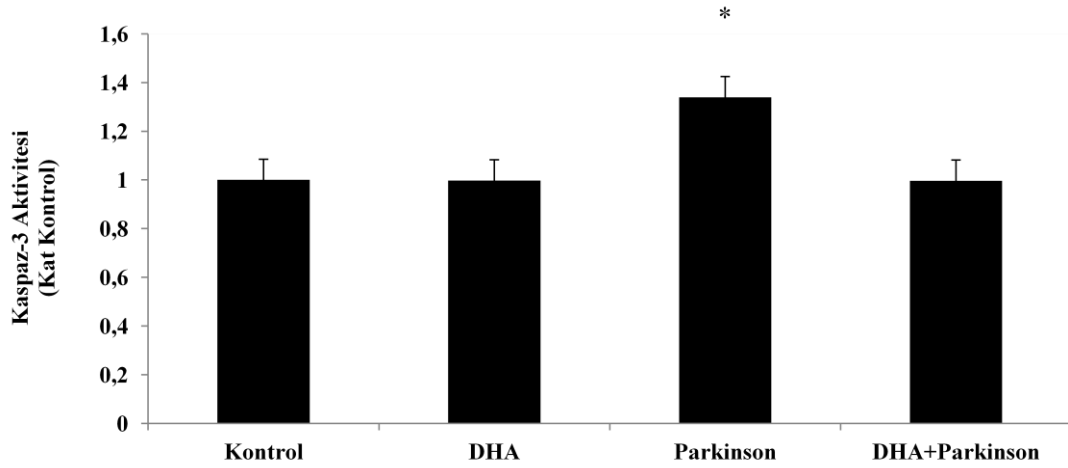
Şekil 4.17. HO-2 Ekspresyonu. *: $p < 0,05$ Düzeyinde P Grubuna Göre Fark. (n=6)

4.6. Biyokimyasal Parametre

Deney gruplarına ait hayvanların SN dokularında kaspaz-3 enzim aktivite değişikliklerine ait grafik aşağıda verilmiştir.

Kaspaz-3 Aktivite Sonucu

Şekil 4.18'de SN'deki kaspaz-3 aktivitesi verilmiştir. P grubundaki kaspaz-3 enzim aktivitesi K ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlenirken P ve DP grupları arasında herhangi bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.18. Kaspaz-3 Aktivitesi. *: $p < 0,05$ düzeyinde K grubundan fark. (n=7)

TARTIŞMA

Yaşam süresi uzadıkça yaşa bağlı ortaya çıkan nörodejeneratif hastalıklar artmaktadır. Bu hastalıklardan biri de Parkinson'dur ve belirli bir grup nöron kaybı ile bilinmektedir. Moleküler mekanizması bilinmemekle birlikte serbest radikallerin artışı, antioksidan sistemin azalması, endoplazmik retikulum stresi, α -sinüklein, bazı çevresel faktörler ve çok az da olsa genetik yapı sorumlu tutulmaktadır [4-7].

İnsanlarda Parkinson modeli oluşturup araştırma yapmak etik olarak mümkün değildir. Dolayısıyla Parkinson hastalığı ile ilgili çalışmalar hayvanlarda yapılmaktadır. Çalışmaların bir kısmı maymunlarda yapılmakla birlikte, hayvan bulma zorlukları ve bakım göz önüne alındığında primatlarda olan çalışmalar kemirgen deney hayvanlarına yönelmiştir [276].

Deney hayvanlarında son yıllarda 3 nörotoksinle Parkinson modeli oluşturulmaktadır. Bu nörotoksinler 6-OHDA'nın hidroksillenmiş analogu toksinlerdir. Dopaminerjik nöronların neredeyse hepsini tahrip eden bu nörotoksin kan beyin bariyerini geçemediği için stereotaksik aletle unilateral ve bilateral olarak uygulanmaktadır [277]. Diğer nörotoksinler ise MPTP, paraquat, rotenon ve maneb denilen tarım ilaçlarıdır. Bu toksinler mitokondride kompleks I veya III'ü inhibe ederek mitokondrilerin bozulmasını sağlarlar [146, 162, 164, 171]. Mevcut çalışmalarda da MPTP Parkinson modeli kullanılmıştır. MPTP kan beyin bariyerini geçmekte, astrositlerde bulunan MAO-B enzimi ile MPP⁺ya dönüşerek dopamin taşıyıcısı (DAT) ile dopaminerjik nöronlara girerek mitokondriye etki ederek ROS üretimine neden olmaktadır. Parkinson çalışmalarına altın standart olarak kabul edilmektedir [146]. MPTP deney hayvanlarına gavaj yoluyla, stereotaksik uygulanabileceği gibi en yaygın kullanılma şekli sistemik, subkutan, intravenöz, intraperitoneal veya intramüsküler uygulanmasıdır [278].

Çalışmamızda C57BL/6 fareler kullanılmıştır. C57BL/6 fare ırkının sistemik MPTP uygulamasına diğer ırklardan daha duyarlı olduğu, dopaminerjik nöronların seçici hasar gördüğü daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [279-280]. Farelere MPTP enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılmış, seçici olarak dopaminerjik nöronların etkilenmesi sağlanmıştır [8]. Doz olarak günde 4 kez, 2 saat ara ile 20 mg/kg dozu uygulanarak Parkinson oluşturulmuştur. Daha önceki çalışmamızda MPTP, 12 saat aralıklarla yaşlı hayvanlara (10-12 aylık) verilmiştir. Literatürler incelendiğinde yaşlı hayvanlara iki saat arayla MPTP verilmesinin ölüm oranını arttıracığı bildirilmiştir [282-283]. Bu çalışmamızda ise hayvanlar 3 aylık olmasından dolayı iki saat arayla akut deney protokolü uygulanmıştır. DHA ile muamele edilen hayvanlara 23. gününde MPTP verilmiştir [37, 281].

Parkinson hastalarında serbest radikallerin artışıyla birlikte hücre membranında doymamış yağ asitlerinde bir azalma olduğu saptanmıştır [284]. Hücre zarında esansiyel yağ asitlerinin azalması aşırı ROS üretimine ve antioksidan sistemin bozulmasına neden olmaktadır [285]. Alınan yağ asitlerinin kan beyin bariyerine geçtiği bilinmektedir. Bu yağ asitlerinin hücre zarındaki fosfolipidleri etkilediği gösterilmiştir [286]. Yağ asitlerinden en

etkili olanı DHA'dır. Amerika'da günlük DHA alınımı 60-80 mg/gün iken tavsiye edilen doz 200-300 mg/gün'dür [287]. Çalışmamızda 36 mg/kg/gün dozu seçilmiş ve hayvanlara mısır özü yağında çözülerek 30 gün süre ile verilmiştir [42, 266].

DeneySEL Parkinson modelinde motor koordinasyonun, dengenin ve lokomotor aktivitenin bozulduğu bilinmektedir. Motor koordinasyon ve denge tayini rotarod testi ile belirlenmiştir [288]. 5, 10, 20, 30 rpm'de gruplar arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. 40 rpm'de ise Parkinson grubunda çubuk üzerinde kalış süresinin kontrol grubuna göre kısaldığı görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar bulunmuştur [289] [290] [291]. DP grubunda çubukta kalış sürelerinin P grubuna göre uzadığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda da DHA'nın motor koordinasyonu düzeltici etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu bulgumuz literatürü destekler niteliktedir [292] [293]. Locomotor aktivite lokomotor kafesi yardımıyla ölçülmüştür. Parkinson modeli oluşturulan hayvanlarda ambulatuvar hareket, toplam mesafe ve total lokomotor aktivite kontrolle karşılaştırıldığında azaldığı saptanmıştır. DHA verilen Parkinson grubunda oluşan azalmanın önlendiği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda DHA uygulamalarının lokomotor aktiviteyi düzeltici etkisi olduğu gösterilmiştir [292]. Bradikinezi şiddetini belirleyen test çubuk testinde ise P grubunda hayvanların geriye dönmesi ve yere inme süreleri uzamıştır. DP grubunda ise bu sürenin kısaldığı bulunmuştur. Parkinson'da hayvanlarda motor koordinasyonunun bozulduğu, lokomotor aktivitenin azaldığı ve bradikinezi olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular Parkinson oluştuğunun bir göstergesidir. DHA verilmesinin ise Parkinson modelinde oluşan motor bozuklukları önlendiği saptanmıştır. Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda geri dönüş zamanının DHA uygulanan Parkinson grubunda kısaldığı fakat anlamlı olmadığı tesbit edilmiştir. Bu çelişkili bulgunun nedeni hayvanların farklı yaş grubunda olması ve sayısının daha az olmasıdır [42].

Parkinson modelinin oluştuğunu gösteren diğer bir gösterge ise histopatolojik TH immunoreaktif hücrelerin sayısını gösteren immunohistokimyasal boyamadır. TH ile boyanmış kesitler değerlendirilmiş, Parkinson grubunda dopaminerjik nöron sayısı kontrole göre %75 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu bulgu Parkinson modelimizin oluştuğunun önemli bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir. DP grubunda ise TH immunoreaktif pozitif nöron sayısının Parkinson grubunun iki katına çıktığı fakat kontrol grubu seviyesine ulaşmadığı tespit edilmiştir. DHA ve kontrol grubu arasında herhangi bir fark izlenmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da bizim bulgumuzu destekler nitelikte olup DHA+MPTP uygulamasının TH immunoreaktif nöron sayısını Parkinson grubuna göre arttırdığı rapor edilmiştir [37, 209, 294].

Parkinson hastalığının etiyopatogenezi tam olarak bilinmemesine rağmen son yıllarda oksidatif stresin nöron apoptozunda önemli rol oynadığı bilinmektedir [5]. Oksidatif stresin oluşmasında değişik yolların rolü vardır. Bunlardan en önemlileri mitokondrideki solunum zincirinde bulunan enzimlerin bozulmaları ve dopamin metabolizmasındaki değişikliktir [295]. Dopaminin otooksidasyonu serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır [296-297]. Parkinson'da COX-2 yolağının aktivitesinin artmasına bağlı olarak serbest radikallerin oluşumu artmaktadır. Ayrıca nNOS ve iNOS aktivitesinin artması NO yapımını ve peroksinitrit oluşumunu arttırmaktadır [297]. Parkinson'da artan serbest radikaller transkripsiyon faktörü olan Nrf2'yi aktiveleştirerek dopaminerjik nöronlara koruyucu etki göstermektedir [298]. Nrf2 antioksidan ve detoksifikasyon genlerini düzenlemektedir. Bu genler HO-1, NAD(P)H, quinon oksidoredüktaz-1 ve diğerleridir. Nrf2 kısa ömürlü olup Kelch protein (Keap1) ile etkileşime girerek daha stabil bir form oluşturmaktadır [299]. Parkinson modeli oluşturmakta kullanılan MPTP'nin serbest radikal artışına neden olduğu bilinmektedir [300]. Artan serbest radikallerin Nrf2 ekspresyonunu arttırdığı, artan Nrf2'nin ise HO-1 ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir [38, 40]. Hem'in degrades edilmesi sonucu açığa çıkan CO, demir ve hızla bilirubinin biliverdine dönüşümünü katalizleyen HO-

1 ekspresyonunun artması, antiinflamatuvar ve antioksidan özellik göstererek nöronları koruduğu bulunmuştur [301]. Nrf2 knock out farelere MPTP uygulanmasında TH immunoreaktivitesi gösteren nöronların azalmasının daha da arttığı izlenmiştir [40]. Antonio Cuadrado ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada HO-1'nin mikrogliaların etkisini azalttığı, buna bağlı olarak antiinflamatuvar sitokinlerin salınımının azaltarak sitoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur [302]. Buradan anlaşılacağı gibi hem oksijenazın antiinflamatuvar ve antioksidan etkisinin daha önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bizim çalışmamızda da immunohistokimyasal boyamalarda Nrf2'nin Parkinson'da arttığı izlenmekte ve bununla uyumlu olarak western blot sonucunda ise HO-1 ekspresyonunda artış görülmektedir. DP grubunda Nrf2'nin immunohistokimyasal olarak azaldığı görülmüştür. Bunu n-3 PUFA'ların Nrf2'nin nükleusa translokasyonunu ve DNA'ya bağlanmasını arttırarak yapmaktadır. Ayrıca DHA uygulaması ARE ile Nrf2'nin bağlanma aktivitesini güçlendirmektedir. HO-1 nadiren nöronlarda eksprese olmakla birlikte daha çok mikroglialarda ve yüksek derecede astrositlerde eksprese olmaktadır [303].

Nrf2 transkripsiyon faktörünü aktifleştiren endojen elektrofiller lipid peroksidasyon ürünü olan α , β doymamış karbonil grupları içeren kimyasallardır. Bunlardan n-6 PUFA'lardan türetilen 4-HNE ve n-3 PUFA'lardan oluşan 4-HHE sistein-tiyol grupları açısından yüksek derecede reaktiftir. n-3 ve n-6 PUFA'lardan türetilen bu elektrofiller antiinflamatuvar ve antioksidatif etkiler göstermektedir [304]. Araştırmalar sonucunda beyin iskemisi sonrasında gerçekleşen lipid peroksidasyon sonucu n-3 PUFA'lardan oluşan 4-HNE'nin, n-6 PUFA'lardan türetilen 4-HHE'den daha güçlü şekilde Nrf2 indükleyicisi olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalarda da DHA'nın serbest radikalleri arttırarak Nrf2 artışına neden olduğu bildirilmiştir [38]. DHA'nın fosfolipaz A2 (PLA2) aracılığı ile hücre zarında araşidonik asit üretimi [305], serbest radikalleri ve Nrf2'yi azalttığı buna bağlı olarak da HO-1'in azaldığı bilinmektedir. DHA'nın tirozin hidroksilaz nöronlarındaki koruyucu etkisini ise Parkinson oluşumunda rolü olan TNF- α , IL-1 β 'yi azaltarak yaptığını söylenebilir [298, 306].

HO-2 ekspresyonun ise Parkinson grubunda kontrole göre arttığı saptanmıştır. HO-2 Nrf2 yanında farklı transkripsiyon faktörleri tarafından ekspresyonu düzenlenen yapısal bir hem oksijenazdır. Yapılan bazı çalışmalarda MPTP verilmesinin HO-2 ekspresyonuna etki etmediği gösterilmiştir [40]. Diğer bir çalışmada ise HO-2'nin nitrik oksit, serbest radikaller, glikokortikoidler ve hücre içi PKC, Ca/calmodulin kinaz-2 ile ekspresyonunun düzenlendiği bildirilmiştir [307]. Parkinson hastalığında glukokortikoidlerin 2 kat arttığı bulunmuştur [308]. Bazı çalışmalarda bunun SN'daki hasarın ilerlemesine katkıda bulunduğu diğer bir çalışmada ise dışarıdan verilen deksametason tedavisinin nöronları koruduğu gösterilmiştir [309]. Bu bilgilere dayanarak HO-2'nin Parkinson grubunda ekspresyonunun artması açıklanabilir. DP grubunda ise HO-2 protein miktarının azaldığı western blot ile tespit edilmiştir. İmmunohistokimyasal bulgular destekler niteliktedir. Oluşan serbest radikallerin nNOS ve iNOS artışına bağlı olarak NO miktarının artmasına neden olduğu bilinmektedir. DHA'nın Ca/calmodulin kinaza ve hücre zarındaki voltaj bağımlı Ca kanallarındaki PKC aktivitesine etki ederek HO-2 ekspresyonundaki bu azalmayı gerçekleştirdiği düşünülmektedir [307].

Ayrıca bulgularımızda Bax ve Bcl-2 miktarının P grubunda arttığı görülmüştür. MPTP oksidatif stres oluşturmaktadır [310]. Bu mitokondri membranındaki depolarizasyonu ve Bax/Bcl-2 arasındaki dengeyi bozmakta ve mitokondriye bağlı apoptotik hücre ölümü gerçekleştirmektedir [118]. Bax'ın mitokondriden sitokrom c salınımına neden olduğu nöronları apoptozis yolağına götürdüğü bulunmuştur [311]. Bax knock out fareler yabancı tipleri ile karşılaştırıldığında Bax olmayan hayvanların MPTP toksisitesine dirençli olduğu görülmüştür [117]. Bcl-2 ise mitokondriden sitokrom c salınımını önleyerek antiapoptotik özellik gösterdiği izlenmiştir [312]. MPTP verilmesinin nöron sayısı daha az olmasına

rağmen Parkinson grubunda Bax ve Bcl-2 protein miktarını arttırdığı, saptanmıştır [41]. DHA verilmesinin DP grubunda Bax ve Bcl-2 miktarını arttırdığı görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda DHA'nın etki mekanizmasında fosfolipaz A2 aktivitesini ve araşidonik asit yapımını inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca DHA 15-Lipoxygenase aracılığıyla NPD1 oluşmasına neden olduğu, NPD1'in ise nöroprotektif ve modulator etki yaptığı saptanmıştır [216,313-314].

Apoptoz göstergesi olan kaspaz-3 aktivitesi SN'de ölçüldüğünde MPTP ile deneysel Parkinson oluşturulan grupta arttığı görülmüştür [42]. DP grubunda ise kaspaz-3 aktivitesinin kontrol grubu ile arasında fark olmadığı, Parkinson grubuna göre ise azaldığı fakat önemli olmadığı görülmüştür. Bunun n sayısı ile açıklanabilmesi mümkün olmakla birlikte kontrolden farkının olmaması DHA verilmesinin apoptozu önlediği izlenimini vermiştir. Bu etki DHA'dan oluşan nöroprotektin D1 aracılığıyla yapılabilmektedir. DHA verilmesiyle TH nöronları korunmasında bu mekanizmaların yanı sıra DHA'nın DAT'a etki ettiğini ve bu yolla DOPA taşınmasını arttırdığı, ayrıca MPTP'yi MPP⁺ye dönüştüren MAO-B enzimini bloke ederek koruyucu etki gösterdiğini, TNF- α , IL-1 β 'yi ekspresyonunu azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur [298] [306]. Ayrıca DHA'nın Parkinson'da bozulan Ca homeostazisine düzenleyici etkisi olduğu, bunu hücre zarındaki Ca kanallarına etki ederek yapılabilmektedir [307].

Sonuç olarak çalışmamızda C57BL/6 farelerine MPTP verilerek oluşturulan deneysel Parkinson modelinde DHA'nın dopaminerjik nöronları koruyucu, lokomotor aktiviteyi düzeltici etkisi olduğu; bulgularımızın ışığı altında DHA'nın HO-1, HO-2 ve Nrf2'ye etkisinden ziyade, antiinflamatuvar özelliği ve serbest radikal oluşumunu inhibe etmesinin daha önemli olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca DHA'nın Ca bağımlı enzimler, hücre membranındaki kanallar ve sinyal mekanizmaları üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Bütün bu mekanizmaların aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

- 1) Deneysel Parkinson modelinde motor koordinasyon, denge ve lokomotor aktivitenin azaldığı, DHA verilmesinin ise lokomotor aktivite ile ilgili parametreleri düzelttiği saptanmıştır.
- 2) Parkinson grubunda kontrole göre SN'de TH immunopozitif nöron sayısının %75 azaldığı, DHA verilmesinin ise Parkinson'a göre TH içeren nöronları iki kat arttırdığı bulunmuştur.
- 3) Nrf2 düzeyinin Parkinson'da az nöron olmasına rağmen arttığı, DHA uygulanan Parkinson grubunda ise azaldığı gösterilmiştir.
- 4) HO-1 ve HO-2 western blot sonuçları incelendiğinde Parkinson'da her iki protein seviyesinin arttığı buna karşın DHA+Parkinson grubunda ise Parkinson ile karşılaştırıldığında azaldığı izlenmiştir.
- 5) Bcl-2 ve Bax ekspresyonlarının Parkinson gruplarında arttığı görülmüştür.
- 6) Apoptoz göstergesi olan kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre Parkinson grubunda arttığı, DHA verilen Parkinson grubunda ise kontrolden herhangi bir fark göstermediği bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Goetz, C.G., The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011. 1(1): p. a008862.
2. Jankovic, J., Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008. 79(4): p. 368-76.
3. McGeer, P.L., et al., Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol*, 1988. 24(4): p. 574-6.
4. Gautier, C.A., Corti, O., Brice, A., Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*, 2014. 170(5): p. 339-43.
5. Youdim M.B, Drigues N, Mandel. S., Oxidative stress indices in Parkinson's disease : biochemical determination. *Methods Mol Med*, 2001. 62: p. 137-53.
6. Niranjana, R., The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol*, 2014. 49(1): p. 28-38.
7. Lim, K.L., Ubiquitin-proteasome system dysfunction in Parkinson's disease: current evidence and controversies. *Expert Rev Proteomics*, 2007. 4(6): p. 769-81.
8. Mandavilli, B.S., Ali, S.F., Houten, B.V., DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment. *Brain Res*, 2000. 885(1): p. 45-52.
9. Dexter, D.T., Carter, C. J., Wells, F. R., et al., Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 1989. 52(2): p. 381-9.
10. Ambani, L.M., Woert, M.H., Murphy, S., Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 1975. 32(2): p. 114-8.
11. Perry, T.L., Godin, D.V., Hansen, S., Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett*, 1982. 33(3): p. 305-10.
12. Balla, J., Jacob, H. S., Balla, G., et al., Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90(20): p. 9285-9.
13. Nagy, E., Jeney, V., Yachie, A., et al., Oxidation of hemoglobin by lipid hydroperoxide associated with low-density lipoprotein (LDL) and increased cytotoxic effect by LDL oxidation in heme oxygenase-1 (HO-1) deficiency. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2005. 51(4): p. 377-85.
14. Ryter, S.W., Alam, J., Choi, A.M., Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 2006. 86(2): p. 583-650.
15. Beltowski, J., Jamroz, A., Borkowska, E., Heme oxygenase and carbon monoxide in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2004. 58: p. 83-99.
16. William K. Mccoubrey Jr, Huang, T.J., Maines, M.D., Isolation and Characterization of a cDNA from the Rat Brain that Encodes Hemoprotein Heme Oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry*, 2004. 247(2): p. 725-732.
17. Abraham, N.G. and Kappas, A., Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 2008. 60(1): p. 79-127.

18. Choi, B.M. and Kim, B.R., Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways and its protective effect against oxidative injury. *Eur J Pharmacol*, 2008. 580(1-2): p. 12-8.
19. Le, W.D., Xie, W.J., Appel, S.H., Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. *J Neurosci Res*, 1999. 56(6): p. 652-8.
20. Thorup, C., Jones, C., L.Gross, S. S., et al., Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol*, 1999. 277(6 Pt 2): p. F882-9.
21. Parfenova, H., Leffler, C. W., Basuroy, S., et al., Antioxidant roles of heme oxygenase, carbon monoxide, and bilirubin in cerebral circulation during seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. 32(6): p. 1024-34.
22. Foresti, R., Bani-Hani, M.G., Motterlini, R., Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med*, 2008. 34(4): p. 649-658.
23. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., et al., An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 236(2): p. 313-22.
24. Schipper, H.M., Liberman, A., Stopa, E.G., Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 1998. 150(1): p. 60-8.
25. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., et al., Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987. 235(4792): p. 1043-6.
26. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., et al., Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 1999. 13(1): p. 76-86.
27. Calkins, M.J., et al., Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(1): p. 244-9.
28. Jakel, R.J., Jakel, R. J., Johnson, D. A., et al., Induction of the protective antioxidant response element pathway by 6-hydroxydopamine in vivo and in vitro. *Toxicol Sci*, 2005. 87(1): p. 176-86.
29. Lee, J.M., Shih, A. Y., Murphy, T. H., et al., NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem*, 2003. 278(39): p. 37948-56.
30. Shih, A.Y., Johnson, D. A., Wong, G., et al., Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*, 2003. 23(8): p. 3394-406.
31. Shih, A.Y., Imbeault, S., Barakauskas, V., et al., Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem*, 2005. 280(24): p. 22925-36.
32. Burton, N.C., Kensler, T.W., Guilarte, T.R., In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. *Neurotoxicology*, 2006. 27(6): p. 1094-100.
33. Chen, P.C., Vargas, M. R., Pani, A. K., et al., Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(8): p. 2933-8.
34. Jakel, R.J., Townsend, J. A., Kraft, A. D., et al., Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res*, 2007. 1144: p. 192-201.
35. Kraft, A.D., Lee, J. M., Johnson, D. A., et al., Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J Neurochem*, 2006. 98(6): p. 1852-65.
36. Satoh, T., Okamoto, S. I., Cui, J., et al., Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(3): p. 768-73.

37. Ozsoy, O., Seval-Celik, Y., Hacıoglu, G., et al., The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 2011. 59(5): p. 664-70.
38. Yang, Y.C., Lii, C. K., Wei, Y. L., et al., Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF-kappaB pathways. *J Nutr Biochem*, 2013. 24(1): p. 204-12.
39. Tsou, Y.H., Shih, C. T., Ching, C. H., et al., Treadmill exercise activates Nrf2 antioxidant system to protect the nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP+ toxicity. *Exp Neurol*, 2015. 263: p. 50-62.
40. Innamorato, N.G., Jazwa, A., Rojo, A. I., et al., Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1. *PLoS One*, 2010. 5(7): p. e11838.
41. Liu, Y., Zeng, X., Hui, Y., et al., Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 2015. 91: p. 87-96.
42. Ozsoy, O., Tanriover, G., Derin, N., 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.
43. Van Den Eeden, S.K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., et al., Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 2003. 157(11): p. 1015-22.
44. de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M. M., et al., Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the Europarkinson Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1997. 62(1): p. 10-5.
45. Dias, V., Junn, E., Mouradian, M.M., The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 2013. 3(4): p. 461-91.
46. Hirsch, E., Graybiel, A.M., Agid, Y.A., Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, 1988. 334(6180): p. 345-8.
47. Dauer, W. and Przedborski, S., Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003. 39(6): p. 889-909.
48. Jellinger, K.A., Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 2002(62): p. 347-76.
49. Leung, H. and Mok, V., Parkinson's disease: aetiology, diagnosis, and management. *Hong Kong Med J*, 2005. 11(6): p. 476-89.
50. Pollanen, M.S., Dickson, D.W., Bergeron, C., Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993. 52(3): p. 183-91.
51. McNaught, K.S., Belizaire, R., Isacson, O., et al., Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 2003. 179(1): p. 38-46.
52. Spillantini, M.G., Crowther, R. A., Jakes, R., et al., alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(11): p. 6469-73.
53. Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H. J., 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.
54. Hornykiewicz, O., The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*, 2006(70): p. 9-15.
55. Henderson JM, Carpenter, K., Cartwright H., Degeneration of the centromedian-parafascicular complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, 2000. 47(3): p. 345.
56. Camicioli R, M.M., Kinney A, Corbridge E., Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy. *Mov Disord.* , 2003. 18(7): p. 784.

57. Rajput, A.H., Rozdilsky, B., Rajput, A., Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can J Neurol Sci*, 1991. 18(3): p. 275-8.
58. Hughes, A.J., Daniel, S. E., Kilford, L., et al., Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992. 55(3): p. 181-4.
59. Gibb, W.R., Accuracy in the clinical diagnosis of parkinsonian syndromes. *Postgrad Med J*, 1988. 64(751): p. 345-51.
60. Hoehn, M.M and Yahr, M.D., Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 1967. 17(5): p. 427-42.
61. Aarsland, D., Tandberg, E., Larsen, J. P., et al., Frequency of dementia in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 1996. 53(6): p. 538-42.
62. Mayeux, R., Chen, J., Mirabello, E., et al., An estimate of the incidence of dementia in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology*, 1990. 40(10): p. 1513-7.
63. Mayeux R, S.Y., Rosen J, et al., Depression, intellectual impairment and Parkinson disease. *Neurology*, 1981. 31(6): p. 645-650.
64. Gerfen, C.R., Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci*, 2000. 23(10 Suppl): p. S64-70.
65. Bamford, N.S., Robinson, S., Palmiter, R. D., et al., Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci*, 2004. 24(43): p. 9541-52.
66. Ryoo HL, P.D., Joyce JN, Dopamine D3 receptor is decreased and D2 receptor is elevated in the striatum of Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 1998. 13((5)): p. 788.
67. Calabresi, P., Centonze, D., Bernardi, G., Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci*, 2000. 23(10 Suppl): p. S57-63.
68. Moore, H and Grace, A.A., A role for electrotonic coupling in the striatum in the expression of dopamine receptor-mediated stereotypies. *Neuropsychopharmacology*, 2002. 27(6): p. 980-92.
69. Huot, P., Levesque, M., Parent, A., The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Brain*, 2007. 130(Pt 1): p. 222-32.
70. Huot, P and Parent, A., Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *J Neurochem*, 2007. 101(6): p. 1441-7.
71. Bezard, E., Gross, C.E., Brotchie, J.M., Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci*, 2003. 26(4): p. 215-21.
72. Adams, J.R., van Netten, H., Schulzer, M., et al., PET in LRRK2 mutations: comparison to sporadic Parkinson's disease and evidence for presymptomatic compensation. *Brain*, 2005. 128: p. 2777-85.
73. Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., et al., Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 2014. 112: p. 24-49.
74. Feany, M.B., New genetic insights into Parkinson's disease. *N Engl J Med.*, 2004. 351(19): p. 1937-40.
75. Meredith, G.E., Halliday, G.M., Totterdell, S., A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation. *Parkinsonism Relat Disord*, 2004. 10(4): p. 191-202.
76. Spillantini, M.G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., et al., Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997. 388(6645): p. 839-40.
77. Lashuel, HA., Wall, P.B., Simon M., Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol.*, 2002. 322(5): p. 1089.
78. Xiong, H., Wang, D., Chen, L., et al., Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*, 2009. 119(3): p. 650-60.

79. Starkov, A.A., The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1147: p. 37-52.
80. Winklhofer, K.F and Haass, C., Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1802(1): p. 29-44.
81. Schapira, A.H., Cooper, J. M., Dexter, D., et al., Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 1990. 54(3): p. 823-7.
82. Hattori, N., Tanaka, M., Ozawa, T., et al., Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1991. 30(4): p. 563-71.
83. Parker, W.D., Parks, J.K., Swerdlow, R.H., Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res*, 2008. 1189: p. 215-8.
84. Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., et al., Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 163(3): p. 1450-5.
85. Mytilineou, C., Werner, P., Molinari, S., et al., Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 1994. 8(3): p. 223-8.
86. Haas, R.H., Nasirian, F., Nakano, K., et al., Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1995. 37(6): p. 714-22.
87. Krige, D., Carroll, M. T., Cooper, J. M., et al., Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol*, 1992. 32(6): p. 782-8.
88. Blin, O., Desnuelle, C., Rascol, O., et al., Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neurol Sci*, 1994. 125(1): p. 95-101.
89. Yoshino, H and Nakagawa-Hattori, Y., Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 1992. 4(1): p. 27-34.
90. Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. *The Journal of Neuroscience:the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2006. 26: p. 5256–5264.
91. Isobe, C., Abe, T., Terayama, Y., Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. *J Neurol*, 2010. 257(3): p. 399-404.
92. Swerdlow, R.H., Parks, J. K., Cassarino, D. S., et al., Biochemical analysis of cybrids expressing mitochondrial DNA from Contursi kindred Parkinson's subjects. *Experimental Neurology*, 2001. 169(2): p. 479-485.
93. Choi, W.S., Kruse, S. E., Palmiter, R. D., et al., Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(39): p. 15136-41.
94. Ahlskog, J.E., Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2005. 20(3): p. 271-82.
95. Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., et al., S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, 2006. 441(7092): p. 513-7.
96. Eguchi, K., Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*, 2001. 40(4): p. 275-84.
97. Mattson, M.P., Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. 1(2): p. 120-9.
98. Horvitz, H.R., Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, 1999. 59(7 Suppl): p. 1701s-1706s.

99. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., et al., Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2861-74.
100. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., et al., Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2006. 13(9): p. 1423-33.
101. Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P. J., et al., Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*, 2004. 23(10): p. 2134-45.
102. Chinnaiyan, A.M., The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1999. 1(1): p. 5-15.
103. van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., et al., The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*, 2002. 9(10): p. 1031-42.
104. Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., et al., Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001. 410(6828): p. 549-54.
105. Enari M1, S.H., Yokoyama H, Okawa K., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998. 391(6662): p. 43-50.
106. Cory, S and Adams, J.M., The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(9): p. 647-56.
107. Chau, B.N., Cheng, E. H., Kerr, D. A., et al., Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell*, 2000. 6(1): p. 31-40.
108. Reed, J.C., Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 2000. 157(5): p. 1415-30.
109. Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001. 104(4): p. 487-501.
110. Ashkenazi, A and Dixit, V.M., Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1305-8.
111. Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., et al., TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*, 1997. 272(51): p. 32401-10.
112. Peter, M.E and Krammer, P.H., Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(5): p. 545-51.
113. Suliman, A., Lam, A., Datta, R., et al., Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 2001. 20(17): p. 2122-33.
114. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., et al., Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 1995. 14(22): p. 5579-88.
115. He Y, L.T and Leong S.K., 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res.*, 2000. 858(1): p. 163-6.
116. Zuch, C.L., Nordstroem, V. K., Briedrick, L. A., et al., Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol*, 2000. 427(3): p. 440-54.
117. Yamada, M., Oligino, T., Mata, M., et al., Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(7): p. 4078-83.
118. Vila, M., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., et al., Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(5): p. 2837-42.
119. Hassouna, I., Wickert, H., Zimmermann, M., et al., Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci Lett*, 1996. 204(1-2): p. 85-8.

120. Benarroch, E.E., Brain iron homeostasis and neurodegenerative disease. *Neurology*, 2009. 72(16): p. 1436-40.
121. Oakley AE, Dobson, C.J., Perrott HR., et al., Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology*, 2007. 68((21)): p. 1820.
122. Dusek, P., Jankovic, J., Le, M., Iron dysregulation in movement disorders. *Neurobiol Dis*, 2012. 46(1): p. 1-18.
123. Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. I., et al., Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med*, 2012. 18(2): p. 291-5.
124. Hirsch, E.C and Hunot, S., Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 2009. 8(4): p. 382-97.
125. Hirsch, E.C., Jenner, P.,Przedborski, S., Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2013. 28(1): p. 24-30.
126. Brochard, V., Prigent, A., Laouar, Y., Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.*, 2009. 119((1)): p. 182.
127. Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., et al., Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2005. 57(2): p. 168-75.
128. Polymeropoulos, M.H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., et al., Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, 1996. 274(5290): p. 1197-9.
129. Brice, A., Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain*, 2005. 128(Pt 12): p. 2760-2.
130. Giasson, B.I., Covy, J. P., Bonini, N. M., et al., Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann Neurol*, 2006. 59(2): p. 315-22.
131. Wszolek, Z.K., Pfeiffer, R. F., Tsuboi, Y., et al., Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology*, 2004. 62(9): p. 1619-22.
132. Poole, A.C., Thomas, R. E., Andrews, L. A., et al., The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(5): p. 1638-43.
133. Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B. S., et al., Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(27): p. 9691-6.
134. Malgieri, G and Eliezer, D., Structural effects of Parkinson's disease linked DJ-1 mutations. *Protein Sci*, 2008. 17(5): p. 855-68.
135. Anderson, P.C. and V. Daggett, Molecular basis for the structural instability of human DJ-1 induced by the L166P mutation associated with Parkinson's disease. *Biochemistry*, 2008. 47(36): p. 9380-93.
136. Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., et al., Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 2006. 38(10): p. 1184-91.
137. Davis, G.C., Williams, A. C., Markey, S. P., et al., Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*, 1979. 1(3): p. 249-54.
138. Langston, J.W., Forno, L. S., Tetrud, J., 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.
139. Moratalla, R., Quinn, B., DeLanney, L. E., et al., Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(9): p. 3859-63.
140. Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., et al., Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Neuropathologic considerations. Advances in Neurology* 1993. 60: p. 600-608.

141. Hantraye, P., Varastet, M., Peschanski, M., et al., Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience*, 1993. 53(1): p. 169-78.
142. Varastet, M., Riche, D., Maziere, M., et al., Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 1994. 63(1): p. 47-56.
143. Heikkila, R.E., A. Hess, and R.C. Duvoisin, Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, 1984. 224(4656): p. 1451-3.
144. Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E. B., et al., 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett*, 1984. 48(1): p. 87-92.
145. Markey, S.P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., et al., Intra-neuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*, 1984. 311(5985): p. 464-7.
146. Hasegawa, E., Kang, D., Sakamoto, K., et al., A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1997. 337(1): p. 69-74.
147. Chan, P., DeLanney, L. E., Irwin, I., et al., Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem*, 1991. 57(1): p. 348-51.
148. Przedborski, S., Levivier, M., Jiang, H., et al., Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, 1995. 67(3): p. 631-47.
149. Fabre, E., Monserrat, J., Herrero, A., et al., Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J Physiol Biochem*, 1999. 55(4): p. 325-31.
150. Desai, D., Michalak, M., Singh, N. K., et al., Inhibition of retinoic acid receptor function and retinoic acid-regulated gene expression in mouse melanoma cells by calreticulin. A potential pathway for cyclic AMP regulation of retinoid action. *J Biol Chem*, 1996. 271(25): p. 15153-9.
151. Piao, Y., et al., Overexpression of TFAM, NRF-1 and myr-AKT protects the MPP⁺-induced mitochondrial dysfunctions in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1820(5): p. 577-85.
152. Burte, F., Kim, H. G., Oh, M. S., et al., Alterations in the mitochondrial proteome of neuroblastoma cells in response to complex 1 inhibition. *J Proteome Res*, 2011. 10(4): p. 1974-86.
153. Zhang, H.N., An, C.N., and Pu, X.P., Protocatechuic acid inhibits neurotoxicity induced by MPTP in vivo. *Neurosci Lett*, 2010. 474(2): p. 99-103.
154. Hoang, T., Choi, D. K., Nagai, M., et al., Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(7): p. 1049-56.
155. Muller, T., Buttner, T., Gholipour, A. F., et al., Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2003. 341(3): p. 201-4.
156. Javitch, J.A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M., et al., Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(7): p. 2173-7.
157. Mayer, R.A., Kindt, M.V., and Heikkila, R.E., Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J Neurochem*, 1986. 47(4): p. 1073-9.

158. Bezdard, E., Gross, C. E., Fournier, M. C., et al., Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol*, 1999. 155(2): p. 268-73.
159. Liu, Y., Roghani, A., and Edwards, R.H., Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(19): p. 9074-8.
160. Ramsay, R.R. and T.P. Singer., Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem*, 1986. 261(17): p. 7585-7.
161. Klaidman, L.K., Adams, J. D., Leung, A. C., et al., Redox cycling of MPP+: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*, 1993. 15(2): p. 169-79.
162. Takahashi, N., Miner, L. L., Sora, I., et al., VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(18): p. 9938-43.
163. Nicklas, W.J., Youngster, S. K., Kindt, M. V., et al., MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci*, 1987. 40(8): p. 721-9.
164. Davey, G.P. and J.B. Clark, Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem*, 1996. 66(4): p. 1617-24.
165. Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., et al., 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. 170(3): p. 1049-55.
166. Ungerstedt, U., 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 1968. 5: p. 107-110.
167. Cohen, G., and Werner, P., Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. In *Neurodegenerative Diseases*, D.B. Calne, 1994: p. pp. 139-161.
168. Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., 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.
169. Jeon, B.S., Jackson-Lewis. V and Burke, R.E., 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration*, 1995. 4(2): p. 131-7.
170. Sauer, H. and W.H. Oertel, Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 1994. 59(2): p. 401-15.
171. Nicholls, D.G., Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1147: p. 53-60.
172. Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C. M., et al., Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2003. 23(34): p. 10756-64.
173. Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., et al., Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 2000. 3(12): p. 1301-6.
174. Couzin, J., Clinical research. Testing a novel strategy against Parkinson's disease. *Science*, 2007. 315(5820): p. 1778.
175. Shults, C.W., Beal, M. F., Fontaine, D., et al., Absorption, tolerability, and effects on mitochondrial activity of oral coenzyme Q10 in parkinsonian patients. *Neurology*, 1998. 50(3): p. 793-5.

176. Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G. W., et al., Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, 2011. 119(6): p. 866-72.
177. Prasad, K., Winnik, B., Thiruchelvam, M. J., et al., Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. *Environ Health Perspect*, 2007. 115(10): p. 1448-53.
178. Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., et al., Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res*, 2001. 906(1-2): p. 135-42.
179. Brooks, A.I., Chadwick, C. A., Gelbard, H. A., et al., Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res*, 1999. 823(1-2): p. 1-10.
180. McCormack, A.L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A. B., et al., Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*, 2002. 10(2): p. 119-27.
181. Ossowska, K., Wardas, J., Smialowska, M., et al., A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci*, 2005. 22(6): p. 1294-304.
182. Richardson J. R., Quan. Y., Sherer T. B., et al., Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol. Sci.*, 2005. 88(1): p. 193–201.
183. Cochemé HM, Murphy, M.M., Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem.*, 2008. 283(4): p. 1786-98.
184. Jones, G.M. and J.A. Vale, Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2000. 38(2): p. 123-8.
185. Yang, W. and Tiffany-Castiglioni, E., The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. *J Toxicol Environ Health A*, 2005. 68(22): p. 1939-61.
186. Fahn, S., The History of Levodopa as it Pertains to Parkinson's disease. *Movement Disorder Society's 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders 2006*. Kyoto, Japan.
187. Benes, F.M., Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. 22(1): p. 46-7.
188. Daubner, S.C., Le, T., Le, and Wang, S., Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 2011. 508(1): p. 1-12.
189. Dahlstroem, A. and K. Fuxe, Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1964: p. suppl 232:1-55.
190. Christine, C.W. and Aminoff, M.J., Clinical differentiation of parkinsonian syndromes: prognostic and therapeutic relevance. *Am J Med*, 2004. 117(6): p. 412-9.
191. Bjorklund, A. and Dunnett, S.B., Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, 2007. 30(5): p. 194-202.
192. DeLong, M. and Wichmann, T., Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clin EEG Neurosci*, 2010. 41(2): p. 61-7.
193. Paulus, W. and Schomburg, E.D., Dopamine and the spinal cord in restless legs syndrome: does spinal cord physiology reveal a basis for augmentation? *Sleep Med Rev*, 2006. 10(3): p. 185-96.
194. Ben-Jonathan, N. and Hnasko, R., Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*, 2001. 22(6): p. 724-63.
195. Witkovsky, P., Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol*, 2004. 108(1): p. 17-40.

196. Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., et al., The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci*, 2002. 17: p. 51-5.
197. Calabresi, P., Picconi, B.,Tozzi, A., et al., Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 2007. 30(5): p. 211-9.
198. Bousquet, M., Calon, F., and Cicchetti, F., Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Res Rev*, 2011. 10(4): p. 453-63.
199. Rapoport, S.I., Chang, M.C., and Spector, A.A., Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res*, 2001. 42(5): p. 678-85.
200. Chen, C.T., Ma, D. W., Kim, J. H., et al., The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *J Lipid Res*, 2008. 49(1): p. 147-52.
201. Hamilton, J.A. and Brunaldi, K., A model for fatty acid transport into the brain. *J Mol Neurosci*, 2007. 33(1): p. 12-7.
202. Barcelo-Coblijn, G. and Murphy, E.J., Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*, 2009. 48(6): p. 355-74.
203. Sprecher, H., Chen, Q., and Yin, F.Q., Regulation of the biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n-3: a complex intracellular process. *Lipids*, 1999. 34 Suppl: p. S153-6.
204. Sprecher, H., Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1486(2-3): p. 219-31.
205. Su, H.M., Moser, A. B., Moser, H. W., et al., Peroxisomal straight-chain Acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis. *J Biol Chem*, 2001. 276(41): p. 38115-20.
206. Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., et al., Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res*, 2005. 46(4): p. 706-15.
207. Bazinet, R.P., Rao, J.S., Chang, L., Chronic valproate does not alter the kinetics of docosahexaenoic acid within brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2005. 182(1): p. 180-185.
208. Calon, F. and Cole, G., Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2007. 77(5-6): p. 287-93.
209. Saravanan, P., Davidson, N. C., Schmidt, E. B., et al., Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, 2010. 376(9740): p. 540-50.
210. Tanriover, G., Seval-Celik, Y., Ozsoy, O., et al., The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem Cytobiol*, 2010. 48(3): p. 434-41.
211. Rao, J.S., Ertley, R. N., Lee, H. J., 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.
212. Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre., et al., Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2009. 33(8): p. 1401-1408.
213. Miyazawa, D., Yasui, Y., Yamada, K., et al., Regional differences of the mouse brain in response to an alpha-linolenic acid-restricted diet: Neurotrophin content and protein kinase activity. *Life Sci*, 2010. 87(15-16): p. 490-4.
214. Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., et al., Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 1999. 270(1): p. 45-8.

215. Parain, K., Murer, M. G., Yan, Q., et al., Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport*, 1999. 10(3): p. 557-61.
216. Lapillonne, A., Clarke, S.D., and Heird, W.C., Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004. 7(2): p. 151-6.
217. 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. 159-166.
218. Calon, F., Lim, G. P., Yang, F., et al., Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron*, 2004. 43(5): p. 633-45.
219. Calon, F., Lim, G. P., Morihara, T., 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.
220. Alves da Costa, Checler, F, Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism. *Cell. Signal*, 2011. 23(6): p. 963-968.
221. Tansey, M.G. and Goldberg, M.S., Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 2010. 37(3): p. 510-8.
222. Croisier, E., Moran, L. B., Dexter, D. T., et al., Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation*, 2005. 2: p. 14.
223. McGeer, P.L. and McGeer, E.G., Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2004. 10 Suppl 1: p. S3-7.
224. Calder, P.C., Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2006. 75(3): p. 197-202.
225. Orr, S.K. and Bazinet, R.P., The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008. 9(7): p. 735-43.
226. Smith, W.L., Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends Biochem Sci*, 2008. 33(1): p. 27-37.
227. Wada, M., DeLong, C. J., Hong, Y. H., et al., Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*, 2007. 282(31): p. 22254-66.
228. Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., et al., Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. *Autacoids in anti-inflammation. J Biol Chem*, 2003. 278(17): p. 14677-87.
229. Boudrault, C., Bazinet, R. P., Kang, J. X., 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.
230. Marcheselli, V.L., Hong, S., Lukiw, W. J., et al., Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem*, 2003. 278(44): p. 43807-17.
231. Kumar, S. and Bandyopadhyay, U., Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*, 2005. 157(3): p. 175-88.
232. Mancuso, C. and Barone, E., The heme oxygenase/biliverdin reductase pathway in drug research and development. *Curr Drug Metab*, 2009. 10(6): p. 579-94.
233. Yoshida, T., Takahashi, S., and Kikuchi, G., Partial purification and reconstitution of the heme oxygenase system from pig spleen microsomes. *J Biochem*, 1974. 75(5): p. 1187-91.
234. Maines, M.D. and Kappas, A., Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. 71(11): p. 4293-7.

235. Mccoubrey, W. K., Huang, T.J, Maines, M.D., Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry*, 1997. 247(2): p. 725–732.
236. Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., et al., Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 2004. 336(2): p. 241-50.
237. Maines, M.D., The hemeoxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1997. 37: p. 517-554.
238. Zhao, H., Wong, J.R., Nguyen, X., et al., Expression and regulation of heme oxygenase isozymes in the developing mouse cortex. *Pediatr Res*, 2006. 60(5): p. 518-23.
239. Zakhary, R., Gaine, S. P., Dinerman, J. L., et al., Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(2): p. 795-8.
240. Muller, R.M., Taguchi, H., and Shibahara, S., Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. *J Biol Chem*, 1987. 262(14): p. 6795-802.
241. McCoubrey, Ewing, J. F., Maines, M. D., Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys*, 1992. 295(1): p. 13-20.
242. Gibbs, L., Willis, D., Morgan, M.J., The identification and expression of heme oxygenase-2 alternative transcripts in the mouse. *Gene*, 1998. 221(2): p. 171-7.
243. Kleschyov, A.L., Wendt, M., Munzel, T., Heme oxygenase-1-mediated protection: potential role of nonheme iron-nitric oxide complexes. *Circulation*, 2002. 105(25): p. e196; author reply e196.
244. Zhu, Y. and Silverman, R.B., Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s). *Biochemistry*, 2008. 47(8): p. 2231-43.
245. Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R., Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*, 1969. 244(23): p. 6388-94.
246. Ewing, J.F. and Maines, M.D., Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(12): p. 5364-8.
247. Applegate, L.A., Luscher, P., Tyrrell, R.M., Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res*, 1991. 51(3): p. 974-8.
248. Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C. D., et al., Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2445-50.
249. Poss, K.D. and Tonegawa, S., Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(20): p. 10925-30.
250. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., et al., Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, 1999. 103(1): p. 129-35.
251. Kinobe, R.T., Dercho, R.A., and Nakatsu, K., Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can J Physiol Pharmacol*, 2008. 86(9): p. 577-99.
252. Sasaki, T., Yoshida, K., Kondo, H., et al., Heme oxygenase-1 accelerates protumoral effects of nitric oxide in cancer cells. *Virchows Arch*, 2005. 446(5): p. 525-31.
253. Nath, K.A., Renal response to repeated exposure to endotoxin: implications for acute kidney injury. *Kidney Int*, 2007. 71(6): p. 477-9.

254. Arregui, B., Lopez, B., Garcia Salom, M., et al., Acute renal hemodynamic effects of dimanganese decacarbonyl and cobalt protoporphyrin. *Kidney Int*, 2004. 65(2): p. 564-74.
255. Shimizu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., et al., Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med*, 2000. 28(3): p. 809-17.
256. Vincent, S.R., Das, S., and Maines, M.D., Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. *Neuroscience*, 1994. 63(1): p. 223-31.
257. Matz, P., Turner, C., Weinstein, P. R., et al., Heme-oxygenase-1 induction in glia throughout rat brain following experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*, 1996. 713(1-2): p. 211-22.
258. Bergeron, M., Ferriero, D.M., and Sharp, F.R., Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res*, 1998. 105(2): p. 181-94.
259. Nakaso, K., Kitayama, M., Fukuda, H., et al., Oxidative stress-related proteins A170 and heme oxygenase-1 are differently induced in the rat cerebellum under kainate-mediated excitotoxicity. *Neurosci Lett*, 2000. 282(1-2): p. 57-60.
260. Baranano, D.E. and Snyder, S.H., Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(20): p. 10996-1002.
261. Trakshel, G.M., Kutty, R.K., and Maines, M.D., Resolution of the rat brain heme oxygenase activity: absence of a detectable amount of the inducible form (HO-1). *Arch Biochem Biophys*, 1988. 260(2): p. 732-9.
262. Verma, A., Hirsch, D. J., Glatt, C. E., et al., Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 1993. 259(5093): p. 381-4.
263. Dwyer, B.E., Nishimura, R.N., and Lu, S.Y., Differential localization of heme oxygenase and NADPH-diaphorase in spinal cord neurons. *Neuroreport*, 1995. 6(7): p. 973-6.
264. Akira, S. and Takedo, K., Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(7): p. 499-511.
265. Zhang, D.D., Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev*, 2006. 38(4): p. 769-89.
266. 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.
267. Date, I., Felten, D.L., and Felten, S.Y., 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.
268. Beal, M.F., Matthews, R. T., Tieleman, A., et al., Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res*, 1998. 783(1): p. 109-14.
269. Kayir, H. and Uzbay, I.T., Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004. 172(1): p. 11-5.
270. Rozas, G., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L., 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.
271. Rozas, G., Lopez-Martin, E., Guerra, M. J., et al., The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods*, 1998. 83(2): p. 165-75.
272. Kobayashi, T., Araki, T., Itoyama, Y., et al., Effects of L-dopa and bromocriptine on haloperidol-induced motor deficits in mice. *Life Sci*, 1997. 61(26): p. 2529-38.
273. Ogawa, N., Mizukawa, K., Hirose, Y., et al., MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur Neurol*, 1987. 26 Suppl 1: p. 16-23.

274. 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. 248-254.
275. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
276. Potashkin, J.A., Blume, S.R., and Runkle, N.K., Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2010. 2011: p. 658083.
277. Jonsson G., Chemical lesioning techniques: Monoamine neurotoxins. In *Handbook of chemical neuroanatomy* 1983. 1: p. 463–507.
278. Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., et al., The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem*, 2001. 76(5): p. 1265-74.
279. Schober, A., Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*, 2004. 318(1): p. 215-24.
280. Schmidt, N. and Ferger, B., Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 2001. 108(11): p. 1263-82.
281. Bezard, E. and Przedborski, S., A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2011. 26(6): p. 993-1002.
282. Kuhn, K., Wellen, J., Link, N. et al., The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*, 2003. 17(1): p. 1-12.
283. Yokoyama, H., Kuroiwa, H., Kasahara, J., et al., Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2011. 71(2): p. 269-80.
284. Youdim, K.A., Martin, A., Joseph, J. A., Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci*, 2000. 18(4-5): p. 383-99.
285. Pamplona, R., Barja, G., and Portero-Otin, M., Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 959: p. 475-90.
286. Martin, R.E., Rodriguez de Turco, E. B., and Bazan N. G., Developmental maturation of hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid metabolism: Supply of docosahexaenoic acid to retina and brain. *J Nutr. Biochem*, 1994. 5: p. 151-160.
287. Maclean, C.H., Issa, A. M., Newberry, S. J., et al., Effects of omega-3 fatty acids on cognitive function with aging, dementia, and neurological diseases. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 2005(114): p. 1-3.
288. Rozas, G., Lopez-Martin, E., Guerra, M. J., The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods*, 1998. 83((2)): p. 165-75.
289. Gambhir, H., Mathur, R., and Behari, M., 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.
290. Goes, A.T., Souza, L. C., Filho, C. B., 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.
291. Morroni, F., Tarozzi, A., Sita, G., et al., Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 2013. 36: p. 63-71.
292. Vinot, N., Jouin, M., Lhomme-Duchadeuil, A., 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.
293. Coluccia, A., Borracci, P., Renna, G., et al., Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats. *Int J Dev Neurosci*, 2009. 27(6): p. 599-605.

294. Hacioglu, G., Seval-Celik, Y., Tanriover, G., et al., Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012. 50(2): p. 228-38.
295. Keeney, P., Roderick, J.X and Bennett, J.P., Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. *Neurobiology of Disease*, 2006. 26((19)): p. 5256-5264.
296. Hunot, S., Vila, M., Teismann, P., et al., JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(2): p. 665-70.
297. Chao, C.C., et al., Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol*, 1992. 149(8): p. 2736-41.
298. Chakraborty, S., Bornhorst, J., Nguyen, T. T., et al., Oxidative stress mechanisms underlying Parkinson's disease-associated neurodegeneration in *C.elegans*. *Int. J. Mol. Sci*, 2013. 14: p. 23103-23128.
299. Chen C, K.A., *Free Radic Biol Med.*, 2004. 36: p. 1505–1516.
300. Obata, T., Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. *J Neural Transm*, 2002. 109(9): p. 1159-80.
301. Cuadrado A, R.A., Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr Pharm Des.*, 2008. 14((5)): p. 429-42.
302. Innamorato NG, R.A., García-Yagüe, A.J and Yamamoto M., The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol.* , 2008. 181((1)): p. 680-9.
303. Min, K.J., Yang, M. S., Kim, S. U., et al., Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci*, 2006. 26(6): p. 1880-7.
304. Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., et al., Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(4): p. 1751-6.
305. Brown, J., 3rd, et al., Binge ethanol-induced neurodegeneration in rat organotypic brain slice cultures: effects of PLA2 inhibitor mepacrine and docosahexaenoic acid (DHA). *Neurochem Res*, 2009. 34(2): p. 260-7.
306. Solanki, P., Aminoshariae, A., Jin, G., et al., The effect of docosahexaenoic acid (DHA) on expression of IL-1ss, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in normal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. *Quintessence Int*, 2013. 44(6): p. 393.
307. Sarsilmaz, M., Songur, A., Ozyurt, H., 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.
308. Ros-Bernal, F., Hunot, S., Herrero, M. T., et al., Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(16): p. 6632-7.
309. Kurkowska-Jastrzebska, I., Litwin, T., Joniec, I., et al., Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol*, 2004. 4(10-11): p. 1307-18.
310. Hung, H.C. and Lee, E.H., MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med*, 1998. 24(1): p. 76-84.
311. Lalier, L., Cartron, P. F., Juin, P., et al., Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 2007. 12(5): p. 887-96.
312. Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., et al., Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 2006. 9(5): p. 351-65.

- 313.** Mayurasakorn, K., Williams, J. J., Ten, V. S., 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.
- 314.** Lukiw, W.J., Cui, J. G., Marcheselli, V. L., et al., A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 2005. 115(10): p. 2774-83.

ÖZGEÇMİŞ

04.09.1989 yılında Ankara’da dünyaya gelen Ayşe ÖZKAN, ilk, orta ve lise öğrenimini İzmir’in Bergama ilçesinde tamamladı. 2007 yılında Bergama Cumhuriyet Lisesi’nden mezun oldu, aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek öğrenimine başladı. Lisans eğitiminin son iki yılını Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonu’nda tamamlayarak 2011 yılında lisans diplomasını aldı. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlayan Ayşe ÖZKAN’ın yabancı dili İngilizce’dir.