

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ (TIP) DOKTORA PROGRAMI
TAN-2020-0001

DENEYSEL PARKİNSON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
SACCHAROMYCES BOULARDII ve BAKTERİYEL
KÖKENLİ PROBİYOTİKLERİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Eda Duygu İPEK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hulki BAŞALOĞLU

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18029 proje numarası ile ve Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı tarafından 15002 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi (Tıp) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Eda Duygu İPEK tarafından hazırlanan “Deneysel Parkinson Oluşturulmuş Ratlarda Saccharomyces bolulardii ve Bakteriyel Kökenli Probiyotiklerin Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/08/2020

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Hulki BAŞALOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Z. Aslı İKİZ	Ege Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Hülya ÜÇERLER	Ege Üniversitesi	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Gülriz ÇERİ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince öncelikle, hiç bitmeyen sabrını örnek aldığım ve her zaman desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Hulki Başaloğlu'na, Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Gülriz ÇERİ'ye, bilgisini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Dokuz Eylül Üniversitesi, Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gökşin Nilüfer Demirci'ye, üniversitemiz Nöroloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Şair, Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr. Çiğdem Yenisey ve Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Buket Demirci'ye, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Kliniği'nde görev yapan uzman biyolog Ercüment Lomcu'ya, tez çalışmamın deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ömer Can Kızılay ve Arş. Gör. Ayşe Gizem Şahmelikoğlu'na, tez çalışmamın istatistiki değerlendirmelerinde destek olan Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Hakan Öztürk'e, manevi katkı ve fedakarlıkları için başta sevgili oğlum Süleyman Kerem'e, eşim Ömer Faruk İpek'e ve ismini sayamadığım, büyük küçük destek olan herkese çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Parkinsonizm ve Parkinson Hastalığı.....	3
2.1.1. Parkinson Hastalığının Klinik Prezantasyonu.....	3
2.1.1.1. Parkinson hastalığının premotor semptomları hakkında genel bilgiler.....	5
2.1.1.1.1. Duyusal bozukluklar; olfaktor ve vizüel disfonksiyonlar.....	6
2.1.1.1.2. Otonomik disfonksiyonlar.....	8
2.1.1.1.3. Kognitif disfonksiyonlar.....	12
2.1.1.1.4. Nöropsikiyatrik disfonksiyonlar.....	12
2.1.1.1.5. Uyku bozuklukları.....	13
2.1.1.2. Parkinson hastalığının motor semptomları hakkında genel bilgiler.....	15
2.1.1.2.1. Rijidite.....	17
2.1.1.2.2. Tremor.....	18
2.1.1.2.3. Bradikinezi.....	19
2.1.1.2.4. Postürel İnstabilite.....	20
2.1.2. Parkinson Hastalığının Tarihçe ve Epidemiyolojisi, Dopamin ve Etki Mekanizması, Dopaminerjik Yolaklar.....	21
2.1.2.1. Dopamin.....	23
2.1.2.2. Dopaminerjik sistem anatomisi.....	28
2.1.2.2.1. Nigrostriatal dopaminerjik yolak.....	30
2.1.3. Parkinson Hastalığının Etiyopatogenezi, Diagnostik Kriterler ve Tedavi Yöntemleri.....	34

2.1.3.1. Parkinson Hastalığında tanı ve tedavi yöntemleri hakkında genel bilgiler.....	43
2.1.3.2. Parkinson hastalığının etiopatogenezinde intestinal mikrobiyomun rolü.....	50
2.1.3.2.1. Probiyotik mikroorganizmalar, lokal ve sistemik Etkileri	55
2.1.3.2.2. İntestinal homeostazisin sağlanmasında anahtar hücreler; musküler makrofajlar.....	57
2.2. Stereolojik Nöron Sayımı Yapılan Hippocampus, Gyrus Dentatus ve Cerebellum'un Makroskopik ve Fonksiyonel Anatomisi, Histolojik Yapısı Hakkında Genel Bilgiler.....	62
2.2.1. Formatio Hippocampalis ve Hippocampus.....	62
2.2.2. Gyrus Dentatus.....	65
2.2.3. Cerebellum.....	66
2.3. Stereolojik Yöntemler Hakkında Genel Bilgiler.....	70
2.3.1. Optik Disektör ve Parçalama (Fractionator) Metodlarının Kombinasyonu; Optik Parçalama Yöntemi.....	74
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	76
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı, Haftalık Rutin Uygulamalar.....	76
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	76
3.3. Motor Testler.....	77
3.3.1. Görüntü Tabanlı Hareket Analizi; Açık Alan Testi.....	77
3.3.2. Silindir Testi.....	80
3.3.3. Askı Teli Testi.....	80
3.4. Deneysel Parkinson Hastalığının Oluşturulması ve Probiyotik Uygulaması.....	81
3.5. Deneyin Sonlandırılması, Doku Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi.....	82
3.5.1. Histolojik Doku Takibi, Kesit Alma ve Kesitlerin Örneklenmesi.....	83
3.6. Stereolojik Optik Parçalama Yöntemi ile Hippokampal Piramidal Nöronların, Gyrus Dentatus'da Bulunan Granüler Hücrelerin ve Serebellar Purkinje Hücrelerinin Sayımı.....	85
3.6.1. Hata Katsayısının Hesaplanması.....	88
3.7. Luksol Fast & Krezil Viyole ve Bielschowsky Boyama Yöntemleri.....	90
3.8. ELISA Yöntemi ile Dopamin Tayini.....	91
3.9. Trozin Hidroksilaz İmmunohistokimyası.....	93
3.10. Akım Sitometri ile CD163 Makrofajlarının Analizi.....	95
3.11. Verilerin İstatistiksel Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	97
4. BULGULAR.....	98

4.1. Gruplar Arasında Haftalık Vücut Ağırlığı Ortalamaları ve Vücut Ağırlığı Yüzde Değişimleri, Deney süresince Ratlarda Gözlenen Bulgular.....	98
4.2. Motor Testlerin Bulguları.....	99
4.2.1. Açık Alan Testi Bulguları.....	99
4.2.2. Silindir Testi Bulguları.....	106
4.2.3. Askı Teli Testi Bulguları.....	108
4.3. Hippokampal Piramidal Nöronlar ve Serebellar Purkinje Hücrelerinin Optik Parçalama Yöntemi ile Gerçekleştirilmiş Stereolojik Sayım Bulguları.....	109
4.4. Luksol fast & Krezil Viyole Asetat ve Bielschowsky Boyanmış Beyin Kesitlerinde Saptanan Histopatolojik Bulgular.....	110
4.5. Corpus Striatum'dan ELISA Yöntemi ile Dopamin Tayini Bulguları.....	116
4.6. Tirozin Hidroksilaz İmmunohistokimya Bulguları.....	117
4.7. CD163 Makrofajların Akım Sitometri Analiz Bulguları.....	119
5. TARTIŞMA.....	125
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	145
KAYNAKLAR.....	147
EKLER.....	174
Ek 1. HADYEK Onay Belgesi.....	174
Ek 2. Akademik Özgeçmiş.....	175

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AÖO	: Alan örnekleme oranı
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BM	: Bağırsak mikrobiyotası
BMP2	: Kemik morfogenetik protein faktörü
CA1nd	: Hippocampus CA1 bölümünde nörodejenerasyon şiddeti
CA2-3nd	: Hippocampus CA2-3 bölümlerinde nörodejenerasyon şiddeti
CA4nd	: Hippocampus CA4 bölümünde nörodejenerasyon şiddeti
CCL18	: Profibrotik CC kemokin ligandı 18
CK	: Çözücü kontrol grubu
CSb	: Corpus striatum'da kistik boşluklar
CSf	: Corpus striatum'da nörofibriller yoğunluk
CSg	: Corpus striatum'da gliosis
ÇG	: Ambulasyon, geçilen çizgi sayısı
D	: Defekasyon sayısı
Daerjik	: Dopaminerjik
DBS	: Derin beyin elektriksel stimülasyonu
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent deney yöntemi
FBS	: Fötal sıgır serumu
GABAerjik	: Gama amino bütirik asiterjik
GDNF	: Gliyal hücreler kaynaklı nörotrofik faktör
GFAP	: Gliyal fibriller asidik protein
GH	: Germe hareketi sayısı
GPI	: Globus pallidus lateralis
GPm	: Globus pallidus medialis
h	: Optik disektör yüksekliği
HBSS	: Dengeli tuz solusyonu
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-10	: İnterlökin 10
IL-13	: İnterlökin 13
IL-1β	: İnterlökin-1β
IL-4	: İnterlökin 4

IL-6	: İnterlökin 6
K	: Kontrol grubu
KaÖÖ	: Kalınlık örnekleme oranı
KBB	: Kan beyin bariyeri
KeÖÖ	: Kesit örnekleme oranı
KOMT	: Katekol-O-metil transferaz
KYA	: Kısa zincirli yağ asitleri
L-DOPA	: Levodopa
LpMφ	: Lamina propria makrofajları
LPS	: Gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşeni lipopolisakkarit
MAO	: Monoamin oksidaz
M-CSF	: Makrofaj koloni stimulan faktör
MKG	: Merkez kareye girme sıklığı
MKK	: Merkez karede geçirilen süre
Mmφ	: İntestinal musküler makrofajlar
Mnd	: Mesencephalon'da nöronal dejenerasyon şiddeti
MOy	: Mossy liflerinde nörofibriller yoğunluk
MPP	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum
MPTP	: 1- metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridin
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSNs	: Orta büyüklükte Gabaerjik nöronlar
Mv	: Mesencephalon'da perinöronal vakuolizasyon
N	: İlgilenilen yapıda bulunan toplam partikül sayısı
N1	: Nigrozom 1
Ncerebellum	: Cerebellum stratum pyramidale tabakasında sayılan toplam nöron sayısı
Nhippocampus	: Hippocampus stratum pyramidale tabakasında sayılan toplam nöron sayısı
NMS	: Premotor Semptom Değerlendirme Skalası
P	: Parkinson hasta grubu
PB	: Bakteriyel probiyotik uygulanan Parkinson hasta grubu
PBM	: Bakteriyel ve maya probiyotik uygulanan Parkinson hasta grubu
PET	: Pozitron Emisyon Tomografi
PH	: Parkinson hastalığı
PM	: Maya probiyotik uygulanan Parkinson hasta grubu
Qi	: Bir kesitte sayılan partikül sayısı

ROS	: Reaktif oksijen türleri
sCD163	: Plazmada çözünmüş CD163 formu
Sil0a	: 0. günde sağ ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayısı
Sil0s	: 0. günde sol ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayısı
Sil60a	: 60. günde sağ ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayısı
Sil60s	: 60. günde sol ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayısı
Sil75a	: 75. günde sağ ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayısı
Sil75s	: 75. günde sol ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayısı
SNpc	: Substantia nigra pars compacta
SNpr	: Substantia nigra pars reticulata
SPECT	: Tek Foton Emisyon Tomografisi
SRÖ	: Sistemik rastgele örnekleme
SSS	: Santral sinir sistemi
STN	: Nucleus subthalamicus
Ş	: Şahlanma sayısı
T	: Tımar davranışının sergilendiği süre
T1'W1	: T1 ağırlıklı MRI görüntüleme
T2'W1	: T2 ağırlıklı MRI görüntüleme
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
Thir	: Tirozin hidroksilaz
TLR2	: Tool benzeri reseptör 2
TLR4	: Tool benzeri reseptör 4
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TY	: Yürünen toplam yol
UPDRS	: Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme Ölçeği
Ü	: Ürinyasyon sayısı
VAYD	: Vücut ağırlığı yüzde değişimi
VAYDb	: Bekleme süresince saptanan vücut ağırlığı yüzde değişimi
VAYDd	: Deney süresince saptanan vücut ağırlığı yüzde değişimi
VAYDu	: Uygulama süresince saptanan vücut ağırlığı yüzde değişimi
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VMAT	: Veziküler monoamin taşıyıcı
α-sinüklein	: alfa sinüklein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. L -fenialalanin'den dopamin sentezi ve yıkımlanması.....	25
Şekil 2. Dahlstroem ve Fuxe nomenklatürüne göre gelişmekte olan (a) ve yetişkin (b) rat beyninde dopaminerjik nöron guplarının dağılımı. dopaminerjik nöronların başlıca projeksiyon alanları oklarla gösterilmiştir, lge ve mge; lateral ve medial ganglionik kabarıntı, p1, p2, p3;prosomerler (Piccione ve DeFelipe, 2007).....	27
Şekil 3. Nigrostriatal direkt (yeşil) ve indirek (kırmızı) yolakların işlevi, GPI; globus pallidus lateralis, STN; nucleus subthalamicus, SNpc; substantia nigra pars compacta, GPM; globus pallidus medialis, SNpr; substantia nigra pars reticulata.....	32
Şekil 4. Mesencephalon transvers kesitlerinde farklı nigrozom bölgelerinin gösterimi. CGS; substantia grisea centralis, M; medial grup, Mv; Medioventral grup, RN; nucleus ruber, A8; retrorubral dopaminerjik nöron grubu, SNpd, SNpl; substantia nigra'nın dorsal ve lateral bölümleri, N; nigrozom, DBC; pedunculus cerebellaris superior çaprazı (brachium conjunctivum), CP; serebellar pedinkül, III; nervus oculomotorius çıkış noktası (Damier ve ark 1999).....	39
Şekil 5. İntestinal başlangıçlı PH patogenezi.....	52
Şekil 6. Muskuler makrofajların intestinal duvarda dağılımı, 1; Tunica mucosa, 2; Tunica muscularis, 3; Tunica serosa, Mmφ signature: Mmφ hücre fenotipi (Schepper ve ark, 2018).....	59
Şekil 7. A; Truncus cerebri arkasına yerleşmiş cerebellum, B; Koronal planda şematize edilmiş cerebellum.....	67
Şekil 8. Tarafsız sayım çerçevesi, kesikli çizilmiş olan kenarlar serbest kenarları, düz çizili kenarlar yasak kenarları ve uzantılarını göstermektedir. Alanı taralı partiküller sayıma dahil edilirken, alanı beyaz olan partiküller sayıma dahil edilmeyen partikülleri göstermektedir...72	72
Şekil 9. A, B; kesit alma yönünün partikül izdüşümüne etkisi, C, D; taneciklerin şekil, büyüklük ve yönelimlerinin izdüşümlerine etkisi.....	72
Şekil 10. Kesit kalınlığı (t) arttıkça tanecik izdüşümü de artmaktadır.....	73

Şekil 11. Üst ve alt güvenlik kuşaklarının bırakılması, kırmızı ve yeşil çizgilerle çizili küp optik disektör yüksekliği boyunca taranan derinlikte tarafsız sayım çerçevesinin kapsadığı hacmi göstermektedir. Yeşil renkli kenarlar serbest kenarları, kırmızı renkli kenarlar yasak kenarları temsil etmektedir.....	74
Şekil 12. ELISA analizinde standart solüsyonların dilüsyonu.....	92
Şekil 13. Median hattın laterale 2,62 mm’de alınan kesitte SNpc ve SNpr koordinatlarını görülmektedir (Paxinos ve Watson, 2007).....	93
Şekil 14. 75 günlük deney süresince, deney gruplarında her hafta başı ve 75. günde kaydedilen ağırlık ortalamaları.....	98
Şekil 15. Deney gruplarında Nhippocampus ve Ncerebellum.....	109
Şekil 16. Gruplar arasında ODCs verilerinin ortalama değerleri. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$	117
Şekil 17. Gruplarda CD163 makrofajlarının dağılımı.....	124

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. A; Beyaz ok somatik uzantıdan kaynaklanan aksonu göstermektedir, B; Beyaz oklar dendritik uzantılarda dikensi çıkıntıları, kırmızı ok püskül benzeri sonlanmayı göstermektedir (Piccione ve DeFelipe, 2007).....	28
Resim 2. 1A; Parkinson hastası bireyde dejenere olmuş N1 bölgesi ve kırlangıç kuyruğu görünümü, 1B; sağlıklı birey, Mesencephalon, Demir duyarlı T2 yoğunluklu MRI görüntüleme.....	45
Resim 3. Hippocampus ve gyrus dentatus histolojik tabakaları, Luxol Fast & Krezil viyole boyama, Sagittal kesit, Magnifikasyon; X4.....	64
Resim 4. Cerebellum'un histolojik tabakaları, Krezil viyole asetat boyama, Magnifikasyon; A X4, B X10, C X20, D X40.....	69
Resim 5. Açık alan testinin gerçekleştirildiği, tabanı çizgilerle karelere ayrılmış galvanize sac kutu.....	78
Resim 6. Kinovea programı kullanılarak yürünen toplam yolun (TY) hesaplanması.....	79
Resim 7. Deney hayvanının sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarı ile teması.....	80
Resim 8. Askı teli testi uygulaması.....	81
Resim 9. A, B; Kraniyumdan tüm halde beyin ve beyinciğin çıkarılması, C; beyin ve beyinciğin ayrılması, D; fissura longitudinalis cerebri'den beynin iki hemisfere ayrılması, E; 1,5 mm kalınlığında sol hemisferden alınan 2. ve 3. kesitlerde corpus striatum.....	82
Resim 10. A, B; proksimal kolonun örneklenmesi, C; longitudinal olarak açılan proksimal kolon örneklerinin buz soğukluğunda serum fizyolojik ile içeriğinin temizlenmesi, D; künt bistüri ile mukozal tabakanın sıyrılması.....	83
Resim 11. A; Nöron sayım düzeneği, B; Hippocampus piramidal nöronlarının sayımı amacı ile hazırlanmış 40 µm kenar uzunluğuna sahip tarafsız sayım çerçevesi. Sağ ve üst kenarı oluşturan kesikli çizgiler serbest kenarları, sol ve alt kenarı oluşturan devamlı çizgiler ve uzantıları yasak kenarları temsil etmektedir, Krezil viyole asetat boyama, Magnifikasyon X100.....	88

Resim 12. Üst satır Luksol fast & Krezil viyole boyama, alt satır THir immunohistokimyası, cp; serebral pedinkül, mRt; mezensefalik retiküler formasyon, SNpr; substantia nigra pars reticulata, SNpc; substantia nigra pars compacta. Fotoğraflanmış kesitlerde soldan sağa sırası ile büyütme oranı; X4, X10, X20.....	94
Resim 13. A; Imagej programının gri skala ile kalibrasyonu, B; Corpus striatum'un optik dansite ölçümü.....	95
Resim 14. Medicon ve içerisindeki metal levhada yer alan hekzagonal, mikro bıçaklı delikler, EP: enjektör portu, B; BD Medimachine cihazında doku ayrıştırılması, C; Doku süspansiyonu, D; Akım sitometri cihazına örneklerin yüklenmesi.....	96
Resim 15. P grubunda prefrontal korteks piramidal nöronlarında muhtemel α -sinüklein agregatları oklarla gösterilmiştir, Magnifikasyon; X40.....	111
Resim 16. Corpus striatum'da kistik boşluklar kırmızı, glia hücreleri siyah oklarla gösterilmiştir. Magnifikasyon; X40.....	112
Resim 17. SNpc dejenere nöronlar (kırmızı oklar) ve perinöronal vakuolizasyon (siyah oklar), Magnifikasyon; X40.....	113
Resim 18. Mesencephalon'da dejenere nöronlar ve perinöronal vakuolizasyon (kırmızı oklar), dejenere nöronlar etrafında mikrogliya hücreleri P grubunda oldukça yoğun olarak görülüyor (siyah oklar), muhtemel α -sinüklein agregatları (sarı oklar).....	113
Resim 19. Hippocampus CA1, Magnifikasyon; X40.....	114
Resim 20. Hippocampus CA2-CA3, Magnifikasyon; X40.....	114
Resim 21. Hippocampus CA2-CA3, Magnifikasyon; X40.....	114
Resim 22. Hippocampus CA4, Magnifikasyon; X40.....	115
Resim 23. Corpus striatum'da fibril yoğunluğu, Magnifikasyon; X40.....	115
Resim 24. Mossy liflerinin yoğunluğu, Bielschowsky boyama, Magnifikasyon; X40.....	116
Resim 25. P grubunda, kırmızı okların ucunda hippocampus'ta ve corpus callosum'dan inen aksonal lifler arasında ekstrasellüler agregat, Bielschowsky boyama, Magnifikasyon; X40.....	116

Resim 26. ELISA 2. denemeye ait plate fotoğrafı, Standart solusyonların okutulması ile elde edilen eğri.....	117
Resim 27. Deney gruplarında corpus striatum. Thir immunohistokimyası, Magnifikasyon X10.....	118
Resim 28. Deney gruplarında SNpc, Thir immunohistokimyası, Magnifikasyon; X40.....	119
Resim 29. Akım sitometri analiz sonuç raporu. Rapora göre okutulan hücre süspansiyonunda kapının alındığı hücreler toplam süspansiyonda bulunan hücrelerin %8'ini, bu yüzdenin de %98'ini CD163 makrofajları oluşturmaktadır. FS INT; Forward Scatter, hücre büyüklüğüne göre saçılım, SS INT; Side Scatter, hücre granülaritesine göre saçılım, KO; hücre miktarı.....	120
Resim 30. P grubu CD163 değerleri.....	121
Resim 31. PM grubu CD163 değerleri.....	121
Resim 32. PB grubu CD163 değerleri.....	122
Resim 33. PBM grubu CD163 değerleri.....	122
Resim 34. CK grubu CD163 değerleri.....	123
Resim 35. K grubu CD163 değerleri.....	123
Resim 36. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Oluru.....	174

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hoehn ve Yahr skalasına göre Parkinson hastalarının kategorizasyonu.....	16
Tablo 2. Açık alan testi video kayıtlarında değerlendirilen parametreler.....	79
Tablo 3. Beyin ve beyincik dokularının histolojik takip prosedürü.....	84
Tablo 4. Beyin ve beyincik dokularının Krezil viyole asetet boyama prosedürü.....	85
Tablo 5. Referans çalışmalardan; Sönmez ve ark, 2010, Kıvrak ve ark, 2017, alınan stereolojik analizde kullanılan değerler.....	87
Tablo 6. P grubuna ait bir sıçanda hata katsayısının hesaplanması için gerekli A, B ve C değerlerinin hesaplanması, Q_i^- : Her bir kesitin disektör partikül sayısı, $Q_i^- \times Q_i^-$: x sayılı kesitin disektör partikül sayısının karesi, $Q_i^- \times (Q_i^-+1)$: x sayılı kesit ile ondan bir sonra gelen kesitin disektör partikül sayılarının çarpımı, $Q_i^- \times (Q_i^-+2)$: x sayılı kesit ile ondan sonra gelen ikinci kesitin disektör partikül sayılarının çarpımı, ΣQ_i^- : Örneklenen kesitlerde sayılan toplam disektör partikül sayısı.....	89
Tablo 7. Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky boyama prosedürleri.....	90
Tablo 8. Vücut ağırlığı yüzde değişimi değerleri. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c; PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$	99
Tablo 9. P grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *, 0. gün değeri ile, **, 60. gün değeri ile, ***, 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$	100
Tablo 10. PM grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *, 0. gün değeri ile, **, 60. gün değeri ile, ***, 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$	101
Tablo 11. PB grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *, 0. gün değeri ile, **, 60. gün değeri ile, ***, 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$	102

Tablo 12. PBM grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$103

Tablo 13. CK grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$104

Tablo 14. K grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$105

Tablo 15. Deney hayvanlarının 0. günde sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları, Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer.....106

Tablo 16. Deney hayvanlarının 60. günde sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$107

Tablo 17. Deney hayvanlarının 75. günde sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$107

Tablo 18. 0., 60. ve 75. günde saniye cinsinden kaydedilen deney hayvanlarının askı telini tutma süreleri. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$108

Tablo 19. Deney gruplarında toplam hippokampal piramidal nöron sayılarının ortalamaları. ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile

karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$109

Tablo 20. Deney gruplarında toplam serebellar Purkinje hücre sayılarının ortalamaları. ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer.....110

Tablo 21. Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky boyanmış kesitlerde değerlendirilen parametreler. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$111

Tablo 22. SNpc THir pozitif hücre (Thir+) yoğunluğu histoskor değerleri, a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$118

ÖZET

DENEYSEL PARKİNSON OLUŞTURULMUŞ RATLARDA SACCHAROMYCES BOULARDII VE BAKTERİYEL KÖKENLİ PROBİYOTİKLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İpek ED. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi (Tıp) Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Parkinson hastalığı motor hareketlerdeki bozukluklar ile tanı koyulan, ancak motor belirtiler görülene dek birçok sistemi etkileyen uzun bir prelinik döneme sahip multisistem progresif bir hastalıktır. Günümüzde hastalığın klinik döneminde uygulanan tedaviler yalnızca motor semptomların hafiflemesine sağlamakta ve uzun dönemde ilaç tedavisinin yan etkisi diskinezi kaçınılmaz olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle erken teşhis ve risk grubunda olanları belirleyebilecek yeni diagnostik metodların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu metodların geliştirilmesinde hastalığın patogenezinin aydınlatılması, motor olmayan belirtilerin mekanizmasının anlaşılması önem kazanmaktadır. Bu amaçla son yıllarda yapılan çalışmalar Parkinson hastalığının bağırsakta başlayarak, beyin-bağırsak aksisi ile merkezi sinir sistemini etkilediği hipotezini öne sürmüş, intestinal mikrobiyomun bu konudaki önemine dikkat çekmiştir. Çalışmamızda 48 adet Wistar cinsi erkek rat 6 gruba ayrıldı ve (n=8) grupların 4'üne 60 gün süresince 2,5 mg/kg dozda intraperitoneal Rotenone® enjeksiyonu uygulanarak deneysel Parkinson hastalığı oluşturuldu. Bu dört gruptan maya kökenli *Saccharomyces boulardii* (Reflor®) probiyotik PM grubuna, bakteri kökenli probiyotik; *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve* ve *Lactobacillus reuteri* (Newita®) PB grubuna, hem maya hem de bakteri kökenli probiyotikler PBM grubuna oral gavaj yolu ile verilirken, hasta kontrol grubuna (P) yalnızca rotenon uygulaması yapıldı. Diğer iki gruptan biri çalışma süresince hiçbir işlem yapılmayan kontrol grubunu (K) diğeri ise rotenone çözücüsü olarak kullanılan maddenin intraperitoneal uygulandığı ve gavaj yolu ile içme suyu verilen çözücü kontrol grubunu (CK) oluşturdu. Probiyotik etkenlerin hastalığın seyrine olan etkisi deney aşamasında yapılan motor testler, corpus striatum'da dopamin miktarı ölçümü,

tirozin hidroksilaz enzim immunohistokimyası, cerebellum ve hippocampus'da stereolojik nöron sayımı, histopatolojik değişiklikler, intestinal CD163 makrofajlarının flow sitometrik analizi ile incelendi. Çalışmamızda probiyotik uygulaması yapılan gruplarda motor performansın CK ve K grubuna kıyasla düşük, P grubuna kıyasla ise yüksek olduğunu tespit ettik. Bunun yanında santral sinir sisteminde nörodejeneratif bulguların P grubunda PM, PB, PBM, CK ve K gruplarına kıyasla oldukça şiddetli olduğu bulundu. Benzer şekilde proksimal kolon örneklerinin akım sitometri analizinde CD163 ekspresyonu gösteren makrofajlar P, PM, PB ve PBM gruplarında CK ve K gruplarına kıyasla oldukça artış gösterdiği, yalnızca PM grubunun P grubundan anlamlı olarak düşük CD163 ekspresyonu gösterdiği bulundu. Araştırmamızın sonuçları Parkinson hastalığının indüklendiği ratlarda probiyotik uygulamasının nöroprotektif etkiler gösterdiğini ve CD163 ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, intestinal makrofaj, probiyotik, *S. boulardii*, rotenon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SACCHAROMYCES BOULARDII AND BACTERIAL ORIGIN PROBIOTICS ON EXPERIMENTAL PARKINSON INDUCED RATS

İpek ED. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Science Anatomy
(Medicine) Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2020.

Parkinson's disease is a multisystem progressive disease with a prolonged preclinic phase that affects many systems until motor symptoms are diagnosed. Currently, the treatments applied during the clinical period of the disease only cause motor symptoms to be alleviated and the side effect of long-term drug treatment dyskinesia is inevitable. Therefore, there is a need to develop new diagnostic methods that can identify early diagnosis and risk groups. Understanding of the pathogenesis of the disease and the mechanism of the non-motor symptoms become important in the development of these methods. To this end, recent studies emphasized the importance of intestinal microbiome and suggested that Parkinson's disease starting in the intestine and affects central nervous system via brain-gut axis. In our study, 48 Wistar male rats were divided into 6 groups (n = 8) and 4 of the groups were administered intraperitoneal Rotenone® injection at a dose of 2.5 mg / kg for 60 days, to induce experimental Parkinson's disease. From these four groups, yeast-derived *Saccharomyces boulardii* (Reflor®) probiotic was given to PM group, bacterial probiotic; *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, and *Lactobacillus reuteri* (Newita®) was given to the PB group, both yeast and bacterial origin probiotics were given to the PBM group and only rotenone was applied to the P group. One of the other two groups consisted of the control group (K), where no treatment was performed during the study, and the other, the solvent control group (CK), where the substance used as rotenone solvent was administered intraperitoneally and given drinking water via gavage. The effects of probiotic agents on the course of the disease were investigated by motor tests, measurement of dopamine in corpus striatum, stereological neuron count in cerebellum and hippocampus, tyrosine hydroxylase

enzyme immunohistochemistry, histopathological changes and flow cytometric analysis of intestinal CD163 macrophages. In our study, we found that motor performance was low compared to CK and K groups and high compared to P groups in probiotic-treated groups. In addition, neurodegenerative findings in the central nervous system were found to be quite severe compared to PM, PB, PBM, CK and K groups in the P group. Similarly, in the flow cytometry analysis of proximal colon samples, macrophages showing CD163 expression were significantly increased in the P, PM, PB and PBM groups compared to CK and K groups, only PM group showed significantly lower CD163 expression than the P group. According to results of our study, probiotic administration shows neuroprotective effects and affects CD163 expression in experimental Parkinson's disease induced rats.

Keywords: Parkinson's disease, intestinal makrophage, probiotic, *S. boulardii*, rotenone.

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve dopaminerjik yolların denervasyonu nedeniyle gelişen, klinik olarak premotor ve motor semptomlarla karakterize, santral sinir sisteminde etkilenen nöronlarda intrastoplazmik inklüzyonların görüldüğü multisistem progresif bir hastalıktır (Palma ve Kaufmann, 2018; Prashanth ve Roy, 2018; Yang et al, 2019). Hastalığın teşhisi genellikle motor semptomların görülmesi ile koyulmaktadır, premotor semptomlarla karakterize uzun bir dönem 'preklinik dönem' olarak adlandırılmaktadır (Berg ve ark, 2015; Getz ve Levin, 2017). Hastalık teşhis edildiğinde diğer bir deyişle klinik olarak motor semptomlar gözlemlendiğinde, substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların %50-70'i dejenerasyona uğramış, nörodejenerasyonu yavaşlatarak veya durdurarak etki gösterebilecek nöroprotektif uygulamalar için geç kalınmış olmaktadır (Akbayır ve ark, 2018; Giguere ve ark, 2018; Sung ve ark, 2018; Takahashi ve ark, 2018; Rynman ve Poston, 2019). Dopamin depleksiyonunun giderilmesi üzerine kurulu, dopamin öncü moleküllerinin ve dopamin agonistlerinin kullanıldığı semptomatik tedavi protokolleri de yalnızca hipokinetik motor semptomların hafiflemesini sağlamakta, 5 yıl ve daha uzun süren farmakolojik tedavilerin yan etkisi sonucunda kaçınılmaz olarak diskinezi adı verilen hiperkinetik hareket bozuklukları görülmektedir (Xu ve Pu, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018). Farmakolojik tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda, motor işlevlerde rol alan subkortikal çekirdeklerin cerrahi yollarla elektriksel stimülasyonu gerçekleştirilir ancak bu uygulama semptomların iyileşmesine en çok on yıl süre ile katkı sağlayabilir (Rizek ve ark, 2016). Terapötik protokollerin hiç biri nörodejenerasyonu yavaşlatmaya ya da durdurmaya yönelik değildir. Aynı zamanda dopamin ve dopamin agonistlerinin kullanıldığı tedavi yöntemleri dopaminerjik sistemle yakından ilişkili pek çok nörotransmitter sistemi ve fonksiyonel etki alanları göz ardı etmektedir. Terapötik protokollerdeki bu açmaz nedeniyle son yıllarda yapılan çalışmalar Parkinson hastalığının patogenezinin aydınlatılmasına, nörodejenerasyonu durdurmaya veya yavaşlatmaya yönelik uygulamaların geliştirilmesine odaklanmıştır (Rodriguez-Violante ve ark, 2017; Wang ve ark, 2018; Murueta-Goyena ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020).

Parkinson hastalığının spesifik bulgularından olan intrastoplazmik nöronal inkluzyonların santral sinir sisteminden önce gastrointestinal sistemde bulunan enterik nöronlarda ve olfaktorik mukoza bipolar nöronlarında gözlenmesi, Parkinson hastalığının patogenezeine yönelik, inkluzyonları prion benzeri yayılım gösteren ve bu inkluzyonların oluşumunda oral yolla veya solunum havası ile alınan tetikleyicilerin etken olduğu savını içeren ‘çift vuruş hipotezi’ nin ortaya atılmasına neden olmuştur (Braak ve ark, 2003; Sveinbjornsdottir, 2016; Subramaniam ve Federoff, 2017; Nair ve ark, 2018; Mihaila ve ark, 2019). İlk kez Scheperjans ve ark (2015) tarafından Parkinson hastalarında sağlıklı kontrollere göre intestinal mikrobiyom bileşiminin değiştiği ve bu değişimin motor fenotip ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. İntestinal mikrobiyom değişimi, çift vuruş hipotezi ve hipotezi destekleyen bulgular birlikte düşünüldüğünde, Parkinson hastalığının patogenezinin aydınlatılmasında olası intestinal başlangıcı önem kazanmış, mikrobiyal değişimin santral sinir sistemi üzerinde olan etkilerinin ve intrastoplazmik nöronal agregatların oluşumundaki rolünün aydınlatılması popüler araştırma konuları haline gelmiştir (Fitzgerald ve ark, 2019; Gorecki ve ark, 2019).

Çalışmamızda uzun süreli rotenon uygulaması ile deneysel Parkinson hastalığını indüklediğimiz ratlarda, intestinal mikrobiyal homeostazisinin düzenlenmesinde, lokal ve sistemik immun yanıtların modülasyonu ve intestinal bariyer fonksiyonunun stabilizasyonunda faydalı etkileri bulunan probiyotik etkenlerin oral yolla kullanımının nöroprotektif etkilerini, santral sinir sistemi ve intestinal sistem arasında ‘beyin-bağırsak aksisi’ olarak alandırılan çift yönlü iletişimde önemli rolü olduğunu düşündüğümüz intestinal makrofajların CD163 ekspresyonuna olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinsonizm ve Parkinson Hastalığı

Parkinsonizm; tremor, rijidite, bradikinezi, akinezi ve postürel instabilitenin değişik kombinasyonlarda bulunduğu progresif supranükleer palsi, Wilson hastalığı, multipl sistem atrofi, Creutzfeldt–Jakob hastalığı, Huntington hastalığı, huzursuz bacak sendromu, kortikobazal ganglionik dejenerasyon, nöroakantozis, Gilles de la Tourette sendromu, esansiyel tremor, distoni, nöroakantozis, Lewy cisimcikli demans, serebellar hastalıklar ve beyin dopamin seviyesini etkileyen bir takım ilaçların kullanımı ile gelişen Parkinson hastalığına benzer semptomlar gösteren olgular, orta beyni etkileyen vasküler hastalıklar gibi klinik olarak motor semptomlarla seyreden sendromları tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir (DeMaagd ve Philip, 2015; Akbayır ve ark, 2018; Haey, 2019; Tibar ve ark, 2018; Ryman ve Poston, 2020). Parkinson hastalığı (PH) ise parkinsonizm sendromunun en sık görülen (%80) varyantı, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (Saunders-Pullman, 2003; Dickson, 2012; Xia ve Mao, 2012; Teive ve Munhoz, 2014; DeMaagd ve Philip, 2015; Oung ve ark, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Xu ve Pu, 2016; Gökçal ve ark, 2017; Özmüş ve ark, 2017; Akbayır ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Tibar ve ark, 2018; Grochowska ve ark, 2019; Ryman ve Poston, 2020). Diagnostik kriterler parkinsonizm olgularının birbirlerinden kesin olarak ayırt edilmesinde yetersiz kaldıklarından, klinik olarak motor semptomlarla seyreden pek çok hastalık Parkinson hastalığı ile karıştırılabilir. Bu hastalıklar Parkinson plus sendromlar ya da atipik parkinsoniyen olgular olarak adlandırılırlar (Dickson, 2012; Ryman ve Poston, 2020).

2.1.1. Parkinson Hastalığının Klinik Prezantasyonu

Parkinson hastalığı substantia nigra pars compacta'da (SNpc) bulunan dopaminerjik (DAerjik) nöronların çeşitli etkenler sebebiyle dejenerasyonu ve corpus striatum'a projekte olan dopamin seviyesinin azalmasına bağlı motor semptomlarla seyreden (Weiser ve ark, 2013; Zapiec ve ark, 2017; Palma ve Kaufmann, 2018; Prashanth ve Roy, 2018; Yang et al, 2019), SNpc ve etkilenen diğer beyin bölgerinde bulunan nöronlarda Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan intrastoplazmik alfa sinüklein (α -sinüklein) agregatlarının ve nöronal fibrillerde

Lewy nörİtlerinin varlığı ile karakterize progresif bir hastalıktır (Weiser ve ark, 2013; Darvas ve ark, 2014; Tanik ve ark, 2016; Xu ve Pu, 2016; Fabbri ve ark, 2017; Huang ve ark, 2017; Zapieć ve ark, 2017; Palma ve Kaufmann, 2018; Cerri ve ark, 2019; Rynman ve Poston, 2019; Yang et al, 2019). Hastalığın sebebi SNpc’da bulunan dopaminerjik nörİnlerin kaybı olduğundan PH önceleri nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanırken, santral sinir sistemi bulgularından önce farklı organ ve sistemlerde görülen disfonksiyonlar, dopaminin merkezi yollarının çeşitliliği ve farklı nörotransmitter sistemlerle olan ilişkisi, reseptörlerinin fonksiyonel farklılıkları, metabolik ve endokrin fonksiyonlarla olan ilişkisi dolayısıyla klinik semptomlarının çeşitliliği PH’nın günümüzde multisistem progresif bir hastalık olarak kabul görmesini sağlamıştır (Goldman ve Postuma, 2014; Todorova ve ark, 2014; Lee ve Koh, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Qamar ve ark, 2017; Cosgrove ve Alty, 2018; Tibar ve ark, 2018; Cerri ve ark, 2019; Murueta-Goyena ve ark, 2019). Jellinger (2012) PH’nın motor semptomlarla karakterize karmaşık bir ekstrapiramidal sistem hastalığı olarak değil, ilerleyici, çoklu bir sistem hastalığı veya daha doğru bir tanımla çeşitli nörolojik motor ve motor olmayan semptomlara sahip bir multiorgan hastalığı olarak kabul edilebileceğini belirtmektedir.

Parkinson hastalığının kardinal motor semptomları istirahat tremoru, rijidite, bradikinezi ve postürel instabilite olarak belirtilmektedir (Adler, 2011; Xia ve Mao, 2012; Poirier ve ark, 2016; Ruffmann ve Parkkinen, 2016; Gökçal ve ark, 2017; Tysnes ve Storstein, 2017; Akbayır ve ark, 2018; Rynman ve Poston, 2019; Sui ve ark, 2019). Substantia nigra pars compacta’da DAerjik nörİnlerin dejenerasyonu %50-70 seviyelerine ulaştığında veya corpus striatum’a projekte olan dopamin seviyesi %70-80 azaldığında motor semptomlar görülmektedir (Adler, 2011; Hobson, 2012; Poirier ve ark, 2016; Fabbri ve ark, 2017; Rodriguez-Violante ve ark, 2017; Akbayır ve ark, 2018; Giguere ve ark, 2018; Sung ve ark, 2018; Takahashi ve ark, 2018; Rynman ve Poston, 2019). Klinik olarak motor semptomların gözlenmesinden önce premotor semptomlarla karakterize uzun bir preklinik dönem bulunmaktadır (Jones ve ark, 2020). Uluslararası Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları Derneği PH sürecini klinikopatolojik özelliklerine dayanarak preklinik, prodromal ve klinik dönem olmak üzere üç bölüme ayırmıştır. Preklinik dönem premotor semptomlarla karakterize iken prodromal dönem motor semptomların henüz hepsinin görülmediği, başlangıçlarını içeren erken dönem olarak tanımlanmaktadır. Klinik dönem ise sıklıkla ve net olarak hastalığın klasik triadı bradikinezi, rijidite ve tremorun görüldüğü dönem olarak tanımlanmaktadır (Berg ve ark, 2015; Getz ve Levin, 2017).

2.1.1.1. Parkinson hastalığının premotor semptomları hakkında genel bilgiler

Parkinson hastalığının başlangıcı sinsidir, nörodejenerasyon oldukça yavaş ilerler (Akbayır ve ark, 2018; Palma ve Kaufmann, 2018; Prashanth ve Roy, 2018), klinik olarak motor semptomların gözlenmesinden önce 5 yıldan 20 yıla kadar uzayabilen, premotor semptomlarla karakterize preklinal dönem görülmektedir (DeMaagd ve Philip, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Arrigo ve ark, 2017; Getz ve Levin, 2017; Fitzgerald ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020). Bu dönemde görülen premotor semptomların arasında; koku duyusunun azalması, renklerin diskriminasyonunu yapamama, bulanık görme, diplopi gibi duyu bozuklukları, hipersalivasyon, sık idrara çıkma, noktüri, aşırı terleme, cinsel işlev bozukluğu, gastroparezis, bağırsak inkontinansı, konstipasyon, ortostatik hipotansiyon, supin hipertansiyon ve kalp atım hızının artması gibi kardiyovasküler, gastrointestinal ve genitouriner otonomik disfonksiyonlar, çoklu görev yeteneğinde azalma, öğrenme kabiliyetinin azalması ve demansla sonuçlanabilen progresif hafıza problemleri gibi kognitif disfonksiyonlar, depresyon, anksiyete gibi nöropsikiyatrik disfonksiyonlar ve uyku bozuklukları yer almaktadır (Xia ve Mao, 2012; Todorova ve ark, 2014; Poirier ve ark, 2016; Teive ve ark, 2016; Gökçal ve ark, 2017; Rodriguez-Violante ve ark, 2017; Mishra ve ark, 2018; Cerri ve ark, 2019; Sui ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020).

Motor semptomlar PH vakalarının çoğunda hastalık tanısını mümkün kılmaktadır ve temel olarak hastalığın tanısı motor semptomlara dayanmaktadır (Takahashi ve ark, 2018, Murueta-Goyena ve ark, 2019). Ancak progresif patolojik değişiklikler motor semptomların görülmesinden yıllar önce başlamakta ve PH tanısı koyulduğunda faydalı olabilecek nöroprotektif uygulamalar için geç kalmış olunmaktadır (Adler, 2011; DeMaagd ve Philip, 2015; Ruffmann ve Parkkinen, 2016; Tanik ve ark, 2016; Rodriguez-Violante ve ark, 2017; Murueta-Goyena ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020). Postuma ve Berg (2016) olfaktor disfonksiyonlar ve konstipasyonun Parkinson hastalığında erken tanıyı sağlayabilecek en önemli premotor semptomlar olduğunu belirtmektedirler. Hastalar arasında çeşidi ve ortaya çıkış paterni dopaminerjik sistemin yanında serotonerjik, noradrenerjik ve asetilkolinergik olmak üzere farklı nörotransmitter sistemlerle olan etkileşime bağlı, oldukça heterojen olan (Poirier ve ark, 2016; Gökçal ve ark, 2017; Qamar ve ark, 2017; Cosgrove ve Alty, 2018; Tibar ve ark, 2018; Jones ve ark, 2020) premotor semptomların, hastalığın motor semptomlarının şiddetini etkilediği hatta mortalite oranını arttırdığı bildirilmektedir (Ryman ve Poston, 2020). Parkinson hastalığı tanısı almış 1072 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, hastaların %98.6'sında premotor semptomlar saptanmıştır (Barone ve ark, 2009). Wu ve

arkadaşları (2016) Parkinson hastalığı tanısı almış 1213 kişi üzerinde yaptıkları araştırmalarında yüksek yaş ve cinsiyet gibi predispozisyon faktörlerinden bağımsız olarak uyku bozuklukları, konstipasyon ve depresyon bulunan hastaların mortalite oranının oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Langston (2006) Parkinson hastalığının premotor semptomlarını buzdağının görünmeyen yüzü olarak tanımlamaktadır. Premotor semptomlar hastalığın progresyonunu etkileyen kritik önemlerine rağmen hastalığın teşhisi esnasında genellikle tanımlanmazlar ve terapötik stratejiler planlanırken göz önünde bulundurulmazlar (Todorova ve ark, 2014; Gökçal ve ark, 2017). Premotor semptomların altında yatan nörobiyolojik süreçlerin aydınlatılmasının, diagnostik ve terapötik protokolleri sınırlı olan PH'nın patogenezinin anlaşılmasında, nöroprotektif uygulamaların geliştirilerek hastalığın motor döneminin ertelenmesinde hatta önlenmesinde, PH'nın erken teşhisinde oldukça fayda sağlayacağı belirtilmektedir (Dauer ve Przedborski, 2003; Kawase ve ark, 2010; Goldman ve Postuma, 2014; Regensburger ve ark, 2014; Gökçal ve ark, 2017; Nair ve ark, 2018; Sui ve ark, 2019). Günümüzde klinik olarak premotor semptomlar kapsamlı ve profesyonel olarak tanımlanmış kardiyovasküler, bilişsel, gastrointestinal, genitoüriner, olfaktor, nöropsikiyatrik ve uyku bozukluklarının bulunduğu 30 farklı premotor semptomun değerlendirilmesini içeren Premotor Semptom Değerlendirme Skalası (Non-Motor Symptoms Scale; NMS) ile değerlendirilmektedirler (Qamar ve ark, 2017; Tibar ve ark, 2018; Murueta-Goyena ve ark, 2019; Sui ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020).

2.1.1.1.1. Duyusal bozukluklar; olfaktor ve vizüel disfonksiyonlar

Koku alma duyusu ile ilgili bozukluklar prodromal dönem Parkinson hastalarında %70-90 oranında ve en erken görülen premotor semptomlardandır (Haehner ve ark, 2009; Kawase ve ark, 2010; Rolheiser ve ark, 2011; Chahine ve ark, 2014; Tanik ve ark, 2016; Murueta-Goyena ve ark, 2019). Hipozmi Parkinson hastaları arasında oldukça yaygınken, anozmi daha nadir görülmektedir (Rey ve ark, 2018). Yapılan araştırmalarda Parkinson hastalarında koku duyusu bozukluklarının yaş, cinsiyet, hastalığın şiddeti, motor ve kognitif belirtilerle ilişkisi kesin olarak ortaya koyulamamıştır ancak yaş ilerledikçe şiddetinin arttığı (Lafreniere ve Mann, 2009), motor semptomların görülmesinden en az 4 sene önce başladığı bildirilmektedir (Malek ve ark, 2015; Rey ve ark, 2018). Ross ve arkadaşları (2008) koku tanımlama testi ile koku duyusu değerlendirilen ve 5 yıl süre ile takip edilen 2.267 erkek içerisinde, en düşük skoru alanlar arasında PH gelişim oranını koku tanımlama testi skoru yüksek olanlardan 5.2 kat fazla olarak bulmuştur. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çalışmaları (Tanik ve ark,

2016) ve post mortem çalışmalarda (Zapiec ve ark, 2017) Parkinson hastalarında bulbus olfactorius hacminin kontrollerden düşük olduğu saptanmıştır. Tanik ve arkadaşları (2016) bu değişimlerin putamen ve hippocampus volümü ile korelasyon gösterdiğini bildirmektedir. Bulbus olfactorius, nucleus olfactorius anterior ve olfaktor yolaklarla ilişkili corpus amygdaloideum'da Lewy cisimcikleri saptanmıştır (Tanik ve ark, 2016; Zapiec ve ark, 2017) ve olfaktor dejenerasyon şiddeti hastalığın progresyon hızı ile doğru orantılıdır (Kawase ve ark, 2010).

Koku duyusu ile ilişkili area piriformis, limbik ve paralimbik bölgelerdeki kortikal atrofi, olfaktor disfonksiyonların beyinde oluşan değişimleri tetiklediğini desteklemektedir. Pozitron emisyon tomografi (PET) görüntülemede putamen'de bulunan dopamin miktarının hipozmili Parkinson hastalarında koku alma ve ayırt edebilme skoru ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (Scherfler ve arkadaşları, 2013). Bu bulgularla birlikte bulbus olfactorius, nucleus olfactorius anterior'da Lewy cisimcikleri varlığının SNpc, nuclei basales gibi PH'nda etkilenen diğer beyin blgerinden önce ortaya çıkması olfaktor vektör hipotezinin (Doty, 2008; Hobson, 2012; Rey ve ark, 2018) ortaya atılmasına neden olmuştur. Hipoteze göre; olfaktor mukoza doğrudan dış hava ile temas halinde olması neticesinde virüsler, metaller ve herbisitler gibi ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır. Bu etkenler altında Lewy cisimcikleri ilk olarak regio olfactoria'da bulunan bipolar nöronlarda ortaya çıktıktan sonra koku yolakları boyunca diğer beyin bölgelerine prion benzeri yayılım göstererek Parkinson hastalığına neden olmaktadır (Doty, 2008; Hobson, 2012; Schrempf ve ark, 2014; Rey ve ark, 2018). Hastalığın oldukça erken dönemlerinde Lewy cisimcikleri intestinal sistemde, plexus myentericus'da bulunan enterik nöronlarda da görülmektedir. Olfaktor vektör hipotezi intestinal yayılımı da içeren çift virş hipotezinin bir parçasını oluşturmaktadır (Pan-Montojo ve ark, 2010; Hobson, 2012; Sveinbjornsdottir, 2016; Subramaniam ve Federoff, 2017).

Olfaktor disfonksiyondan sorumlu mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilmış değildir (Zapiec ve ark, 2017). Hipozmi PH'nda oldukça hassas bir bulgudur ancak spesifik değildir, Alzheimer hastalığı, multiple sistem atrofisi, otonom yetmezlik durumlarında da koku duyusunda bozulmalar görülebilir (Chahine ve ark, 2014). Bunun yanında hipozmi veya anozmi prodromal dönemde PH'nı progresif supranükleer palsi veya vasküler parkinsonizm gibi olgulardan ayırt etmede kullanılabilir, PH ile sıklıkla karıştırılan esansiyel tremor hastalarında da koku duyusu normaldir (Adler, 2011).

Vizüel disfonksiyonlar Parkinson hastalığının erken döneminde, yaygın görülen premotor semptomlarındandır (Ahn ve ark, 2018). Renk diskriminasyonu yapılamaması ve kontrast duyarlılığın azalması, renk algısının değişmesi, görsel-mekansal görevleri yerine getirmede ve görsel becerilerde bozulma Parkinson hastalarında görülen vizüel disfonksiyonlardandır (Adler, 2011; Arrigo ve ark, 2017; Ahn ve ark, 2018; Murueta-Goyena ve ark, 2019). Price ve ark (1992) renk diskriminasyonu yapabilmenin ölçüldüğü Farnsworth-Munsell testinde Parkinson hastalarının kontrollerden anlamlı derecede fazla hata yaptıklarını, kontrast duyarlılığı azalmasının hastalığın şiddetine paralel olduğunu bildirmişlerdir. Vizüel disfonksiyonların gelişiminde Parkinson hastalarında retinal amakrin hücrelerden sentezlenen dopaminin azalmasının yanında (Ahn ve ark, 2018) oksipital korteksin hipoperfüzyonu, kortikal kalınlığın fokal olarak azalmasının da etkili olduğu bildirilmektedir (Pereira ve ark, 2011; Arrigo ve ark, 2017). Yeni tanı koyulmuş Parkinson hastalarında optik koherens tomografi ile retinanın temporal ve nazal bölümlerinde inceltme görüldüğü ve değişikliklerin daha çok macula lutea'da meydana gelme eğiliminde olduğu (Ahn ve ark, 2018), voksel bazlı morfometrik MRG incelemelerinde primer vizüel korteks kalınlığının azaldığı belirtilmiştir (Arrigo ve ark, 2017).

2.1.1.1.2. Otonomik disfonksiyonlar

Disotonomi; otonom sinir sisteminin fonksiyon bozukluğuna bağlı PH'nın yaygın fakat az tanınan özelliklerindendir. Parkinson hastalarında disotonomik bulgular değişkendir ve kardiyovasküler, genitoüriner, gastrointestinal, pupillomotor, respiratuar, termoregülatör ve sudomotor bozuklukları içerir (Micieli ve ark, 2003; Chen ve ark, 2020). Parkinson hastalarının %20-60'ında genitoüriner, %10-15'inde termoregülatör, %19-50'sinde gastrointestinal, %10-20'sinde pupillomotor, %20-40'ında ortostatik hipotansiyon ve supin hipertansiyon olmak üzere kardiyovasküler disfonksiyonların görüldüğü bildirilmektedir (Merola ve ark, 2017). Dopaminin beyin sapında bulunan otonomik merkezlerin regülasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Nucleus dorsalis nervi vagi, median retiküler formasyon raphe nucleus'ları, nucleus spinalis nervi trigemini'de dopamin immunoreaktivitesi, otonom sisteme ait ve otonom fonksiyonların regülasyonunda görevli columna intermediolateralis, hypothalamus, truncus sympathicus gangliyonları, nucleus dorsalis nervi vagi ve nuclei sacrales parasympathici'de, kalp, bağırsaklar ve pelviste bulunan ürogenital organların innervasyonunu sağlayan nöral pleksuslarda Lewy cisimciklerinin varlığı gösterilmiştir (Micieli ve ark, 2003). Parkinson hastalığında her ne kadar alfa sinüklein

patolojisi ve otonom sinirlerin denervasyonu yaygın olarak gözlenmiş olsa da, disotonomik semptomların spesifik mekanizması henüz tanımlanmamıştır (Chen ve ark, 2020).

Kardiyovasküler otonomik disfonksiyonlar temel olarak sempatik denervasyon, noradrenerjik yollarda yetersiz aktivasyon ve barorefleks bozukluklar ile ortaya çıkmaktadır. Hastalar arasında özellikle sırt üstü yatarken supin hipertansiyon, ayağa kalktıkları anda ise baş dönmesi, göz kararması olarak ifade ettikleri ortostatik hipotansiyon sık görülmektedir (Qamar ve ark, 2017; Palma ve Kaufmann, 2018). Ortostatik hipotansiyon sırt üstü pozisyonda iken ayağa kalkıldığında sistolik kan basıncında en az 20 mmHg, 3 dakika sonrasında diastolik kan basıncında en az 10 mmHg düşüş görülmesidir (Isaacson ve Skettini, 2014; Sveinbjornsdottir, 2016; Chen ve ark, 2020). Multiple sistem atrofisinin ayırt edici özelliği olsa da Parkinson hastalarında %14-30 arasında değişen bir insidansla görüldüğü bildirilmektedir (Adler, 2011; Chahine ve ark, 2014; Isaacson ve Skettini, 2014; Chen ve ark, 2020). Ortostatik hipotansiyonlu Parkinson hastalarında motor semptomların çok daha şiddetli seyrettiği belirtilmektedir. Supin hipertansiyon felç, demans, miyokardiyal infarktüs gelişimi açısından da risk oluşturmaktadır (Chen ve ark, 2020). Nörojenik supin hipertansiyon ve ortostatik hipotansiyonun, Parkinson hastalarında postürel değişikliklere karşı, yetersiz salınan noradrenalin sebebiyle otonom sinir sisteminin kan basıncını düzenleyememesinden ileri geldiği belirtilmektedir (Isaacson ve Skettini, 2014; Palma ve Kaufmann, 2018).

Gastrointestinal rahatsızlıklar Parkinson hastalığının otonom belirtileri spektrumunda sıklıkla yer almaktadır, insidansı %60-80 olarak belirtilmektedir (Sung ve ark, 2014; Poirier ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016; Chen ve ark, 2020). Siyalore, disfaji, mide bulantısı, gastroparezis, ince bağırsak disfonksiyonu, konstipasyon ve defekasyon Parkinson hastalarında sıklıkla görülen gastrointestinal disfonksiyonlardır. İntestinal sistem disfonksiyonları enterik sinir sisteminin α -sinüklein aracılı nöropatisine ve nervus vagus'un enterik dallarının nörodejenerasyonuna bağlanmaktadır (Murueta-Goyena ve ark, 2019). Gastrointestinal disfonksiyonlar ile motor semptomlar arasında pozitif yönlü korelasyon bulunmaktadır (Sung ve ark, 2014). Parkinson hastalarında konstipasyon ilk motor belirtinin görülmesinden 20 yıl öncesinde ortaya çıkabilir (Getz ve Levin, 2017). Yu ve arkadaşları (2018) yalnızca 46'sı prodromal dönemde konstipasyon yaşamış, 188 konstipasyon belirtisi olan toplam 306 Parkinson hastasında dopaminerjik tedavinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, konstipasyon bulunan Parkinson hastalarının dopamin prekürsörü Levodopa'ya (L-DOPA) diğerlerinden daha yüksek dozda gereksinim duyduklarını

saptamışlardır. Otonom semptomlar dopaminerjik tedavi ile yakından ilişkilidir ve acil müdahale gerektirebilecek pulmoner aspirasyon, megakolon, bağırsak obstrüksiyonu hatta perforasyonu gibi şiddetli komplikasyonlara neden olabilirler (Poirier ve ark, 2016). Olfaktor vektör hipotezine benzer şekilde nervus vagus'un parasempatik innervasyon sağladığı bölgelerde, özellikle kolonlarda plexus myentericus ganglionik nöronlarında, hastalığın erken döneminde sağlıklı kontrollere kıyasla oldukça yoğun olarak Lewy cisimcikleri saptanması dikkat çekicidir. Bu bulgular prion benzeri yayılma hipotezini desteklemektedir. Bu durumda Parkinson hastalarında Lewy cisimciklerinin nervus vagus ve dalları aracılığıyla retrograd aksonal transport ile öncelikle medulla oblongata ve pons'ta bulunan çekirdeklere yayılarak premotor semptomlara neden olduğu, daha sonra SNpc dopaminerjik nöronlarına ve kortikal merkezlere yayılarak motor semptomlara yol açtığı düşünülmektedir (Holmqvist ve ark, 2014; Nair ve ark, 2018; Yan et al, 2018). Gastrointestinal biyopsilerde Lewy cisimciklerinin immunohistokimyasal yollarla gösterilmesinin Parkinson hastalığının erken teşhisi için fayda sağlayabileceği bildirilmektedir (Cersosimo, 2015; Yan et al, 2018).

Konstipasyon Parkinson hastalarında %50-80 insidansa sahip, en sık görülen gastrointestinal semptomlardan biridir (Yu ve ark, 2018; Chen ve ark, 2020). Abbott ve arkadaşları (2001), 51-75 yaş aralığında bulunan 6790 erkek katılımcıdan 3 yıl süresince bağırsak hareketlerinin sıklığı hakkında bilgi toplamışlar, takip eden 24 yıl boyunca katılımcılar arasında PH gelişimini izlemişlerdir. Bulguları günde bir kez dışkılama yapmayan insanlarda PH riskinin günde bir kez dışkılayan insanlara göre 2.7 kat, 2 ve daha fazla sayıda dışkılayan insanlara göre 4.5 kat artmış olduğunu göstermektedir. İmmunohistokimyasal alfa sinüklein belirleme çalışmaları ile gastrointestinal kanalda özellikle kolon enterik nöronlarında dejenerasyon ve Parkinson hastalığının santral bulgularından olan Lewy cisimcikleri saptanmıştır (Poirier ve ark, 2016). Ayrıca bölgenin pregangliyonik parasempatik innervasyonundan sorumlu nervus vagus'un parasempatik çekirdeği nucleus dorsalis nervi vagi santral sinir sisteminde (SSS) Lewy cisimciklerinin ilk görüldüğü bölgelerden biridir (Adler, 2011, Chahine ve ark, 2014; Yu ve ark, 2018). Defekasyon disfonksiyonları ise kolonik düz kasların yavaş çalışması ile birlikte ürogenital diyafram kaslarının koordinasyonsuz çalışmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Sung ve ark, 2014).

Siyalore özellikle geç dönemde Parkinson hastaların %70-80'inde görülmektedir, asfeksi ve aspirasyon pnömonisi açısından ciddi risk oluşturmaktadır (Poirier ve ark, 2016; Teive ve ark, 2016; Chen ve ark, 2020). Siyalore tükürük bezlerinin parasempatik kolinerjik innervasyonu ile aşırı tükürük üretimi, tükürük klirensinin bozulması ve/veya ağızda

tükürüğün tutulamaması gibi sebeplerden kaynaklanabilir. Siyalore nadiren aşırı tükürük üretiminden kaynaklanmaktadır, bradikinezinin bir tezahürü olan disfaji, siyalore tablosunda oldukça etkindir (Nobrega ve ark, 2008; Poirier ve ark, 2016). Disfaji, bradikinezinin bir tezahürü olsa da, yutmanın istemsiz aşamasında etken otonomik özofageal pleksusta da Lewy cisimciklerinin varlığı disfaji gelişiminde dolayısıyla siyalore tablosunda otonomik nöronal dejenerasyonun da payının olduğunu göstermektedir (Adler, 2011; Sung ve ark, 2014; Poirier ve ark, 2016). Ayrıca Tredici ve arkadaşları (2010) glandula submandibularis'te Lewy cisimciklerinin varlığını göstermişlerdir. Disfaji, Parkinson hastalarında ölüm sebeplerinin başında gelen aspirasyon pnömonisi, yetersiz beslenmeye bağlı ciddi kilo kaybı ve dehidratasyona neden olarak mortalite oranını arttırmaktadır (Poirier ve ark, 2016; Mihaila ve ark, 2019). Bulantı ve kusma ise çoğunlukla antiparkinsoniyen ilaç tedavileri sırasında ortaya çıkmaktadır, bazı hastalarda gastroparezisin bir komplikasyonu olarak da bulantı görülmektedir. Bağırsak transitini de etkileyen gastroparezis erken doyma, dolgunluk hissi, kilo kaybı, karın ağrısı ve şişkinlik ile karakterizedir. Gastroparezisli Parkinson hastalarında oral L-DOPA sağaltımının etkinliğinin azaldığı bildirilmektedir (Sung ve ark, 2014; Poirier ve ark, 2016).

Hiperseksüalite, erektil disfonksiyon ve ejakulasyon anormallığı, istemsiz idrar kaçırma, noktüri Parkinson hastalarında sıklıkla görülen genitoüriner disfonksiyonlardandır (Sveinbjornsdottir, 2016; Chen ve ark, 2020). Pollaküri ve noktüri en sık görülen genitoüriner disfonksiyonlardandır (Irene, 2019) ve sıklıkla musculus detrusor vesicae'nın artmış aktivitesi ile ilişkilidir. Parasempatik innervasyonu kolinerjik liflerle muskarinik reseptörler üzerinden, sempatik innervasyonu noradrenerjik lifler ve reseptörlerle sağlanan mesanede idrarın depolanması sakral otonomik refleksle sağlanır ve hypothalamus, cerebellum, nuclei basales ve frontal korteks depolama sürecinde aktiftir. Parkinson hastalarında nuclei parasympathici sacrales tutulumu musculus detrusor vesicae üzerindeki inhibisyonu azaltarak görece olarak artmış aktivitesine ve mesane tam dolu olmasa dahi idrar yapma isteğine neden olmaktadır (McDonald ve ark, 2017; Irene, 2019). Alt idrar yolları; mesane ve urethra otonom fonksiyonuna ilişkin bozukluklar Parkinson hastalarında %27-85 oranında görülmektedir ve irritatif, obstrüktif ve miks tip olmak üzere üçe ayrılmaktadır (McDonald ve ark, 2017; Irene, 2019). Özellikle prostat hiperplazisi olan yaşlı erkeklerde de sık görüldüğünden Parkinson hastalığının alt idrar yolları ile ilgili disfonksiyonlara etkisini belirlemek zordur. İdrar kaçırma sıklıkla dışkı kaçırma ile birlikte görülürken, üriner semptomlarla seksüel fonksiyonlar arasında ilişki saptanmamıştır (Sakakibara ve ark, 2010).

2.1.1.1.3. Kognitif disfonksiyonlar

Parkinson hastalığında frontal loba ilişkin kognitif bozuklukların, frontostriatal projeksiyonlarda dopamin ve asetilkolin nörotransmitterlerinin düzensizliğine bağlı olduğu düşünülmektedir (Getz ve Levin, 2017; Cosgrove ve Alty, 2018; Murueta-Goyena ve ark, 2019). Hastaların yaklaşık %30-50'sinde klinik PH tanısı sırasında hafif ve orta dereceli sözel bellekte zayıflamaya bağlı yavaş konuşma, yavaş karar verme, dikkat dağınıklığı gibi bilişsel bozukluklar bulunmaktadır (Glizer ve Macdonald, 2016; Özmüş ve ark, 2017; Roheger ve ark, 2018; Murueta-Goyena ve ark, 2019). Bu olgularda hastalığın progresif seyri süresince kortikal merkezlerde Lewy cisimciklerinin birikimi ile doğru orantılı olmak üzere ortalama 10-12 yıl içerisinde, %60-80 oranında PH'na bağlı demans gelişmektedir (Glizer ve Macdonald, 2016; Cosgrove ve Alty, 2018; Roheger ve ark, 2018). Parkinson hastalarında demans gelişme riskinin aynı yaşlardaki sağlıklı kontrollere göre 3-6 kat fazla olduğu (Murueta-Goyena ve ark, 2019) ve %30-35 insidansla görüldüğü bildirilmektedir. Demans gelişen hastalarda mortalite önemli ölçüde artmaktadır. Alzheimer hastalığından farklı olarak kognitif disfonksiyonlar öncelikle bellekte değil, görsel-uzamsal becerilerde ve konsantrasyon yeteneğinde ortaya çıkmaktadır (Özmüş ve ark, 2017). Kognitif disfonksiyonların profili heterojendir ancak tipik olarak hafıza ve dikkat problemleri ağırlıklıdır (Roheger ve ark, 2018). Tremor dominant PH olgularına göre postürel instabilitenin baskın olduğu olgularda bilişsel bozuklukların çok daha hızlı geliştiği bildirilmektedir (Cosgrove ve Alty, 2018).

2.1.1.1.4. Nöropsikiyatrik disfonksiyonlar

Parkinson hastalığında görülen depresyon, anksiyete ve psikoz gibi nöropsikiyatrik bulguların temelinde, bir bütün halinde kişinin duygudurumu üzerine etkili monoaminerjik serotonin, noradrenalin ve dopamin nörotransmitterlerini içeren sistemlerin disfonksiyonu yatmaktadır (Marsh, 2013; Taddei ve ark, 2017; Qamar ve ark, 2017). Antidepresan kullanmayan Parkinson hastalarında radyoligantlar kullanılarak yapılmış PET çalışmasında depresyon şiddeti ile serotonerjik sistem disfonksiyonu arasında güçlü korelasyon bulunmuştur (Qamar ve ark, 2017). Depresif Parkinson hastalarında frontal lob kan akımı, dopamin taşıyıcı molekülün aktivitesi ve nucleus caudatus aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (Marsh, 2013). Parkinson hastalığı tanısı almış 105.416 hasta ile yapılmış epidemiyolojik bir çalışmada sağlıklı deneklerde depresyon oranı %2.4 iken Parkinson hastalarında %9.2 olarak bildirilmiştir (Adler, 2011). Leentjens ve arkadaşları (2003) ilk

depresif atağın PH tanısından ortalama 10 yıl önce Marsh (2013) ise ortalama 4-6 yıl önce görüldüğünü bildirmektedir. Depresyon ilerleyen aşamalarda şiddetlenerek hastalığın diğer klinik yönlerini etkilemektedir (Marsh, 2013). Parkinson hastalarında anksiyete sıklıkla depresyon ile birlikte %40 oranında görülür (Getz ve Levin, 2017). Geniş örneklem ve uzun süreli takip çalışmalarında anksiyete skoru yüksek insanlarda PH gelişim riskinin arttığı bildirilmiştir (Chahine ve ark, 2014; Qamar ve ark, 2017). Depresyon gelişimi SNpc, raphe nucleus'ları, locus caeruleus disfonksiyonu ve bu bölgelerden salınan dopamin, serotonin ve noradrenalin seviyeleri ile ilişkilidir (Getz ve Levin, 2017). Erro ve arkadaşları (2012) anksiyöz Parkinson hastalarında corpus striatum'a projekte olan dopamin miktarının azaldığını, Moriyama ve arkadaşları (2011) ise sosyal anksiyete bozukluğu olan hastalarda, anksiyete skorunun corpus striatum'a projekte olan dopamin miktarı ile ilişkili olmadığını ancak burada bulunan dopamin taşıyıcı molekül yoğunluğunun azalmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular anksiyete patolojisinin dopaminerjik sistemi de içeren heterojen bir yapıda olduğunu göstermektedir.

Psikoz, Parkinson hastalarında %25 oranla görülen, hastalığın geç döneminde insidansı %40'a yükselen (Sveinbjornsdottir, 2016), çoğunlukla görsel nadiren işitsel halüsinasyonlarla görülen bir sendromdur. Dopaminerjik ilaç tedavisi, vizüel disfonksiyonlar, depresyon ve demans varlığı psikoz olgularının gelişiminde risk oluşturmaktadır (Taddei ve ark, 2017; Qamar ve ark, 2017). Parkinson hastalığında corpus amygdaloideum ve hippocampus'ta oluşan nöropatolojik değişimlerin psikoz gibi nöropsikiyatrik bulguların etiolojisinden sorumlu esas faktörler oldukları belirtilmektedir (Sveinbjornsdottir, 2016).

2.1.1.1.5. Uyku bozuklukları

Uyku bozuklukları Parkinson hastalarında en yaygın görülen premotor semptomlar arasındadır, insidansı %66-98 olarak bildirilmektedir (Schrempf ve ark, 2014; Qamar ve ark, 2017; Murueta-Goyena ve ark, 2019). Uyku ile ilgili anormallikler arasında insomnia, uyku bölünmesi, gündüz aşırı uyku hali, uykuda hızlı göz kapağı hareketleri, uykunun REM fazına ilişkin sayıca fazla rüya görülmesi ile uykuda rüyayı canlandırma hareketleri ve uyku sırasında periyodik bacak hareketlerinin yapılması ve huzursuz bacak sendromu bulunmaktadır (Sveinbjornsdottir, 2016; Qamar ve ark, 2017; Melka ve ark, 2019). Diğer premotor semptomlardan depresyon, demans, halüsinasyonlar ve psikoz da uyku kalitesini negatif yönde etkileyen etmenlerdendir. Uyku-uyanıklık düzenlenmesinde rol oynayan

monoaminerjik (serotonin, noradrenalin) ve kolinerjik sistemlerin biyokimyasal değişiklikleri; nuclei raphe'de bulunan serotonerjik, locus coeruleus'ta bulunan noradrenerjik nöronların yanı sıra REM uykusunun düzenlemesinde rol oynayan nucleus interpeduncularis'in, D1 dopamin reseptörleri üzerinden etki göstererek uyku-uyanıklık durumunun düzenlenmesine katkı sağlayan area tegmentalis ventralis'te bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu Parkinson hastalarında uyku bozukluklarının nedenleri arasında yer almaktadır (Schrempf ve ark, 2014; Tıbar ve ark, 2018).

Gündüz aşırı uyku hali Parkinson hastalarının %50'sinde görülen kısmen dopaminerjik tedavinin bir sonucu olan, PH'nın erken dönemlerinde ortaya çıkan bir semptomdur (Sveinbjornsdottir, 2016). Abbott ve arkadaşları (2005) uyku bozukluğu açısından değerlendirdikleri ve 7 yıl süresince takip ettikleri 71-93 yaş aralığında 3078 erkek hastada, gündüz aşırı uyku hali olan erkeklerde PH gelişim riskinin kontrollere kıyasla 3.3 kat arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca uyku bozukluğu olan hastalarda kardiyak otonomik disfonksiyonların daha şiddetli olduğu, diğer premotor bulgulara da daha sık rastlanıldığı belirtilmektedir (Adler, 2011; Melka ve ark, 2019). Uyku bozuklukları genellikle PH'nın motor semptomların görülmesinden sonra, geç dönemde fark edilirler ve bu dönemde ilaç tedavisi de uyku bozukluklarına olumlu ya da olumsuz etki edebilir. Düşük dozlarda L-DOPA veya dopamin agonistleri hipokinezi, diskinezi veya titreme gibi motor semptomları azaltarak gece uykusu kalitesini kısmen arttırabilir. Bununla birlikte özellikle yüksek doz L-DOPA veya dopamin agonistlerinin kullanımında yan etki olarak uykusuzluk veya ani başlayan uyku atakları ile aşırı gündüz uykuları görülebilir. Doza bağlı bu etkilerin bir nedeni, kullanılan farmakolojik ajanın bağlandığı dopamin reseptör tipinin çeşididir. Dopamin D3 reseptörleri ile etki gösteren agonist etken maddelerin gündüz aşırı uyku haline sebep olduğu, D1 reseptörleri ile etki gösteren agonistlerin ise uyarılmaları arttırarak uyku etkinliğini azalttıkları bildirilmektedir (Schrempf ve ark, 2014).

Premotor semptomlar hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmekte, motor semptomlarla olan ilişkileri neticesinde erken hospitalizasyona neden olmakta ve sağlık ekonomisi kapsamında da önemli bir gider payı oluşturmaktadır (Sakakıbara ve ark, 2010; Glizer ve Macdonald, 2016; Gökçal ve ark, 2017; McDonald ve ark, 2017; Tıbar ve ark, 2018; Park ve ark, 2019). Yapılan araştırmalarda, hasta yakınları motor semptomlardan ziyade premotor semptomlar sebebi ile hasta bakım zorluklarının arttığını ifade etmektedirler. Özellikle nöropsikiyatrik bozukluğu bulunan Parkinson hastalarının bakımı oldukça güçtür. Hastalığın her fazında görülen premotor semptomların, hastaların yaşam kalitesine olan

etkisinin motor semptomlardan daha belirleyici olduğu bildirilmektedir (Todorova ve ark, 2014; Glizer ve Macdonald, 2016; Gökçal ve ark, 2017). Bu nedenle fiziki muayene sırasında göz ardı edilebilecek premotor semptomlar, Parkinson hastalarında yaşam kalitesini mümkün olduğunca büyük ölçüde artırmak için sorgulanmalı ve uygun şekilde tedavi edilmelidirler (Tibar ve ark, 2018; Melka ve ark, 2019; Murueta-Goyena ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020).

2.1.1.2. Parkinson hastalığının motor semptomları hakkında genel bilgiler

Parkinson hastalığının klasik motor triadı tremor, rijidite ve bradikinezi olarak belirtilmektedir (Xia ve Mao, 2012; Caligiore ve ark, 2016; Huang ve ark, 2017; Perlberg ve ark, 2018; Tibar ve ark, 2018). Postürel instabilite PH'nın kardinal motor semptomlarından ancak diğer motor semptomlardan daha geç ortaya çıkma eğilimindedir. Tanı sırasında genellikle bulunmaz veya çok hafif olarak gözlenebilir, bu nedenle PH'nın klasik triadı içerisinde yer almaz (Kim ve ark, 2013; Goldman ve Postuma, 2014). Primer sebebi SNpc'da bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu olan motor semptomlar ortak bir patolojiye dayanıyor olsalar da, ilerleme hızları ve tipi hastalar arasında, hatta aynı hastada PH seyri boyunca heterojendir (Murueta-Goyena ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020). Semptomlar Parkinson hastalığının erken evresinde olan hastalarda, hastalık süresi daha uzun olanlara göre daha hızlı ilerlemektedir. Klasik üçlü motor semptomların tezahürüne bağlı görülen bu heterojenite hastaların akinetik/bradikinetik-rijit tip ve tremor dominant tip olmak üzere iki kategoriye ayrılmasına neden olmaktadır (Xia ve Mao, 2012; Moustafa ve ark, 2016; Teive ve ark, 2016). Her iki semptomatik profilin de görüldüğü miks fenotipik özellik gösteren olgular da bulunmaktadır. Parkinson hastalığında kardinal motor semptomların yanı sıra sekonder motor semptomlar olarak da adlandırılan, postürel instabilitenin katkısının yadsınamaz olduğu yürüyüş bozukluğu, el yazısının küçülmesi, normalden küçük harflerle yazma; mikrografi, el ile hassas kavrama yapılamaması dolayısıyla objeleri tutmada zorluk, maske yüz olarak tanımlanan emosyonel ifadelerin yüz mimiklerine yansımaması; hipomimi, hipofonik bir tonla çok hızlı veya yavaş konuşma, distoni gibi motor bozukluklar da görülür (Moustafa ve ark, 2016; Rizek ve ark, 2016; Getz ve Levin, 2017; Zito ve ark, 2018). Distoni çoğunlukla diğer motor semptomlardan önce görülür, istemsiz kasılmalar ve uzuvların bükülmesi nedeniyle hastalarda anormal hareket ve duruşların oluştuğu bir motor semptomdur. Tipik prediagnostik distoniler arasında tek taraflı ekinovarus ayak pozisyonu, kol, önkol veya el bileğinin bükülmesi, kaslarda sıklıkla kramp görülmesi, tortikollis veya bu semptomların farklı kombinasyonları bulunur. Genç başlangıçlı ailesel PH'nda distoni tipik olarak kramp

benzeri rahatsızlık veya etkilenen ayağın ters çevrilmesi ile kendini göstermektedir (Lee ve Koh, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016). Parkinson hastalığının ilerleyen evrelerinde motor semptomların şiddeti ve görülme sıklığı artar, hastalar gün içerisinde giyinme, yemek yeme gibi motor beceri gerektiren rutin işlevlerde dahi zorluk çekmeye başlarlar ve zaman içerisinde bakıma muhtaç hale gelirler (Moustafa ve ark, 2016), tedavi edilmedikleri takdirde immobilité ve düşme sonucu ciddi sakatlanmalar görülebilir (Prashanth ve Roy, 2018).

Motor semptomlar Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme Ölçeği'ne (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) göre değerlendirilirler (Xia ve Mao, 2012; Moustafa ve ark, 2016; Bank ve ark 2017; Getz ve Levin, 2017; Zito ve ark, 2018). Motor becerilere yönelik hastalara yöneltilen, Hareket Bozuklukları Derneği tarafından hazırlanmış anket soruları, semptomun durumuna göre skorlanarak 0 ve 4 puan arasında bir değer verilir, verilen değerler toplanarak UPDRS skoru elde edilir. Hastaların klinik durumuna göre hesaplanan UPDRS skoru hastalığın şiddetine pararendir. Louis ve arkadaşları (1999) UPDRS skorlarını uzun dönem takip ettikleri 237 Parkinson hastasında bradikinezi, rijidite ve yürüyüş bozukluğuna ait UPDRS skorlarının takip sürecinde, özellikle ölen hastalarda daha yüksek olmak üzere, %2-3.1 oranında artarken, tremor skorunun sabit kaldığını bildirmişlerdir. Tremor dominant tip Parkinson hastalarında SNpc nöron dejenerasyonunun daha yavaş ilerlediği bildirilmektedir (Xia ve Mao, 2012; Moustafa ve ark, 2016). Premotor semptomların da motor semptomların şiddeti ile yakın ilişkili oldukları, UPDRS skoru yüksek Parkinson hastalarının çok çeşitli ve fazla sayıda premotor semptoma sahip oldukları bildirilmektedir (Lee ve Koh, 2015). Bunun yanında motor semptomların şiddetinin değerlendirilmesinde halen sıklıkla kullanılan, UPDRS'nden farklı olarak hastaların semptomatik kategorizasyonunu sağlayan, ilk olarak 1967 yılında Hoehn ve Yahr tarafından tanımlanmış, araştırmacıların isimleri ile anılan Hoehn ve Yahr skalası da bulunmaktadır. Hoehn ve Yahr skalasında Parkinson hastalarının, hastalığın şiddetine göre ayrıldığı evreler Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1: Hoehn ve Yahr skalasına göre Parkinson hastalarının kategorizasyonu

EVRE	Semptomlar
Evre 0	Hastalık belirtisi yok.
Evre 1	Motor semptomlar hafiftir, tek taraflı olarak daha çok uzuvlarda görülür.
Evre 1.5	Motor semptomlar hafiftir ve unilateraldir, aksiyel tutulum vardır; omurga da etkilenmiştir.

Tablo 1 (devam): Hoehn ve Yahr skalasına göre Parkinson hastalarının kategorizasyonu

Evre 2	Motor semptomlar hafiftir ve bilateraldir ancak henüz denge problemi gözlenmez.
Evre 2.5	Bilateral motor semptomlara hastalar omuzlarından hafifçe geriye çekildiğinde düzelme gösteren hafif postürel dengesizlik eklenmiştir.
Evre 3	Postürel instabiliteye bağlı denge bozuklukları görülür, bilateral motor semptomların şiddeti orta derecelidir.
Evre 4	Şiddetli postürel instabilite ve motor semptomlar görülür ancak hasta halen yürüyebilir ve yardım edilmeden ayakta durabilir.
Evre 5	Hasta yardım edilmeden ayakta duramaz, tekerlekli sandalye veya yatağa bağlıdır.

Parkinson hastalığının evresi ve şiddetini doğru olarak belirlemek etkili tedavi protokolleri oluşturmak için son derece önemlidir. Bu nedenle UPDRS skorunun yanı sıra Hoehn ve Yahr skalası da klinik pratikte halen kullanılmaktadır. Örneğin; erken dönem Parkinson hastalarında, yan etkileri kaçınılmaz olan L-DOPA tedavisine başlamak yerine, ropinirol gibi dopamin agonistleri kullanımı oldukça başarılı sonuçlar göstermekte ve L-DOPA ile tedaviye başlamayı geciktirmektedir. Bu durum evreleme sisteminin terapötik protokollere olan olumlu katkısını göstermektedir (Prashanth ve Roy, 2018).

2.1.1.2.1. Rijidite

Agonist ve antagonist kas gruplarının ikisinde de kas tonusunun arttığı, kas sertliği olarak da ifade edilen rijidite PH'nın kardinal motor semptomlarından biridir. Parkinson hastalarında özellikle ekstremitelerin pasif mobilizasyonu sırasında hareketin yönü ve hızından bağımsız olarak artan direnç görülür (Shapiro ve ark, 2007; Baradan ve ark, 2013; Xia ve ark, 2017; Zito ve ark, 2018). Rijit bir ekstremitede herhangi bir eklem yavaş veya hızlı, pasif olarak hareket ettirilmeye çalışılırsa ciddi bir dirençle karşılaşılır. Bu durum kurşun boru rijiditesi olarak adlandırılmaktadır. Hareket esnasında görülen rijiditedeki dalgalanmalar, pasif mobilizasyon uygulaması sırasında rijiditenin şiddetinin azalarak harekete olanak sağlaması, ardından tekrar artarak hareketi engellemesi ise dişli çark rijiditesi olarak adlandırılmaktadır. Üst motor nöron hasarı nedeni ile hıza bağımlı artmış kas tonusunun görüldüğü spastisite olguları ile rijidite sıklıkla karıştırılmaktadır. Spastisitede agonist veya antagonist kas gruplarının birinde tonus artmıştır ve soğuk uygulamaları kas iğciklerinin gerilme duyarlılığını ve sinir iletim hızını düşürerek klinik olarak fayda sağlamaktadır. Parkinson hastalarında ise rijiditenin kriyoterapiye daha az cevap verdiği

bildirilmektedir (Xia ve ark, 2017). Rijidite bazal gangliyonlarla ilişkili herhangi bir patolojinin tezahürü olabileceğinden PH'nın patognomik motor semptomu olarak kabul edilmez ancak diğer kardinal motor semptomlardan daha hızlı ilerler (Xia ve ark, 2017). Klinisyenler bir kasın pasif gerilmeye karşı direncini inceleyerek rijidite şiddetini değerlendirebilir. Rijidite Parkinson hastalarında nucleus subthalamicus (STN), cerebellum, nucleus caudatus, thalamus, primer motor, temporal ve oksipital korteks arasında olan fonksiyonel bağlantıların disfonksiyonu ile ilişkilendirilmektedir (Moustafa ve ark, 2016). Rijidite gelişiminde Parkinson hastalarında nucleus subthalamicus ve globus pallidus medialis'te (GPM) artan nöronal aktivite ile talamokortikal projeksiyonların inhibisyonunun gerçekleşmesi dolayısıyla kas aktivasyonunun ve pasif germeye karşı yanıtın azaldığı tahmin edilmektedir. Parkinson hastalarında klinik rijidite skoru ile ipsilateral putamen ve suplemer motor alan aktivitesi arasında negatif korelasyon bulunduğu bildirilmektedir (Baradaran ve ark, 2013).

2.1.1.2.2. Tremor

Kasların istemsiz ve ritmik kasılması olarak tanımlanan tremor; istirahat tremoru, istemli hareketler sırasında gözlenen kinetik tremor ve yer çekimine karşı kararlı duruşun sağlanamaması olarak tanımlanan postürel veya statik tremor olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır (Moustafa ve ark, 2016; Gironell ve ark, 2018). Parkinson hastalarında %75-80 sıklıkla istirahat tremoru görülmektedir, hastalığın ilerlemesi ile istirahat tremoru ile aynı veya değişen frekanslarda kinetik tremor da Parkinson olgularına eşlik edebilir (Sveinbjornsdottir, 2016; Gironell ve ark, 2018; Heusinkveld ve ark, 2018; Tarakad ve Jankovic, 2018). Premotor semptomlardan hipozmi oranının tremor varlığına karşılık geldiği bildirilmektedir (Kawase ve ark, 2010). Parkinson hastaları bir gün içerisinde ortalama 5.5 saat, hastalık ilerledikçe 8 saate varan bir süre zarfında tremorla mücadele etmektedirler (Heusinkveld ve ark, 2018). Tremor, 265 Parkinson hastasının katılımı ile gerçekleştirilmiş bir anket çalışmasında %42 oranla en rahatsız edici motor semptom olarak bulunmuştur. Bu sonucun ortaya çıkmasında tremorun yemek yeme, giyinme, bilgisayar vb alet kullanımı gibi günlük yaşam aktivitelerine olan olumsuz etkisi büyüktür. Bunun yanında psikolojik olarak hastalar tremorun benlik imajını, güvenlik duygusunu ve refahını olumsuz etkileyen önemli bir sosyal kaygı ve utanç kaynağı olduğunu belirtmişlerdir (Heusinkveld ve ark, 2018; Tarakad ve Jankovic, 2018). Düşük ve yüksek frekanslı olabilen tremor atakları Parkinson hastalarında sıklıkla eller ve ayaklarda daha nadir olarak da diğer vücut bölümlerinde

görülebılır. En yaygın olarak ellerde başlayan tremor, başparmak ve işaret parmağı arasında bir nesnenin yuvarlanması benzemektedir. İstirahat tremoru genellikle vücudun bir yarımında başlamakta ve hastalığın ilerlemesi ile bilateral hale gelmektedir (Moustafa ve ark, 2016; Gironel ve ark, 2018; Jones ve ark, 2020). Dudak, çene ve dil titremesi de ilk semptomlar olarak görülebilir (Rizek ve ark, 2016). Klinik olarak nörodejenerasyonun daha yavaş ilerlediği tremor dominant Parkinson hastalarının zaman içerisinde %15-38 oranında miks tip %46-50 oranında ise akinezi/bradikinezi-rijit tipe dönüştüğü bildirilmektedir (Moustafa ve ark, 2016). Toplamda 315 Parkinson hastası (166 erkek, 149 kadın) ile gerçekleştirilmiş bir çalışmada hastaların %51'inin miks tip tremora sahip olduğu bildirilmiştir. Hastalarda tremor şiddeti ile tremor tipi, yaş, cinsiyet, Hoehn ve Yahr derecesi, hastalık süresi, motor fluktuasyonlar, bradikinezi ve rijidite UPDRS skoru arasında ilişki saptanmamıştır (Gironel ve ark, 2018). Premotor kognitif disfonksiyonların varlığı ise tremor yoğunluğunu arttırmaktadır (Heusinkveld ve ark, 2018). Tremorun patogenezi aydınlatılabilmiş değildir ancak tremor dominant Parkinson hastalarında nuclei basales ile cerebellum, thalamus ve motor korteks arasında olan fonksiyonel bağlantıların aktivitesinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Caligiore ve ark, 2016). Post mortem yapılan çalışmalarda tremor dominant Parkinson hastalarında retrorubral alanda DAerjik dejenerasyonun daha şiddetli olduğu bildirilmiştir (Hirsch ve ark, 1992). Benzer şekilde 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile deneysel Parkinson hastalığının indüklendiği çalışmalarda SNpc hasarının daha şiddetli olduğu resus maymunlarında nadiren, kısa süreli ve yüksek frekanslı tremor atakları, retrorubral alanda nörodejenerasyonun daha şiddetli olduğu vervet maymunlarında ise sıklıkla, uzun süreli ve düşük frekanslı tremor atakları geliştiği gözlenmiştir (Helmich ve ark, 2012).

2.1.1.2.3. Bradikinezi

Akinezi, hipokinezi ve bradikinezi sırası ile hareketlerin olmaması, hareketlerin amplitüdünde azalma ve hareketlerin oldukça yavaş yapılmasını ifade etmektedir (Bank ve ark, 2017; Bologna ve ark, 2018). Akinezi ve hipokinezi hastalık seyrince Parkinson hastalığının kardinal motor semptomlarından olan bradikineziye eşlik etmektedirler (Bank ve ark, 2017). Bradikineziye sebep olan etmenler hala tartışma konusu olmakla birlikte, hastaların yapılan hareketin amaca uygun olması, hareketin doğruluğunu sağlayabilmeyi telafi amaçlı yavaş hareket etmesine ve kas gücünün azalmasına bağlı olabileceği görüşleri bulunmaktadır. Ancak hareketle ilgili mekansal sınırlamalar kaldırıldığında da devam etmesi

ve Parkinson hastalarının nörofizyolojik olarak yeterli kas kasılmasını sağlayabiliyor olmaları bu görüşleri desteklememektedir (Shiner ve ark, 2012). Bradikinezi hastalarda tekrarlanarak yapılması istenen hareketlerde yavaşlama ve tekrar sayısı arttıkça hareketlerin yapılamaması olarak görülür. Klinik pratikte başparmağı ve işaret parmağını birbirine vurma, el hareketleri, pronasyon ve supinasyon hareketleri, ayağını yere vurma gibi çeşitli standart hareketlerin incelenmesi ile değerlendirilmektedir (Bank ve ark, 2017; Gao ve ark, 2018). Bradikinezi Parkinson hastalarında hipomimi ve mikrografiye neden olmaktadır (Sveinbjornsdottir, 2016). Bradikinezi şiddetinin premotor korteksin eksitabilite ve plastisite anomalileri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Bologna ve ark, 2018), bununla birlikte bradikinezi şiddetinin değişkenliği çarpıcı klinik özelliklerinden biridir, aynı hasta farklı zamanlarda çok farklı hareket hızlarına erişebilir, bu değişkenlik ‘hareket paradoksu’ (kinesia paradoxa) olarak adlandırılmaktadır. Shiner ve arkadaşları (2012) Parkinson hastalarına ödül vadedildiğinde daha hızlı hareket ettiklerini saptamışlar, bradikinezi şiddetinin tehlike durumunda kaçma, fiziksel ve duygusal şok karşısında ani hareketlerde bulunma durumunda olduğu gibi, emosyonel faktörlerin motor hareketlere etkisine, kısaca şartlara bağlı olarak değişebileceğini göstermişlerdir.

2.1.1.2.4. Postürel instabilite

Postürel instabilite PH’nda çevresel uyaranlara uyum sağlayarak, vücudun pozisyonunun ayarlanmasını sağlayan duyuşal; vizüel, vestibuler ve somatosensorik girdilerin entegrasyonunun sağlanamaması sonucu postürel reflekslerin bozulması veya kaybı ile görülen bir motor semptomdur (Kim ve ark, 2013; Goldman ve Postuma, 2014; Moustafa ve ark, 2016; Erdeniz ve ark, 2018). Postürel instabilite Parkinson hastalığının klasik triadı olan tremor, rijidite ve bradikineziye kıyasla hastalığın orta ve geç döneminde görülmektedir, rijidite ve distoni, postürel instabilite gelişimine katkıda bulunmaktadır (Santamato ve ark, 2015). Kognitif disfonksiyonların hem duyuşal bilgilerin entegrasyonunu hem de dengeyi sağlamak için gerekli motor planlamayı etkilediği bildirilmektedir (Kim ve ark, 2013; Barbosa ve ark, 2016; Erdeniz ve ark, 2018). Kognitif disfonksiyonların postürel instabilite gelişimine etkisi üzerine yapılan araştırmalar, hayvanlarda corpus striatum ile kolinerjik sistem arasındaki disfonksiyonun ön beyinde dikkat ve motor işlevleri etkilediğini ve değişen çevre koşullarına karşı postürel reflekslerin zayıfladığı bildirilmektedir (Moreau ve ark, 2016). Parkinson hastalarında ise thalamus’a kolinerjik girdilerin çoğunu sağlayan, cerebellum, substantia nigra, STN, GPM ile bağlantısı olan nucleus tegmentalis

pedunculopontinus ve nucleus basalis telencephali (Meynert çekirdeği) dejenerasyona uğramaktadır. Hayvan deneylerinde bilateral globus pallidus hasarının akinezi ve şiddetli postürel instabiliteye neden olduğu (Yanagisawa ve ark, 2018), ayrıca postürel instabilitenin şiddetli olduğu Parkinson hastalarında kortikal atrofi tespit edilmiş, korteks ve subkortikal çekirdekler arasındaki bağlantının azaldığı bildirilmiştir (Erdeniz ve ark, 2018).

Postürel instabilite PH'nın erken dönemlerinde düşüp sakatlanma ve yaralanmalar açısından risk faktörü olarak görülmez ancak hastanın yaşı ve hastalığın şiddeti arttıkça düşme ile birlikte sonrasında görülebilecek ciddi komplikasyonlar açısından büyük risk oluşturmaktadır (Santamato ve ark, 2015). Parkinson hastalarında postürel instabiliteye bağlı düşme vakaları %62-68 olarak belirtilmektedir (Barbosa ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016). Özellikle Hoehn ve Yahr sınıflandırmasına göre 3. evrede bulunan hastalarda düşme riski yüksektir, hastalık ilerledikçe hastalar oldukça hareketsiz hale geleceklerinden düşme riski azalır (Kim ve ark, 2013; Erdeniz ve ark, 2018). Postürel instabilite genellikle torakal ve lumbal bölgede omurganın fleksiyonu, baş ve boynun fleksiyonu; antecollis, bazı durumlarda omurganın skolyozu nedeni ile gelişir. Postürel refleksin sağlanmasında duyuşal girdilerin entegrasyonu santral sinir sisteminde pek çok yapının kombine çalışmasına bağlı olduğundan postürel instabilite Parkinson hastalarında L-DOPA tedavisine daha az yanıt vermektedir (Kim ve ark, 2013; Santamato ve ark, 2015; Erdeniz ve ark, 2018).

2.1.2. Parkinson Hastalığının Tarihçe ve Epidemiyolojisi, Dopamin ve Etki Mekanizması, Dopaminerjik Yolaklar

Eski tıbbi metin ve kitaplarda paralitik kondisyon ve tremor ile ilgili Parkinson hastalığını işaret eden kanıtlar olsa da, PH bilimsel literatürde ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından yayımlanan 'Titremeli Felç Üzerine Bir Deneme' (An Essay on the Shaking Palsy) isimli kitapçıkta yer bulmuştur (Goetz, 2011; Lewis, 2012; Poirier ve ark, 2016; Fahn, 2018; Giguere ve ark, 2018). İngiliz hekim Parkinson altı hastası üzerinde yaptığı gözlemler neticesinde hastalığı; 'istirahat halinde istemsiz titremelerin ve bazı durumlarda yüzüstü düşmelere sebebiyet verebilecek kadar şiddetli olabilen gövde fleksiyon postürünün olduğu, yürürken adımların sıklaşarak koşma durumuna geçme olarak tanımlanan festinasyonun bulunduğu, kas gücünün azaldığı, duyuşal ve zekasal belirtinin olmadığı bir sendrom' olarak tanımlamıştır (Goedert ve ark, 2017; Obeso ve ark, 2017; Jones ve ark, 2020). Nörolog Jean Martin Charcot 1872 yılında bradikineziyi hastalığın belirgin bir kardinal

semptomu olarak tanımlamış ve ilk kez James Parkinson'un soy ismi ile isimlendirmiştir (Goetz, 2011; Goedert ve ark, 2017). James Parkinson motor semptomların yanında konstipasyon, disfaji, siyalore ve uyku bozukluğu olmak üzere PH'nın premotor semptomlarına da değinmiştir (Todorova ve ark, 2014; Poirier ve ark, 2016). Blocq ve Marinesco tarafından 1893 yılında, orta beyinde yer alan bir tüberkülozun Parkinson benzeri tremora yol açtığı belirtilmiş, Parkinson hastalığının patogenezi ilk kez orta beyin ile ilişkilendirilmiştir. Bunun üzerine Tretiakoff (1919), Parkinson hastalığı semptomları gösteren dokuz hastanın postmortem beyin dokusunda histopatolojik olarak substantia nigra bölgesini değerlendirmiş, bölgede nöron kaybı ve buna bağlı nöromelanin pigmentinde azalma dolayısıyla makroskobik olarak görülebilen renk açıklığı ve gliozisi tanımlamıştır. Buna rağmen SNpc önemini göz ardı ederek, PH patolojisinin globus pallidus kaynaklı olduğunu belirtmiştir. Hassler (1938) Parkinson hastalarında SNpc nöron kaybının ventrolateral bölgede, dorsomedial bölgeye göre çok daha şiddetli olduğunu belirtmiştir (Goedert ve ark, 2017). 1953 yılına kadar PH patolojisinin kaynağının substantia nigra veya globus pallidus kaynaklı olduğu tartışılmıştır. Greenfield ve Bosanquet 1953 yılında yaptıkları çalışmada ana lezyonun substantia nigra'da olduğunu belirtmişlerdir. Tretiakoff çalışmasında PH'nın karakteristik özelliklerinden olan, nöron stoplazmasında görülen intrastoplazmik inklüzyonları ilk kez tanımlamış olan araştırmacıdır (Goedert ve ark, 2017; Fahn, 2018). Friedrich Lewy 1913 yılında, 'Lewy cisimcikleri' olarak adlandırılan bu inklüzyonların Parkinson hastalarında nucleus dorsalis nervi vagi, nuclei basales ve bazı talamik çekirdeklerde varlığını göstermiştir (Poirier ve ark, 2016; Huang ve ark, 2017). Altmışlı yıllarda elektron mikroskobinin kullanılmaya başlaması ile intrastoplazmik Lewy cisimciklerinin nöronal uzantılarda da görüldüğü bildirilmiş ve Lewy nöritleri olarak adlandırılmıştır (Goedert ve ark, 2017). Dahlstroem ve Fuxe (1964) SNpc'da bulunan DAerjik nöron terminallerinin corpus striatum'da sonlandıklarını, Poirier ve Sourkes (1965) maymunlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada SNpc nöron kaybının corpus striatum'da dopamin depleksiyonuna yol açtığını bildirmişlerdir (Goedert ve ark, 2017).

Parkinson hastalığı 60-65 yaş aralığında bulunan popülasyonun % 2-3'ünde görülen, insidansı özellikle 50 yaşından sonra artış gösteren (Saiki ve ark, 2011; Bollinger ve ark, 2012; Weiser ve ark, 2013; Oung ve ark, 2015; Özmüş ve ark, 2017; Cerri ve ark, 2019), 70 ve üzeri yaş popülasyonunda insidansı %3'e, 80-85 ve üzeri yaş popülasyonunda insidansı %4'e yükselen (Saiki ve ark, 2011; DeMaagd ve Philip, 2015; Ylikotila ve ark, 2015), yaşlanma ve buna bağlı faktörlerle yakından ilişkili bir hastalıktır (Sveinbjornsdottir, 2016;

Getz ve Levin, 2017; Poewe ve ark, 2017; Tysnes ve Storstein, 2017; Mishra ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018; Rajsombath ve ark, 2019). Dünya genelinde yaklaşık 10 milyon Parkinson hastasının bulunduğu bildirilmektedir (Nair ve ark, 2018; Perlberg ve ark, 2018; Sui ve ark, 2019). Çeşitli ülkelerde yapılan pek çok kohort çalışmasında, hastalığın insidansı ve prevalansı metodolojik farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterse de, erkeklerde kadınlardan 1.5-2 kat daha fazla görüldüğü saptanmıştır (Wirdefeldt ve ark, 2011; Bollinger ve ark, 2012; Amel ve Heba, 2013; Cerri ve ark, 2019; Lee ve ark, 2019; Park ve ark, 2019). Bölgesel olarak bakıldığında Asya kıtasında insidansı Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerine kıyasla düşüktür (Oung ve ark, 2015; Getz ve Levin, 2017), ancak Asya ülkelerinde PH insidansını ortaya koyan epidemiyolojik araştırmaların da diğer bölgelere oranla daha az sayıda olduğu da bildirilmektedir (Park ve ark, 2019). Hindistan'da yapılan bir çalışmada insidansı diğer bölgelere kıyasla %4'e yakın bir değerle yüksek bulunmuştur (Mishra ve ark, 2018), Güney Kore'de hastalığın insidansının gittikçe arttığı, 2010-2015 yılları arasında 16.152 yeni vaka bulunduğu rapor edilmiştir (Park ve ark, 2019). Populasyon, cinsiyet ve yaşa bağlı görülen bu farklılıkların yanında global olarak PH prevalansının 1990 ve 2015 yılları arasında iki katına çıkmış olduğu bildirilmekte (Ryman ve Poston, 2020), 2040 yılında 14.2 milyon Parkinson hastasının olacağı tahmin edilmektedir (Sui ve ark, 2019; Fitzgerald ve ark, 2019; Grochowska ve ark, 2019).

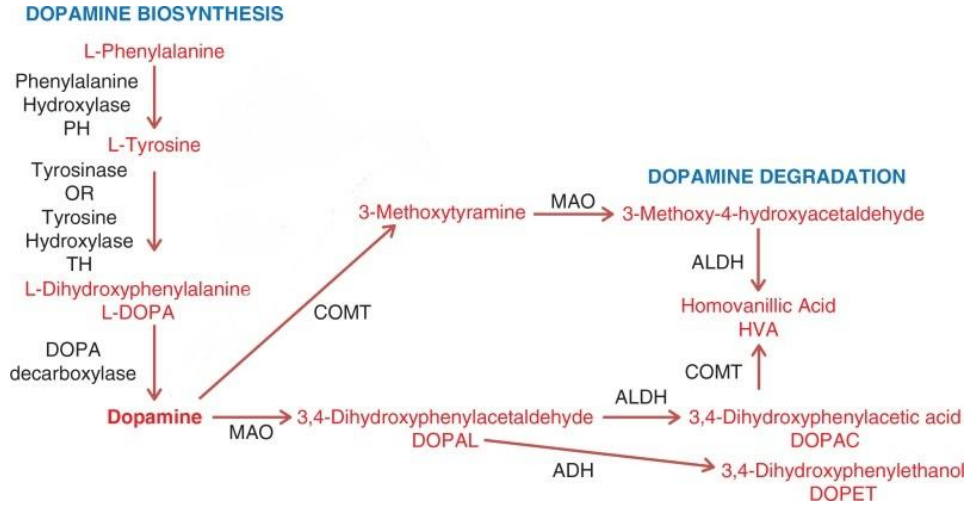
Parkinson hastalığının patogenezinin ve klinik semptomlarının anlaşılmasında motor yollarda önemli rol oynayan bir nörotransmitter olan dopaminin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin, santral sinir sisteminde projekte olduğu alanların, merkezi yollarının bilinmesi önem arz etmektedir.

2.1.2.1. Dopamin

Dopamin beyinde başlıca substantia nigra, area tegmentalis ventralis, hypothalamus'tan, periferde bir miktarda adrenal bezde sentezlenen monoamin yapısında (Daubner ve ark, 2011), norepinefrin ve epinefrinin prekürsörü katekolaminerjik, organik bir kimyasaldır (Tank ve Wong, 2015; Ayano, 2016). Bir dopamin molekülü, bir etil zincir aracılığıyla bir amin grubu bağlı bir katekol yapısından (iki hidroksil yan gruba sahip bir benzen halkası) oluşur. Bu amin bağına sahip bir benzen halkasının varlığı, onu çok sayıda psikoaktif ilaç içeren bir aile olan fenetilamin grubuna dahil eder (Vendelboe ve ark, 2016). Dopaminin kimyasal formülü $C_8H_{11}NO_2$, Uluslararası Uygulamalı Kimya Birliği ismi 4-(2-

aminoethyl) benzene-1,2-diol'dür (WEB_1). Dopamin SSS'de nörotransmitter olarak görev yapar. Hypothalamus'tan sentezlenen dopamin, bir nörohormon olarak adenohipofizden prolaktin sentezini baskılar, prolaktin inhibe edici faktör olarak da bilinmektedir. Bunun yanında diğer katekolaminler epinefrin ve norepinefrin ile benzer şekilde bazal metabolizmayı hızlandırarak oksijen tüketimini ve kalp atım sayısını artırır, karaciğer ve kas dokuda glikojenolizi, yağ dokuda lipolizi uyarır (Tank ve Wong, 2015; Vendelboe ve ark, 2016).

Karaciğerde fenilalanin, fenilalanin hidroksilaz enzimi tarafından L-tirozine dönüştürülür (Ayano, 2016). Aktif transportla kan beyin bariyerini geçerek nöron stoplazmasına alınan L-tirozin, tirozin hidroksilaz (Thir) enziminin aktivitesiyle fenol halkasının hidroksilasyonu sonucu L-3,4-dihidroksifenilalanin'e (L-DOPA, Levodopa) dönüştürülür. Tirozin hidroksilaz enzim aktivitesinin bulunduğu bu aşama dopamin sentezinin hız sınırlayıcı basamağıdır (Daubner ve ark, 2011; Mishra ve ark, 2018). Aminoasit dekarboksilaz enzimi L-DOPA'yı sitozolik dopamine dönüştürür (Best ve ark, 2009; Meiser ve ark, 2013). Sitozolik dopamin veziküler monoamin taşıyıcısı (VMAT) tarafından nöron terminallerinde bulunan veziküllere taşınır ve ekstrasellüler aralığa salınarak sinir iletiminde görev almak üzere depolanır. Levodopa sentez basamaklarında kofaktör ve koenzim olarak demir, magnezyum, çinko mineralleri ve B3, B6, C ve D vitaminleri rol almaktadır (Best ve ark, 2009; Daubner ve ark, 2011; Ugrymov, 2018). Levodopa'nın optik izomeri (enantiyomer) olan D-3,4-dihidroksifenilalanin (D-DOPA, dekstrodoopa) biyolojik olarak inaktif bir bileşiktir, enzimatik olarak dopamine dönüştürülemez (Goedert ve ark, 2017). Levo ve dekstrorotasyon bir molekülün polarize ışık düzlemlerini döndürme yeteneğinin yönünü ifade etmektedir (Hornykiewicz, 2010). Dopamin santral sinir sisteminde intersellüler aralıkta, periferel organlarda karaciğer, böbrek ve eritrositlerde monoamin oksidaz (MAO), katekol-O-metil transferaz (KOMT) enzimlerinin aktivitesi sonucu yıkımlanır. Nihai ürün idrar ile dışarıya atılan homovanillik asittir. Nörolojik bilimlerde yapılan pek çok çalışmada, dopamin kan beyin bariyerini geçemediğinden, santral dopamin miktarını tayin etmede homovanillik asit kullanılmıştır (Baraibar ve ark, 2016). Şekil 1'de dopaminin sentez ve yıkımlanma basamakları görülmektedir.



Şekil 1: L-fenilalanin'den dopamin sentezi ve yıkımlanması.

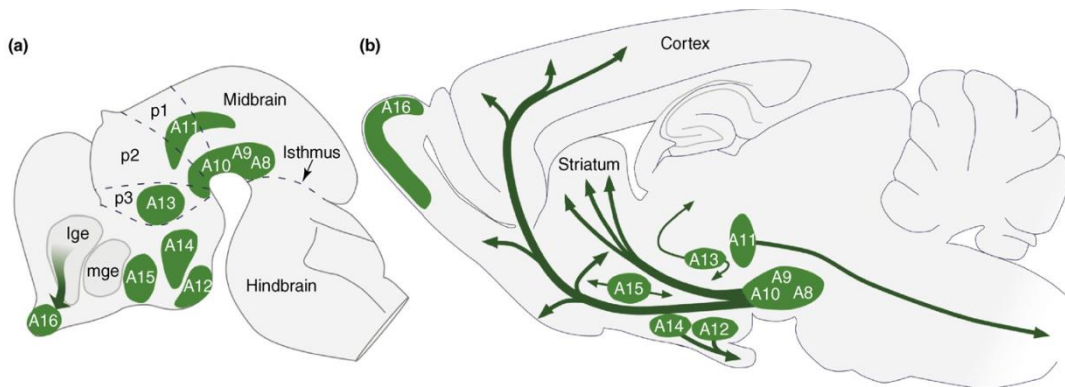
Levodopa ilk olarak Latince 'Vicia faba' olarak adlandırılan bakla bitkisinden 1910-11 yıllarında Torquato Torquati tarafından izole edilmiş, kimyasal özellikleri 1913 yılında Markus Guggenheim tarafından tanımlanmıştır (Hornykiewicz, 2010). İlk keşfedildiği yıllarda L-DOPA'nın yalnızca epinefrin ve norepinefrinin sentezinde gerekli bir prekürsör olduğu düşünülmüştür (Hornykiewicz, 2002; Björklund ve Dunnet, 2007; Hornykiewicz, 2010). Peter Holtz tarafından 1938 yılında böbrek homojenatlarında L-DOPA'yı dopamine dönüştüren aromatik aminoasit dekarboksilaz enziminin keşfi, katekolaminerjik moleküllerin araştırmalarında bir dönüm noktası olarak kabul görmüştür. Kathleen Montagu 1957 yılında aralarında insan beyninin de bulunduğu çeşitli hayvan beyinlerinde kromatografik yöntemlerle dopamin varlığını göstermiş ilk araştırmacıdır (Goedert ve ark, 2017). Carlsson ve arkadaşları 1957'de etkisini VMAT'nı bloke ederek gösteren, adrenerjik blokör rezepin uygulayarak gerçekleştirdikleri deneyde, deney hayvanlarında gözlenen semptomların Parkinson benzeri olduğunu ve L-DOPA uygulamasının semptomları iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca L-DOPA uygulaması ile beyinde noradrenalinin değil dopamin miktarının arttığını, beyindeki dopamin miktarının norepinefrin prekürsörü olarak gerekenin çok üzerinde bulunduğunu, dopaminin bağımsız bir nörotransmitter olduğunu keşfetmişlerdir (Björklund ve Dunnet, 2007; Yeragani ve ark, 2010; Lees ve ark, 2014). Ayrıca santral dopamin miktarını tayin etmede oldukça hassas spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bunun üzerine Hornykiewicz post mortem postensefalitik parkinsonizm ve Parkinson hastalarının beyin dokularında yaptığı araştırmalarda hastalığın şiddetinin striatal dopamin kaybına paralel olduğunu, dopamin seviyesinin özellikle nucleus caudatus ve putamen'de düştüğünü göstermiştir (Björklund ve Dunnet, 2007; Lees ve ark, 2014). Carlsson

ve arkadaşları dopamin üzerinde yaptıkları araştırmalarla 2000 yılında Fizyoloji alanında Nobel Tıp Ödülünü kazanmışlardır (Yeragani ve ark, 2010). Carlsson ve Hornykiewicz, Parkinson hastalığında dopaminin önemini gösteren en belirleyici bilimsel temelleri sağlamış olan araştırmacılar olarak kabul edilmektedirler (Lees ve ark, 2014; Goedert ve ark, 2017; Mishra ve ark, 2018).

Dopamin bir nörotransmitter olarak beyinde bilişsel işlevlerde, emosyonel duyuların oluşmasında, koku alma, görme, uyku düzenlenmesi, motor aktivite, gıda alımı ve endokrin regülasyonda önemli rol oynamaktadır (Ayano, 2016; Mishra ve ark, 2018; Cerri ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020). Dopamin etkisini hücre yüzeyinde yer alan G protein bağlı reseptörleri vasıtası ile gösterir. Tanımlanmış beş farklı dopamin reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler D1, D2, D3, D4 ve D5 olarak adlandırılırlar, farmakolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre D1 benzeri (D1 ve D5) ve D2 benzeri (D2, D3 ve D4) olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar (Beaulieu ve Gainetdinov, 2011; Buchta ve Riegel, 2015; Ayano, 2016; Mishra ve ark, 2018). Santral sinir sisteminde D1 benzeri reseptörler hücre içi ikincil habercinin yapısına da bağlı olmak üzere, eksitasyon ve postsinaptik inhibisyonda rol oynarken, D2 benzeri aktivite gösteren reseptörler genellikle presinaptik ve postsinaptik inhibisyondan sorumludur. D1 benzeri reseptörler ikincil haberci olarak hücre içi siklik adenozin monofosfat oluşumunu uyarırken, D2 reseptörler tersi etki gösterirler (Gerfen, 2000; Filippo ve ark, 2008; Beaulieu ve Gainetdinov, 2011; Ayano, 2016). Santral sinir sisteminde en çok bulunan (%78) D1 reseptörü başlıca hippocampus, nucleus caudatus, putamen, nucleus accumbens, hypothalamus, thalamus, substantia nigra pars reticulata (SNpr), tuberculum olfactorium, cerebellum, temporal ve frontal kortekste yer almaktadır (Beaulieu ve Gainetdinov, 2011; Mishra ve ark, 2018) ve D1 grubu reseptörlerin yalnızca %30'u dopamine karşı yüksek affinite göstermektedir (Buchta ve Riegel, 2015). Öğrenme, hafızanın düzenlenmesi ve motor aktivitede D1 reseptörleri önemli rol oynarlar (Mishra ve ark, 2018). Corpus striatum, area tegmentalis ventralis, globus pallidus lateralis (GPI), glandula hypophysialis, corpus amygdaloideum, hippocampus, serebral korteks ve nucleus accumbens'te %80'i dopamine karşı yüksek aktivite gösteren D2 reseptör tipi bulunmaktadır. Aynı zamanda otoreseptör olan D2 grubu reseptörleri somatodendritik sinapsları aracılığı ile dopamin sentezini, depolanmasını ve salınımını azaltmaktadırlar (Buchta ve Riegel, 2015; Mishra ve ark, 2018). İnsan ve ratlarda D3 ve D4 reseptörleri SSS'de ağırlıklı olarak limbik sistemi oluşturan yapılarda bulunurlar (Ayano, 2016). Nucleus accumbens'in ventromedial bölümünde ve tuberculum olfactorium'da D3 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (Mishra ve

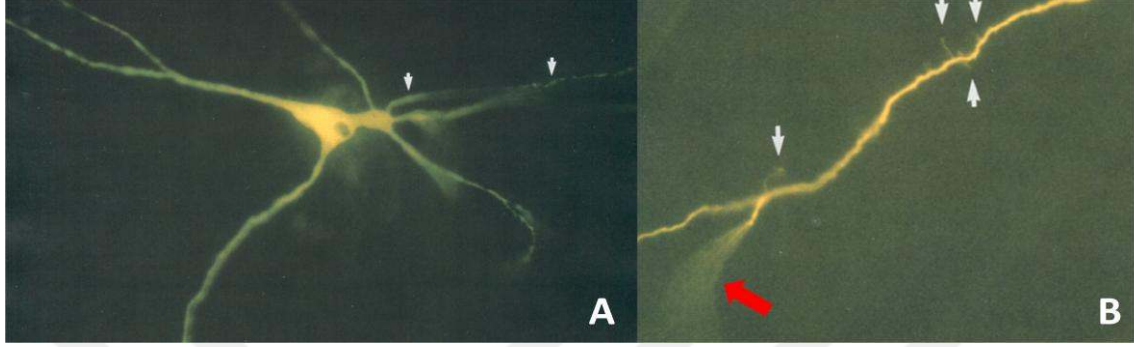
ark, 2018). Prefrontal, premotor, singulat ve entorinal korteks piramidal nöronlarında, gyrus dentatus'ta, substantia nigra, hypothalamus ve hippocampus gibi çeşitli beyin bölgelerinde düşük yoğunlukta D5 reseptörleri bulunmaktadır. Dopamin reseptörlerinin tüm tipleri SSS dışında böbrek, adrenal bezler, gastrointestinal kanal, kalp, kan damarları ve sempatik gangliyonlarda da bulunmaktadır (Beaulieu ve Gainetdinov, 2011).

Dahlstroem ve Fuxe 1960'lı yılların başında geliştirilen, dopaminerjik nöronların karakterizasyonunu ve fenotipini inceleyebilmeye olanak sağlayan Falck-Hillarp histofloresans tekniğini kullanarak SSS'de bulunan dopaminerjik nöron kümelerinin haritasını çıkaran ilk araştırmacılar (Goedert ve ark, 2017). Şekil 2'de görüldüğü gibi 1965 yılında yayımladıkları çalışmalarında artan numaralarla medulla oblongata'dan başlayarak üst merkezlere doğru yerleşmiş on iki dopaminerjik hücre grubunu A1, A2, A3, ..., A12 diencephalon, bulbus olfactorius ve retina'da bulunan 5 dopaminerjik hücre grubunu A13,..., A17 olarak isimlendirmişlerdir (Björklund ve Dunnet, 2007; Piccione ve DeFelipe, 2007). İlerleyen yıllarda immunohistokimyasal ve immunositokimyasal metodların gelişmesi ile yapılan incelemeler de bu bulguları doğrulayarak daha ileri analizlerin yapılmasına olanak sağlamışlardır (Björklund ve Dunnet, 2007; Ugryumov, 2018). Memelilerde mesencephalon'da dopaminerjik nöronların yer aldığı üç ana bölge bulunmaktadır; retrorubral alan (A8), SNpc (A9), area tegmentalis ventralis (A10) (Alcaro ve ark, 2007; Luo ve Huang, 2016). Bununla birlikte daha az yoğunlukta DAerjik nöronların hypothalamus'ta supramamiller bölgede, nuclei raphe ve substantia grisea centralis'te bulunduğu bildirilmektedir (Alcaro ve ark, 2007).



Şekil 2: Dahlstroem ve Fuxe nomenklatürüne göre gelişmekte olan (a) ve yetişkin (b) rat beyinde dopaminerjik nöron guplarının dağılımı. dopaminerjik nöronların başlıca projeksiyon alanları oklarla gösterilmiştir, lge ve mge; lateral ve medial ganglionik kabarıntı, p1, p2, p3; prosomerler(Piccione ve DeFelipe, 2007).

Dopaminerjik nöronlar Resim 1’de görüldüğü gibi aksonlarının bir primer dendritik uzantı veya somatik bir uzantıdan kaynaklanması, dikensi çıkıntılar bulunan dendritik uzantılarının çatallanarak püskül görünümünde sonlanması gibi spesifik morfolojik özelliklere sahiptirler ve genellikle dendritik dallanmaları seyrektr (Piccione ve DeFelipe, 2007).



Resim 1: A; Beyaz ok somatik uzantıdan kaynaklanan aksonu göstermektedir, B; Beyaz oklar dendritik uzantılarda dikensi çıkıntıları, kırmızı ok püskül benzeri sonlanmayı göstermektedir (Piccione ve DeFelipe, 2007).

Substantia nigra pars compacta’da dendritik uzantıları mediolateral ve ventral olarak SNpr’ya uzanan multipolar DAerjik nöronlar, SNpc’nin dorsal kısmında ise dendritik uzantıları mediolateral uzanan ve SNpc dışına çıkmayan fusiform DAerjik nöronlar bulunur (Grace ve Onn, 1989; Gerfen, 2000; Piccione ve DeFelipe, 2007).

2.1.2.2. Dopaminerjik sistem anatomisi

Makroanatomik olarak bir bütünlükten söz etmek mümkün olmasa da, SSS’de dopaminin üretildiği ve projekte olduğu alanlar dopaminerjik yollar olarak tanımlanmaktadır. Santral sinir sisteminde dopaminin sentezlendiği ve projekte olduğu yapılar majör ve minör dopaminerjik yollar olarak sınıflandırılırlar. Beyinde nigrostriatal, mezokortikal, mezolimbik ve tuberoinfundibuler dopaminerjik yolak olmak üzere dört majör yolak bulunmaktadır.

Mezolimbik yolak area tegmentalis ventralis’te (A10) bulunan DAerjik nöronların nucleus accumbens ve tuberculum olfactorium’a, mezokortikal yolak ise prefrontal kortekse projeksiyonunu içerir. Aynı bölgeden başlayan bu iki dopaminerjik yolak, fonksiyonel olarak da birbirleri ile bağlantılı olduğundan, mezokortikolimbik yolak ismi ile tek bir yolak olarak da adlandırılırlar (Yamaguchi ve ark, 2011). Prefrontal korteks kognitif işlevlerde, hafıza,

öğrenme ve karar verme mekanizmasında önemli rol oynamaktadır (Luo ve Huang, 2016). Mezokortikal yolağın disfonksiyonu konsantrasyon problemi, karar verme yetisinde zayıflama, şizofreni, psikoz gibi nöropsikiyatrik bulguların görülmesine neden olur. Mezolimbik yolak ödül motivasyonu, belirli uyaranlara karşı oluşturulan zevk, beğenme, memnuniyet duygusu ve bağımlılık oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Diğer ekstrapiramidal sistem yolları ile birlikte başlıca motor hareketlerin değerlendirilmesinde ve düzenlenmesinde rol oynayan nigrostriatal DAerjik yolağın da kognitif fonksiyonlara etkisi bulunmaktadır. Dorsal striatum alışılmış davranışların şekillenmesinde rol oynarken, mezolimbik yolak emosyonel davranışların şekillenmesinde rol oynar (Luo ve Huang, 2016; Caminiti ve ark, 2017). Nigrostriatal yolak nöron terminalleri yaşamın erken evrelerinde olgunlaşırken, mezokortikolimbik terminaller yavaş olgunlaşır ve gençlik dönemine dek tam olarak gelişmez (Bucht ve Riegel, 2015; Walker ve ark, 2017). Gonadal hormon değişimlerinden bağımsız olarak prefrontal kortekste dopaminerjik liflerin sayısı, nucleus accumbens ve dorsal striatum'da D1 ve D2 reseptörlerinin ekspresyonu ergenlik dönemi boyunca artmakta, yetişkin dönemde tekrar azalmaktadır. Bu durum ergenlik döneminde ortaya çıkan çeşitli psikiyatrik ve davranışsal bozuklukların, ilaç ve madde kullanımına yönelimin ve bağımlılık gelişiminin sıklıkla bu dönemde görülmesinin nörobiyolojik mekanizmasını açıklamaya yardımcı olmaktadır (Walker ve ark, 2017). Nucleus accumbens aynı zamanda gıda alımının hedonik ve motivasyonel yönlerinde de rol almaktadır. Gıda alımı bilişsel, emosyonel ve enerji homeostazisini sağlayan kompleks mekanizmalarca yönetilir ve dopaminerjik sistem bu işlevin 'isteme', ödüle karşı motivasyonel davranışların sergilenmesinde rol oynamaktadır (Frank, 2014). Yeme bozuklukları olarak adlandırılan anorexia nervosa ve bulimia nervosa da sıklıkla ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Anoreksiya hastalarında serebrospinal sıvıda homovanillik asit oranının sağlıklı kontrollere göre %30 oranında azaldığı, PET görüntülemeye corpus striatum anteroventral bölümünde D2 ve D3 reseptörlerinin, muhtemelen negatif geri bildirim nedeniyle, artış gösterdiği bildirilmiştir (Frank, 2014). Bulimia nervosa ise madde bağımlılığına benzemektedir, aşırı gıda alımı ile nucleus accumbens'e dopamin salınımı ve D1 reseptörlerine bağlanma artar, dorsal striatum'da ise D2 reseptörlerine bağlanma azalır (Avena ve Bocarsly, 2012).

Tuberoinfundibuler DAerjik yolak ile hypothalamus nucleus arcuatus'ta (A12) ve nuclei paraventriculares'te (A14) sentezlenen dopamin infundibuler bölgeye ve eminentia medialis'e projekte olur. Portal dolaşıma salınan dopamin, hipofiz bezinden prolaktin salınımını inhibe ederek etkisini gösterir. Antipsikotik ilaçlar gibi D2 reseptör blokajına neden

olan etken maddeler dopaminin inhibisyon etkisini önleyerek prolaktin artışına neden olurlar (Lyons ve ark, 2012).

Minör dopaminerjik yollar SSS’de bulunan dopaminerjik hücre gruplarının projekte olduğu alanları içerir. Area tegmentalis ventralis’de yer alan nöronların aksonları çoğunlukla majör dopaminerjik yollara katılmanın yanında gyrus cinguli, area piriformis, bulbus olfactorius, hippocampus, corpus amygdaloideum ve bulbus olfactorius’a, zona incerta’ da bulunan dopaminerjik nöron grubu (A13) hypothalamus’a, nucleus hypothalamicus posterior (A11) DAerjik nöronları ise medulla spinalis’e projekte olurlar. Retinada bulunan dopaminerjik amakrin hücrelerden ışık maruziyeti sonucu sentezlenen dopamin ise SSS dışında kalan tek minör dopaminerjik yoldur (Piccione ve DeFelipe, 2007; Jackson ve ark, 2012).

2.1.2.2.1. Nigrostriatal dopaminerjik yolak

Parkinson hastalığının patofizyolojisinde, klinik semptomlarının ortaya çıkışında en önemli rolü oynayan nigrostriatal yolak çoğunlukla SNpc’da (A9) bulunan dopaminerjik nöronların fasciculus medialis telencephali aracılığıyla putamen ve nucleus caudatus’a projeksiyonunu içerir. Substantia nigra retrorubral alanda (A8) ve area ventralis tegmentalis’te (A10) bulunan dopaminerjik nöronların bir kısmının da nigrostriatal dopaminerjik yolağa katıldığı bildirilmektedir (Luo ve Huang, 2016; Caminiti ve ark, 2017; Mishra ve ark, 2018). Area ventralis tegmentalis’te bulunan dopaminerjik nöronlar daha çok mezolimbik dopaminerjik yolağa katılarak corpus amygdaloideum, tuberculum olfactorium, prefrontal korteks ve anterior singulat korteks innervasyonunu sağladığı bildirilmektedir (Prensa ve Parent, 2001; Lanciego ve ark, 2012; Goedert ve ark, 2017). Birbirleri ile bağlantılı subkortikal bazal çekirdekler serebral korteks, beyin sapı ve thalamus’tan önemli girdiler olarak cerebellum’la birlikte motor hareketlerin değerlendirilmesinde ve düzenlenmesinde, motor hareketler dışında mental ve emosyonel fonksiyonlarda önemli rol oynarlar. Nuclei basales başlıca putamen, nucleus caudatus ve globus pallidus’un oluşturduğu corpus striatum, substantia nigra ve nucleus subthalamicus’tan oluşmaktadır (DeLong ve Wichmann, 2010).

Beyindeki dopamin miktarının %80’ini nigrostriatal yolak projeksiyon alanı corpus striatum içermektedir. Corpus striatum striozom ve matriks olarak adlandırılan nörokimyasal olarak farklı iki kompartımandan oluşmaktadır (Lanciego ve ark, 2012; Brimblecombe ve

Cragg, 2017). Zayıf asetilkolinesteraz immunoreaktivitesi gösteren bölüm corpus striatum'un projeksiyon nöronlarının bulunduğu striozomları, güçlü asetilkolinesteraz immunoreaktivitesi gösteren bölüm ise corpus striatum'un kolinerjik internöronlarının bulunduğu matriksi oluşturur. Striozomlarda enkefalin, substans P, GABA ve nörotensin yoğun olarak bulunurken, matriks kompartımanı kalsiyum bağlayıcı protein parvalbuminden zengindir (Lanciego ve ark, 2012). Substantia nigra pars compacta'nın dorsal bölümünde bulunan nöronlar matrikse, ventral bölümünde bulunanlar ise striozomlara projekte olurlar (Prensa ve Parent, 2001; Brimblecombe ve Cragg, 2017).

Nigrostriatal dopaminerjik yolak, aktiviteleri büyük ölçüde serebral korteks girdilerine bağlı olan, istemli hareketlerin planlanmasında direkt, istemsiz hareketlerin planlanmasında indirekt yolların rol oynadığı iki alt bölümden oluşmaktadır (Gerfen, 2000; Delong ve Wichmann, 2010; Tsui ve Isacson, 2011; Milardi ve ark, 2019). Korteksten gelen piramidal nöronların aksonları corpus striatum'da bulunan nöronların %90'ını oluşturan, dendritik uzantılarında sinaptik yüzey alanını arttıran spina adı verilen dikensi çıkıntıların bulunduğu, orta büyüklükte GABAerjik projeksiyon nöronları ile (medium spiny neurons; MSNs) sinaps yaparlar (Gerfen, 2000; Curtis ve ark, 2012; Luo ve Huang, 2016). Direkt yolda korteksten gelen uyarı dorsal striatum'un D1 reseptörü taşıyan GABAerjik nöronları ile sinaps yaptıktan sonra, diğer bazal çekirdeklerle sinaps yapmaksızın kortikal çıkış kapısı GPM ve SNpr'ya projekte olur. Buradan çıkan lifler thalamus'un ventral anterior ve lateral çekirdeklerinde nöron değiştirdikten sonra serebral korteksin eksitasyonunu sağlarlar (DeLong ve Wichmann, 2010; Lanciego ve ark, 2012; Yamada ve ark, 2016; Milardi ve ark, 2019). Şekil 3'de görüldüğü gibi indirekt yolak aktivitesinde korteksten gelen uyarı corpus striatum'da bulunan nöronların %10'unu oluşturan, D2 reseptörü taşıyan kolinerjik ara nöronlarla sinap yapar ve bu nöronların aksonları GPI'e projekte olur. Globus pallidus lateralis'ten çıkan lifler STN'a, STN'tan çıkan lifler GPM ve SNpr'ye, GPM ve SNpr'dan çıkan lifler thalamus'un ventral anterior ve lateral çekirdeklerinde nöron değiştirdikten sonra serebral korteksin inhibisyonunu sağlarlar. Substantia nigra pars compacta'dan dorsal striatum'a gelen dopamin GPM'e projekte olan, GABAerjik inhibitör nöronları D1 reseptörleri üzerinden uyarırken, GPI'e projekte olan kolinerjik eksitator nöronları D2 reseptörleri üzerinden inhibe etmektedir (Filippo ve ark, 2008; Delong ve Wichmann, 2010; Lanciego ve ark, 2012; Yamada ve ark, 2016; Milardi ve ark, 2019).

Dopaminerjik nöronların progresif ve dejeneratif değişikliklerine bağlı direkt ve indirekt yolak aktivitesindeki dengesizlikler PH'nın motor semptomlarının açığa çıkmasına neden olmaktadır (Gerfen, 2000; DeLong ve Wichmann, 2010; Poirier ve ark, 2016; Tanik ve ark, 2016; Caminiti ve ark, 2017). Nörodejenerasyon öncelikle corpus striatum'a projekte olan aksonal uzantılarda ortaya çıkmakta daha sonra hücre gövdesine yayılmaktadır. Aynı zamanda aksonal uzantılarda Lewy nöritleri baskın olarak bulunmaktadır (Caminiti ve ark, 2017). Parkinson hastalığında direkt nigrostriatal yolakta SNpc'dan dorsal striatum'a iletilen dopaminin azalması sonucu; D1 reseptörleri taşıyan inhibitör nöronların Gpm üzerindeki inhibisyon etkisi azalır, bu durum pallidotalamik projeksiyonlardaki inhibitör aktivitenin artışına neden olur. Thalamus çekirdeklerinde GABAerjik Gpm aksonlarının oluşturduğu inhibisyon motor kortekse giden uyarıların azalmasını sağlar. İndirekt nigrostriatal yolakta ise D2 reseptörleri taşıyan kolinerjik nöronların disinhibisyonu nedeni ile STN üzerindeki inhibisyon etkisi kalkar. Bu durum GPI'de bulunan nöronların eksitasyonunu sağlamakta, thalamus'a projekte olan nöronlar üzerindeki tonik aktivitenin artışına neden olmaktadır (Filippo ve ark, 2008; Lanciego ve ark, 2012; DeLong ve Wichmann, 2010; Yamada ve ark, 2016). Dopaminerjik denervasyon, striatal nöronlardaki nöropeptid seviyelerinin de ters yönde değişmesine; direkt yolakta dopaminerjik innervasyon yokluğunda substans P ve dinorfin seviyelerinin azalmasına, indirekt yolakta dopaminerjik inhibisyonun ortadan kalkması enkefalin miktarının artmasına neden olur (Gerfen, 2000). Sonuç olarak Parkinson hastalığında dopamin salgısının azalması pallidotalamik projeksiyonlardaki GABAerjik inhibitör aktivitenin artışına, motor kortekse giden uyarıların azalması dolayısıyla hipokinetik motor disfonksiyonlara neden olmaktadır (Gerfen, 2000; Yamada ve ark, 2016).

Nigrostriatal dopaminerjik yolak motor fonksiyonların planlanması, yürütülmesi ve otomatizasyonu yanında bir ödül karşısında gösterilen davranışların motivasyonel yönünü de etkilemektedir (Prensa ve Parent, 2001; Alcaro ve ark, 2007; Kroemer ve ark, 2014; Luo ve Huang, 2016; Brimblecombe ve Cragg, 2017). Bağırsaklardan gelen sensorik girdiler, dolaşımdaki leptin, grelin ve insülin hormon düzeylerinde görülen değişiklikler, hücre içi metabolitler gibi etmenler açlık veya tokluk sinyali oluşturarak gıda alımı motivasyonunu oluştururlar. Genetik olarak Thir defekti bulunan farelerde, gıda hedonikleri ve gıda ödülleri uzaysal öğrenimi işlevsel olmasına rağmen L-DOPA tedavisi uygulanana dek iştahsızlık, açlığa bağlı ciddi kilo kaybı görüldüğü bildirilmiştir (Palmiter, 2008). Bu durum dorsal striatum'a projekte olan dopaminin motivasyonel davranışlar üzerine olan etkisini de göstermektedir. Nigrostriatal yolak dopamin döngüsü motor hareketlerdeki öneminin yanında

ödöl ve çaba arasındaki dengenin kurularak verilen cevabın kuvvetini belirlemektedir (Kroemer ve ark, 2014).

2.1.3. Parkinson Hastalığının Etiyopatogenezi, Diagnostik Kriterler ve Tedavi Yöntemleri

Günümüze değin yapılmış olan pek çok araştırma PH'nın klinik ve patolojik özelliklerinin iyi tanımlanmasına olanak sağlamış olsa da, hastalığın etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (Huang ve ark, 2017; Giguere ve ark, 2018; Park ve ark, 2019). Parkinson hastalığı farklı tiplerde pek çok etmenin heterojenitesi ile ortaya çıktığından, çeşitli patofizyolojik belirteçler ve bunların hastalığın progresyonu ile olan bağlantıları üzerinden açık bir vizyona ulaşmaya çalışmak oldukça zordur (Giguere ve ark, 2018; Park ve ark, 2019) ve halen hastalığın patofizyolojisinin netleştirilmesinde bir takım boşluklar mevcuttur (Ludtmann ve Abramov, 2018; Karakatsani ve ark, 2019; Park ve ark, 2019). Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Parkinson Vakfı Tıbbi Direktörü Michael Okun, PH'nı "klinik tıptaki en karmaşık hastalık" olarak tanımlamaktadır (Fitzgerald ve ark, 2019). Parkinson hastalığının patofizyolojisinde spesifik bir etmeden ziyade yaşlanma, genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı heterojen bir sürecin etkili olduğu belirtilmektedir (Saiki ve ark, 2011; Hobson, 2012; Getz ve Levin, 2017; Giguere ve ark, 2018; Kim ve ark, 2019). Postmortem beyin araştırmaları, genetik çalışmalar ve spesifik nörotoksin uygulamaları ile oluşturulan deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar nörodejenerasyonun sebeplerini mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve yetersiz protein degradasyonu ile ilişkilendirmektedir (Pan-Montojo ve ark, 2010; Huang ve ark, 2017; Giguere ve ark, 2018).

Parkinson hastalığının birincil nöropatolojik kriteri SNpc dopaminerjik nöronlarının dejenerasyonu ile birlikte nöronlarda Lewy cisimciklerinin varlığıdır (Lanciego ve ark, 2012; Sveinbjornsdottir, 2016; Xu ve Pu, 2016; Perez-Pardo ve ark, 2017; Giguere ve ark, 2018; Ludtmann ve Abramov, 2018; Fitzgerald ve ark, 2019; Gorecki ve ark, 2019; Grünewald ve ark, 2019; Karakatsani ve ark, 2019; Wang ve ark, 2019). Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri ağırlıklı olarak alfa sinükleinden oluşan, fakat aynı zamanda ubikitin, tubulin, nörofilamentler, lipitler ve mitokondri gibi çok sayıda farklı molekül, protein ve organel içeren intrastoplazmik eozinofilik yapılardır (Giguere ve ark, 2018; Wang ve ark, 2019). Genetik olarak alfa sinüklein sentezinden sorumlu SNCA olarak adlandırılan genlerde görülen

nokta mutasyonu, duplikasyon veya triplikasyon nedeniyle proteinin sıklıkla hatalı katlanması sonucu oluşurlar (Hu ve Wang, 2016; Fitzgerald ve ark, 2019). Alfa sinüklein fizyolojik koşullarda presinaptik terminallerde bulunan, çözülebilir monomer yapısında, vezikül füzyon kompleksleri ile etkileşime girerek nörotransmitter salınımı, depolanması ve yıkımlanmasında görev alan, 140 aminoasitten oluşan bir proteindir (Reeve ve ark, 2014; Xu ve Pu, 2016; Fitzgerald ve ark, 2019) ve kalsiyum homeostazisinden, kompleks I aktivitesine kadar mitokondriyal dinamiklerde de rol oynamaktadır. Ubikitin proteozomal sistemi hücre içi protein agregatlarının degradasyonunu sağlayan, her aşamada yüksek enerji gerektiren bir sistemdir. Mitokondriyal disfonksiyon sonucu enerji tedarikinin azalması Lewy cisimciklerinin yıkımlanamaması ile sonuçlanır (Reeve ve ark, 2014; Wang ve ark, 2019). Lewy cisimcikleri Parkinson hastalığının yanında Lewy cisimcikli demans ve multipl sistem atrofsinin de nöropatolojik kriterleri arasındadır (Wang ve ark, 2019).

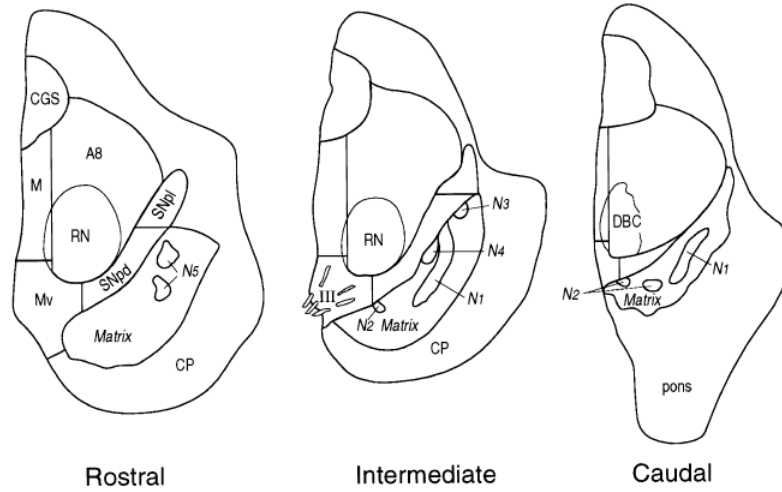
Mitokondriyal disfonksiyon PH'nın patogenezinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Parkinson hastalığı ile ilişkili çoğu genetik faktörün ekspresyonu mitokondriyal fonksiyonlar ile ilişkili proteinlerdir (Marella ve ark, 2009; Hu ve Wang, 2016; Grünewald ve ark, 2019). Mitokondriyal disfonksiyonlar ile PH patogenezi arasındaki bağlantı 1980'lerin ortalarında Parkinson hastalığına benzer semptomlar gösteren ve L-DOPA tedavisine cevap veren uyuşturucu bağımlılarının kullandığı bir nörotoksin olan MPTP keşfi ile anlaşılmıştır (Hu ve Wang, 2016; Grünewald ve ark, 2019). Astrositlerde monoamin oksidaz ile aktif metaboliti 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum'a (MPP) dönüşen MPTP dopamin taşıyıcısı ile dopaminerjik nöronlara taşınır. Dopaminerjik nöronlarda mitokondriyal solunum zincirinde proton pompası olarak görev yapan kompleks I inhibisyonuna yol açarak, elektron taşıma zincirinin disfonksiyonuna dolayısıyla hücre içi enerji üretilmemesine ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkmasına neden olur (Reeve ve ark, 2014; Hu ve Wang, 2016; Grünewald ve ark, 2019). Günümüzde deneysel Parkinson hastalığı oluşturmak amacı ile kullanılan rotenon, parakuat gibi benzer nörotoksinlerin çoğu da seçici olarak mitokondriyal kompleks I inhibisyonunu sağlayarak etkisini göstermektedir (Hu ve Wang, 2016). Mitokondriyal kompleks I inhibisyonu ve ROS üretimi dopaminerjik nöronların dejenerasyonu için anahtar mekanizmadır. Hücre içi oksidatif stresin artması, hatalı katlanmış protein agregatlarının degradasyonunu sağlayan ubikitin proteozomal sisteminin de disfonksiyonuna neden olmaktadır (Reeve ve ark, 2014). Sonuç olarak mitokondriyal membran potansiyeli azalır, hücre içi kalsiyum homeostazisi bozulur ve mitokondriler yıkımlanır (mitofaji), nörodejenerasyon görülür (Hu ve Wang, 2016).

Gliyal hücre popülasyonunda yer alan astrositler ve mikroglia hücreleri ektodermden gelişirler, nöronlardan farklı olarak hematopoietik kökenlidirler ve substantia nigra, nuclei basales'de yoğun olarak bulunurlar. Mikroglialar SSS'nin yerleşik makrofajlarıdır, kan-beyin bariyeri formasyonu ve iyon dengesinden sorumlu astrositlerle birlikte SSS'nin doğal bağışıklık sistemini oluştururlar (Huang ve ark, 2017; Subramaniam ve Federoff, 2017). Çeşitli etkenler tarafından aktive edildiklerinde pro-inflamatuar sitokinler, kemokinler, ROS sentezler ve PH'nda nöroinflammatuar süreçlerde rol oynarlar (Desai ve ark, 2007; Pisanu ve ark, 2014; Rodriguez ve ark, 2015; Huang ve ark, 2017; Subramaniam ve Federoff, 2017). McGeer ve ark (1988) tarafından, Parkinson hastalarına ait postmortem beyin incelemelerinde substantia nigra ve corpus striatum'da reaktif mikrogliaların tespiti, PH patogenezinde nöroinflamasyonun ve inflammatuar süreçlerde mikrogliaların fonksiyonel önemini göstermiştir (Desai ve ark, 2007; Wang ve ark, 2015; Subramaniam ve Federoff, 2017). Parkinson hastalarında interlökin 1 β (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6) interferon gama (IFN- γ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi mikroglia hücreleri tarafından sentezlenen pro-inflamatuar mediyatörler (Wang ve ark, 2015; Huang ve ark, 2017) ve PET görüntülemeye çeşitli beyin bölgelerinde mikrogliaların aktivasyonu tespit edilmiştir (Gray ve Woulfe, 2015). Dejenere dopaminerjik nöronlardan salınan alfa sinüklein agregatları ve bazı moleküllerin mikroglia aktivasyonunu şiddetlendirerek nörodejenerasyonu hızlandırdığı, reaktif mikrogliaların alfa sinüklein agregatlarının çevresinde toplandığı bilinmektedir (Wang ve ark, 2015). Mikroglia hücreleri farklı karakterdeki gen ekspresyonlarına bağlı olmak üzere pro-inflamatuar M1 ve anti-inflamatuar M2 olmak üzere iki farklı aktivasyon fenotipi gösterirler. Pro-inflamatuar M1 aktivasyonu IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6 gibi yangı mediyatörleri ve nitrit oksit, süperoksit gibi sitotoksik ROS salınımına neden olur. Anti-inflamatuar M2 aktivasyonu ise interlökin-4 (IL-4), interlökin-10 (IL-10), interlökin-13 (IL-13), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) salınımı ile immunsupresyonu sağlamaktadır. Deneysel Parkinson hastalığı çalışmalarında Lewy cisimcikleri ve çevresel toksinlerin M1 mikroglial aktivasyona neden olduğu (Wang ve ark, 2015; Subramaniam ve Federoff, 2017), SSS'de bulunan M2 mikrogliaların fenotipik belirteçlerinden CD206 ekspresyonunun oldukça azaldığı saptanmıştır (Pisanu ve ark, 2014). Mikroglialar gibi astrositlerde çeşitli pro-inflamatuar sitokinler sentezleyerek nöroinflammatuar süreçlerde önemli rol oynarlar. Reaktif astrosit belirteci gliyal fibriller asidik protein (GFAP) varlığı Parkinson hastalarının post mortem beyin dokusunda ve deneysel Parkinson hastalığı çalışmalarında gösterilmiştir. Astrositlerin aktivasyonu mikroglialardan salınan pro-inflamatuar sitokinler vasıtası ile gerçekleşmektedir (Rodriguez ve ark, 2015; Wang ve ark, 2015).

Parkinson hastalığında nöroinflamatuvar süreçlerin gelişiminde kan beyin bariyeri (KBB) taşıyıcı sisteminde ve permeabilitesinde görülen değişiklikler de önem arz etmektedir (Gray ve Woulfe, 2015; Karakatsani ve ark, 2019). Santral sinir sistemi seçici geçirgen özellikteki KBB'nin varlığı sayesinde immunolojik olarak imtiyazlıdır (Wang ve ark, 2015). Fizyolojik koşullarda periferel immun hücreler; T ve B lenfositler, SSS'de bulunmazlar. Parkinson hastalarında KBB kapiller damarlarında bulunan endotel tabakasındaki hücrelerin sıkı bağlantılarını sağlayan okludin, kloudin ve adhezyon proteinlerinin azalmasına bağlı görülen KBB'nde permeabilite artışı periferel immun hücrelerin, pro-inflamatuar yangı mediyatörlerinin SSS'ne geçişine olanak sağlar ve nörodejenerasyon oldukça şiddetlenir (Desai ve ark, 2007; Gray ve Woulfe, 2015; Wang ve ark, 2015). T hücre aracılı nörodejenerasyonda CD4 ve CD8 ekspresyonu gösteren T hücrelerinin rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve ark 2015; Subramaniam ve Federoff, 2017). Ayrıca Parkinson hastalarında, etiyojisi kesin olarak bilinmese de, KBB taşıyıcı sistemindeki değişimlere bağlı olduğu düşünülen, özellikle SNpc nöronlarında ve nucleus ruber'de demir birikimi görülmektedir. Yoğun demir birikiminin oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu, parkin ve SNCA genlerini tetiklediği bildirilmektedir (Girotra ve ark, 2017). Kan beyin bariyerinde hasar oluşumunu indükleyen vasküler endoteliyal büyüme faktörünün (VEGF) stereotaksik yöntemle, intranigral olarak verildiği farelerde SNpc dopaminerjik nöronlarında dejenerasyon görülmüştür (Yasuda ve ark, 2007). Parkinson hastalarında ve deneysel Parkinson hastalığı modellerinde de VEGF'nin önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir (Wang ve ark, 2015). Nöroinflamatuvar süreçleri modüle ederek, anti-inflamatuar etkilere sahip etken maddelerin PH patogeneğinde olumlu sonuçlar doğurabileceği düşünülmüş, nitekim non-steroid anti-inflamatuar ilaçların kullanımının %15 oranında PH'nın gelişim riskini azalttığı, düzenli ve uzun süreli kullanımda bu oranın %21-29'a çıktığı bildirilmiştir (Gagne ve Power, 2010; Wang ve ark, 2015). Anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkilere sahip ikinci jenerasyon tetrasiklin analoglarından olan minosiklin ve bir glukokortikoid bileşiği olan deksametazon uygulamasının da dopaminerjik nöronları dejenerasyondan koruduğu, gliyal hücre aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (Wang ve ark, 2015).

Bazal çekirdeklerin bir bileşeni olan, mesencephalon'da yer alan substantia nigra beyin kesitlerinde bütün bir bant olarak görölse de histolojik ve fonksiyonel yönden inferoposterior olarak bulunan pars compacta ve superoanterior olarak bulunan pars reticulata ve pars reticulata'nın arka ucunda yer alan pars lateralis olmak üzere üç ayrı bölümden oluşmaktadır (Amel ve Heba, 2013; Massey ve ark, 2017; Sung ve ark, 2018). Corpus striatum'a projekte

olan dopamini üreten DAerjik nöronların bulunduğu ana bölge pars compacta'dır (Massey ve ark, 2017). Pars reticulata, globus pallidus'un iç kısmına yapısal ve fonksiyonel olarak güçlü bir benzerlik gösterir burada bulunan nöronların çoğu GABAerjiktir ve globus pallidus ile birlikte bazal çekirdeklerden thalamus'a projekte olurlar (Massey ve ark, 2017; Sung ve ark, 2018). Orta beyinde bulunan katekolaminerjik nöronların bol miktarda ihtiva ettiği nöromelanin pigmenti substantia nigra ve locus coeruleus'a diğer beyin bölgelerinden farklı, karakteristik koyu rengini veren pigmenttir (Zecca ve ark, 2001; Lanciego ve ark, 2012). Özellikle yaşamın ilk 2-3 yılından sonra bu bölgelerde nöromelanin pigmenti ilerleyen yaşla birlikte birikim gösterir (Zecca ve ark, 2001; Reeve ve ark, 2014; Rodriguez ve ark, 2015). Parkinson hastalarında SNpc'da olduğu gibi locus coeruleus'ta da nöron kaybı görülür, bunun yanında SNpc'nin ventrolateral bölümünde nöron kaybı daha fazladır, dorsomedial bölümde bulunan nöronlar dejenerasyona daha dayanıklıdır ve kısmen yıkımlanırlar (Damier ve ark, 1999; Dopeso-Reyes ve ark, 2014; Fabbri ve ark, 2017; Karakatsani ve ark, 2019). Bu seçici nörodejenerasyonun nedeni halen tartışma konusu olmakla birlikte, SNpc'da bulunan dopaminerjik nöronların dejeneratif etkenlere heterojenite gösterdiği açıktır. Dopaminerjik nöronları belirlemeye yönelik tirozin hidroksilaz ve kalbindin immunohistokimyasının kombine uygulandığı çalışmalarda SNpc ventral bölümünde kalbindin bulunmazken, area tegmentalis ventralis ve SNpc dorsal bölümünde bulunan dopaminerjik nöronlarda kalbindin varlığı gösterilmiştir (Damier ve ark, 1999; Xu ve Pu, 2016; Dopeso-Reyes ve ark, 2014). Sinaptik iletim ve depolarizasyon aşamasında ekstrasellüler aralıktan hücre içine kalsiyum akışı gerçekleşmektedir. Hücre içine olan kalsiyum akışı kalbindin, kalmodulin ve kalsiyum tamponlama proteinleri tarafından sıkı şekilde kontrol edilmektedir (Dopeso-Reyes ve ark, 2014; Ludtmann ve Abramov, 2018). Lewy cisimciklerinin plazma membranında gözenekler oluşturarak ekstrasellüler aralıktan sitozole kalsiyum geçişini arttırdıkları bildirilmiştir, artan hücre içi kalsiyum mitokondri ve endoplazmik retikulum tarafından düzenlenmeye çalışılır ve oksidatif stres gelişimine katkıda bulunur (Ludtmann ve Abramov, 2018). Damier ve arkadaşları (1999) Şekil 4'de görüldüğü gibi SNpc'da bulunan, kalbindin negatif hücre kümelerinin 'nigrozom' olarak adlandırıldığı 5 alt gruba ayırmışlardır. En geniş 'N1' olarak adlandırılan nigrozom 1 PH'nda ilk dejenere olan bölümdür, hastalığın şiddeti arttıkça sırasıyla N2, N4, N3 ve N5 bölgelerinde bulunan nöronlarda dejenerasyona uğrarlar (Damier ve ark, 1999; Saeed ve ark, 2017; Sung ve ark, 2018; Schwarz ve ark, 2018; Cheng ve ark, 2019).



Şekil 4: Mesencephalon transvers kesitlerinde farklı nigrozom bölgelerinin gösterimi. CGS; substantia grisea centralis, M; medial grup, Mv; Medioventral grup, RN; nucleus ruber, A8; retrorubral dopaminerjik nöron grubu, SNpd, SNpl; substantia nigra'nın dorsal ve lateral bölümleri, N; nigrozom, DBC; pedunculus cerebellaris superior çaprazı (brachium conjunctivum), CP; serebellar pedinkül, III; nervus oculomotorius çıkış noktası (Damier ve ark 1999).

Parkinson hastalığının gelişiminde nörotropik bir patojenin vücuda nazal ve/veya gastrik yol ile alındıktan sonra, aksonal transportla merkezi sinir sistemine taşındığı fikri de bilimsel olarak oldukça fazla kanıta sahip, güncel olarak çalışılan, hastalığın etiopatogenezeine farklı bir bakış açısı getirmiş olan bir hipotezdir. İlk olarak Braak ve arkadaşları (2003) tarafından ortaya atılmıştır ve 'çift vuruş hipotezi' olarak bilinmektedir (Pan-Montojo ve ark, 2010; Hobson, 2012; Gray ve Woulfe, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Subramaniam ve Federoff, 2017). Çift vuruş hipotezine göre Parkinson hastalığının birincil nöropatolojik bulgularından biri SNpc nöronlarının dejenerasyonu değildir. Çeşitli etmenler sebebi ile motor semptomların ortaya çıkmasından çok önce başlayan, premotor semptomların ortaya çıkışında anahtar rol oynayan ve dopaminerjik nöronlara spesifik olmayan bir sürecin sonunda PH gelişmektedir ve dopaminerjik nörodejenerasyon da bu sürecin ilerleyen aşamalarında görülen bir bulgudur (Braak ve ark, 2003; Todorova ve ark, 2014). Braak ve arkadaşlarına (2003) göre Lewy cisimcikleri ilk olarak nucleus dorsalis nervi vagi ve nervus glossopharyngeus innervasyonunu sağlayan nucleus solitarius'ta ve bulbus olfactoris'ta ortaya çıkmakta caudo-rostral olarak aksonal transportla hücreden hücreye geçerek SSS'ne yayılmakta, nörodejeneratif ve inflamatuvar mekanizmaları tetiklemektedir. Çift vuruş hipotezinde PH'nın gelişimi klinik semptomlarla ilişkilendirilerek altı aşamada

açıklanmaktadır. Birinci ve ikinci aşama klinik olarak hastalığın preklinik dönemidir, Lewy cisimcikleri yalnız SSS’de medulla oblongata, tegmentum pontis, bulbus olfactorius ve nucleus olfactorius anterior, nucleus dorsalis nervi vagi, nucleus solitarius’ta, periferde intestinal dokuda, olfaktor mukozada ve glandula submandibularis’te bulunur. Üçüncü ve dördüncü aşamada substantia nigra ve diğer mezensefalik çekirdeklerin tutulumu gerçekleşir, klinik olarak motor semptomlar görülür. Beşinci ve altıncı aşamada ise Lewy cisimcikleri beyin korteksine yayılmışlardır, çok çeşitli klinik semptomlar görülür (Braak ve ark, 2003; Sampson ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016; Giguere ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018; Mihaila ve ark, 2019). Bu yayılmacı patoloji PH’nın prion hastalıklarına benzer bir patolojiye sahip olduğu düşüncesini doğurmuştur, nitekim alfa sinüklein fibrillerinin enjekte edildiği farelerde takip eden süreçte alfa sinüklein agregasyonları ve SNpc nöron dejenerasyonunun geliştiği saptanmıştır (Wang ve ark, 2019). İlginç olarak Creutzfeldt-Jakob gibi prion hastalıklarında da olfaktor yollarının tutulumunun gerçekleştiği bilinmektedir (Hobson, 2012). Ayrıca primer nöronal hücre kültürlerinde alfa-sinüklein oligomerlerinin nöronlar tarafından endositozla alınarak alfa-sinüklein agregatlarına indüklendiği bildirilmiştir (Desplats ve ark, 2009). Deneysel Parkinson hastalığı oluşturmak amacıyla, çeşitli yollarla uygulanan pestisitlerden biri olan rotenonun oral yolla uygulandığı farelerde enterik ve santral sinir sisteminde alfa-sinüklein agregatların varlığı ve SNpc’da nöron dejenerasyonu gösterilmiştir (Pan-Montojo ve ark, 2010). Ratlarda intranazal mangan ve MPTP uygulamasının üç hafta sonrasında, mesencephalon ve medulla oblongata’da Lewy cisimciklerinin varlığı gösterilmiştir (Hobson, 2012).

Parkinson hastalığının etiyopatogenezinde rol oynayan genetik nedenler daha çok 20 yaş altında görülen primer juvenil parkinsonizm ve 20-40 yaşları arasında motor semptomların görüldüğü genç başlangıçlı parkinsonizm olguları ile ilişkilendirilmektedir (Ylikotila ve ark, 2015; Neimann ve Jankovic, 2019). Genç başlangıçlı olgularda cinsiyetin etkili olduğu, erkeklerde daha sık görüldüğü bilinmektedir (Rajsombath ve ark, 2019). Aile öyküsünde PH bulunan bireylerin genel popülasyondan 3-4 kat daha fazla risk altında olduğu bildirilmektedir (Ylikotila ve ark, 2015). Amerika Birleşik Devletleri’nde 40 yaş altı popülasyonda görülen parkinsonizm olgularının insidansı %3-5 olarak belirtilirken Japonya’da bu oran %10 olarak bildirilmiştir (Schrag ve Scott, 2006). Genetik nedenler arasında alfa sinüklein ve parkin genleri olarak adlandırılan çeşitli kromozom lokuslarında bulunan otozomal dominant; PARK1/4 (SNCA), PARK3, PARK8, PARK11, PARK13 ve otozomal resesif; PARK2, PARK6, PARK7, PARK9, PARK14, PARK15, LRRK2, DJ-1,

PIN1 genlerinde oluşan mutasyonlar bulunmaktadır (Lotharius ve Brundin, 2002; Saiki ve ark, 2011; Subramaniam ve Federoff, 2017; Akbayır ve ark, 2018; Giguere ve ark, 2018; Neimann ve Jankovic, 2019). Genç başlangıçlı parkinsonizm olgularında parkin mutasyonlarının prevalansı etnik kökene ve ülkeye göre %2.9-11.1 arasında değişmektedir (Malek ve ark, 2015). Parkinson hastalığı ile ilişkili genetik mutasyonların yaşlanma ve çevresel faktörlere bağlı olarak da ortaya çıkabileceği bildirilmektedir (Akbayır ve ark, 2018). Genetik kodların fonksiyonuna ilişkin erken yaşlarda başlayan PH olgularında hastalar arasında hastalığın başlangıç yaşı, ilerleme hızı ve semptomların kesin profili farklılık göstermektedir. Örneğin PARK7 mutasyonu ile görülen genç başlangıçlı PH olgularında psikiyatrik semptomlar yaygındır, blefarospazm ve skolyoz eşlik edebilir, PARK14 mutasyonunda ise cerebrum ve cerebellum atrofisi görülür (Saiki ve ark, 2011). Ayrıca genetik kökenli primer juvenil parkinsonizm ve genç başlangıçlı parkinsonizm olgularının büyük çoğunluğunda Lewy cisimcikleri görülmez (Hirsch ve ark, 2012; Malek ve ark, 2015; Neimann ve Jankovic, 2019). Bazı çalışmalarda otozomal resesif genlerde oluşan mutasyonlar nedeni ile görülen PH olgularında oldukça sık rastlanan bir premotor semptom olan olfaktor disfonksiyonların bulunmadığı da belirtilmektedir (Malek ve ark, 2015). Dopamin reseptörlerini bloke eden haloperidol, olanzapin gibi ilaçların kullanımı, kafa travması, ensefalite neden olan otoimmün hastalıklar, dang humması, *mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr virus, varicella Zoster virus ve coxsackie virus enfeksiyonları, mezensefalik tümörler, obstruktif hidrosefalus, kraniyal radyoterapi geçmişi ve iskemiye sebep olan dolaşım bozuklukları da pediatrik parkinsonizm olgularına neden olmaktadır (Neimann ve Jankovic, 2019). Pek çok genetik mutasyonun ve patolojinin benzer motor semptomlarla seyretmesi nedeniyle Parkinson hastalığının birden fazla olası etiyolojisi olan bir sendrom olduğu açıktır (Adler, 2011).

Parkinson hastalarının %90'ında hastalık belirlenebilir bir genetik faktörle ilişkili bulunmamakta, çevresel faktörlerin hastalık patogeneğinde önemli yer tuttuğu belirtilmektedir (Hirsch ve ark, 2012; Ylikotila ve ark, 2015; Ascherio ve Schwarzschild, 2016; Tysnes ve Storstein, 2017; Akbayır ve ark, 2018; Kim ve ark, 2019). Özellikle pestisitlere, demir, kurşun ve mangan gibi ağır metallerle maruziyet, travmatik beyin hasarı, süt ve süt ürünleri tüketimi, antidepresan ilaçlar ve amfetamin gibi uyarıcı maddelerin kullanımının Parkinson hastalığı riskini arttırdığı bildirilirken, sigara ve alkol kullanımı, düzenli kahve ve siyah çay tüketiminin hastalık riskini azalttığı bildirilmektedir (Pan-Montojo ve ark, 2010; Bollinger ve ark, 2012; Ascherio ve Schwarzschild, 2016; Getz ve Levin, 2017; (Parashar ve Udayabanu,

2017; Kim ve ark, 2019). Kırsal kesimde tarım ile uğraşan ve sıklıkla, deneysel Parkinson hastalığı oluşturmak için de kullanılan, rotenon, parakuat, maneb ve benzeri pestisitleri kullanan çiftçilerde PH gelişim oranı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Akbayır ve ark, 2018). Güney Kore’de yapılmış bir araştırma sigara kullanımının erkeklerde %50 kadınlarda %23, alkol tüketiminin ise erkeklerde %23 kadınlarda %41 oranında PH riskini azalttığını belirtmektedir (Kim ve ark, 2019). Cinsiyete bağlı görülen bu farklılıkların başlıca kadın ve erkek beyninin farklı olmasından ileri geliyor olabileceği belirtilmektedir. Sigaranın ana bileşeni olan nikotin $\alpha 6\beta 2$ ve $\alpha 6\beta 4$ nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerinden corpus striatum’a dopamin salınımını uyarmaktadır (Getz ve Levin, 2017). Kadınlar arasında fark bulunmaz iken sigara kullanan erkeklerde kullanmayan erkeklere göre $\beta 2$ reseptörlerinin alt ünitelerinin daha fazla olduğu saptanmıştır (Cosgrove ve ark, 2012). Alkol tüketiminin ise kadınlarda daha etkili olması gastrik alkol dehidrojenaz aktivitesinin kadınlarda erkeklere kıyasla daha düşük olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Kim ve ark, 2019). Eşit miktar alkol tüketiminden sonra kadınlarda serum ürat düzeyi daha yüksek bulunmuştur (Gaffo ve ark, 2010). Ayrıca dişi eşey hormonu östrojenin dopaminerjik nöronları yıkımdan koruduğu (Cerri ve ark, 2019), Parkinson hastalığı semptomlarının şiddetini azalttığı, cerrahi veya doğal menapoz sonrası kadınlarda da riskin arttığı belirtilmektedir (Marras ve Saunders-Pullman, 2014; Lee ve ark, 2019; Park ve ark, 2019). Ovariectomize ratlarla yapılmış bir deneysel çalışmada 30 günlük östrojen yokluğunun SNpc dopaminerjik nöronlarının %30’undan fazlasının kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Leranth ve ark, 2000). Substantia nigra ve area tegmentalis ventralis’de östrojen reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Östrojen presinaptik olarak tirozin hidroksilaz aktivitesini artırarak dopamin sentezini arttırmakta, postsinaptik olarak dopamini yıkımlayan katekol-O-metil transferaz enziminin mRNA ekspresyonunu azaltmaktadır (Saunders-Pullman, 2003). Cinsiyete bağlı bu farklılıkların yanında kronik stres maruziyeti en önemli çevresel risk faktörlerindendir. Pestisitler, kimyasal çözücüler ve metal maruziyeti yaşayan meslek grupları; çiftçiler, ağaç işçileri, ressamlar ve sağlık çalışanları arasında PH insidansı yüksektir (Cerri ve ark, 2019). Fransa’da sanayi sektörlerinin kapsamlı bir analizine dayanarak yapılmış olan bir çalışmada PH insidansı ile tarım, metalurji ve tekstil sektörleri arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki saptanmıştır (Vlaar ve ark, 2018). Fiziksel aktivite PH başlangıcını, şiddetini ve ilerlemesini etkileyen diğer bir önemli yaşam tarzı faktörüdür (Cerri ve ark, 2019). Orta yaş döneminde yapılan yoğun egzersiz PH riskinin azalmasında, hastalığın prognozunun daha iyi seyretmesinde ve düşük oranda komplikasyon görülmesinde etkilidir (Rafferty ve ark, 2017).

Yaşlanma yalnızca Parkinson hastalığı ile değil, tüm nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen ancak patofizyolojisi tam olarak açıklanamayan bir faktördür (Reeve ve ark, 2014, Rodriguez ve ark, 2015). Yaşlanma, yıpranma ve aşınma nedeni ile görülen bir sonuç değil, oksidatif stres ve enerji metabolizmasının değişimlerini içeren bir süreçtir. Orta yaş sonrası her on yılda bir substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların, çevresel faktörlere de bağlı olmak üzere %4.7-9.8 oranında azaldığı bildirilmektedir (Akbayır ve ark, 2018). Yaşlanma ile birlikte hipokampus, putamen, hypothalamus ve nucleus basalis telencephali'de nöron sayılarının nispeten aynı kaldığı ancak kortikal nöronlarda ortalama %10, substantia nigra haricinde dopaminerjik nöronların bulunduğu ventral tegmental ve retrorubral alan nöronlarında %50'ye yakın kayıp görüldüğü bildirilmektedir. Bu durum dopaminerjik nöronların yaşlanma ile ilgili değişikliklere daha duyarlı olduklarını göstermektedir (Reeve ve ark, 2014). Dopaminerjik nöronların nörodejeneratif süreçlere daha duyarlı olmaları dopamin metabolizmasının monoamin oksidaz basamağında açığa çıkan hidrojen peroksit gibi serbest radikallere, substantia nigra'da bulunan dopaminerjik nöronların içerdiği nöromelanin pigmentinin serbest radikaller, demir elementi ve hücre katyonlarla reaksiyona girmesine, yaşlanma ile birlikte ubiquitin proteozomal sisteminin niteliğinin azalmasına bağlanmaktadır ki Lewy cisimcikleri PH'nda olduğu kadar yoğun olarak bulunmasa da, sağlıklı yaşlı insanlarda da saptanmaktadır (Zeca ve ark, 2001; Reeve ve ark, 2014; Rodriguez ve ark, 2015; Giguere ve ark, 2018).

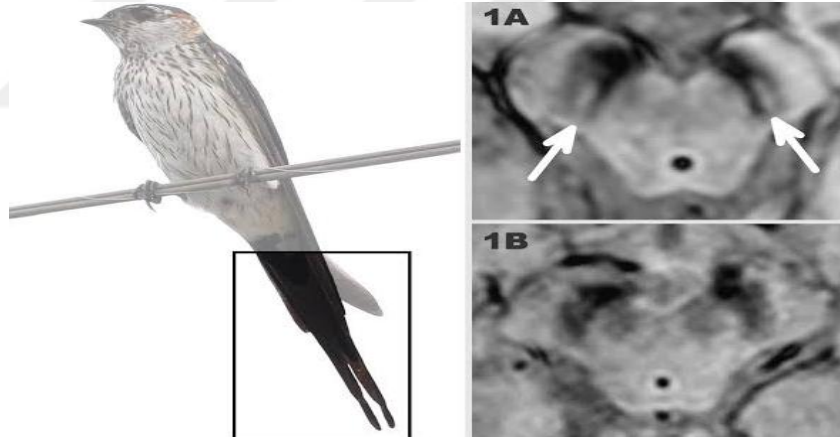
2.1.3.1. Parkinson hastalığında tanı ve tedavi yöntemleri hakkında genel bilgiler

Parkinson hastalığı multifaktöriyel etiyolojiye sahip, klinik olarak premotor ve motor semptomların ortaya çıkış paterni ve progresyonunda hastalar arasındaki profili oldukça heterojen bir hastalıktır. Bu nedenle klinik olarak PH tanısı pek çok premotor semptomun varlığına rağmen çoğunlukla motor dönemde, motor semptomların varlığına ve karakterizasyonuna göre tanı koyulmaktadır (Regensburger ve ark, 2014; Rizek ve ark, 2016; Ruffmann ve Parkkinen, 2016; Gao ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018; Fitzgerald ve ark, 2019; Grochowska ve ark, 2019; Sui ve ark, 2019). İngiltere Parkinson Hastalığı Derneği Beyin Bankası klinik tanı kriterlerinde bradikinezi temel alınır, bradikineziye asimmetrik başlangıçlı 4-6 hertz şiddetinde tremor, vizüel, vestibüler, serebellar ve proprioseptif disfonksiyonlarla alakalı olmayan postürel instabilite veya rijidite semptomlarından herhangi birinin eşlik ediyor olması, Levodopa sağaltımından olumlu cevap alınması klinik PH tanısı için yeterlidir (Rizek ve ark, 2016; Tarakad ve Jankovic, 2018).

Çoğu olguda (%70) motor semptomlar vücudun bir yarımında ve %41 oranla vücudun sağ yarımında ortaya çıkar, birkaç yıl içerisinde de kontralateral tarafta görülür. Vücut fleksiyon postürü, yürüyüş bozuklukları, yürürken kol salınımının olmaması, istirahat halinde genellikle el veya ayak gibi uzuvlarda, %70 sıklıkla üst ekstremitelerde başlayan tek taraflı tremor ilk motor bulgulardandır (Hobson, 2012; Rizek ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016). Parkinson hastalığının ilk tanımlanmasından bu yana geçmiş olan 200 yıldan fazla süre içerisinde, klinikopatolojik korelasyon ile birlikte semptomların kapsamlı klinik karakterizasyonu tanı için güçlü klinik kriterlerin, UPDRS ve NMS gibi değerlendirme skalalarının oluşturulmasını sağlamıştır (Huang ve ark, 2017; Tibar ve ark, 2018). Bununla birlikte motor tezahürler olmadan PH'nı erken tespit etmek de son derece önemlidir (Chahine ve ark, 2014; Nair ve ark, 2018). Parkinson hastalığında doğru tanı sadece tedavi ve prognoz için değil, aynı zamanda klinik ve epidemiyolojik çalışmalar için de önem arz etmektedir. Ancak multifaktöriyel etiyolojisi ve hastalar arasındaki farklı klinik profili nedeniyle PH'nın klinik pratikte yanlış teşhisi oldukça yaygındır. Yakın tarihli bir derleme Parkinson hastası olarak bildirilen olgularda doğru tanı oranının yalnızca %80.6 olduğunu bildirmektedir (Rizzo ve ark, 2016). Esansiyel tremor klinik olarak PH ile en kolay karıştırılan sendromlardan biridir (Gao ve ark, 2018). Kesin tanı Parkinson hastalığının spesifik bulguları olan SNpc nörodejenerasyonu ile birlikte Lewy cisimciklerinin varlığının gösterilmesiyle ancak post mortem incelemelerde koyulabilmektedir (Marsh, 2013; Poirier ve ark, 2016; Ruffmann ve Parkkinen, 2016; Gao ve ark, 2018; Tarakad ve Jankovic, 2018). Bu nedenle, klinik pratikte yalnızca semptomların tezahürüne dayanan UPDRS ve NMS skalalarına göre PH teşhisine ek olarak L-DOPA uygulamasına alınan olumlu yanıt da tanıyı doğrulayan en önemli etmendir (Xia ve Mao, 2012; Poirier ve ark, 2016; Rizek ve ark, 2016).

Radyolojik görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler, PH'nda beyinde görülen dejeneratif süreçleri araştırmak, erken tanı koymayı sağlayabilecek kriterlerin geliştirilmesini sağlamak ve olası diğer patolojilerin tanımlanarak saf dışı bırakılması amacıyla günümüzde önem kazanmıştır (Rizek ve ark, 2016; Nair ve ark, 2018; Perlberg ve ark, 2018). Nigrostriatal dopaminerjik yolak PET ve tek foton emisyon tomografisinde (SPECT) dopamin taşıyıcı için radyoligantlar kullanılarak in vivo olarak görüntülenabilmektedir. Fonsiyonel MRI, perfüzyon MRI, difüzör tensör görüntüleme ve transkraniyal ultrasonografi görüntüleme yöntemleri diğer parkinsoniyen olguların ayırımında oldukça fayda sağlamaktadır (Pagano ve ark, 2016; Rizek ve ark, 2016). Yapısal MRI görüntülemeleri vasküler veya neoplastik patolojisi olan parkinsonizm olgularının PH'ndan ayırımında oldukça fayda sağlamaktadır (Pagano ve ark,

2016). Bu görüntüler üzerinde yapılan voksel bazlı morfometrik ölçümlerde Parkinson hastalarında nucleus caudatus ve putamen hacminin, hippocampus, frontal lob, gyrus cinguli ve gyrus temporalis superior'da gri cevherin azaldığı bildirilmiştir (Saeed ve ark, 2017). Daha fazla manyetik alan üreterek daha kaliteli görüntüler sağlayan 3 ve 7 Tesla MRI görüntülemelerde, hastalığın erken dönemlerinde dahi Parkinson hastaları sağlıklı kontrollerden ve atipik parkinsoniyen olgulardan yüksek doğruluk payı ile ayırt edilebilmektedir (Fabbri ve ark, 2017; Sung ve ark, 2018; Takahashi ve ark, 2018; Cheng ve ark, 2019). Substantia nigra T1 ağırlıklı (T1'W1) MRI görüntülerinde hiperintens bir bant olarak görülmektedir (Takahashi ve ark, 2018). Lokal demir birikimi manyetik alanın homojenitesini bozar, T2 ağırlıklı (T2'W1) MRI görüntülerinde, transvers relaksasyon süresi kısaldığı için hipointens olarak görünür (Takahashi ve ark, 2018). Resim 2'de görüldüğü gibi N1'de bulunan nöronların dejenerasyonu ve artmış demir konsantrasyonuna bağlı T2 yoğunluklu, demir duyarlı MRI görüntülemelerde N1 bölgesinde sinyal azalımı ve oluşan 'kırlangıç kuyruğu' görüntüsü PH için spesifiktir (Saeed ve ark, 2017; Sung ve ark, 2018; Schwarz ve ark, 2018; Cheng ve ark, 2019).



Resim 2: 1A; Parkinson hastası bireyde dejenere olmuş N1 bölgesi ve kırlangıç kuyruğu görünümü, 1B; sağlıklı birey, Mesencephalon, Demir duyarlı T2 yoğunluklu MRI görüntüleme (Saeed ve ark, 2017).

Ayrıca T2'W1 MRI görüntülemelerde putamen'de hipointens sinyal yoğunluğu PH'nın multipl sistem atrofisinden %89, progresif supranükleer palsiden %95 doğrulukla ayrımını sağlamaktadır (Pagano ve ark, 2016). Transkraniyal ultrasonografide substantia nigra'da hiperekojenite artışı PH ile ilişkilidir (Chahine ve ark, 2014). Difüzör tensör ve MRI görüntüleme yöntemi ile Parkinson hastalarında nigrostriatal yolak liflerindeki dejenerasyon

ve SNpc'da azalmış fraksiyonel anizotropi belirlenebilmektedir (Rolheiser ve ark, 2011; Perlberg ve ark, 2018). Pozitron emisyon tomografisi ve SPECT görüntüleme in vivo olarak PH'nda beyindeki değişimleri tespit etmek için oldukça etkin yöntemlerdir, bu yöntemlerle VMAT, dopamin taşıyıcı ve L-aromatik amino asit dekarboksilaz enzimlerinde belirgin düşüşler gösterilmiştir. 18F-fludeoksiglukoz kullanılarak yapılmış PET taramalarında Parkinson hastalarında nuclei basales, pons ve cerebellum'da glikoz metabolizması artarken posterior parietal korteks, primer ve suplemer motor kortekste azaldığı tespit edilmiştir (Pagano ve ark, 2016). Parkinson hastalarında oldukça yaygın ve ilk görülen premotor semptomlardan olan olfaktor disfonksiyonların hastalığın motor döneminden en az 4-6 yıl önce gözlemlendiği düşünülürse, gelişen görüntüleme yöntemlerinin PH'nın erken teşhisi için premotor semptomları değerlendirmeye yönelik kullanımı oldukça faydalı olabilir (Rolheiser ve ark, 2011; Rizek ve ark, 2016). Aynı zamanda invaziv olmayan görüntüleme biyobelirteçleri ilaç etkisinin erken teşhisi ve izlenmesi, dolayısıyla hastalığa karşı daha etkili tedavilerin geliştirilmesi için de kullanılabilir (Rolheiser ve ark, 2011; Baradan ve ark, 2013; Perlberg ve ark, 2018).

Parkinson hastalığında terapötik protokoller yalnızca semptomların iyileşmesini sağlamakta, hastalığın ilerlemesini ya da durdurulmasını sağlayan bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır (Dauer ve Przedborski, 2003; Shapiro ve ark, 2007; Oung ve ark, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Rizek ve ark, 2016; Gao ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Karakatsani ve ark, 2019). Bu durum Parkinson hastalığının klinik olarak nörodejenerasyonun onarılamaz aşamada olduğu motor dönemde teşhisi ile de yakından ilişkilidir (Rolheiser ve ark, 2011; Caminiti ve ark, 2017). Bu nedenle günümüzde PH'nın tedavisine yönelik yapılan pek çok araştırma nörodejenerasyonu yavaşlatmayı ve/veya durdurmayı sağlayarak hastalığın modifiye edilmesini amaçlamaktadır. Ancak henüz hiçbir tedavinin kesin olarak nöroprotektif etkisi olduğu kanıtlanmamıştır (Rizel ve ark, 2016; Karakatsani ve ark, 2019). Parkinson hastalığının tedavisinde oral L-DOPA uygulaması, keşfedildiği günden bu yana altın standarttır. Dopamin agonistlerinin nöropsikiyatrik yan etkileri göz önüne alındığında çoğu hasta için de en yaygın başlangıç tedavisini oluşturmaktadır (Xia ve Mao, 2012; Oung ve ark, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Yu ve ark, 2018). Parkinson hastalığında motor semptomların erken döneminde, ortalama 5 yıl süresince farmakolojik tedaviye mükemmel cevap alınır ve bu dönem 'balayı dönemi' olarak adlandırılır (Saunders-Pullman, 2003; Oung ve ark, 2015; Sveinbjornsdottir, 2016; Xu ve Pu, 2016). Ancak L-DOPA'nın nörodejeneratif mekanizmalara ve sürece etkisi yoktur. Hastalık

ilerledikçe L-DOPA daha az süre ile etki eder, tedavi için gereken doz miktarı artar, ilaç uygulamasından önce motor semptomlar tekrar ortaya çıkar, 5-10 yıl veya daha fazla süren tedavi sonrasında hastaların çoğunda ‘yıpranma reaksiyonları’ olarak adlandırılan, ilaca iyi veya kötü yanıt veren fazlar ve kaçınılmaz olarak diskinezi olarak adlandırılan hiperkinetik motor bozukluklar görülür (Dauer ve Przedborski, 2003; Regensburger ve ark, 2014; Oung ve ark, 2015; Rizek ve ark, 2016; Sampson ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016; Xu ve Pu, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018; Mishra ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018). Bu nedenle L-DOPA tedavisine başlamayı geciktiren pramipeksol, ropinirol, rotigotin ve bromokriptin gibi dopamin reseptör agonistlerinin rasagilin, selegilin gibi MAO inhibitörleri ve entakapon gibi KOMT inhibitörleri ile kombine kullanımı çoğunlukla tedavide ilk seçeneği oluşturmaktadır. Hastalığın ilerleyen aşamalarında L-DOPA ile kombine edilerek de kullanılmaktadırlar (Rizek ve ark, 2016; Mishra ve ark, 2018; Prashanth ve Roy, 2018). Dopamin agonistlerinin yarılanma ömrü L-DOPA’dan daha uzundur bu nedenle daha uzun süreli reseptör stimülasyonu sağlarlar (Mishra ve ark, 2018). Dopamin agonistlerinin kullanımı semptomatik olarak oldukça faydalıdır ancak genetik çalışmalar dopamin deplesyonunun, motor aktivitede direkt yolla rol alan dopaminerjik nöronlarda D1 reseptör agonistlerine karşı aşırı duyarlılık oluşturduğunu göstermektedir. Bu aşırı duyarlılık uzun süreli dopamin agonistleri ile tedavi sonrası diskinezi motor bozuklukların görülmesinde etkindir (Gerfen, 2000). Bunun yanında serotonerjik, noradrenerjik nöronlarda ekzojen L-DOPA’nın dekarboksilasyonunu sağlayarak dopamine dönüşmesini sağlar. Kadınlarda L-DOPA tedavisine bağlı diskinezi bozukluklar daha sık ve şiddetli görülürken tedavi sırasında daha az L-DOPA’ya gereksinim duydukları bildirilmektedir (Sanders-Pullman, 2003; Marras ve Saunders-Pullman, 2014). Genç başlangıçlı Parkinson hastalığı olgularında L-DOPA’ya daha iyi cevap alınır ancak diskinezi gelişim riski daha fazladır (Getz ve Levin, 2017).

Motor semptomlar arasında bradikinezi ve rijidite, farmakolojik ve cerrahi tedaviye tremordan önce cevap veren, en duyarlı semptomlardır. Dopaminerjik tedavinin bradikinetik-rijit tip Parkinson hastalarında primer motor korteksin uyarılabilirliğini normalize ederek, azalan hareket amplitüdünü ve hızını arttırdığı bildirilmektedir (Bologna ve ark, 2018; Cosgrove ve Alty, 2018). Tremorun L-DOPA sağaltımına yanıtı hastalık boyunca değişkendir, başlangıçta olumlu sonuçlar görölse de hastalığın ilerlemesi ile dirençli hale gelebilir. Tedavi tremor amplitüdünde azalma sağlamakta ancak sıklığını değiştirmemektedir (Helmich ve ark, 2012; Lee ve Koh, 2015; Rizek ve ark, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018). Dopaminerjik tedavilerin tremor çeşitleri üzerine farklı etkileri de göz önünde

bulundurulduğunda bazı çalışmalar kinetik ve postürel tremorun dopamin bağımlı olduğunu, istirahat tremorunun ise olmadığını belirtmektedir (Santamato ve ark, 2015; Moustafa ve ark, 2016), corpus striatum'daki dopamin deplesyonunun tremorla ilişkisi kesin olarak gösterilememiştir (Cosgrove ve Alty, 2018). Benzer şekilde premotor semptomların da dopaminerjik tedaviye yanıtı değişkenlik göstermektedir. Örneğin nöropsikiyatrik semptomlardan depresyon dopaminerjik tedaviye cevap verirken, kognitif bozukluklar ve demans vermez. Bunun yanında ortostatik hipotansiyon ve halüsinasyonlar gibi bazı premotor semptomlar dopaminerjik tedavi tarafından da indüklenmektedir (Xia ve Mao, 2012; Lee ve Koh, 2015; Poirier ve ark, 2016; Sveinbjornsdottir, 2016). Dopaminerjik tedavi mezolimbik yolağı etkileyerek kumar ve alış veriş bağımlılığına, aşırı cinsel istek gibi dürtü kontrol bozukluklarına da neden olmaktadır (Goldman ve Postuma, 2014; Caligiore ve ark, 2016; Poirier ve ark, 2016).

Parkinson hastalığının ilerleyen aşamalarında, farmakolojik tedavi motor semptomları kontrol etmede yetersiz kaldığında, cerrahi olarak derin beyin elektriksel stimülasyonu (DBS) gerçekleştirilmektedir (Sveinbjornsdottir, 2016; Xu ve Pu, 2016; Heusinkveld ve ark, 2018). Bu aşamada GPM'i hedefleyen pallidotomi, STN'ü hedefleyen subtalamotomi gibi yüksek frekanslı derin beyin stimülasyonunu içeren cerrahi tedaviler devreye girer. Subtalamik çekirdeğin stimülasyonu unilateral uygulandığında akinezi ve rijiditede daha az etkili iken tremorun sağaltımında daha etkili olduğu bildirilmektedir (Shapiro ve ark, 2007; Moustafa ve ark, 2016). Subtalamik çekirdeğin stimülasyonunun motor semptomları iyileştirdiği, sağ premotor alanda ve serebellumda glikoz metabolizmasını arttırdığı bildirilmektedir ve DBS için sıklıkla tercih edilir (Lanciego ve ark, 2012; Moustafa ve ark, 2016). Tremor kontrolü DBS ile mükemmel şekilde sağlanmaktadır (Heusinkveld ve ark, 2018). Derin beyin stimülasyonu uygulamaları diskinezi gelişme riski olmadan motor semptomların sağaltımını sağlar ancak yalnızca on yıl boyunca faydası bulunabilir (Rizek ve ark, 2016). Son yıllarda yetmiş yaşından büyük olan veya bir takım diğer sebepler nedeni ile DBS uygulanmayan hastalarda levodopa-karbidopa (duodopa) intestinal jel uygulaması geliştirilmiştir. Bu uygulama yalnızca jejunal tüpü tutamayabilecek ciddi demansı olan hastalarda uygulanmamaktadır. Bağırsak jeli perkutan tüp yerleştirme yoluyla jejunum içine pompalanır, daha uzun süreli dopaminerjik stimülasyon sağlamada ve daha sabit plazma Levodopa seviyelerinin oluşmasında oral L-DOPA sağaltımından etkilidir (Rizek ve ark, 2016; Wang ve ark, 2018).

Parkinson hastaları arasında mortalite oranı sağlıklı bireylerden üç kat daha fazladır. Hastaların yaklaşık yarısı hastalıkla ilişkili nedenlerden hayatlarını kaybetmektedirler. Otopsi sonuçlarına göre bronkopnömoni (%50) en sık rastlanan ölüm nedenidir (Wang ve ark, 2015; Ruffmann ve Parkkinen, 2016). Yüksek yaş, erkek cinsiyet, şiddetli motor semptomlar ve yürüyüş bozuklukları mortalite oranını arttırmaktadır (Dauer ve Przedborski, 2003; Ruffmann ve Parkkinen, 2016). Parkinson hastalarının tanı koyulmasından 10-20 yıl sonra %40-75'i ölürlen, %50'ye yakını ise bakıma muhtaç hale gelmektedir (Xia ve Mao, 2012).

Görüldüğü üzere PH tedavisi için yalnızca bazal çekirdeklerin fonksiyonel değişimlerine odaklanarak, dopamin replasmanı sağlama üzerine kurulu tedaviler uzun dönemde hastalar için faydadan çok zarar sağlamakta, serebral korteks ile bazal çekirdekler ve serebellum arasındaki anatomik ve fonksiyonel etkileşimleri göz ardı ettiği için PH'nın patogenezinin anlaşılmasını, dolayısıyla farklı tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini sınırlandırmaktadır (Xia ve Mao, 2012; Caligiore ve ark, 2016; Wang ve ark, 2018). Motor semptomları tedavi etmeye yönelik uygulamalardan ziyade, nörodejenerasyonu yavaşlatmaya veya önlemeye yönelik nöroprotektif uygulamaların geliştirilebilmesi ancak PH'nın patogenezinin aydınlatılması ve erken teşhis kriterlerinin geliştirilmesi ile mümkün görünmektedir (Adler, 2011; Ruffmann ve Parkkinen, 2016; Tanik ve ark, 2016; Rodriguez-Violante ve ark, 2017; Murueta-Goyena ve ark, 2019; Jones ve ark, 2020). Son yıllarda hastalığın patogenezinin aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar, Parkinson hastalarında görülen intestinal mikrobiyom değişiminin, patolojik alfa sinüklein agregatlarının oluşumundaki rolünü, intestinal sistem kaynaklı humoral ve hücrel değişikliklerin SSS'nde PH patogenezi üzerine olası etkilerini araştırmaya odaklanmıştır (Fitzgerald ve ark, 2019; Gorecki ve ark, 2019). Bu amaçlarla sıklıkla kullanılan deneysel hayvan modellerinde, daha çok alternatif terapötik protokollerin araştırılmasına uygun, yalnızca corpus striatum'da dopamin depleksiyonunu sağlayan MPTP gibi ajanların stereotaksik uygulaması ile oluşturulan kısa süreli PH modelleri yerine, Lewy cisimcikleri, SNpc dejenerasyonu gibi hastalığın tüm patogenetik özelliklerini oluşturan, bunun yanında hastalığın patogenezinin uygun nöropsikiyatrik ve davranışsal problemler ve gastrointestinal disfonksiyonların da görüldüğü, nöroprotektif ajanların etkisinin araştırılabileceği ve hastalığın progresyonunun izlenebileceği uzun süreli rotenon uygulamaları tercih edilmektedir (Samantaray ve ark, 2007; Cannon ve ark, 2009; Johnson ve Bobrovskaya, 2015; Grünewald ve ark, 2019).

Çalışmamızda probiyotik etkenlerin hastalığın progresyonuna olan etkilerini araştırmak amacı ile, belirtilen sebeplerle uzun süreli, düşük dozda rotenon uygulaması ile oluşturulan

deneysel Parkinson hastalığı modelini tercih ettik. Uzun süreli rotenon uygulaması ile oluşturulan deneysel Parkinson hastalığı modeli ratlarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir, rotenon farelere ratlardan daha az toksik olduğundan, farelerde SNpc dejenerasyonunu oluşturmada yetersiz olduğu bildirilmektedir (Thiffault ve ark, 2000; Blesa ve ark, 2012). Rotenon, *Pachyrhizus erosus* olarak adlandırılan Meksika turbunun ve *Fabaceae* ailesinde bulunan bir kaç bitkinin kök harici kısımlarında doğal olarak bulunan insektisit, akarisit ve pisisit olarak kullanılan kokusuz, renksiz, toz halinde organik bir nörotoksindir (Lee ve ark, 2018). Rotenon mitokondriyal kompleks I'deki elektron transportunu engelleyerek etkisini göstermektedir. Böylece mitokondriyal matrikste yedeklenen oksijen, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve buna bağlı hücre DNA'sı ve mitokondriyal bileşenlerin hasar görmesine ve sonuç olarak nörodejenerasyona neden olmaktadır (Samantaray ve ark, 2007).

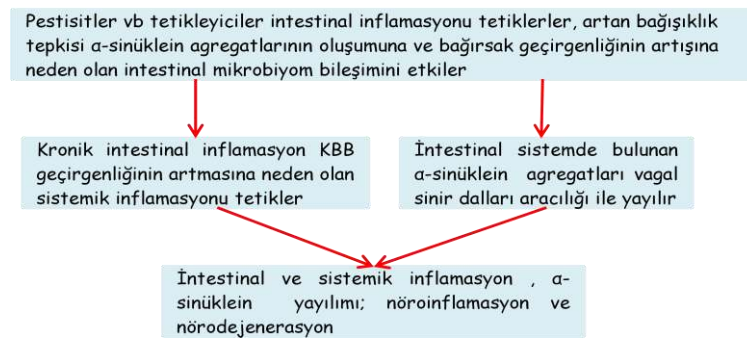
2.1.3.2. Parkinson hastalığının etiyopatogenezinde intestinal mikrobiyomun rolü

Parkinson hastalarında intestinal mikrobiyomun sağlıklı insanlardan farklı olduğu ilk kez Filip Scheperjans ve arkadaşları tarafından 2015 yılında tespit edilmiş, oldukça yeni bir gelişmedir. Scheperjans ve arkadaşları (2015) 72 Parkinson hastası ve 72 sağlıklı bireyin fekal mikrobiyom analizinde; Parkinson hastalarının dışkısında klinik konstipasyon skoru ile korelasyon gösteren *Prevotellaceae* ailesine ait bakterilerin %77,6 oranında azaldığını, göreceli olarak sayısı fazla bulunan *Enterobacteriaceae* cinsi bakterilerin klinik postürel instabilite ve yürüyüş bozukluğu skoru ile pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. Bu bulgular Parkinson hastalarında intestinal mikrobiyomun değiştiğini ve bu değişimin motor fenotip ile ilişkili olduğunu gösteren ilk kanıtlardır. Sonrasında, Parkinson hastalarının dışkısında *Blautia*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium* ve *Roseburia* cinsine ait bakterilerin de önemli ölçüde azaldığı, *Ralstonia*, *Lactobacillaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Clostridiaceae* ve *Akkermansia* cinsi bakterilerin ise artış gösterdiği (Hasegawa ve ark, 2015; Keshavarzian ve ark, 2015), toplam mikroorganizma sayısında aşırı artış saptansa da, hastalığın geç döneminde intestinal mikrobiyom çeşitliliğinin azaldığı bildirilmiştir (Aho ve ark, 2019; Gorecki ve ark, 2019; Mihaila ve ark, 2019). İntestinal mikrobiyom çeşitliliğinin azalması inflamatuvar bağırsak hastalıklarında olduğu gibi inflamasyona ve immun sistem aktivasyonuna neden olmaktadır (Perez-Pardo ve ark, 2019). Parkinson hastalarında saptanan intestinal mikrobiyom

değişimlerinin tekrarlayan analizlerde de uzun yıllar boyunca sabit kaldığı bildirilmiştir (Aho ve ark, 2019).

Lewy cisimciklerinin SSS'nden önce intestinal enterik nöronlarda ortaya çıkışı ve α -sinüklein agregatlarının varlığı ile artan intestinal permeabilite (Forsyth ve ark, 2011), Parkinson hastalarında konstipasyon, gastroparezis gibi premotor gastrointestinal semptomların ve düşük dereceli kolonik inflamasyonun varlığı (Devos ve ark, 2013; Nair ve ark, 2018; Gorecki ve ark, 2019), vagatomi uygulanmış bireylerde PH gelişim insidansının azalması (Svensson ve ark, 2015; Liu ve ark, 2017) gibi bulgular ilk olarak Braak ve arkadaşlarının (2003) ortaya attığı Parkinson hastalığının bağırsakta başlayarak, beyin-bağırsak aksisi ile merkezi sinir sistemini etkilediği hipotezinin önemini arttırmış, Scheperans ve arkadaşlarının bulguları (2015) Parkinson hastalarında görülen intestinal mikrobiyom değişiminin etiyopatogenetik faktörlerdeki rolünü sorgulatmıştır (Parashar ve Udayabanu, 2017; Lionnet ve ark, 2018; Nair ve ark, 2018; Haikal ve ark, 2019; Mihaila ve ark, 2019). Braak ve arkadaşlarına ait çift vuruş hipotezi Lewy cisimciklerinin nazal yayılımını da içermektedir ancak Parkinson hastalarında nazal mikrobiyomda sağlıklı insanlardan farklı olarak dikkate değer bir değişiklik saptanmamıştır (Aho ve ark, 2019). Bu hipotezin gastrointestinal sistem ayağında, epitel tabakasının bilinmeyen bir nörotropik patojenin geçişine izin verdiği ve bu patojen etkenin nervus vagus'un dalları aracılığı ile de sinaptik yayılımının gerçekleştiği yer almaktadır. Braak ve arkadaşlarının (2003) hipotezinin en temel eksiklerinden biri post mortem doku incelemelerine dayanarak dinamik bir sürecin tarif edilmesidir (Lionnet ve ark, 2018). Takip eden yıllarda bu hipotez in vivo ve in vitro pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Nöronal hücre kültürlerinde Lewy cisimciklerinin ana bileşeni olan alfa-sinükleinin, bir sinir hücresinden diğerine yayılma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiş ve böylece agregatların bir beyin bölgesinden diğerine yayılımının olası olabileceği ifade edilmiştir (Lionnet ve ark, 2018; Wang ve ark, 2019). Holmqvist ve arkadaşları (2014) bağırsak lumenine verdikleri α -sinüklein agregatlarının vagal sinirde ve beyin sapında varlığını göstermişlerdir. Parkinson hastalarında gastrik, duodenal ve kolon örneklerinde motor semptomların başlamasından ortalama 7-8 yıl öncesinde α -sinüklein agregatlarının varlığı gösterilmiştir (Hilton ve ark, 2013; Stockholm ve ark, 2016). Ancak Philips ve arkadaşları (2008) nucleus dorsalis nervi vagi'den kaynaklanan, enterik sinir sisteminin otonomik innervasyonunu sağlayan, nervus vagus'un efferent liflerin de α -sinüklein ekspresyonu bulunurken, nucleus solitarius'ta sonlanan afferent vagal liflerin α -sinüklein eksprese etmediğini, bu nedenle PH patolojisinin yayılmasında yer almasının olası

olmayacağını bildirmişlerdir. Post mortem doku incelemelerinde Parkinson hastalarının %47'sinde α -sinüklein agregatlarının kaudorostral yayılma paternine uymadığı, %31'inde SNpc'da şiddetli dejenerasyon bulunmasına rağmen nucleus dorsalis nervi vagi'de patolojik değişimin saptanmadığı da bildirilmiştir (Kalaitzakis ve ark, 2008). Hipotezin bir diğer zayıf yönü de bilinmeyen bir patojenin gastrointestinal epiteli geçerek, nöronal pleksuslara ulaştığı iddiasıdır. Bu durum ancak intestinal mikrobiyom bileşimindeki değişimlerin tetiklediği bilinen, intestinal epitel geçirgenliğinde artış nedeni ile mümkün olabilir. Parkinson hastalarında intestinal mikrobiyom değişimlerinin intestinal geçirgenliği ve inflamasyonu tetikleyici özellikte olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Lionnet ve ark, 2018). Genetik yatkınlığı bulunan farelerde intestinal enfeksiyonların Parkinson benzeri semptomları indüklediği bildirilmiştir (Haikal ve ark, 2019). Parkinson hastalarında yapılan şeker emilim testleri sonucu intestinal permeabilitenin önemli ölçüde arttığı (Forsyth ve ark, 2011), intestinal bariyer geçirgenliğinde önemli rol oynayan, epitel hücrelerinin sıkı bağlantılarını oluşturan okludin proteininin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Clairembault ve ark, 2015; Nair ve ark, 2018). Parkinson hastalarından alınan kolon biyopsi örneklerinde pro-inflamatur mediyatörlerin mRNA'sında artış tespit edilmiş, hastalarda KBB geçirgenliğinin artması nedeni ile nöroinflamasyonu ve nörodejenerasyonu tetikleyici olabileceği bildirilmiştir (Nair ve ark, 2018). İntestinal inflamasyona bağlı gastrointestinal disfonksiyon aracılı, olası PH patogenezi temsil eden basamaklar Şekil 5'de verilmiştir. Braak ve arkadaşlarının (2003) çift vuruş hipotezinden bağımsız olarak, intestinal mikrobiyom değişiminin nörodejeneratif hastalıklar üzerine olan etkisi yadsınamaz. Parkinson hastalığı patogenezinin aydınlatılmasında intestinal sistem ve mikrobiyotaya üzerine daha fazla araştırma yapılması, nöroprotektif uygulamaların geliştirilmesinde ve çift vuruş hipotezine karşıt bulguların, hipotezin eksik noktalarının açıklanmasında önemli faydalar sağlayabilir.



Şekil 5: İntestinal başlangıçlı PH patogenezi.

İnsanlarda bağırsak mikrobiyotası (BM) aralarında bazı mantar, protozoa ve arkea türleri ve viruslarında bulunduğu binden fazla tür çeşidi olan, özellikle kolonlarda yüksek yoğunlukta bulunan, genetik ve çevresel faktörlere bağlı bileşimi değişkenlik gösteren, ortalama 100 trilyon mikroorganizmadan oluşmaktadır. İnsanlarda BM’nda en fazla (%70-75) *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarına ait türler, daha az olarak da *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* ve *Verrucomicrobia* filumlarına ait türler bulunmaktadır (Giorgetti ve ark, 2015; Grochowska ve ark, 2019; Miraglia ve Colla, 2019; Zhang ve ark, 2019). Bağırsak mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizmaların genomu insan genomundan 150 kat fazladır. Araştırmacılar bu kadar büyük bir genom varlığının, bağırsak-beyin aksisi vasıtası ile bireylerin davranışlarını ve fizyolojisini önemli ölçüde etkileyebileceğini bildirmektedirler (Carding ve ark, 2015; Parashar ve Udayabanu, 2017; Nair ve ark, 2018; Grochowska ve ark, 2019; Haikal ve ark, 2019; Miraglia ve Colla, 2019). Bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Bacillus* filumuna ait türler vücutta bulunan dopamin miktarının nerede ise yarısını sentezlemektedir. Ayrıca SSS’de dopamin sentezinde rol alan enzimlerin sentezi ve inhibisyonunun BM’nda bulunan mikroorganizmalar aracılığıyla kontrol edildiği bildirilmektedir (Nair ve ark, 2018; Mihaila ve ark, 2019). İlginç olarak BM’nın üçte birinde bulunan mikroorganizmalar tüm insanlar arasında ortak iken, üçte ikisi kimlik kartı gibi bireye özgü çeşitlilik ve bileşim göstermektedir (Parashar ve Udayabanu, 2017; Grochowska ve ark, 2019; Vitetta ve ark, 2019). Daha da ilginç olanı BM’nı oluşturan mikroorganizma popülasyonunun %50-60’ı, muhtemelen konakçı ile olan etkileşimlerine bağlı, identifikasyon amacı ile dış ortamda kültüre edilememektedirler (Parashar ve Udayabanu, 2017). Bağırsak ve beyin arasında SSS, otonom ve enterik sinir sistemi, endokrin ve immun sistemleri içeren çift yönlü bir iletişimin olduğu ve bu iletişimde BM’nın anahtar rol oynadığına dair gittikçe artan bilimsel kanıtlar, günümüzde BM’nın insan biyolojisinin önemli bir modülatörü olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Giorgetti ve ark, 2015; Sampson ve ark, 2016; Nair ve ark, 2018; Aho ve ark, 2019; Grochowska ve ark, 2019; Mihaila ve ark, 2019).

Fizyolojik şartlarda konakçı ile BM arasında bulunan denge antibiyotik kullanımı, diyet değişiklikleri, stres faktörleri, endüstriyel olarak işlenmiş et, süt ve buğday ürünlerinin tüketimi, patojen etkenler, toksin ve pestisitlere maruziyet gibi çeşitli çevresel etmenler sonucu değişerek, faydalı mikroorganizmaların kaybı ve/veya zararlı mikroorganizmaların kazanımı olarak tanımlanan mikrobiyal disbiyozis gelişimine neden olur (Nair ve ark, 2018; Aho ve ark, 2019; Mihaila ve ark, 2019; Zhang ve ark, 2019). İntestinal mikrobiyom patojen mikroorganizma kolonizasyonuna karşı konak immun sistemi ile denge içinde çalışır ve

konak için esansiyel bir dizi aminoasit, vitamin ve kısa zincirli yağ asitlerinin (KYA) sentezini gerçekleştirir (Giorgetti ve ark, 2015; Haikal ve ark, 2019). *Lactobacillus reuteri* B12 vitamini sentezlerken, *Bacillus subtilis* ve *Escherischia coli* B2 vitamini sentezler, yağ ve safra asitlerinin metabolizmasını düzenler (Miraglia ve Colla, 2019). *Prevotellaceae* cinsine ait bakteriler kompleks karbonhidratların parçalanmasına yardımcı olarak intestinal mikrobiyomun homeostazisi için gerekli tiamin, folat ve KYA'ni oluştururlar (Nair ve ark, 2018), *Streptococcus thermophilus*'un intestinal toksinleri azalttığı bildirilmektedir (Vitetta ve ark, 2019). Bağırsak mikrobiyotası intestinal epitelin büyümesi ve farklılaşmasını sağlar, enterik sinir sisteminin normal gelişimini destekler, gastrointestinal motiliteyi düzenler (Giorgetti ve ark, 2015; Miraglia ve Colla, 2019; Vitetta ve ark, 2019). Mikrobiyal disbiyozis irritabl bağırsak sendromu, çölyak hastalığı, alerji, astım, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık ve obezite gibi pek çok intestinal ve ekstraintestinal kronik sendromlarla, depresyon, anksiyete, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıklarla ve bir dizi onkolojik rahatsızlıkla ilişkili bulunmuştur (Carding ve ark, 2015; Westfall ve ark, 2017; Grochowska ve ark, 2019; Mihaila ve ark, 2019). Bu koşulların çoğunda hastalık gelişimine yol açan mekanizmalar temel olarak kolon mikrobiyotası ve metabolit ürünlerinin değişimi ve intestinal mukoza geçirgenliğinin artışı sonucu bu etmenlerin konakçı immun sistemi ile olan etkileşimine bağlanmaktadır (Carding ve ark, 2015; Grochowska ve ark, 2019; Haikal ve ark, 2019).

Parkinson hastalığında intestinal mikrobiyom disbiyozisini tetikleyen çevresel etmenler, BM'nin normal fonksiyonunun oluşumuna önemli ölçüde katkı sağladığı bağırsak bariyerinin geçirgenliğinin artışına ve immun sistem aktivasyonuna neden olmaktadır (Grochowska ve ark, 2019). Parkinson hastalarının kolon mukozasında CD3 T lenfositlerinin (Perez-Pardo ve ark, 2019), serum örneklerinde kortizol, TNF- α , IL-6, ve B lenfositleri aktive eden mononükleer hücrelerin ürettiği nükleer faktör kappas β (NfKB) artışı bildirilmiştir (Mihaila ve ark, 2019; Perez-Pardo ve ark, 2019). Benzer şekilde gram negatif bakterilerden salınan lipopolisakkarit (LPS) de, intestinal permeabilitenin artışı ile sistemik dolaşıma geçerek, Parkinson hastalarında yüksek düzeyde eksprese edilen serum akut faz proteinlerine bağlanır, SSS'de bulunan mikrogliyaların aktivasyonunu sağlar ve PH patogenezinin katkısında bulunur (Parashar ve Udayabanu, 2017; Grochowska ve ark, 2019; Perez-Pardo ve ark, 2019). Bağırsak mikrobiyotasında bulunan, Parkinson hastalarında önemli ölçüde azaldığı belirtilen *Prevotellaceae* cinsine ait bakterilerin ürettikleri KYA intestinal bariyerin bütünlüğünü sağlayan en önemli etmen olan mukus salgısının üretimini desteklemektedir (Giorgetti ve ark,

2015). Parkinson hastalarından alınan fekal mikrobiyomun oral yolla verildiği farelerde KYA'nın azaldığı, mikrobiyomun PH'na benzer değiştiği ve motor semptomları tetiklediği görülmüştür (Sampson ve ark, 2016).

2.1.3.2.1. Probiyotik mikroorganizmalar, lokal ve sistemik etkileri

Probiyotikler yeterli miktarda uygulandıklarında, bağırsakların normal flora kolonizasyonunu olumlu yönde değiştirerek, konakçıya faydalı etkiler sağlayan canlı, çoğunlukla bakteri ve mayalardan oluşan mikroorganizmalardır (Giorgette ve ark, 2015; Parashar ve Udayabanu, 2017; De Marco ve ark, 2018; Galdeano ve ark, 2019). Rus biyolog Elia Metchnikoff'un 1907 yılında fermente gıda tüketiminin insan ömrünü uzattığına dair ileri sürdüğü hipotezi probiyotikleri ilgi odağı haline getirmiştir (Kelesidis ve Pothoulakis, 2012; Galdeano ve ark, 2019). Probiyotik olarak en yaygın kullanılan mikroorganizmalar *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacteria* cinslerine ait bakteriler ve *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi bazı mayalardır (Galdeano ve ark, 2019). *Lactobacillus acidophilus* ve *rhamnosus* bilimsel literatürde en uzun tarihe sahip bakteriyel probiyotiklerdir. Çalışmamızda kullandığımız *Saccharomyces boulardii* ise Fransız mikrobiyolog Henry Boulard tarafından 1923 yılında, kökeni Çin olan lycee meyvesinin kabuklarından izole edilmiş bir mayadır (Westfall ve ark, 2017).

Probiyotik etkenler, bağırsak mikrobiyal homeostazisinin düzenlenmesi, patojen etkenlerin mukozayı kolonize ve enfekte etme yeteneğinin engellenmesi, lokal ve sistemik immun yanıtların modülasyonu, gastrointestinal bariyer fonksiyonunun stabilizasyonu, emilim ve beslenmeyi destekleyen enzimatik aktivitenin indüksiyonunu sağlayarak konakçıya fayda sağlarlar (Kelesidis ve Pothoulakis, 2012; Westfall ve ark, 2017; Galdeano ve ark, 2019). Yapılan araştırmalar metabolik sendrom, diyabet, obezite, alerji, kanser, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklarda canlı bakteri hücre biyoterapilerinin oldukça fayda sağladığını göstermektedir (Westfall ve ark, 2017; Galdeano ve ark, 2019; Zhang ve ark, 2019). Bağırsak mikrobiyotası ve probiyotik etkenlerin nörodejeneratif hastalıklar üzerine olan etkisi SSS ile intestinal sistem arasında bağırsak-beyin aksisi olarak bilinen bilateral iletişim sayesinde gerçekleşmektedir (Westfall ve ark, 2017). Mikroptan ari hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda bağırsaklarda mikrobiyal kolonizasyon yokluğunun enterik ve merkezi sinir sisteminde nörotransmitterlerin ekspresyonuna, bağırsakların duysal ve motor fonksiyonlarının değişimine, gastrik boşalma ve intestinal transitin gecikmesine yol açtığını,

mikrobiyal kolonizasyondan sonra bu anormalliklerin mikroorganizma türüne özgü şekilde restore edildiğini bildirmektedir (Carabotti ve ark, 2015; Giorgette ve ark, 2015). Günümüzde ayrıntılı olarak tanımlanamamış olsa da beyin-bağırsak aksisini oluşturan etmenlerin intestinal mikrobiyom, enterik sinir sistemi, parasempatik ve sempatik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, nöroendokrin bağlantılar, humoral yollar, sitokinler, nöropeptidler ve sinyal molekülleri bütününden oluştuğu ve bu bağlantıların Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde rolü olduğu bildirilmektedir (Ochoa-Reparaz ve Kasner, 2016; Westfall ve ark, 2017).

Mikrobiyal disbiyozisin oral probiyotiklerle sağaltımı oldukça etkili sonuçlar doğurmaktadır ve probiyotikler klinik pratikte terapötik amaçlı kullanılmaktadırlar (Isidro ve ark, 2017; De Marco ve ark, 2018). Fizyolojik koşullarda intestinal villusların üzerini kaplayan mukus tabakası lümende bulunan bakterilerle bağırsak duvarını ayırır ancak probiyotik etkenlerin intestinal epitele yapışabilme kapasitesi vardır. Patojen etkenlere karşı inflamatuvar süreçleri aktive eden bu etkileşimde, ilginç olarak probiyotik etkenlere karşı yangı mediyatörlerinin salınımı ve takiben gerçekleşen mononükleer hücre infiltrasyonu sırasında intestinal bariyer zarar görmez (Galdeano ve ark, 2019). Ayrıca BM ve probiyotik etkenler tarafından sentezlenen çeşitli metabolitler mukus tabakasını geçerek immün hücrelerin aktivasyonunu sağlayabilirler. *Bacillus fragilis* ve *Bifidobacterium breve* ve *Clostridium* türlerinin kolonik makrofajlardan IL-10 sekresyonunu arttırarak inflamasyonu azalttığı (Isidro ve ark, 2017; Haikal ve ark, 2019; Miraglia ve Colla, 2019), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus reuteri*'nin proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı, *Saccharomyces boulardii*'nin bağırsak epitel hücrelerinde ve monositlerinde düşük molekül ağırlıklı çözünür bir faktör üreterek anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmektedir (De Marco ve ark, 2018). Makrofajlar kolonlarda en çok bulunan hücrelerdir aynı zamanda kolonlar makrofajlardan en zengin olan organlardır (Isidro ve Appleyard, 2016). İntestinal makrofajlar BM ve probiyotik etkenlere inflamatuvar yanıt göstermezler, bu etkenler anti-inflamatuvar M2 fenotipinde makrofajların polarizasyonunu arttırırken, inflamatuvar M1 fenotip makrofajların polarizasyonunu düşürürler (Isidro ve ark, 2017). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait probiyotik bakterilerin dopaminerjik nöronları yıkımdan koruduğu gösterilmiştir, bu bakterilerin biyotin, kobalamin, folatlar, pantotenik asit, nikotinik asit, piridoksin, riboflavin ve tiamin, vitamin B6, E, D gibi faktörleri sentezlediği bildirilmektedir. Probiyotik etkenler BM'nda bulunan mikroorganizmalardan antioksidan bileşikler ve L-DOPA sentezini arttırmaktadırlar (Parashar ve Udayabanu, 2017; Haikal ve ark, 2019).

Mitokondriyal kompleks I'in fonksiyonunu üstlenerek, hücre içi solunum zincirinde proton pompası görevini sürdüren, *Saccharomyces cerevisiae* adlı mayadan eksprese edilen Ndi1 proteininin PH tedavisinde faydalı olacağı düşünülmektedir. Viral vektör ile Ndi1 kodlayan genin, mitokondriyal kompleks I'i hedef alarak etkisini gösteren MPTP ve rotenon ile deneysel Parkinson hastalığı oluşturulmuş farelerde SNpc bölgesine verilmesiyle dopaminerjik nöronların dejenerasyondan korunduğu bildirilmiştir (Marella ve ark, 2008; Marella ve ark, 2009). *Actinomyces* türü bakteriler tarafından üretilen, doğal bir proteazom inhibitörü olan epoksomisin'in ise sıçanlarda SNpc'da nörodejenerasyona yol açarak PH gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Haikal ve ark, 2019).

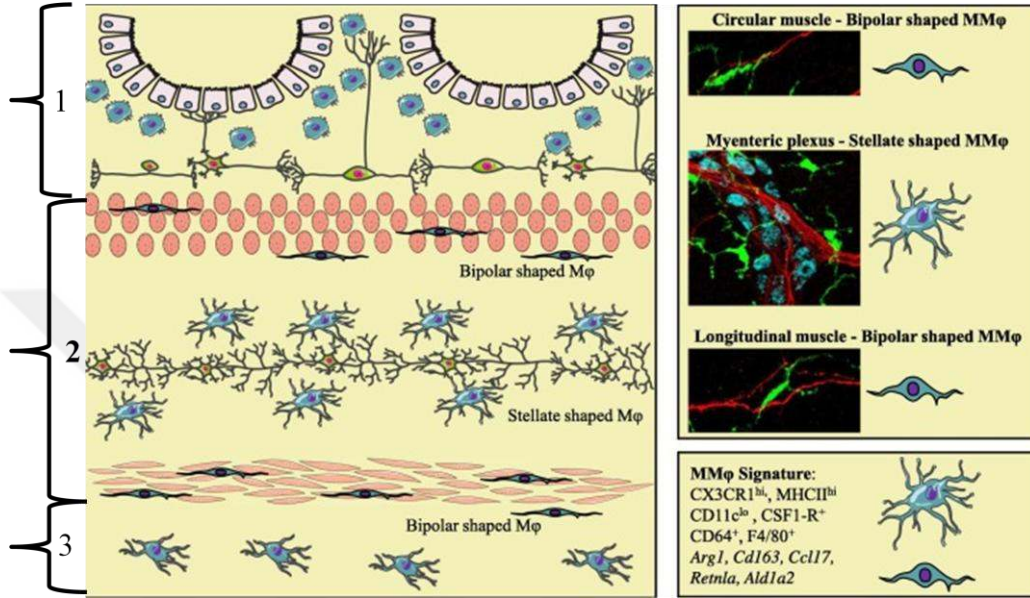
2.1.3.2.2. İntestinal homeostazisin sağlanmasında anahtar hücreler; musküler makrofajlar

Bağırsak duvarı boyunca yerleşmiş üç pleksustan; plexus submucosus (Meissner pleksusu), plexus myentericus (Auerbach pleksusu) ve plexus subserosus'dan oluşan enterik sinir sistemi, otonom sinir sisteminin en büyük bileşenidir ve benzersiz şekilde SSS'den bağımsız olarak gastrointestinal sistem motilitesinin düzenlenmesini sağlayan intrinsik devrelere sahiptir (Matheis ve ark, 2020). İçerdiği ortalama yüz milyon nöron sayısı itibari ile 'ikinci beyin' olarak da adlandırılır (Muller ve ark, 2014; Avetisyan ve ark, 2018; Schepper ve ark, 2018). Makrofajlar ise ana kaynağı kemik iliği olan monositlerin dolaşıma geçerek perifer organlarda farklılaşmasıyla oluşturdukları, oldukça heterojen immun hücrelerdir. Çünkü bulundukları organa göre farklı morfolojik özellikler, enzimatik aktivasyon dolayısıyla farklı hücre fenotipi ve fonksiyonel özellikler gösterirler ve makrofajların fenotipik polarizasyonu çevresel koşullara göre değişim gösterebilir (Dijkstra ve ark, 1985; Isidro ve Appleyard, 2016). Dokularda yerleşik olarak bulunan makrofajlar, intestinal duvarda plexus myentericus'un da bulunduğu, tunica muscularis'in sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında yer alırlar, bu nedenle musküler makrofajlar (Mm ϕ) olarak da isimlendirilirler (Muller ve ark, 2014; Avetisyan ve ark, 2018; Schepper ve ark, 2018). Doku makrofajları bulundukları organa göre farklı fonksiyonlar, farklı hücre dinamikleri ve farklı morfolojik özellikler gösterirler. Diğer bir deyişle farklı gen ekspresyonlarına, dolayısıyla farklı hücre yüzey ekspresyonlarına sahiptirler (Gabanyi ve ark, 2016; Wehner ve Engel, 2017; Schepper ve ark, 2018; Meroni ve ark, 2018). İntestinal duvarda plexus submucosus'un da bulunduğu submukozada yer alan makrofajlar (lamina propria makrofajları, LpM ϕ) patojen mikroorganizmaları fagosite ederken, kommensal mikrobiyom bileşenlerine, probiyotik

bakterilere ve diyet ile alınan zararsız antijenlere tolerans gösteren (tolerejenik, M2 fenotip) anti-inflamatuar yüzey reseptörlerine sahiptirler (Gabanyi ve ark, 2016; Wehner ve Engel, 2017; Schepper ve ark, 2018; Matheis ve ark, 2020). Şekil 6'da görüldüğü gibi Mmφ'ların sirküler ve longitudinal kas tabakası arasında yer alanları kısa dendritik uzantılı, yıldız şeklinde ve plexus boyunca eşit aralıklarla dağılmış, multipolar morfoloji gösteren hücrelerdir. Sirküler ve longitudinal kas tabakalarının içerisinde, bir miktarda plexus subserosus'ta yer alanları ise bipolar morfoloji gösterirler (Isidro ve ark, 2017; Wehner ve Engel, 2017; Schepper ve ark, 2018). Farelerde lamina propria'da yer alan LpMφ'nın yüzey ekspresyonları MHCII^{hi}CX3CR1^{hi}CD11c^{hi} iken Mmφ'lar düşük olarak CD11c eksprese ederler ve MHCII^{hi}CX3CR1^{hi}CD11c^{lo} olarak ifade edilirler (Muller ve ark, 2014; Cipriani ve ark, 2016; Schepper ve ark, 2018). Kısa ömürlü, sirkülasyondaki monosit infiltrasyonu ve olgunlaşması ile sürekli yenilenen LpMφ'nın aksine, Mmφ'lar uzun ömürlü hücrelerdir ve Arg1, Chi3l3 ve CD163 gibi doku koruyucu, anti-inflamatuar fenotip sergiledikleri bildirilmektedir (Roszer, 2015; Gabanyi ve ark, 2016; Schepper ve ark, 2018; Meroni ve ark, 2018).

Enterik sinir sistemi patojenlere ve inflammatuar uyaranlara uygun doku koruyucu reaksiyonların sağlanması ve peristaltik aktivitenin düzenlenmesi için Mmφ'lar ile intrinsik (enterik nöronların dendritik uzantıları) ve ekstrinsik (sempatik adrenerjik lifler, nervus vagus'un kolinerjik parasempatik lifleri) nöronal bağlantılar vasıtasıyla yakın iletişim kurmaktadır (Wehner ve Engel, 2017; Avetisyan ve ark, 2018; Schepper ve ark, 2018). Musküler makrofajların hücresel çıkıntıları ile enterik nöronların dendritik uzantılarının birbirlerine kenetlenerek sinaptik iletişim sağladıkları bildirilmiştir (Philips ve Powley, 2012; Gabanyi ve ark, 2016). Bağırsak duvarında Mmφ'lar ve enterik nöronlar arasında nörotransmitterlerin, sitokinlerin ve doku kaynaklı endokrin sinyallerin aracılık ettiği yoğun bir karşılıklı iletişim bulunmaktadır (Meroni ve ark, 2018). Otonom sinir sistemi ve immun hücreler arasındaki iletişim ilk olarak Tracey (2002) tarafından tanımlanmıştır. Tracey ratlarda intravenöz endotoksin uygulamasını takiben, nervus vagus'un elektriksel stimülasyonunun sağlanmasının, dalakta pro-inflamatuar sitokin sentezini baskıladığını, sistemik şok gelişimini önlediğini tespit etmiştir. Günümüzde vago-vagal refleks ya da vagal anti-inflamatuar yolak olarak adlandırılan bu etki, özellikle makrofajlarda bulunan α7 nikotinik reseptörlerin asetilkoline cevabı sonucu anti-inflamatuar M2 polarizasyonu göstermeleri ile oluşmaktadır. Katekolaminler, asetilkolin, glukokortikoidler, adiponektin ve leptin makrofajlarda anti-inflamatuar M2 polarizasyonunu arttırmaktadır (Roszer, 2015).

Bununla birlikte intestinal musküler makrofajlar noradrenalin ve enterik nöronlar tarafından üretilen makrofaj koloni stimulan faktöre (M-CSF) $\beta 2$ adrenerjik reseptörleri vasıtası ile cevap verirler. Vagal sinir aracılığı ile parasempatik uyarımın inflamasyonu azalttığı, ganglion mesentericum superius ve ganglion coeliacum'dan köken alan lifler aracılığı ile sempatik uyarımın inflamatuvar süreçleri tetiklediği bildirilmektedir (Wehner ve Engel, 2017).



Şekil 6: Musküler makrofajların intestinal duvarda dağılımı, 1; Tunica mucosa, 2; Tunica muscularis, 3; Tunica serosa, Mmφ signature: Mmφ hücre fenotipi (Schepper ve ark, 2018).

Gastrointestinal sistem motilitesi başlıca BM, enterik nöronlar ve Mmφ'lar arasında bulunan etkileşime bağlı ayarlanmaktadır (Muller ve ark, 2014; Robinette ve Colonna, 2014; Cipriani ve ark, 2016; Isidro ve ark, 2017; Avetisyan ve ark, 2018). Enterik nöronların gelişimi Mmφ'lardan mikrobiyota bağımlı sentezlenen kemik morfogenetik protein faktörüne (BMP2), Mmφ'ların sağ kalımı da ana kaynağı enterik nöronlar olan koloni stimüle edici faktöre (M-CSF) bağlıdır (Muller ve ark, 2014; Gabryani ve ark, 2016; Wehner ve Engel, 2017; Avetisyan ve ark, 2018; Matheis ve ark, 2020). Muller ve arkadaşları (2014) antibiyotik tedavisi uyguladıkları farelerde BMP2, M-CSF faktörlerinin, Mmφ'ın ve gastrointestinal motilitenin azaldığını bildirmişlerdir. İn vitro olarak enterik nöronların gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) ile kültüre edilmesi M-CSF üretimlerinin artmasına neden olmaktadır (Robinette ve Colonna, 2014). Bu sonuçlar enterik nöronlar ve Mmφ arasındaki iletişimin gastrointestinal motiliteyi kontrol etmede oldukça önemli olduğunu, BM'nin de bu iletişimi etkilediğini göstermektedir. Bu bağlam da

Parkinson hastalığında tanımlanmış mikrobiyal disbiyozis, intestinal inflamasyon ve sistemik inflamasyonu tetikleyen intestinal permeabilitenin artışında M ϕ 'ların önemli işlevsel rolleri olabilir. Ayrıca makrofajların aktivasyonu ile değişen fenotipleri ve salgıladıkları inflamatuvar, ve anti-inflamatuvar faktörler çoğunlukla insanlarda ve farelerde tanımlanmıştır (Muller ve ark, 2014; Cipriani ve ark, 2016). Bu nedenle ratlarda intestinal M ϕ 'ın spesifik özellikleri, çeşitli patolojilerdeki fonksiyonel rolleri ve önemlerine yönelik literatür bilgileri oldukça sınırlı olmakla birlikte, intestinal makrofajların fenotipik karakterizasyonunun yapılabilmesine yönelik, spesifik antikörler de oldukça azdır (Polfliet ve ark, 2006; Etzerodt ve Moestrup, 2013; Wehner ve Engel, 2017). Ratlarda immunohistokimyasal olarak intestinal dokuda makrofaj öncü hücreleri monositlerin ve pan makrofajların CD68, M ϕ 'ın CD163, ağırlıklı olarak lenfoid organlarda bulunan makrofajların CD169 taşıdıkları gösterilmiştir (Dijkstra ve ark, 1985; Polfliet ve ark, 2006).

Çalışmamızda ratlarda kolondan alınan örneklerde akım sitometri ile analizini gerçekleştirmeyi planladığımız makrofaj hücre yüzey antijeni CD163 ilk olarak 130 kDa ağırlığında, kırmızı kan hücrelerinin lizisinden sonra oluşan toksik haptoglobulin-hemoglobin (hp-hb) kompleksinin dokularda ve sirkülasyonda temizleyicisi olarak işlev gören, makrofaj spesifik bir hücre yüzey proteini olarak tanımlanmıştır (Franze ve ark, 2013; Graversen ve Moestrup, 2015; Zhi ve ark, 2017). İnsanlarda ve benzer olarak ratlarda CD163 eksprese eden monosit kökenli yerleşik doku makrofajları karaciğer Kupffer hücrelerinde, dalakta, akciğer ve kemik iliğinde bol miktarda bulunmaktadır, monositlerden köken alan dendritik hücrelerde ise CD163 yüzey antijeni bulunmamaktadır. Bunun yanında Polfliet ve ark (2006) ratlarda alveolar makrofajlarda ve monositlerde de CD163 ekspresyonu bulunmadığını bildirmişlerdir. Hücre yüzeyinden ADAM17 enzimi vasıtası ile ayrılarak çözünebilir formda (soluble CD163; sCD163) plazmada hp-hb kompleksinin temizleyicisi olarak görev yapar, fizyolojik koşullarda günlük eritrosit yıkımıyla açığa çıkan kompleksin %10'u sCD163 tarafından yıkılmaktadır (Roszer, 2015; Nissen ve ark, 2020). İn vitro olarak makrofajlardaki CD163 ekspresyonunun artışı başlıca IL-4 olmak üzere glukokortikoidler, M-CSF ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar etkenler, immün kompleksler, apoptotik hücreler tarafından uyarılabilirken LPS, TNF- α , TGF- β , IFN- γ gibi inflamatuvar etkenler ekspresyonunu azaltmaktadır (Graversen ve Moestrup, 2015; Roszer, 2015). Patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturan klasik olarak M1 polarizasyonu, inflamatuvar etki gösteren makrofajlardan farklı olarak, yüksek fagositik kapasiteye sahip CD163 eksprese eden makrofajlar insanlarda doku onarımı ve yara iyileşmesinde rol alan M2 polarizasyonu, anti-inflamatuvar etki gösteren makrofajlar olarak

sınıflandırılmışlardır (Etzerodt ve Moestrup, 2013; Zhi ve ark, 2017). Pek çok hastalıkta, post operatif süreçlerde doku iyileşmesinde, inflamasyonun rezolusyonunda CD163 makrofajlarının rol aldığı gösterilmiştir. İnflamasyonun rezolusyon aşamasında CD163 eksprese eden makrofajların salgıladıkları profibrotik CC kemokin ligandı 18'in (CCL18) fibroblast hücreleri uyardığı, doku veya organda fibrozis gelişimini destekleyerek fonksiyonel yetersizliğe neden olduğu bildirilmektedir (Bellon ve ark, 2011; Roszer, 2015). Ancak CD163'ün gram negatif ve pozitif patojenik bakterileri, TNF- α benzeri zayıf apoptozis indükleyicisini ve domuzlarda bazı virus suşlarını bağlayarak, pro-inflamatuar mediyatörlerin sentezini uyardığı da bildirilmektedir (Fabriek ve ark, 2008; Etzerodt ve Moestrup, 2013; Franze ve ark, 2013; Graversen ve Moestrup, 2015). İn vivo araştırmalarda makrofajların polarizasyonunu değerlendirmeye yönelik bir takım genel belirteçler kullanılıyor olsa dahi, M2 polarizasyonu gösteren makrofajları kesin olarak tanımlamak oldukça zordur (Inoue ve ark, 2019). Bu nedenle CD163 eksprese eden makrofajların, muhtemelen bulundukları mikro ortama bağlı, immunolojik cevapların oluşturulmasında ikili etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Polfliet ve ark, 2006; Franze ve ark, 2013; Roszer, 2015). İnsanlarda M2 polarizasyonuna sahip doku makrofajlarının klasik belirteci olarak görülen CD163'ün, pek çok kronik inflamasyonda da dokulardaki varlığı gösterilmiş, inflamasyon gelişimindeki potansiyel rolü ve immunomodülatör fonksiyonları üzerine araştırmalar yapılmıştır. İnflamatuar bağırsak hastalıklarında kolonda genel bir makrofaj popülasyonu artışından ziyade, CD163 eksprese eden makrofajların aktif inflamasyon gösteren bölgelerde yoğunlaştığı ve ilginç olarak uygulanan tedaviden etkilenmediği bildirilmiştir (Franze ve ark, 2013). Wakusawa ve arkadaşları (2013) insanlarda tip 1 diyabete bağlı gelişen necrobiosis lipoidica'da görülen granülomlarda CD163 makrofajlarının oldukça yoğun bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde peritonit hastalarında peritoneal makrofajların CD163 ekspresyonunda artış bildirilmiştir (Bellon ve ark, 2011). Parkinson hastalarında frontal ve oksipital kortekste, beyin sapında, SSS'nde bulunan yerleşik mikrogliya hücreleri ya da KBB'nde görülen artışa bağlı SSS'ne geçen sistemik makrofajlardan kaynaklı olabilecek artmış CD163 ekspresyonu bildirilmiştir (Graversen ve Moestrup, 2015). Çözünebilir formda plazmada bulunan sCD163 diyabet, obezite, karaciğer hastalıkları ve ateroskleroz gibi hastalıklarda görülen düşük dereceli inflamasyon durumu ile ilişkili yeni bir belirteçtir (Zhi ve ark, 2017).

2.2. Stereolojik Nöron Sayımı Yapılan Hippocampus ve Cerebellum'un Makroskopik ve Fonksiyonel Anatomisi, Histolojik Yapısı Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. Formatio Hippocampalis ve Hippocampus

Formatio hippocampalis; subiküler kompleks (prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, parasubiculum), hippocampus (cornu Ammonis), gyrus dentatus ve bunlara ait beyaz cevherler olan alveus ve fimbria hippocampi'den oluşur (O'Mara, 2005). Entorinal korteks de bazı kaynaklarda hippokampal formasyona dahil edilmektedir (O'Mara ve ark, 2009). Hippokampal formasyon bellek, öğrenme, konumlama, duygulanım ve yön bulma işlevlerinde önemli rol oynaması nedeniyle beynin en çok araştırılan yapılarından biridir (Curtis ve ark, 2012).

Hippocampus temporal lobun medial yüzeyinin içine doğru kıvrılmış, koronal kesiti 'C' harfine benzeyen, ependim hücreleri ile kaplı konveks yüzü ventriculus lateralis'in cornu temporale'sinin tabanına çıkıntı yapmış bir archicortex yapısıdır. Denizatına benzediği için hippocampus adı verilmiştir (Curtis ve ark, 2012). Koç boynuzuna da benzetildiği için, koç başlı Mısır tanrısı Ammon'dan esinlenilerek cornu Ammonis'de denilmektedir (İzci ve Erbaş, 2015). Hippocampus'un daha kalın ve ortalama 2-3 olukla ayrılarak dişli bir görünüme sahip, pençeye benzetilen ön ucu pes hippocampi adını alır. Pes hippocampi'de, yüzeyel oluklarla birbirinden ayrılmış parmak benzeri çıkıntılara digitationes hippocampi adı verilir. Hippocampus ve subiculum'da bulunan sinir hücrelerinin aksonları hippocampus'un lateral ventrikül tabanına komşu, konveks yüzü üzerinde alveus adı verilen beyaz bir cevher tabakası oluşturur. Bu tabaka medial tarafta gyrus dentatus'a uzanarak fimbria hippocampi adını alan kenar şeklinde bir çıkıntıyı meydana getirir. Fimbria hippocampi adını alan lifler hippocampus'un arka ucundan itibaren crus fornicis olarak uzanırlar.

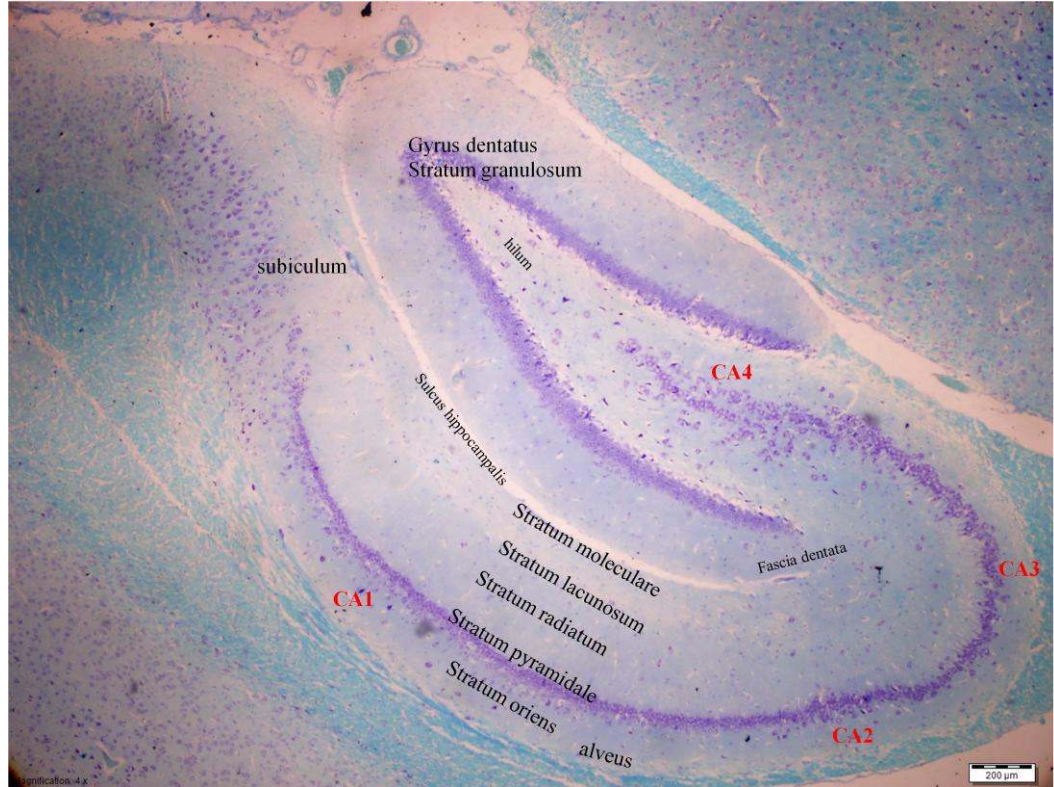
Hippocampus cornu Ammonis'in baş harflerini temsilen CA1, CA2, CA3 ve CA4 bölümlerine ayrılır. Subiculum'a komşu kısım CA1, gyrus dentatus'un hilus'u içinde bulunan alan CA4, iki bölüm arasında da CA2 ve CA3 bölümleri bulunur. Gyrus dentatus'un at nalı şeklinde uzanan granüler hücre tabakasının kolları arasında kalan alan hilus'unu oluşturur. Subiculum ise area entorhinalis ile hippocampus CA1 bölümü arasındaki geçiş bölgesidir (Ding, 2013). Hippocampus ile subiculum ayrımı piramidal nöronların dağılımı gözetilerek yapılır. Resim 6'da görüleceği üzere piramidal nöronlar subiculum'da hippocampus'dan daha dağınık olarak bulunurlar. Dolayısıyla subiculum'da piramidal nöron tabakası daha kalındır (O'Mara, 2005). Subiculum; prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum ve parasubiculum olmak üzere beş alt bölüme ayrılır. Prosubiculum ve subiculum hippokampal formasyonun ana çıktı yapılarıdır, uzun süreli belleğin alınmasında ve kodlanmasında önemli

rol oynarlar. Presubiculum ve postsubiculum anterior talamik çekirdekler, lateral mamillar nükleus, retrosplenial korteks (Brodmann 29 ve 30 alanları) ve entorinal korteksi de içeren başın uzaysal yönlendirilmesinde kritik rol oynar. Parasubikulum fonksiyonu hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır, bölgedeki lokal elektroensefalogram aktivitesi medial temporal bellek aktivitesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Subikuler komponentlerin her birinin spesifik fonksiyonlarının anlaşılmasının ilişkili nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasında önem arz ettiği bildirilmektedir. Örnek olarak Alzheimer hastalarında, uzun süreli bellek oluşumunda fonksiyonel önemi olan prosubikulum ve subikulum bölgelerinde anormal protein fosforilasyonu gösterilmiştir (Ding, 2013), ayrıca presubikulum bölgesinde bulunan yanlış katlanmış protein agregatlarının diğer bölgelerden farklı patolojik özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Murray ve ark, 2018). Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda hippocampus atrofi önemli bir bulgudur. Hippokampal CA1, CA3 bölümleri ve subikulum Parkinson hastalığında nörodejenerasyona en dayanıksız olan bölgelerdir. Hippokampal atrofi Parkinson hastalığının ilerleyen dönemlerinde sıklıkla görülen demansla ilişkilendirilmektedir (Tanner ve ark, 2017; Uribe ve ark, 2018). Parkinson hastalarında prefrontal korteks atrofi ile ilişkilendirilen bilişsel disfonksiyonların altında, sosyal davranışların ilişkisel bellek temsillerini oluşturan hippocampus kritik bir rol oynamaktadır. Hippocampus atrofi bellek, navigasyon, keşif, hayal gücü, yaratıcılık, karar verme, karakter yargıları, empati, sosyal bağların kurulması ve sürdürülmesi gibi çeşitli yeteneklerde uyumsuz davranışların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bilişsel bozukluklar gösteren Parkinson hastalarının MRI görüntülemelerinde hippocampal volümün azaldığı bildirilmiştir (Rubin ve ark, 2014; Yıldız ve ark, 2015; Tanner ve ark, 2017).

Ventriculus lateralis'in cornu temporale'sinin tabanı boyunca uzanan hippocampus'un histolojik yapısı Resim 3'de görüldüğü gibi ventriculus lateralis'e bakan konveks yüzünden başlayarak 7 tabakadan oluşmaktadır;

- Alveus: Hippocampus ve subiculum'dan gelen aksonların oluşturduğu beyaz cevher tabakasıdır (İzci ve Erbaş, 2015).
- Stratum oriens: Stratum pyramidale tabakasında bulunan nöronların dendritlerinin ve ara nöronların bulunduğu tabakadır (İzci ve Erbaş, 2015). Çoğunluğunu stratum radiatum'un içerdiği Schaffer kollateral liflerinin bir kısmı burada bulunur (Tzakis ve Holahan, 2019).

- Stratum pyramidalis: Bu tabakada karakteristik olarak tabanları ventriculus lateralis'e dönük, dizilimleri ile hippocampus'a esas şeklini veren, eksitator büyük piramidal nöronlar ve Golgi tip II hücreleri bulunur. Piramidal nöronların bazal ve apikal dendritleri komşu tabakalara kadar uzanır, aksonları ise alveus'a katılır. CA1 bölgesinde bulunan piramidal nöronlar hippocampus'un diğer bölgelerinden daha sık bulunurlar (Tzakakis ve Holahan, 2019).
- Stratum lucidum: CA1, CA2 alanında bulunmayıp CA3 bölgesinde bulunan, gyrus dentatus'la CA3 stratum pyramidale tabakasındaki piramidal nöronlar arasında fascia dentata'nın hilusu üzerinden bağlantı sağlayan, gyrus dentatus'un granüler hücrelerinin aksonlarının oluşturduğu Mossy lifleri olarak adlandırılan yosunsu liflerin bulunduğu tabakadır. Mossy liflerinin beyindeki en yaygın ve gelişmiş ağ olduğu bildirilmektedir (İzci ve Erbaş, 2015).



Resim 3: Hippocampus ve gyrus dentatus histolojik tabakaları, Luxol Fast & Krezil viyole boyama, Sagittal kesit, Magnifikasyon; X4.

- Stratum radiatum: Az sayıda nöron ve ince sinir lifleri bulunan tabakadır. Hippocampus'un CA3 bölgesindeki nöronların kendi aralarında ve CA2 ile CA1 bölgesinde bulunan piramidal nöronların bağlantısını sağlayan Schaffer kollateralleri olarak adlandırılan liflerin bulunduğu tabakadır.

- Stratum lacunosum: Az sayıda nöron ve ince sinir lifleri bulunan tabakadır.
- Stratum moleculare: Piramidal hücrelerin apikal dendritleri ve az sayıda nöron içeren en yüzeysel tabakadır (İzci ve Erbaş, 2015).

Bazı kaynaklarda stratum lacunosum ve stratum moleculare ortak yapılar içerdiklerinden tek tabaka olarak da kabul edilmektedirler (Songur ve ark, 2001; İzci ve Erbaş, 2015).

Entorinal korteks ve hippocampus formasyonunun distalinde uzanan subiculum'a komşu alan CA1, gyrus dentatus'a komşu hilus olarak da adlandırılan ve gyrus dentatus ile arasındaki Mossy liflerini içeren bölge CA4, iki bölge arasında CA2 ve CA3a, CA3b ve CA3c olarak üç alt bölüme ayrılan CA3 bölgeleri yer alır. CA3a, CA2'ye en yakın hücre bandı, CA3b fornix'e en yakın hücre bandı, CA3c ise gyrus dentatus'un proksimalinde hilus'a girinti yapmış hücre bandıdır. CA3 hippocampus'un kontrol noktası olarak kabul edilir, hafıza ve öğrenme süreçlerinde rolü olduğu bildirilmiştir. CA2 bölgesinin stratum pyramidale tabakasında bulunan piramidal nöronlar hippocampus'un diğer bölgelerine oranla oldukça küçüktürler. CA2 hippocampus'un dejeneratif etkenlere en dirençli bölgesidir (Dudek ve ark, 2016). CA2 ve CA3 bölgelerinde stratum lacunosum ve moleculare entorinal korteksin II. ve VI. tabakalarından girdi alırken CA1 bölgesinde stratum lacunosum ve moleculare entorinal korteksin III. ve V. tabakalarından girdi alır. Subiculum aracılığı ile CA1 bölgesinin çıktıları corpus mamillare, thalamus ve nucleus accumbens gibi diğer beyin bölgelerine yansıtılır (Tzakakis ve Holahan, 2019). CA1 bölgesi ise subiculum aracılığıyla önemli çıktıların yer aldığı bölgedir, gyrus dentatus'tan sulcus hippocampalis ile ayrılır.

2.2.2. Gyrus Dentatus

Gyrus dentatus, hippocampus'un medialinde, gyrus parahippocampalis'in üst yüzünde, gyrus parahippocampalis ile fimbria hippocampi arasında bulunan dişli bir gri cevher yapısıdır (Curtis ve ark, 2012). Gyrus dentatus histolojik olarak üç tabakadan oluşur;

- Stratum moleculare: Sulcus hippocampalis'e komşu tabakadır. Resim 6'da sulcus hippocampalis ve gyrus dentatus'un sınırları görülmektedir. Granüler tabakada bulunan hücrelerin proksimal dendritlerini içerir.
- Stratum granulosum: Gyrus dentatus'un esas hücre tipi granüler hücreleri içeren tabakadır. Bu hücrelerin aksonları Mossy liflerini oluşturur.
- Stratum polymorphicum: Ara nöronların bulunduğu en yüzeysel tabakadır.

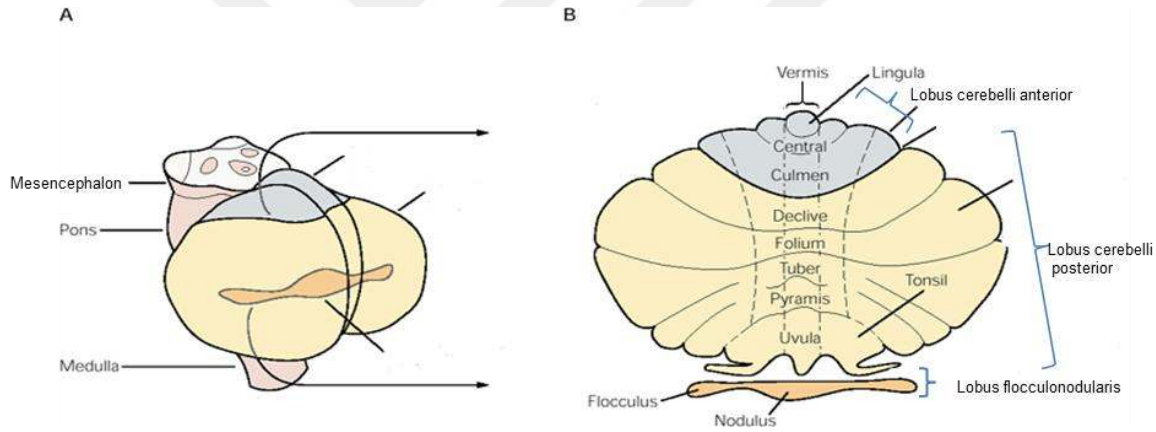
Önceki yıllarda nöron hücrelerinin tümünün doğumdan önce geliştiğini, sinir dokuda yeni hücre oluşumunun yaşam boyunca gerçekleşmediğini savunan dogmaların aksine, memelilerin beyinde nörogenezis olarak adlandırılan, tüm yaşam boyunca nöron hücrelerinin formasyonunun gerçekleştiği bölgeler subventriküler bölge ve gyrus dentatus'ta bulunan subgranüler bölgedir. Area tegmentalis ventralis ve SNpc'da bulunan dopaminerjik nöronlar D2 reseptörleri üzerinden direkt olarak hippocampus ve subventriküler bölgeyi innerve ederler, dolayısıyla dopamin nörogenezis ve beyin plastisitesinde önemli rol oynamaktadır (Curtis ve ark, 2012; Mishra ve ark, 2018). Rotenon gibi nörotoksik etken maddeler kullanılarak SNpc dejenerasyonu gerçekleştirilen rodentlerde nöronal kök hücrelerin proliferasyonunun azaldığı bildirilmiştir (Suzuki ve ark, 2010).

2.2.3. Cerebellum

Fossa cranii posterior'da bulbus ve pons'un arka-üst sınırında bulunan, rhombencephalon'un en büyük parçası olan cerebellum yukarıdan aşağı basık, ovalimsi bir yapıdadır. Cerebrum'un onda biri kadar ağırlığa sahip olsa da yarıklarla genişletilmiş sinaptik yüzey alanı beşte biri kadardır ve beyin %80'i kadar nöron içerir, motor hareketlerin başlamasını sağlayamaz ancak motor kontrol ve motor öğrenme süreçlerindeki işlevi önemlidir (Roostaei ve ark, 2014). Cerebellum, sağ ve sol hemispherium cerebelli'yi ortada birbirine bağlayan vermis cerebelli'den oluşur ve beyne benzer dışta cortex cerebelli adını alan substantia grisea'nın içte corpus medullare adını alan substantia alba'nın organize olduğu bir yapı gösterir. Resim 4'de görüldüğü gibi cortex cerebelli, fissurae cerebelli adı verilen yarıklarla birbirlerinden ayrılmış folia cerebelli denilen yaprakçıklardan oluşmaktadır. Cerebellum'da corpus medullare içerisine gömülü nuclei cerebelli adını alan dört çift çekirdek bulunmaktadır. Bu çekirdekler dıştan içe nucleus dentatus, nucleus emboliformis, nucleus globosus ve nucleus fastigii adını alırlar (Unverdi ve Alsayouri, 2019).

Cerebellum dış yüzündeki oluklarla temel olarak lobus cerebelli anterior, lobus cerebelli posterior ve lobus flocculonodularis olarak üç loba ayrılmaktadır. Cerebellum'un dış yüzündeki folia cerebelli'ler, ortadaki vermal zon da dahil olmak üzere transvers planda sağ ve sol hemispherium cerebelli'ler üzerinde devamlılık gösterirler. Lobus cerebelli anterior ve posterior oluklarla daha küçük lobulus'lara ayrılır, her bir lobulus'a karşılık gelen bir vermis bölümü bulunur (Klein ve ark, 2013; Unverdi ve Alsayouri, 2019). Örnek olarak lobus flocculonodularis'in vermal bölümü nodulus'tur ve flocculus olarak devam eder. Cerebellum

filogenetik olarak lobus flocculonodularis'in oluşturduğu archicerebellum, lobus cerebelli anterior ve vermis cerebelli'nin uvula ve pyramis bölümünün oluşturduğu paleocerebellum ve lobus cerebelli posterior'un oluşturduğu neocerebellum olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır. Filogenetik ayrım, her lobun vermal bölümü ve bununla devamlılık gösteren hemisfer bölümü aynı zamanda fonksiyonel bir ayrım da sağlamaktadır ve her bölümün girdi ve çıktılarının kaynağı dolayısı ile bu bölümlerin afferent ve efferent yolları farklılık göstermektedir. Bu fonksiyonel üniteler Şekil 7'de görüldüğü gibi cerebellum'un tümünün koronal planda şematize edilmesi ile gösterilmektedir. Cerebellum'un afferent ve efferent lifleri, cerebellum'u truncus cerebri'ye bağlayan pedunculus cerebellaris superior, medius ve inferior'u oluştururlar. Cerebellum'u pons'a bağlayan pedunculus cerebellaris medius afferent liflerden oluşurken, bulbus'a bağlayan pedunculus cerebellaris inferior'un çoğunluğu afferent liflerden, mesencephalon'a bağlayan pedunculus cerebellaris superior'un ise çoğunluğu efferent liflerden oluşmaktadır (Roostaei ve ark, 2014; Unverdi ve Alsayouri, 2019).



Şekil 7: A; Truncus cerebri arkasına yerleşmiş cerebellum, B; Koronal planda şematize edilmiş cerebellum.

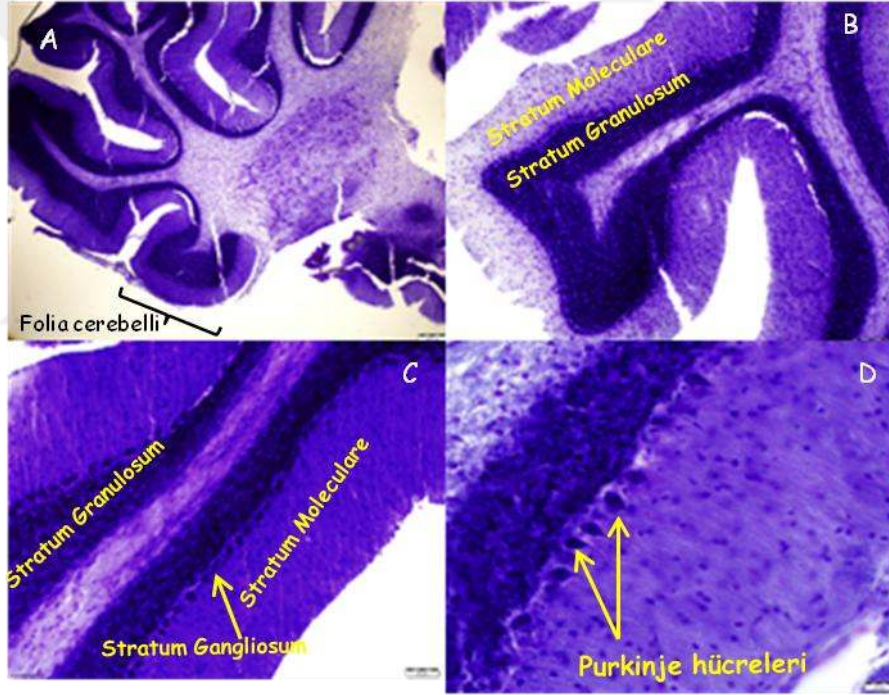
Archicerebellum filogenetik olarak cerebellum'un en eski bölümüdür. Afferentlerini nervus vestibularis ile iç kulakta yer alan vestibuler sistemden direkt olarak ya da ipsilateral vestibuler çekirdekler aracılığı ile alır. Bu nedenle vestibulocerebellum adı da verilmektedir. Area pretectalis ve vizüel korteksten de girdiler alır. Denge, uzaya oryantasyonun sağlanması ve göz hareketlerinden sorumludur (Klein ve ark, 2013; Roostaei ve ark, 2014). Lobus flocculonodularis'in medial bölümü nodulus dengenin korunmasını sağlarken, flocculus vestibulo-oküler adaptasyona aracılık eder (Manto ve ark, 2012; Unverdi ve Alsayouri, 2019). Medulla spinalis'te bulunan somatomotor nöronlar ile fasciculus longitudinalis medialis ve

ekstrapiramidal sistem yollarından tractus rubrospinalis, tractus vestibulospinalis ve tractus reticulospinalis aracılığı ile bağlantı kurar.

Paleocerebellum medulla spinalis'in afferent yolları tractus spinocerebellaris anterior, tractus spinocerebellaris posterior, tractus cuneocerebellaris, tractus spinoreticularis ve devamı tractus reticulocerebellaris aracılığı ile kas, kiriş ve eklemlerden proprioseptif duyunun yanında bir miktar basınç ve temas duyusu da alır. Paleocerebellum'a afferentleri medulla spinalis'ten geldiği için spinocerebellum da denilmektedir (Unverdi ve Alsayouri, 2019). Cerebellum aldığı bu impulsları değerlendirir, ekstrapiramidal sistem yolları tractus rubrospinalis, tractus vestibulospinalis ve tractus reticulospinalis aracılığı ile medulla spinalis ön boynuz motor nöronları ile bağlantı kurarak kas tonusunun sürdürülmesini, kas grupları arasında koordinasyonun sağlanarak, hareketlerin amaca uygun akıcı ve düzenli yapılmasında sensorimotor senkronizasyonu sağlar (Manto ve ark 2012). Tractus rubrospinalis aracılığı ile fleksor kasların tonusunun ayarlanmasını sağlayan efferent lifler cerebellum'u terk etmeden önce nucleus globosus ve nucleus emboliformis'te, tractus vestibulospinalis aracılığı ile ekstensor iskelet kaslarına kolaylaştırıcı etki sağlayan efferent lifler ile tractus reticulospinalis aracılığı ile motor aktivitenin kontrolünü sağlayan lifler nucleus fastigii'de sinaps yaparlar. Purkinje hücrelerinden çıkan bir kısım liflerin ise doğrudan doğruya nucleus vestibularis lateralis'de sonlandığı bilinmektedir (Roostaei ve ark, 2014).

Neocerebellum beyin korteksinden afferent lifler alan cerebrocerebellum adı da verilen cerebellum'un filogenetik olarak en gelişmiş ve en büyük bölümüdür. İstemli ve ince motor hareketlerin koordinasyonu, motor hareketlerin planlanmasından sorumludur. Beyin korteksi tractus corticopontocerebellaris ile nuclei pontis aracılığıyla, tractus cortico-olivocerebellaris ile nucleus olivaris inferior aracılığı ile, tractus corticoreticulocerebellaris ile bulbus ve pons'ta yer alan formatio reticularis aracılığı ile cerebellum'a bağlanır. Bunun yanında tractus corticospinalis'in kollateral dallarını alan nuc arcuatus'lar fibrae arcuatae externae anteriores ve posteriores (stria medullaris ventriculi quarti) aracılığı ile pedunculus cerebellaris inferior üzerinden cerebellum'a projekte olurlar. Cerebellum'dan çıkan efferent lifler tractus cerebellothalamicus aracılığı ile thalamus'un nucleus ventralis intermedius isimli çekirdeğinde ve tractus cerebellorubralis ile nucleus ruber'de sinaps yaparlar. Thalamus'tan başlayan tractus thalamocorticalis primer motor saha ve gyrus precentralis'de sonlanır, nucleus ruber'den çıkan lifler ise nucleus olivaris inferior'da sonlanır (Roostaei ve ark, 2014; Unverdi ve Alsayouri, 2019).

Cortex cerebelli Resim 4’de görüldüğü gibi dışta stratum moleculare içte stratum granulosum adı verilen iki tabaka ve bu iki tabaka arasında büyük golgi tip 1 nöronlar olan Purkinje hücrelerinin tek sıra şeklinde dizildiği, Bergmann glia hücrelerinin de bulunduğu stratum gangliosum’dan oluşur. Stratum moleculare’de Purkinje hücrelerinin dendritik uzantıları yer alır. Stratum granulosum büyük ve küçük granüler hücrelerden oluşur. Dendritleri aynı tabakada sonlanan bu granüler hücrelerin aksonları folia cerebelli’nin uzun eksenine dik olarak stratum moleculare’ye uzanırlar ve burada birbirine paralel olarak ikiye ayrılırlar. Cerebellum’a nucleus olivaris inferior dışındaki kaynaklardan gelen girdiler (Mossy lifleri) granüler hücrelerin dendritik uzantıları ile cerebellar glomerulus adı verilen sinaptik bağlantıları yaparlar. Nucleus olivaris inferior’dan gelen lifler (tırmanıcı lifler) ise Purkinje hücrelerinin dendritik uzantıları ile sinaps yaparlar (Roostaei ve ark, 2014).



Resim 4: Cerebellum’un histolojik tabakaları, Krezil viyole asetat boyama, Magnifikasyon; A X4, B X10, C X20, D X40.

Stratum granulosum altında ise Purkinje hücrelerinin myelinli aksonlarının oluşturduğu, cerebellum’un beyaz cevheri corpus medullare bulunur. Purkinje hücrelerinin aksonlarının kollateral dalları stratum granulosum’da bulunan stellat hücreler ile sinaps yaparlar. Yüzeyelde bulunan stellat hücreler yıldız hücreleri, derinde bulunanlar ise sepet hücreleri adını alan inhibitör internöronlardır (Jimsheleishvili ve Dididze, 2019).

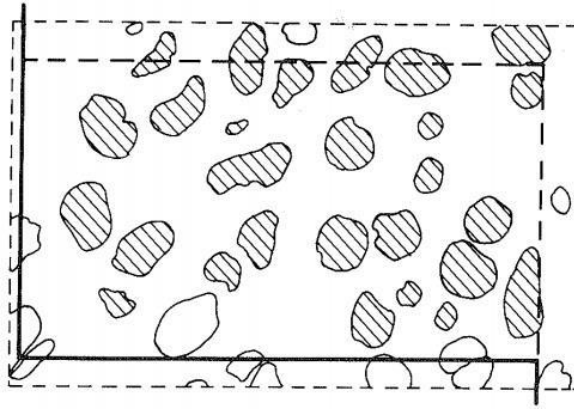
Klasik olarak nuclei basales ve cerebellum istemli hareketleri kontrol eden, serebral korteks aracılığı ile iletişim kuran iki büyük motor merkezdir (Yanagisawa ve ark 2018; Milardi ve ark, 2019). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar cerebellum ve bazal çekirdekler arasında direkt bağlantıların bulunduğunu bildirmiştir. Bu durum cerebellum'un motor ve motor olmayan fonksiyonlarda bilinenden çok daha fazla rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda cerebellum'un thalamus yolu ile corpus striatum'a güçlü bir disinaptik projeksiyona sahip olduğu (Mirdamadi, 2016; Milardi ve ark, 2019), insanlarda nucleus dentatus ile Gpm ve SNpr arasında direkt bağlantıların olduğu (Mirdamadi, 2016) ve STN'un nuclei pontis aracılığı ile serebellar kortekse disinaptik bir bağlantısı olduğu gösterilmiştir (Milardi ve ark, 2019). Parkinson hastalığının motor belirtilerinin ortaya çıkışında özellikle STN ve cerebellum arasındaki bağlantının işlev bozuklukları önem arz etmektedir (Caligiore ve ark, 2016; Milardi ve ark, 2019). İstirahat tremorunun başlangıcı bazal çekirdeklerin anormal aktivitesi ile, tremor amplitüdü ise serebello-talamo-kortikal projeksiyonların işlev bozukluğu ile ilişkilendirilmektedir (Helmich ve ark, 2012). Parkinson hastalarının fonksiyonel MRI görüntülemelerinde kortiko-striatal aktivitede azalmanın yanında nucleus dentatus ve cerebellum aktivitesinde artış saptanmıştır. Değişen serebellar aktivasyonun bazal çekirdeklerin anormal aktivitesi ile ilgili patofizyolojik bir bulgu olduğu ve striato-talamo-kortikal devrede işlev bozukluğunun üstesinden gelmek için telafi edici bir mekanizmayı yansıtır olabileceği bildirilmektedir (Mirdamadi, 2016; Milardi ve ark, 2019).

2.3. Stereolojik Yöntemler Hakkında Genel Bilgiler

Stereoloji, Yunanca üç boyutlu cisim anlamına gelen 'stereos' kelimesinden türemiş, üç boyutlu yapılara ait iki boyutlu kesitler üzerinde, belirli kurallar bütünü çerçevesinde yapılan çıkarımların, yapıların üç boyutlu özellikleri ile ilgili yorum yapılabilmesini sağlayan bilim dalıdır (Gundersen ve ark, 1988; Akalan ve Demirkıran, 2013). Stereolojik yöntemler kullanılarak kesit görüntüler üzerinde üç boyutlu yapıların hacmi, tanecik sayısı ve yoğunluğu hesaplanabilir. Stereolojik çalışmalarda kullanılan yöntemlerin daha kısa zamanda daha az hata ile çalışmayı sağlayarak son derece etkin ve gerçek değerlerden sistematik bir sapma göstermeyen son derece tarafsız sonuçlar elde edilmesi beklenir. Bu yöntemlerin temelini sistematik rastgele örnekleme (SRÖ) oluşturmaktadır. Sistematik rastgele örnekleme prensibi, incelenen yapının her alanında eşit örnekleme yapılmaması gibi örnekleme taraflılıklarının ve kesit alınan cihazın yapısındaki hatalar, mikroskobun optik sistemindeki hatalar, ölçüm aletlerinin kalibrasyonunda oluşabilecek hatalar gibi sistematik taraflılıkların ortadan

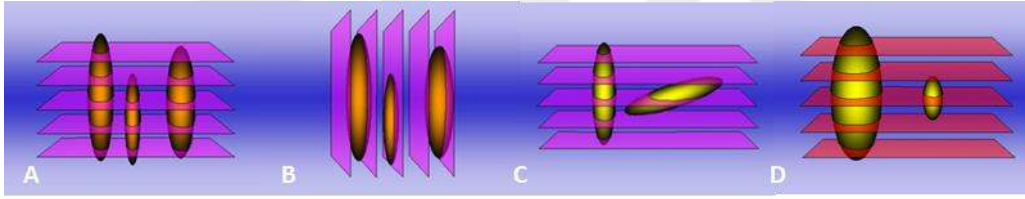
kaldırılmasını sağlamaktadır (West, 1993). Rastgele bir başlangıçtan sonra, belirlenen aralıklarla sistematik olarak örneklenen üç boyutlu bir yapının her parçası eşit örneklenme şansına sahip olmaktadır (Gundersen ve Jensen, 1987). Sözgelimi doku kesitlerinden ilk on tanesinin içerisinde altıncı kesit rastgele seçilir. Örneklenecek diğer kesitlerin sırası 16, 26, 36, 46... olarak sistematik şekilde devam eder. Böylece ilgilenilen yapının her parçası önceden belirlenmiş bir aralıkla rastgele ve sistematik olarak, kesit örnekleme oranı (KeÖÖ) 1/10 olan kesitler ile örneklenmiş olur. İstatistiki anlamda da SRÖ, rastgele örneklemeyle kıyasla gerçeğe daha yakın sonuçlar sağlamaktadır (West, 1993; Cruz-Orive, 2017).

Stereolojik olarak tanecik sayımında bir diğer önemli husus da taneciklerin kesit üzerindeki izdüşümlerinin belirli bir alanda sınırlandırılarak sayılması gerekliliğidir. Bu amaçla sayım çerçeveleri kullanılmaktadır. Önceden belirlenmiş bir alanın sayım çerçevesi içerisinde kalan bölümünde tanecik sayımı yapılır. İlk stereolojik çalışmalarda kare veya dikdörtgen şeklinde sayım çerçeveleri kullanılmış, bu çerçevelerin içerisinde kalan ve çerçevelerin kenarları ile kesişen tanecikler sayılmış ancak bu çerçevelerin toplam tanecik sayısından uzak değerler elde etmeye sebep olduğu anlaşılmıştır. 1970'li yıllarda Gundersen tarafından geliştirilmiş olan tarafsız sayım çerçevesi bu soruna çözüm getirmiştir (Gundersen 1977). Tarafsız sayım çerçevesi Şekil 8'de görüldüğü gibi sıklıkla kullanılan şekliyle iki kenarı düz, iki kenarı da kesikli çizgilerden oluşan dikdörtgen veya kare şeklinde basit bir çerçevedir. Tarafsız sayım çerçevesinin kenarlarından kesikli çizgi şeklinde olanlar serbest kenarları, düz çizgi şeklinde olanlar yasak kenarları temsil etmektedir. Çerçeve içerisinde kalan alanda bulunan ve serbest kenarlar ile temas eden tanecikler sayılırken, yasak kenarlar ve bunların uzantıları ile temas eden tanecikler sayılmaz (Gundersen 1977; Mandarim-De-Lacerda, 2003; Cruz-Orive, 2017).

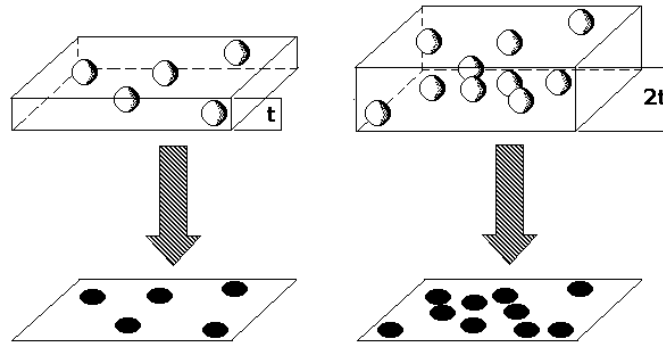


Şekil 8: Tarafsız sayım çerçevesi, kesikli çizilmiş olan kenarlar serbest kenarları, düz çizili kenarlar yasak kenarları ve uzantılarını göstermektedir. Alanı taralı partiküller sayıma dahil edilirken, alanı beyaz olan partiküller sayıma dahil edilmeyen partikülleri göstermektedir.

Sistemantik rastgele örneklenmiş kesitlerde, tanecik izdüşümlerinin doğrudan sayımıyla toplam tanecik sayısına ulaşma fikri stereolojik olarak ilk denenen yöntemlerden biridir. Ancak taneciklerin şekli, büyüklüğü, yönelimi, kesit alma yönü gibi pek çok parametrenin ilgilenilen yapıda bulunan taneciklerin kesitler üzerindeki izdüşümünü etkilediği görülmüştür. Aynı zamanda kesitler iki boyutlu düzlemler olarak kabul edilseler de belirli bir kalınlığa sahiptirler. Kesit kalınlığının izdüşüm üzerine olan etkisi de göz ardı edilmemelidir. Kesit kalınlığı arttıkça, optik olarak şeffaf kesitler içerisinde yer alan tanecik sayısı dolayısıyla tanecik izdüşümü artar, bu duruma fazla görünme etkisi (Holmes etkisi) adı verilir. Şekil 9 ve 10'da taneciklerin şekil, büyüklük, yönelimi, kesit alma yönü ve kesit kalınlığının tanecik izdüşümüne etkisi gösterilmiştir (Mandarin-De-Lacerda, 2003).



Şekil 9: A, B; kesit alma yönünün partikül izdüşümüne etkisi, C, D; taneciklerin şekil, büyüklük ve yönelimlerinin izdüşümlerine etkisi.



Şekil 10: Kesit kalınlığı (t) arttıkça tanecik izdüşümü de artmaktadır.

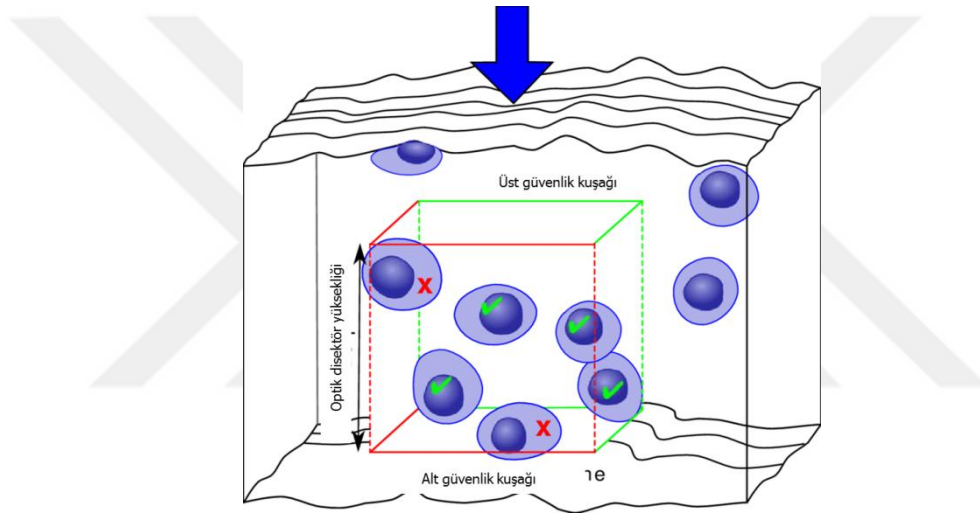
Abercrombie 1946 yılında tanecik izdüşümlerinin doğrudan sayımı ile elde edilen toplam tanecik sayısının kesit kalınlığı / (kesit kalınlığı x tanecik yüksekliği)'ne bölünmesi ile

kesit kalınlığının da hesap edildiği bir düzeltme faktörü ileri sürmüştür. Ancak Abercrombie'nin ileri sürdüğü düzeltme formülünde yer alan tanecik yüksekliğinin ölçümü pratik olarak mümkün olmamaktadır. Aynı zamanda formülün, tanecik sayısını gerçek değerinden daha fazla hesapladığı ortaya koyulmuştur. 1984 yılında Sterio tarafından ortaya koyulan disektör yöntemi kesit kalınlığı içerisinde ilerleyen bir sonda gibi düşünülebilir. Bu yöntemde taneciklerin şekil, büyüklük ve yöneliminden bağımsız olarak kesitin üst ve alt yüzlerinde yer alan uçlarını bulmak önemlidir. Disektör taneciği, disektör yöntemi ile sayılan yapılara verilen isimdir. Disektör yöntemi fiziksel ve optik disektör olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel disektör, disektör yönteminin ilk uygulanan şeklidir. Bu yöntemde ardışık veya aralarındaki uzaklık asgari tanecik büyüklüğünden daha az olan iki kesit alınır. İki kesitten biri örnek diğeri ise gözlem kesiti olarak kullanılır. Eş zamanlı incelenen iki kesitte örnek kesitinde bulunup gözlem kesitinde bulunmayan tanecikler sayıma dahil edilir. İki kesit arasındaki mesafe optik disektör yüksekliği olarak alınır. Bu yöntemde yüksekliği kesit doğrultusunda olan, örnek kesiti üzerinde izdüşümü görülen büyük küçük tüm tanecikler için örneklenme şansı eşittir. Bu yöntemle sayılan partikül sayısı, ilgilenilen yapının hacminin de yer aldığı bir hesaplama tabi tutularak toplam partikül sayısı belirlenebilir. Fiziksel disektör yönteminde iki ayrı kesit üzerinde eş zamanlı olarak çalışma, her iki kesitte de sayım yapılan aynı alanları bulabilme, her iki kesitin de iki farklı mikroskopta görüntülenmesi, kullanılan mikroskopların birbirinin aynı olması ve ilgilenilen yapının toplam hacminin de bilinmesi gerekliliği çalışma zorluğu oluşturmaktadır (Mandarim-De-Lacerda, 2003).

Gundersen ve arkadaşları tarafından geliştirilen optik disektör yöntemi, fiziksel disektör yöntemine göre daha pratik ve etkin bir sayım yapmayı sağlamaktadır. Bu yöntemin esası kalın kesitler içerisinde z ekseninde optik düzlemler boyunca ilerlerken tarafsız sayım çerçevesi içerisinde görüntüye giren taneciklerin sayımını yapmaktır. Önceden belirlenen aralıklar boyunca kesit üzerinde ilgilenilen yapı x ve y eksenlerinde adımlanır ve tarafsız sayım çerçevesi içerisinde kalan veya çerçevenin serbest kenarlarıyla temas halinde olan disektör partikülleri z ekseninde ilerlenerek sayılır. Kesit üzerinde x ve y eksenlerinin taradığı alanın tarafsız sayım çerçevesi alanına bölünmesi ile alan örnekleme oranı (AÖO) elde edilir (Gundersen ve ark, 1988).

2.3.1. Optik Disektör ve Parçalama (Fractionator) Metodlarının Kombinasyonu; Optik Parçalama Yöntemi

Optik disektör yöntemi tarafsız ve etkin olarak partikül sayımını sağlasa da dokuların histolojik takibi, kesit alma, boyama gibi işlemler sırasında özellikle kesit kalınlığını etkileyen faktörlerin etkilerini saf dışı bırakmamaktadır. Doku örneklerinin histolojik takibi sırasında kullanılan kimyasallara örneklerin optimal düzeyde maruz kalmaması hücrelerin büzüşmesine ya da şişmesine neden olabilir. Aynı zamanda doku bloklarından kesitler alınırken bıçağın dokunun tüm yüzeyini ve doku içerisinde yer alan tanecikleri pürüzsüz bir düzlem olarak kestiği varsayımı gerçeğe örtüşmemektedir. Doku bloğunu kesen bıçak, yolu üzerinde yer alan tanecikleri bazen keser, çoğunlukla da yerlerinden çıkararak düşmelerine sebep olur. Dolayısıyla doku kesitlerinin üst ve alt yüzlerinde Şekil 11’de görüldüğü gibi pürüzsüz olmayan bir tabaka oluşur (Mandarim-De-Lacerda, 2003; Cruz-Orive, 2017).



Şekil 11: Üst ve alt güvenlik kuşaklarının bırakılması, kırmızı ve yeşil çizgilerle çizili küp optik disektör yüksekliği boyunca taranan derinlikte tarafsız sayım çerçevesinin kapsadığı hacmi göstermektedir. Yeşil renkli kenarlar serbest kenarları, kırmızı renkli kenarlar yasak kenarları temsil etmektedir.

West ve arkadaşları tarafından 1991 yılında geliştirilen optik parçalama (Fractionator) yönteminde doku kesitinin üst ve alt yüzlerinde belirli bir mesafe bırakılarak tanecik sayımı yapılmaz. Bırakılan bu mesafeler üst ve alt güvenlik kuşağı olarak adlandırılırlar. Üst ve alt güvenlik kuşakları arasında kalan disektör partiküllerinin sayımının yapıldığı yüksekliğe optik disektör yüksekliği (h) adı verilir. Alan örneklemesinin yapıldığı optik disektör prensibine ek olarak kesitler kalınlıkları içerisinde de örnekleme yapılır. Optik parçalama yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde elde edilen toplam partikül sayısı ‘parçalama’ prensibine bağlı olarak doku takibi ve kesit alma işlemlerinin herhangi bir basamağında oluşabilecek

olumsuzluklardan, ‘optik disektör’ prensibine bağılı olarak da doku içerisindeki taneciklerin büyüklüğü, şekli ve yöneliminden etkilenmez. Optik parçalama yöntemi ile tanecik sayımı nörolojik bilimlerde altın standart olarak kabul görmüş, oldukça etkin ve tarafsız bir uygulamadır.

Doku kesitinin üst ve alt yüzlerinde olan deformasyon nedeni ile sayım yapılan her alanda kesit kalınlığı ölçülür. Bir kesit için ölçülen kesit kalınlığı değerlerinin ortalaması alınarak o kesite ait kalınlık ortalama değeri elde edilir. Bir doku örneğine ait tüm kesitlerin kalınlık ortalama değerlerinin ortalaması ise her bir doku örneğine ait ortalama kesit kalınlığı değerini verir. Optik disektör yüksekliğinin her bir doku örneğine ait ortalama kesit kalınlığı değerine bölünmesi ile kalınlık örnekleme oranı (KaÖÖ) elde edilir. Sistematiğ rastgele örneklemede kullanılan KeÖÖ, AÖÖ, KaÖÖ, her bir kesitte sayılan partikül sayılarının (Q_i^-) toplamı (ΣQ^-), $N = (\Sigma Q^-) \times (1/KeÖÖ) \times (1/AÖÖ) \times (1/KaÖÖ)$ formülünde yerine koyularak işlem yapıldığında ilgilenilen yapının tümünde bulunan partikül sayısı (N) hesaplanmaktadır (Cruz-Orive, 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı, Çalışma Planı ve Haftalık Rutin Uygulamalar

Çalışmamızda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı’ndan temin edilen 10 aylık, 400-450 gram ağırlığında toplam 48 adet yetişkin Wistar Albino türü erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar normal bakım ve besleme koşullarında, her kafeste dörder adet olmak üzere polikarbon kafeslerde, otomatik olarak %45-60 nem oranına ve 22 ± 1 °C ortam sıcaklığına ayarlanmış ve günlük 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışıklandırması yapılan laboratuvarında, yem ve su kısıtlaması

yapılmadan bakıldılar. Haftada iki kere tüm kafeslerin temizliği yapıldı. Deney hayvanlarının ortama ve araştırmacılara adaptasyonu için geçen bir hafta sonrasında deney grupları oluşturularak çalışmanın uygulama aşamasına geçildi. Deneysel Parkinson hastalığını indüklemek amacı ile 60 gün süresince düşük dozda Rotenone® uygulanan deney hayvanlarından probiyotik grubunda bulunanlara ek olarak gavaj yolu ile probiyotik verildi ve on beş günlük bekleme süresinin sonunda (75. gün) deney hayvanları anestezi altında sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Deneysel prosedürün devam ettiği süre boyunca her hafta aynı gün, enjeksiyon ve gavaj uygulamasının sonlandırıldığı 60. gün ve deneyin sonlandırıldığı 75. gün hayvanlar tartılarak canlı ağırlıkları kaydedildi.

Deney süresince hayvanların ağırlık değişimlerinin değerlendirilmesi amacı ile (son ağırlık-ilk ağırlık)/son ağırlık X 100 formülü ile vücut ağırlığı yüzde değişimleri (VAYD) hesaplandı. Deney hayvanlarının, enjeksiyon ve gavaj uygulamasının sonlandırıldığı 60. günde kaydedilen ağırlıkları ve deney başlangıcında kaydedilen ağırlıkları kullanarak uygulama süresince saptanan vücut ağırlığı yüzde değişimi (VAYDu), 60. günde kaydedilen ağırlıklar ile on beş günlük bekleme sürecinin bitiminde kaydedilen 75. gün ağırlıkları kullanarak bekleme süresinde saptanan vücut ağırlığı yüzde değişimi (VAYDb) ve 75. gün ağırlıkları ile çalışmanın başlangıcında kaydedilen ağırlıkları kullanarak deney süresince saptanan vücut ağırlığı yüzde değişimi (VAYDd) hesaplandı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar her grupta sekizer adet olmak üzere rastgele seçilerek altı gruba; kontrol grubu (K), çözücü kontrol grubu (CK), Parkinson hastası grubu (P), bakteriyel probiyotik uygulanan Parkinson hastası grubu (PB), maya probiyotik uygulanan Parkinson hastası grubu (PM), bakteriyel ve maya probiyotik uygulanan Parkinson hastası grubu (PBM), ayrıldı.

3.3. Motor Testler

Deney hayvanlarının motor hareketlerinin analizi ve kognitif fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacı ile yapılan açık alan, silindir ve askı teli testleri deneysel Parkinson hastalığının oluşturulması amacı ile enjeksiyona başlamadan önce (0. gün), son enjeksiyon günü (60. gün) ve son enjeksiyon uygulamasından on beş gün sonra (75. gün) toplamda 3 defa gerçekleştirildi.

3.3.1. Görüntü Tabanlı Hareket Analizi; Açık Alan Testi

Açık alan testi Resim 5’de görüldüğü gibi galvanize sacdan yapılmış, kenar uzunluğu 100 cm, yüksekliği 30 cm olan ve taban alanı 25 cm kenar uzunluğunda küçük karelere ayrılmış ve bu karelerden ayrı olarak her kenardan 37,5 cm uzaklıkta merkeze kırmızı renkte çizilmiş, 25 cm kenar uzunluğu olan bir karenin bulunduğu kutu kullanılarak gerçekleştirildi. Her deney hayvanı kutu içerisine koyulduktan sonra on dakika videoya kaydedildi. Video çekimi yapan kamera (LG G4, 16 MP, f/1.8 lens) 156 cm uzunluğunda olan bir tripoda (Deyatech, model C3550) monte edilmiş ve belli bir yükseklikte kutuya paralel olarak yerleştirilmiş ve kutunun tüm alanını görecektir şekilde ayarlanmıştır. Kayıt sırasında hayvanlar uygulama odasında yalnız bırakıldılar. Her yeni kayıttan önce, bir önceki deney hayvanının kutuda bıraktığı dışkı ve idrar atıkları yeni kayda alınacak hayvanın davranışlarının etkilenmemesi amacı ile %10’luk etil alkol kullanılarak temizlendi. Temizlik işleminin daha kolay yapılabilmesi, ürinasyon çizgilerinin kaydedilen videolar üzerinde net şekilde görülebilmesi ve deney hayvanının hareketlerini kutu tabanı ile olan kontrast farkını gözeterek takip eden video takip programının daha etkili şekilde kullanımını sağlamak amacı ile kutu tabanına her hayvan için opak, siyah renkli karton serildi. Çizgi geçişi, merkez kareye girme sıklığı gibi kutu tabanında yer alan çizgiler yardımı ile saptanan veriler için, kaydedilen videolar değerlendirilirken kutu tabanının ekran görüntüsü bir cetvel yardımı ile ölçüldü. Kutu tabanında yer alan çizgi düzeni asetat kağıdına çizildi. Asetat kağıdı monitör üzerine yapıştırıldı ve video süresince değerlendirmeler gerçekleştirildi.



Resim 5: Açık alan testinin gerçekleştirildiği, tabanı çizgilerle karelere ayrılmış galvanize sac kutu.

Açık alan testi deney hayvanlarında lokomotor aktivitenin ve anksiyete ilişkili davranışların değerlendirilmesi amacı ile uygulanan, bu amaçla değişen kenar uzunluğuna sahip (38-100 cm aralığında) kutu benzeri araçların kullanıldığı bir testtir. Çalışmamızda açık alan testinde kaydedilen videolar üzerinde Tablo 2’de verilen analizler gerçekleştirildi. Deney hayvanının kayıt süresince geçtiği çizgi sayısı (ambulasyon, ÇG) ve buna bağlı yürünen toplam yol (TY), şahlanma hareketi (Ş) lokomotor aktivitenin temel belirteçlerindendir ve deneysel Parkinson hastalığı modellerinde sıklıkla incelenirler (Su ve ark, 2018). Deney hayvanının merkez kareye girme sıklığı (MKG) ve merkez kare içerisinde geçirdiği süre (MKK) keşifsel davranışların yüksek, anksiyete skorunun düşük olduğunu göstermektedir. Germe hareketi (GH) ise hayvanın mevcut konumundan yeni bir konuma geçmekte tereddüt ettiğini gösteren bir risk değerlendirme davranışı olarak değerlendirilir. Tımar (T) davranışı çoğunlukla bulunduğu yerden farklı bir yere geçen deney hayvanında gözlenen bir yer değiştirme davranışdır ve lokomotor aktivite hakkında fikir verir. Ürinyasyon (Ü) ve defekasyon (D) parametreleri ise otonomik fonksiyonların değerlendirilmesinden ziyade kaygı değerlendirilmesine yönelik incelenmektedir. Bu parametrelerin kontrol grubu ile benzerlik göstermesi deney grubunun anksiyete skorunun düşük olduğunu gösterir (Griebel ve Blanchard, 2001).

Tablo 2: Açık alan testi video kayıtlarında değerlendirilen parametreler.

Video kaydında değerlendirilen Parametreler	Açıklama
Çizgi geçişi (ÇG)	Hayvanın dört ayağı ile birlikte geçtiği kutu tabanındaki çizgi sayısı
Merkez kareye giriş (MKG)	Hayvanın merkez kareye girme sıklığı
Merkez karede kalma süresi (MKK)	Saniye cinsinden hayvanın merkez karede geçirdiği zaman
Şahlanma (Ş)	Hayvanın arka ayakları üzerine kalkma sıklığı
Germe hareketi (GH)	Hayvanın baş ve omuzlarını yukarı ve ileriye uzatma ve tekrar orijinal pozisyonuna dönme sıklığı
Tımar (T)	Saniye cinsinden video süresince hayvanın kendini yalamak, tırmalamak için geçirdiği zaman
Hareketsiz kalma (HK)	Saniye cinsinden hayvanın tamamen hareketsiz geçirdiği süre

Ürinyasyon (Ü)	Hayvanın kutu içerisinde bıraktığı idrar çizgisi sayısı
Defekasyon (D)	Hayvanın kutu içerisinde bıraktığı tane şeklinde dışkı sayısı
Yürünen toplam yol (TY)	Santimetre cinsinden 10 dakika süre boyunca deney hayvanının kutu içerisinde yürüdüğü toplam mesafe

Kayda alınan video süresince deney hayvanının yürüdüğü toplam yol (TY) Resim 6'da gösterildiği gibi Kinovea-0.8.15 video takip programı kullanılarak hesaplandı. Video oynatılmaya başlamadan önce, takip noktası olarak deney hayvanının sırt bölümü işaretlendi.



Resim 6: Kinovea programı kullanılarak yürünen toplam yolun (TY) hesaplanması.

Bilinen bir uzunluk olan açık alan testi kutusunun kenar uzunluğunun ölçümü vasıtasıyla video takip programının kalibrasyonu sağlandı ve on dakikalık video süresince deney hayvanının yürüdüğü TY santimetre cinsinden kaydedildi.

3.3.2. Silindir Testi

Tek taraflı motor asimetriyi değerlendirmek için her deney hayvanı Resim 7'de görülen 20 cm çapında ve 30 cm yüksekliğinde pleksiglas bir silindirin içine koyuldu. Silindirin dışına çıkmak, içerisine koyulduğu nesneyi anlamak ve benzeri amaçlarla şahlanma hareketi yaparak ön ekstremitelerini silindir duvarına dayayan deney hayvanının toplam beş dakika içerisinde sağ ve sol ön ekstremitelerini kaç defa silindir duvarına dayadığı sayıldı. Bu test on beş dakika ara ile 3 defa tekrarlandı ve her rat için elde edilen değerlerin ortalaması alındı.



Resim 7: Deney hayvanının sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarı ile teması.

3.3.3. Askı Teli Testi

Kalem kalınlığında, dayanıklı ve yeterli uzunlukta olan tahta bir çubuk her iki ucu ayaklarla desteklenerek, yerden 60 cm yukarıya ve yere paralel olarak yerleştirildi. Genel kas kuvvetini ölçmek amacı ile çubuk üzerine getirilerek, ön ekstremiteleri ile çubuğu kavramaları sağlanan ratlar serbest bırakıldı. Resim 8’de görüldüğü üzere çubuk üzerinde asılı kalan ratların çubuğu tutmayı bırakıp yere düşene kadar geçirdikleri, başka bir deyişle çubuğu tuttukları süre kaydedildi. Bu uygulama on beş dakika ara ile 3 defa tekrar edildi, her rat için elde edilen değerlerin ortalaması alındı.



Resim 8: Askı teli testi uygulaması.

3.4. Deneysel Parkinson Hastalığının Oluşturulması ve Probiyotik Uygulaması

Deneyel Parkinson hastalığının oluşturulması amacıyla P, PB, PM ve PBM grubu deney hayvanlarına günlük 2.5 mg/kg dozda, çözücü solusyonu içerisinde çözdürülen Rotenone® (Ürün kodu: CAS83-79-4, Santa Cruz Biotechnology, Texas, ABD) 60 gün süresince intraperitoneal olarak uygulandı. Bu süre içerisinde PM grubu hayvanlara rotenon enjeksiyonuna ek olarak günlük 25mg/kg dozda liyofilize *Saccharomyces boulardii*, PB grubu hayvanlara 10^9 koloni oluşum birimi (kob) *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* ve *Streptococcus thermophilus* içeren bakteriyel probiyotik, PBM grubu hayvanlara ise 25 mg/kg/gün dozda *Saccharomyces boulardii* ile 10^9 kob/gün bakteriyel kökenli probiyotik kombine şekilde distile su ile sulandırılarak, gavaj yoluyla verildi. Çözücü kontrol grubu (CK) hayvanlara aynı miktar distile su gavaj yolu ile ve aynı miktar rotenon çözücü solüsyonu intraperitoneal olarak verilirken K grubu hayvanlara çalışma süresince herhangi bir uygulama yapılmadı.

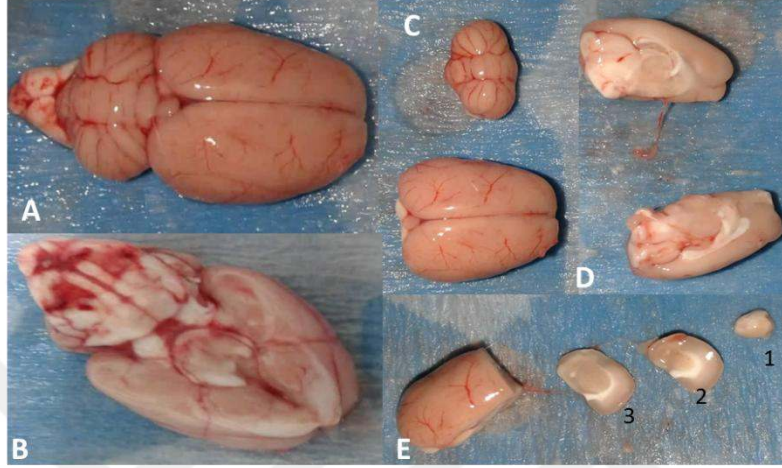
Çalışmamızda kullandığımız *S. boulardii* ticari preparatı Reflor® (Biocodex İlaç, İstanbul, Türkiye) bir şasede 250 mg mayaya eşdeğer liyofilize suş içermektedir, her deney hayvanının ağırlığına göre 25mg/kg/gün dozda hesaplanarak uygulanmıştır. Newita® (PharmaPLANT, İstanbul, Türkiye) bakteriyel kökenli probiyotik ise her kapsülde 5×10^9 kob mikroorganizma içermektedir, bir kapsül içeriği 5 hayvan için 10^9 kob/gün dozda kullanılmıştır. Rodentler için günlük $10^8 - 10^9$ kob/gün (koloni oluşum birimi/gün) oral bakteriyel probiyotik alımının, ratlar için ise günlük 25 mg/kg dozda *Saccharomyces boulardii*'nin intestinal mukozanın etkili şekilde kolonizasyonu için yeterli olduğu belirtilmektedir (Bassaganya-Riera ve ark, 2012, Karen ve ark, 2010).

3.5. Deneyin Sonlandırılması, Doku Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi

Altmış günlük enjeksiyon ve gavaj uygulamasını takiben oluşturulan patolojinin stabilizasyonunun sağlanması amacıyla on beş gün süre ile hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. Enjeksiyon ve gavaj uygulamasını takiben ve iki hafta sonrasında gerçekleştirilen motor testler tamamlandıktan sonra deney hayvanları 5 mg/kg ksilazin (Alfazyne®, Ege-Vet, İzmir, Türkiye) ve 100 mg/kg ketamin (Ketalar®, Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında sakrifiye edildiler.

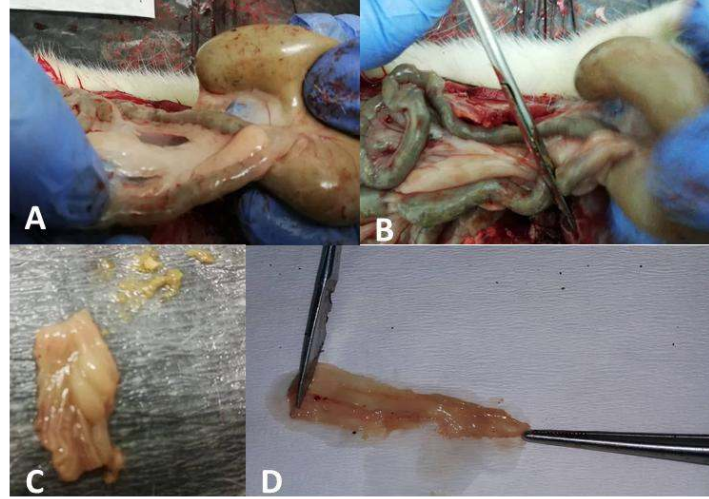
Sakrifiye edilen ratların kraniyumu hızlıca açılarak beyin ve beyincik Resim 9'da görüldüğü gibi bütün halde çıkarıldı. Keskin bir bistüri ucu kullanılarak koronal planda beyin ve beyincik birbirinden ayrıldı. Fissura longitudinalis cerebri'den sağ ve sol iki hemisfere

ayrılan beynin sağ hemisferi ve beyincik % 10'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Sol beyin hemisferinden enzim bağlı immunosorbent deney yöntemi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) ile dopamin tayini için corpus striatum izole edildi (Heffner ve ark, 1980; Spijker, 2011). Eppendorf tüplere alınan corpus striatum örnekleri ELISA yöntemi ile dopamin analizi gerçekleştirilene kadar -22°C'de saklandı.



Resim 9: A, B; Kraniyumdan tüm halde beyin ve beyinciğın çıkarılması, C; beyin ve beyinciğın ayrılması, D; fissura longitudinalis cerebri'den beynin iki hemisfere ayrılması, E; 1,5 mm kalınlığında sol hemisferden alınan 2. ve 3. kesitlerde corpus striatum.

Resim 10'da görüldüğü gibi caecum'un 1 cm distalinden, hemen hemen 0,5 cm uzunlukta proksimal kolon örnekleri alındı. Alınan örneklerde yer alan mesenterium'a ait yağ ve bağ dokusu temizlendi. Örnekler longitudinal olarak açılıp, intestinal içerik bolca soğuk serum fizyolojik kullanılarak yıkandıktan sonra, özellikle hematopoietik hücreler için uygun bir besiyeri olan %2'lik fötal sığır serumu (FBS, ThermoFischer Scientific, Katalog no: A3840001) ve dengeli tuz solusyonu (HBSS, ScienCell, Katalog no: 0313) içeren buz soğukluğundaki RPMI 1640 (ScienCell, Katalog no: 09521) hücre kültürü medyumuna alındılar ve kesim işlemi bitene dek buz dolu kutu içerisinde tutuldular.



Resim 10: A, B; proksimal kolonun örneklenmesi, C; longitudinal olarak açılan proksimal kolon örneklerinin buz soğukluğunda serum fizyolojik ile içeriğinin temizlenmesi, D; künt bistüri ile mukozal tabakanın sıyırılması.

İnorganik tuzlar ve glikozdan oluşan, fizyolojik bir pH ve ozmotik basınç sağlayan HBSS ile FBS, hücreleri yaşayabilir durumda tutmak amacı ile RPMI 1640 medyumuna eklenmiştir. Alınan intestinal örnekler, soğuk zincir bozulmadan, aynı gün içerisinde akım sitometride CD163 ekspresyonu gösteren makrofajları değerlendirmek için okutuldu.

3.5.1. Histolojik Doku Takibi, Kesit Alma ve Kesitlerin Örneklenmesi

Sağ beyin hemisferleri dört hafta, beyincikler on gün tespit olmaları için %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Sürecin sonunda bir gece akarsu altında bekletilerek formaldehitten arındırılan dokular Tablo 3'de verilen prosedüre göre artan alkol (Tekkim, Bursa, Türkiye) serilerinde dehidre edilerek, ksilende (Ürün kodu: 1330-20-7, VWR Chemicals, Pensilvanya, ABD) şeffaflaştırıldı, 60°C etüvde parafin emdirildikten sonra parafin bloklara gömülen dokular rotary mikrotom (ThermoFischer Scientific, HM 325) ile kesilerek stereolojik optik parçalama yöntemi ile nöron sayımı, histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler için örneklandılar. Parafin doku blokları kesilmeden önce, boyama işlemleri sırasında kalın kesitlerin lamdan düşmelerinin önlenmesi amacı ile pozitif şarjlı lam (Ürün kodu: 24216-20, Polysciences Inc., Pensilvanya, ABD) kullanıldı ve kesitlerin açılmasının sağlandığı 40°C sıcaklığındaki benmari suyuna 90-95 °C sıcaklığındaki suda iyice karıştırılarak çözdürülmüş toz jelatin (Tekkim, Bursa, Türkiye) %5 oranında eklendi.

Tablo 3: Beyin ve beyincik dokularının histolojik takip prosedürü.

Kimyasallar	Sağ beyin hemisferi doku takip prosedürü	Serebellum doku takip prosedürü
%50'lik alkol	-	1 saat
%70'lik alkol	1 gece	1 saat
%80'lik alkol	1 saat	1 saat
%96'lık alkol	1 saat	1 saat
%100'lük alkol X 3	1 saat X 3 (3 saat)	1 saat (3 saat)
%50'lik ksilen ve absolüt alkol karışımı	20 dakika	10 dakika
Ksilen X 2	30 dakika (1 saat)	30 dakika (1 saat)
Eriyik parafin 60°C etüvde X 3	1 saat (3 saat)	1 saat (3 saat)
Parafine gömme (Bloklama)		

Sağ beyin hemisferinden sagittal planda 20 µm kalınlığında kesitler alındı. Trimleme; doku etrafındaki parafinin kesilerek uzaklaştırılması, yapılıp doku mikrotom ile kesilmeye başlandıktan sonra alınan altı kesitten biri rastgele seçildi. Seçilen kesitten sonraki her altıncı kesit, doku tümü ile kesilene kadar hippocampus nöron sayımı için örneklendi. Sagittal planda 20 µm kalınlığında kesilen her bir sağ beyin hemisferinden 350-390 arasında değişen sayılarda kesit elde edildi. Sistematik rastgele 1/6 oranında örneklenen kesitlerden rat beyin atlasından yararlanılarak hippocampus'u içeren kesitler ayrıldı ve bu kesitler üzerinde hippocampus'un stratum pyramidale tabakasında bulunan piramidal nöronların sayımı yapıldı. Benzer şekilde serebellum örneklerinden de doku mikrotom ile kesilmeye başlandıktan sonra, transvers planda 30 µm kalınlığında on kesit alındı. Alınan on kesitten biri rastgele seçilerek, seçilen kesitten sonraki her onuncu kesit serebellar Purkinje hücrelerinin sayımı için örneklendi. Transvers planda 30 µm kalınlığında kesilen her bir serebellum örneğinden 180-230 arasında değişen sayılarda kesit elde edildi, 1/10 oranında sistematik rastgele örneklenen 18-23 kesit üzerinde Purkinje hücre sayımı yapıldı. Stereolojik örnekleme yapılmadığı kesit aralıklarında, stereolojik örnekleme prosedürünün örnekleme aralığını etkilemeden, histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler için beyin dokularından 7 µm kalınlığında ince kesitler alındı.

Sağ beyin hemisferinden alınan 20 µm ve beyincikten alınan 30 µm kalınlığındaki kesitler Tablo 4'de verilen prosedüre göre Krezil viyole asetat (Ürün kodu: 105235, Merck Millipore, Massachusetts, ABD) ile boyandı. Boyama işleminden önce, toz halde olan Krezil viyole asetat 100 ml distile suda 100 mg çözündürülerek hazırlandı ve 55 °C'e ayarlanmış etüvde tutuldu. Krezil viyole asetat ayrıştırıcısı ise %96'lık etil alkol içerisine her 100 ml'lik

hacim için 2 damla glasiyal asetik asit (Ürün kodu: 1005706, Merck Millipore, Massachusetts, ABD) eklenerek hazırlandı.

Tablo 4: Beyin ve beyincik dokularının Krezil viyole asetet boyama prosedürü.

Kimyasallar	Sağ beyin hemisferi için bekletme süresi	Cerebellum için bekletme süresi
Ksilen X 4	30 dakika (2 saat)	45 dakika (3 saat)
%100'lük alkol X 2	10 dakika (20 dakika)	15 dakika (30 dakika)
%96'lık alkol	10 dakika	15 dakika
%80'lik alkol	10 dakika	15 dakika
%70'lik alkol	10 dakika	15 dakika
Distile su	10 dakika	15 dakika
55 °C'de Krezil viyole asetat çözeltisi	3 dakika	5 dakika
Distile su	2 dakika	3 dakika
%70'lik alkol	5 dakika	8 dakika
%80'lik alkol	5 dakika	8 dakika
%96'lık alkol	5 dakika	8 dakika
Krezil viyole asetat ayrıştırıcısı	7 dakika	10 dakika
%96'lık alkol	10 dakika	15 dakika
%100'lük alkol	10 dakika	15 dakika
Ksilen X 2	30 dakika (1 saat)	45 dakika (90 dakika)
Entellan ile kapatma		

3.6. Stereolojik Optik Parçalama Yöntemi ile Hippokampal Piramidal Nöronların ve Serebellar Purkinje Hücrelerinin Sayımı

Sağ beyin hemisferinden sagittal planda 20 µm, serebellumdan transvers planda 30 µm kalınlığında alınmış olan kesitlerde optik parçalama yöntemi ile hippocampus stratum pyramidale tabakasında bulunan piramidal nöronların ve serebellar Purkinje hücrelerinin sayımı yapıldı. Stereolojik nöron sayımı için mikroskop (Eclipse E100, Nikon, Tokyo, Japonya) ile mikroskop üzerine monte edilmiş bir video kamera (Model no: XCAM1080PHA, Toupcam, Zhejiang, Çin) ve mikroskop görüntüsünün yansıtıldığı bir bilgisayar (Model no: A57, Fujitsu, Tokyo, Japonya) kullanıldı.

İlgilenilen yapılarda nöron sayımı yapılırken x ve y eksenlerinde öncesinde belirlenmiş mesafeler boyunca adımlama yapılabilmesi için Adıgüzel ve arkadaşlarının (2003) geliştirdiği thoma lamı kalibrasyon yöntemi ile kenar uzunluğu 50 µm olan bir kare asetat kağıdı üzerine çizildi. Mikroskop görüntüsünün yansıtıldığı monitör üzerine yapıştırılan asetat kağıdı üzerine çizilmiş kenar uzunluğu 50 µm olan adımlama karesi vasıtasıyla nöron sayımı yapılan X100

büyütmede ilgilenilen yapılar belirtilen değerlerde x ve y eksenleri boyunca tarandı. Adımlama karesinin ortasına çizilen, kenar uzunluğu bilinen tarafsız sayım çerçevesi alanında kalan hücrelerin sayımı yapıldı. Kesit içerisinde z ekseni boyunca ilerlemeyi sağlayan mikroskop mikrovidası kalınlığı bilinen bir lamel ile kalibre edilerek, optik düzlemler boyunca kesit içerisinde ilerlenen mesafenin kontrolü ve sayım yapılan her alanda kesit kalınlığının ölçümü sağlandı. Lamel kalınlığının ölçümü amacıyla yumuşak bir parafine dik olarak gömülen lamel kalınlığı X10 büyütmede monitöre yansıtıldı, öncesinde kalibrasyonu yapılmış olan monitörün üzerindeki lamel kalınlığı santimetre cinsinden ölçülerek mikron cinsinden değeri hesaplandı. Lamelin üst ve alt yüzlerine asetat kalemi ile birbirinden farklı şekiller çizilerek mikroskop tablasına yerleştirildi. Mikroskop mikrovidası oynatılarak lamelin üst yüzündeki şeklin netleştiği anda mikrovidanın birimi kaydedildi. Mikrovida ile z ekseninde lamelin alt yüzüne doğru ilerlendi, lamelin alt yüzüne çizilen şeklin görüntüsü netleştiği anda mikrovida birimi tekrar kaydedildi. Mikron cinsinden değeri hesaplanmış olan lamel kalınlığı boyunca, mikrovidanın kaç birim hareket ettiği hesaplanarak, mikrovidanın bir birimlik hareketinin kaç mikron derinliğe denk geldiği bulundu.

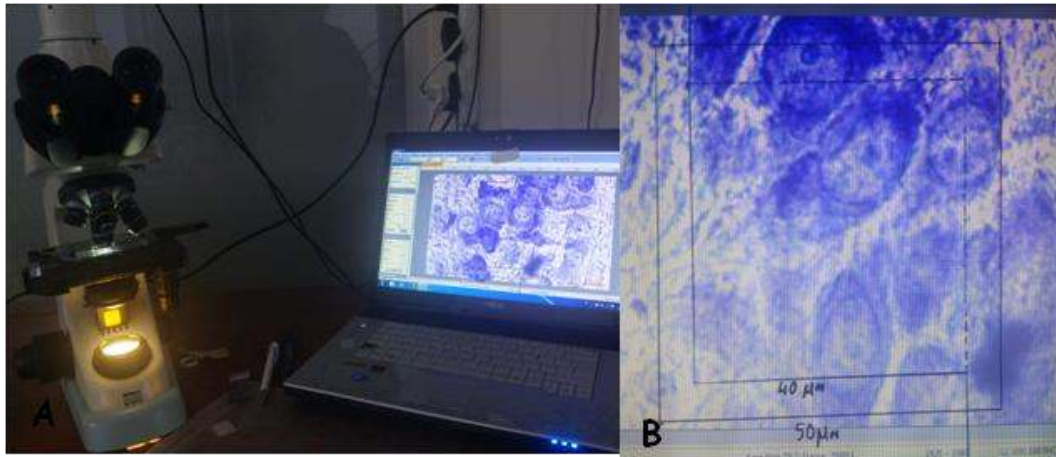
Tablo 5’de verilen, referans çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda (Kıvrak ve ark, 2017) hippocampus stratum pyramidale tabakasında bulunan nöronların sayımında üst güvenlik kuşağı 2 μm olarak bırakılırken, optik disektör yüksekliği 7 μm olarak alındı. Sayıma hippocampus CA1 alanının subiculum’a komşu ucunda, x, y adımlama alanı içerisinde bir alanın tarafsız sayım çerçevesi içerisine alınarak X100 büyütmede nöron sayımı yapılmasıyla başlandı. Resim 11’de görüldüğü gibi 40 μm kenar uzunluğuna sahip, 1600 μm^2 alanı olan tarafsız sayım çerçevesinin ortalandığı, 50 μm kenar uzunluğuna sahip adımlama karesi yardımı ile hippocampus alanı boyunca x ekseninde 450 μm , y ekseninde 50 μm adımlanarak taranan her 22.500 μm^2 ’lik (450 μm X 50 μm) alanın tarafsız sayım çerçevesi içerisinde kalan 1600 μm^2 ’sinde piramidal nöronların sayımı yapıldı. Dolayısıyla stratum pyramidale tabakasında bulunan nöronların sayımında alan örnekleme oranı 1600 μm^2 /22.500 μm^2 olarak hesaplandı. Sayım yapılan her alanda ölçülen kesit kalınlığı değerlerinin ortalaması alınarak her bir kesit için kesit kalınlığı ortalama değeri, bu ortalama değerlerin toplamının sayım yapılan kesit sayısına bölünmesi ile de her bir hippocampus örneği için ortalama kesit kalınlığı elde edildi. Optik disektör yüksekliğinin ortalama kesit kalınlığına bölünmesi ile her bir hippocampus örneği için kalınlık örnekleme oranı (7 μm /ortalama kesit kalınlığı) elde edildi. Her bir deney hayvanının 1/6 oranında örneklenen hippocampus kesitlerinde belirtilen kurallar çerçevesinde sayılan toplam disektör partikül sayısı (ΣQ^-), kesit örnekleme oranı (1/6), alan örnekleme oranı (1600 μm^2 /22.500 μm^2) ve kalınlık örnekleme oranı

(7µm/ortalama kesit kalınlığı) aşağıda verilen formülde yerine koyularak, her deney hayvanının hippocampus stratum pyramidale tabakasında bulunan toplam piramidal nöron sayısı (Nhippocampus) hesaplandı.

$$N_{hippocampus} = (\Sigma Q^-) \times (1/K_{e\ddot{O}O}) \times (1/A_{\ddot{O}O}) \times (1/K_{a\ddot{O}O})$$

Tablo 5: Referans çalışmalardan; Sönmez ve ark, 2010, Kıvrak ve ark, 2017, alınan stereolojik analizde kullanılan değerler.

	Hippocampus	Cerebellum
Örnekleme yönü	Sagittal plan	Horizontal plan
Kesit kalınlığı	20	30
Kesit örnekleme oranı	1/6	1/10
x-y adımlama alanı	450 µm X 50 µm (22.500 µm ²)	300 µm X 300 µm (90.000 µm ²)
Tarafsız sayım çerçevesi alanı	1600 µm ²	625 µm ²
Optik disektör yüksekliği	7 µm	10 µm
Üst güvenlik kuşağı	2 µm	4 µm
Sayım yapılan objektif büyüklüğü	X100	X100



Resim 11: A; Nöron sayım düzeneği, B; Hippocampus piramidal nöronlarının sayımı amacı ile hazırlanmış 40 µm kenar uzunluğuna sahip tarafsız sayım çerçevesi. Sağ ve üst kenarı oluşturan kesikli çizgiler serbest kenarları, sol ve alt kenarı oluşturan devamlı çizgiler ve uzantıları yasak kenarları temsil etmektedir, Krezil viyole asetat boyama, Magnifikasyon X100.

Kesit örnekleme oranı 1/10 olan 30 µm kalınlığındaki serebellum kesitlerinde üst güvenlik kuşağı 5 µm olarak bırakıldı, optik disektör yüksekliği (10 µm) boyunca, x ekseninde 300 µm y ekseninde 300 µm adımlanarak taranan 90.000 µm²'lik her alanın tarafsız sayım çerçevesi içerisinde kalan 625 µm²'lik bölümünde Purkinje hücrelerinin sayımı yapıldı. Cerebellum kesitlerinin alan örnekleme oranı 625 µm²/90.000 µm² olarak hesaplandı (Sönmez ve ark, 2010). Optik disektör yüksekliğinin, sırasıyla her kesit ve sonrasında her cerebellum örneği için hesaplanan ortalama kesit kalınlığına oranı ile kalınlık örnekleme oranı elde edildi. Her bir deney hayvanına ait kesitlerde sayılan toplam nöron sayısı (ΣQ^-) ve diğer parametreler formülde yerine koyularak, her deney hayvanının cerebellum'unda bulunan toplam nöron sayısı ($N_{\text{cerebellum}}$) hesaplandı.

3.6.1. Hata Katsayısının Hesaplanması

Stereolojik çalışmalarda kesitler üzerinde belirli kurallar çerçevesinde yapılan üç boyutlu yapılara ait çıkarımların güvenilirliği her örnek için hesaplanan hata katsayısı ile kontrol edilir. Her bir örnek için hata katsayısının %10 altında bulunması, çalışmanın örnekleme planının yeterli ve elde edilen sonuçların güvenilir olduğunu göstermektedir (West ve ark, 1991). Hata katsayısı her bir örneğin kesitlerinde sayılan nöron sayıları kullanılarak hesaplanan değerlerin, hata katsayısının hesaplandığı formülde yerine koyulması ile bulunmaktadır.

Tablo 6: P grubuna ait bir sıçanda hata katsayısının hesaplanması için gerekli A, B ve C değerlerinin hesaplanması, Q_i^- : Her bir kesitin disektör partikül sayısı, $Q_i^- \times Q_i^-$: x sayılı kesitin disektör partikül sayısının karesi, $Q_i^- \times (Q_i^-+1)$: x sayılı kesit ile ondan bir sonra gelen kesitin disektör partikül sayılarının çarpımı, $Q_i^- \times (Q_i^-+2)$: x sayılı kesit ile ondan sonra gelen ikinci kesitin disektör partikül sayılarının çarpımı, ΣQ^- : Örneklenen kesitlerde sayılan toplam disektör partikül sayısı.

Kesit sayısı	Q_i^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times (Q_i^-+1)$	$Q_i^- \times (Q_i^-+2)$
1	49	2401	2695	2303
2	55	3025	2585	2970
3	47	2209	2538	2068
4	54	2916	2376	2592
5	44	1936	2112	2596
6	48	2304	2832	3072
7	59	3481	3776	4071
8	64	4096	4416	3904
9	69	4761	4209	4002
10	61	3721	3538	4148
11	58	3364	3944	4292
12	68	4624	5032	4760

13	74	5476	5180	5846
14	70	4900	5530	5250
15	79	6241	5925	5846
16	75	5625	5550	5175
17	74	5476	5106	5624
18	69	4761	5244	4416
19	76	5776	4864	5548
20	64	4096	4672	4224
21	73	5329	4818	4307
22	66	4356	3894	4422
23	59	3481	3953	4307
24	67	4489	4891	3886
25	73	5329	4234	4964
26	58	3364	3944	3480
27	68	4624	4080	4692
28	60	3600	4140	3360
29	69	4761	3864	3588
30	56	3136	2912	2352
31	52	2704	2184	2600
32	42	1764	2100	1554
33	50	2500	1850	2150
34	37	1369	1591	-
35	43	1849	-	-
Toplam	$\Sigma Q^- = 2130$	A= 133844	B= 130579	C= 128369

Örnek olarak Tablo 6’da gösterilen hesaplamalar ile elde edilen A, B ve C değerleri HK = $[\sqrt{(3A+C-4B)}] / 12 \times \Sigma Q^-$ formülünde yerine koyularak her bir örnek için ayrı ayrı hata katsayısı hesaplanmıştır. Verilen örnekte P grubuna ait deney hayvanında, sağ hippocampus piramidal nöron sayımında hata katsayısı 0,0034 olarak hesaplanmıştır. Kesitlerin tümünde sayılan ΣQ^- , hippocampus için kesit örnekleme (1/6) ve alan örnekleme (1600/22500) oranı, optik disektör yüksekliğinin (7µm) sayım yapılan kesitlerin kalınlık ortalamasına bölümü ile elde edilen kalınlık örnekleme oranı (tort= 10,55 µm) Nhippocampus formülünde yerine koyulduğunda, P grubundaki deney hayvanının sağ hippocampus toplam piramidal nöron sayısı 270.861 olarak hesaplanmaktadır.

$$N_{hippocampus} = 2532 \times 1 / (1/6) \times 1 / (1600/22500) \times 1 / (7/13,55) = 413.541$$

3.7. Luksol Fast & Krezil Viyole ve Bielschowsky Boyama Yöntemleri

Stereolojik örneklemenin yapılmadığı kesit aralıklarında 7 µm kalınlığında alınan beyin kesitleri Luksol fast & Krezil viyole (Ürün kodu: 04-200812, Bio Optica, Milano, İtalya) ve

Bielschowsky (Ürün kodu: 04-040801, Bio Optica, Milano, İtalya) kitleri kullanılarak, Tablo 7’de da verilen, kit içerisinde belirtilen prosedüre uygun olarak boyandı.

Tablo 7: Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky boyama prosedürleri.

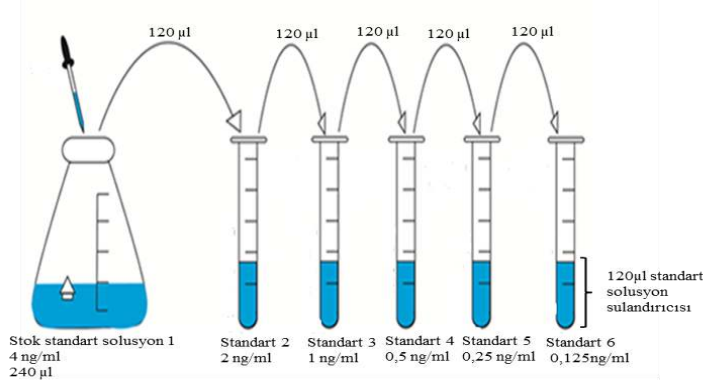
Luksol Fast & Krezil Viyole Boyama Prosedürü	Bielschowsky Boyama Prosedürü
1-60°C etüvde 1 saat ve ksilende 10 dakika deparafinizasyon işlemi 2-%95’lik alkolde 5 dakika	1-Kesit distile su ile yıkanır
3-Distile su emdirilmiş bir filtre kağıdı petri kutusu tabanına yayılır, üzerine kesit yerleştirilir, kesit üzerine Luxol fast blue solusyonu damlatılarak petri kutusunun kapağı kapatılır ve bir gece 56°C etüvde bekletilir	2-Kesit üzerine eşit hacimde potasyum permanganat ve asit aktivasyon buffer damlatılarak 5 dakika beklenir Kesit distile su ile yıkanır
4-Etüvden alınan kesit %95’lik alkolde 2 dakika yıkanır	3-Kesit üzerine oksalik asit eklenerek 3 dakika beklenir
5-Kesit distile su ile yıkanır	4-Kesit distile suda iki kez yıkanır
6-Kesit üzerine lityum karbonat solusyonu eklenerek 30 dakika beklenir	5-Kesit üzerine ferik amonyum sülfat eklenerek 3 dakika beklenir
7-Kesit %70’lik alkolde mavi renk görülene dek yıkanır	6-Kesit distile suda iki kez yıkanır
8-Petri kutusuna tekrar koyulan kesit üzerine krezil viyole solusyonu damlatılır, 56°C etüvde 20 dakika bekletilir	7-Kesit üzerine gümüş nitrat solusyonu eklenerek 3 dakika beklenir
9-İnkubasyondan sonra kesit %95’lik alkolde soluk pembe renk alana dek bekletilir	8-Kesit distile suda yıkanır
10-Kesit absolüt alkolde dehidre edilerek, ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatılır	9-Kesit üzerine nötral formalin solusyonu damlatılarak 5 dakika beklenir
	10-Kesit distile suda iki kez yıkanır
	11-Kesit üzerine sodyum hiposülfat damlatılarak 5 dakika beklenir
	12-Kesit akarsu altında 5 dakika yıkanır
	13-Kesit artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilir, ksilende şeffaflaştırılır ve entellan ile kapatılır

Stereolojik örneklemeler esnasında sağ beyin hemisferinden alınmış, her hayvan için rastgele seçilen 3 kesitte, bir grup için toplam 24 kesitte Luksol fast & Krezil viyole boyamada corpus striatum'da gliosis (CSg) ve kistik boşluklar (CSb), mesencephalon'da perinöronal vakuolizasyon (Mv) ve nöronal dejenerasyon şiddeti (Mnd), hippocampus CA1 (CA1nd), CA2-3 (CA2-3nd), CA4 (CA4nd) bölümlerinde gözlenen dejenerasyon şiddeti her kesitte histoskorlanarak değerlendirildi. Hücre morfolojisinin değerlendirilmesinden ziyade nöronal fibrillerin incelenmesine olanak sağlayan her hayvan için rastgele seçilen 3, bir grupta toplam 24 adet Bielschowsky boyanmış kesitlerde corpus striatum'da (CSf) ve Mossy liflerinin bulunduğu bölgede nörofibriller yoğunluk (MOy) histoskorlanarak değerlendirildi. Sıfırdan dörde kadar verilen histoskor değerleri 0; yok, 1; oldukça az, 2; orta derecede, 3; oldukça fazla, 4; çok fazla anlamlarına gelmektedir. Her hayvan için verilen histoskor değerlerinin ortalaması alınarak istatistiksel olarak analiz edildi. Kesitlerin mikroskop görüntüleri Olympus BX53 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda, Olympus DP72 objektif kullanılarak görüntülendi, LabSciences (Nevada, ABD) programı ile fotoğraflandı.

3.8. Corpus Striatum'dan ELISA Yöntemi ile Dopamin Tayini

Deneyin sonlandırılması aşamasında eppendorf tüplere alınmış olan corpus striatum örneklerinin ağırlıkları hassas terazide tartılarak kaydedildi. Her bir tüpe corpus striatum ağırlığına oranla 1/10 oranında olacak şekilde 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, %0,1 GDS ve %1 Triton-X içeren doku tamponu eklendi. Homojenizasyonun etkili şekilde sağlanması amacı ile her bir tüpe 3-5 adet metal bilye eklendi ve örnekler 3 dakika süresince Bullet Blender Homogenizer (Next Advance, New York, ABD) cihazında homojenize edildiler. Homojenatlar 1400 g'de santrifüje edilerek alınan supernatantlar ELISA analizi için kullanıldı.

ELISA ile dopamin tayininde kullanılan kit (Rat Dopamine ELISA kit, Katalog no:E0219Ra, Bioassay Technology Laboratory, Birmingham, İngiltere) içerisinde yer alan 8 ng/ml derişimindeki standart solüsyonu ve standart solüsyon sulandırıcısı 120'şer µl oranında karıştırılarak 4 ng/ml derişiminde stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonundan alınan 120 µl örnek tekrar 120 µl standart solüsyon sulandırıcısı ile sulandırılarak 2 ng/ml derişiminde, 2 ng/ml'lik solüsyondan alınan 120 µl tekrar 120 µl standart solüsyon sulandırıcısı ile sulandırılarak 1 ng/ml derişiminde standart solüsyon elde edildi. Şekil 12'de görüldüğü gibi bu işleme 0,125 ng/ml derişiminde standart solüsyon elde edilene dek devam edildi.

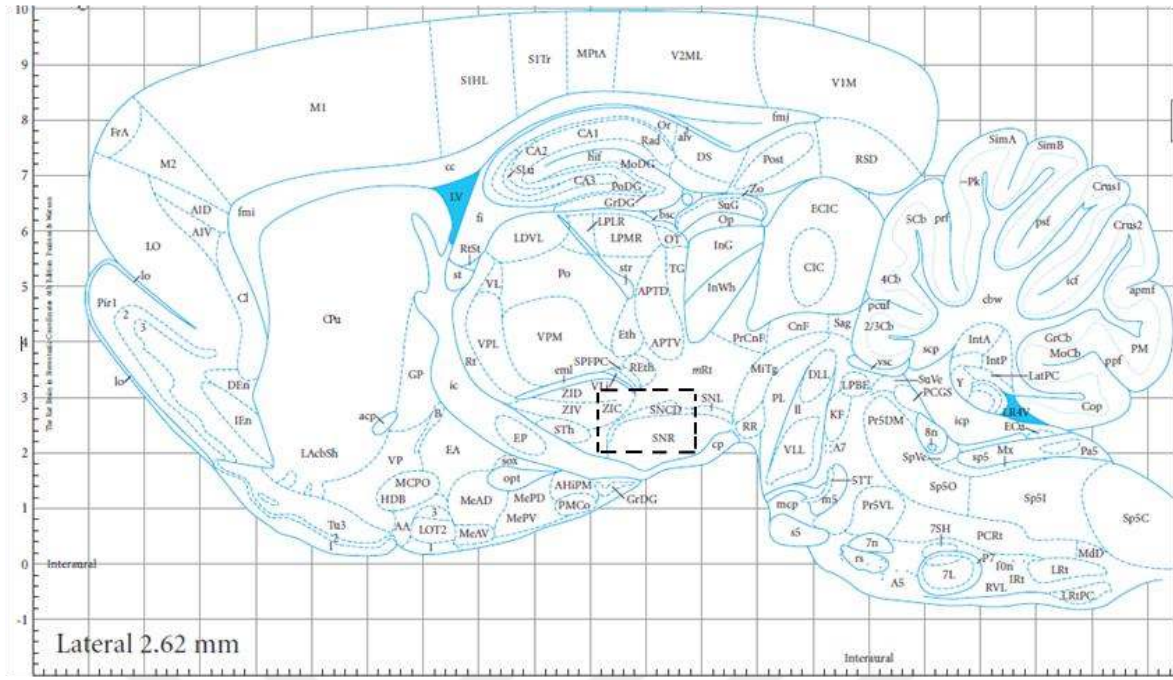


Şekil 12: ELISA analizinde standart solüsyonların dilüsyonu.

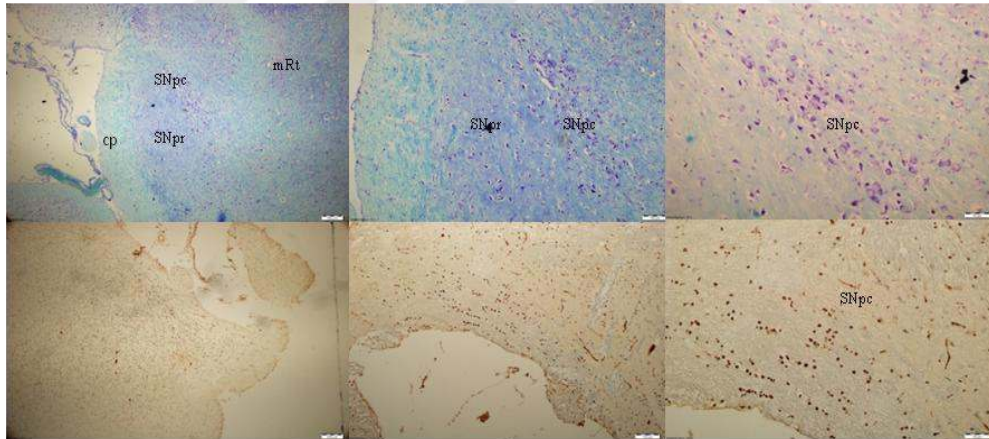
ELISA tabletinde A satırında bulunan 12 adet kuyucuğa düşük derişimden yüksek derişime doğru iki sıra halinde 50 µl standart solüsyonları eklendi. Örnek kuyucuklarına her bir denegin corpus striatum örneklerinin homojenizasyonu ve santrifüjü ile elde edilen 40 µl supernatant ve ardından 10 µl dopamin antikoru eklendi. Ardından standart ve örnek kuyucuklarının tümüne 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenen ELISA tableti üstü kapatılarak Microtec Shaker Plate (Infors HT, İsviçre) cihazında 37°C’de 60 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda kuyucuklarda yer alan içerik dökülerek 5 kez ELISA yıkama tamponu (ThermoFischer Scientific, Katalog no: N503) ile yıkandı. Her kuyucuğa kit içerisinde yer alan substrat A ve substrat B 50’şer µl eklendikten sonra tablet karanlık ortamda, üstü kapalı halde, 37°C’de 10 dakika inkube edildi. İnkubasyon sonunda her kuyucuğa kit içerisinde yer alan stop solüsyonu 50 µl hacimde eklendi ve tablet ELISA Reader (Diagnostic Automation Inc., Model: DAR800, Kaliforniya, ABD) cihazında 450 nanometre dalga boyunda okutuldu.

3.9. Tirozin Hidroksilaz Enzim İmmunohistokimyası

Tirozin hidroksilaz immunoreaktif nöronların belirlenebilmesi amacıyla, rat beyin atlasından (Paxinos ve Watson, 2007) yararlanılarak sagittal beyin kesitlerinde SNpc’nin en iyi gözlendiği kesitler seçildi. Median hat 0 noktası olarak kabul edildi, laterale doğru 2,5-2,62 mm aralığında, hippocampus piramidal nöron sayımı için alınan 21. sayılı kesit (median hattın laterale 2500 µm) ile 22. sayılı kesit (median hattın laterale 2620µm) aralığında bulunan kesitlerden 7 µm kalınlığında alınan 17 kesitten rastgele seçilen 5 kesit kullanıldı. Substantia nigra pars compacta’nın sagittal kesitlerdeki koordinatları Şekil 13’de, çevre yapıların daha rahat ayırt edildiği Luksol fast & Krezil viyole boyanmış ve THir immunohistokimyası uygulanmış kesitlerde Resim 12’de gösterilmiştir.



Şekil 13: Median hattın laterale 2,62 mm’de alınan kesitte SNpc ve SNpr koordinatlarını görmektedir (Paxinos ve Watson, 2007), SNCD; Substantia nigra pars compacta.

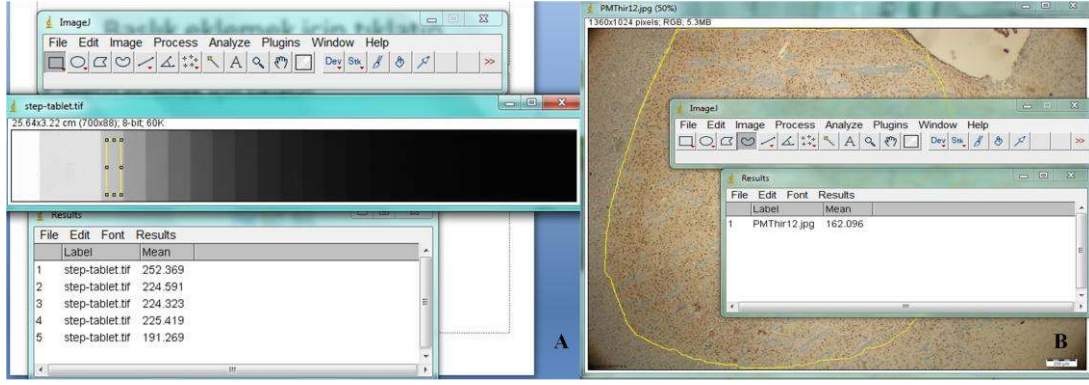


Resim 12: Üst satır Luksol fast & Krezil viyole boyama, alt satır THir immunohistokimyası, cp; serebral pedinkül, mRt; mezensefalik retiküler formasyon, SNpr; substantia nigra pars reticulata, SNpc; substantia nigra pars compacta. Fotoğraflanmış kesitlerde soldan sağa sırası ile büyütme oranı; X4, X10, X20.

Alınan kesitler 5 dakika ksilolde bekletildikten sonra sırasıyla 10’ar dakika azalan alkol serilerinden geçirildi (%100, %95, %80, %70). Azalan alkol serilerinden sonra distile suda 5 dakika bekletilerek rehidrasyonu sağlanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla metanol ile dilüe edilmiş %3’lük hidrojen peroksit içerisinde (Katalog no: AR1108, Boster, Kaliforniya, ABD) 10 dakika bekletildi ve takiben 3 dakika distile su ile

yıkandı. Antijenik yapıların açığa çıkarılması için pH'sı 6 olan, 10mM sodyum sitrat tamponu içerisinde 90°C, 800 W ayarlanmış mikrodalgada 10 dakika bekletildi. Mikrodalgadan alınan kesitler tezgah üzerinde yaklaşık 30 dakika soğumaya bırakıldı ve takiben 3 dakika boyunca distile suda yıkandı. Primer antikor inkubasyonundan önce spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla %5'lik keçi serumu içeren fosfat tamponunda 30 dakika bekletildi. Süre sonunda kesitler üzerine 1:100 oranında dilüe edilmiş primer tirozin hidroksilaz enzim antikor (Ürün kodu: NBP2-42211, Novus Biologicals, Colorado, ABD) damlatılarak 4°C'de 18 saat boyunca inkube edildi. İnkubasyon sonunda fosfat tamponu ile yıkanan kesitler oda sıcaklığında 1 saat sekonder antikor (Ürün kodu: NB7535, Novus Biologicals, Colorado, ABD) ile inkube edildi. İnkubasyon sonunda fosfat tamponu ile yıkanan kesitler peroksidaz ile kaplanarak 20 dakika bekletildi. Tekrar fosfat tamponu ile yıkanan kesitler 3,3-diamino benzinin içeren kromojen substratında (Katalog no: CAS95-91-2, Santa Cruz Biotechnology, Texas, ABD) 30 saniye bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkanan kesitler Mayer's hematoxilen (Katalog no: 05M06002, Bio Optica, Milano, İtalya) ile 30 saniye boyandıktan sonra tekrar distile su ile yıkandı. Sırası ile birer dakika artan alkol serilerinde (%95, %100) dehidre edilerek, beş dakika ksilolde şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelemeye hazır hale getirildi.

Boyanan kesitlerde SNpc'da bulunan immunoreaktif hücreler yoğunluklarına göre: hücre yok; 0, oldukça az yoğunlukta hücre varlığı; 1, az yoğunlukta hücre varlığı; 2, orta yoğunlukta hücre varlığı; 3, bol hücre varlığı; 4, oldukça bol hücre varlığı; 5 olarak histoskorlandı. Her kesit için verilen histoskor değerleri toplanarak ortalaması alındı. Her hayvan için elde edilen ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirilen her 5 kesitte corpus striatum'un sınırları çizilerek Imagej programı (Sürüm tarihi: 2014, ABD) ile bölgenin optik dansitesi ölçüldü. Corpus striatum optik dansite değeri (ODcs) ölçülmeden önce Resim 13'de görülen, Imagej programının resmi internet sayfasında verilen gri skalanın (SteptTablet) her basamağı için toplamda 25 optik dansite değeri ölçüldü ve Imagej programı kalibre edildi. Bir deney hayvanı için her bir kesitte ölçülen corpus striatum optik dansite değerlerinin ortalaması alınarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

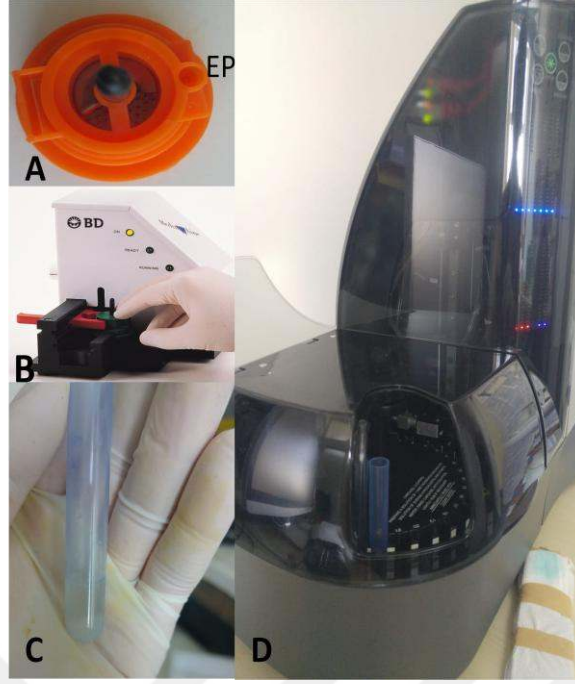


Resim 13: A; Imagej programının gri skala ile kalibrasyonu, B; Corpus striatum'un optik dansite ölçümü.

Corpus striatum'un optik dansite ölçümü SNpc'dan corpus striatum'a projekte olan THir pozitif dopaminerjik liflerin yoğunluğunu değerlendirmek için güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Zhang ve ark, 2012; Normando ve ark, 2016).

3.10. Akım Sitometri ile CD163 Makrofajlarının Analizi

Alınan proksimal kolon örnekleri mukus tabakasının tam olarak temizlenmesi için, 50 ml HBBS içerisine 100 µl 0.5 M ditiyotretol eklenerek hazırlanan çözletinin 20 ml'si içerisinde 200 rpm'de 20 dakika çalkalandılar. Daha sonra mukoza tabakası mekanik olarak sıyrıldı ve doku örnekleri 35µm çapında, tek kullanımlık, steril Medicon (BD Biosciences, Ürün kodu: 340589) içerisine 1 ml steril IsoFlow Sheat (Beckman Coulter, Ürün kodu: 8547008) eklenerek yerleştirildi. Resim 14'de görüldüğü gibi Medicon'lar yaklaşık 100 adet hegzagonal şekilli delik bulunan, paslanmaz çelikten bir levha içerir. Her deliğin çevresinde sert ve yumuşak dokuların verimli şekilde ayrıştırılması için tasarlanmış altı adet mikro bıçak bulunur. Doku örneklerinin koyulduğu Medicon'lar 80 rpm sabit hızda çalışan BD Medimachine (BD Biosciences, Ürün kodu: 340588) cihazına yerleştirildi. Cihaz çalıştırılarak örnekler, kolon dokusu için önerilen 20 dakikalık süre boyunca ayrıştırıldılar. Her iki deney hayvanına ait proksimal kolon örneği bir kerede ayrıştırıldı. Bir deney grubu için dört adet akım sitometri raporu alındı. Dokunun ayrıştırılmasında Medicon içerisinde bulunan mikro bıçakların mekanik etkisinin yanında IsoFlow Sheat içeriğinde yer alan bileşiklerin kimyasal etkisi de bulunmaktadır. İşlem tamamlandıktan sonra ayrıştırılan doku süspansiyonu Medicon üzerinde yer alan enjektör portu vasıtası ile enjektöre çekildi. Süspansiyon 50 µm por genişliğine sahip Filcon (Syntec, Ürün kodu: [05047S/1](#)) filtre kullanılarak süzüldü.



Resim 14: A; Medicon ve içerisindeki metal levhada yer alan hegzagonal, mikro bıçaklı delikler, EP: enjektör portu, B; BD Medimachine cihazında doku ayrıştırılması, C; Doku süspansiyonu, D; Akım sitometri cihazına örneklerin yüklenmesi.

Süzülen süspansiyon içerisinde 1000 µl alınarak 0.5 ml monoklonal CD163 antikoru (Mouse Anti-Rat CD163 Clone ED2, Bio-Rad, Ürün kodu: MCA342R) eklendi. On beş dakikalık karanlık ortam inkubasyonundan sonra eritrositleri parçalama amacıyla 250 µl lizis buffer; OptiLyse C (Beckman Coulter, Ürün kodu: A11895) eklenerek on dakika daha karanlık ortamda inkubasyona devam edildi. İnkubasyon sonunda örnekler 300 g, 1100 rpm hızda santrifüje edildiler. Santrifüj işlemi sonrasında supernatant atıldı, pellete 500 µl Isoflow Sheat eklenerek yeniden süspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hematoloji Laboratuvarı'nda bulunan akım sitometri cihazında (Beckman Coulter, Model: Navious 3L10C, Kaliforniya, ABD) okutuldu ve Kaluza (Beckman Coulter, Kaliforniya, ABD) akım sitometri yazılımı ile analiz edildi.

3.11. Verilerin İstatiksel Analizinde Kullanılan Yöntemler

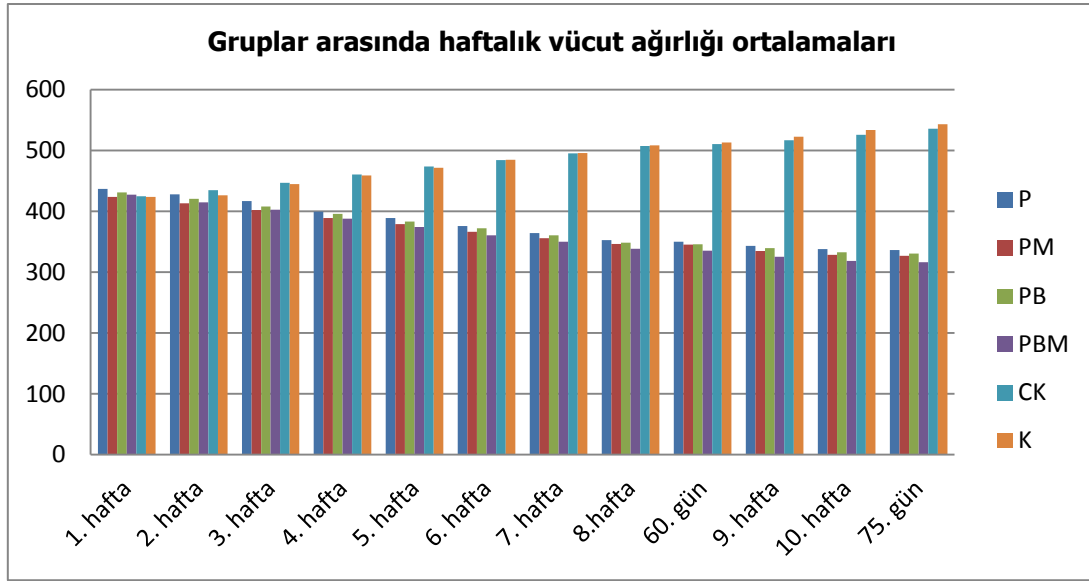
İstatiksel olarak verilerin dağılım paterni Kolmogorov Smirnov normalite testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklar IBM SPSS Statistics Version 22 (Sürüm tarihi: 2014, Chicago, ABD) programı kullanılarak, normal dağılım gösteren parametrik değişkenlerde One Way ANOVA testi ile normal dağılım göstermeyen non-parametrik değişkenlerde; 60. gün silindir testi sol ekstremitte, 60. ve 75. gün askı teli testi, 0. gün MKG,

MKK, Ü, D, 60. gün MKG, MKK, HK, Ü, D, 75. gün MKG, MKK, T, HK, Ü, D, CD163, Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi, Bonferroni düzeltmesi uygulandıktan sonra elde edilen p değeri dikkate alındı. Gruplar arası karşılaştırmalarda $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. One Way ANOVA ile analiz edilen parametrik verilerin varyanslarının homojenitesi Levene testi ile değerlendirildi, gruplar arasındaki farklılık varyansları homojen olan parametrik verilerde ($p > 0,05$) Tukey, varyansları homojen olmayan parametrik verilerde ($p < 0,05$); 0. gün ÇG ve T, 60. gün Ş ve T ile Nhippocampus Tamhane testi ile değerlendirildi. Farklı zamanlarda tekrarlayan ölçümlerden oluşan motor testlerin verilerinin aynı grup içerisindeki değişimi SigmaSTAT 4.0 (Sürüm tarihi: 2016, Kaliforniya, ABD) programı kullanılarak, Tekrarlayan Ölçümlerde ANOVA testi ile analiz edildi. Farklı ölçüm zamanlarında aynı grup içerisindeki farklar değerlendirildi, $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gruplar Arasında Haftalık Vücut Ağırlığı Ortalamaları ve Vücut Ağırlığı Yüzde Değişimleri, Deney süresince Ratlarda Gözlenen Bulgular

Bir deney grubu içerisinde bulunan deney hayvanlarının ağırlıklarının toplanarak ortalamasının alınması ile elde edilen gruplar arasındaki haftalık vücut ağırlığı ortalamalarının deney süresince değişimi Şekil 14’de verilmiştir.



Şekil 14: 75 günlük deney süresince, deney gruplarında her hafta başı ve 75. günde kaydedilen ağırlık ortalamaları.

Deney süresince rotenon alan tüm gruplarda CK ve K grubuna göre anlamlı canlı ağırlık kaybı tespit edildi. Probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM gruplarında canlı ağırlık kaybının P grubu canlı ağırlık kaybı ile farklılık göstermediği bulundu. Rotenon enjeksiyonu uygulanmış olan tüm grupların canlı ağırlık değişimi CK ve K gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu. Canlı ağırlık kazanımı gösteren CK ve K gruplarının vücut ağırlığı yüzde değişimleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Tablo 8’de deney süresince gözlenen vücut ağırlığı yüzde değişimleri minimum ve maksimum değerleri ile ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir.

Tablo 8: Vücut ağırlığı yüzde değişimi değerleri. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

Grup	VAYDu	VAYDb	VAYDd
	Ort±ss (Min, Max)	Ort±ss (Min, Max)	Ort±ss (Min, Max)
P	-27,3±3,02 (-32,4, -23,71) ^{e,f}	-1,97±1,12 (-3,6, -0,53) ^{e,f}	-29,82±3,72 (-35,7, 24,9) ^{e,f}
PM	-26,76±2,77 (-32,34, -23,86) ^{e,f}	-2,35±1,6 (-4,95, -0,29) ^{e,f}	-29,77±4,24 (-38,8, -25,4) ^{e,f}

PB	-28,52±2,1 (-31,54, -24,44) ^{e,f}	-2,72±1,45 (-4,91, -0,74) ^{e,f}	-30,55±3,49 (-35,9, 26,55) ^{e,f}
PBM	-30,55±3,49 (-35,91, -26,5) ^{e,f}	-2,94±1,49 (-5,25, -1,32) ^{e,f}	-34,1±4,55 (-43,1, -30,13) ^{e,f}
CK	16,27±1,82 (13,93, 19,04) ^{a,b,c,d}	5,35±0,97 (3,77, 6,37) ^{a,b,c,d}	20,74±2,31 (17,63, 24,53) ^{a,b,c,d}
K	16,69±1,38 (15,05, 19,19) ^{a,b,c,d}	6,45±1,34 (4,64, 8,67) ^{a,b,c,d}	22,06±2,09 (18,99, 24,52) ^{a,b,c,d}

Enjeksiyon ve gavaj uygulamasının üçüncü haftasında ikisi PM, biri PB grubunda bulunan üç deney hayvanında, takip eden iki hafta içerisinde tamamen iyileşen hematüri gözlemlendi. İlk motor belirti tremor olarak 24. günde P grubunda yer alan bir hayvanda gözlemlendi. Deney süresince hayvanların çoğunlukla hareketsiz kalmayı tercih ettikleri gözlemlendi. Hareket etmeye zorlandıklarında özellikle arka bacaklarını etkin hareket ettirmede zorlandıkları, paralizi andıran bulgular gösterdikleri gözlemlendi. Ratlar özellikle deney periyodunun son yarımında uygulama sırasında oldukça agresif davranışlar sergilediler. Uygulamanın son dönemlerinde özellikle akinezi ve bradikinezinin P grubunda bulunan hayvanlarda oldukça belirgin olduğu, probiyotik takviyesi alan gruplarda motor semptomların daha hafif seyrettiği gözlemlendi.

4.2. Motor Testlerin Bulguları

4.2.1. Açık Alan Testi Bulguları

Açık alan testinde 0. günde ölçülen ÇG, MKG, MKK, Ş, GH, T, HK, Ü, D ve TY parametreleri arasında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Merkez kareye giriş sıklığı, MKK, Ü ve D sayıları farklı ölçüm zamanlarında aynı grup içerisinde değişim gösterirken, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Gruplar arasında 0., 60. ve 75. günde değerlendirilen parametrelerde görülen anlamlı farklılıklar, normal dağılan parametrik grup değişkenlerinin ortalama±standart sapma olarak, normal dağılmayan, parametrik olmayan grup değişkenlerinin median değeri (25.persantil değeri-75.persantil değeri) olarak ifade edildiği Tablo 9, 10, 11, 12, 13 ve 14’de verilmiştir.

Tablo 9’dan görüleceği üzere Parkinson hasta grubunda 60. günde kaydedilen ÇG, GH, ve TY değerleri probiyotik takviyesi alan tüm gruplardan ve kontrol gruplarından anlamlı olarak düşük bulunmuştur, HK ise benzer şekilde PM, PB, PBM ve CK, K gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Şahlanma hareketinin 60. gün değeri ise PM, PB ve PBM

grupları ile anlamlı farklılık göstermezken, 75. gün değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Tablo 9: P grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

P grubu	0. gün	60. gün	75. gün
ÇG	112±12,11 (88-131)**,*	43,87±11,9 (24-58) ^{b,c,d,e,f,*}	34,75±9,06 (20-41) ^{b,c,d,e,f,*}
MKG	2,5 (2-4,75)**,*	0,5 (0-1,75)*	0,87 (0-1,75)*
MKK/saniye	9 (6,25-14,75)**,*	1,5 (0-8,5)*	2 (0-9,25)*
Ş	34±3,38 (27-38)**,*	20±4,83 (14-26) ^{e,f,*}	15±4,4 (10-19) ^{b,c,d,e,f,*}
GH	18,37±4,24 (14-26)**	10,25±3,65 (4-16) ^{b,c,e,f,*}	7,75±3,88 (5-13) ^{b,c,d,e,f}
T/saniye	49,37±23,61 (25-72)**	30,5±18,43 (21-38) ^{b,c,d,e,f,*}	25,2 (18-31,7) ^{b,c,d,e,f}
HK/saniye	18,5 (15-23)**,*	109 (88,25-157,75) ^{b,c,d,e,f,*}	157 (105,5-194) ^{b,c,d,e,f,*}
Ü	2 (1-2,75)**,*	1 (0-1,75)	0,5 (0-1,75)*
D	1,5 (1-2)**,*	0 (0-0)*	0 (0-1)*
TY/santimetre	4318±62,17 (4051-4456)**,*	1678±52,02(1417-1851) ^{b,c,d,e,f,*}	1329±58,75(1176-1445) ^{b,c,d,e,f,*}

Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test sonuçlarına göre; P grubunda 60. gün ÇG, MKG, MKK, Ş, GH, T, D ve TY değerleri 0. gün değerlerine göre anlamlı ölçüde azaldığı, MKG, MKK, GH, Ü, D ve T 60. gün değerleri ile 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmadığı, ancak 75. gün ÇG, Ş ve TY değerlerinin ise 60. gün değerine göre anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ürinyasyon çizgi sayısı ise (Ü) 75. günde 0. gün değerine göre anlamlı olarak azalmıştır. Deney hayvanının video kaydı süresince hareketsiz kaldığı süre (HK) ise 60. günde 0. güne kıyasla, 75. günde 60. güne kıyasla anlamlı ölçüde artış göstermiştir.

Intraperitoneal rotenon enjeksiyonuna ek olarak, günlük 25 mg/kg dozda oral *Saccharomyces boulardii* takviyesi alan PM grubunda 60. gün ÇG, T ve TY parametreleri P grubundan anlamlı olarak yüksek bulunurken, CK ve K grubundan anlamlı olarak düşük

bulunmuştur. Deney grubunda hareketsiz kalınan süre (HK) ise 60. günde CK ve K grubuna göre anlamlı olarak artarken, P grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Merkez kareye giriş, MKK, Ş, GH 60. gün değerleri yalnızca CK ve K grubundan anlamlı olarak farklılık gösterirken, 75. gün Ş ve GH değerlerinin P grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 10: PM grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

PM grubu	0. gün	60. gün	75.gün
ÇG	98,12±15,41 (63-118)**	52,87±21,66 (48-74) ^{a,e,f,*}	49,5±19,73 (41-62) ^{a,e,f}
MKG	2,5 (2-3)** ,***	0 (0-0) ^{e,f,*}	0 (0-0)*
MKK/saniye	9,5 (7,25-10)** ,***	0 (0-0) ^{e,f,*}	0 (0-0) ^{e,f,*}
Ş	27,87±9,86 (17-48)**	21,75±6,13 (18-34) ^{e,f,*}	19,62±6,32 (17-22) ^{a,e,f}
GH	26±8,34 (17-42)**	14±6,89 (8-23) ^{e,f,*}	12,37±4,47 (9-20) ^{a,e,f}
T/saniye	51,62±15,08 (45-63)**	39,87±13,3 (31-45) ^{a,e,f,*}	36 (28,5-43) ^{a,e,f}
HK/saniye	11 (6,5-42)** ,***	77 (46-115,75) ^{a,e,f,*}	82,5 (48-119,5) ^{a,e,f,*}
Ü	1 (1-1,75)	1 (0,25-1)	1 (0,25-2)
D	2,5 (1,25-3)	1,7 (0,5-2,5)	1,5 (0,5-2,2)
TY/santimetre	3.756±52,04 (3681-4064)**	2.014±48,71 (1682-2340) ^{a,e,f,*}	1.958±55,06 (1630-2158) ^{a,e,f}

Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test sonuçlarına göre PM grubundan ÇG, Ş, GH, T, TY değerleri 60. gün ölçümleri 0. gün ölçümlerine göre anlamlı ölçüde azaldığı, belirtilen parametrelerin 60. ve 75. gün değerleri ile arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Deney hayvanının hareketsiz geçirdiği süre (HK) 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmazken, her iki değer de 0. gün HK değeri ile kıyaslandıklarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Merkez kareye giriş ve MKK 60. ve 75. günde başlangıç değerinden düşük bulunmuştur. Ürinyasyon ve D değerlerinde, grup içerisinde her üç ölçüm arasında da anlamlı farklılık saptanmamıştır.

İntraperitoneal rotenon enjeksiyonunun yanında günlük 10^9 kob/gün dozunda *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium*

bifidum, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* ve *Streptococcus thermophilus* 'dan oluşan bakteriyel probiyotik takviyesi alan PB grubunda 60. gün ÇG, GH, T ve TY parametreleri P grubundan anlamlı olarak yüksek CK ve K gruplarından ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Kontrol gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunan 60. gün HK değeri ise P grubunun 60. gün HK değerinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Belirtilen parametrelerin 75. gün değerleri de benzer farklılık göstermektedir. Bunun yanında 60. ve 75. gün MKK süresi CK ve K gruplarından anlamlı olarak düşük bulunurken, 75. gün MKG değerinin yalnızca K grubundan anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 11: PB grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

PB grubu	0. gün	60. gün	75.gün
ÇG	109,25±18,79 (55-112) ** , ***	59,5±20,02 (13-64) a,e,f,*	62,5±16,78 (14-60) a,e,f,*
MKG	2,5 (1,25-3) ** , ***	0,5 (0-1) *	0,5 (0-1) f,*
MKK/saniye	8 (5,5-16) ** , ***	1 (0-3,75) e,f,*	0 (0-3,8) e,f,*
Ş	23,5±3,77 (18-30)	19,78±4,74 (18-26) e,f	17,37±4,43 (15-22) a,e,f
GH	26,25±7,02 (15-36) ** , ***	18,5±4,4 (13-24) a,e,f,*	18,37±4,2 (12-24) a,e,f,*
T/saniye	48,5±14,85 (38-56)	34,25±14,62 (26-47) a,e,f	35 (29,75-43,25) a,e,f
HK/saniye	16 (7,25-42,75) ** , ***	105 (77,25-136,5) a,e,f,*	103,5 (79,5-134) a,e,f,*
Ü	1 (1-1,75)	1 (0,25-1)	0 (0-1,75)

Tablo 11 (devam): PB grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

D	2 (1,25-2)	1,5 (0,25-2)	1,5 (0,25-2,75)
TY/santimetre	4.207±62,11 (3807-4113) ** , ***	2.207±52,4 (1874-2541) a,e,f,*	2.218±38,6 (2091-2314) a,e,f,*

Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test sonuçlarına göre PB grubunun 60. ve 75. gün MKG, MKK, ÇG, GH ve TY değerleri 0. gün değerlerinden anlamlı olarak düşük bulunurken, 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Hareketsiz kalınan süre (HK) 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmazken, her iki değer de 0. güne kıyasla önemli ölçüde artış göstermiştir. Ürinyasyon ve defekasyon parametreleri PB grubunda her üç ölçüm zamanında da anlamlı farklılık göstermemiştir.

İntraperitoneal Rotenone® enjeksiyonuna ek olarak, günlük 25 mg/kg dozda *Saccharomyces boulardii* ve 10^9 kob/gün *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* ve *Streptococcus thermophilus*'dan oluşan bakteriyel probiyotik takviyesi alan PBM grubunda 60. ve 75. gün CÇ, GH, T ve TY değerleri P grubundan anlamlı olarak yüksek CK ve K grubundan ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Şahlanma (Ş) sayısı 60. gün değeri ise yalnızca CK ve K gruplarından anlamlı olarak düşük iken, 75. gün değeri P grubundan da anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 12: PBM grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

PBM grubu	0. gün	60. gün	75.gün
ÇG	118,37±34,58 (72-169)** ,***	56,75±27,01 (12-91) a,e,f,*	61,62±20,68 (46-89) a,e,f,*
MKG	2,5 (2-3) ** ,***	0,5 (0-1,75) *	0,5 (0-1,75) *
MKK/saniye	14,5 (9,75-17,5) ** ,***	1,5 (0-6,25) *	1,5 (0-5,5) *

Tablo 12 (devam): PBM grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Ş	30,25±10,29 (16-48)** ,***	24,2±10,63 (18-37) e,f,*	21,62±8,89 (13-32) a,e,f,*
GH	25,75±5,7 (16-35)** ,***	16,37±5,99 (7-22) a,e,f,*	15,62±5,8 (7-24) a,e,f,*
T/saniye	54,12±11,19 (46-)	38,5±9,14 (28-42) a,e,f,*	36 (27,5-41,25) a,e,f,*

	63)**,**		
HK/saniye	11,5 (10-17,75)**,**	78 (61,75-188) ^{a,e,f,*}	75,5 (63,5-169) ^{a,e,f,*}
Ü	1 (1-1)	1 (0-1)	0 (0-1)
D	0,92 (1-2)	1,5 (0-2,75)	1 (1-2)
TY/santimetre	4.292±57,45 (3901-4522)	2.122±46,4 (2014-2351) ^{a,e,f}	2.028±43,85 (1965-2301) ^{a,e,f}

Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test sonuçlarına göre PBM grubunda 0. gün ÇG, Ş, GH, T, ve HK değerleri 60. ve 75. gün değerleri ile anlamlı farklılık gösterirken, belirtilen parametrelerin 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Benzer şekilde MKG ve MKK 0. gün değerleri 60. ve 75. gün değerlerinden anlamlı olarak yüksek iken 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Tekrarlayan ölçümlerde D ve Ü değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Günlük olarak, intraperitoneal 1:300 oranında dilüe edilmiş etil alkol ve serum fizyolojik uygulanan, gavaj yolu ile distile su verilen CK grubunda 60. ve 75. gün ÇG, Ş, GH, T, TY değerleri P, PM, PB ve PBM grubundan anlamlı olarak yüksek iken, 60. ve 75. gün HK değeri anlamlı olarak düşük bulundu. Bunun yanında 60. gün MKG değeri PM grubundan, 60. ve 75. gün MKK değeri PM ve PB grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu.

Tablo 13: CK grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

CK grubu	0. gün	60. gün	75.gün
ÇG	103,75±25,01 (77-129)	97±24,89 (68-134) ^{a,b,c,d}	98,25±21,19 (74-128) ^{a,b,c,d}

Tablo 13 (devam): CK grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *; 0. gün değeri ile, **; 60. gün değeri ile, ***; 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

MKG	2,5 (1,25-3)	2 (1,25-2,75) ^b	2 (2-2)
MKK/saniye	11 (6,5-15,5)	10 (6,75-13,25) ^{b,c}	9,5 (6,75-11,75) ^{b,c}
Ş	30,37±3,99 (25-36)	31,62±7,06 (23-45) ^{a,b,c,d}	32,37±7,61 (24-48) ^{a,b,c,d}

GH	26,37±5,92 (16-34)	28±6,32 (17-36) ^{a,b,c,d}	28,12±6,15 (19-37) ^{a,b,c,d}
T/saniye	49,2±9,26 (38-61)	53,87±12,18 (45-61) ^{a,b,c,d}	48 (42,25-53) ^{a,b,c,d}
HK/saniye	13 (9-15,5)	12 (10-17,25) ^{a,b,c,d}	13 (10,5-15,75) ^{a,b,c,d}
Ü	1 (0,25-1,75)	1 (1-1)	1 (0,25-1,75)
D	2 (0,25-3)	2 (0,25-2)	2 (1-2,75)
TY/santimetre	4118±42,19 (4021-4364)	3844±47,72 (3627-4254) ^{a,b,c,d}	4212±44,63 (3834-4381) ^{a,b,c,d}

Deney süresince hiçbir uygulama yapılamayan K grubunun diğer gruplarla arasında saptanan farklar Tablo 14'ten de görülebileceği üzere CK grubu ile oldukça yakındır.

Tablo 14: K grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *, 0. gün değeri ile, **, 60. gün değeri ile, ***, 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

K grubu	0. gün	60. gün	75. gün
ÇG	101,5±13,84 (83-123)	108,5±13,8 (83-128) ^{a,b,c,d}	102,37±15,99 (82-130) ^{a,b,c,d}
MKG	2 (1,25-3,75)	2 (1,25-2) ^b	2 (2-3) ^c
MKK/saniye	9,5 (4,75-15,75)	8,5 (6,5-14,75) ^{b,c}	9 (8-14,25) ^{b,c}
Ş	32,5±4,37 (23-35)	30,8±2,2 (28-33) ^{a,b,c,d}	31,12±5,35 (26-41) ^{a,b,c,d}
GH	27,12±4,76 (21-35)	29±3,7 (25-36) ^{a,b,c,d}	29,5±4,03 (24-35) ^{a,b,c,d}
T/saniye	51,37±12,36 (43-67)	54,62±10,94 (49-74) ^{a,b,c,d}	50,5 (39,25-65,5) ^{a,b,c,d}
HK/saniye	13,5 (9,5-17,5)	14 (12,5-17,75) ^{a,b,c,d}	15,5 (11,25-16) ^{a,b,c,d}

Tablo 14 (devam): K grubunda açık alan testi bulguları. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$. *, 0. gün değeri ile, **, 60. gün değeri ile, ***, 75. gün değeri ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Ü	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (0,25-1,75)
D	1 (0,25-1)	1,5 (0,25-2,75)	2 (0,25-2)
TY/santimetre	3.916±51,2 (3697-4012)	4.295±43,01 (4012-4381)	4.020±48,34 (3897-4381)

Açık alan testinde değerlendirilen parametrelerin hiç birinde CK ve K grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Benzer şekilde her iki grup için değerlendirilen parametrelerin hiç birinin, tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test sonuçlarına göre 0., 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

4.2.2. Silindir Testi Bulguları

Deney sürecinin başlamasından önce ölçülen, deney hayvanlarının (0. gün) sağ (Sil0a) ve sol (Sil0s) ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayılarında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Deney gruplarında 0. günde sağ ve sol ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayıları Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15: Deney hayvanlarının 0. günde sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları, Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer.

Grup	Sil0a	Sil0s
	Ort $\pm$ ss (Min-Max)	Ort $\pm$ ss (Min-Max)
P	14,87 $\pm$ 3,64 (7-19)	14,37 $\pm$ 3,58 (9-20)
PM	11,62 $\pm$ 4,17 (7-20)	12 $\pm$ 4,53 (7-21)
PB	12,62 $\pm$ 4,56 (7-20)	13,62 $\pm$ 5,65 (8-25)
PBM	10 $\pm$ 3,5 (5-15)	10,5 $\pm$ 3,38 (6-15)
CK	14,12 $\pm$ 5,66 (7-24)	12,87 $\pm$ 3,56 (8-18)
K	10,12 $\pm$ 2,1 (7-14)	8,75 $\pm$ 3,24 (4-15)

Enjeksiyon ve gavaj uygulamasının bitiminde (60. gün) yapılan silindir testinde CK ve K grubu arasında anlamlı farklılık bulunmaz iken bu iki grupta diğer tüm gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi. Tablo 16’da gösterildiği üzere probiyotik uygulanan PM, PB ve PBM gruplarında temas sayıları daha yüksek olmasına rağmen P grubu ile aralarında anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 16: Deney hayvanlarının 60. günde sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c; PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Grup	Sil60a	Sil60s
	Ort±ss (Min-Max)	Ort±ss (Min-Max)
P	5,75±2,25 (2-9) ^{e,f}	4,87±1,24 (3-7) ^{e,f}
PM	5,87±2,7 (3-10) ^{e,f}	6,21±1,56 (4-13) ^{e,f}
PB	6,75±3,45 (3-14) ^{e,f}	6,14±2,13 (4-12) ^{e,f}
PBM	6,25±2,54 (3-10) ^{e,f}	6,28±2,34 (3-12) ^{e,f}
CK	11,5±3,54 (7-18) ^{a,b,c,d}	11,45±2,9 (8-18) ^{a,b,c,d}
K	10,37±2,06 (8-14) ^{a,b,c,d}	10,2±3,01 (7-15) ^{a,b,c,d}

Tablo 17’de görüleceği üzere on beş günlük bekleme süresinin ardından tekrarlanan silindir testinde CK ve K gruplarına göre P, PM, PB ve PBM gruplarında bulunan deney hayvanlarının ön ekstremitelerini silindir duvarına temas sayılarının anlamlı ölçüde azaldığı, bu azalmanın P grubunda PM, PB ve PBM grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edildi.

Tablo 17: Deney hayvanlarının 75. günde sağ ve sol ön ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c; PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Grup	Sil75a	Sil75s
	Ort±ss (Min-Max)	Ort±ss (Min-Max)
P	4,75±2,43 (2-8) ^{b,c,d,e,f}	4,12±1,18 (3-6) ^{b,c,d,e,f}
PM	6±2 (3-10) ^{a,e,f}	5,87±1,64 (4-10) ^{a,e,f}
PB	6,12±2,53 (3-11) ^{a,e,f}	6,12±2,79 (3-11) ^{a,e,f}
PBM	6,62±2,55 (3-11) ^{a,e,f}	6,12±2,79 (3-11) ^{a,e,f}
CK	12,25±4,5 (8-21) ^{a,b,c,d}	11,37±2,82 (7-16) ^{a,b,c,d}
K	10±2,44 (8-15) ^{a,b,c,d}	9,87±3,48 (5-16) ^{a,b,c,d}

Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA analiz sonuçlarına göre P, PM, PB ve PBM gruplarının her birinin 0. gün değerlerine göre 60. günde kaydedilen sağ ve sol ön ekstremitelerini silindir duvarına temas sayılarının anlamlı ölçüde azaldığı CK ve K grubunda ise 0., 60., 75. gün ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Parkinson hasta grubunun 75. günde kaydedilen Sil75a ve Sil75s değerleri de Sil0a, Sil0s, Sil60a, Sil60s değerlerine göre anlamlı ölçüde düşük bulunurken, probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM gruplarında 60. gün değerleri ile 75. gün değerleri arasında fark bulunmadı.

4.2.3. Askı Teli Testi Bulguları

Tablo 18’de saniye cinsinden ortalama değerleri verilmiş olan 0. gün askı teli testi sonuçlarında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Normal dağılım göstermeyen, Tablo 18’de median ve 25.-75. persantil değerleri verilmiş olan 60. ve 75. günde tekrarlanan askı teli testlerinde probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM grupları ile CK ve K grupları arasında anlamlı farklılık bulunmaz iken P grubu ile aralarında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 18: 0., 60. ve 75. günde saniye cinsinden kaydedilen deney hayvanlarının askı telini tutma süreleri. Ort; ortalama, ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

	0. gün	60. gün	75. gün
	Ort $\pm$ ss (Min-Max)	Median(25.-75.persantil)	Median(25.-75.persantil)
P	12,5 $\pm$ 3,4 (7-18)	6,5 (5,5-8) ^{b,c,d,e,f}	5,5 (4,25-7,25) ^{b,c,d,e,f}
PM	10,25 $\pm$ 4,26 (6-18)	8,5 (7-10) ^a	8,5 (6,5-9,75) ^a
PB	11,12 $\pm$ 2,94 (8-16)	9 (8-10) ^a	9,5 (8,25-11) ^a
PBM	11,12 $\pm$ 2,69 (7-16)	9 (7,25-9) ^a	8,5 (8-9,75) ^a
CK	10,37 $\pm$ 1,84 (8-13)	10 (9-12,5) ^a	10,5 (9,25-12,75) ^a
K	10,37 $\pm$ 3,62 (7-18)	10,5 (9-11) ^a	10 (9-12) ^a

Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test sonuçlarına göre gruplar içerisinde yalnızca P grubunun 0. gün askı teli testi değerlerinin 60. ve 75. gün değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı, 60. ve 75. gün değerleri arasında ise anlamlı farklılık bulunmadığı saptandı. Diğer grupların; PM, PB, PBM, CK ve K, çalışmanın 0., 60. ve 75. günde kaydedilen askı teli testi değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

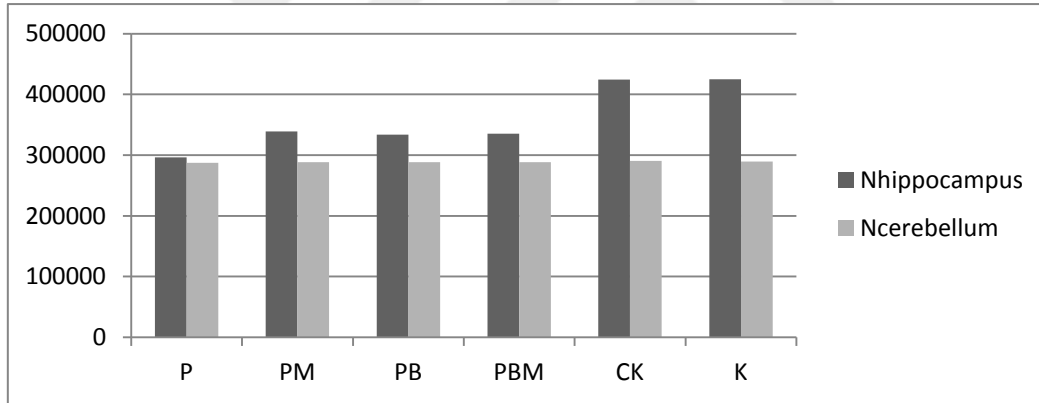
4.3. Hippokampal Piramidal Nöronlar ve Serebellar Purkinje Hücrelerinin Optik Parçalama Yöntemi ile Gerçekleştirilmiş Stereolojik Sayım Bulguları

Optik parçalama yöntemi ile tanecik sayımı sonucu elde edilen toplam hippokampal piramidal nöron sayısı (Nhippocampus) P grubunda diğer tüm gruplardan anlamlı olarak düşük bulunurken, PM, PB ve PBM gruplarında Şekil 15’de gösterildiği gibi CK ve K gruplarından anlamlı olarak düşük, P grubundan ise anlamlı olarak yüksek bulundu.

Tablo 19: Deney gruplarında toplam hippocampal piramidal nöron sayılarının ortalamaları. ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c; PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

	Nhippocampus ortalama $\pm$ ss (Min-Max)
P	296442,25 $\pm$ 13622,5 (270861-315195) ^{b,c,d,e,f}
PM	339037 $\pm$ 22391,53 (312940-375450) ^{a,e,f}
PB	333654,62 $\pm$ 17506,24 (311098-358912) ^{a,e,f}
PBM	335270,75 $\pm$ 22988,79 (312128-377280) ^{a,e,f}
CK	424593,5 $\pm$ 10631,9 (410172-441056) ^{a,b,c,d}
K	425067,5 $\pm$ 11467,8 (408038-440166) ^{a,b,c,d}

Tablo 19’da deney gruplarının ortalama hippocampal piramidal nöron sayısı ve grup içerisinde bulunan minimum ve maksimum değerleri, Şekil 15’de grupların Nhippocampus ve Ncerebellum ortalama değerleri verilmiştir.



Şekil 15: Deney gruplarında Nhippocampus ve Ncerebellum.

Gruplar arasında Şekil 15’de gösterildiği gibi toplam serebellar Purkinje hücre sayısı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Tablo 20’de deney gruplarının ortalama serebellar Purkinje hücre sayısı ve grup içerisinde bulunan minimum ve maksimum değerleri verilmiştir.

Tablo 20: Deney gruplarında toplam serebellar Purkinje hücre sayılarının ortalamaları. ss; standart sapma, Min; grup içerisindeki en küçük değer, Max; grup içerisindeki en büyük değer.

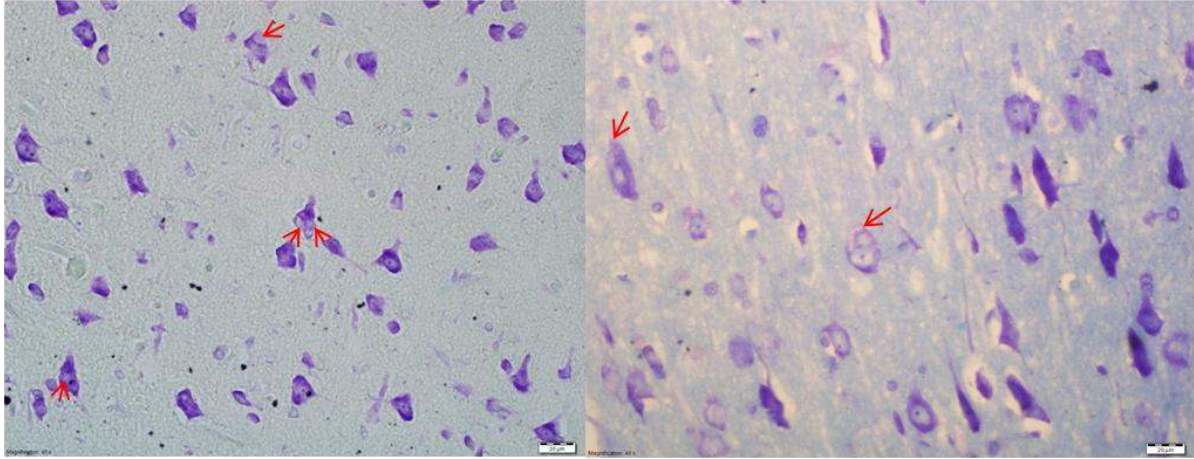
	Ncerebellum ortalama $\pm$ ss (Min-Max)
P	287218,75 $\pm$ 4806,94 (281232-294768)

PM	288603±3759,81 (283392-293328)
PB	288614±5053,91 (282240-298080)
PBM	288603±3759,81 (283392-293328)
CK	290413,87±4003,24 (283133-295085)
K	289467,25±4326,18 (281952-294402)

Çalışmamızda nöron sayımı yapılan her bir örnek için ayrı ayrı hesaplanan hata katsayısı değerlerinin tümü %10 altında hesaplanmıştır. Bu bulgu elde ettiğimiz Nhippocampus ve Ncerebellum değerlerimizin güvenilirliğini göstermektedir.

4.4. Luksol fast & Krezil Viyole Asetat ve Bielschowsky Boyanmış Beyin Kesitlerinde Saptanan Histopatolojik Bulgular

Luksol fast & krezil viyole asetat boyanmış kesitlerde P grubunda corpus striatum'da gliosis ile kistik boşluklar, mesencephalon'da perinöronal vakuolizasyon ve nöronal dejenerasyon şiddeti, hippokampal CA1, CA2-3 ve CA4 bölgelerinde görülen nöronal dejenerasyon şiddeti probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. Corpus striatum'da gliosis ile kistik boşluklar Resim 16'da, mesencephalon'da perinöronal vakuolizasyon ve nöronal dejenerasyon şiddeti Resim 17 ve 18'de, hippokampal CA1, CA2-CA3, CA4 dejenerasyon şiddeti Resim 19, 20, 21 ve 22'de gösterilmiştir. Kontrol ve CK grubunun kesitlerinde ise normal histolojik yapı ve konfigürasyon gözlemlendi, patolojik değişiklikler saptanmadı. Değerlendirilen parametrelere verilen histoskor değerleri Tablo 21'de verilmiştir. Bunun yanında incelenen kesitlerde P grubunda yer alan 3 hayvanda Resim 15'de görüldüğü gibi prefrontal korteks piramidal nöronlarında da Lewy cisimciklerine rastlandı. Lewy cisimciklerinin kaudo-rostral yayılımının Parkinson hastalığının şiddeti ile ilişkili olduğunu belirtmiştik.



Resim 15: P grubunda prefrontal korteks piramidal nöronlarında muhtemel α -sinüklein agregatları oklarla gösterilmiştir, Magnifikasyon; X40.

Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsk boyanmış kesitlerde gerçekleştirdiğimiz histokimyasal parametrelere verdiğimiz histoskor değerlerinin ortalamaları ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar Tablo 21’de verilmiştir.

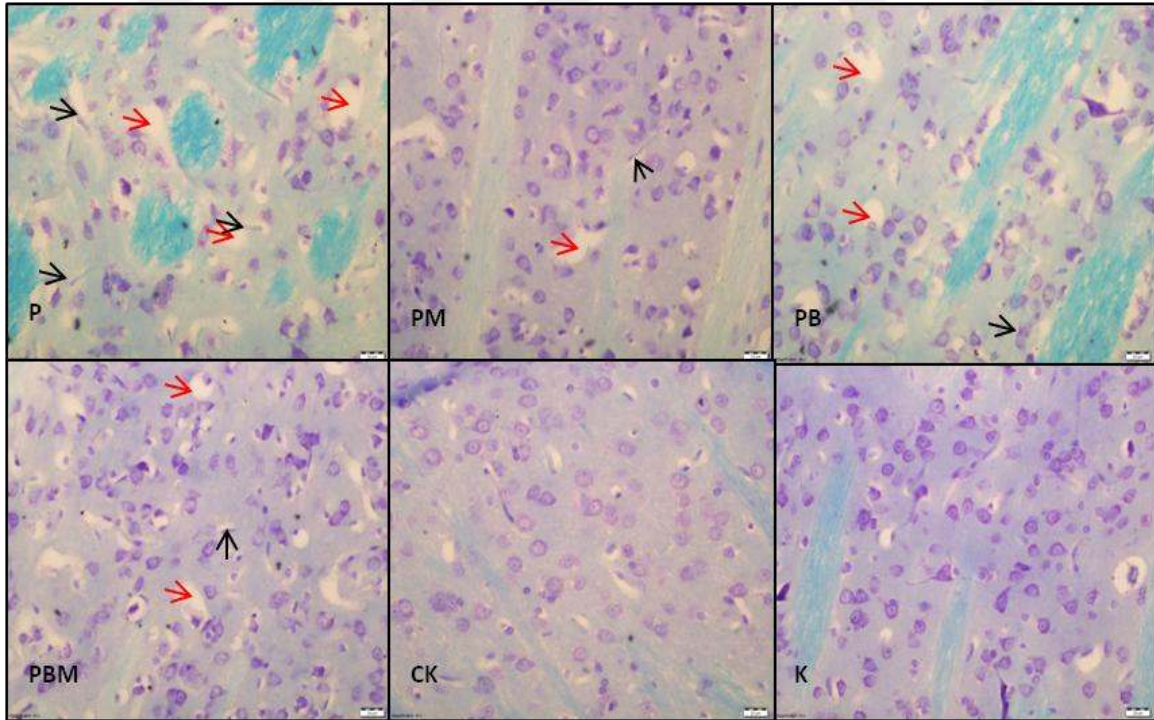
Tablo 21: Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky boyanmış kesitlerde değerlendirilen parametreler. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

Histokimyasal parametreler	P	PM	PB	PBM	CK	K
CSg	$3,42 \pm 0,11^{b,c,d,e,f}$	$2,11 \pm 0,05^{a,e,f}$	$2,22 \pm 0,15^a$,e,f	$2,56 \pm 0,08$ a,e,f	$0,15 \pm 0,08$ a,b,c,d	$0,11 \pm 0,09$ a,b,c,d
CSb	$3,07 \pm 0,17^{b,c,d,e,f}$	$1,85 \pm 0,11^{a,e,f}$	$2,1 \pm 0,88$ a,e,f	$2,11 \pm 0,05$ a,e,f	$0,78 \pm 0,17$ a,b,c,d	$0,43 \pm 0,17$ a,b,c,d
Mv	$3,37 \pm 0,94^{b,c,d,e,f}$	$2,43 \pm 0,14^{a,e,f}$	$2,36 \pm 0,13$ a,e,f	$2,5 \pm 0,88$ a,e,f	$0,63 \pm 0,11$ a,b,c,d	$0,5 \pm 0,88$ a,b,c,d
Mnd	$3,55 \pm 0,12^{b,c,d,e,f}$	$2,82 \pm 0,1^{a,e,f}$	$2,85 \pm 0,11$ a,e,f	$2,76 \pm 0,09$ a,e,f	$0,3 \pm 0,08$ a,b,c,d	$0,3 \pm 0,09$ a,b,c,d
CA1nd	$2,06 \pm 0,15^{b,e,f}$	$1,81 \pm 0,13^{a,e,f}$	$1,85 \pm 0,52^e$,f	$1,88 \pm 0,78$ e,f	$0,05 \pm 0,08$ a,b,c,d	$0,02 \pm 0,09$ a,b,c,d
CA2-3nd	$3,13 \pm 0,1^{b,c,d,e,f}$	$2,3 \pm 0,05^{a,e,f}$	$2,35 \pm 0,12$ $2,85 \pm 0,11$ a,e,f	$2,42 \pm 0,12$ $85 \pm 0,11$ a,e,f	$0,08 \pm 0,04$ a,b,c,d	$0,07 \pm 0,04$ a,b,c,d

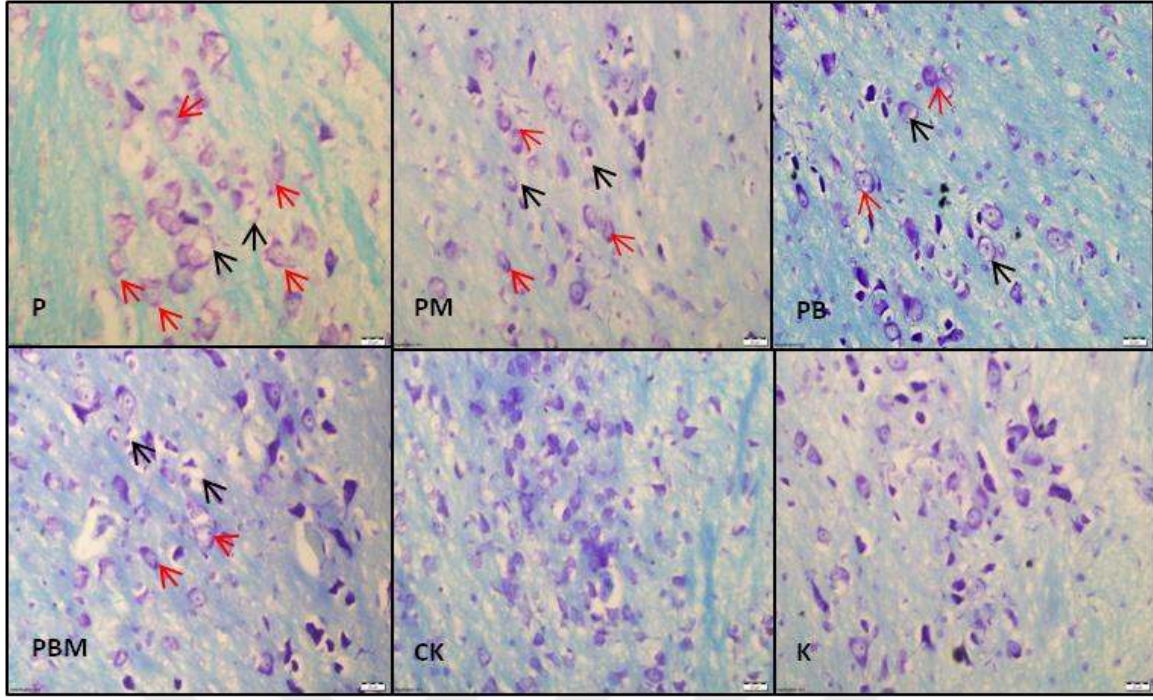
Tablo 21 (devam): Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky boyanmış kesitlerde değerlendirilen parametreler. a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

CA4nd	$3,09\pm0,2^{e,f}$	$2,41\pm0,11^{e,f}$	$2,56\pm0,2^{e,f}$	$2,65\pm0,21^{e,f}$	$0,04\pm0,01^{a,b,c,d}$	$0,06\pm0,02^{a,b,c,d}$
CSf	$0,63\pm0,11^{b,c,d,e,f}$	$1,88\pm0,13^{a,e,f}$	$1,88\pm0,12^{a,e,f}$	$1,76\pm0,09^{a,e,f}$	$3,35\pm0,11^{a,b,c,d}$	$3,27\pm0,12^{a,b,c,d}$
MOy	$1,76\pm0,12^{b,c,d,e,f}$	$2,42\pm0,12^{a,e,f}$	$2,31\pm0,12^{a,e,f}$	$2,18\pm0,14^{a,e,f}$	$3,36\pm0,14^{a,b,c,d}$	$3,31\pm0,12^{a,b,c,d}$

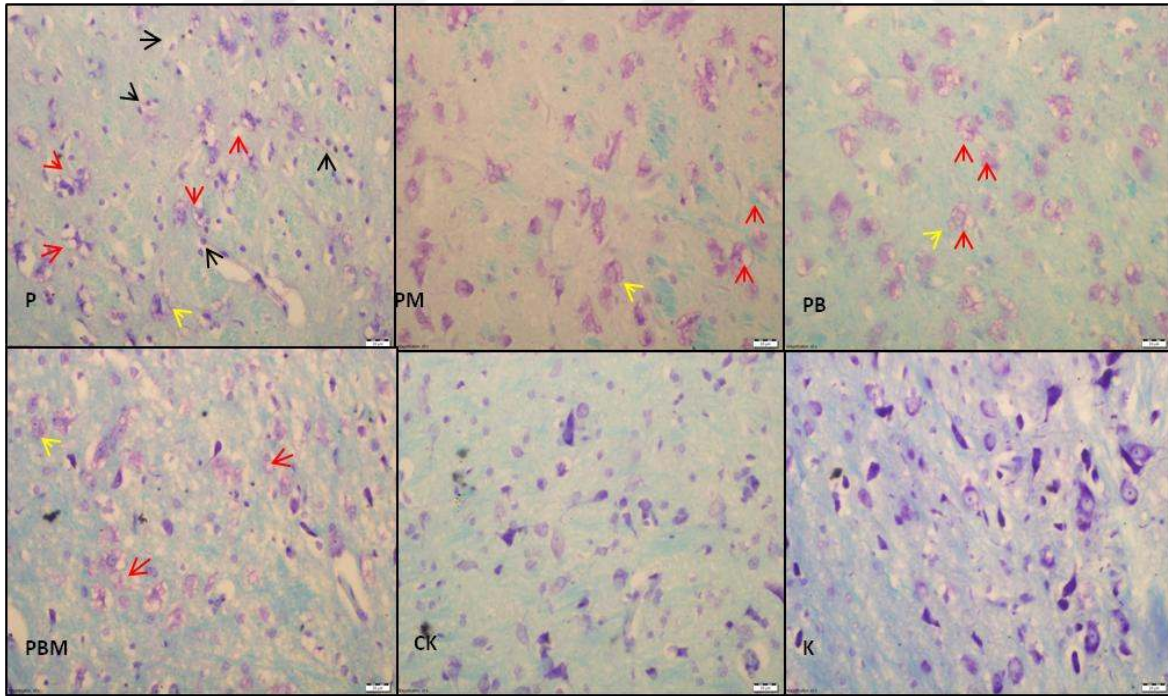
Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky boyanmış kesitlerde P grubunda CSg, CSb, Mv, Mnd, Csf, CA2-3nd ve MOy değerleri PM, PB, PBM, CK ve K gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu. Parkinson hasta grubumuzda CA1nd yalnızca PM, CK ve K gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunurken, CA4nd histoskor değerleri CK ve K gruplarında diğer gruplardan anlamlı olarak düşük bulundu, P, PM, PB ve PBM grupları arasında ise anlamlı farklılık tespit edilmedi.



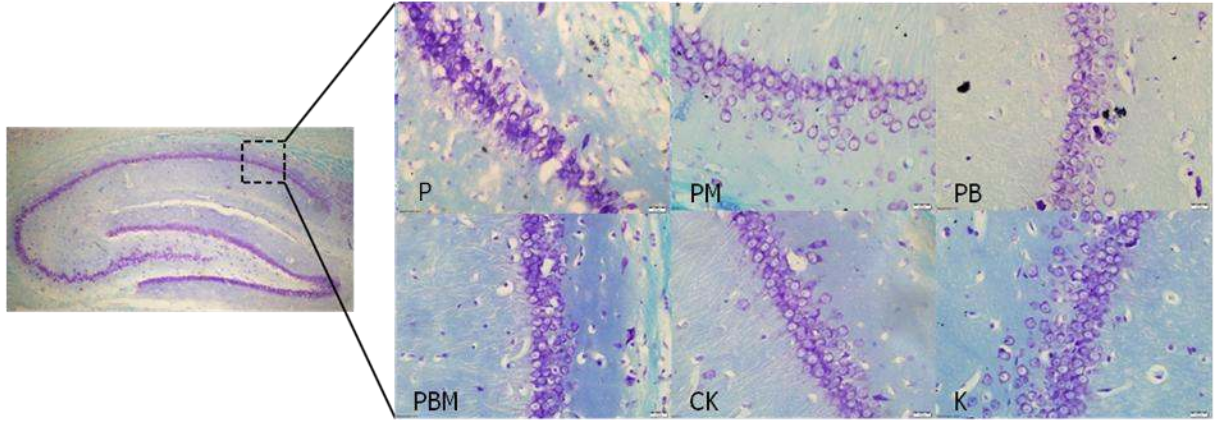
Resim 16: Corpus striatum'da kistik boşluklar kırmızı, glia hücreleri siyah oklarla gösterilmiştir. Magnifikasyon; X40.



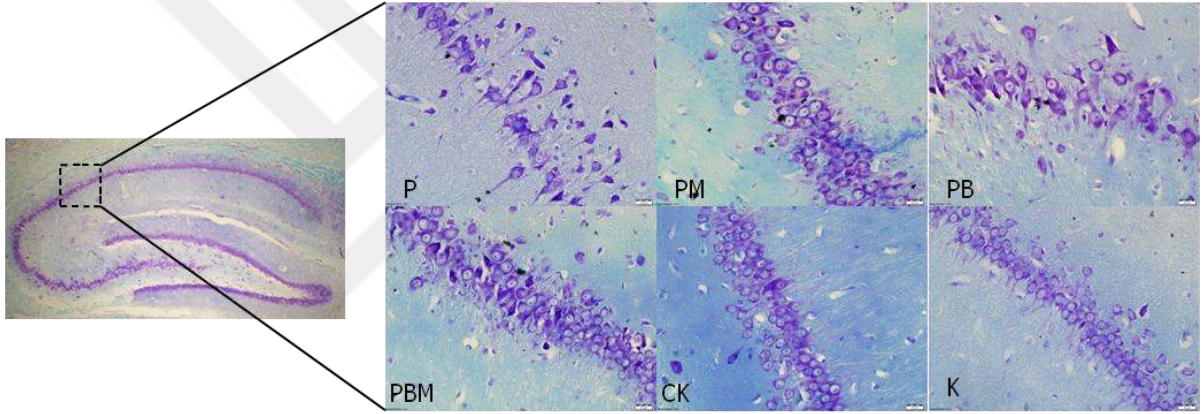
Resim 17: SNpc dejenere nöronlar (kırmızı oklar) ve perinöronal vakuolizasyon (siyah oklar), Magnifikasyon; X40.



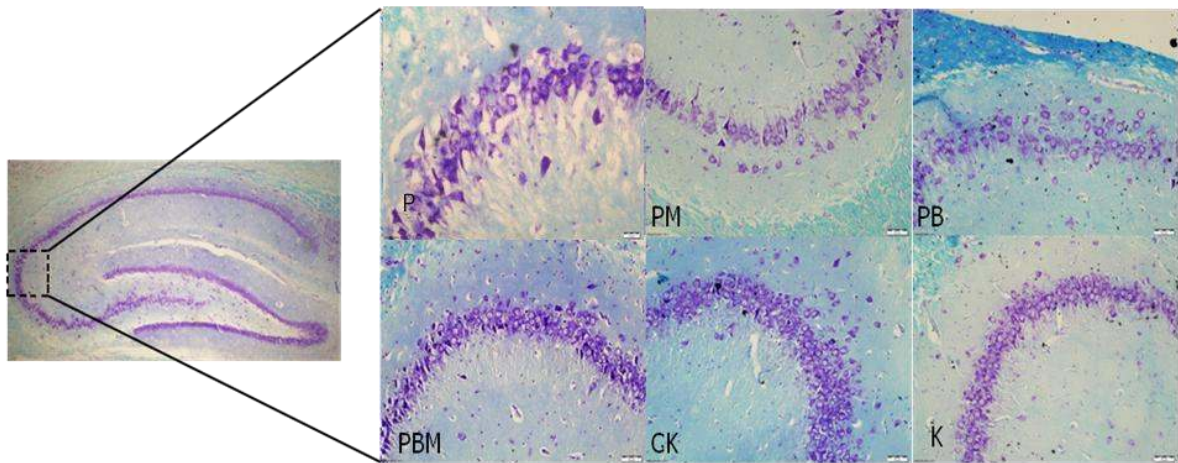
Resim 18: Mesencephalon'da dejenere nöronlar ve perinöronal vakuolizasyon (kırmızı oklar), dejenere nöronlar etrafında mikrogliya hücreleri P grubunda oldukça yoğun olarak görülüyor (siyah oklar), muhtemel α -sinüklein agregatları (sarı oklar).



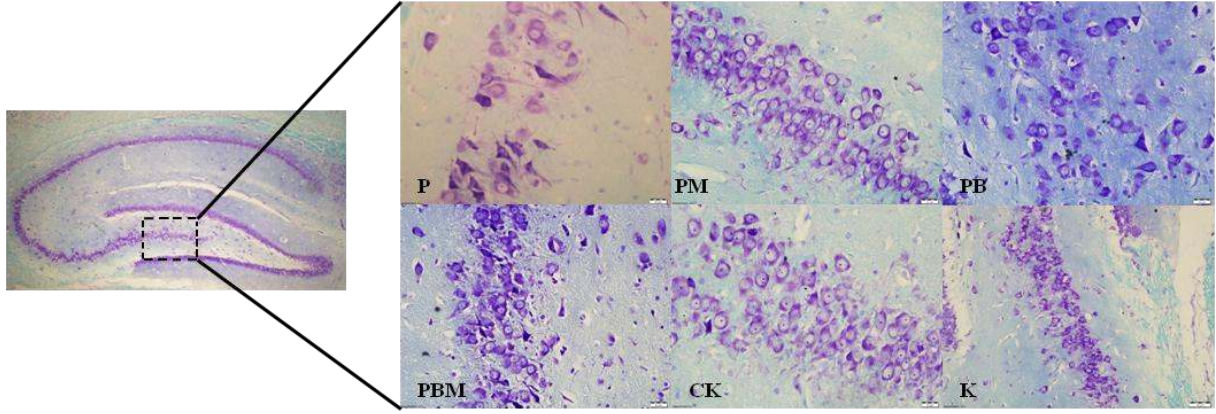
Resim 19: Hippocampus CA1, Magnifikasyon; X40.



Resim 20: Hippocampus CA2-CA3, Magnifikasyon; X40.

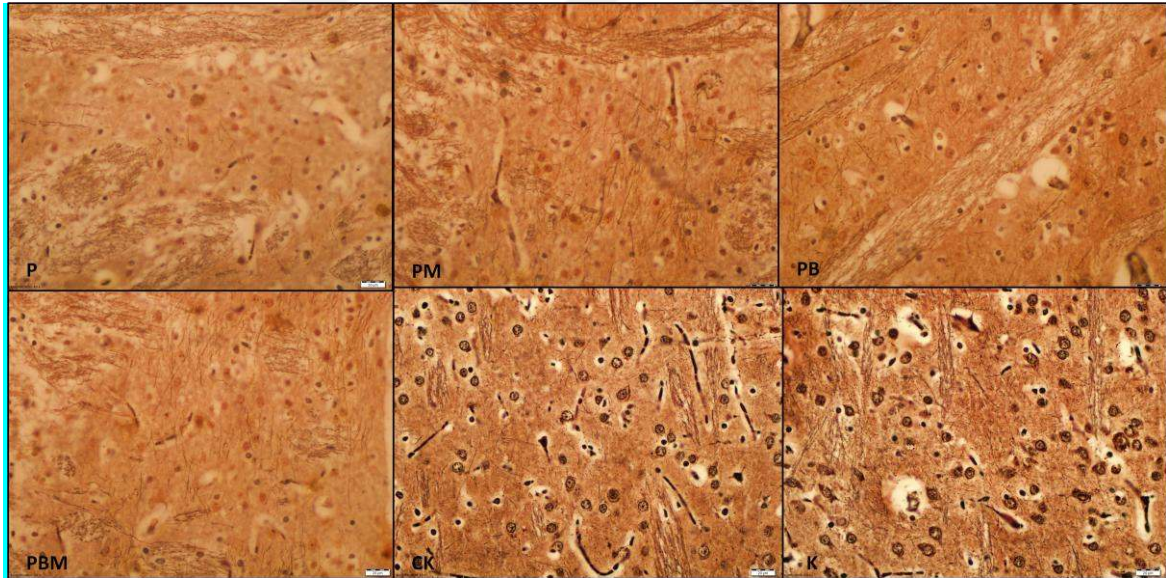


Resim 21: Hippocampus CA2-CA3, Magnifikasyon; X40.



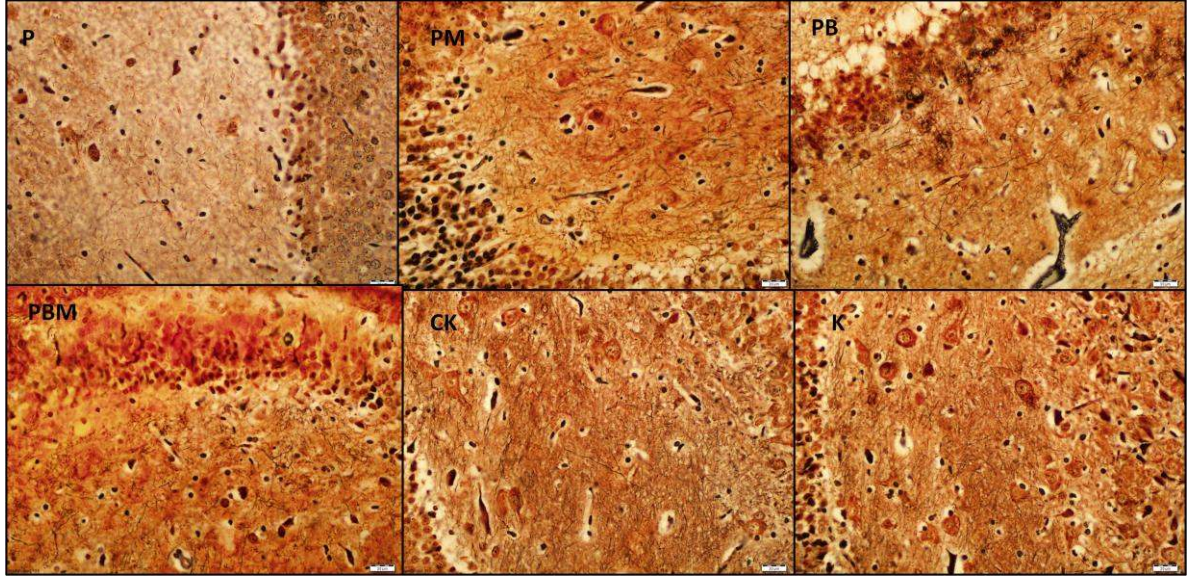
Resim 22: Hippocampus CA4, Magnifikasyon; X40.

Bielschowsky boyanmış kesitlerde P grubunda, Tablo 21’de histoskor değerleri verilmiş olan corpus striatum’da sonlanan fibrillerin yoğunluğu (CSf), gyrus dentatus hilum’u ile hippokampal CA3-4 arasında kalan bölgede Mossy liflerinin yoğunluğu (MOy) PM, PB ve PBM grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



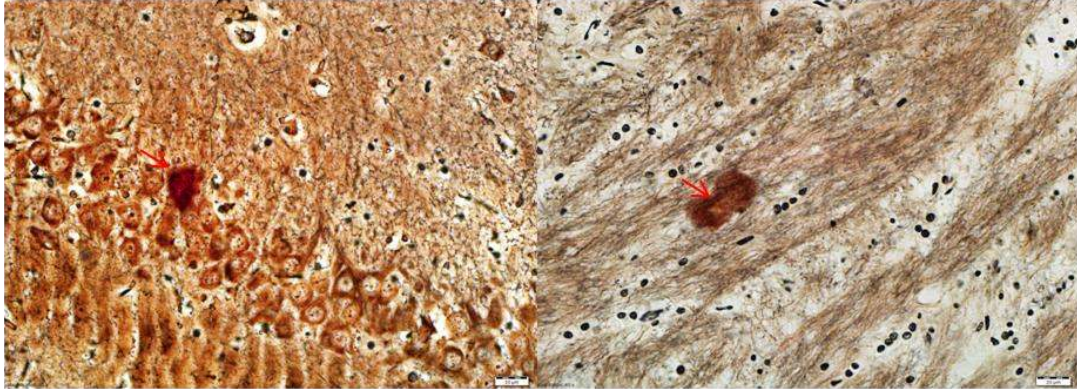
Resim 23: Corpus striatum’da fibril yoğunluğu, Magnifikasyon; X40.

Probiyotik takviyesi alan gruplarda ise Resim 23 ve 24’de görüldüğü gibi CSf ve MOy, CK ve K grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.



Resim 24: Mossy liflerinin yoğunluğu, Bielschowsky boyama, Magnifikasyon; X40.

Bu bulgulara ek olarak, Resim 25’de görüldüğü gibi P grubunda yar alan iki kesitte corpus callosum’dan inen lifler arasında ve hippocampus’ta Alzheimer hastalığında görülen ekstrasellüler agregatlara benzer inklüzyonlar görüldü.

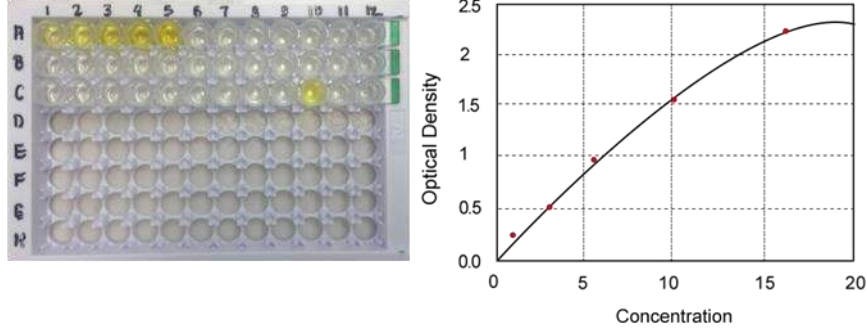


Resim 25: P grubunda, kırmızı okların ucunda hippocampus’ta ve corpus callosum’dan inen aksonal lifler arasında ekstrasellüler agregat, Bielschowsky boyama, Magnifikasyon; X40.

4.5. Corpus Striatum’dan ELISA Yöntemi ile Dopamin Tayini Bulguları

Corpus striatum’da dopamin miktarını belirlemeye yönelik iki kez gerçekleştirdiğimiz ELISA analizinde Resim 26’da görüldüğü üzere örneklerimizden sonuç alamadık. Kullandığımız kitin standart solusyonları Resim 26’da görüleceği üzere, istenilen şekilde çalışıyor olmasına rağmen, corpus striatum örneklerinde dopamin belirleyememe nedeni

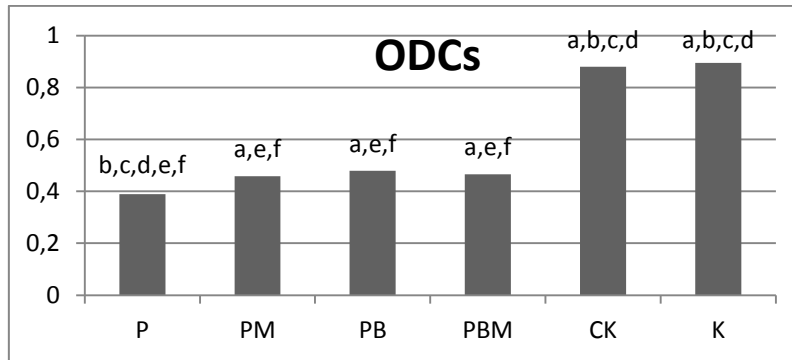
olarak kitin kullanım klavuzunda kit reaktiflerinin kontamine olmuş olması, örneklerin uygun hazırlanmaması, yeterli antikor eklenmemesi, yıkama çözeltisinin sodyum azid içermesi ve HRP'nin eklenmemesi nedenleri belirtilmektedir.



Resim 26: ELISA 2. denemeye ait plate fotoğrafı, Standart solusyonların okutulması ile elde edilen eğri.

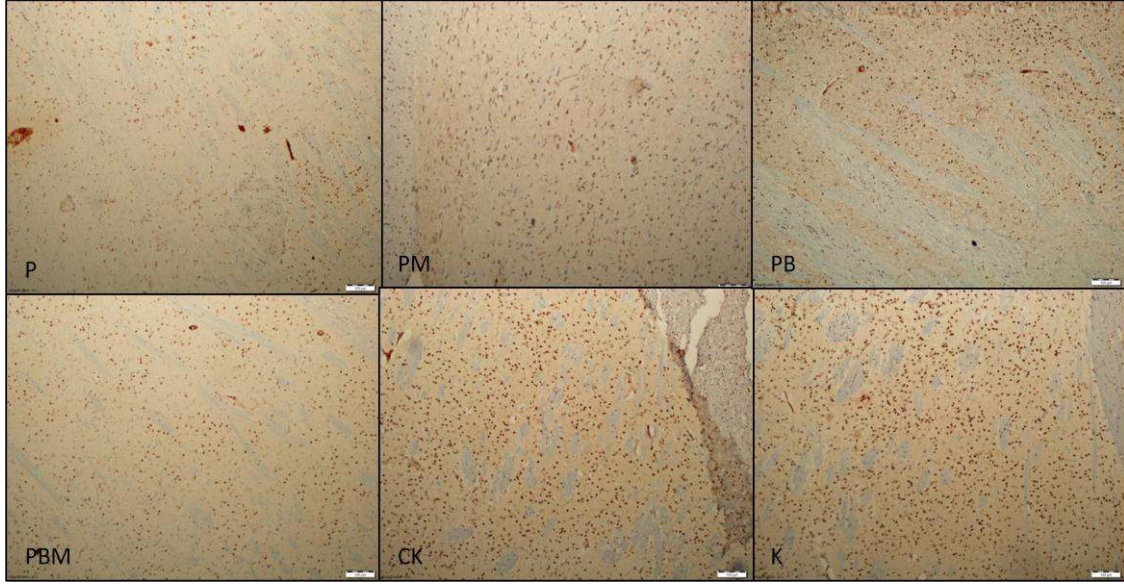
4.6. Tirozin Hidroksilaz İmmunohistokimya Bulguları

Tirozin hidroksilaz enzim immunohistokimyası gerçekleştirmiş 2,5 mm - 2,62 mm aralığından alınan, rastgele seçilmiş beş kesitte Şekil 16'da görüldüğü gibi ODCs ölçüm değerlerinin CK ve K gruplarında P, PB, PM ve PBM gruplarından anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulundu. Parkinson hasta grubunda corpus ODCs ise probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM gruplarından anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p<0,05$).



Şekil 16: Gruplar arasında ODCs verilerinin ortalama değerleri. a; P grubu, b; PM grubu, c; PB grubu, d; PBM grubu, e; CK grubu, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Resim 27'de deney gruplarında corpus striatum'da Thir immunoreaktivitesi görülmektedir.

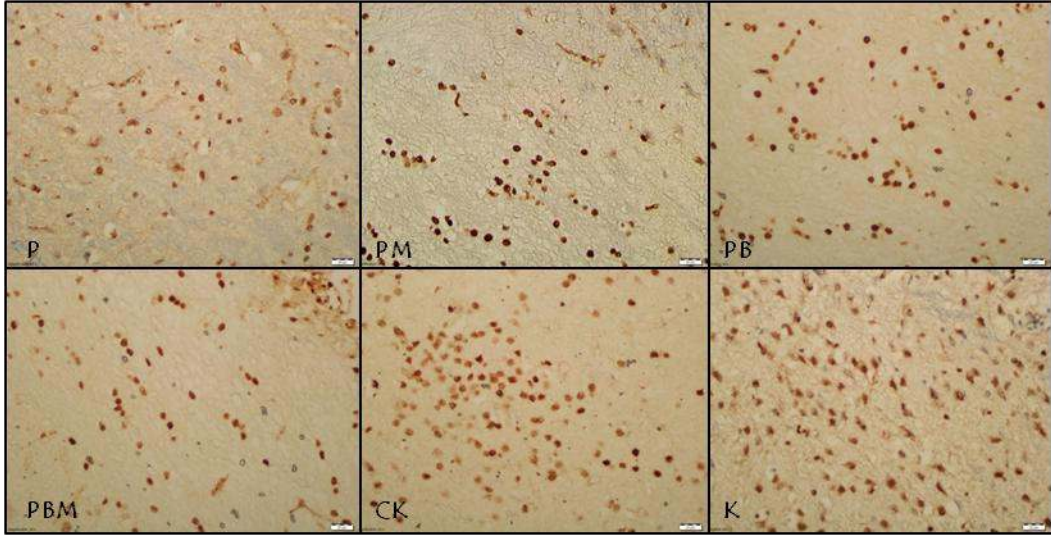


Resim 27: Deney gruplarında corpus striatum. Thir immunohistokimyası, Magnifikasyon X10.

Corpus striatum optik dansite verilerine benzer şekilde SNpc’da bulunan dopaminerjik nöron yoğunluğu da CK ve K gruplarında P, PM, PB ve PBM gruplarına göre anlamlı derecede fazla iken, P grubunda tüm gruplardan anlamlı olarak düşük bulundu. Resim 28’de her grup için fotoğraflanmış SNpc ve Tablo 22’de SNpc hücre yoğunluğu için verilmiş histoskor değerlerinin istatistiksel analiz bulguları verilmiştir.

Tablo 22: SNpc THir pozitif hücre (Thir+) yoğunluğu histoskor değerleri, a; P grubu ile karşılaştırıldığında, b; PM grubu ile karşılaştırıldığında, c: PB grubu ile karşılaştırıldığında, d; PBM grubu ile karşılaştırıldığında, e; CK grubu ile karşılaştırıldığında, f; K grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

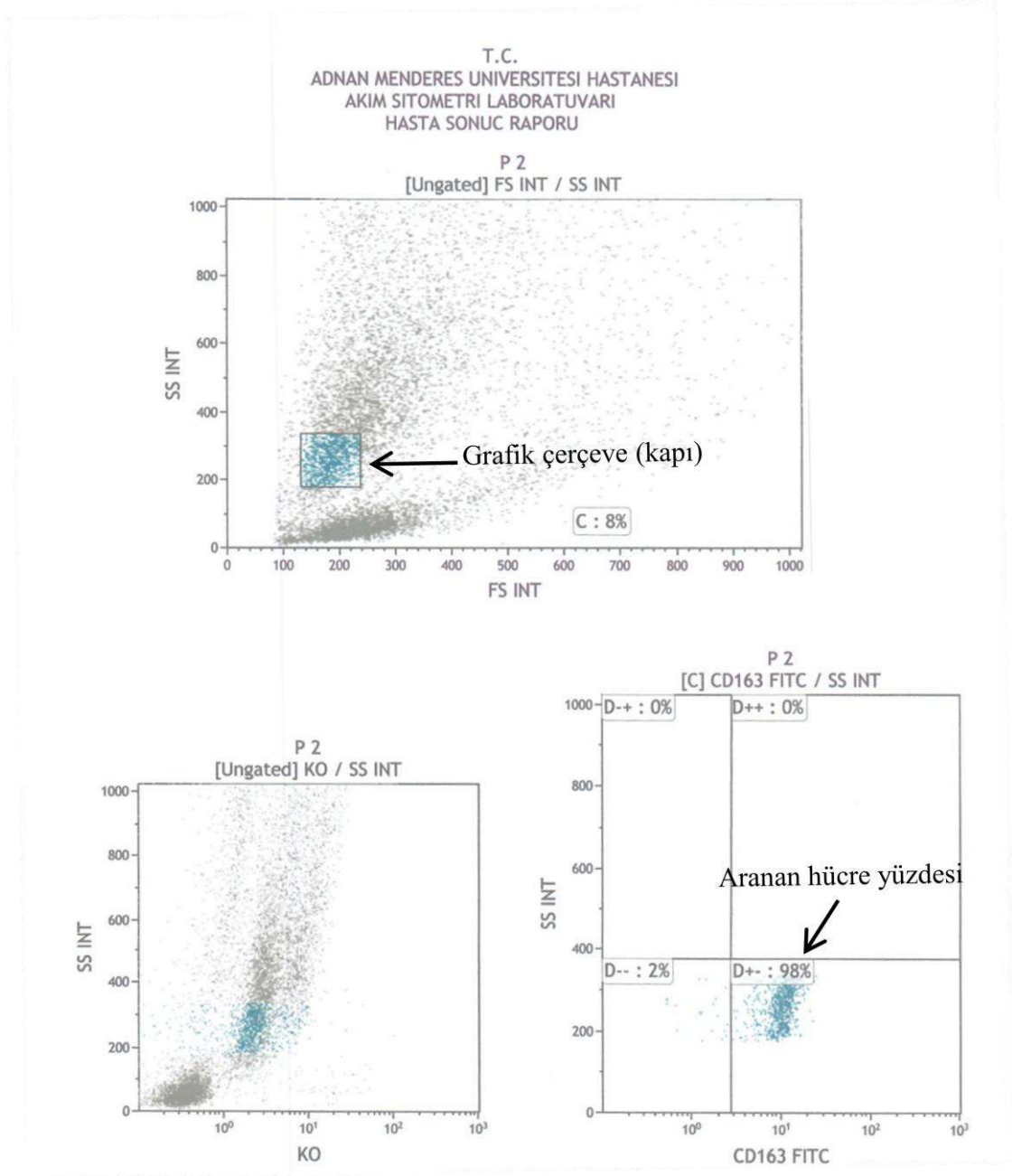
	P	PM	PB	PBM	CK	K
THir +	2,01±0,2	3,48±0,64	3,2±0,65	3,08±0,71	4,81±0,63	4,87±0,58
	(1,1-2,5) ^{b,c,d,e,f}	(3,1-3,6) ^{a,e,f}	(2,7-3,5) ^{a,e,f}	(2,5-3,4) ^{a,e,f}	(4,1-5) ^{a,b,c,d}	(4,3-5) ^{a,b,c,d}



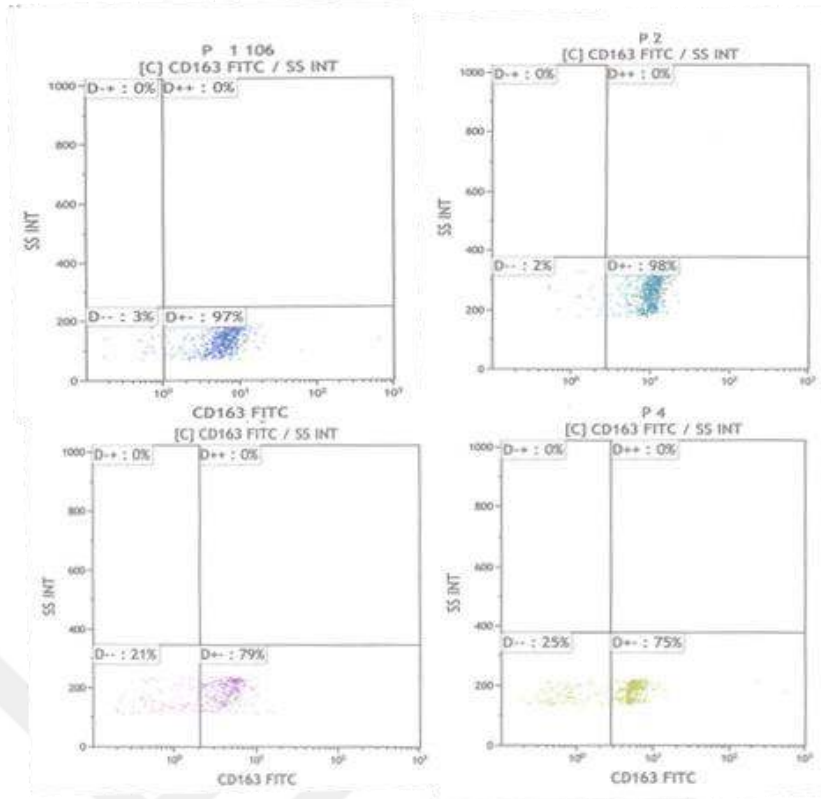
Resim 28: Deney gruplarında SNpc, Thir immunohistokimyası, Magnifikasyon; X40.

4.7. CD163 Makrofajların Akım Sitometri Analiz Bulguları

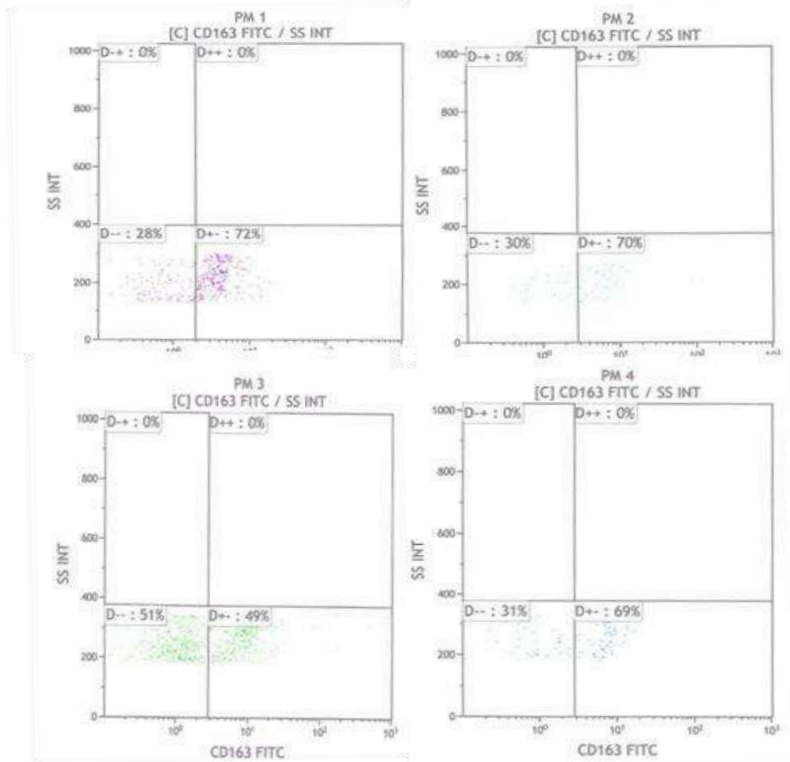
Akım sitometri cihazında okutulan proksimal kolon örneklerinden hazırlanmış hücre süspansiyonlarında bulunan CD163 makrofajlarının yüzde analizlerinin örnek raporu P grubuna ait bir siçanda Resim 29’da, gruplarda kaydedilen değerler Resim 30, 31, 32, 33, 34 ve 35’de gösterilmiştir.



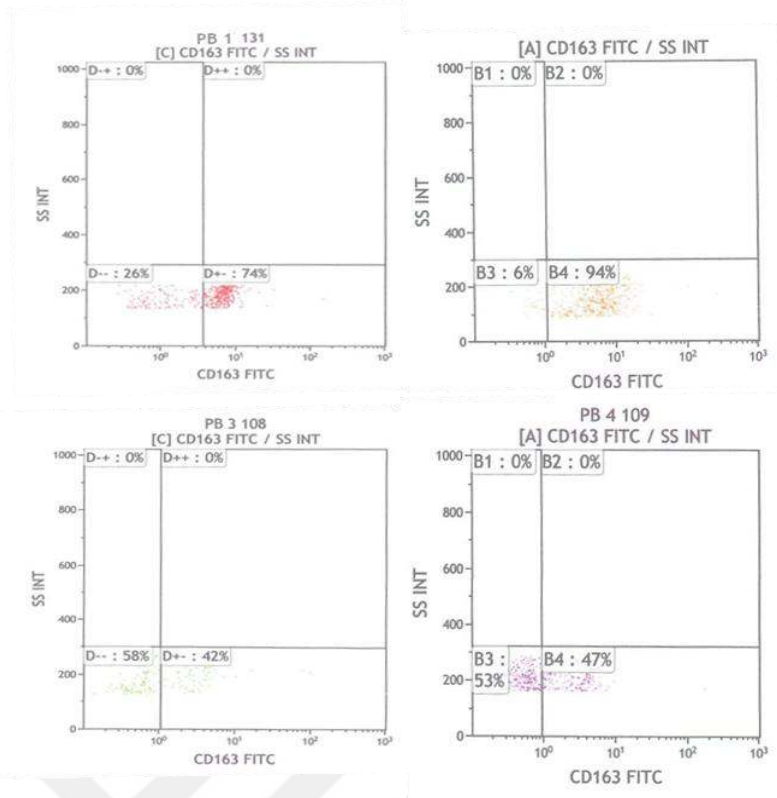
Resim 29: Akım sitometri analiz sonuç raporu. Rapora göre okutulan hücre süspansiyonunda kapının alındığı hücreler toplam süspansiyonda bulunan hücrelerin %8'ini, bu yüzdenin de %98'ini CD163 makrofajları oluşturmaktadır. FS INT; Forward Scatter, hücre büyüklüğüne göre saçılım, SS INT; Side Scatter, hücre granülaritesine göre saçılım, KO; hücre miktarı.



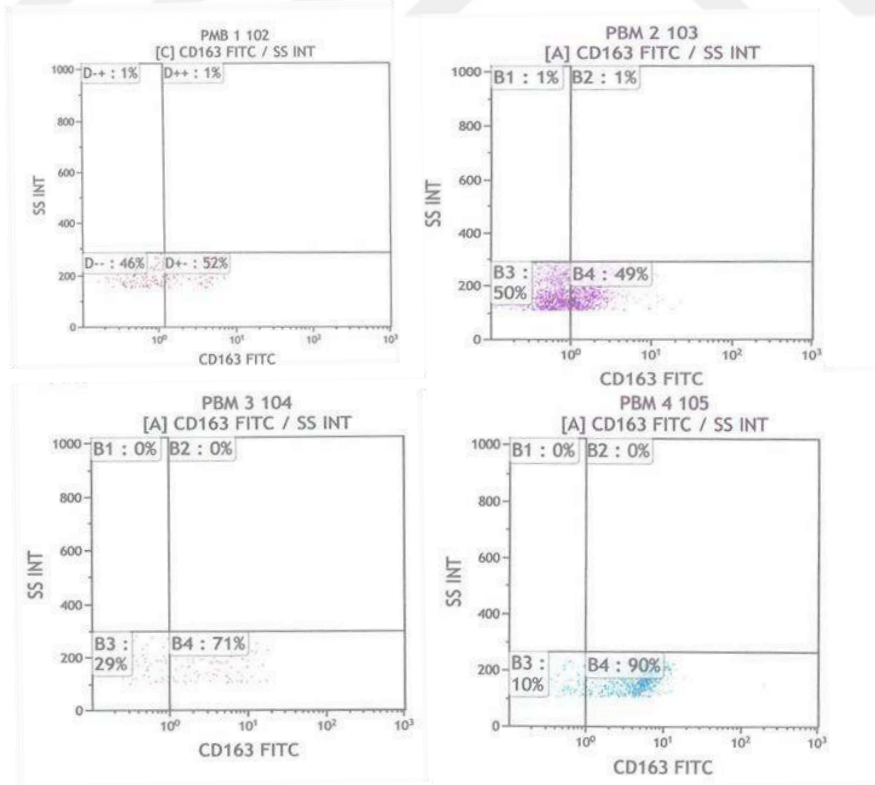
Resim 30: P grubu CD163 değerleri.



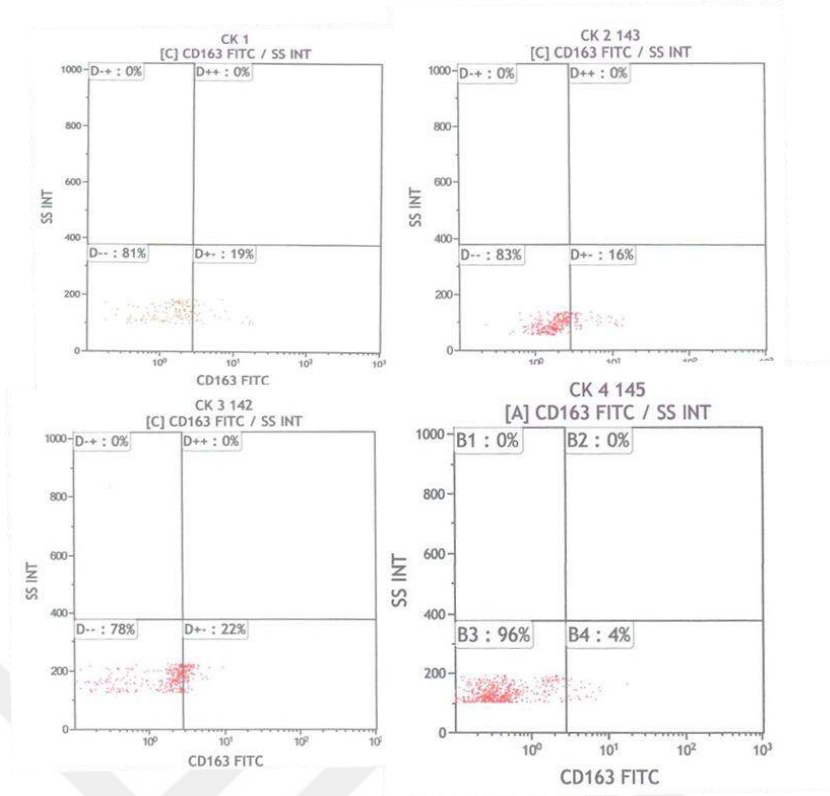
Resim 31: PM grubu CD163 değerleri.



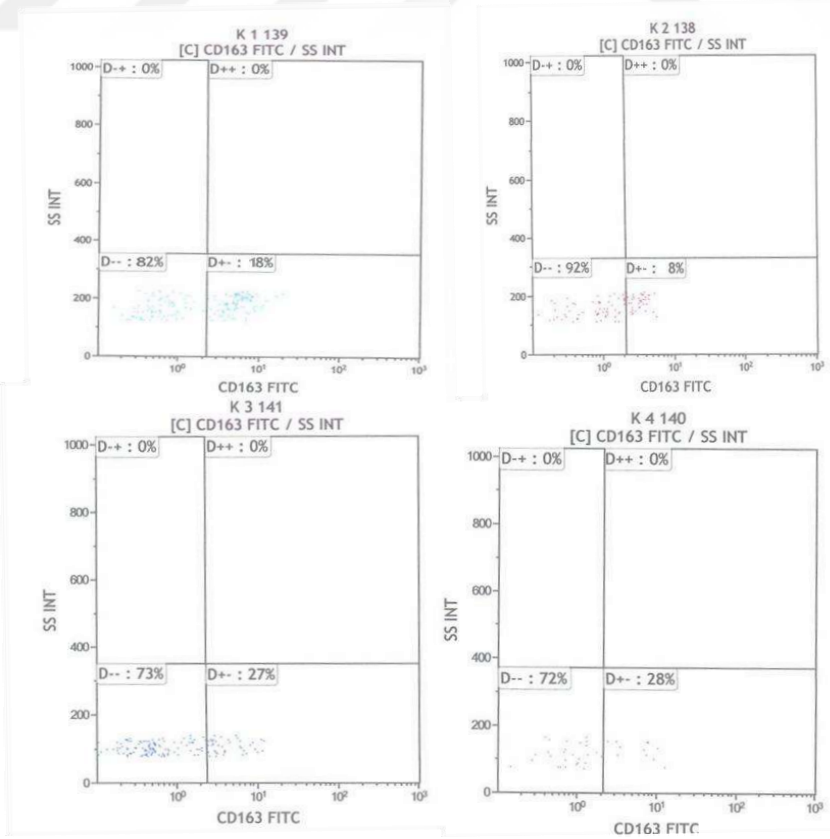
Resim 32: PB grubu CD163 değerleri.



Resim 33: PBM grubu CD163 değerleri

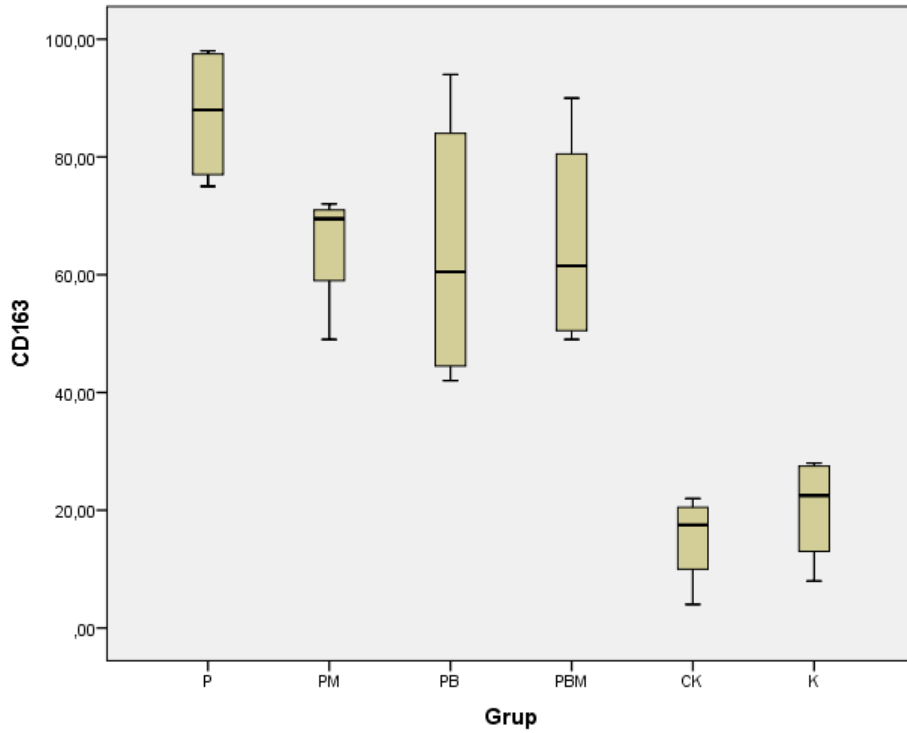


Resim 34: CK grubu CD163 değerleri.



Resim 35: K grubu CD163 değerleri.

Şekil 17’de yer alan grup ortalama değerlerinin sütunlarda siyah çizgi ile belirtildiği grafikten de anlaşılacağı üzere, Parkinson hasta grubunda CD163 makrofajlarının yüzdesi diğer tüm gruplardan yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak yalnızca PM grubu P grubundan anlamlı olarak farklı bulundu. PB ve PBM grubunun CD163 ortalama değerleri PM grubundan küçük olmasına rağmen, gruplar içerisinde görülen PB (%94) PBM (%90) yüksek değerler nedeniyle P grubundan anlamlı olarak düşük bulunmamıştır. Probiyotik verilmiş PM, PB ve PBM gruplarında CD163 makrofajlarının yüzdesi CK ve K gruplarından ise anlamlı olarak yüksek bulundu.



Şekil 17: Gruplarda CD163 makrofajlarının dağılımı.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 60 gün süresince rotenon uygulaması ile deneysel Parkinson hastalığı oluşturduğumuz P grubunda, rotenon uygulamasına ek olarak maya ve bakteriyel kökenli oral probiyotik verdiğimiz PM, PB ve PBM gruplarında yer alan 10 aylık, erişkin erkek ratlarda vücut ağırlığının azaldığını ve buna bağlı olarak vücut ağırlığı yüzde değişimlerinin CK ve K gruplarının aksine uygulama süresince arttığını tespit ettik. Rotenon enjeksiyonu ve oral probiyotik uygulamasının sonlandırıldığı 60. gün ile deney başlangıcında (0. gün) kaydedilen canlı ağırlıklar kullanılarak hesaplanan VAYDu değerleri P, PM, PB ve PBM grubunda CK ve K grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Benzer şekilde enjeksiyon ve gavaj uygulamasının sonlandırıldığı 60. günden sonra, iki haftalık bekleme süresinin sonunda (75. gün) kaydedilen canlı ağırlıklar kullanılarak hesaplanan VAYDb, deney hayvanlarının başlangıç (0. gün) ve 75. gün ağırlıkları kullanılarak hesaplanan VAYDd'de P, PM, PB ve PBM grubunda CK ve K grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Rotenonun toksik etkilerini araştırmak veya deneysel Parkinson hastalığı oluşturmak amacı ile uygulandığı deney hayvanlarında gastrointestinal kanal, karaciğer ve böbrek gibi periferik organlara olan toksik etkileri nedeni ile ağırlık kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Cannon ve ark, 2009; Murakami ve ark, 2015). Çalışmamızın üçüncü haftasında ikisi PM biri PB grubunda olan üç deney hayvanında rotenonun böbrek üzerine olan toksik etkilerinden kaynaklı olabilecek hematüri gözlemlendiğini belirtmiştik. Bunun yanında ağırlık kaybı Parkinson hastalığının oldukça yaygın görülen ve hastalık ilerledikçe şiddetlenen klinikopatolojik özelliklerinden biridir (Cumming ve ark, 2017; Cersosimo ve ark, 2018; Miyanishi ve ark, 2019). Rotenon uygulamasının sonlandırıldığı 60. günden sonrasında da, iki hafta süresince P, PM, PB ve PBM gruplarının ağırlık kaybetmeye devam ettikleri Şekil 13'de yer alan grafiğe ve Tablo 8'de yer alan VAYDb ortalama değerlerine bakılarak anlaşılabilir. Çalışmamıza benzer şekilde ratlarda intraperitoneal rotenon uygulaması ile deneysel Parkinson oluşturulmuş pek çok çalışmada ağırlık kaybı bildirilmiştir (Khadrawy ve ark, 2017; Rohini ve Vijayalakshmi, 2017; Srimathi Priyanga ve ark, 2017; Johnson ve ark, 2018; Su ve ark, 2018; Alabi ve ark, 2019). Parkinson hastalarında görülen ağırlık kaybına disfaji, gastrointestinal disfonksiyonlar, depresyon, hipozmi gibi gıda alımının azalmasına neden olan premotor semptomların yanında tremor, rijidite gibi enerji harcanmasına neden olan motor semptomların katkıda bulunduğu (Kashihara, 2006), ancak bu durumun yalnızca gıda alımının azalması ve enerji harcanmasının artmasına bağlı olarak açıklanamayacağı (Cumming ve ark,

2017), altta yatan mekanizmanın halen belirsiz olduğu bildirilmektedir (Cersosimo ve ark, 2018; Ma ve ark, 2018). Nitekim Lorefalt ve ark (2004) tarafından yapılmış bir çalışmada erken dönem Parkinson hastalarında kalori alımı arttırılmasına rağmen kilo kaybı tespit edilmiştir. Bunun yanında Parkinson hastaları ve aynı yaşta bulunan sağlıklı kontroller üzerinde Baricella ve ark (2003) ve Morales-Briceno ve ark (2012) tarafından gerçekleştirilmiş kesitsel çalışmalarda ise Parkinson hastalarının %60'ından fazlasının aşırı kilolu ya da obez olduğu, hastaların yalnızca %3'ünün düşük beden kitle indeksine sahip olduğu bildirilmiştir. Sırası ile İtalya ve Meksika'da gerçekleştirilmiş olan bu çalışmalarda, populasyonun obezite oranının yüksek olmasının da göz önünde bulundurulması gerektiği ancak aşırı kilolu olmanın Parkinson hastalığında görülen kilo kaybını telafi etmek için yeterli bir neden olamayacağı belirtilmektedir (Ma ve ark, 2018). Benzer şekilde Miyazaki ve ark (2020) 4 hafta süresince, 2.5 mg/kg dozda, subkutan rotenon uyguladıkları erkek farelerde çalışma süresince ağırlık kaybı tespit etmemişlerdir.

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da ($p>0,05$) VAYDu, VAYDb ve VAYDd ortalama değerlerinin probiyotik takviyesi alan PB ve PBM grubunda P ve PM grubundan daha yüksek olduğu, diğer bir deyişle bu gruplarda ağırlık kaybının daha fazla olduğunu saptadık. Deney süresince en yüksek ağırlık kaybının VAYDd ortalama değeri $-34,1\pm4,55$ olan PBM grubunda, onu takiben PB ($-30,55\pm3,49$), P ($-29,82\pm3,72$) ve PM ($-29,77\pm4,24$) gruplarında olduğu görülmektedir. Probiyotik etkenlerin ağırlık kazanımı ve kaybı üzerine, mikroorganizma türüne ve konak ile olan etkileşimine bağlı olmak üzere farklı etkileri bulunmaktadır. Million ve arkadaşları (2012) *Lactobacillus* cinsine ait probiyotik etkenlerin kullanıldığı araştırma çalışmalarını inceleyerek, kilo alımı üzerine olan etkilerinin sonuçlarını derledikleri çalışmalarında, insanlarda *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus fermentum*'un kilo alımını sağlarken, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus plantarum*'un kilo kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir. *Lactobacillus acidophilus* çalışmamızda kullandığımız bakteriyel probiyotik preperatı Newita® içerisinde de yer almaktadır. Newita® içerisinde yer alan bir diğer etken *Lactobacillus rhamnosus*'un ise Lee ve arkadaşlarının (2006) yüksek yağlı diyet ile farelerde obezite indükledikleri çalışmalarında, önemli ölçüde kilo kaybını arttırdığı ve yağ dokusunu azalttığı bildirilmiştir. Newita® içerisinde de yer alan; *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Bifidobacterium breve* gibi *Bifidobacteria* cinsine ait etkenlerin de kilo kaybını tetikledikleri, anti-obezite etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Brusaferro ve ark, 2018; Kang ve Cai, 2018). Kısa zincirli yağ asitlerinden bütirat sentezleyen bu probiyotik etkenlerin kilo kaybında oldukça etkili oldukları

bildirilmekte, obezite tedavisinde bu probiyotik etkenlerin kullanımı bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen deney hayvanlarında, bütirat takviyesi alan grupta obezite ve insülin direncinde düşüş saptanmıştır (Rios-Covian ve ark, 2016; Kang ve Cai, 2018). Kısa zincirli yağ asitleri intestinal epitel hücrelerinde bulunan Gpr41 ve Gpr43 olarak adlandırılan reseptörlere bağlanarak peptid $\gamma\gamma$ ve glukagon benzeri peptid-1 üretimini arttırmırlar. Bu iki intestinal hormonun bağırsak motilitesini azaltarak tokluk hissini arttırdığı, enerji alımını azalttığı bildirilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız maya kökenli probiyotik etken *Saccharomyces boulardii* ise leptin dirençli obez farelerde kilo kaybı üzerine etkili bulunmuştur (Everard ve ark, 2014). Obez farelerde intestinal mikrobiyomda *Firmicutes* cinsine ait bakterilerin arttığı, *Bacteroidetes* cinsine ait bakterilerin ise azaldığı belirtilmiştir (Kang ve Cai, 2018). *Saccharomyces boulardii* ise intestinal mikrobiyomda *Bacteroidetes* cinsi bakterileri arttırırken, *Firmicutes* cinsi bakterileri azaltmaktadır (Everard ve ark, 2014; Brusaferrero ve ark, 2018). Bu bilgiler, çalışmamızda canlı ağırlık kaybının bakteriyel ve maya kökenli probiyotik etkenleri birlikte uyguladığımız PBM grubunda daha yüksek bulunmasını anlaşılır kılmaktadır. Parkinson hastalığı sürecinde beklenen kilo kaybı probiyotik etkenlerin belirtilen etkileri nedeniyle artış göstermiş olabilir. *Saccharomyces boulardii* uyguladığımız PM grubunda kilo kaybı ise P grubu ile oldukça yakın değerler göstermektedir, *Saccharomyces boulardii* çalışmamızda kilo kaybı üzerine bakteriyel probiyotikler kadar etkili bulunmamıştır. Kontrol ve CK gruplarının ise VAYDu, VAYDb, VAYDd değerleri pozitif olarak kaydedilmiş, beklenildiği üzere bu gruplarda bulunan deney hayvanlarının ağırlıkları çalışma süresince artış göstermiştir ve her iki grubun vücut ağırlığı yüzde değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Görüldüğü üzere probiyotik etkenlerin ve salgıladıkları metabolitlerin konağın enerji dengesi üzerine oldukça önemli etkileri bulunmaktadır. Ayrıca intestinal mikrobiyom bileşimini de konak ile olan etkileşimlerine ve cins özelliklerine bağlı değiştirebilmektedirler. Bu açıdan Parkinson hastalarında mekanizması açıklanamayan kilo kaybında ve bazı çalışmalarda belirtilen karışık bulguların temelinde intestinal mikrobiyom değişimi önemli rol oynuyor olabilir. Çünkü farklı ülkelerde yapılan Parkinson hastalarının intestinal mikrobiyom analizi çalışmaları incelendiğinde, özellikle *Lactobacillaceae* cinsine ait probiyotik türlerin intestinal mikrobiyomdaki değişiminin popülasyonlar arasında fark gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin Almanya ve Çin’de Parkinson hastalarının intestinal mikrobiyom analizinde *Lactobacillaceae* cinsine ait türlerin azaldığı, Japonya ve Rusya’da yapılan çalışmalarda ise artış gösterdiği bildirilmiştir (Sun ve Shen, 2018).

Açık alan testi bulgularının direkt olarak ortalama değerleri kullanılarak literatür bulguları ile karşılaştırılması, çalışmalarda kullanılan açık alan test kutusunun kenar uzunluğunun farklı olması (38-100 cm) ve kayıt süresinin değişkenlik göstermesi (5-10 dakika) nedeniyle zorluk oluşturmaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar aktivite parametrelerinde kaydettikleri değişimleri yüzde olarak vermişlerdir. Bizde çalışmamızda kaydettiğimiz açık alan testi bulgularımızı literatür bulguları ile tartışırken anlamlı farklılığın bulunup bulunmadığını dikkate aldık. Çalışmamızın enjeksiyon ve gavaj uygulamasına başlamadan önce gerçekleştirdiğimiz açık alan testinde, değerlendirdiğimiz parametrelerde gruplar arasında anlamlı farklılık saptamadık. Genel olarak 60. günde ise P grubunda ÇG, T, TY değerlerinin anlamlı ölçüde azaldığını, HK değerinin ise arttığını tespit ettik. Probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM gruplarında 60. günde ÇG, T, TY değerleri P grubundan yüksek, CK ve K grubundan düşük bulundu ($p<0,05$). Deney hayvanının test süresince hareketsiz kaldığı süre (HK) ise PM, PB ve PBM gruplarında P grubundan düşük bulundu. Ayrıca 60. gün GH değerleri PM grubunda yalnızca CK ve K grubundan düşük, PB ve PBM grubunda P grubundan yüksek, CK ve K grubundan düşük bulundu. İki haftalık bekleme süresinin ardından tekrar gerçekleştirdiğimiz açık alan testinde ise P grubunda 60. gün değerlerine göre ÇG, Ş, ve TY 75. gün değerleri anlamlı olarak azalma gösterirken, HK değeri artış göstermiştir ($p<0,05$). Probiyotik takviyesi alan gruplarda ise 75. günde 60. gün parametrelerine kıyasla belirtilen değerlerde değişim saptanmamıştır. Khadrawy ve ark (2017) 45 günlük rotenon uygulaması ile ratlarda PH'nda kafeinin antioksidan etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, Parkinson hasta grubunda başlangıç değerlerine kıyasla MKK değerinin %320, HK değerinin %503 arttığını, ÇG ve Ş değerinin ise sırası ile %83 ve %85 azaldığını bildirmişlerdir. İnceledikleri bu dört parametre içerisinde HK değeri hariç, kafein takviyesi yaptıkları Parkinson hasta grubunda kontrol grubuna yakın değerler kaydetmişlerdir. Yalnızca kafein uyguladıkları grupta ise hareketsiz geçirilen sürenin anlamlı olarak, kontrol grubu değerlerinin dahi altına düştüğünü belirtmişlerdir. Çalışmamızın bulguları da MKK hariç belirtilen parametrelerde Khadrawy ve arkadaşlarının (2017) bulgularına benzerlik göstermektedir, 60. günde P grubunun HK değeri %589 artış gösterirken ve ÇG %255 ve Ş ise daha fazla düşüş (%170) göstermiştir. Bu durum çalışmamızın uygulama süresinin daha uzun olmasından kaynaklı olabilir. Su ve ark (2018) ratlarda sol corpus striatum'a stereotaksik olarak 6-hidroksidopamin uygulaması ile oluşturdukları hemiparkinson modelinde, 6 hafta süresince her hafta gerçekleştirdikleri açık alan testinde TY, MKG'nin azaldığını, HK'nın arttığını ve bu değişimlerin 6. haftada oldukça belirgin olduğunu ancak gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir.

Stereotaksik PH hayvan modellerinde DAerjik nöronların yıkımını sağlayan etken maddenin corpus striatum'a enjekte edilmesi, uzun zaman içerisinde retrograd SNpc nöron kaybını sağlamaktadır. Merkez kareye girme ve merkez karede kalma süresi keşifsel davranışlar ve anksiyete ile ilişkilendirilmektedir. Ürinyasyon (Ü) ve defekasyon (D) parametrelerinin yüksek olması da deney hayvanının bulunduğu ortamda kendini rahat hissetmesinin belirtileri olarak değerlendirilmekte, anksiyete ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle anksiyete ve ilişkili davranışların yüksek olması beklenen P grubunda MKG, MKK, Ü ve D değerlerinin düşük olması beklenir. Çalışmamızda Su ve ark (2018) bulgularına benzer, Khadrawy ve ark (2017) bulgularından farklı olarak P, PM, PB ve PBM gruplarında MKG ve MKK değerlerinin 60. ve 75. günde 0. güne kıyasla anlamlı ölçüde azaldığını tespit ettik. Ürinyasyon 75. günde 0. güne göre, D ise 60. ve 75. günde 0. güne göre yalnızca P grubunda anlamlı olarak azaldı. Merkez kareye giriş sıklığı ve MKK değerleri açık alan testinin gerçekleştirilmesi için kullanılan kutunun ebatına, kayıt süresine, deney hayvanlarının doğumdan itibaren maruz kaldıkları bakım koşullarına kadar pek çok faktörden etkilenebilir. Çalışmamızda Ü ve D parametrelerinin tekrarlayan ölçümlerde P grubunda anlamlı olarak düşük bulunması bu grubun anksiyete seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Probiyotik takviyesi alan gruplarda Ü ve D parametreleri tekrarlayan ölçüm zamanlarında anlamlı farklılık göstermezken, MKG ve MKK değerlerinin 60. ve 75. günde anlamlı olarak azalmıştır. Anksiyete ilişkili davranışlardan bağımsız olarak, kronik rotenon uygulamasından harekete ilişkin keşifsel davranışların daha fazla etkilendiği söylenebilir. Çizgi geçişi (ÇG), TY ve Ş lokomotor aktivitenin temel belirteçlerinden kabul edilirler (Su ve ark, 2018) ve deneysel çalışmalarda sıklıkla gözetilen parametrelerdir. Amano ve ark (2013) Parkinson hastalığının şiddeti ile ÇG arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamıza benzer şekilde rotenon ile deneysel Parkinson hastalığını indükledikleri ratlarda Maniyath ve ark (2017), Rohini ve Vijayalakshmi (2017), Srimathi Priyanga ve ark (2017), Sun ve ark (2019), Alabi ve ark (2019), Miyazaki ve ark (2020) ÇG, Ş değerlerinin hasta grubunda önemli ölçüde azaldığını, Sun ve ark (2019) HK'nın arttığını, Maniyath ve ark (2017), Rohini ve Vijayalakshmi (2017), Srimathi-Priyanga ve ark (2017) tımar davranışının anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Rotenon uygulamasına ek olarak Rohini ve Vijayalakshmi (2017) sesamol, Srimathi Priyanga ve ark (2017) kuersetin ve hesperidin, Sun ve arkadaşları (2019) minosiklin, Alabi ve arkadaşları (2019) metil jasmonat uygulamasının motor semptomları anlamlı ölçüde iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Shallie ve arkadaşları da (2017) rotenon ile deneysel Parkinson hastalığını indükledikleri farelerde ÇG'nin önemli ölçüde azaldığını, deney sürecinde keten tohumu yağı uyguladıkları hasta grubunda motor semptomların

iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da PM, PB ve PBM gruplarında 60. günde ÇG, T, HK ve TY değerleri, 75. günde ÇG, Ş, GH, T, HK, TY değerleri motor fonksiyonların probiyotik takviyesi alan gruplarda P grubundan iyi olduğunu göstermektedir. Silindir testi bulgularımızda ise 60. günde P, PM, PB ve PBM gruplarının CK ve K gruplarına göre az sayıda ön ekstremitelerini silindir duvarı ile temas ettirdikleri, 75. günde P grubu değerlerinin daha da azalarak diğer tüm gruplardan anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Silindir testi istemli lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinin yanında, stereotaksik yöntemlerle ipsilateral lezyon oluşumu ile indüklenen deneysel Parkinson hastalığında motor asimetriyi değerlendirme amacıyla da uygulanmaktadır (Darbinyan ve ark, 2017). Aynı zamanda striatal dopamin seviyesinin azalımı ile en iyi korelasyon gösteren motor testlerden biri olduğu belirtilmiştir (Miyanişi ve ark, 2019). Rotenon sistemik olarak uygulandığında bilateral SNpc hasarı gerçekleştirmektedir (Darbinyan ve ark, 2017). Dolayısıyla çalışmamızda P, PM, PB ve PBM grubunda sağ ve sol ekstremitelerin silindir duvarına temas sayıları azalma gösterirken, her iki taraf ekstremitelerinin silindir duvarına temas sayıları arasında farklılık saptamadık. Çalışmamıza benzer şekilde Darbinyan ve ark (2017) üç hafta süre ile 2.5 mg/kg rotenon uyguladıkları ratlarda sağ ve sol ön ekstremitelerin silindir duvarına temas sayıları ortalamalarının anlamlı ölçüde azaldığını, rotenon uygulaması kesildikten 3 hafta sonra tekrarlanan silindir testinde temas sayıları ortalamalarının daha da azaldığını bildirmişlerdir. Alikatte ve ark (2020) 35 gün süresince rotenon uyguladıkları grupta sağ ve sol ekstremitenin silindir duvarına temas sayılarının ortalamalarını, çalışmamızın 60. ve 75. gün değerlerine oldukça yakın 4.66 ± 0.395 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda P grubu ile probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM grubunun Sil60a ve Sil60s değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmazken, Sil75a ve Sil75s değerleri arasında anlamlı farklılık saptandı. Ancak P grubunun 75. gün silindir testi bulguları 60. gün bulguları ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşüş gösterirken PM, PB ve PBM gruplarının 60. ve 75. gün değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Bu durum Tablo 15'den görüleceği üzere, P grubunun Sil0a ve Sil0s başlangıç değerlerinin PM, PB ve PBM grubundan yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. Kas kuvveti ve nöromuskuler fonksiyon değerlendirilmesi amacı ile uygulanan askı teli testinde ise çalışmamızda P grubu ile PM, PB ve PBM grupları arasında diğer motor testlere kıyasla oldukça belirgin farklılık saptandı. PM, PB ve PBM gruplarında çubuğu tutma süreleri çalışma boyunca CK ve K gruplarından anlamlı farklılık göstermezken, P grubunda 60. ve 75. günde önemli ölçüde azaldığı Tablo 18'de görülmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Srimathi Priyanga ve ark (2017) yalnızca rotenon uyguladıkları grupta çubuğu tutma süresinin kontrole kıyasla önemli ölçüde azaldığını, güçlü

flavanoid bileşikler olan kuersetin ve hesperidin uygulamasının neredeyse kontrol grubuna yakın bir kas kuvveti sağladığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Khadrawy ve ark (2017) rotenon uyguladıkları grupta askı çubuğunu tutma süresinde oldukça düşüş saptamışlar, kafein takviyesi alan grupta ise kontrol grubu ile anlamlı fark saptamamışlardır. Parkinson hastalarında izometrik dinamometre ile ölçülen kas kuvveti ile ilgili literatürler oldukça sınırlı olmakla birlikte, çalışmalar arasında farklılıklar da bulunmaktadır. Bazı araştırmalarda Parkinson hastalarında bilateral ve hareketin hızı ile artış gösteren kas kasılma kuvvetinin azalması tespit edilmiş iken (Kakinuma ve ark, 1998), bazı araştırmalarda kas kasılma kuvveti azalımının hareketin hızı ile bağlantılı olmadığını, hastalığın kliniği ile progresyon gösterdiğini ve asimetrik dağılıma sahip olduğunu vurgulamışlardır (Durmus ve ark, 2010). Frazzitta ve ark (2015) ise Parkinson hastalarında bacağa ekstensiyon ve fleksiyon yaptıran kaslarda kontrol grubundan farklı bir kasılma kuvveti saptamamışlardır. Parkinson hastalarında kas kasılma kuvvetinin azalması çoğunlukla immobilité ve postürel dengesizlik gelişimine bağlanmaktadır (Frazzitta ve ark, 2015). Ancak özellikle rotenon ile deneysel Parkinson hastalığının indüklendiği çalışmalarda, hasta grubunda net olarak saptanan kas kasılma kuvvetinin azalımı, rotenonun periferik sinirlerde oluşturduğu dejeneratif değişiklikler nedeniyle olabilir. Binienda ve ark (2013) subkutan kronik rotenon uygulaması gerçekleştirdikleri ratlarda siyatik sinirde miyelin bazik proteini ve nörofilament B'nin azaldığını, kronik rotenon uygulamasının periferik sinirlerde nöropatiye neden olarak askı teli testinde kas kuvvetini etkilediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızın bulguları probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM gruplarında lokomotor fonksiyonların P grubuna kıyasla daha iyi düzeyde olduğunu göstermektedir. İlk kez Scheperjans ve ark (2015) tarafından tanımlanmış olan PH'nda mikrobiyal disbiyozis ve intestinal mikrobiyom değişiminin motor fenotip ile korelasyon gösterdiği düşünüldüğünde, Parkinson hastalığının oluşturulma sürecinde probiyotik uygulamasının motor fonksiyonları iyileştirmesi şaşırtıcı değildir. Benzer şekilde Tamtaji ve arkadaşları (2019) da, 50-90 yaş aralığında bulunan Parkinson hastalarının 12 hafta süre ile 2×10^9 kob/gün oral probiyotik kullanımının UPDRS ve NMS değerlerini anlamlı ölçüde iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Probiyotik etkenlerin motor fonksiyonlar üzerine olan olumlu etkileri, gliyal hücre aktivasyonunu ve nöroinflamasyonu önlemelerine, bütirat seviyesini, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve gliyal hücreler kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) sentezini arttırarak olanaklı kıldıkları nöroprotektif etkilerine bağlanmaktadır (Erickson ve ark, 2001; Sun ve ark, 2018; Srivastav ve ark, 2019). Çalışmamızda yalnızca rotenon uygulaması

gerçekleştirdiğimiz P grubunda ODcs değerinin Zhang ve ark (2012), Abdel Salam ve ark (2014), Murakami ve ark (2015), Normando ve ark (2016), Miyazaki ve arkadaşlarının (2020) ODcs bulgularına benzer oldukça düştüğünü tespit ettik. Greene ve ark (2009) ise 3 hafta süre ile subkutan rotenon uygulaması gerçekleştirdikleri ratlarda ODcs değerini 0,8 (%80) ve üzeri olarak tespit etmişler ve kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. Corpus striatum’da Thir immunoreaktivitesinin düşük dozda kronik rotenon uygulamasının 3. haftasından, SNpc’da Thir pozitif hücrelerin ise uygulamanın 6. haftasından itibaren başlayarak giderek azaldığı belirtilmiştir. Dopaminerjik sinir terminallerinden başlayarak hücre gövdesine ilerleyen retrograd nörodejenerasyon PH’nın patogeneze uygunluk göstermekle birlikte kronik rotenon uygulaması için de tipiktir (Murakami ve ark, 2015; Tentillier ve ark, 2016; Maniyath ve ark, 2017). Yaklaşık 9 hafta (60 gün) süre ile kronik rotenon uygulaması gerçekleştirdiğimiz ratlarda, Resim 28’de görüldüğü gibi, SNpc dopaminerjik nöronlarında da azalma saptadık. Çalışmamızda probiyotik uyguladığımız PM, PB ve PBM grubunda SNpc hücre yoğunluğu ve ODcs değerini CK ve K grubundan düşük, P grubundan ise anlamlı olarak yüksek bulduk. Çalışmamıza benzer şekilde Hsieh ve ark (2020) rotenon ile deneysel PH’nı indükledikleri farelerde uzun süreli (16 hafta, 10^{10} kob/gün) *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum* LP28, ve *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* suşlarını içeren probiyotik uygulamasının, Thir immunohistokimyası uygulanmış kesitlerde SNpc dopaminerjik nöronlarını önemli ölçüde yıkımdan koruduğunu, motor fonksiyonları iyileştirdiğini göstermişlerdir. Probiyotik etkenlerin anti-inflamatuar, anti-oksidan etkileri de DAerjik nöronları yıkımdan korumada önem arz etmektedir. Parkinson hastalarında azaldığı rapor edilen *Prevotella* ailesine mensup etkenler intestinal permeabilityi azaltan münin tabakasının oluşturulmasında önemlidirler. Bunun yanında probiyotik etkenler salgıladıkları KYA’lar, vitaminler, güçlü antioksidan bileşikler ve GABA, serotonin, asetilkolin başta olmak üzere çeşitli nörotransmitterler sayesinde SSS’nin fonksiyonlarını etkilemektedirler (Su ve ark, 2018; Tamtaji ve ark, 2019).

Probiyotik etkenlerin nöroprotektif etkileri çalışmamızda stereolojik optik parçalama yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz hippokampal piramidal nöronların sayım bulgularında da görülmektedir. Parkinson hastalığında görülen bilişsel problemlerin ve hastalığın ilerleyen aşamalarında demansla sonuçlanabilen hafıza problemlerinin etiyolojisinde hippocampus kaynaklı patolojilerin varlığı olasıdır. Hippocampus atrofi normal yaşlanma sürecinde de görülmektedir ve çok daha şiddetli olarak Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların temel

bulgularından birini oluşturmaktadır. Normal yaşlanma sürecinde ve Alzheimer hastalığında özellikle CA1 ve CA3 bölümlerinin dejenerasyona daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Parkinson hastalığında ise nörodejeneratif süreçlerin hippocampus üzerine etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (Uribe ve ark, 2018), bu konuda yapılan araştırmaların sonuçları da henüz kesin bir varsayım yapmayı sağlayacak, yeterli kanıtlara sahip değildir. Dolayısıyla Parkinson hastalarında görülen demansın nöropatolojik basamakları henüz anlaşılabilmiş değildir (Hall ve ark, 2014; Uribe ve ark, 2018; Lun Liu ve ark, 2019). Volumetrik MRI çalışmalarında, post mortem beyin incelemelerinde pek çok araştırmacı tarafından hippocampus hacminin azaldığı tespit edilmiş (Camicioli ve ark, 2003; Jokinen ve ark, 2009; Goldman ve ark, 2012; Uribe ve ark, 2018) ve hippokampal atrofinin Parkinson hastalığının süresi ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Tanner ve ark, 2017). Ancak hippokampal atrofi demans görülmeyen Parkinson hastalarında da saptanmıştır (Pereira ve ark, 2013; Yıldız ve ark, 2015; Tanner ve ark, 2017). Goldman ve ark (2012) ise demans bulunan ve bulunmayan Parkinson hastalarının ayırımında entorhinal korteks atrofisinin belirleyici olabileceğini bildirmişlerdir. Heidari ve ark (2017) ise volumetrik MRI çalışmalarında Parkinson hastaları ile sağlıklı kontrollerin hippocampus hacimleri arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Parkinson hastalarında hippokampal atrofiye nöron kaybının eşlik edip etmediğine yönelik literatür bilgileri ise oldukça sınırlıdır. Joelsing ve ark (2006) demans gösterdiği kaydedilmiş, sekiz Parkinson hastasına ait post mortem beyin incelemelerinde hippokampal gri cevher hacminde ve stereolojik metodlarla tespit ettikleri CA1, CA2-3, CA4 ve gyrus dentatus'un toplam nöron sayısında sağlıklı kontrollerden anlamlı farklılık saptamamışlardır, hatta istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da, örneklerin hippocampus nöron sayısı ortalamasını Parkinson hastalarında kontrol grubundan yüksek bulmuşlardır. Bununla birlikte demans bulunan Parkinson hastalarında Mori ve ark (2003) CA2-3, Hall ve ark (2014), Lun Liu ve ark (2019) CA2 piramidal nöronlarında Lewy cisimciklerinin, demans bulunmayan Parkinson hastalarına kıyasla oldukça yoğun olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. İntrastoplazmik Lewy cisimciklerinin oluşumunu takiben nöronal dejenerasyon gözlenmektedir, ancak yetişkinlerde gyrus dentatus ve subventriküler bölge SSS'de nöronal kök hücrelerin bulunduğu, nöroenezisin devam ettiği bölgelerdir. Parkinson hastalığında nöroinflamasyon ve nörodejeneratif süreçlere yanıt olarak gyrus dentatus ve subventriküler bölgede bulunan nöronal kök hücrelerin çoğaldığı bildirilmektedir (Doorn ve ark, 2014; Regensburger ve ark, 2014). Doorn ve ark (2014) klinik olarak PH tanısı almış hastalara ait post mortem beyin incelemelerinde, nöronal proliferasyonu minikromozom protein 2 immunohistokimyası ile değerlendirmişler, Parkinson hastalarında kontrol grubuna kıyasla CA1, CA2-3, CA4 ve gyrus

dentatus'ta MMC2 yoğunluğunun önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Klinik ve deneysel bulgular öğrenme ve bellek işlevinde rol oynayan hippocampus'un Parkinson hastalığı olan bazı hastalarda görülen kognitif disfonksiyonların ve demansın gelişiminde rol oynadığı görüşünü desteklemektedir (Jokinen ve ark, 2009; Yıldız ve ark, 2015; Darbinyan ve ark, 2017; Uribe ve ark, 2018). Ancak PH'nda kognitif disfonksiyonlar ve demansın patogenezi, nucleus basalis magnocellularis'in dejenerasyonu da göz önüne alınarak, dopaminerjik sistem kaynaklı patolojilerden ziyade ilk kez 1970'lerde ortaya atılan kolinerjik hipotezle açıklanmaya çalışılmaktadır. Nitekim kognitif disfonksiyonlar ve demans dopaminerjik tedaviye yanıt vermemektedir (Ermine ve ark, 2018; Lun Liu ve ark, 2019). Ayrıca paraolfaktor alan, gyrus subcallosus ve substantia perforata anterior'dan köken alarak hippokampal CA2-3 bölümüne projekte olan Broca'nın diyagonal bandını oluşturan nöronların dejenerasyonu hippocampus'ta kolinerjik lif kaybına neden olmaktadır (Hall ve ark, 2014; Yıldız ve ark, 2015). Deneysel Parkinson hastalığı oluşturmak amacı ile ratlarda kronik rotenon uygulamasının ise çalışmamıza benzer şekilde hippokampal nörodejenerasyona neden olduğu belirtilmiştir (Sai ve ark, 2009; Darbinyan ve ark, 2017; Abdel-Salam ve ark, 2018). Abdel-Salam ve ark (2018), Rakha ve ark (2019) rotenon ile farelerde deneysel Parkinson hastalığını indükledikleri çalışmalarında, Resim 19, 20, 21 ve 22'de de görüleceği üzere bulgularımıza benzer şekilde hasta grubunda hippocampus'ta piknotik nöron yoğunluğunu yüksek bulmuşlardır. Darbinyan ve ark (2017) rotenon ile deneysel PH'nı indükledikleri ratlarda, hippokampal nöronların elektrofizyolojik aktivite değişimlerinin nörodejenerasyona bağlı gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Rotenon mikrotübüllerin depolarizasyonunu inhibe ederek, nörotransmitterlerin veziküllere taşınmasını engellemekte, hücre gövdesinde biriken nörotransmitter maddeler oksidasyona uğrayarak, oksidatif strese ve takiben dejenerasyona neden olmaktadır (Darbinyan ve ark, 2017; Bisbal ve Sanchez, 2019). İn vitro olarak primer hippokampal nöron kültürleri ile yapılan çalışmalarda da rotenonun doza bağlı olarak nörodejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir (Darbinyan ve ark, 2017; Bisbal ve Sanchez, 2019). Bu bulgulara ek olarak; Thir immunohistokimyası ile rodentlerde hippocampus'un dopaminerjik innervasyonu tespit edilmiştir (Milner ve Bacon, 1989) ancak insanlarda CA2-3 bölümünde monoaminerjik lifler bulunmamaktadır (Ermine ve ark, 2018). Rotenon gibi nörotoksik maddeler kullanılarak indüklenen deneysel PH modellerinde kullanılan etken maddelerin, nöronal kök hücrelerin proliferasyonunun azaldığı belirtilmektedir (Suzuki ve ark, 2010). Bu durum hippocampus'ta saptanan toplam nöron sayısını etkileyen bir faktör olabilir. Jia ve ark (2014) 1 ve 3 ay süre ile kronik rotenon uygulaması gerçekleştirdikleri farelerde çift immunofloresan boyama ile,

nöronal prekürsör hücrelerde bulunan proliferatif hücre nükleer antijeni ve mikrotübül fonksiyonu ile ilişkili doublin pozitif hücrelerin hippocampus'ta bulunmadığını, dolayısıyla rotenon uygulanmış farelerde hippokampal nörogenezisin olmadığını belirtmişlerdir. Almeida ve ark (2016) 10 aylık yaşlı ratlarda, 4 hafta süresince, 2 mg/kg/gün dozunda kronik rotenon uygulamasının hippocampus'ta Alzheimer hastalarına benzer amiloid β ve tau protein agregatlarının birikimine ve nörodejenerasyona neden olduğunu, 1 mg/kg/gün dozunda uygulanan rotenonun hippocampus'ta protein agregasyonuna neden olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca ratlarda serebral korteks, hippokampal formasyon ve SNpc'da ekspresyonu gösterilmiş olan, pro-inflamatuar mediyatörlerin sentezini önleyerek nörodejenerasyonu engelleyen, hippokampal nörogenezisi arttıran nükleer reseptör ilişkili protein 1 (Nurr1) ekspresyonunun yetişkinlik döneminde önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir (Ahn ve ark, 2018). Woodruff-Pak ve arkadaşları (2010) 4, 8, 12, 18 ve 24 aylık farelerde, stereolojik nöron sayımı ile hippocampus ve cerebellum'da normal yaşlanma sürecinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında; hippokampal CA1 nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 8 ve 12 aylık farelerde 4 aylık farelere göre düşüş gösterdiğini, 18 ve 24 aylık farelerde ise artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Serebellar Purkinje hücrelerinin ise yaşlanma süreci ile sürekli düşüş gösterdiğini, 4 aylık farelere kıyasla 18 ve 24 aylık farelerde anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. Almeida ve ark (2016) ve Woodruff-Pak ve ark (2010) bulguları, deneysel PH oluşturmak amacı ile kullanılan etken maddenin uygulama dozunun, çalışmada kullanılan deney hayvanlarının yaşının dolayısıyla hippokampal nörogenezisin normal yaşlanma sürecinde etkili olduğu yaş aralığının toplam nöron sayısına olan etkisini göstermektedir. Çalışmamızda da 10 aylık erkek ratlarda, 60 gün süresince, 2.5 mg/kg/gün dozunda kronik rotenon uygulaması sonucu, P grubunda Nhippocampus değerini diğer tüm gruplardan anlamlı olarak düşük bulduk. Toplam 75 günlük deney sürecinin sonunda 12,5 aylık yaşında olan deney hayvanlarımızda, stereolojik optik parçalama yöntemi ile tespit ettiğimiz hippocampus piramidal nöron sayısı rotenonun belirtilen etkileri, rodentlerde hippocampus'un DAerjik innervasyonunun bulunması ve Woodruff-Pak ve arkadaşlarının (2010) bulgularında belirtilen yaşa bağlı etkenler nedeni ile P grubunda düşük bulunmuş olabilir. Probiyotik takviyesi alan PM, PB ve PBM gruplarında ise Nhippocampus değeri CK ve K grubundan düşük, P grubundan ise yüksek bulundu ($p<0,05$).

Parkinson hastalığında görülen ve L-DOPA tedavisine yanıt vermeyen tremor, yürüyüş bozukluğu ve postürel instabilitenin patogenezinde primer olarak bazal çekirdekler, thalamus ve serebral korteks arasındaki bağlantıların rol almadığı açıktır (Seidel ve ark, 2017). Bu

durum PH'nda cerebellum ilişkili patolojik ve fonksiyonel değişimlerin olası olduğunu düşündürmektedir. Yapılan pek çok araştırma PH'nda Purkinje hücrelerinin dejeneratif özellikler gösterdiğini bildirmiştir. Lee ve ark (2018) rotenon ile deneysel Parkinson hastalığını indükledikleri 1 aylık ratlarda, vermiş cerebelli'de reaktif astrositlerin belirteci GFAP'in arttığını, TUNEL boyama yöntemi ile Purkinje hücrelerinin apoptozise uğradığını belirtmişlerdir. Shallie ve arkadaşları (2017) rotenon ile deneysel Parkinson hastalığını indükledikleri farelerin, Nissl boyanmış serebellum kesitlerinde Purkinje hücrelerinin daha açık renkli boyandığını, Bielschowsky ile boyanmış kesitlerde hücrelerin etrafında vakuollerin bulunduğunu, hematoksilin & eozin boyanmış kesitlerde de Khadrawy ve ark (2017), Hasan ve ark (2019) Purkinje hücrelerinin stoplazmik büzüşme ve piknotik nükleus gibi dejeneratif özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise serebellar Purkinje hücrelerinin stereolojik sayım bulgularında gruplar arasında anlamlı farklılık saptamadık ($p>0,05$). Cerebellum, Braak ve arkadaşlarının (2003) Lewy cisimciklerinin yayılımını dikkate alarak oluşturdukları, Parkinson hastalığının derecelendirme sisteminde yer almamıştır. Hastalığın belirteçlerinden olan Lewy cisimciklerinin aksonal transportla nöronlar arasında yayıldığı bilinmektedir (Rusholt ve ark, 2020). İlk kez Mori ve arkadaşları (2003) α -sinüklein immunohistokimyası uyguladıkları on Parkinson hastasına ait cerebellum'da, Lewy cisimciklerinin cerebellum'un afferent ve efferent liflerinin oluşturduğu corpus medullare'de yoğunlaştığını saptamışlar, Purkinje hücrelerinin de bulunduğu cortex cerebelli'de tek tük Lewy cisimciği görüldüğünü bildirmişlerdir. Seidel ve arkadaşları (2017) da benzer şekilde Parkinson hastalarında corpus medullare'de, ve serebellar çekirdeklerde Lewy cisimciklerinin varlığını göstermişlerdir. Alfa sinüklein agregatlarının etkilenen nöronların aksonal taşınmasını bozduğunu düşünmek mümkündür. Nitekim Khadrawy ve arkadaşları (2017) ratlarda ipsilateral corpus striatum'a rotenon uygulaması ile oluşturdukları deneysel PH modelinde, serebellar dokuda glutamat, aspartat gibi eksitatör nörotransmitterlerin artış gösterdiğini, inhibitör nörotransmitterler olan GABA ve glisin'in ise azaldığını belirtmişlerdir. Belirtilen çalışmalarda saptanan histokimyasal, immunohistokimyasal ve nörokimyasal değişimler Parkinson hastalığında serebellumun fonksiyonel olarak farklılaştığını göstermektedir. Ancak bu değişimlerin serebellar Purkinje hücrelerinin toplam sayısına etkisi çalışmamıza benzer şekilde Rajput ve arkadaşları (2011), Rusholt ve arkadaşları (2020) tarafından da saptanmamıştır. Rajput ve arkadaşları (2011) Parkinson hastaları ve kontrol grubu arasında Purkinje hücre sayısında farklılık tespit etmemişlerdir. Rusholt ve arkadaşları (2020) da Parkinson hastalarına ait serebellumlarda, lobus cerebelli anterior, lobus cerebelli posterior, vermiş cerebelli ve lobus flocculonodularis'de stereolojik olarak Purkinje hücre

sayımı gerçekleştirmişler, belirtilen bölümlerde sayılan nöron sayıları ve toplam nöron sayısı açısından Parkinson hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptamamışlardır. Ek olarak, Cavalieri prensibi ile değerlendirdikleri hacim ölçümlerinde Parkinson hastası grupta serebellar beyaz cevher hacminin azaldığını ancak gri cevher hacminin kontrol grubundan farklı olmadığını bildirmişlerdir. Woodruff-Pak ve arkadaşlarının (2010) bulguları çalışmamızda kullandığımız yaş aralığında bulunan farelerde, stereolojik sayım bulgularımızı destekler şekilde, yaşlanmaya bağlı Purkinje hücrelerinin kaybının da anlamlı olmadığını bildirmektedir.

Sağ beyin hemisferinden 7 µm kalınlığında alarak, Luksol fast & Krezil viyole ve Bielschowsky ile boyadığımız kesitlerde histokimyasal olarak değerlendirdiğimiz parametrelere ait bulgularımız Tablo 21’de görülmektedir. Hippokampal bölümlerin nörodejenerasyon şiddetini değerlendirdiğimiz Luksol Fast & Krezil viyole boyalı kesitlerde P grubunda CA1’de yalnızca PM grubundan yüksek, CA4’de ise yalnızca CK ve K grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuç Parkinson hastalığında, rotenon ile indüklenen deneysel Parkinson hastalığı modelinde, hippocampus’un CA2-3 bölümünün dejenerasyona daha duyarlı olduğu çıkarımının yapılmasını sağlamaktadır. Ancak hippocampus’ta dejeneratif etmenlere en dirençli bölgenin CA2 olduğu bildirilmektedir (Dudek ve ark, 2016). Çalışmamızda CA2-3’ün daha yüksek bulunması, Parkinson hastalığında hippocampus’un tümüne etki eden dejeneratif etmenlerin dışında, CA2-3 bölümünün işlevsel olarak bağlantılı olduğu ve PH’nda disfonksiyon gösteren bölümlerin etkisi ya da CA2-3 bölümünde bulunan piramidal nöronlara spesifik bir nörodejeneratif mekanizmanın söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Foo ve ark (2017) CA2-3 atrofisinin PH’nın farklı nörodejeneratif basamaklarının değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olabileceğini bildirmişlerdir. Hippokampal piramidal nöronların stereolojik sayım bulguları sonuçlarını tartışırken de belirttiğimiz gibi, Parkinson hastalarında Mori ve ark (2003) CA2-3 bölümünde, Hall ve ark (2014), Lun Liu ve ark (2019) CA2 bölümünde Lewy cisimciklerinin yoğun olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Lewy cisimciklerinin CA2-3 bölümünde bulunması, serebral kortekste de bulunduğunun, dolayısıyla PH’nın şiddetinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Irwin ve ark, 2012; Lun Liu ve ark, 2019). Hippocampus CA2-3 bölümünde PH’nın erken dönemlerinde dahi, orta dereceli kognitif disfonksiyonu bulunan hastalarda atrofi görüldüğü bildirilmiş ve CA2-3 bölümündeki volüm azalışı, Parkinson hastalarının sağlıklı kontrollerden ayırımında toplam hippocampus volümüne kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir (Györfi ve ark, 2017; Uribe ve ark, 2018). Bunun yanında daha önce de belirtildiği gibi, PH yalnızca

dopaminerjik sisteme özgü bir patoloji olmaktan ziyade diğer nörotransmitter sistemleri, özellikle kolinerjik sistemi de etkilemektedir. Parkinson hastalarında nucleus basalis magnocellularis'in dejenerasyonu, hippocampus'ta intrinsik kolinerjik internöronların ve muskarinik reseptörlerin bulunması, CA2-3 bölümüne projekte olan Broca'nın diyagonal bandını oluşturan kolinerjik nöronların dejenerasyonu PH'nda hippokampal CA2-3 bölümünde nörodejenerasyonun daha şiddetli olmasının nedenleri arasında sayılabilir (Uribe ve ark, 2018; Lun Liu ve ark, 2019). Hippocampus CA2-3 atrofisi bulunan erken dönem Parkinson hastalarında L-DOPA sağaltımı kognitif disfonksiyon skorunu kısmen iyileştirirken, hippokampal atrofinin ilerlemesine etkisi bulunmamıştır (Györfi ve ark, 2017). Çalışmamızda CA1nd değeri rotenon uygulanan tüm gruplarda CK ve K gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunurken, CA4nd gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Györfi ve ark (2017) demans gösteren Parkinson hastalarında CA2-3 başta olmak üzere CA1 bölümünde kontrol grubuna kıyasla atrofi geliştiğini, CA4 bölümünde ise farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Tablo 21'de CA1nd histoskor değerlerimizin ortalamalarının CA4nd değerlerimizden oldukça düşük olduğu görülmektedir. Yamaguchi ve ark (2005) da çalışmamızın bulgularına benzer şekilde CA2-3 bölümünde nöronal dejenerasyon ve yoğun Lewy cisimcikleri tespit etmişler, CA1 bölümünde yalnızca inflamasyon göstergesi olarak gliyozisi tanımlamışlardır. Hippocampal CA4 bölümünde ise CA1'e göre gliyozis'in üç kat daha şiddetli olduğunu bildirmişlerdir. Parkinson hastalığında dejenere beyin bölgelerinde saptanan nöronal vakuolizasyon hastalığın patolojik sürecinde görülen inflamasyon ve oksidatif süreçlerin tetiklediği otofaji ile ilişkilendirilmektedir (Yakhine-Diop ve ark, 2017). Lewy cisimcikleri otofagozom formasyonunu bozarak otofajiyi inhibe etmekte, Parkinson hastalığının gelişimde rol oynayan genetik etmenlerden lizozomal fonksiyonları dolayısıyla otofaji regülasyonunu sağlayan LRKK2 ve hasarlı mitokondri yıkımından sorumlu PINK1 mutasyonu nedeniyle hücrel agregatlar yıkımlanamamakta, Resim 17 ve 18'de görülen çalışmamızda da P, PM, PB ve PBM gruplarında tespit ettiğimiz gibi, Parkinson hastalarında etkilenen beyin bölgelerinde anormal otofajik vakuollerin varlığı görülmektedir (Gomez-Sanchez, 2013; Surmeier ve Sulzer, 2013; Yakhine-Diop ve ark, 2017). Çalışmamıza benzer şekilde ratlarda rotenon ile indüklenmiş deneysel Parkinson hastalığında Khadrawy ve ark (2017), Abdel-Salam ve ark (2014) etkilenen beyin bölümlerinde nöronal dejenerasyon ve vakuolizasyon tespit etmişlerdir. Mesencephalon'da nöronal vakuolizasyona benzer şekilde CSb ve CSg histoskor değerlerimiz P, PM, PB ve PBM gruplarında CK ve K gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu. Yamaguchi ve ark Parkinson hastalarında (2005) temporal korteks ve entorhinal korteksle birlikte vakuolasyonun en şiddetli corpus striatum'da

görüldüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamıza benzer şekilde Abdel-Salam ve ark (2014), Khadrawy ve ark (2017), Maniyath ve ark (2017) ratlarda rotenon ile indükledikleri deneysel PH modelinde corpus striatum'da vakuolasyon ve gliyozisin oldukça şiddetli olduğunu belirtmişlerdir. Corpus striatum'da Thir pozitif liflerin kaybına bağlı ODcs'nin P grubunda diğer tüm gruplardan anlamlı olarak düşük bulunduğunu, PM, PB ve PBM gruplarında ise P grubundan yüksek, CK ve K gruplarından düşük olduğunu bildirmiştik. Benzer şekilde Bieslchowsky boyanmış kesitlerimizde corpus striatum'da sonlanan lif yoğunluğunun (CSf), azaldığını tespit ettik. Bu bulgu ODcs değerlerimizle tutarlılık göstermektedir. Gyrus dentatus'un stratum granulosum tabakasında bulunan granüler hücrelerin aksonlarının oluşturduğu Mossy lifleri hippocampus ve entorhinal korteks arasına bağlantıyı sağlarlar, normal öğrenme ve bellek gelişiminde önemli rol oynarlar. Bunun yanında BDNF gyrus dentatus granüler hücrelerinden yüksek seviyede eksprese edilir, nöronal gelişimi ve nöronal plastisiteyi düzenler (Danzer ve ark, 2008). Çalışmamızda Mossy lif yoğunluğu (MOy) PM, PB ve PBM grubunda CK ve K grubundan anlamlı olarak düşük, P grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum P grubunda Nhippocampus değerinin diğer tüm gruplardan düşük olarak bulunmasını desteklemektedir. Bunu yanında, daha önce de belirttiğimiz gibi probiyotik etkenler de santral sinir sisteminde BDNF sentezini arttırmaktadırlar (Sun ve ark, 2018; Srivastav ve ark, 2019).

Çalışmamızda intestinal homeostazisin sağlanmasında ve SSS ile olan etkileşimlerde önemli rolü olduğunu düşündüğümüz, ratlarda CD163 eksprese ettiği bilinen muskuler makrofajların akım sitometri analizinde, rotenon uygulaması yaptığımız P, PM, PB ve PBM gruplarında CD163 ekspresyonunun CK ve K gruplarına kıyasla oldukça artış gösterdiğini tespit ettik ($p<0,05$). Şekil 16'da yer alan grafikte görüleceği üzere PM grubu CD163 makrofajlarının yüzde ortalamaları P grubundan oldukça düşük bulundu. Probiyotik takviyesi uyguladığımız PB ve PBM gruplarının CD163 değerleri ile P grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Pey ve arkadaşları (2014) Alzheimer hastalarında frontal ve oksipital kortekste, Parkinson hastalarında beyin sapında, çoğu nöritik plakların etrafına kümelenmiş şekilde CD163 immunoreaktivitesi gösteren makrofajların artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Parkinson hastalarından ziyade Alzheimer hastalarında daha yoğun olarak tespit ettikleri, yüksek fagositik kapasiteye sahip CD163 pozitif hücrelerin artışı, Alzheimer hastalığında görülen ekstrasellüler amiloid β ve tau protein agregatlarının SSS'nin yerleşik makrofajları olan mikrogliyaların M2 polarizasyonunu daha etkin şekilde tetiklemiş olabileceğini belirtmişlerdir. Parkinson hastalığında görülen α -sinüklein agregatları intrasellüler

yerleşimlidir. Almeida ve ark (2016) 10 aylık ratlarda 2 mg/kg rotenon uygulamasının Alzheimer hastalığına benzer, SSS'de amiloid- β ve tau protein agregatları oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da Resim 25'de görüldüğü gibi histokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi sırasında hippocampus'ta ve corpus callosum'dan inen lifler arasında ekstrasellüler inkluzyonlar görüldü. Bunun yanında Pey ve ark (2014) KBB'de tespit ettikleri artış ve CD163 pozitif hücrelerin kan damarlarının çevresinde yoğunlaşmış olması nedeniyle SSS'de bulunan mikrogliaların farklılaşmasından ziyade, sistemik makrofaj infiltrasyonu nedeni ile CD163 ekspresyonunda artış gerçekleşmiş olabileceğini bildirmişlerdir. Nitekim Tentillier ve arkadaşları (2016) ratlarda tek taraflı striatal 6-OHDA enjeksiyonu ile oluşturdukları deneysel Parkinson modelinde, doku koruyucu M2 polarizasyonu gösteren CD163 makrofajlarının ekspresyonunu arttırmak amacı ile, CD163 makrofajlarını hedef alan deksametazon yüklenmiş lipozomların intravenöz uygulamasını takiben; lezyon oluşturulan corpus striatum'da yoğun CD163 ekspresyonu ve SNpc'da bulunan dopaminerjik nöronların daha az yıkımlandığını tespit etmişler, CD163 makrofajlarının nöronları yıkımdan koruduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak makrofaj hücre yüzeyinden CD163 antijeninin ayrılmasını sağlayan ADAM17 enzimi işlevini, oksidatif stres ve inflamatuvar mediyatörler tarafından Toll benzeri reseptör 2 ve 4'ün (TLR2, TLR4) aktive edilmesiyle gerçekleştirmektedir. Alfa sinüklein agregatları, doku hasarı ilişkili moleküler yolak (DAMP) yoluyla TLR4 aktivasyonunu sağlamaktadır. Swan ve ark (2017) plazmada sCD163 konsantrasyonunun artışının makrofaj aktivasyonunun bir belirtici olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla sCD163 da Parkinson hastalığında makrofaj aktivasyonu ve inflamasyon durumu ile ilgili bir belirteç olabilir. Nissen ve arkadaşları (2020) serebrospinal sıvıda hastalığın progresyonuna paralel ve kognitif disfonksiyon skoru ile negatif korelasyon gösteren sCD163 konsantrasyonunda artış tespit etmişlerdir. Serumda ise sCD163 yalnızca kadın Parkinson hastalarında yüksek bulunmuştur. Bu durum monositlerin makrofajlara farklılaşması sırasında immun sistemin cinsiyete bağlı farklı bir etmeden dolayı oluşan cevabı olarak düşünülebilir. Parkinson hastalığının erkeklerde kadınlardan sık görülmesinin nedenlerinden biri de cinsiyet ilişkili faktörlerin etkisine bağlı görülen immunolojik farklılıklar olabilir. Pek çok çalışma serebrospinal sıvıda ve serumda PH ile ilişkili immun biyobelirteçlerin değişimini rapor etmiştir. Parkinson hastalarında serumda IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF gibi hem pro-inflamatuvar hem anti-inflamatuvar mediyatörlerin artış gösterdiği, IFN- γ ise azaldığı bildirilmiştir. Nissen ve arkadaşları (2020) KBB geçirmenliğinde artışa neden olan, nöronlar, monositler ve astrositler tarafından üretilen IL-15'inde Parkinson hastalarında artış

gösterdiğini bildirmiştir. Ancak spesifik olarak hangi immün hücrelerin bu değişimlerden sorumlu olduğu belirsizdir.

Santral sinir sisteminde M2 polarizasyonu göstererek, nörodejenerasyonun önlenmesinde rolü olduğu gösterilen CD163 makrofajlarının, ratlarda intestinal dokuda fonksiyonuna ilişkin literatür bulguları oldukça sınırlıdır. Demetter ve ark (2005) inflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan hastalara ait kolon biyopsi örneklerinde Crohn hastalarında yoğun CD163 immunoreaktivitesi saptamışlar, buna karşın kontrol grubunda ve ülseratif kolit hastalarında oldukça zayıf immunoreaktivite tespit etmişlerdir. Franze ve ark (2013) ise hem Crohn hem de ülseratif kolit hastalarının kolon biyopsi örneklerinde akım sitometri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile CD163 mRNA ölçümü ve immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirdikleri mukozal CD163 makrofajlarının oldukça artış gösterdiğini, intestinal inflamasyonun şiddetinde ve sürdürülmesinde CD163 makrofajlarının rolü olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Swan ve ark (2017) patolojik özelliklerinden biri progresif intestinal hasar olan ve intestinal mikrobiyom dengesinin bozulduğu, immün yetmezlik virusu ile enfekte makak maymunlarında intestinal sistemde pro-inflamatuvar makrofajlarda artış saptamamışlar, aksine ileum'da artmış CD163 ekspresyonunu belirlemişlerdir. Kronik intestinal inflamasyonla karakterize bu hastalıklarda CD163 makrofajlarının artışı, BM için değerli bir demir kaynağı olan hp-hb kompleksinin atılımını arttırarak, intestinal floranın değişimine de katkı sağlamaktadır (Demetter ve ark, 2005). Mikrobiyal disbiyozis şiddetli şekilde M1 ve M2 polarizasyonu gösteren makrofajların ekspresyonunu arttırmaktadır. Aynı zamanda PH'nda enterik nöronlarda görülen alfa-sinüklein agregatlarının artışına da neden olmaktadır (Mihaila ve ark, 2019). Inoue ve ark (2019) 5 hafta süre ile vankomisin uyguladıkları farelerde, intestinal mikrobiyom değişiminin kolon makrofajlarının profili üzerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, M1 polarizasyonuna sahip CD80, M2 polarizasyonuna sahip CD163 makrofajlarının kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını, CD80 ekspresyonunun CD163 ekspresyonuna kıyasla daha fazla artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Deneysel Parkinson hastalığının oluşturulması amacı ile uygulanan rotenonun ise gastrointestinal sistem üzerine olan etkisi çalışmalar arasında farklılıklar göstermektedir. Pan-Montojo ve arkadaşları (2012) ratlarda yalnızca intragastrik yolla uygulanan rotenonun SNpc'da nörodejenerasyonla birlikte gastrointestinal sistemde de şiddetli patolojik değişimlere neden olduğunu bildirmişlerdir. Ancak Tasselli ve ark (2013) 4 hafta süresince oral rotenon (30 mg/kg/gün) uyguladıkları farelerde gastrointestinal geçiş süresi, proksimal

kolonda α -sinüklein agregatlarının yoğunluğu ve enterik nöron sayısı açısından kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık saptamamışlardır. Murakami ve arkadaşları (2015) ise farelerde 6 hafta (50 mg/kg/gün) süre ile subkutan olarak uyguladıkları rotenonun, plexus myentericus enterik nöronlarında Thir ve asetilkolinesteraz aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Greene ve ark (2009) da ratlarda 3 hafta süre ile 3 mg/kg/gün dozda subkutan rotenon uygulamasının SNpc dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu oluşturmak için yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Ancak rotenon uyguladıkları grupta proksimal kolon kas tabakasında 10 μ M serotonine yanıt olarak kontrol grubuna kıyasla %41 daha fazla izometrik kasılma kuvveti oluştuğunu, parasempatik enterik nöronlardaki işlev bozukluğu nedeni ile relaksasyonun ise %30 azaldığını bildirmişlerdir. Drolet ve ark (2009) da ratlarda 2 mg/kg/gün dozda, 6 hafta süre ile intraperitoneal olarak uyguladıkları rotenonun uzun süreli etkilerini inceledikleri çalışmalarında, rotenon uygulanan ratlarda son enjeksiyondan 6 ay sonrasında enterik nöronlarda α -sinüklein agregatlarının artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bahsedilen çalışmaların sonuçları rotenon uygulamasının kullanılan hayvanın cinsi ve yaşına, rotenonun uygulama yolu, dozu ve süresine bağlı patolojik belirteçlerin oldukça değiştiğini göstermektedir. Bu değişkenliklerin genellikle genç deney hayvanlarının kullanımı ile görüldüğü, erişkin ve yaşlı deney hayvanlarının deneysel PH'nı oluşturmada daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Canon ve ark, 2009). Rotenonun subkutan ve oral uygulamasının da etkileri oldukça değişkenlik göstermektedir, düşük dozda, 2 aya kadar uzayan s relerde intraperitoneal olarak uygulanmasının Parkinson hastalığının tüm patogenetik özellikleri ile oluşturulmasında en etkin yöntem olduğu bildirilmiştir (Cannon ve ark, 2009; Drolet ve ark, 2009; Duty ve Jenner, 2011). Üstelik Braak ve ark (2003)'nın Parkinson hastalığı patogenezinde ileri sürdükleri α -sinüklein agregatlarının intestinal yayılımını destekler şekilde, kronik rotenon uygulaması ile SSS'den önce enterik nöronlarda α -sinüklein agregatları tespit edilmektedir. Bu durum enterik nöronların rotenona daha duyarlı olduğunu göstermektedir (Duty ve Jenner, 2011; Viader ve ark, 2011; Murakami ve ark, 2015). Henüz SNpc dejenerasyonunun oluşmadığı aşamada enterik nöronların fonksiyonel değişimlerini bildiren Greene ve arkadaşlarının (2009) bulguları da bu bilgileri desteklemektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Johnson ve ark (2018) 4 hafta süresince, intraperitoneal yolla 2.75 mg/kg dozda rotenon uyguladıkları ratların kolon mikrobiyatısında, Parkinson hastası insanlarda yapılmış mikrobiyom analizlerine benzer şekilde toplam mikroorganizma sayısının oldukça artış gösterdiğini, özellikle *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinslerine ait bakterilerin ve potansiyel patojenik bir bakteri olan *Escherichia coli*'nin oldukça arttığını, *Lachnospiraceae* ve *Prevotellaceae* cinsine ait türlerin ise azaldığını bildirmişlerdir.

Li ve ark (2017) ratlarda gastrointestinal kanal mikrobiyotasının insanlara benzer olduğunu ve mikrobiyom çalışmaları için en uygun deney hayvanlarının ratlar olduğunu belirtmişlerdir. Parkinson hastalarının mikrobiyom analizinde en dikkat çekici değişim *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsi türlerin artarken *Prevotellaceae* cinsi türlerin azalmasıdır. Bu durum Parkinson hastalarında kandaki grelin seviyesinin azalması ile ilişkilendirilmektedir (Scheperjans ve ark, 2015; Johnson ve ark, 2018). Substantia nigra pars compacta DAerjik nöronlarında bulunan grelin reseptörlerinin mitokondriyal oksidatif stresi önleyen hücresel mekanizmaları aktive ederek, DAerjik nöronları yıkımdan koruduğu da bildirilmektedir (Andrews ve ark, 2009). İlk kez Polfliet ve ark (2006) ratlarda CD163 ekspresyonu gösteren peritoneal mekarofajların inflamatuvar özellik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Fabriek ve ark (2008) tarafından da makrofaj hücre yüzeyinde bulunan CD163 reseptörünün homeostatik ve anti-inflamatuvar etkilerinin yanında, gram negatif ve pozitif bakterileri bağlayarak, pro-inflamatuvar sitokin salınımını uyardığı ve konak savunmasında rol aldığı gösterilmiştir. Verilen bilgiler doğrultusunda kronik rotenon uygulaması ile Parkinson hastalığının indüklendiği ratlarda CD163 ekspresyonu gösteren poksimal kolon makrofajlarının, SSS’de görülen etkilerinden farklı olarak, intestinal sistemde bağırsak mikrobiyotası ile olan etkileşimleri sonucu pro-inflamatuvar özellik sergiledikleri söylenebilir. Çalışmamızda P grubunda CD163 ekspresyonunun aşırı artışını Fabriek ve ark (2008), Johnson ve ark (2018), Inoue ve ark (2019) bulgularının desteklediği şekilde mikrobiyal disbiyozisin tetiklemiş olduğunu, Swan ve arkadaşlarının (2017) önerdiği şekilde mikrobiyal disbiyozisi takiben görülen intestinal inflamasyon ve intestinal permeabilite artışına bir yanıt olarak, bölgeye makrofaj göçünü uyarmak ve fagositik kapasiteyi arttırmak amacı ile gerçekleşmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın bulguları probiyotik etkenlerin CD163 artışını azalttığını göstermektedir. Bu etki probiyotik etkenlerin mikrobiyal disbiyozis gelişimini önleyerek, intestinal inflamasyon gelişimi ve permeabilite artışını engelleyerek, PH’nda nörodejenerasyon ile sonuçlanan sistemik inflamasyon şiddetini azaltmalarıyla açıklanabilir. Nitekim probiyotik etkenler kolonik makrofajların anti-inflamatuvar polarizasyonunu uyarmaktadırlar. Çalışmamızda kullandığımız bakteriyel probiyotik içerisinde yer alan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus reuteri*’nin pro-inflamatuvar sitokin üretimini azalttıkları, *Bifidobacterium breve*’nin ise kolonik makrofajlardan IL-10 sekresyonunu arttırarak, *Saccharomyces boulardii*’nin ise intestinal permeabiliteyi azalttığı ve anti-inflamatuvar etki gösterdiği bilinmektedir (De Marco ve ark, 2018). Probiyotik etkenlerin belirtilen etkileri çalışmamızda CD163 ekspresyonu gösteren proksimal kolon makrofajlarının artışının, pro-inflamatuvar özellikte olduğu düşüncesini de

desteklemektedir. Ancak çalışmamızda probiyotik takviyesi alan gruplardan yalnızca PM grubunda CD163 ekspresyonu P grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Şekil 16’da görüleceği üzere PB ve PBM grubunun ortalama CD163 değerleri PM grubundan daha düşük olmasına rağmen, P grubu ile aralarında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu durum PB ve PBM gruplarında bir örneğin P grubuna benzer yüksek CD163 ekspresyonu göstermesi nedeniyle tespit edilmiş olup, maya ve bakteriyel kökenli probiyotik etkenler arasında olası antagonistik bir etkiden ziyade, her iki grubun ortak paydası olan bakteriyel kökenli probiyotik etkenlerin PH’nda görülen mikrobiyal değişime olası negatif etkileri nedeni ile görülmüş olabilir. Nitekim Mihaila ve ark (2019) *Lactobacillaceae* ailesine mensup, çalışmamızda kullandığımız bakteriyel probiyotik içerisinde de yer alan, bakteriyel probiyotiklerin özellikle *Lactobacillus reuteri*’nin feçeste artışının bradikinezi skoru ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. İn vitro olarak *Lactobacillus reuteri*’nin enterik nöronlardan alfa-sinüklein salınımını arttırdığı bildirilmektedir (Mihaila ve ark, 2019). Farelerde kronik *Lactobacillus rhamnosus* uygulamasının ise hippocampus, prefrontal korteks ve locus caeruleus gibi beyin bölgelerinde GABA_A reseptörleri arttırarak anksiyolitik davranışlara neden olduğu bildirilmiştir (Perez-Burgos ve ark, 2013). Bu bulgular *Lactobacillus* cinsine ait bakteriyel probiyotiklerin PH’nda probiyotik olarak kullanılmasına yönelik yararlarının ve zararlarının daha ayrıntılı çalışılması gerektiğini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Parkinson hastalığı kronik inflamasyonun eşlik ettiği, multisistem progresif bir hastalıktır. Post mortem yapılan pek çok araştırma, Parkinson hastalarında çeşitli beyin bölgelerinde gliyozis ve buna bağlı mikrogliyaların sayısında, morfolojisinde ve ekspresyon paterninde değişiklik saptamıştır. Bunun yanında Parkinson hastalığında santral sinir sistemi tutulumundan önce diğer organ ve sistemlerde de patolojik değişimler saptanmıştır. Dolayısıyla Parkinson hastalığında immun sistem aktivasyonu yalnızca beyin ile sınırlı değildir, sirkülasyona katılarak, santral sinir sisteminde fonksiyon gösteren immun hücrelerden ziyade, hastalığın patogenetik mekanizmalarında rol oynayan organ ve sistemlerde bulunan, lokal inflamatuvar ve anti-inflamatuvar reaksiyonları yöneten periferik immun hücrelerin aktivasyonunu da içermektedir. Araştırmamızda Parkinson hastalığının indüklendiği ratlarda proksimal kolonda bulunan, CD163 ekspresyonu gösteren makrofajların aşırı artış gösterdiğini, probiyotik uygulanan gruplarda ise CD163 makrofajları azalırken, hasta grubuna kıyasla nörodejeneratif bulguların, motor kondisyonun daha iyi durumda olduğunu tespit ettik. Ayrıca araştırmamızın sonuçları probiyotik etkenlerin CD163 ekspresyonunu değiştirdiğini, dolayısıyla bu hücrelerin aracılık ettiği immunolojik fonksiyonları etkilediğini göstermektedir. İnsanlarda ve benzer olarak ratlarda sıklıkla doku koruyucu, anti-inflamatuvar bir immun belirteç olarak değerlendirilen CD163 yüzey antijeni bulunan makrofajlar, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında olduğu gibi Parkinson hastalığında da, intestinal mikrobiyom ile olan etkileşimlerine bağlı pro-inflamatuvar karakteristik sergiliyor olabilirler. Parkinson hastalığını indüklediğimiz ratlarda CD163 makrofajların aşırı artışı mikrobiyal disbiyozisle ilişkili olabilir. İlk kez çalışmamızda gösterilmiş olan, Parkinson hastalığının indüklendiği ratlarda, proksimal kolonda CD163 ekspresyonu gösteren makrofajların aşırı artışına dayanarak, bu hücrelerin enterik sinir sistemi ve santral sinir sistemi etkileşiminde önemli yollardan biri olan immunolojik süreçlerin bir parçası olduğunu söyleyebiliriz.

Parkinson hastalığının erken dönemlerinde diagnostik kriterlerin yetersiz olması, motor belirtilerin gözlenmesinden sonra ise tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle son yıllarda yapılan araştırmalar, hastalığın patogenezinin aydınlatılmasını ve elde edilen bilgiler doğrultusunda erken teşhis ve tedavi kriterlerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan deneysel hayvan modellerinde öncelikle hastalığın patogenezinin uygun deneysel modellerin seçimi gerekmektedir. Ancak bahsettiğimiz üzere, hastalığın patogenezinin en yakın bulguları oluşturan kronik rotenon uygulamasının da, gastrointestinal sistem üzerine olan bulgularının çalışmalar arasında oldukça farklılık gösterdiği

görülmektedir. Hedefe yönelik araştırmaların doğru şekilde gerçekleştirilmesinde, kronik rotenon uygulamasında görülen değişken sonuçların, kullanılan deney hayvanının türü, cinsiyeti, yaşı, rotenonun uygulama yolu ve dozu gibi olası sebeplerinin standardizasyonuna yönelik daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. Enterik sinir sistemi ve santral sinir sistemi etkileşiminde rol alan çeşitli faktörlerin en önemlilerinden biri olarak sayılabilecek olan immun sistem ve intestinal dokuda bulunan immun hücreler ile probiyotik etkenlerin etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasında, özellikle mikroorganizma türüne spesifik daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Bunun yanında ratlarda intestinal makrofajların fenotipik karakteristikleri hakkında literatür bilgileri oldukça sınırlıdır. Ratlarda intestinal makrofajların fenotipik karakterizasyonunun aydınlatılmasına yönelik yapılacak daha kapsamlı çalışmalar da, intestinal sistemle ilişkili pek çok hastalığın patogenetik mekanizmalarının aydınlatılmasını ve klinik pratiğin geliştirilmesini amaçlayan deneysel araştırmalara fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, Grandinetti A, Blanchette PL, Popper JS, Ross GW. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001, 57, 456–462.

Abbott RD, Ross GW, White LR, Tanner CM, Masaki KH, Nelson JS, Curb JD, Petrovitch E. Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology* 2005, 65, 1442–1446.

Abdel-Salam O, Mohammed N, Youness E, Khadrawy Y, Omara E, Sleem, A. Cerebrolysin protects against rotenone-induced oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of Neurorestoratology* 2014, 2, 47-63.

Abdel-Salam OME, Sleem AA, Youness ER, Yassen NN, Shaffie N, El-Toumy SA. Capsicum Protects Against Rotenone-Induced Toxicity in Mice Brain Via Reduced Oxidative Stress and 5-Lipoxygenase Activation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology Research* 2018, 2(3), 60-77.

Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtomic sections. *The Anatomical Record* 1946, 94, 239-247.

Adiguzel E, Duzcan SE, Akdogan I, Tufan AC. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003, 2, 6-8.

Adler CH. Premotor Symptoms and Early Diagnosis of Parkinson's Disease. *International Journal of Neuroscience* 2011, 121(2), 3–8.

Ahn J, Lee JY, Kim TW, Yoon EJ, Oh S, Kim YK, Kim JM, Woo SJ, Kim KW, Jeon B. Retinal thinning associates with nigral dopaminergic loss in de novo Parkinson disease. *Neurology* 2018, 91 (11), e1003–e1012.

Ahn JHJ, Lee JS, Cho JH, Park J, Lee T, Song M, Kim H, Kang SH, Won MH, Lee, C. Age-dependent decrease of Nurrl protein expression in the gerbil hippocampus. *Biomedical Reports* 2018, 8, 517-522.

Aho VTE, Pereira PAB, Voutilainen S, Paulin L, Pekkonen E, Auvinen P, Scheperjan F. Gut microbiota in Parkinson's disease: Temporal stability and relations to disease progression. *EBioMedicine* 2019, 44, 691-707.

Akbayır E, Şen M, Ay U, Şenyer S, Tüzün E, Küçükali Cİ. Parkinson Hastalığının Etiyopatogenezi. *Deneysel Tıp Dergisi* 2017, 7(15), 1-23.

Alabi AO, Ajayi AM, Ben-Azu B, Omorobge O, Umukoro S. Methyl jasmonate ameliorates rotenone-induced motor deficits in rats through its neuroprotective activity and increased expression of tyrosine hydroxylase immunopositive cells. *Metabolic Brain Disease* 2019, 2019, 1-14.

Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: an Affective Neuroethological Perspective. *Brain Research Reviews* 2007, 56(2), 283-321.

Alikatte K, Palle S, Kumar JR, Pathakala N. Fisetin Improved Rotenone-Induced Behavioral Deficits, Oxidative Changes, and Mitochondrial Dysfunctions in Rat Model of Parkinson's Disease. *Journal of Dietary Supplements* 2020, 2020, 1-15.

[Almeida](#)MF, [Silva](#)CM, [D'Unhao](#)AM, [Ferrari](#) MFR. Aged Lewis Rats Exposed to Low and Moderate Doses of Rotenone Are a Good Model for Studying the Process of Protein Aggregation and Its Effects Upon Central Nervous System Cell Physiology. *Arq Neuropsiquiatr* 2016, 74(9), 737-744.

Amano S, Roemmich RT, Skinner JW, Hass CJ. Ambulation and Parkinson's disease. *Phys Med Physical Medicine and Rehabilitation Clinics in orth America* 2013, 24(2):371-92.

Andrews ZB, Erion D, Beiler R, Liu ZW, Abizaid A, Zigman J, Elsworth JD, Savitt JM, DiMarchi R, Tschoep M, Roth RH, Xiao-Bing G, Horvarth TL. Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *Journal of Neuroscience* 2009, 29, 14057–14065.

Arrigo A, Calamuneri A, Milardi D, Mormina E, Rania L, Postorino E, Marino S, Di Lorenzo G, Anastasi GP, Ghilardi MC, Aragona P, Qartarone A, Gaeta M. Visual system involvement in patients with newly diagnosed parkinson disease. *Radiology* 2017, 285 (3), 885–895.

[Avena](#) N, [Bocarsly](#) ME. Dysregulation of Brain Reward Systems in Eating Disorders: Neurochemical Information from Animal Models of Binge Eating, Bulimia Nervosa, and Anorexia Nervosa. *Neuropharmacology* 2012, 63(1), 87–96.

Avetisyan M, Roodd JE, Lopeza SH, Sengupta R, Wright-Jinf E, Dougherty JD, Behrend EM, Heuckeroth RO. Muscularis macrophage development in the absence of an enteric nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018, 115(8), 4696–4701.

Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders Treatment* 2016, 2(2), 2-4.

Bank PJM, Marinus J, Meskers CGM, de Groot JH, van Hilten JJ. Optical Hand Tracking: A Novel Technique for the Assessment of Bradykinesia in Parkinson's Disease. *Movement Disorders Clinical Practice* 2017, 4(6), 875–883.

Baradaran N, Tan SN, Liu A, Ashoori A, Palmer SJ, Wang ZJ, Oishi MMO, McKeown MJ. Parkinson's disease rigidity: relation to brain connectivity and motor performance. *Frontiers in Neurology* 2013, 4(1), 1-9.

Barbosa AF, Chen J, Freitag F, Valente D, Souza CO, Voos MC, Chien HF. Gait, posture and cognition in Parkinson's disease. *Dementia e Neuropsychologia* 2016, 10(4):280-286.

Barichella M, Marczevska AM, Mariani C, Landi A, Vairo A, Pezzoli G. Body weight gain rate in patients with Parkinson's disease and deep brain stimulation. *Movement Disorders* 2003, 18, 1337–1340.

Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2009, 24(11), 1641–1649.

Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, Simone C, Carbo A, Shaykhutdinov R, Jobin C, Arthur JC, Corl BA, Voge H, Storr M, Hontecillas R. Probiotic Bacteria Produce Conjugated Linoleic Acid Locally in the Gut That Targets Macrophage PPAR γ to Suppress Colitis. *Regulatory Mechanisms of Probiotic Bacteria* 2012, 7(2), e31238.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews* 2011, 63(1), 182–217.

Bellón T, Martínez V, Lucendo B, Peso G, Castro MJ, Aroeira LS, Bajo MA. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011, 26(9), 2995–3005.

Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B. Mds research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2015, 30, 1600–1611.

Best JA, H Nijhout F, Reed MC. Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2009, 6(21), 8-15.

Binienda ZK, Sarkar S, Mohammed-Saeed L, Gough B, Beaudoin MA, Ali SF, Paule MG, Imam SZ. Chronic exposure to rotenone, a dopaminergic toxin, results in peripheral neuropathy associated with dopaminergic damage. *Neuroscience Letters* 2013, 541, 233–237.

[Bisbal M](#), [Sanchez M](#). Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neuronal Regeneration Research* 2019, 14(5), 762-766.

Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences* 2007, 30(5), 194–202.

[Blesa J](#), [Phani S](#), [Jackson-Lewis V](#), [Przedborski S](#). Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 2012, 845618.

Bologna M, Guerra A, Paparella G, Giordo L, Fegatelli DA, Vestri AR, Rothwell JC, Berardelli A. Neurophysiological correlates of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain* 2018, 141, 2432–2444.

[Borghammer P](#), [Østergaard K](#), [Cumming P](#), [Gjedde A](#), [Rodell A](#), [Hall N](#), [Chakravarty MM](#). A Deformation-Based Morphometry Study of Patients With Early-Stage Parkinson's Disease. *European Journal of Neurology* 2010, 17(2), 314-20.

Bourdy R, Sanchez-Catalan MJ, Kauffling J, Balcita-Pedicino J, Freund-Mercier MJ, Veinante P, R Sesack S, Georges F, Barrot M. Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacology* 2014, 39, 2788–2798.

[Braak H](#), [Del Tredici K](#), [Rüb U](#), [de Vos RA](#), [Jansen Steur EN](#), [Braak E](#). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology Aging*, 2003, 24(2), 197-211.

Brimblecombe KR, Cragg SJ. The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chemical Neuroscience*, 2017, 8, 235–242.

[Buchta WC](#), [Regel AC](#). Chronic cocaine disrupts mesocortical learning mechanisms. *Brain Research* 2015, 1628, 88-103.

Caligiore D, Helmich RC, Hallett M, Moustafa AA, Timmermann L, Toni I, Baldassarre G. Parkinson's disease as a system-level disorder. *npj Parkinson's Disease* 2016, 2, 16025-16030.

Camicioli R, Moore MM, Kinney A, Corbridge E, Glassberg K, Kaye JA. Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy. *Movement Disorders* 2003, 18(7), 784-790.

Caminiti SP, Presotto L, Baroncini D, [Garibotto V](#), [Moresco RM](#), [Gianolli L](#), [Volonté MA](#), [Antonini A](#), [Perani D](#). Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease. *Neuroimage: Clinical-Journal* 2017, 14, 734-740.

Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiological Disease* 2009, 34(2), 279-290.

Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology Health and Disease* 2015, 26, 26191.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature* 1957, 180(4596), 1200-1200.

Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *Journal of Parkinson's Disease* 2019, 9, 501-515.

Cersosimo M. Gastrointestinal Biopsies for the Diagnosis of Alpha-Synuclein Pathology in Parkinson's Disease. *Gastroenterology Research and Practice* 2015, 2(4), 9-16.

Cersosimo MG, Raina GB, Pellene LA, Micheli FE, Calandra CR, Maiola R. Weight Loss in Parkinson's Disease: The Relationship with Motor Symptoms and Disease Progression. *BioMed Research International* 2018, 2018, 1-6.

Chen Z, Li G, Liu J. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: Implications for pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Neurobiology of disease* 2020, 134, 1-18.

Cheng Z, Zhang J, He N, Li Y, Wen Y, Xu H, Tang R, Jin Z, Haacke EM, Yan F, Qian, D. Radiomic Features of the Nigrosome-1 Region of the Substantia Nigra: Using Quantitative Susceptibility Mapping to Assist the Diagnosis of Idiopathic Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2019, 11(167), 1-11.

Cipriani G, Gibbons SJ, Kashyap PC, Farrugia G. Intrinsic Gastrointestinal Macrophages: Their Phenotype and Role in Gastrointestinal Motility. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2016, 2(2), 120-130.

Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, Bourreille A, Le Dily S, Vavasseur F, Heymann MC, Neunlist M, Derkinderen P. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 2015, 3(12), 1-9.

Cosgrove J, Alty JE. Cognitive deficits in Parkinson's disease: current perspectives. *Research and Review of Parkinsonism* 2018, 5, 1-11.

Cosgrove KP, Esterlis I, McKee SA, Bois F, Seibyl JP, Mazure CM, Krishnan-Sairn S, Staley JK, Picciotto SR, O'Malley SS. Sex differences in availability of $\beta 2^*$ -nicotinic

acetylcholine receptors in recently abstinent tobacco smokers. *Archives of General Psychiatry* 2012, 69, 418–427.

Cruz-Orive LM. Stereology: A histological Survey. *Image Analysis & Stereology* 2017, 36, 153-77.

Cumming K, Macleod AD, Myint PK, Counsell CE. Early weight loss in parkinsonism predicts poor outcomes. *Neurology* 2017, 89(22), 2254–2261.

Curtis MA, Low VF, Faull RL.M. Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: A comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. *Developmental Neurobiology* 2012, 72(7), 990–1005.

Dahlstroem A, Fuxe K. 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 physiologica Scandinavica* 1964, (232), 1-55.

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. *Brain* 1999, 122(8), 1421–1436.

Danzer SC, Kotloski RJ, Walter C, Hughes M, McNamara JO. Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus* 2008, 18(7), 668–678.

Darbinyan LV, Hambardzumyan LE, SimonyanKV, ChavushyanVA, ManukyanLP, BadalyanSA, KhalajiN, Sarkisian VH. Protective Effects of Curcumin Against Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease: In Vivo Electrophysiological and Behavioral Study. *Metabolic Brain Disease* 2017, 32(6), 1791-1803.

Daubner S, Le T, Wang S. Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2011, 508(1), 1–12.

De Marco S, Sichetti M, Muradyan D, Piccioni M, Traina G, Pagiotti R, Pietrella D. Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *Evid Based Complement Alternative Medicine* 2018, 2018, 1756308.

DeLong M, Wichmann T. Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clinical EEG and Neuroscience* 2010, 41(2), 61–67.

DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *Parkinson's Disease and Its Management* 2015, 40(8), 504-511.

Demetter P, Van Huysse JA, Baeten D, Ferdinanda L, Peeters H, Mielants H, Veys EM, De Keyser F, Cuvelier CA. Colon mucosa of patients both with spondyloarthritis and Crohn's disease is enriched with macrophages expressing the scavenger receptor CD163. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005, 64(2), 321–324.

Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood–Brain Barrier Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease: Implications for Drug Therapy. *Cell Transplantation* 2007, 16(3), 285–299.

[Desplats P](#), [Lee HJ](#), [Bae EJ](#), [Patrick C](#), [Rockenstein E](#), [Crews L](#), [Spencer B](#), [Masliah E](#), [Lee SJ](#). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, 106(31), 13010-13015.

[Devos D](#), [Lebouvier T](#), [Lardeux B](#), [Biraud M](#), [Rouaud T](#), [Pouclet H](#), [Coron E](#), [Bruley des Varannes S](#), [Naveilhan P](#), [Nguyen JM](#), [Neunlist M](#), [Derkinderen P](#). Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2013, 50, 42–48.

[Dickson DW](#). Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine* 2012, 2(8), 9258-9265.

[Dijkstra CD](#), [Döpp EA](#), [Joling P](#), [Kraal G](#). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985, 54 (3): 589-99.

[Doorn KJ](#), [Drukarch B](#), [van Dam AM](#), [Lucassen PJ](#). Hippocampal Proliferation Is Increased in Presymptomatic Parkinson's Disease and due to Microglia. *Hindawi Publishing Corporation Neural Plasticity* 2014, 2014, 1-13.

[Doty RL](#). The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable?. *Annals of Neurology* 2008; 63: 7–15.

[Drolet RE](#), [Cannon JR](#), [Montero L](#), [Greenamyre JT](#). Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiology of Disease* 2009, 36, 96–102.

[Durmus B](#), [Baysal O](#), [Altinayar S](#), [Altay Z](#), [Ersoy Y](#), [Ozcan C](#). Lower extremity isokinetic muscle strength in patients with Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 2010, 17, 893–896.

[Duty S](#), [Jenner P](#). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology* 2011, 164(4), 1357–1391.

[Erdeniz B](#), [Selvaraj D](#), [Bulut M](#). Neuroanatomy of Postural Stability: Links to Parkinson's Disease. *Turkish Journal of Neurology* 2019, 25, 1-6.

[Erickson JT](#), [Brosenitsch TA](#), [Katz DM](#). Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *Journal of Neuroscience* 2001, 21, 581–589.

[Ermine CM](#), [Wright JL](#), [Frausin S](#), [Kauhausen JA](#), [Parish CL](#), [Stanic D](#), [Thompson LH](#). Modelling the Dopamine and Noradrenergic Cell Loss That Occurs in Parkinson's Disease and the Impact on Hippocampal Neurogenesis. *Hippocampus* 2018, 28(5), 327-337.

[Erro R](#), [Pappatà S](#), [Amboni M](#), [Viciomini C](#), [Longo K](#), [Santangelo G](#), [Picillo M](#), [Vitale C](#), [Moccia M](#), [Giordano F](#), [Brunetti A](#), [Pellecchia MT](#), [Salvatore M](#), [Barone P](#). Anxiety is associated with striatal dopamine transporter availability in newly diagnosed untreated Parkinson's disease patients. *Parkinsonism and Related Disorders* 2012, 18(9), 1034-1038.

[Etzerodt A](#), [Moestrup SK](#). CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013, 18(17), 2352–2363.

Everard A, Matamoros S, Geurts L, Delzenne NM, Cani PD. *Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic *db/db* Mice. *mBio* 2014, 5(3), 1011-1014.

Fabbri M, Reimão S, Carvalho M, Nunes RG, Abreu D, Guedes LC, Ferreira J J. Substantia Nigra Neuromelanin as an Imaging Biomarker of Disease Progression in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 2017, 7(3), 491–501.

Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RPM, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 2008, 113(4), 887–892.

Fahn S. The 200-year journey of Parkinson disease: Reflecting on the past and looking towards the future. *Parkinsonism and Related Disorders* 2018, 46, 1-5.

Filippo M, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Rossi A, Calabresi P. The endocannabinoid system in Parkinson's disease. *Current Pharmacological Design* 2008, 14(23), 2337-2347.

Fitzgerald E, Murphy S, Martinson HA. Alpha-Synuclein Pathology and the Role of the Microbiota in Parkinson's Disease. *Frontiers Neuroscience* 2019, 24, 361-369.

Foo H, Mak E, Chander RJ, Ng A, Au WL, Sitoh YY, Tan LCS, Kandiah N. Associations of hippocampal subfields in the progression of cognitive decline related to Parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical* 2017, 14, 37–42.

Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, Estes JD, Dodiya HB, Keshavarzian A. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* 2011, 6(12), e28032.

Frank GK. Could dopamine agonists aid in drug development for anorexia nervosa? *Frontiers Nutrition* 2014, 3(1), 19-25.

Franzè E, Caruso R, Stolfi C, Sarra M, Cupi ML, Caprioli F, Monteleone I, Zorzi F, De Nitto D, Colantoni A, Biancone L, Pallone F, Monteleone G. Lesional Accumulation of CD163-Expressing Cells in the Gut of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* 2013, 8(7), e69839.

Frazzitta G, Ferrazzoli D, Maestri R, Roveskala R, Guaglio G, Bera R, Volpe D, Pezzoli G. Differences in Muscle Strength in Parkinsonian Patients Affected on the Right and Left Side. *PLoS One* 2015, 10(3), e0121251.

Gabanyi I, Muller PA, Feighery L, Oliveira TY, Costa-Pinto FA, Mucida D. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* 2016, 164(3), 378–391.

Gaffo AL, Roseman JM, Jacobs DR, Lewis CE, Shikany JM, Mikuls TR, Jolly PE, Saag KG. Serum urate and its relationship with alcoholic beverage intake in men and women: findings from the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) cohort. *Annals of Rheumatic Disease* 2010, 69, 1965–1970.

Gagne JJ, Power MC. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology* 2010, 74(12), 995-1002.

Galdeano CM, Cazorla SI, Dumit JLM, Vélez E, Perdigón G. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2019, 74, 115–124.

Gao C, Smith S, Lones M, Jamieson S, Alty J, Cosgrove J, Zhang P, Liu J, Chen Y, Du J, Cui S, Zhou H, Chen, S. Objective assessment of bradykinesia in Parkinson's disease using evolutionary algorithms: clinical validation. *Translational Neurodegeneration* 2018, 7(18), 1-8.

Gerfen CR. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends in Neurosciences* 2000, 23, S64–S70.

Getz SJ, Levin B. Cognitive and Neuropsychiatric Features of Early Parkinson's Disease. *Archives of Clinical Neuropsychology* 2017, 32, 769–785.

Giguère N, Burke-Nanni S, Trudeau LE. On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neurology* 2018, 9, 455-463.

Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, Trotta MC, Elisei W, Penna A, Lecca PG, Picchio M, Tursi A. Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *Journal of Immunology Research* 2015, 501361.

Gironell A, Pascual-Sedano B, Aracil I, Mari'n-Lahoz J, Pagonabarraga J, Kulisevsky J. Tremor Types in Parkinson Disease: A Descriptive Study Using a New Classification. *Parkinson's Disease* 2018, 1, 1-5.

Girotra T, Mahajan A, Sidiropoulos C. Levodopa Responsive Parkinsonism in Patients with Hemochromatosis: Case Presentation and Literature Review. *Case Reports in Neurological Medicine* 2017, 2017, 5146723.

Glizer D, MacDonald PA. Cognitive Training in Parkinson's Disease: A Review of Studies from 2000 to 2014. *Parkinson's Disease* 2016, 1, 5-19.

Goedert M, Jakes R, Spillantini MG. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *Journal of Parkinson's Disease* 2017, 7(1), 51-69.

Goetz CG. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine* 2011, 1, 1-15.

Gomez-Sanchez AR, Gomez-Sanchez-Erviti L, Bravo-San Pedro L, Pizarro-Estrella E, Niso-Santano M, Fuentes MJ. Autophagy: A Possible Defense Mechanism in Parkinson's Disease? *New Insights into Toxicity and Drug Testing* 2013, 8, 177-194.

Gorecki AM, Preskey L, Bakeberg MC, Kenna JE, Gildenhuis C, MacDougall G, Dunlop SA, Mastaglia FL, Akkari PA, Koengten F, Anderton RS. Altered Gut Microbiome in Parkinson's Disease and the Influence of Lipopolysaccharide in a Human α -Synuclein Over-Expressing Mouse Model. *Frontiers Neuroscience* 2019, 13, 839-845.

Gökçal E, Gür VE, Selvitop R, Babacan Yıldız G, Asil T. Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease: Effects on Quality of Life. *Archives of Neuropsychiatry* 2017, 54, 143-148.

[Grace AA](#), [Onn SP](#). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *The Journal of Neuroscience* 1989, 9(10), 3463-3481.

Graversen JH, Moestrup SK. Drug Trafficking into Macrophages via the Endocytotic Receptor CD163. *Membranes* 2015, 5, 228-252.

Gray MT, Woulfe JM. Striatal Blood–Brain Barrier Permeability in Parkinson’s Disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2015, 35(5), 747–750.

Greene JG, Noorian AR, Srinivasan S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson’s disease. *Experimental Neurology* 2009, 218(1), 154–161.

Greenfield JG, Bosanquet FD. The Brainstem Lesions in Parkinsonism. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1953, 16, 213-218.

Griebel BDC, Blanchard GRJ. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001, 25, 205-218.

[Grochowska M](#), [Laskus T](#), [Radkowski M](#). Gut Microbiota in Neurological Disorders. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2019, 67, 375–383.

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR and Pakkenberg B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988, 96, 857-881.

Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* 1987, 147(Pt3), 229-63.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy* 1977, 111(2), 219–223.

Györfi O, Nagy H, Bokor M, Moustafa AA, Rosenzweig I, Kelemen O, Kéri, S. Reduced CA2–CA3 Hippocampal Subfield Volume Is Related to Depression and Normalized by 1-DOPA in Newly Diagnosed Parkinson’s Disease. *Frontiers in Neurology* 2017, 8,1-8.

Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay SA, Fleischmann J, Sildburn PA, Johnston AN, Mellick GD, Herting B, Reichmann H, Hummel T. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease—a multicenter study. *Parkinsonism Related Disorders* 2009, 15, 490-494.

Haikal C, Chen QQ, Li JY. Microbiome changes: an indicator of Parkinson’s disease? *Translational Neurodegeneration* 2019, 8 (38), 1-9.

Hall H, Reyes S, Landeck N, Bye C, Leanza G, Double K, Thompson L, Halliday G, Kirik D. Hippocampal Lewy pathology and cholinergic dysfunction are associated with dementia in Parkinson’s disease. *Brain* 2014, 137, 2493–2508.

Hasan W, Kori RK, Jain J, Yadav RS, Jat D. Neuroprotective effects of mitochondria-targeted curcumin against rotenone-induced oxidative damage in cerebellum of mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2019, 34(1), 1-8.

Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 1980, 13(3), 453-6.

Helmich RC, Hallett M, Deuschl G, Toni I, Bloem BR. Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits?. *Brain* 2012, 135(11), 3206–3226.

Heidari Z, Moghtaderi A, Mahmoudzadeh-Sagheb M, Gorgich EAC. Stereological Evaluation of the Brains in Patients with Parkinson's disease Compared to Controls. *Revista Română de Medicină de Laborator* 2017, 2(3), 266-274.

Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, Broughton E, Hagan H, Carroll C. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica* 2013, 127(2), 235–241.

Hirsch EC, Mouatt A, Faucheux B, Bonnet AM, Javoy-Agid F, Graybiel AM, Agid Y. Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. *Lancet* 1992;340:125–6.

Hobson DE. Asymmetry in parkinsonism, spreading pathogens and the nose. *Parkinsonism & Related Disorders* 2012, 18(1), 1–9.

Holmqvist S, Bousset CO, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, Wang ZY, Roybon L, Melki R, Li JY. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathologica* 2014, 128(6), 805-820.

Hornykiewicz O. A brief history of levodopa. *Journal of Neurology* 2010, 257, 249–252.

Hsieh TH, Kuo CW, Hsieh KH, Shieh MJ, Peng CW, Chen YC, Chang YL, Huang YZ, Chen CC, Chang PK, Chen K, Chen HY. Probiotics Alleviate the Progressive Deterioration of Motor Functions in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Brain Sciences* 2020, 10(4), 206.

Hu Q, Wang H. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration* 2016, 1, 5-14.

Huang D, Xu J, Wang J, Tong J, Bai X, Li H, Wang Z, Huang Y, Wu Y, Yu M, Huang F. Dynamic Changes in the Nigrostriatal Pathway in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* 2017, 1, 1-7.

Inoue Y, Fukui H, Xu X, Ran Y, Tomita T, Oshima T, Watari J, Miwa H. Colonic M1, macrophage is associated with the prolongation of gastrointestinal motility and obesity in mice treated with vancomycin. *Molecular Medicine Reports* 2019, 19(4), 2591-2598.

Irwin DJ, White MT, Toledo JB, Xie SX, Robinson JL, Van Deerlin V, Lee VMY, Leverenz JB, Montine TJ, Duda J, Hurtig HI, Trojanowski JQ. Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Annals of Neurology* 2012, 72(4), 587–598.

Isacson SH, Skettini J. Neurogenic orthostatic hypotension in Parkinson's disease: evaluation, management, and emerging role of droxidopa. *Vascular Health and Risk Management* 2014, 10, 169–176.

Isidro RA, Lopez A, Cruz ML, Gonzalez Torres MI, Chompre G, Isidro AA, Appleyard CB. The Probiotic VSL#3 Modulates Colonic Macrophages, Inflammation, and Microflora in Acute Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2017, 65(8), 445–461.

Jackson CR, Ruan GX, Aseem F, Abey J, Gamble K, Stanwood G, Palmiter RD, Luvone PM, McMahon DG. Retinal Dopamine Mediates Multiple Dimensions of Light-Adapted Vision. *Journal of Neuroscience* 2012, 32(27), 9359–9368.

Jellinger KA. Neuropathology of sporadic PD disease: evaluation and change of concepts. *Movement Disorders* 2012, 27, 8–30.

Jia F, Song N, Zhao C, Xie J, Jiang H. Unexpected Improvements of Spatial Learning and Memory Abilities in Chronic Rotenone Intoxicated Mice. *Plos One* 2014, 9(3), e91641.

Jimshelashvili S, Dididze M. Neuroanatomy, Cerebellum (1st ed), StatPearls Publishing, 2019, 1-10.

Joelving FC, Billeskov R, Christensen JR, West M, Pakkenberg B. Hippocampal neuron and glial cell numbers in Parkinson's disease—A stereological study. *Hippocampus* 2006, 16(10), 826-833.

Johnson ME, Bobrovskaya L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene–environment interactions. *NeuroToxicology* 2015, 46, 101–116.

Johnson ME, Stringer A, Bobrovskaya L. Rotenone induces gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology* 2018, 65, 174–185.

Kakinuma S, Nogaki H, Pramanik B, Morimatsu M. Muscle weakness in Parkinson's disease: isokinetic study of the lower limbs. *European Journal of Neurology* 1998, 39, 218–222.

Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RKB. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of α -synuclein staging. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2008, 34(3), 284–295.

Kang Y, Cai Y. The development of probiotics therapy to obesity: a therapy that has gained considerable momentum. *Hormones* 2018, 17(2), 141–151.

Karakatsani ME, Blesa J, Konofagou EE. Blood–brain barrier opening with focused ultrasound in experimental models of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2019, 2019, 1-10.

Karen M, Yuksel O, Akyurek N, Ofluoglu E, Caglar K, Sahin TT, Pasaoglu H, Memis L, Akyurek N, Bostanci H. Probiotic Agent *Saccharomyces boulardii* Reduces the Incidence of Lung Injury in Acute Necrotizing Pancreatitis Induced Rats. *Journal of Surgical Research* 2010, 160, 139–144.

[Kashihara K.](#) Weight loss in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 2006, 253(7), 38-41.

[Kawase Y](#), [Hasegawa K](#), [Kawashima N](#), [Horiuchi E](#), [Ikeda K](#). Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: Benefits of quantitative odorant examination. *International Journal of General Medicine* 2010, 21(3), 181-185.

[Kelesidis T](#), [Pothoulakis C](#). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2012, 5(2), 111–125. Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA, USA

[Keshavarzian A](#), [Green SJ](#), [Engen PA](#), [Voigt RM](#), [Naqib A](#), [Forsyth CB](#), [Mutlu E](#), [Shannon KM](#). Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2015, 30(10), 1351-1360.

Khadrawy YA, Salem AM, El-Shamy KA, Ahmed EK, Fadl NN, Hosny EN. Neuroprotective and Therapeutic Effect of Caffeine on the Rat Model of Parkinson's Disease Induced by Rotenone. *Journal of Dietary Supplements* 2017, 14(5), 553-572.

KimR, YooD, JungYJ, HanK, Lee JY. Sex Differences in Smoking, Alcohol Consumption, and Risk of Parkinson's Disease: A Nationwide Cohort Study. *Parkinsonism and Related Disorders* 2019, 71, 60-65.

[Kim SD](#), [Allen NE](#), [Canning CG](#), [Fung VS](#). Postural instability in patients with Parkinson's disease. Epidemiology, pathophysiology and management. *CNS Drugs* 2013, 27(2), 97-112.

Kivrak EG, Altunkaynak BZ, Alkan I, Yurt KK, Kocaman A, Onger ME. Effects of 900-MHz radiation on the hippocampus and cerebellum of adult rats and attenuation of such effects by folic acid and Boswellia sacra. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 2017, 5, 216-224.

Kroemer NB, Guevara A, Ciocanea-Teodorescu I, Wuttig F, Kobiella A, Smolka MN. Balancing reward and work: Anticipatory brain activation in NAcc and VTA predict effort differentially. *NeuroImage*, 2014, 102, 510–519.

Lafreniere D, Mann N. Anosmia: loss of smell in the elderly. *Otolaryngologic Clinics of North America* 2009, 42, 123–131.

Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine* 2012, 2(12), a009621.

Langston JW. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of Neurology* 2006, 59, 591–596.

Lee HM, Koh SB. Many Faces of Parkinson's Disease: Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders* 2015, 8(2), 92-97.

[LeeHY](#), [Park JH](#), [Seok SH](#), [Baek MW](#), [Kim DJ](#), [Lee KE](#), [Paek KS](#), [Lee Y](#), [ParkJH](#). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, 1761(7), 736-744.

[Lee JH](#), [Baek SY](#), [Song Y](#), [Lim S](#), [Lee H](#), [Nguyen MP](#), [Kim EJ](#), [Huh GY](#), [Chun SY](#), [Cho H](#). The Neuromelanin-related T2 Contrast in Postmortem Human Substantia Nigra with 7T MRI. *Scientific Reports* 2016, 6(6), 32647-32658.

Lee YH, Cha J, Chung SJ, Yoo HS, Sohn YH, Ye BS, Lee PH. Beneficial effect of estrogen on nigrostriatal dopaminergic neurons in drug-naïve postmenopausal Parkinson's disease. *Scientific Reports* 2019, 9(1), 10531-10540.

[Lee JM](#), [Kim TW](#), [Park SS](#), [Han JH](#), [Shin MS](#), [Lim BV](#), [Kim SH](#), [Baek SS](#), [Cho YS](#), [Kim KH](#). Treadmill Exercise Improves Motor Function by Suppressing Purkinje Cell Loss in Parkinson Disease Rats. *International Neurology Journal* 2018, 22(3), 147-155.

Leentjens AF, Van den Akker M, Metsemakers JF, Lousberg R, Verhey FR. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Movement Disorders* 2003, 18, 414–418.

Lees AJ, Tolosa E, Olanow CW. Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias and Melvin Yahr. *Movement Disorders* 2014, 30(1), 19–36.

[Leranth C](#), [Roth RH](#), [Elsworth JD](#), [Naftolin F](#), [Horvath TL](#), [Redmond DE](#). Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory. *Journal of Neuroscience* 2000, 20(23), 8604–8609.

Li W, Wu X, Hu X, Wang T, Liang S, Duan Y, Jin F, Qin B. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Science China Life Sciences* 2017, 1, 1–11.

Lionnet A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Murayama S, Takao M, Adler CH, Derkinderen P, Beach TG. Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathologica* 2018, 135(1), 1–12.

Liu B, Fang F, Pedersen NL, Tillander A, Ludvigsson JF, Ekbom A, Wirdefeldt, K. Vagotomy and Parkinson disease. *Neurology* 2017, 88(21), 1996–2002.

Lorefält B, Ganowiak W, Pålhagen S, Toss G, Unosson M, Granérus AK. Factors of importance for weight loss in elderly patients with Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 2004, 110, 180–187.

Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience* 2002, 3(12), 932–942.

Louis ED, Tang MX, Cote L, Alfaro B, Mejia H, Marder K. Progression of parkinsonian signs in Parkinson disease. *Archives of Neurology* 1999, 56, 334–337.

Ludtmann MHR, Abramov A. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 2018, 663, 86–90.

Lun Liu AK, Chau TW, Lim EJ, Ahmed I, Chang RCC, Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RKB. Hippocampal CA2 Lewy pathology is associated with cholinergic degeneration in Parkinson's disease with cognitive decline. *Acta Neuropathologica Communications* 2019, 7(61), 1–13.

Luo SX, Huang EJ. Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways From Neurogenesis to Circuit Assembly. *The American Journal of Pathology* 2016, 186(3), 478–488.

[Lyons DJ](#), [Hellysaz A](#), [Broberger C](#). Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *Journal of Neuroscience* 2012, 32(23), 8074–8083.

Ma K, Xiong N, Shen Y, Han C, Liu L, Zhang G, Wang L, Guo S, Guo X, Xia Y, Wan F, Huang J, Lin Z, Wang T. Weight Loss and Malnutrition in Patients with Parkinson's Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2018, 10(1), 1–19.

Malek N, Swallow DMA, Grosset KA, Lawton MA, Smith CR, Bajaj NP, Barker RA, Ben-Shlomo Y, Bresner C, Burn DJ, Foltynie T, Morris HR, Williams N, Wood NW,

Grosset DG. Olfaction in Parkinson's single and compound heterozygotes in a cohort of young onset Parkinson's disease patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 2015, 134(4), 271–276.

Mandarim-De-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2003, 75(4), 469-486.

Maniyath SP, Solaiappan N, Rathinasamy M. Neurobehavioural Changes in a Hemiparkinsonian Rat Model Induced by Rotenone. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2017, 1(3), 01-05.

Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda SN, Gerwig M, Habas C, Hagura N, Ivry RB, Mariën P, Molinari M, Naito E, Nowak DA, Oulad Ben Taib N, Pelisson D, Tesche CD, Tilikete C, Timmann D. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum* 2012, 11(2), 457-87.

Marella M, Seo BB, Yagi T, Matsuno-Yagi A. Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndi1 therapy. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2009, 41(6), 493–497.

[Marella M](#), [Seo BB](#), [Nakamaru-Ogiso E](#), [Greenamyre JT](#), [Matsuno-Yagi A](#), [Yagi T](#). Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2008, 3(1), 18-25.

Marras C, Saunders-Pullman R. The Complexities of Hormonal Influences and Risk of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 2014, 29(7), 845–848.

Marsh L. Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2013, 13(12), 409-415.

Massey L, Miranda M, Al-Helli O, Parkes H, Thornton J, So PW, White MJ, Mancini L, Strand C, Holton J, Lees AJ, Revesz T, Yousry T. 9.4 T MR microscopy of the substantia nigra with pathological validation in controls and disease. *NeuroImage: Clinical* 2017, 13, 154–163.

Matheis M, Muller PA, Graves CL, Gabanyi I, Kerner ZJ, Costa-Borgnes D, Ahrends T, Rosenstiel P, Mucida D. Adrenergic Signaling in Muscularis Macrophages Limits Infection-Induced Neuronal Loss. *Cell* 2020, 180, 64-78.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988, 38(8), 1285–1291, 1988.

Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling* 2013, 11(34), 1-18.

Melka D, Tafesse A, Bower JH, Assefa D. Prevalence of sleep disorders in Parkinson's disease patients in two neurology referral hospitals in Ethiopia. *BMC Neurology* 2019, 19, 205-210.

Merola A, Romagnolo A, Rosso M, Suri R, Berndt Z, Maule S, Lopiano L, Espay AJ. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: A prospective cohort study. *Movement Disorders* 2017, 33(3), 391–397.

Meroni E, Stakenborg N, Viola MF, Boeckxstaens GE. Intestinal macrophages and their interaction with the enteric nervous system in health and inflammatory bowel disease. *Acta Physiologica* 2018, 1, e13163.

Mihaila D, Donegan J, Barns S, LaRocca D, Du Q, Zheng D, Middleton FA. The oral microbiome of early stage Parkinson's disease and its relationship with functional measures of motor and non-motor function. *PLoS One* 2019, 14(6), e0218252.

Milardi D, Quartarone A, Bramanti A, Anastasi G, Bertino S, Basile GA, Buonasera P, Pilone G, Celeste G, Rizzo G, Bruschetta D, Cacciola A. The Cortico-Basal Ganglia-Cerebellar Network: Past, Present and Future Perspectives. *Frontiers in Systems Neuroscience* 2019, 13(61), 1-14.

Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis* 2012, 53(2), 100–108.

Milner TA, Bacon CE. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *Journal of Comparative Neurology* 1989, 281(3), 479–495.

Miraglia F, Colla E. Microbiome, Parkinson's Disease and Molecular Mimicry. *Cells* 2019, 8(3), 222-229.

Mirdamadi JL. Cerebellar role in Parkinson's disease. *Journal of Neurophysiology* 2016 116(3), 917–919.

Mishra A, Singh S, Shukla S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *Journal of Experimental Neuroscience* 2018, 12, 1–8.

Miyazaki I, Isooka N, Imafuku F, Sun J, Kikuoka R, Furukawa C, Asanuma M. Chronic Systemic Exposure to Low-Dose Rotenone Induced Central and Peripheral Neuropathology and Motor Deficits in Mice: Reproducible Animal Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(9), 1-18.

Montagu KA. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 1957, 180, 244–245.

Morales-Briceño H, Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M, Calleja-Castillo J, Corona T. Overweight is more prevalent in patients with Parkinson's disease. *Arg Neuropsiquiatr* 2012, 70, 843–846.

Moreau C, Devos D, Defebvre L. Acetylcholinesterase inhibitors and gait: a steady hand?. *The Lancet Neurology* 2016, 15(3), 232-233.

Mori F, Piao YS, Hayashi S, Fujiwara H, Hasegawa M, Yoshimoto M, Iwatsubo T, Takahashi H, Wakabayashi K. Alpha-synuclein Accumulates in Purkinje Cells in Lewy Body Disease but Not in Multiple System Atrophy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2003, 62(8), 812-819.

Morivama TS, Felicio AC, Chagas MH, Tardelli VS, Ferraz HB, Tumas V, Amaro-Junior E, Andrade LA, Crippa JA, Bressan RA. Increased dopamine transporter density in

Parkinson's disease patients with Social Anxiety Disorder. *Journal of Neurological Science* 2011, 310(1-2), 53-57.

Moustafa AA, Chakravarthy S, Phillips JR, Gupta A, Keri S, Polner B, Frank MJ, Jahanshahi, M. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2016, 68, 727–740.

Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, [Stevanovic K](#), [Berres ML](#), [Hashimoto D](#), [Mortha A](#), [Leboeuf M](#), [Li XM](#), [Mucida D](#), [Stanley ER](#), [Dahan S](#), [Margolis KG](#), [Gershon MD](#), [Merad M](#), [Bogunovic M](#). Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility *Cell* 2014, 158(2), 300–313.

Murakami S, Miyazaki I, Miyoshi K, Asanuma M. Long-Term Systemic Exposure to Rotenone Induces Central and Peripheral Pathology of Parkinson's Disease in Mice. *Neurochemical Research* 2015, 40(6), 1165–1178.

[Murray CE](#), [Gami-Patel P](#), [Gkanatsiou E](#), [Brinkmalm G](#), [Portelius E](#), [Wirths O](#), [Heywood W](#), [Blennow K](#), [Ghisso J](#), [Holton JL](#), [Mills K](#), [Zetterberg H](#), [Revesz T](#), [Lashley T](#). The presubiculum is preserved from neurodegenerative changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 2018, 6(1), 62-69.

Murueta-Goyena A, Andikoetxea A, Gómez-Esteban JC, Gabilondo I. Contribution of the GABAergic System to Non-Motor Manifestations in Premotor and Early Stages of Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology* 2019, 10, 1-9.

Nair AT, Ramachandran V, Joghee NM, Antony S, Ramalingam G. Gut Microbiota Dysfunction as Reliable Non-invasive Early Diagnostic Biomarkers in the Pathophysiology of Parkinson's Disease: A Critical Review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2018, 24(1), 30–42.

Niemann N, Jankovic J. Juvenile parkinsonism: Differential diagnosis, genetics, and treatment. *Parkinsonism & Related Disorders* 2019, 1, 1-16.

Nissen SK, Ferreira SA, Schulte C, Shrivastava K, Hennig D, Graversen J, Maetzler W, Berg D, Panhelainen A, Moller HJ, Brockmann K, Romero-Ramos M. Changes in soluble CD163 indicate monocyte involvement in cognitive deficits in Parkinson's disease. *medRxiv* 2020, 1-34.

Nobrega AC, Rodrigues B, Torres AC, Scarpel RD, Neves CA, Melo A. “Is drooling secondary to a swallowing disorder in patients with Parkinson's disease?” *Parkinsonism and Related Disorders* 2008, 14(3), 243–245.

Normando EM, Davis BM, De Groef L, Nizari S, Turner LA, Ravindran N, Pahlitschz M, Brenton J, Malaguarnera G, Guo L, Somavarapu S, Cordeiro MF. The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain. *Acta Neuropathologica Communications* 2016, 4(1), 1-11.

O. Hornykiewicz. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids* 2002, 23, 65–70.

[Obeso JA](#), [Stamelou M](#), [Goetz CG](#), [Poewe W](#), [Lang AE](#), [Weintraub D](#), [Burn D](#), [Halliday GM](#), [Bezard E](#), [Przedborski S](#), [Lehericy S](#), [Brooks DJ](#), [Rothwell JC](#), [Hallett M](#), [DeLong MR](#), [Marras C](#), [Tanner CM](#), [Ross GW](#), [Langston JW](#), [Klein C](#), [Bonifati V](#), [Jankovic](#)

[J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ](#). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders* 2017, 32(9), 1264-1310.

[O'Callaghan C, Hornberger M, Balsters JH, Halliday GM, Lewis SJG, Shine JM](#). Cerebellar Atrophy in Parkinson's Disease and Its Implication for Network Connectivity. *Brain* 2016, 139(3), 845-55.

O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *Journal of Anatomy* 2005, 207(3), 271–282.

Oung QW, Muthusamy H, Lee HL, Basah SN, Yaacob S, Sarillee M, Lee CH. Technologies for Assessment of Motor Disorders in Parkinson's Disease: A Review. *Sensors* 2015, 15, 21710-21745.

Özmüş G, Yerlikaya D, Gökçeoğlu A, Emek Savaş DD, Çakmur R, Dönmez Çolakoğlu B, Yener GG. Parkinson Hastalarında Erken Dönem Kognitif Tutulumun Görsel P300 Yanıtları ile Gösterilmesi. *Archives of Neuropsychiatry* 2017, 54, 21-27.

[Pagano G, Niccolini F, Politis M](#). Imaging in Parkinson's disease. *Clinical Medicine Journal* 2016, 16(4), 371–375.

Palma JA, Kaufmann H. Treatment of autonomic dysfunction in Parkinson disease and other synucleinopathies. *Movement Disorders* 2018, 33(3), 372–390.

[Palmiter RD](#). Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Annals of New York Academy of Sciences* 2008, 11(29), 1135-1146.

Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, Arnhold M, O'Sullivan GA, Pal A, Said J, Marsico G, Verbavatz JM, Rodrigo-Angulo M, Gille G, Funk RH, Reichmann H. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Scientific Reports* 2012, 2, 898-906.

Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disorders* 2017, 38, 1-7.

[Park JH, Kim DH, Kwon DY, Choi M, Kim S, Jung JH, Han K, Park YG](#). Trends in the incidence and prevalence of Parkinson's disease in Korea: a nationwide, population-based study. *BMC Geriatrics* 2019, 19, 320-328.

Patrick A, Lewis PA. James Parkinson: The Man Behind the Shaking Palsy. *Journal of Parkinson's Disease* 2012, 2, 181–187.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (6th ed), Academic Press, London, 2007, 152-165.

Pereira JB, Ibarretxe-Bilbao N, Marti MJ, Compta Y, Junqué C, Bargallo N, Tolosa E. Assessment of cortical degeneration in patients with Parkinson's disease by voxel-based morphometry, cortical folding, and cortical thickness. *Human Brain Mapping* 2011, 33(11), 2521–2534.

Pereira JB, Junqué C, Bartrés-Faz D, Ramírez-Ruiz B, Martí MJ, Tolosa E. Regional vulnerability of hippocampal subfields and memory deficits in Parkinson's disease. *Hippocampus* 2013, 23(8), 720-728.

Perez-Burgos A, Wang B, Mao YK, Mistry B, McVey Neufeld KA, Bienenstock J, Kunze W. Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *American journal of physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2013, 304(2), 211–220.

[Perez-Pardo P](#), [Dodiya HB](#), [Engen PA](#), [Forsyth CB](#), [Huschens AM](#), [Shaikh M](#), [Voigt RM](#), [Naqib A](#), [Green SJ](#), [Kordower JH](#), [Shannon KM](#), [Garssen J](#), [Kranefeld AD](#), [Keshavarzian A](#). Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut* 2019, 68(5), 829-843.

Perlberg V, Lambert J, Butler B, Felfli M, Valabrègue R, Privat AL, Lehericy S, Petie A. Alterations of the nigrostriatal pathway in a 6- OHDA rat model of Parkinson's disease evaluated with multimodal MRI. 2018, *Plos One*, 1, 1-12.

[Pey P](#), [Pearce RKB](#), [Kalaitzakis ME](#), [Griffin WST](#), [Gentleman SM](#). Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease *Acta Neuropathologica Communications* 2014, 2, 1-21.

Phillips RJ, Walter GC, Wilder SL, Baronowsky EA, Powley TL. Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease?. *Neuroscience* 2008, 153(3), 733–750.

Piccione RB, DeFelipe J. Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy* 2007, 211, 212-222.

Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S, Carta AR. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2014, 71, 280–291.

Poirier AA, Aubé A, Côté M, Morin N, Di Paolo T, Soulet D. Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Hindawi Publishing Corporation Parkinson's Disease* 2016, 2016, 1-23.

Poirier L, Sourkes TL. Influence of the substantia nigra on the catecholamine content of the striatum. *Brain* 1965, 88, 181–192.

Polfliet MMJ, Fabrick BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: Expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 2006, 211(6-8), 419–425.

Postuma RB, Berg D. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology* 2016, 12, 622–634.

Prashanth R, Roy SD. Novel and improved stage estimation in Parkinson's disease using clinical scales and machine learning. *Neurocomputing* 2018, [305](#), 78-103.

Prensa L, Parent A. The Nigrostriatal Pathway in the Rat: A Single-Axon Study of the Relationship between Dorsal and Ventral Tier Nigral Neurons and the Striosome/Matrix Striatal Compartments. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21(18), 7247–7272.

Price MJ, Feldman RG, Adelberg D, Kayne H. Abnormalities in color vision and contrast sensitivity in Parkinson's disease. *Neurology* 1992, 42, 887–90.

Qamar M, Sauerbier A, Politis M, Carr H, Loehrer P, Chaudhuri KR. Presynaptic dopaminergic terminal imaging and non-motor symptoms assessment of Parkinson's disease: evidence for dopaminergic basis? *Npj Parkinson's Disease* 2017, 3(1), 1-20.

Rafferty MR, Schmidt PN, Luo ST, Li K, Marras C, Davis TL, Guttman M, Cubillos F, Simuni T. Regular exercise, quality of life, and mobility in Parkinson's disease: A longitudinal analysis of National Parkinson Foundation Quality Improvement Initiative data. *Journal of Parkinson's Disease* 2017, 7, 193-202.

Rajput AH, Robinson CA, Rajput ML, Rajput A. Cerebellar Purkinje cell loss is not pathognomonic of essential tremor. *Parkinsonism & Related Disorders* 2011, 17(1), 16–21.

Rakha MK, Tawfiq RA, Sadek MM, Anwer MA, Salama SM, Mohamed AF, El-Hendy MG, El-Said SE, Ahmed NM, Mekawi KS, Abd-ElAziz M, Elmazar MM. Neurotherapeutic Effects of Bee Venom in a Rotenone Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurophysiology* 2019, 50(6), 445-455.

Raudino F. The Parkinson disease before James Parkinson. *Neurological Sciences* 2012, 33, 945–948.

Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Review* 2014, 14(100), 9–30.

Regensburger M, Prots I, Winner B. Adult Hippocampal Neurogenesis in Parkinson's Disease: Impact on Neuronal Survival and Plasticity. *Hindawi Publishing Corporation Neural Plasticity* 2014, 2014, 1-12.

Regensburger M, Prots I, Winner B. Adult Hippocampal Neurogenesis in Parkinson's Disease: Impact on Neuronal Survival and Plasticity. *Hindawi Publishing Corporation Neural Plasticity* 2014, 2014, 1-12.

Rey NL, Wesson DW, Brundin P. The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease* 2018, 109, 226-248.

Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology* 2016, 7, 1-9.

Rizek P, Kumar N, Mandar SJ. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Canadian Medical Association Journal* 2016, 188(16), 1157–1165.

Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, Martino D, Fontana A, Logroscino G. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 2016, 86(6), 566–76.

Robinette ML, Colonna M. GI Motility: Microbiota and Macrophages Join Forces. *Cell* 2014, 158(2), 239–240.

Rodriguez M, Rodriguez-Sabate C, Morales I, Sanchez A, Sabate M. Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell* 2015, 14(3), 293–308.

Rodríguez-Violante M, Zerón-Martínez R, Cervantes-Arriaga A, Corona T. Who Can Diagnose Parkinson's Disease First? Role of Pre-motor Symptoms. *Archives of Medical Research* 2017, 48(3), 221–227.

Rohegera M, Kalbea E Liepelt-Scarfone I. Progression of Cognitive Decline in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 2018, 8, 183–193.

Rohini D, Vijayalakshmi K. Sesamol Ameliorates the Motor Behavior in Rotenone Induced Rat Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2017, 8(2), 330-336.

Rolheiser TM, FultonHG, Good KP, Fisk JD, McKelvey JR, Scherfler C, Robertson HA. Diffusion tensor imaging and olfactory identification testing in early-stage Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 2011, 258(7), 1254–1260.

Roostaei T¹Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A. The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurologic Clinics* 2014, 32(4):859-869.

Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 2008, 63(2), 167-173.

Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* 2015, 2015, 1-16.

Rubin RD, Watson PD, Duff MC, Cohen NJ. The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in Human Neuroscience* 2014, 8, 742.

Ruffmann C, Parkkinen L. Gut Feelings About a-Synuclein in Gastrointestinal Biopsies: Biomarker in the Making? *Movement Disorders* 2016, 31(2), 193-202.

Rusholt EHL, Salvesen L, Brudek T, Tesfay B, Pakkenberg B, Olesen MV. Pathological changes in the cerebellum of patients with Multiple System Atrophy and Parkinson's disease – a stereological study. *Brain Pathology* 2019, 30(3):576-588.

Ryman SG, Poston KL. MRI biomarkers of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2020, 73, 85-93.

Saeed U, Compagnone J, Aviv RI, Strafella AP, Black SE, Lang AE, Masellis M. Imaging biomarkers in Parkinson's disease and Parkinsonian syndromes: current and emerging concepts. *Translational Neurodegeneration* 2017, 28, 6-8.

Sai Y, Chen J, Wu Q, Liu H, Zhao J, Dong Z. Phosphorylated-ERK 1/2 and neuronal degeneration induced by rotenone in the hippocampus neurons. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009, 27(3), 366–372.

Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2011, 83(4), 430–436.

Sakakibara R, Uchiyama T, Yamanishi T, Kishi M. Genitourinary dysfunction in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2010, 25(1), 2–12.

Samantaray S, Knaryan VH, Guyton MK, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience* 2007, 146(2), 741–755.

Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, [Shastri GG](#), [Ilhan ZE](#), [Challis C](#), [Schretter CE](#), [Rocha S](#), [Gradinaru V](#), [Chesselet MF](#), [Keshavarzian A](#), [Shannon KM](#), [Krajmalnik-Brown R](#), [Wittung-Stafshede P](#), [Knight R](#), [Mazmanian SK](#). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 2016, 167(6), 1469–1480.

[Santamato A](#), [Ranieri M](#), [Cinone N](#), [Stuppiello N](#), [Valeno K](#), [De Sanctis JL](#), [Fortunato F](#), [Solfrizzi V](#), [Greco A](#), [Seripa D](#), [Panza F](#). Postural and Balance Disorders in Patients with Parkinson's Disease: A Prospective Open-Label Feasibility Study with Two Months of Action Observation Treatment. *Parkinsons Disease* 2015, 2015, 902738.

Sarbishegi M, Gorgich EAC. The Effects of Celecoxib on Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease: Suppression of Neuroinflammation and Oxidative Stress-Mediated Apoptosis. *Gene, Cell and Tissue* 2019, 6(2), e92178.

[Scheperjans F](#), [Aho V](#), [Pereira PA](#), [Koskinen K](#), [Paulin L](#), [Pekkonen E](#), [Haapaniemi E](#), [Kaakkola S](#), [Eerola-Rautio J](#), [Pohja M](#), [Kinnunen E](#), [Murros K](#), [Auvinen P](#). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders* 2015, 30(3), 350-358.

Schepper S, Stakenborg N, Matteoli G, Verheijden S, Boeckxstaens GE. Muscularis macrophages: Key players in intestinal homeostasis and disease. *Cellular Immunology* 2018, 330, 142–150.

Scherfler C, Esterhammer R, Nocker M, Mahlknecht P, Stockner H, Warwitz B, Spielberger S, Pinter B, Donnemiller E, Decristoforo C, Virgolini I, Schocke M, Poewe W, Seppi K. Correlation of dopaminergic terminal dysfunction and microstructural abnormalities of the basal ganglia and the olfactory tract in Parkinson's disease. *Brain* 2013, 136 (2013), 3028-3037.

Schrempf W, Brandta MD, Storch A, Reichmann H. Sleep Disorders in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 2014, 4, 211–221.

Seidel K, Bouzrou M, Heidemann N, Krüger R, Schöls L, Dunnen WFA, Rüb U. Involvement of the cerebellum in Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Annals of Neurology* 2017, 81(6), 898–903.

Shallie PD, Talabi DJ, Olayinka OO, Babatunde BR, Akpan HB, Otulana OJ, Alese OO, Shallie OF. Flaxseed Oil as a Potential Neuro-protective Agent on the Cerebellum of Rotenone Mice Model of Parkinson's Diseases. *International Journal of Brain and Cognitive Sciences* 2017, 6(3), 43-50.

Shapiro MB, Vaillancourt DE, Sturman MM, Metman LV, Bakay RAE, Corcos DM. Effects of STN DBS on Rigidity in Parkinson's Disease. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 2007, 15(2), 173–181.

Shiner T, Seymour B, Symmonds M, Dayan P, Bhatia KP, Dolan RJ. The Effect of Motivation on Movement: A Study of Bradykinesia in Parkinson's Disease. *PLoS One* 2012, 7(10), 47138-47142.

Sonmez OF, Odaci E, Bas O, Kaplan S. Purkinje cell number decreases in the adult female rat cerebellum following exposure to 900 MHz electromagnetic field. *Brain Research* 2010, (13)56, 95-101.

Spijker S. Dissection of Rodent Brain Regions. *Neuroproteomics* 2011, 57, 13-26.

Srimathi PK, Vijayalakshmi K, Selvaraj R. Behavioral Studies of Wistar Rats in Rotenone Induced Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2017, 9(11), 1-6.

Srivastav S, Neupane S, Bhurtel S, Katila N, Maharjan S, Choi H, Hong JT, Choi DY. Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2019, 69, 73–86.

Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy* 1984, 134(Pt2), 127-136.

Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, Borghammer P. Pathological α -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Annals of Neurology* 2016, 79(6), 940–949.

Su R, Zhen J, Wang W, Zhang J, Zheng Y, Wang X. Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular Medicine Reports* 2017, 2017, 1-10.

[Subramaniam SR](#), [Federoff HJ](#). Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2017, 8(9), 176-185.

Sui X, Zhou C, Li J, Chen L, Yang X, Li F. Hyposmia as a Predictive Marker of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International* 2019, 1, 1-9.

Sun C, Wang Y, Mo M, Song C, Wang X, Chen S, Liu Y. Minocycline Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity Correlating with Upregulation of Nurr1 in a Parkinson's Disease Rat Model. *BioMed Research International* 2019, 2019, 1–7.

Sun MF, Shen YQ. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease. *Ageing Research Reviews* 2018, 45, 53–61.

Sung HY, Park JW, Kim JS. The Frequency and Severity of Gastrointestinal Symptoms in Patients with Early Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders* 2014, 7(1), 7-12.

Sung YH, Lee J, Nam Y, Shin HG, Noh Y, Shin DH, Kim EY. Differential Involvement of Nigral Subregions in Idiopathic Parkinson's Disease. *Human Brain Mapping* 2018, 39, 542–553.

Surmeier DJ, Sulzer D. The pathology roadmap in Parkinson disease. *Prion* 2013, 7(1), 85–91.

Suzuki K, Okada K, Wakuda T, [Shinmura C](#), [Kameno Y](#), [Iwata K](#), [Takahashi T](#), [Suda S](#), [Matsuzaki H](#), [Iwata Y](#), [Hashimoto K](#), [Mori N](#). Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS ONE* 2010, 5, e9260.

[Sveinbjornsdottir S](#). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 2016, 39(1), 318–324.

[Svensson E](#), [Horvath-Puho E](#), [Thomsen RW](#), [Djurhuus JC](#), [Pedersen L](#), [Borghammer P](#), [Sørensen](#). Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 2015, 78(4), 522–529.

[Swan ZD](#), [Bouwer AL](#), [Wonderlich ER](#), [Barratt-Boyes SM](#). Persistent accumulation of gut macrophages with impaired phagocytic function correlates with SIV disease progression in macaques. *European Journal of Immunology* 2017, 47(11), 1925–1935.

[Taddei RN](#), [Cankaya S](#), [Dhaliwal S](#), [Chaudhuri KR](#). Management of Psychosis in Parkinson's Disease: Emphasizing Clinical Subtypes and Pathophysiological Mechanisms of the Condition. *Hindawi Parkinson's Disease Volume* 2017, 2017, 1-18.

[Takahashi H](#), [Watanabe Y](#), [Tanaka H](#), [Mihara M](#), [Mochizuki H](#), [Liu T](#), [Wang Y](#), [Tomiya N](#). Quantifying changes in nigrosomes using quantitative susceptibility mapping and neuromelanin imaging for the diagnosis of early-stage Parkinson's disease. *British Institute of Radiology* 2018, 91, 1-7.

[Tamtaji OR](#), [Taghizadeh M](#), [Daneshvar Kakhaki R](#), [Kouchaki E](#), [Bahmani F](#), [Borzabadi S](#), [Oryan S](#), [Mafi A](#), [Asemi Z](#). Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition* 2019, 38(3), 1031-1035.

[Tanik N](#), [Serin HI](#), [Celikbilek A](#), [Inan LE](#), [Gundogdu F](#). Associations of olfactory bulb and depth of olfactory sulcus with basal ganglia and hippocampus in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 2016, 620, 111–114.

[Tank AW](#), [Lee Wong D](#). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology* 2015, 5(1), 1-15.

[Tanner JJ](#), [McFarland NR](#), [Price CC](#). Striatal and Hippocampal Atrophy in Idiopathic Parkinson's Disease Patients without Dementia: A Morphometric Analysis. *Frontiers Neurology* 2017, 8, 139.

[Tanner JJ](#), [McFarland NR](#), [Price CC](#). Striatal and Hippocampal Atrophy in Idiopathic Parkinson's Disease Patients without Dementia: A Morphometric Analysis. *Frontiers in Neurology* 2017, 8(139), 1-10.

[Tarakad A](#), [Jankovic J](#). Essential Tremor and Parkinson's Disease: Exploring the Relationship. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements* 2018, 8, 1-10.

[Tasselli M](#), [Chaumette T](#), [Paillusson S](#), [Monnet Y](#), [Lafoux A](#), [Huchet-Cadiou C](#), [Aubert P](#), [Hunot S](#), [Derkinderen P](#), [Neunlist M](#). Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterology & Motility* 2013, 25(3), 183–193.

[Teive HAG](#), [Filho BDC](#), [Renato P](#). Munhoz. Unusual motor and non-motor symptoms and signs in the early stage of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2016, 74(10), 781-784

[Tentillier N](#), [Etzerodt A](#), [Olesen MN](#), [Rizalar FS](#), [Jacobsen J](#), [Bender D](#), [Moestrup SK](#), [Romero-Ramos M](#). Anti-Inflammatory Modulation of Microglia via CD163-Targeted Glucocorticoids Protects Dopaminergic Neurons in the 6-OHDA Parkinson's Disease Model. *The Journal of Neuroscience* 2016, 36(36), 9375–9390.

Thiffault C, Langston JW, Di Monte DA. Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. *Brain Research* 2000, 885(2), 283– 288.

[Tibar H](#), [El Bayad K](#), [Bouhouche A](#), [Ait Ben Haddou EH](#), [Benomar A](#), [Yahyaoui M](#), [Benazzouz A](#), [Regragui W](#). Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease and Their Impact on Quality of Life in a Cohort of Moroccan Patients. *Frontiers Neurology*, 2018, 4(9), 170-181.

Todorova A, Jenner P, Chaudhuri KR. Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. *Practical Neurology* 2014, 14, 310–322.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002, 420(6917), 853-859.

Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica* 2010, 119(6), 703–713.

Tribl F, Asan E, Arzberger T, Tatschner T, Langenfeld E, Meyer HE, Bringmann G, Riederer P, Gerlach M, Marcus K. Identification of L-ferritin in neuromelanin granules of the human substantia nigra: A targeted proteomics approach. *Molecular & Cellular Proteomics* 2009, 8(8): 1832–1838.

[Tsui A](#), [Isacson O](#). Functions of the nigrostriatal dopaminergic synapse and the use of neurotransplantation in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 2011, 258(8), 1393-1405.

Ugryumov MV. Dopamine Synthesis by Non-Dopaminergic Neurons as an Effective Mechanism of Neuroplasticity. *Neurochemical Journal* 2018, 12(4), 288–294.

Unverdi M, Alsayouri K. Neuroanatomy, Cerebellar Dysfunction(1st ed), StatPearls Publishing, 2019, 1-10.

[Uribe C](#), [Segura B](#), [Baggio HC](#), [Campabadal A](#), [Abos A](#), [Compta Y](#), [Marti MJ](#), [Valldeoriola F](#), [Bargallo N](#), [Junque C](#). Differential Progression of Regional Hippocampal Atrophy in Aging and Parkinson's Disease. *Frontiers Aging Neuroscience* 2018, 10, 325-332.

Vendelboe TV, Harris P, Zhao Y, Walter TS, Harlos K, El Omari K, Christensen HEM. The crystal structure of human dopamine -hydroxylase at 2.9 Å resolution. *Science Advances* 2016, 2(4), 1500980–1500980.

Viader A, Wright-Jin EC, Vohra BPS, Heuckeroth RO, Milbrandt J. Differential Regional and Subtype-Specific Vulnerability of Enteric Neurons to Mitochondrial Dysfunction. *PLoS ONE* 2011, 6(11), e27727.

Vitetta L, Llewellyn H, Oldfield D. Gut Dysbiosis and the Intestinal Microbiome: *Streptococcus thermophilus* a Key Probiotic for Reducing Uremia. *Microorganisms* 2019, 7(8), 228-236.

Vlaar T, Kab S, Schwaab Y, Frery N, Elbaz A, Moisan F. Association of Parkinson's disease with industry sectors: A French nationwide incidence study. *European Journal of Epidemiology* 2018, 33, 1101-1111.

Wakusawa C, Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Hashimoto A, Aiba S. Pigmented necrobiosis lipoidica accompanied by insulin-dependent diabetes mellitus induces CD163⁺ proinflammatory macrophages and interleukin-17-producing cells. *Acta Dermato-Venereologica* 2013, 93(4), 475-6.

Walker DM, Bell MR, Flores C, Gulley JM, Willing J, Paul MJ. Adolescence and Reward: Making Sense of Neural and Behavioral Changes Amid the Chaos. *Journal of Neuroscience* 2017, 37(45), 10855–10866.

Wang L, Li J, Chen J. Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers Neurology* 2018, 9, 620.

Wang X, Becker K, Levine N, Zhang M, Lieberman AP, Moore DJ, Ma J. Pathogenic alpha-synuclein aggregates preferentially bind to mitochondria and affect cellular respiration. *Acta Neuropathologica Communications* 2019, 7, 41-49.

WEB_1. (2020). Pubmed web site. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine>. (17.07.2020)

Wehner S, Engel DR. Resident macrophages in the healthy and inflamed intestinal muscularis externa. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2017, 469(3-4), 541–552.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record* 1991, 231(4), 482–497.

West MJ. New Stereological Methods for Counting Neurons. *Neurobiology of Aging* 1993, 14, 275-285.

Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017, 74(20), 3769–3787.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology* 2011, 26(S1), 1–58.

Woodruff-Pak DS, Foy MR, Akopian GG, Lee KH, Zach J, Nguyen KT, Comalli DM, Kennard JA, Agelan A, Thompson RF. Differential effects and rates of normal aging in cerebellum and hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107(4), 1624-1629.

Wu YH, Lee WJ, Chen YH, Chang MH, Lin CH. Premotor Symptoms as Predictors of Outcome in Parkinson's Disease: A CaseControl Study. *Plos One* 2017, 2016, 1-10.

Xia RP, Gillig c, Mueller D, Ludwig L, Schmith Z. Effect of Cooling Intervention on Reducing Rigidity in Parkinson's Disease: A Case Report *Annals of Clinical Case Reports* 2017, 2, 1363-1368.

Xu L, Pu J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. *Hindawi Publishing Corporation Parkinson's Disease* 2016, 2016, 1-10.

Yakhine-Diop SMS, Gomez-Sanchez R, Bravo-San Pedro JM, Gonzalez-Polo RA, Fuentes JM. The Roles of Autophagy in Parkinson's Disease. *Clinical Pharmacology and Translational Medicine* 2017, 1(3), 62-72.

Yamada K, Takahashi S, Karube F, Fujiyama F, Kobayashi K, Nishi A, Momiyama T. Neuronal circuits and physiological roles of the basal ganglia in terms of transmitters, receptors and related disorders. *The Journal of Physiological Sciences* 2016, 66(6), 435-446. Epub 2016 Mar 15.

Yamaguchi K, Cochran E J, Murrell JR, Polymeropoulos MH, Shannon KM, Crowther RA, Goedert M, Ghetti B. Abundant neuritic inclusions and microvacuolar changes in a case of diffuse Lewy body disease with the A53T mutation in the α -synuclein gene. *Acta Neuropathologica* 2005, 110(3), 298–305.

Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Morales M. Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway. *The Journal of Neuroscience* 2011, 31(23), 8476 – 8490.

Yan F, Chen Y, Li M, Wang Y, Zhang W, Chen X, Ye O. Gastrointestinal nervous system α -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine* 2018, 97, 28-37.

Yanagisawa N. Functions and dysfunctions of the basal ganglia in humans. *Proceedings of the Japan Academy* 2018, 94(7), 275–304.

Yang YL, Ran XR, Li Y, Zhou L, Zheng LF, Han Y, Cai QQ, Wang ZY, Zhu JX. Expression of Dopamine Receptors in the Lateral Hypothalamic Nucleus and Their Potential Regulation of Gastric Motility in Rats With Lesions of Bilateral Substantia Nigra. *Frontiers in Neuroscience* 2019, 13, 1-8.

Yasuda T, Fukuda-Tani M, Nihira T, Wada K, Hattori N, Mizuno Y, Mochizuki H. Correlation between levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the striatum of patients with Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 2007, 206(2), 308–317.

Yeragani V, Tancer M, Chokka P, Baker G. Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian Journal of Psychiatry* 2010, 52(1), 87-95.

Yıldız D, Erer S, Zarifoğlu M, Hakyemez B, Bakar M, Karlı N, Varlıbaş ZN, Tufan F. Impaired cognitive performance and hippocampal atrophy in Parkinson disease. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2015, 45(5), 1173-1177.

Ylikotila P, Tiirikka T, Moilanen JS, Kääriäinen H, Marttila R, Majamaa K. Epidemiology of early-onset Parkinson's disease in Finland. *Parkinsonism & Related Disorders* 2015, 21(8), 938–942.

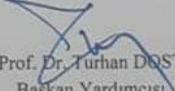
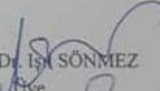
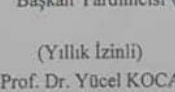
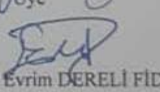
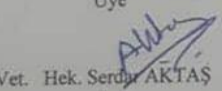
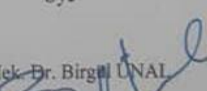
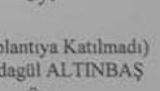
Zapiec B, Dieriks BV, Tan S, Faull RLM, Mombaerts P, Curtis MA. A ventral glomerular deficit in Parkinson's disease revealed by whole olfactory bulb reconstruction. *Brain* 2017, 140 (10), 2722–2736.

Zhang Y, Granholm AC, Huh K, Shan L, Diaz-Ruiz O, Malik N, Olson L, Hoffer BJ, Lupica CR, Hoffman AF, Backman CM. PTEN deletion enhances survival, neurite outgrowth and function of dopamine neuron grafts to MitoPark mice. *Brain* 2012, 135(9), 2736–2749.

Zhi Y, Gao P, Xin X, Li W, Ji L, Zhang L, Zhang X, Zhang, J. Clinical significance of sCD163 and its possible role in asthma. *Molecular Medicine Reports* 2017, 15(5), 2931–2939.

EKLER

Ek 1. HADYEK Onay Belgesi

	T.C. ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (ADÜ-HADYEK)	
Aydın, 30.Ocak. 2018		
Oturum	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2018 Yılı I. Oturum	
Sayı	: 64583101/2018/001	
Proje Başlığı	: Deneysel Parkinson Oluşturulmuş Ratlarda <i>Saccharomyces boulardii</i> ve Bakteriyel Kökenli Probiyotiklerin Etkisinin Araştırılması.	
Proje Yürütücüsü	: Hulki BAŞALOĞLU	
Proje Ekibi	: Eda Duygu İPEK	
Bu çalışmanın hiçbir bölümünde: İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması		
Hayvan Çalışması	İnsanlarda araştırma İnsan olmayan primatların kullanılması Transgenik hayvanların kullanılması Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.	
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır		
 Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN Başkan	 Prof. Dr. Turhan DOĞST Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. İsmail SÖNMEZ Üye
 Prof. Dr. Deniz ÇOBAN Üye	 Prof. Dr. Yücel KOCA Üye	 Doç. Dr. Evrim DERELİ FIDAN Üye
 Vet. Hek. Serdar AKTAŞ Üye	 Vet. Hek. Dr. Birgül UNAL Üye	 (Toplantıya Katılmadı) Yurdagül ALTINBAŞ Üye
Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir		

Resim 36: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Oluru.

Ek 2. Akademik Özgeçmiş

Soyadı, Adı: İpek, Eda Duygu

Uyruk: T.C.

Doğum yeri ve tarihi: İzmir, 24.08.1986

Telefon: 0 545 684 86 73

E-mail: eda.cakir@adu.edu.tr

Yabancı Dil: İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi	Temmuz 2011
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	Eylül 2015
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	-

BURSLAR ve ÖDÜLLER

‘Golden Rose Young Investigator Award’ of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress Society (HSOD), 3rd International Brain Research School, Yurtiçi kamu kurum ve kuruluşlarından alınan bilim ödülü, Certificate number: 2018/YA02, 2018, Isparta, Turkey.

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2013-2019	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi AD	Arş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

1. Sekkin S, Çakır ED, Boyacıoğlu M, Kum C, Karademir Ü, Yalınkılıç HS, Ak MO, Başaloğlu H. DNA protective and antioxidant effects of melatonin in streptozotocin induced diabetic rats. Turkish Journal of Biology 2015, 39, 932-940.

2. Çeri NG, İpek ED. Correlation Analysis of Infraorbital Foramen with Related Anatomical Structures. International Journal of Morphology 2020, 38(4), 914-918.

2. PROJELER

1. Basaloglu H, İpek ED. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Melatonin Uygulamasının Duodenum Üzerindeki Etkisinin Morfolojik Olarak İncelenmesi. Proje no: 12019, Bitiş tarihi: 03.03.2014.

2. Axis'in Morfometrik Analizi Proje no: 2016/911
Bitiş Tarihi: 09.06.2016.
3. Atlas'ın Morfometrik Analizi ve Klinik Önemi. Proje no: 2016/835, Bitiş Tarihi: 11.08.2016.
4. Tellioğlu AM, Aydın E, İpek ED. Antropometrik Ölçümlerin Denge Üzerine Olan Etkisi. Proje no: 2017/1192, Bitiş Tarihi: 06.07.2017.
5. Deneysel Parkinson Oluşturulmuş Ratlarda Saccharomyces boulardii ve Bakteriyel Kökenli Probiyotiklerin Etkisinin Araştırılması. BAP Proje no: TPF-18029, ÖYP Proje no: 15002, Başlangıç Tarihi: 12.06.2018, Devam ediyor.
6. Tıp Fakültesi Öğrencilerinin Anatomi Uygulama Derslerinde Kadavra Diseksiyonu ve Maket Kullanım Becerilerinin Geliştirilmesi. BAP Proje no: TPF-20010, Başlangıç Tarihi: 07.02.2020, Devam ediyor.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. İpek ED, Başaloğlu H. Exogenous Melatonin Induces Histochemical Changes in the Duodenum of Diabetic Rats. Poster Bildiri, 15th International Congress of Hystochemistry and Cytochemistry. 18-21.05.2017, Antalya, Turkey.
2. İpek ED, Başaloğlu H. Experimental Parkinson's disease models. Poster Bildiri, 3rd International Brain Research School 25 Haziran-1Temmuz 2018 Isparta, Turkey.
3. Başaloğlu H, Kasar ZS, İpek ED. Relationship between forearm and hand anthropometric measurements and hand grip strength. Sözlü Bildiri, International Mediterranean Anatomy Congress. 6-9.09.2018, İzmir, Turkey.
4. Çeri NG, Kasar ZS, İpek ED. Investigation of the Anatomical Relationships between Foramen Rotundum and Canalis Pterygoideus in Coronal Computed Tomography Images. International Health, Science and Family Medicine Congress. 7-9.02.2019, İzmir, Turkey.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. Başaloğlu C, Başaloğlu HK, Metin Tellioğlu A, Çakır ED, Çeri NG, Başaloğlu H. Os coxae'daki Bazı Morfometrik Ölçümlerin Cinsiyet Ayrımının Saptanmasında Kullanılması. Poster Bildiri, 15. Ulusal Anatomi Kongresi. 05-08.09.2013, Samsun, Türkiye.
2. Metin Tellioğlu A, Başaloğlu HK, Çakır ED, Başaloğlu H, Başaloğlu C. Foramen Mentalenin Morfolojik Olarak İncelenmesi ve Aksesuar Foramen Mentale Sıklığının Araştırılması. Poster bildiri 15. Ulusal Anatomi Kongresi. 05-08.09.2013, Samsun, Türkiye.
3. Başaloğlu HK, Başaloğlu C, Metin Tellioğlu A, Çakır ED, Çeri NG. Radius Proksimal Ucunun Morfolojik ve Morfometrik Olarak İncelenmesi. Poster Bildiri, 15. Ulusal Anatomi Kongresi. 05-08.09.2013, Samsun, Türkiye.
4. Çakır ED, Karakas S, Metin Tellioğlu A, Başoğlu H. Gençlerde Vücut Kompozisyonunun Değerlendirilmesinde, BİA ve VKİ yöntemlerinin Karşılaştırılması. Poster bildiri 15. Ulusal Anatomi Kongresi 05-08.09.2013, Samsun, Türkiye.

5. Metin Tellioglu A, Aydın E, Çakır ED. Antropometrik Vücut Ölçümlerinin Statik Denge Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Ön Çalışma Sonuçlarımız. Poster bildiri 18. Ulusal Anatomi Kongresi. Bolu, Türkiye.
6. Metin Tellioglu A, Karakas S, Türe M, Çakır ED. 18-24 Yaş Arası Öğrencilerin El ve El Bileği Ölçümlerinin Cinsiyet Tayininde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Sözlü Bildiri, 14. Adli Bilimler Kongresi 11.05.2017, Nevşehir, Türkiye.
7. Turgut ÇA, Çakır ED, Çeri NG, Turgut M, Başaloğlu H. Condylus Occipitalis Morfometrik Analizi ve Klinik Önemi. Poster bildiri, Anatomi Günleri 2017, 26.02.2017, Bursa, Türkiye.
8. Turgut YB, Çakır ED, Başaloğlu H, Yurttaş C, Başaloğlu HK, Çağımın P, Turgut M. Morphometric Analysis of Axis Vertebrae. Poster Bildiri, Uluslararası Katılımlı 17. Ulusal Anatomi Kongresi 05.09.2016, Eskişehir, Türkiye.
9. Turgut AÇ, Çakır ED, Yurttaş C, Başaloğlu H, Çağımın P, Turgut M. Morphometric Analysis of Atlas and Clinical Importance. Poster Bildiri, Uluslararası Katılımlı 17. Ulusal Anatomi Kongresi 05.09.2016, Eskişehir, Türkiye.
10. Başaloğlu H, Çakır ED, Başalolu HK. The Morphometric Analysis of the Scapula and Classification of Acromion Shape. Poster Bildiri, Uluslararası Katılımlı 17. Ulusal Anatomi Kongresi 05.09.2016, Eskişehir, Türkiye.
11. Çakır ED, Başaloğlu H, Başaloğlu HK. Fossa Intercondylaris Index Values and the Distal Femur Morphometric Analysis. Poster Bildiri, Uluslararası Katılımlı 17. Ulusal Anatomi Kongresi 05.09.2016, Eskişehir, Türkiye.
12. İpek ED, Başaloğlu H. Experimental Parkinson's Disease Models. Poster Bildiri, 3rd Brain Research School, 27 Haziran-1 Temmuz 2018, Isparta, Türkiye.
13. İpek ED, Şahmelikoğlu AG, Başaloğlu HK, Başaloğlu H. Ratlarda Anatomik Olarak Spesifik Beyin Dokularının Diseksiyonunda Kullanılan Yöntemler, Uygulama Kolaylıkları. Sözlü Biliri, 20. Ulusal Anatomi Kongresi 27-31 Ağustos 2019, İstanbul, Türkiye.
14. İpek ED, Başaloğlu H. Deneyisel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Duodenum Histometrisi ve Melatoninin Etkileri. Poster Bildiri, 20. Ulusal Anatomi Kongresi 27-31 Ağustos 2019, İstanbul, Türkiye.