

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE MELATONİNİN**  
**TOLL BENZERİ RESEPTÖR 4 İLİŞKİLİ**  
**İNFLAMATUVAR YOLAK ÜZERİNE ETKİSİ**

Sendegül YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE MELATONİNİN**  
**TOLL BENZERİ RESEPTÖR 4 İLİŞKİLİ**  
**İNFLAMATUVAR YOLAK ÜZERİNE ETKİSİ**

Sendegül YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-3972 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden bu yana desteğini, sevgisini, özverisini hiç esirgemeyen, yürüdüğüm bu yolda bana ışık olan ve hep yanımda olduğunu hissettiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca akademik ve bilimsel bilgi ve tecrübeleriyle bizi eğiten ve yanımızda olan değerli Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve aynı yolda yürüdüğüm asistan arkadaşlarıma,

Bilgisi ve tecrübesi sayesinde elde ettiğim tüm deneyimler için Ayşe ÖZKAN'a,

Yüksek lisans sürecimin ilk gününden itibaren her anıma tanıklık eden, bilgisi ve inancıyla bana yürekten destek olan Ezgi GOLAL ve Cemre Nur BALCI'ya,

Yüksek lisans tez sürecimde tüm soru ve sorunlarıma içtenlik ve sabırla yardımcı olan Sibel ÖZER'e,

Bilimsel bilgi ve tecrübe donanımı ile bana yön veren sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Gökhan ERTOSUN'a,

Ekip arkadaşlarım Asiye Kübra KARADAŞ ve Sayra DİLMAÇ'a,

Güler yüzleri ile her daim bize yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli tüm çalışanlarına,

Bana her daim yürekten inanıp bu süreçte yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili Seçkin İLDEM'e,

Hayatım boyunca ideallerim ve eğitimim için maddi ve manevi destek olan, bu yola başlarken benimle aynı heyecan ve isteği paylaşan ve bana güç veren, hayatımın her aşamasında beni destekleyen babam Bahadır YILDIRIM, annem Gül YILDIRIM, kardeşim Hande YILDIRIM ve pamuk anneannem Pervin DİKİCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Parkinson hastalığı (PH), dopaminerjik nöronların (DN) kaybıyla karakterize progresif nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöroinflamasyona bağlı mikrogliyal aktivasyon, TLR4 yolağını kullanarak hastalığın patolojisini şiddetlendirebilmektedir. Melatonin, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif özellikli bir antioksidandır. Çalışmamız, PH’da ortaya çıkacak TLR4 aracılı inflamatuvar yanıtı karşı melatonin etkisinin değerlendirilmesi üzerine kurgulanmıştır.

**Yöntem:** Üç aylık C57BL/6 erkek fareler; Kontrol (K), Çözücü (Ç), Melatonin verilen (M), MPTP verilerek PH oluşturulan (P) ve MPTP ve Melatonin verilen (P+M) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. MPTP, SF içinde çözülerek günde 2 sefer ve 2 gün boyunca toplamda 80 mg/kg dozda intraperitoneal olarak hayvanlara enjekte edildi. 7 gün boyunca günde iki kez Melatonin (2x10 mg/kg) M ve P+M gruplarına uygulandı. Deney sonrasında davranış analizleri yapıldı. Beynin substansiya nigra (SNpc) alanında; TH, TLR4,  $\alpha$ -sinüklein ve p65 ekspresyonları immünohistokimyasal analizlerle, TNF- $\alpha$  ekspresyonu da western blot analiziyle değerlendirildi.

**Bulgular:** P grubunda motor aktivitede azalma görülürken, melatonin uygulamasıyla aktivitenin normal seviyeye ulaştığı görüldü. TH immunreaksiyonu Parkinson gruplarında azalırken, P+M gruplarında bu ekspresyonun kontrollere yaklaştığı görüldü. P grubunda toksisiteye bağlı  $\alpha$ -sinüklein, TLR4 ve p65 ekspresyonlarında artış görülürken, P+M grubunda ekspresyonların azaldığı dikkati çekti. P grubunda TNF- $\alpha$  sitokin salınımının arttığı, melatonin uygulamasıyla bu miktarın azaldığı görüldü.

**Sonuç:** Çalışmamız melatonin uygulamasının PH ile ortaya çıkan DN hasarını kısmen engellendiğini, hasar sonucu ortaya çıkan nöroinflamasyonun TLR4 ve TNF- $\alpha$  aracılı baskılanabildiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** PH, dopaminerjik nöron, MPTP, TLR4, melatonin

## ABSTRACT

**Objective:** Parkinson (PD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons (DN). Neuroinflammation including TLR4 response in the activation of microglia play an important role in PD. Melatonin has anti-inflammatory and neuroprotective effects. The aim of this study was to demonstrate that melatonin play a role in the suppression of pathogenesis of PD model by using MPTP.

**Method:** Three-month old male C57BL/6 mice were divided into 5 groups as Control (C), Sham (S), Melatonin injected (M), MPTP-injected (P) and MPTP +Melatonin injected (P+M). In our study, MPTP was dissolved in SF and injected into the animals intraperitoneally at total dose of 4x20 mg/kg for 2 days. Melatonin was administered (20 mg/kg/day) by i.p. to M and P+M groups in two times a day for 7 days. Behavior analysis was done after end of the injections. In the SNpc expressions of TH, TLR4,  $\alpha$ - synuclein and p65 were evaluated by immunohistochemical and TNF- $\alpha$  in total brain were evaluated by western blot analysis.

**Results:** While motor activity decreased in the P group, it was seen that the activity reached normal level with the effect of melatonin. While TH immunostaining was decreased in P group, P+M groups expression get close to the control groups. Western blot analysis showed that TNF- $\alpha$  proteins increased in P group and also the expression was decreased in melatonin administration group.

**Conclusion:** In our study showed that melatonin administration could partially prevent DN damage caused by PD and it could suppress neuroinflammation resulting from damage via TLR4 and TNF- $\alpha$ .

**Key words:** PD, dopaminergic neuron, MPTP, TLR4, melatonin

## İÇİNDEKİLER

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ÖZET</b>                                                        | i   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                    | ii  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                 | iii |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                             | iv  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                             |     |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>                                     |     |
| <br>                                                               |     |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                    | 1   |
| <br>                                                               |     |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                           | 3   |
| 2.1. Parkinson Hastalığı                                           | 3   |
| 2.1.1. Parkinson Hastalığı'nın Epidemiyolojisi                     | 3   |
| 2.1.2. Parkinson Hastalığı'nın Etiyolojisi                         | 4   |
| 2.1.3. Parkinson Hastalığı'nın Nöroanatomik Mekanizmaları          | 5   |
| 2.1.4. Dopamin ve Parkinson Hastalığı                              | 8   |
| 2.1.5. Parkinson Hastalığı Semptomları                             | 10  |
| 2.1.6. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelleri                      | 12  |
| 2.1.7. Parkinson Hastalığı'nın Patolojisi                          | 14  |
| 2.1.8. $\alpha$ -Sinüklein Agregasyonu                             | 15  |
| 2.1.9. Nöroinflamasyon                                             | 16  |
| 2.2. Toll Benzeri Reseptörler (TLRs)                               | 17  |
| 2.2.1. TLR'lerin Yapısı ve Fonksiyonu                              | 18  |
| 2.2.2. TLR'lerin Beyinde ve Nöroinflamasyondaki Rolü               | 19  |
| 2.3. TLR4                                                          | 20  |
| 2.3.1. TLR4 Sinyalizasyonu                                         | 21  |
| 2.3.2. TLR4'ün Parkinson Hastalığı'nda Rolü                        | 23  |
| 2.4. Melatonin                                                     | 23  |
| 2.4.1. Melatonin Nöroinflamasyon ve Parkinson Hastalığı'ndaki Rolü | 25  |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                | 27 |
| 3.1. Deney Grupları                                                      | 27 |
| 3.2. MPTP ve Melatonin İçin Kullanılacak Dozun Belirlenmesi              | 27 |
| 3.3. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması                | 28 |
| 3.4. Ağırlık Takibi                                                      | 31 |
| 3.5. Periferik Kan Yayma Analizi                                         | 31 |
| 3.6. Davranış Deneyleri: Motor Aktivite Tayini                           | 31 |
| 3.6.1. Lokomotor Aktivite Testi                                          | 31 |
| 3.6.2. Bradikinezi Şiddetinin Belirlenmesi                               | 32 |
| 3.6.3. Rotarod Testi                                                     | 32 |
| 3.7. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması                    | 33 |
| 3.8. Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması                                  | 33 |
| 3.9. İmmünohistokimyasal Analizler                                       | 33 |
| 3.9.1. Kullanılan Solüsyonlar                                            | 33 |
| 3.10. Western Blot                                                       | 36 |
| 3.10.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Lizat Elde Edilmesi                 | 36 |
| 3.10.2. Protein Miktarının Belirlenmesi                                  | 37 |
| 3.10.3. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) |    |
| Protokolü                                                                | 37 |
| 3.10.4. Görüntüleme ve Değerlendirilme                                   | 39 |
| 3.11. Image-j Analizi                                                    | 40 |
| 3.12. Sonuçların Değerlendirilmesi                                       | 40 |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                       | 41 |
| 4.1. Genel Görünüm                                                       | 41 |
| 4.2. Ağırlık Değişimi                                                    | 41 |
| 4.3. Periferik Kann Yayma Analizi                                        | 42 |
| 4.4. Davranış Deneyleri: Motor Aktivite Tayini                           | 44 |
| 4.4.1. Pole (Çubuk) Testi                                                | 44 |
| 4.4.2. Lokomotor Aktivite Testi                                          | 45 |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.3. Rotarod Testi                                        | 46 |
| 4.5. İmmünohistokimyasal Analizler                          | 47 |
| 4.5.1. Tirozin Hisroksilaz (TH) İmmünohistokimya Analizleri | 47 |
| 4.5.2. $\alpha$ -Sinüklein İmmünohistokimya Analizleri      | 49 |
| 4.5.3. TLR4 İmmünohistokimya Analizleri                     | 51 |
| 4.5.4. p65 İmmünohistokimya Analizleri                      | 53 |
| 4.6. Western Blot Bulguları                                 | 55 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                          | 57 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                 | 63 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                            | 65 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                             | 85 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo. 3.1.** İmmünohistokimyasal analizler için kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile dilüsyonları gösterilmektedir.

35



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                    |                                                                                                                                                     |    |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b>  | PH’nda beynin SNpc alanında dopamin miktarının azalmasıyla meydana gelen hareket bozuklukları gösterilmektedir.                                     | 3  |
| <b>Şekil 2.2.</b>  | Genel olarak nörodejeneratif hastalıklara neden olan faktörler gösterilmektedir.                                                                    | 5  |
| <b>Şekil 2.3.</b>  | Beynin bazal gangliyon alanı ve nükleusları görülmektedir.                                                                                          | 6  |
| <b>Şekil 2.4.</b>  | Dopaminin (DA) direkt ve indirekt yol aracılığı ile motor hareketin düzenlenmesindeki etkin yol ve PH’da meydana gelen değişimler gösterilmektedir. | 8  |
| <b>Şekil 2.5.</b>  | Dopamin sentezi görülmektedir.                                                                                                                      | 9  |
| <b>Şekil 2.6.</b>  | PH’nın zamana bağlı değişen motor ve motor olmayan semptomları gösterilmektedir.                                                                    | 10 |
| <b>Şekil 2.7.</b>  | DeneySEL PH modeli oluşturulmasında kullanılan toksik ajanlar ve etkileri gösterilmektedir.                                                         | 12 |
| <b>Şekil 2.8.</b>  | PH’na neden olan faktörler ve $\alpha$ -sinükleinin patolojideki rolü gösterilmektedir.                                                             | 16 |
| <b>Şekil 2.9.</b>  | PH’da nörodejenerasyon gösterilmektedir.                                                                                                            | 17 |
| <b>Şekil2.10.</b>  | TLR’lerin nöroinflamasyon mekanizması gösterilmektedir.                                                                                             | 20 |
| <b>Şekil 2.11.</b> | TLR ve sinyalizasyonunda yer alan domeyinler görülmektedir.                                                                                         | 21 |
| <b>Şekil 2.12.</b> | Nöroinflamasyonda TLR4’ün MyD88 bağımlı sinyal yolağı gösterilmektedir.                                                                             | 22 |
| <b>Şekil 2.13.</b> | Melatonin sentezi görülmektedir.                                                                                                                    | 24 |
| <b>Şekil 2.14.</b> | MPTP ile oluşturulmuş PH’da melatoninin etki mekanizmaları şematize edilmiştir.                                                                     | 25 |
| <b>Şekil 3.1.</b>  | Gruplara özgü oluşturulan deney modeli şekilde gösterilmektedir                                                                                     | 30 |
| <b>Şekil 4.1.</b>  | Gruplarda deney öncesi ve deney sonrası ağırlık değişimi gösterilmektedir.                                                                          | 41 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.2.</b>  | Periferik kan yayma analizi sonucunda monosit sayısının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir.                                                                                                                                                                | 42 |
| <b>Şekil 4.3.</b>  | Periferik kan yayma analizi sonucunda lenfosit sayısının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir.                                                                                                                                                               | 43 |
| <b>Şekil 4.4.</b>  | Periferik kan yayma analizi sonucunda nötrofil sayısının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir.                                                                                                                                                               | 44 |
| <b>Şekil 4.5.</b>  | Çubuk testi dönme (a) ve yere inme süresi (b) gösterilmektedir.                                                                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>Şekil 4.6.</b>  | Lokomotor aktivite testi ambulatuvar hareket (a), horizontal hareket (b), lokomotor aktivite mesafesi (c) ve toplam lokomotor aktivite sonuçları (d) gösterilmektedir.                                                                                          | 46 |
| <b>Şekil 4.7.</b>  | a) Serebrumun SNpc bölgesinde görülen TH immunohistokimyasal reaksiyonlarının gruplara göre dağılımı görülmektedir (10x panel). b) Serebrumun SNpc bölgesinde görülen TH immunohistokimyasal reaksiyonlarının gruplara göre dağılımı görülmektedir (40x panel). | 48 |
| <b>Şekil 4.8.</b>  | Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan DN'ların, TH immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen grafiktir.                                                                        | 49 |
| <b>Şekil 4.9.</b>  | Serebrumun SNpc bölgesinde $\alpha$ -sinükleinin sitoplazmik immünohistokimyasal boyanmaları sonucu gruplara göre dağılımı görülmektedir (40x panel).                                                                                                           | 50 |
| <b>Şekil 4.10.</b> | Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan $\alpha$ -sinüklein immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen grafik görülmektedir.                                                    | 51 |
| <b>Şekil 4.11.</b> | Serebrumun SNpc bölgesinde mikrogliyaların membranında lokalize olan TLR4 immünohistokimyasal boyanmalarının gruplara göre dağılımı görülmektedir (40x panel).                                                                                                  | 52 |

|                    |                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.12.</b> | Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan TLR4 immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen grafiktir.   | 53 |
| <b>Şekil 4.13.</b> | Serebrumun SNpc bölgesinde mikrogliaların nükleusunda lokalize olan p65 immünohistokimyasal boyanmalarının gruplara göre dağılımı görülmektedir (40x panel).                         | 54 |
| <b>Şekil 4.14.</b> | Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan p65 immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen grafiktir.    | 54 |
| <b>Şekil 4.15</b>  | Total beyinde TNF- $\alpha$ ve $\beta$ -aktinin tüm gruplara ait western blot yöntemiyle elde edilen bantları görülmektedir.                                                         | 55 |
| <b>Şekil 4.16.</b> | TNF- $\alpha$ 'nın serebrumda total beyinde western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının $\beta$ -aktin molekülünün miktarına oranlanmasıyla elde edilen grafik gösterilmektedir. | 56 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                                                               |                                      |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b><math>\alpha</math>-sinüklein</b>                          | : Alfa Sinüklein Proteini            |
| <b>6-OHDA</b>                                                 | : 6-Hidroksidopamin                  |
| <b>AANAT</b>                                                  | : Arilalkilamin N-asetiltransferaz   |
| <b>AH</b>                                                     | : Alzheimer Hastalığı                |
| <b>APS</b>                                                    | : Amonyum Persülfat                  |
| <b>ATP13A2</b>                                                | : 13A2 taşıyan ATPaz katyon          |
| <b>BCA</b>                                                    | : Bicinchoninic Asit                 |
| <b>BSA</b>                                                    | : Bovin Serum Albumin                |
| <b>CD14</b>                                                   | : Farklılaşma Kümesi 14              |
| <b>CH<sub>3</sub>OH</b>                                       | : Metanol                            |
| <b>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O</b> | : Sitrik Asit                        |
| <b>CM</b>                                                     | : Sentromedyan Nükleus               |
| <b>COMT</b>                                                   | : Katekol-O-metiltransferaz          |
| <b>D1</b>                                                     | : D1-benzeri Dopamin Reseptörü       |
| <b>D2</b>                                                     | : D2-benzeri Dopamin Reseptörü       |
| <b>DA</b>                                                     | : Dopamin                            |
| <b>DAB</b>                                                    | : 3,3'-Diaminobenzidin               |
| <b>DAMP</b>                                                   | : Hasarla İlişkili Moleküler Yapılar |
| <b>DAT</b>                                                    | : Dopamin Taşıyıcı                   |

|                                     |                                            |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>DJ-1</b>                         | : Deglycase Protein                        |
| <b>DN</b>                           | : Dopaminerjik Nöron                       |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>              | : Distile Su                               |
| <b>GABA</b>                         | : Gama-aminobütirik Asit                   |
| <b>Gpe</b>                          | : Globus pallidus eksterna                 |
| <b>Gpi</b>                          | : Globus pallidus interna                  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>   | : Hidrojen Peroksit                        |
| <b>HIOMT</b>                        | : Hidroksindol-Ometiltransferaz            |
| <b>HMGB-1</b>                       | : Yüksek Mobilite Grubu Kutusu-1 Proteini  |
| <b>HRP</b>                          | : Horseradish Peroksidaz                   |
| <b>IgG</b>                          | : İmmünoglobulin G                         |
| <b>IκB</b>                          | : NF-κB İnhibitör Protein                  |
| <b>IKK</b>                          | : NF-κB İnhibitör Protein Kinaz            |
| <b>IL-1</b>                         | : İnterlökin 1                             |
| <b>IL-6</b>                         | : İnterlökin 6                             |
| <b>IL-1R</b>                        | : İnterlökin 1 Reseptörü                   |
| <b>IRAK</b>                         | : IL-1 Reseptör Bağlantılı Kinaz Kompleksi |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | : Potasyum Hidrojen Fosfat                 |
| <b>L-DOPA</b>                       | : Levodopa                                 |
| <b>LPS</b>                          | : Lipopolisakkarit                         |

|                                      |                                                              |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>LRRK2</b>                         | : Lösence Zengin Tekrarlı Kinaz-2                            |
| <b>MAO-B</b>                         | : Monoamin oksidaz-B                                         |
| <b>MD-2</b>                          | : Miyeloid farklılaşma faktörü 2                             |
| <b>MPDP</b>                          | : 1-methyl-4-phenyl-2,3 dihydropyridinium                    |
| <b>MPP+</b>                          | : 1-methyl-4-phenylpyridinium                                |
| <b>MPTP</b>                          | : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Hydrochloride |
| <b>MyD88</b>                         | : Miyeloid farklılaşma faktörü 88                            |
| <b>NaCl</b>                          | : Sodyum Klorür                                              |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | : Disodyum Hidrojen Fosfat                                   |
| <b>NAT</b>                           | : Serotonin-N-asetiltransferaz                               |
| <b>NF-κB</b>                         | : Nüklear Faktör- Kappa B                                    |
| <b>PAMP</b>                          | : Hastalık Etkenlerine Eşlik Eden Moleküler Yapılar          |
| <b>PARK 1/4</b>                      | : Parkinson Hastalığı Geni 1/ 4                              |
| <b>PARK 6</b>                        | : Parkinson Hastalığı Geni 6                                 |
| <b>PARK 7</b>                        | : Parkinson Hastalığı Geni 7                                 |
| <b>PARK 8</b>                        | : Parkinson Hastalığı Geni 8                                 |
| <b>PARK 9</b>                        | : Parkinson Hastalığı Geni 9                                 |
| <b>PARK2</b>                         | : Parkin Kodlayan Gen                                        |
| <b>PBS</b>                           | : Fosfat Tuzu Tamponu                                        |
| <b>PH</b>                            | : Parkinson Hastalığı                                        |

|              |                                               |
|--------------|-----------------------------------------------|
| <b>PIK</b>   | : Proteaz İnhibitör Kokteyli                  |
| <b>PPN</b>   | : Pedinkülopotin nükleus                      |
| <b>PTEN</b>  | : Fosfataz ve Tensin Homoloğu                 |
| <b>REM</b>   | : Hızlı Göz Hareketi                          |
| <b>ROS</b>   | : Reaktif Oksijen Türevleri                   |
| <b>RNS</b>   | : Reaktif NitrojenTürevleri                   |
| <b>SDS</b>   | : Sodyum Dodesil Sülfat                       |
| <b>SNpc</b>  | : Substansiya Nigra Pars Kompakta             |
| <b>SNpr</b>  | : Substansiya Nigra Pars Retikulata           |
| <b>SNCA</b>  | : Alfa Sinüklein Kodlayan Gen                 |
| <b>STN</b>   | : Subtalamik Nükleus                          |
| <b>TAB1</b>  | : TGF-Beta Aktive Kinaz 1 Bağlayıcı Protein 1 |
| <b>TAB2</b>  | : TGF-Beta Aktive Kinaz 1 Bağlayıcı Protein 2 |
| <b>TAK1</b>  | : TGF-Beta Aktive Kinaz 1                     |
| <b>TBS</b>   | : Tris Tamponlu Salin                         |
| <b>TEMED</b> | : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine        |
| <b>TH</b>    | : Tirozin Hidroksilaz                         |
| <b>TIR</b>   | : Toll/IL-1R homoloğu                         |
| <b>TIRAP</b> | : TIR-Bölgesi İçeren Protein                  |
| <b>TLR4</b>  | : Toll Benzeri Reseptör-4                     |

|                                |                                                          |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : Tümör Nekroz Faktör Alfa                               |
| <b>TRAF</b>                    | : TNF Reseptör İlişkili Faktör 6                         |
| <b>VA/VL</b>                   | : Ventral anterior/Ventral lateral nükleus               |
| <b>VPS35</b>                   | : Vacuolar Protein Sınıflandırma ile İlişkili Protein-35 |



## 1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığı (AH)'ndan sonra en yaygın görülen progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (Tansey ve Goldberg, 2010). Nörodejenerasyon, dopaminerjik nöronların (DN) kaybıyla karakterize olup, hastalığın seyri ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Nörodejenerasyonda, DN'ların kaybına ek olarak; nöroinflamasyona bağlı mikrogliyal aktivasyon da hastalığın patolojisini şiddetlendirmektedir (Hirsch ve Hunot, 2009; Tufekci ve ark., 2011; Ha ve ark., 2012; Llewellyn ve ark., 2017).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridin (MPTP) ile oluşturulan PH modellerinde, ortaya çıkan toksik etkinin oluşturduğu alfa sinüklein ( $\alpha$ -sinüklein) birikimlerinin DN'larda ölüme yol açtığı gösterilmiştir (Giraldez-Perez ve ark., 2014). DN ölümü ya da MPTP nörotoksitesinin oluşturduğu yanıtın mikrogliyalardaki TLR'leri aktive ettiği söylenmektedir (Trudler ve ark., 2010). TLR4'ün aktivasyonu NF- $\kappa$ B yanıtını da proinflamatuvar sitokinlerin salınımını da destekler bir rol oynamaktadır (Kerfoot ve ark., 2004; Hua ve ark., 2007).

Melatonin, santral sirkadiyen ritmin ve beraberinde birçok vücut fonksiyonunun düzenlenmesinde rol alan bir indolamindir. Melatonin nörohormonu üretildikten sonra hücre içinde depolanmaz; düşük molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle ve lipofilik-hidrofilik özelliğiyle pinealositlerden basit difüzyon ile hızlıca atılır ve pineal bezde kan-beyin bariyeri bulunmadığı için de direkt kan dolaşımına ulaşır. Melatonin deneysel PH modelinde gliyal hücrelerin aktivasyonuna bağlı nöroinflamasyonu ve DN'larda ortaya çıkan reaktif oksijen türevleri (ROS) bağımlı apoptotik yolağı baskılayabilmektedir (Mayo ve ark., 2005).

Literatürde melatoninin PH'da TLR4 aracılı inflamatuvar yanıt üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada MPTP ile oluşturulan deneysel PH modelinde, TLR4 aktivasyonuna bağlı oluşan inflamatuvar yanıt ve bu yanıtta melatoninin etkisi immunohistokimyasal olarak; beynin substansiya nigra alanında  $\alpha$ -sinüklein, TH,

TLR4 ve NF- $\kappa$ B ekspresyonlarıyla deęerlendirilirken; total beyinde de TNF- $\alpha$  ekspresyonu western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

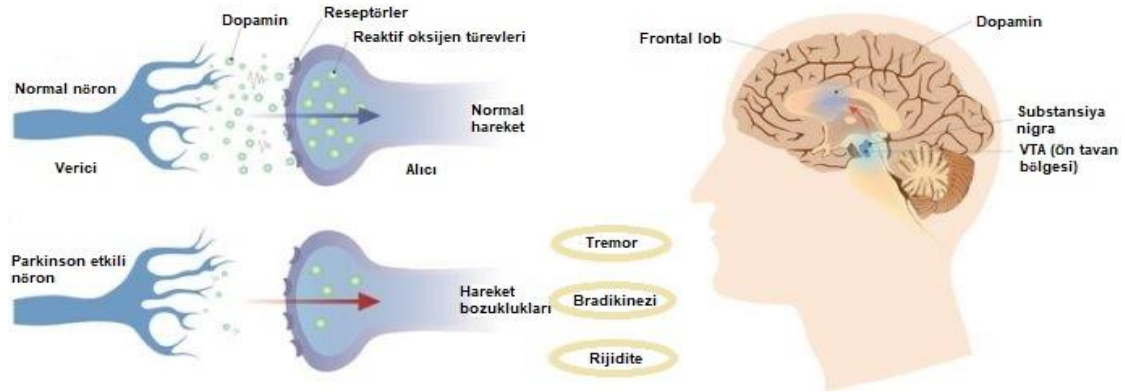
Melatoninin bu etki mekanizması literatürde daha önce tanımlanmadığından elde edilen veriler yeni çalışmalara ışık tutabilecek özellikle de kliniğe yansıma olanağına sahip olabilecektir. Bu alışmayla PH tedavisi gören birçok hastanın L-DOPA kullanımına ek anti-inflamatuvar özellikli melatoninin de tedaviye eklenebileceği kanaatindeyiz.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH), ilk kez James Parkinson tarafından 1817 yılında “Essay on the Shaking Palsy” isimli monografide tanımlanmış, Alzheimer hastalığı (AH)’ndan sonra en yaygın görülen bir nörodejeneratif hastalıktır (Mulhearn, 1971; Dorsey ve ark., 2007; Tansey ve Goldberg, 2010). PH, substantia nigra pars compacta (SNpc)’da yer alan dopaminerjik nöronların (DN) kaybı ve dopamin (DA) miktarının azalmasına bağlı nigrostriatal dopaminerjik yolun aşamalı dejenerasyonu ile oluşur (Dauer ve Przedborski, 2003; Mullin ve Schapira, 2015). Somatik sinir sistemine ait işlev bozuklukları PH belirtisi olarak ortaya çıkar. Bu belirtiler; rijidite, bradikinezi, postural denge kaybı, yürüyüş disfonksiyonu ve titremedir (Litvan ve ark., 2003). Hastalık seyri sırasında motor olmayan fonksiyonlardaki bozukluklara sıklıkla demans, hiposmi ve gastrointestinal değişiklikler de eşlik etmektedir (Buzas ve Max, 2004; Iranzo ve ark., 2006; Chaudhuri ve Martinez-Martin, 2008) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** PH’nda beynin SNpc alanında dopaminerjik nöronlardan salınan dopamin miktarının azalmasıyla motor aktivite koordinasyonu hasara uğrar ve hareket bozuklukları meydana gelir. Bu bozulma sonucunda PH’nın belirtileri olan tremor, bradikinezi, rijidite ortaya çıkar (Görsel <https://www.huffpost.com> adresinden alınıp revize edilmiştir).

#### 2.1.1. Parkinson Hastalığı’nın Epidemiyolojisi

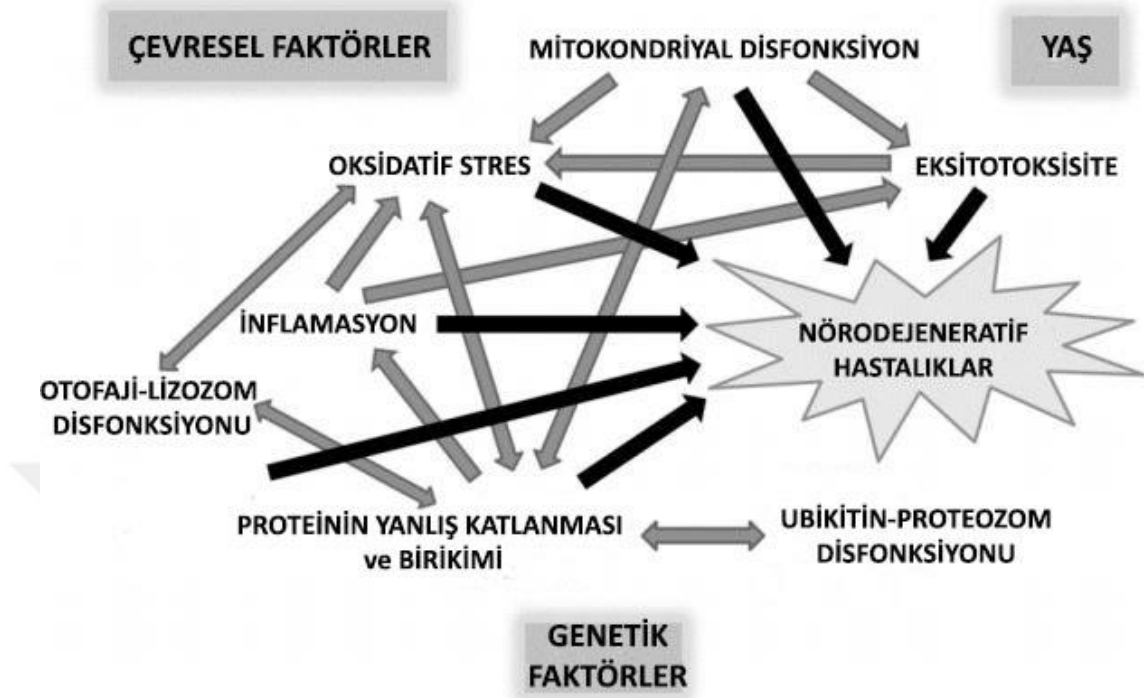
Hastalığın prevalansı 160 vaka/100.000 kişi, insidansı ise 20 vaka/100.000 kişidir. Yaşa bağlı olarak artan PH, toplam nüfusun % 0,3’ünü ve 65 yaş üstü nüfusun yaklaşık % 1-

3'ünü etkilemektedir ve 2030 yılına kadar hasta sayısının 8,7 milyondan 9,3 milyona çıkacağı düşünülmektedir (de Rijk ve ark., 2000; Poewe ve ark., 2017).

### **2.1.2. Parkinson Hastalığı'nın Etiyolojisi**

Çevresel etmenler, yaşlanma ve genetik yatkınlık geçerli nedenler arasında gösterilse de PH'nın nedeni henüz tam anlamıyla bilinmemektedir (Alexander, 2004). Kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülen PH'nın (Cipriani ve ark., 2010), yaş artışıyla prevalansı ve insidansı da artmaktadır (Driver ve ark., 2009). Yaşlanma ve PH ilişkisini inceleyen birçok çalışmaya göre hastalıkla birlikte motor semptomlarda artış, levodopa (L-DOPA) cevabında azalma, postürde bozulmalar, şiddetli bilişsel bozukluklar ve demans gelişmektedir (Levy, 2007). PH riskini artıran birincil çevresel faktörler; parakuat, herbisit veya pestisit maruziyeti, ağır kafa travmaları, kırsal yaşam,  $\beta$ -blokör ve nöroleptik ilaç kullanımı iken; ikincil çevresel faktörler sigara ve alkol tüketimi, uyuşturucu bağımlılığı ve steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaç kullanımı olarak gösterilmektedir (Noyce ve ark., 2012).

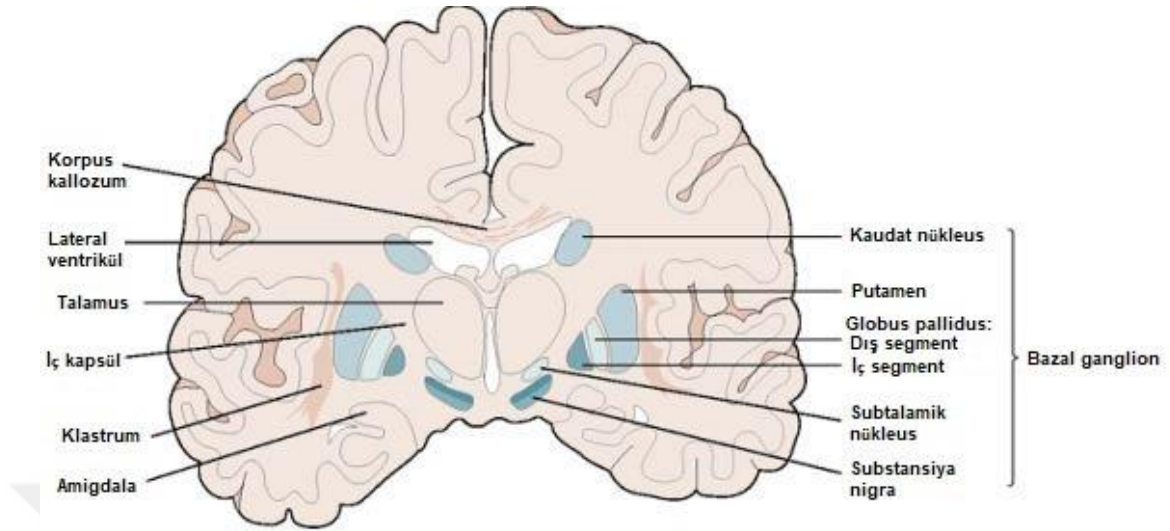
PH vakalarının sadece %10'u ailesel yatkınlık göstermektedir. Parkinson hastalarının birinci derece yakınlarında hastalığın görülme ihtimali, sağlıklı bireylerin birinci derece yakınlarına oranla 1.5-9.5 kez daha yüksek bulunmuştur (Vierregge ve Heberlein, 1995). Birçok genetik mutasyon da PH sebebi olabilir.  $\beta$ -Glukoserebrozidaz ve ilişkili genleri olan ve Alfa sinüklein (SNCA) ve Lösince zengin tekrarlı kinaz-2 (LRRK2) genleri, Parkinson hastalığı 1/4 (PARK1/4) ve Parkinson hastalığı 8 (PARK8) genleri otozomal dominant mutasyonları PH oluşumuna neden olurken; Parkin (PARK2), PTEN indüklü kinaz 1 (PINK1), Parkinson hastalığı 6 (PARK6), Onkogen DJ-1 (DJ-1), Parkinson hastalığı 7 (PARK7) ve ATPaz 13A2 (ATP13A2) genlerindeki otozomal resesif mutasyonlar da PH'nın nedenleri arasında gösterilmektedir (Corti ve ark., 2011; Klein ve Westenberger, 2012; Sidransky ve Lopez, 2012) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Genel olarak nörodejeneratif hastalıklara neden olan faktörler gösterilmektedir (Bäck, 2014). PH da nörodejeneratif bir hastalık olduğundan bu etkenlerden kolaylıkla etkilenebilmektedir.

### 2.1.3. Parkinson Hastalığı'nın Nöroanatomik Mekanizmaları

Bazal gangliyonlar ve motor korteks, motor aktivitelerin yürütülmesinde önemli rol oynamaktadır. Bazal gangliyonlar, eylemlerin ve hedefe yönelik davranışların kontrolünde önemli işlevlere sahip olan birkaç paralel, ancak anatomik olarak ayrılmış talamo-kortiko-bazal gangliyon devresinin bir parçasıdır (Alexander ve ark., 1990). Bazal gangliyonlar; telensefalon, diensefalon ve orta beyine yayılan, birbirleri ile bağlantılı subkortikal nükleus topluluğudur. Bunlar; Striatum (kaudat nükleus ve putamen), Globus pallidus (Globus pallidus eksterna (Gpe) ve Globus pallidus interna (Gpi), Substansiya nigra (Substansiya nigra pars kompakta (SNpc) ve Substansiya nigra pars retikülata (SNpr)) ve Subtalamik nükleuslardır (STN) (Albin ve ark., 1989) (Şekil 2.3).



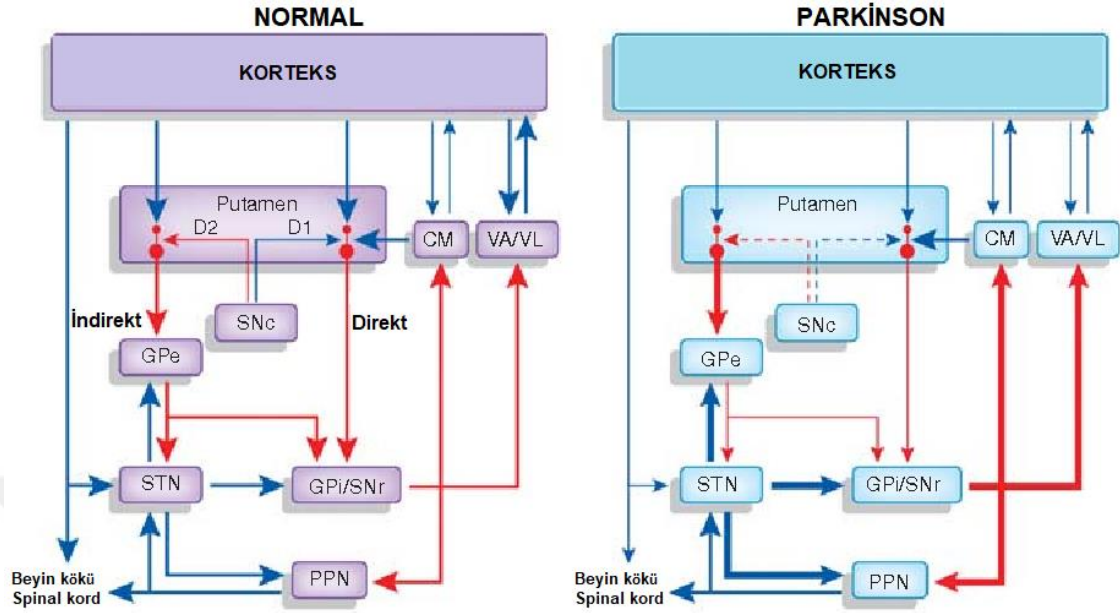
**Şekil 2.3.** Beynin bazal gangliyon alanı ve nükleusları görülmektedir (Albin ve ark., 1989).

Hareketi kontrol etmek ve hareket üzerinde ince ayarlamalar yapmakla görevli olan bu gangliyonlar, afferent uyarılarla bilgiyi alan ve efferent uyarılarla da bu bilgiyi ileten alanlardır. Bazal gangliyonların afferent girdilerinin büyük bir kısmı frontal korteksten, bir kısmı ise pariyetal korteksten gelir. Bu afferent sinyallerin bazal gangliyonlara giriş yaptığı yer striatumdur (Obeso ve ark., 2000). Bazal gangliyonlarda bilgiler işlenir, Gpi ve SNpr'dan çıkış yaparlar. Gpi'den çıkan bilgiler talamusun ventral anterior segmentine gelir ve talamustan çıkan aksonlar motor kortekse bağlanarak döngüyü tamamlarlar. Bazal gangliyonların efferent sinyallerinin büyük bir kısmı, Gpi üzerinden talamusa giderken, küçük bir kısmı ise beyin sapındaki pedinkülopontin nükleusa gitmektedir (Benarroch, 2016). Nöronal aktivite koordinasyonu, bazal gangliyonların üzerinden geçen birbirine paralel nöronal ağlara bağlıdır (Alexander ve ark., 1986). Serebral korteks ve bazal gangliyonlar arasında korteksin aktivitesini artıran direkt ve korteksin aktivitesini azaltan indirekt olmak üzere iki yol bulunmaktadır (Brown ve ark., 1997). Bazal gangliyon devresindeki yollar spesifik nörotransmitter bağlantıları aracılığıyla organize bir ağ oluşturmaktadırlar. Direkt ve indirekt yol GABAerjiktir (Gama-aminobütirik asit). Striatumu Gpi ve SNpr'ya bağlayan direkt yolda; frontal ve pariyetal korteksten gelen bazal gangliyon afferent sinyalleri putamene girer ve doğrudan Gpi ve SNpr'ya giderek talamus üzerinden kortekse geri döner. Gpi ve SNpr inhibe edici GABAerjik nöronlarını hem talamusa hem de beyin sapındaki pedinkülopontin nükleusa göndermektedir.

Glutamaterjik lifler aracılığıyla ortaya çıkan talamik çıktı uyarıcıdır ve prefrontal ve motor korteksi uyarır. İndirekt yolda ise; korteksten putamene gelen sinyaller Gpe ve STN'a uğradıktan sonra, Gpi ve SNpr'ya giderek talamus üzerinden kortekse dönerler (Smith ve ark., 2012). Gpe, GABAerjik bağlantılar aracılığıyla STN üzerinde inhibitör etki yaratır (Sawle, 1999).

DN'lar; SNpc'da yer alan ve aksonları striatuma kadar uzanan nöronlardır. Nigrostriatal yolak bilinçli motor hareketleri düzenlemede önemli rol oynamaktadır (Chinta ve Andersen, 2005).

Direkt yolun nöronları D1 tip; indirekt yolun nöronları da D2 tip reseptörlere sahiptirler. Dopamin reseptörleri guanin nükleotit bağlayıcı protein (G protein) eşleşmeli reseptörlerdir. 5 tane alt tipi bulunmaktadır ve 2 gruba ayrılırlar. D1 benzeri reseptörler; D1 ve D5'i içerirler. Adenilat siklaz aktivasyonu ile siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimine neden olurlar. D2 benzeri reseptörler ise D2, D3 ve D4'tür. Bu reseptörler G proteinlerin alfa alt birimi olan Gi/o proteinleri ile eşleşirler. Gi/o proteinleri, heterotrimerik G protein alfa alt birimleri ailesidir. Eşleşme sonucunda adenilat siklazı inhibe ederek cAMP üretimini baskırlar (Kebabian ve Calne, 1979). DA; D1 tip reseptörlere bağlandığında uyarıcı, D2 tip reseptörlere bağlandığında ise inhibe edici bir etki gösterdiğinden; bu devrelerin regülasyonunda anahtar role sahiptir (Alexander ve ark., 1986) (Şekil 2.4).



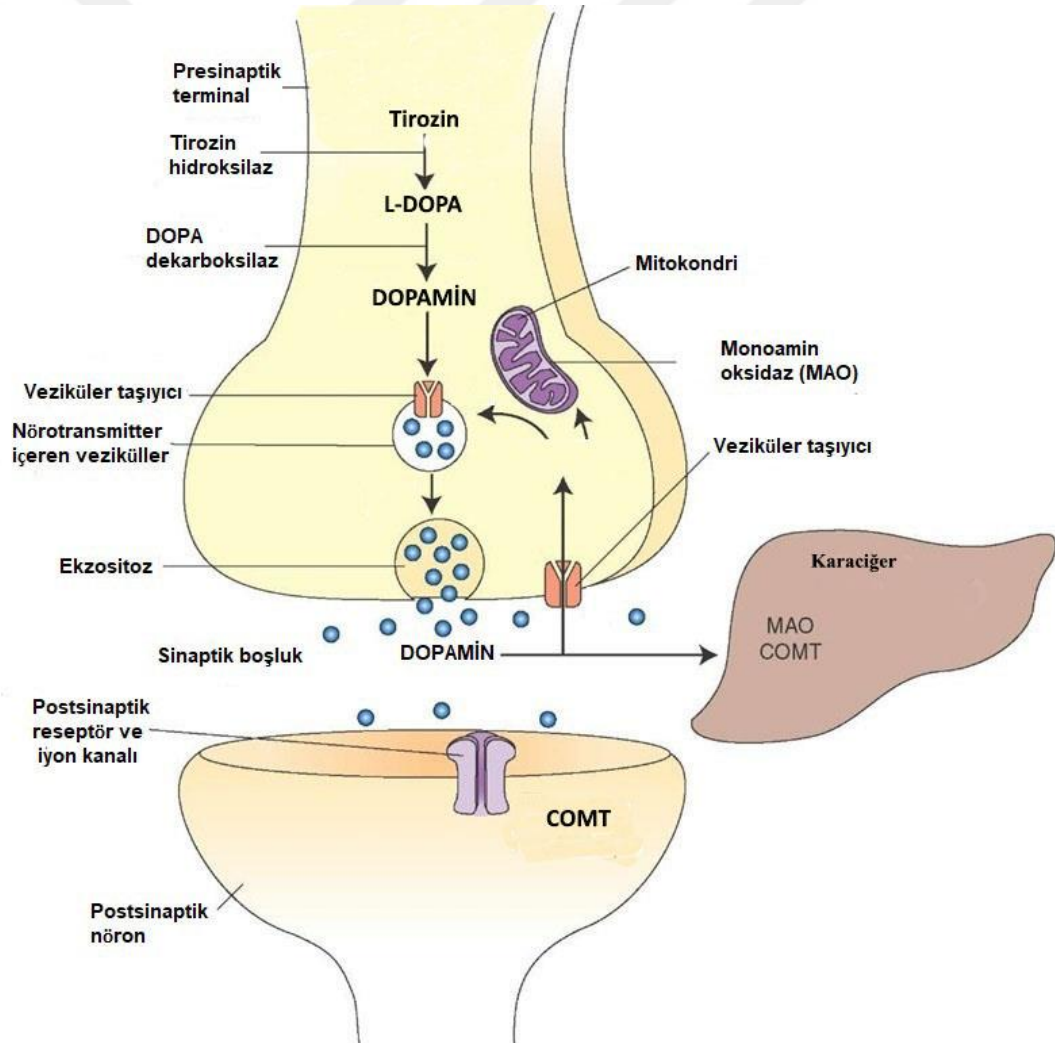
**Şekil 2.4.** Dopaminin (DA) direkt ve indirekt yol aracılığı ile motor hareketin düzenlenmesindeki etkin yol ve PH’nda meydana gelen değişimler gösterilmektedir (Smith ve ark., 2012). (CM, Sentromedyan nükleus; GPe, Globus pallidus dış segment; Gpi, Globus pallidus iç segment; PPN, Pedinkülopontin nükleus; SNc, Substansiya nigra pars kompakta; STN, Subtalamik nükleus; VA/VL, Ventral enteriyor, ventral lateral nükleus; SNr, Substansiya nigra pars retikülata)

#### 2.1.4. Dopamin ve Parkinson Hastalığı

Katekolaminler; adrenal medullanın kromafin hücrelerinde, serebrum ve sempatik nöronlarda tirozin aminoasidinden sentezlenen epinefrin, norepinefrin ve dopamindir. Katekolaminlerin sekresyonu egzersiz, hipoglisemi, miyokard infarktı gibi pek çok stresli durumlarda artar. Katekolaminlerin karaciğer, böbrek ve alyuvarlarda monoaminoksidaz ve katekol o-metil transferaz enzimlerinin etkileriyle metabolize edilirler ve ortaya çıkan son metabolitler idrarla dışarı atılır (Reich ve Savitt, 2019). DA sentezi; Tirozin amino asidinin, Tirozin hidroksilaz (TH) enzimi ile L-DOPA’ya katalizlenmesiyle başlamaktadır. L-DOPA, aromatik dekarboksilaz enzimi ile dekarboksillenir ve DA üretilir. Üretilen DA veziküller içerisine alınır ve veziküler taşıyıcılar aracılığı ile sinaptik boşluğa salınır. Salınan DA, dopamin reseptörüne bağlanınca postsinaptik hücrede cevap oluşur. DA presinaptik bölgede ya da sinaptik aralıkta monoamin oksidaz B ve katekol-O-metiltransferaz ile enzimatik olarak parçalanır. Fakat enzimatik degradasyon DA’nin inaktivasyonu için yeterli olmaz. DA aynı zamanda dopamin taşıyıcıları ile sinapstan geri alınıp presinaptik bölgeye taşınır. Taşınan DA veziküller halinde tekrar veziküler monoamin taşıyıcıları ile sinaptik veziküllere alınır ve stimulasyon ile sinir

terminallerinden sinapsa ekzositoz yoluyla boşalır, bu sayede DA sirkülasyonu sağlanmış olur (Giros ve Caron, 1993; E. Anderson ve Nutt, 2011) (Şekil 2.5).

Striatumdan salınan DA, hareketi kolaylaştırmak için hem direkt hem de indirekt yollara etki etmekte, bu durum da uygulanan motorik hareketin ince ayarını yapmaktadır. Normal şartlarda bu iki yol birbiri ile dengededir. Ancak PH'da DA'nın azalmasıyla bu denge indirekt yolu destekleyecek şekilde bozulur ve talamus üzerinde indirekt yolun etkisi artarken, kortikal aktivasyon da azalarak PH belirtilerini ortaya çıkartmaktadır (Lewis ve Barker, 2009).

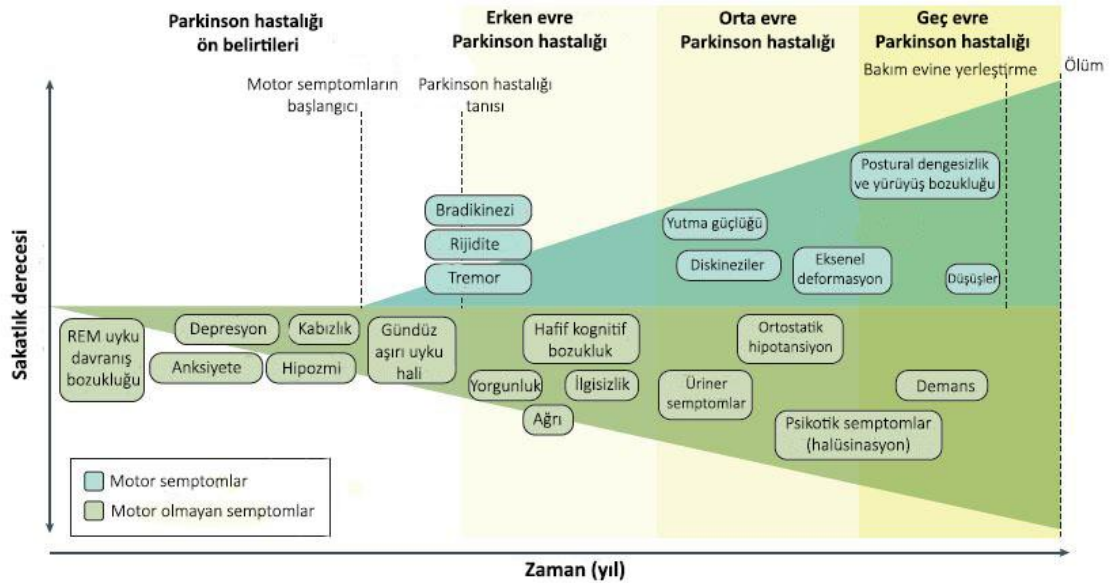


**Şekil 2.5.** Dopamin sentezi görülmektedir (E. Anderson ve Nutt, 2011). (L-DOPA; Levodopa, MAO; Monoamin oksidaz, COMT; katekol-O-metiltransferaz)

### 2.1.5. Parkinson Hastalığı Semptomları

Hastalığın motor semptomları; bradikinezi, tremor, rijidite ve postural bozukluklardır (Jankovic, 2008). Motor olmayan semptomlar ise; nöropsikiyatrik semptomlar (depresyon, bilişsel işlev bozuklukları ve demans), uyku bozuklukları (uykusuzluk ve hızlı göz hareketi bozuklukları) ve otonomik semptomlardır (mesane bozuklukları, ortostatik hipotansiyon, erektil iktidarsızlık) (Chaudhuri ve Schapira, 2009).

PH'nın teşhisi, tipik olarak 50'li yaşların sonlarında ortalama 40 ile 80 yaşları arasında motor semptomların (erken evre PH) gerilemesiyle ortaya çıkmaktadır. Motor semptomların görülmesi genellikle tek taraflıdır ve hastalık boyunca asimetri devam eder. Motor olmayan semptomlar hastalık seyrinde giderek yaygınlaşır ve belirginleşir, ancak motor olmayan sorunların şiddetinin artması PH'nın tüm aşamalarında değişken bir dereceye kadar ortaya çıkabilir. L-DOPA'nın neden olduğu motor komplikasyonların artması ile orta evre PH ve zayıf L-DOPA- postural instabilite, yürüyüş problemleri ile geç evre PH derecelendirmesi yapılır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. PH'nın zamana bağlı değişen motor ve motor olmayan semptomları gösterilmektedir (Poewe ve ark., 2017) (REM; Hızlı göz hareketi)

### **Bradikinezi (İstemli Hareketlerde Yavaşlama)**

PH'nın en karakteristik klinik bulgusu, hareketlerde yavaşlama anlamına gelen bradikinezidir. Kişi, motor kontrolü sağlamakta zorlanır. Hareketi planlama, başlatma ve yürütme ile ilgili zorluklar, sıralı ve eş zamanlı görevleri yerine getirmede sorunlar ortaya çıkmaktadır (Berardelli ve ark., 2001). Motor aktivitenin azalması (hipokinezi) ile başlayan semptomlar; hastalığın ilerleyen zamanlarında bradikinezi ve akineziye (hareket edememe) dönüşür (Şekil 2.6).

### **Tremor (İstirahat Halinde İzlenen Titreme)**

PH'nın en karakteristik özelliklerinden biri olup; hastaların %70'inde görülmektedir (Helmich ve ark., 2012). Üst ekstremité distalinden unilateral olarak başlar ve hareket sırasında kaybolur. Tremor sıklıkla işaret parmağı ve başparmağın ritmik ve stereotipik para sayma hareketidir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde yüz, dudaklar, dil ve çenede de tremor görülebilir. Tremor gün içinde değişen şiddetlerde aralıklı olarak ortaya çıkar, uyku durumunda kaybolurken stres durumlarında artmaktadır.

### **Rijidite (Kas Katılığı)**

Agonist ve antagonist kasların eş zamanlı kasılmasıdır ve pasif olarak ekstremitenin eklem boyunca hareketi sırasında dirençle karşılaşması olarak ortaya çıkar. Rijidite PH'na özgü bir semptom olmamakla birlikte birçok hareket bozukluğuna bağlı hastalıkta ortaya çıkabilir (Riley ve ark., 1989).

### **Postural Bozukluk**

Gövdedeki rijidite, bozulmuş aksiyal postüre neden olur ve bükük boyun ve gövde, bükük bilek ve dizler ile kendini gösterir. Eğilmiş postür ise hastalığın son dönemlerinde ortaya çıkmaktadır (S. D. Kim, Allen, ve ark., 2013).

### **Bilişsel Bozukluk ve Demans**

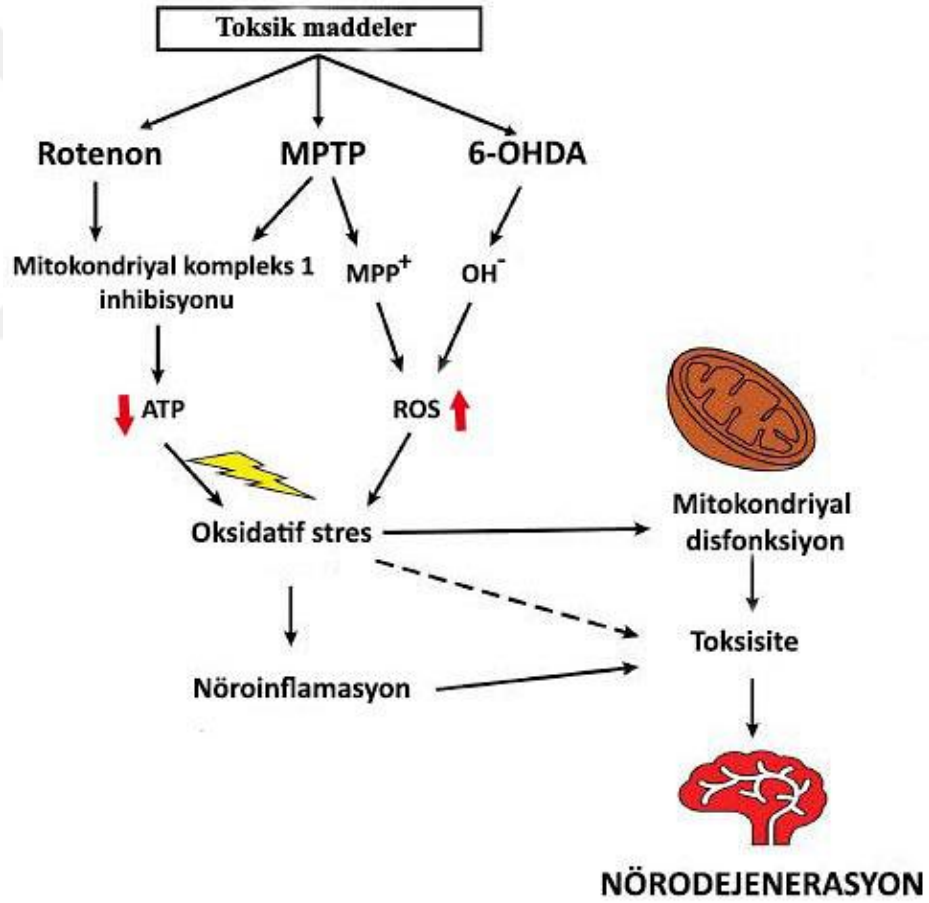
15-20 yıllık hastalık sürecinden sonra Parkinson hastalarının %80'inde bilişsel bozukluklar ve demans görülmektedir (Aarsland ve ark., 2003; Aarsland ve Kurz, 2010; Biundo ve ark., 2016).

## Depresyon

PH patolojisinde DN ile birlikte serotonerjik ve noradrenerjik nöron kaybı da gerçekleşmektedir ve buna bağlı duygudurum bozuklukları ve depresyon da ortaya çıkmaktadır (Buddhala ve ark., 2015).

### 2.1.6. Deneysel Parkinson Hastalığı Modelleri

DN dejenerasyonunun indüklenmesinde; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 6-hidroksidopamin (6-OHDA), rotenon ve paraquat gibi nörotoksik ajanlar kullanılmaktadır (Raza ve ark., 2019) (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7.** Deneysel PH modeli oluşturulmasında kullanılan toksik ajanlar ve etkileri gösterilmektedir (Raza ve ark., 2019) (Referansa bağlı kalınarak revize edilmiştir).

## 6-OHDA

DA analogu 6-OHDA, monoaminerjik nöronal toksisiteyi indüklemek için kullanılmaktadır. Kan beyin bariyerini geçemez, bu nedenle substantia nigraya stereotaksik işlemlerle doğrudan uygulama gerektirmektedir. Büyük beyin bölgesinde toksin iletim kolaylığı nedeniyle farelerden ziyade sıçanlarda kullanılmaktadır (Maasz ve ark., 2017).

6-OHDA'nın kimyasal yapısı katekolaminlere benzer olup; katekolamin DA transport sistemini kullanarak seçici katekolaminergic hücre ölümüne neden olur (Cohen, 1984; Luthman ve ark., 1989) ve toksisitesini; otooksidasyon ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin I ve IV komplekslerinin inhibisyonuyla göstermektedir. Bu mekanizmalar; nöroinflamasyon, mikroglial aktivasyon ve hücre ölümüyle sonuçlanan apoptotik yolların aktivasyonu ile reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumunu tetiklemektedir (Bove ve ark., 2005).

## MPTP

Bir lipofilik toksin olan MPTP; fare, insan ve diğer primatların Substantia nigrası için oldukça seçicidir ve kan beyin bariyerini geçtikten sonra PH'nı indüklemektedir (Langston ve ark., 1984). MPTP'nin en geçerli uygulama yöntemi sistemik uygulama olup; en sık kullanılan hayvan modelleri fare ve maymundur. Sıçanlar ise MPTP'ye karşı göreceli olarak daha dayanıklıdır. MPTP'nin toksisitesini gösterebilmesi için gliya ve serotonergic nöronlarda monoamin oksidaz B (MAO-B) enzimi ile 1-methyl-4-phenyl-2,3 dihydropyridinium'a (MPDP) çevrilmelidir. Hemen ardından oksidasyonla aktif ve toksik bir bileşik olan 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)'a dönüşür. MPP<sup>+</sup> organik katyon taşıyıcısı ekstraselüler alana salınır, polar yapıda olduğundan hücre içine giremez ve plazma membran taşıyıcılarına ihtiyaç duymaktadır (Nicklas ve ark., 1985; Przedborski ve Vila, 2001). DA taşıyıcısından (DAT) giren MPP<sup>+</sup>, ROS oluşumunu indükler ve bazal gangliyonların DN'lerinde toksisite oluşturarak DN kaybına neden olur (G. Anderson ve ark., 2007).

Yaşlı farelerde elektron taşıma zincirinin I, III ve IV komplekslerinin aktivitelerini inhibe ederek toksisiteyi indükler. Bu arada ortamdaki toksisiteye bağlı DN'larda  $\alpha$ -sinüklein

içeren inklüzyonlar da oluşur. MPTP, mikroglialar tarafından toksik olarak algılanır ve inflamatuvar yanıt reaksiyonları başlatılır (Fornai ve ark., 2005).

### **Rotenon**

Bitki kaynaklı toksin olan rotenon; spesifik bir mitokondriyal elektron taşıma sistem kompleks-1inhibitörüdür ve kan beyin bariyerinden hızlıca geçebilir (Nicholls, 2008). Rotenon ile kompleks I'in inhibisyonu, oksidatif strese sebep olan ROS oluşumuna neden olur (Sherer ve ark., 2003). Rotenon ile oluşturulan deneysel PH modellerinde sıçanların DN'lerinde, ubiquitin ve  $\alpha$ -sinüklein içeren fibril sitoplazmik inklüzyonlar birikir (Betarbet ve ark., 2000; Giraldez-Perez ve ark., 2014). Rotenonun kronik intravenöz uygulaması kompleks I aktivitesinde önemli derecede azalmaya ve SNpc'da DN kaybına neden olmaktadır (Betarbet ve ark., 2000).

### **Paraquat**

Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium diklorid) yapısal olarak MPTP'ye oldukça benzeyen bir herbisittir (Tanner ve ark., 2011). Paraquat kan beyin bariyerinden geçemediği için DN'lara DAT'lar aracılığıyla girer ve toksik etkilerini hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve süperoksit radikalleri birikimi yoluyla gerçekleştirir (Shimizu ve ark., 2001; Rappold ve ark., 2011). Paraquatın kronik uygulaması, DN'ların doz bağımlı ve seçici ölümünü gerçekleştirmektedir (Brooks ve ark., 1999; Goode ve ark., 1999).

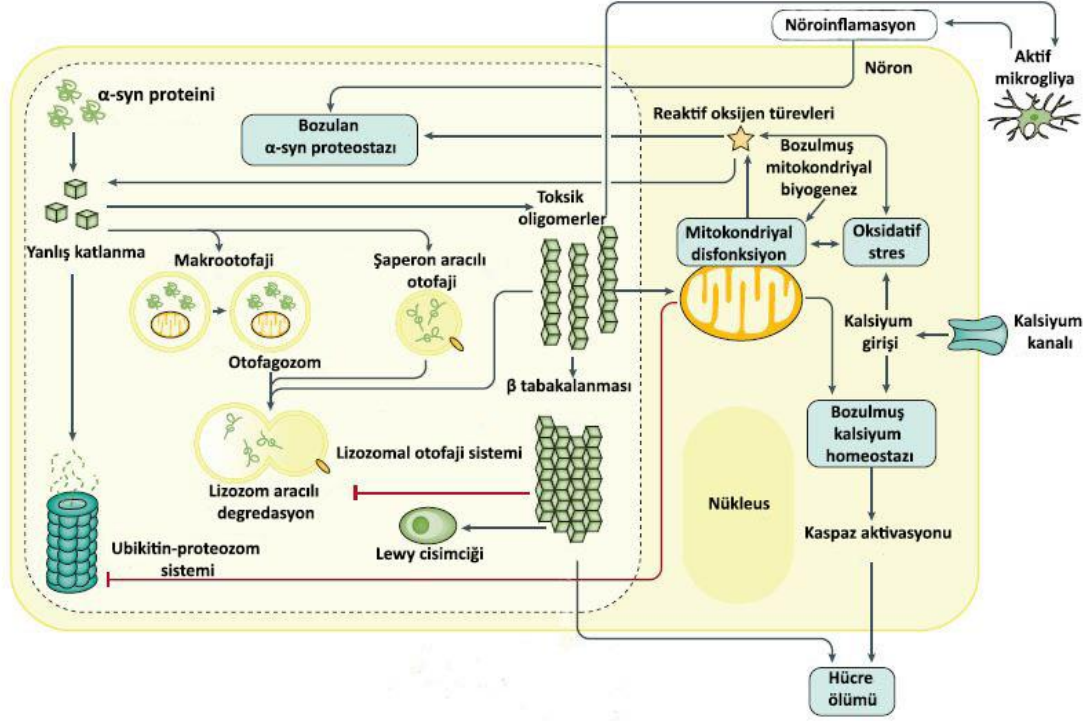
#### **2.1.7. Parkinson Hastalığı'nın Patolojisi**

PH'nın önemli patolojik özelliği, SNpc içindeki DN'ların kaybıdır. SNpc'nın striatumun dorsal putamenlerine yansıyan nöronları içeren ventrolateral tabakası en çok etkilenen bölgedir. PH'da nöron kaybı, locus koruleus, Meynert nükleus basalis, pedinkülopontin nükleus, raphe çekirdeği, vagus, amigdala ve hipotalamusun dorsal motor çekirdeği gibi diğer birçok beyin bölgesinde görülür (Dickson, 2012). PH'nın patolojisi,  $\alpha$ -sinüklein agregasyonlarından oluşmuş ipliksi sitoplazmik inklüzyonların birikmesiyle meydana gelen Lewy cisimcikleridir.  $\alpha$ -sinüklein fosforilasyonu ve fibrilizasyonu Lewy cisimciği oluşumuna yol açar ve DN ölümüne neden olur (Gorbatyuk ve ark., 2008; Volpicelli-Daley ve ark., 2011; Volpicelli-Daley ve ark., 2014).

### 2.1.8. $\alpha$ -Sinüklein Agregasyonu

Hücresel protein homeostazı; moleküler şaperonlar, ubiquitin-proteazom yolağı ve otofaji-lizozomal yolağın koordineli bir şekilde çalışması ile yürütülmekte olup, yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılması veya tamiri ile gerçekleşmektedir. Bu yolların bozulması veya inhibisyonu sonucu mutasyona uğramış  $\alpha$ -sinüklein gibi hatalı katlanan proteinler agregat oluştururlar ve hücre içindeki moleküler akışı engelleyerek hücre ölümüne yol açarlar (Cookson, 2009; Lim ve Zhang, 2013; Sato ve ark., 2018).

$\alpha$ -sinüklein proteinleri, santral sinir sistemindeki total protein miktarının %1'ini oluşturmaktadır.  $\alpha$ -sinüklein'nin hücre içi homeostazı, ubiquitin-proteazom sisteminin ve lizozomal otofaji sisteminin etkileri ile korunmaktadır (Vekrellis ve ark., 2011). Her iki sistemin de inhibisyonu protein miktarında artışa sebep olur (Xilouri ve ark., 2013). SNCA genindeki mutasyon,  $\alpha$ -sinüklein proteininin yanlış katlanmasına, proteinin sekonder yapısının değişmesine ve ubiquitin ile işaretlenerek proteazomal degradasyona maruz kalmasına yol açmaktadır (Feany, 2004).  $\alpha$ -sinüklein proteini yanlış katlanmalar sonucunda çözünmez hale gelir, agregasyona neden olur ve hücre içinde birikerek Lewy cisimciğini oluşturur (Breydo ve ark., 2012; Karampetsou ve ark., 2017). Yaşla birlikte beynin proteolitik savunma mekanizmalarındaki azalma  $\alpha$ -sinüklein birikiminde önemli rol oynamaktadır (Brundin ve ark., 2008; Kaushik ve Cuervo, 2015) (Şekil 2.8).

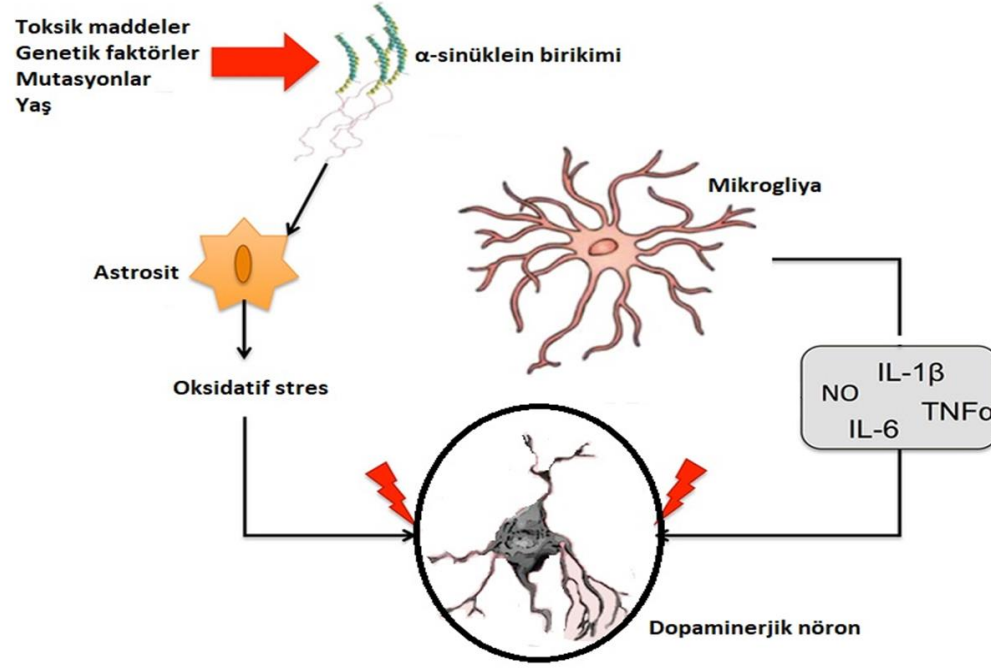


**Şekil 2.8.** PH'na neden olan faktörler ve  $\alpha$ -sinükleinin patolojideki rolü gösterilmektedir (Poewe ve ark., 2017).

### 2.1.9. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon; PH, AH ve Huntington hastalığı dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıkta önemli bir role sahiptir (Aid ve Bosetti, 2011). Merkezi sinir sisteminde akut inflamatuvar yanıt, hasarlı dokuların onarımını sağlarken; yanıt kronikleştiğinde kalıcı beyin hasarlarına neden olmaktadır (Lucas ve ark., 2006; Eikelenboom ve ark., 2010). Nöroinflamatuvar koşullar altında aktifleşen gliyal hücreler, nöronal hasarı ve nörodejenerasyonu indükleyen proinflamatuvar ve nörotoksik faktörleri serbest bırakmaktadır (Harry ve Kraft, 2008). Nöroinflamasyon sırasında; aktif mikrogliyalı, beyin parankimindeki reaktif astrositler'den; sitokinler, kemokinler, proteoglikanlar, tamamlayıcı kaskad proteinleri, ROS'lar da dahil olmak üzere çok sayıda inflamatuvar aracı madde salınımı mevcuttur. Bu faktörler kan beyin bariyerine hasar vererek adaptif bağışıklık sistemi hücrelerinin merkezi sinir sistemine girmesine izin verir ve gerçekleşen bu olaylar sonucunda beyin hasarı şiddetlenebilir (Agostinho ve ark., 2010).

Beyinde dejenerasyon durumunda, mikrogliya dejenere olan doku etrafında çoğalır, birikir ve aktif M1 tip formuna dönüşür. M1 tip mikrogliya, interferon- $\gamma$  ve lipopolisakarit (LPS) tarafından uyarılır ve proinflamatuvar bir yanıt oluşturur. M2 tip ise; aktive olduğunda anti-inflamatuvar etki gösterir. Aktif M1 mikrogliya, proinflamatuvar sitokinleri düzenler ve Parkinson hastaları ve deneysel PH modellerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), ROS ve RNS (Reaktif NitrojenTürevleri) üretimini indükler (Sawada ve ark., 2006; Joers ve ark., 2017; Janda ve ark., 2018). Nöroinflamasyon ve mikrogliyal aktivasyon, DN hasarına neden olarak PH patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Hirsch ve Hunot, 2009; Tufekci ve ark., 2011; Ha ve ark., 2012; Llewellyn ve ark., 2017) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. PH'da nörodejenerasyon gösterilmektedir (Yuste ve ark., 2015).

## 2.2. Toll Benzeri Reseptörler (TLRs)

Toll reseptörü ilk olarak *Drosophila Melanogaster*'de embriyoların gelişmesinde dorso-ventral alanın oluşturulması için gerekli bir reseptör olarak tanımlanmıştır (Nusslein-Volhard ve Wieschaus, 1980; Steward ve ark., 1984; Hashimoto ve ark., 1988).

TLR'ler, birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup transmembran protein ailesidir. TLR ailesi, insanlarda 10 (TLR1-10) ve farelerde 12

fonksiyonel reseptörden (TLR1-13; murin TLR10, gen eklemelerinden dolayı fonksiyonel olmayan bir psödojendir) oluşmaktadır (Hasan ve ark., 2005; Akira ve ark., 2006). Bu reseptörlerin her biri farklı moleküler yapıları tanıma ve immün yanıtın başlatılmasına izin verme yeteneğine sahiptirler.

### **2.2.1. TLR'lerin Yapısı ve Fonksiyonu**

İnsanlarda TLR'ler interlökin-1 reseptörünün (IL-1R) homologu olup, aynı zamanda adaptif immün cevabın da aktive olmasını sağlayarak konak immünitesinde önemli role sahiptirler (Thompson ve ark., 2011; Browne, 2012). TLR'ler tip I integral membran glikoproteinleri ile karakterize üç domaine sahiptir. Bu alanlar; lösine zengin ekstraselüler domain (LRR), transmembran domain ve interlökin 1 (IL-1) reseptörüne homolog Toll-IL-1R (TIR) domainidir (O'Neill ve Dinarello, 2000). TLR'ler tarafından ligand tanıma, "xLxxLxLxx" motifinin 19-25 tekrarlı kopyasından oluşan LRR domaini ile gerçekleşmektedir (Jin ve Lee, 2008).

Patojenler üzerindeki evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara 'Hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP)' adı verilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde PAMP'ları tanıyan reseptörler (PRR) bulunur (Bode ve ark., 2012) ve bugüne kadar beş PRR sınıfı karakterize edilmiştir: (1) TLR'ler, (2) C-tipi lektin reseptörleri, (3) Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domenine benzer reseptörler, (4) Retinoik aside bağlı gen-1 benzeri reseptörler ve (5) AIM2 benzeri reseptörler (Brubaker ve ark., 2015). TLR'ler patojenlere ek olarak; ısı şok proteinleri, HMGB-1, ürik asit, hücre stres, protein agregasyonu veya mutasyonu gibi doku hasarı veya hücre ölümü ile ilişkili ligandların moleküler modellerini (DAMP) de tanımaktadırlar (Bianchi, 2007; Beraud ve ark., 2011). TLR'ler, PAMP ve DAMP'ları tanıdıklarında, patojeni konakçıdan temizlemek veya hasarı çözmek için immün sistemi aktive ederek bir sinyalleme reaksiyonu başlatırlar. Hem proinflamatuvar sitokin üretiminin ve fagositozun başlatılması gibi spesifik olmayan yanıtlardan oluşan doğuştan gelen bağışıklık sistemin aktivasyonunda, hem de T ve B lenfositlerinin aracılık ettiği patojene spesifik bir yanıttan oluşan adaptif bağışıklık sisteminin aktivasyonunda rol oynarlar (Hoebe ve Beutler, 2004).

TLR'ler, hücre içerisinde farklı lokalizasyonlarda bulunmaktadır. Fonksiyonel olarak TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11, PAMP ve DAMP'ları tanımak için hücre yüzeyinde; TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 ise hücre içi endozomal veya lizozomal kompartmanlarda ve endoplazmik retikulumda ekspre edilmektedir (Bode ve ark., 2012). İlk tanımlanan TLR1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen TLR4 olmuştur.

### **2.2.2. TLR'lerin Beyinde ve Nöroinflamasyondaki Rolü**

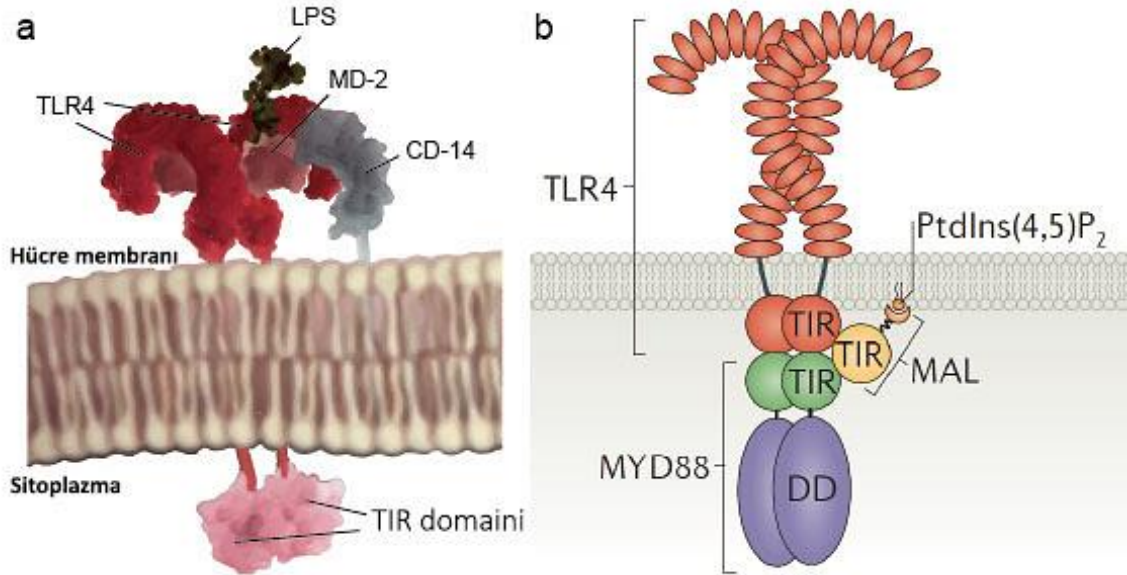
TLR'ler beyinde oligodendrositlerde (Bsibsi ve ark., 2002), astrositlerde (Bowman ve ark., 2003), mikroglialarda (Olson ve Miller, 2004) ve nöronlarda (Prehaud ve ark., 2005; Wadachi ve Hargreaves, 2006) görülmekte ve nöroenez ile beyin gelişimde rol oynamaktadırlar (Ma ve ark., 2007; Rolls ve ark., 2007; Drouin-Ouellet ve Cicchetti, 2012). TLR ekspresyonu mikroglialar inaktifken düşüktür ancak mikroglia aktivasyonu ile ekspresyonu artmaktadır (Trudler ve ark., 2010).

Beyindeki inflamatuvar yanıt, santral sinir sisteminde yer alan nöron ve gliyaların geri dönüşümsüz hasarını engellemek ve korumak üzerine kurgulanmıştır (Ransohoff, 2016). Ancak nöroinflamasyon kronikleştiğinde, nörodejenerasyon meydana gelir ve beyin, oksidatif strese karşı savunmasızdır (Sanders ve Greenamyre, 2013). Oluşan nöronal hasar sitokin ve kemokin yanıtlarının ve oksidatif stresin artmasına neden olarak tekrarlı bir dejenerasyon döngüsü oluşturur. Bu durum daha fazla nöron kaybı ile sonuçlanmaktadır (Gao ve Hong, 2008) (Şekil 2.10).



### 2.3.1. TLR4 Sinyalizasyonu

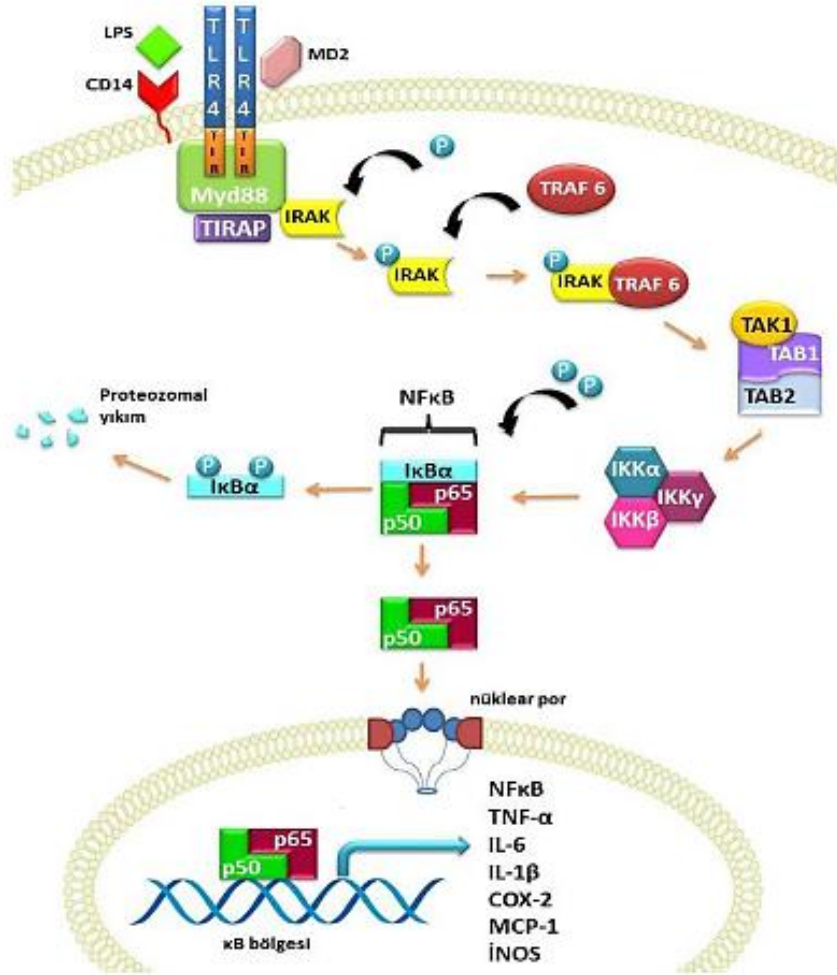
Konak sisteminde LPS tutulumu, LPS bağlayıcı protein tarafından kolaylaştırılır ve bu protein LPS'yi, Farklılaşma kümesi 14 (CD14), Miyeloid farklılaşma faktörü 2 (MD-2) ve TLR4 içeren reseptör kompleksine transfer eder (Şekil 2.11). TLR4 sinyalizasyonunda miyeloid farklılaştırma faktörü 88 (MyD88) bağımlı yolak ve MyD88 bağımsız yolak olmak üzere iki yolak tanımlanmış olup (Akira ve ark., 2006), MyD88 bağımlı yollardaki sinyal yolları, proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, eikosanoidlerin ve ROS gibi doğal immunité etkenlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Ve ve ark., 2012) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. TLR4 ve sinyalizasyonunda yer alan domainler görölmektedir (Gay ve ark., 2006).

MyD88 bağımlı yolda; bakteriyel LPS'yi tanıyan CD14; TLR4 ve MD-2 ile bir kompleks oluşturarak sinyalizasyonu başlatır (Akira ve ark., 2001). TLR4 aktivasyonu için, ekstraselüler bir protein olan MD-2 ve transmembran veya intraselüler bölgesi bulunmayan ve LPS reseptörü olan CD14 gereklidir. MD-2, TLR4'ün hücre yüzeyine lokalizasyonu ve LPS ile indüklenen uygun TLR4 cevabının oluşmasında görev alırken; CD14, bakteriyel LPS'nin ve diğer PAMP'ların tespit ve tanınmasında, TLR4 ve MD-2 ile birlikte yardımcı reseptör olarak görev alır. MyD88, TIR bölgesi içeren protein (TIRAP) varlığında TLR4'ün TIR bölgesine bağlanır ve komplekse terminal bölgedeki

karboksil (COOH) kısmından IL-1 reseptör bağlantılı kinaz kompleksini (IRAK) dahil eder. Daha sonra IRAK otofosforillenir, kompleksten çıkarılır ve yerine TNF reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) bağlanır. TRAF6 ile aktifleşen TGF-beta aktive kinaz 1 (TAK1); TAB1 (TAK1 bağlanma proteini 1) ve TAB2 (TAK1 bağlanma proteini 2) ile bir sinyal kompleksi oluşturur ve NF- $\kappa$ B inhibitör protein [I $\kappa$ B] kinaz (IKK) kompleksini aktive eder. IKK kompleks aktivasyonu ile fosforillenen I $\kappa$ B kompleksten ayrılarak proteozom yıkım yolu ile yıkılır, düzenleyici genler aktifleşir ve NF- $\kappa$ B nükleusa geçer ve  $\kappa$ B bölgesine bağlanır. Sonuç olarak; NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, iNOS ve MCP-1 gibi inflamatuvar düzenleyici genlerin ekspresyonu gerçekleşir (Janssens ve Beyaert, 2002; Polentarutti ve ark., 2003; Lee ve ark., 2006; Erridge, 2010) (Şekil 2.12).



**Şekil 2.12.** Nöroinflamasyonda TLR4'ün MyD88 bağımlı sinyal yolağı gösterilmektedir (J. H. Lee ve ark., 2006).

### 2.3.2. TLR4'ün Parkinson Hastalığında Rolü

TLR4'ün PH'nda hem nöroprotektif hem de zararlı rollere sahip olabileceğini gösteren yayınlar literatürde yer almaktadır.

PH patogenezinde mikrogliyal aktivasyonun temel kaynağı olan  $\alpha$ -sinüklein agregasyonları ve toksisite maruziyeti, TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının artışına sebep olmaktadır (Watson ve ark., 2012; C. Kim, Ho, ve ark., 2013; Noelker ve ark., 2013; Drouin-Ouellet ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada, postmortem kontrol beyinlerinden transkriptomik verilerin analizi ile TLR4 ve MyD88'in beyin her yerinde ekspresyonunun olduğu ve ifadelerinin SNpc ve putamende daha yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (Hughes ve ark., 2019). TLR4 geni susturulmuş ve MPTP ile PH modeli oluşturulmuş farelerde DN kaybının kontrol hayvanlara kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Bu durum, TLR4 inhibisyonunun nöroinflamasyonu etkileyerek DN hasarını azalttığını ortaya koymuştur (Noelker ve ark., 2013; Conte ve ark., 2017; Mariucci ve ark., 2018).

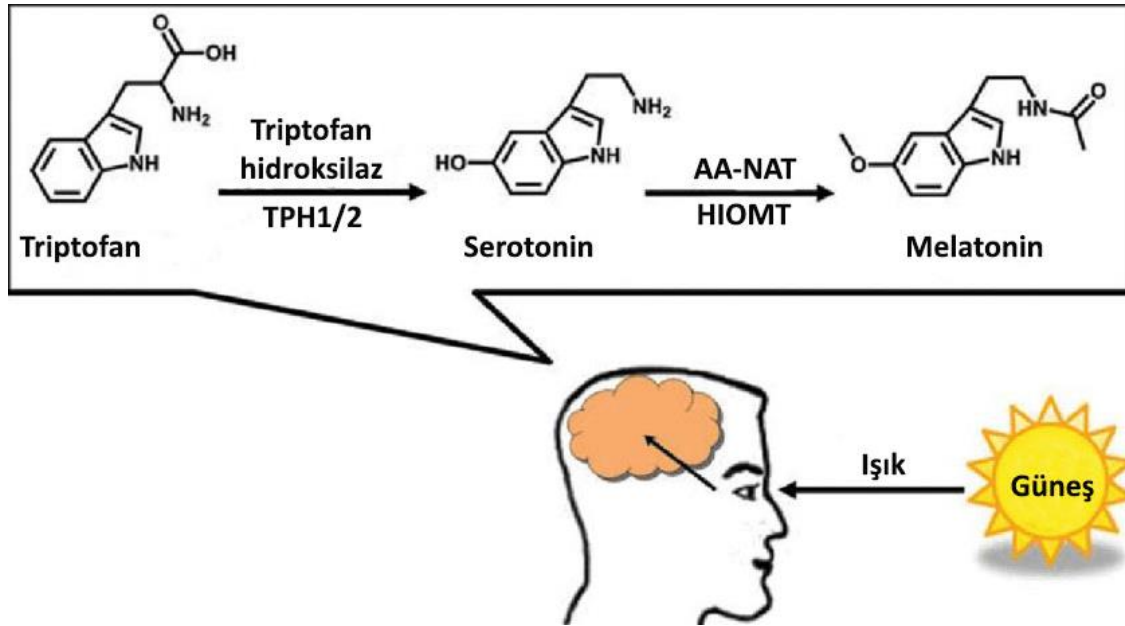
Literatürde yer alan *in vitro* bir çalışmada; oligomerik  $\alpha$ -sinüklein birikimlerinin TLR4 aracılı sitokin üretimini indükleyebileceği ve bu durumun da sitokin yanıtlarını tetikleyebileceği belirtilmiştir (Hughes ve ark., 2019). Bu nedenle TLR4 yolağının, oligomerik  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunu tetikleyebileceği ve beraberinde ortaya çıkacak yanıtların da regülasyonunu sağlayabileceğini düşündürmektedir.

### 2.4. Melatonin

Melatonin, beyin merkezinde bulunan epifiz bezi ve retinadan salgılanan bir nörohormondur (Tan ve ark., 2010). Melatonin, sirkadiyen ritimle düzenlenen bir sekresyon mekanizmasına sahip olup, ritmi hipotalamusun suprakiazmatik nükleusunda bulunan bir biyolojik saat tarafından ayarlanmaktadır. Suprakiazmatik nükleus, günlük aydınlık/karanlık siklusu ile 24 saatlik bir periyoda ayarlanmıştır. Bu senkronizasyon, ışık sinyalinin retinal yollarla suprakiazmatik nükleusa iletilmesi ile başlamaktadır. SKN'de bulunan saat, multisinaptik nöronal yollarla sirkadiyen sinyalleri pineal beze gönderir ve ritmik melatonin üretimini yönetir. Sirkadiyen ritmi senkronize etme, oksidatif strese karşı koruma, enerji metabolizmasını düzenleme, bağışıklık sistemini modüle etme ve yaşlanma sürecini erteleme gibi çok çeşitli düzenleyici ve koruyucu etkilere sahiptir (Tan

ve ark., 2007; De Pedro ve ark., 2008; Caballero ve ark., 2009; Shieh ve ark., 2009; Hardeland, 2010).

Melatonin hormonunun salınması pinealosit hücrelerinin ışığa duyarlı olmasıyla direkt ilişkilidir. Bu duyarlılık sayesinde ışıkla ortaya çıkan engellenme, karanlıkta ortadan kalkar ve pinealositlerin melatonin salgılaması tetiklenir. Işığın inaktivasyonu, gözde retina tabakasında başlayan uyarı retinohipotalamik yol ile hipotalamusta bulunan çekirdeklerden önce suprakiazmatik çekirdeğe ardından da paraventriküler çekirdeğe ulaşmaktadır. Arka beyin ve spinal kord yolunu izleyerek superior servikal gangliyona gelen uyarım, nörepinefrin salınımına sebep olur. Işığın inaktivasyonu ile oluşan karanlık uyarısı pineal beze ulaştığı zaman, norepinefrin hormonu pinealosit membranında bulunan adrenerjik reseptörlere bağlanır. Böylece bir dizi reaksiyon başlar. Melatonin sentezi pinealositlerden triptofan salınımı ile başlar, daha sonra serotonine ve son olarak dört aşamalı bir süreçte melatonine dönüştürülür (Tan ve ark., 2010). Serotonin melatonine dönüştürülmesi için serotonin-N-asetiltransferaz (NAT; aynı zamanda arilalkilamin N-asetiltransferaz [AANAT]) ve hidroksindol-O metiltransferaz (HIOMT) enzimleri gereklidir (Tan ve ark., 2010). AANAT, serotonini N-asetil-serotonine, HIOMT ise N-asetil-serotonini melatonine dönüştürür (Ribelayga ve ark., 2000) (Şekil 2.13).

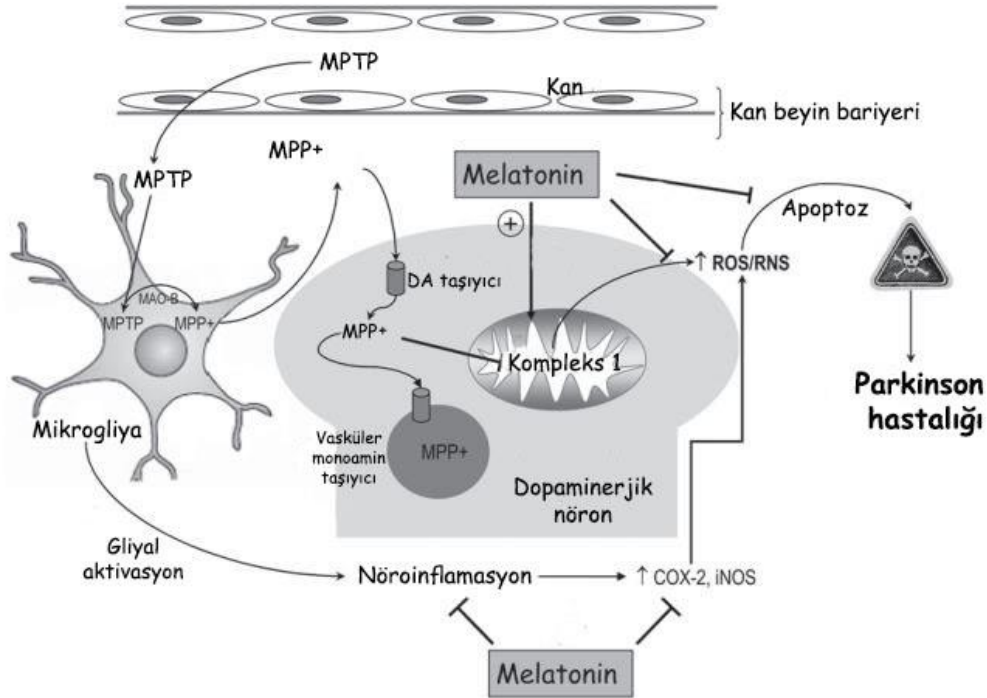


Şekil 2.13. Melatonin sentezi görülmektedir (Gillette ve Wang, 2014).

#### 2.4.1. Melatoninin Nöroinflamasyon ve Parkinson Hastalığındaki Rolü

Lenfosit, timus, dalak ve kemik iliği ile sentezlenen melatonin, biyotik ve abiyotik hasarların ve stresin indüklediği doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve inflamatuvar yanıtlarda önemli rol oynamaktadır (Naranjo ve ark., 2007; Gomez-Corvera ve ark., 2009; Lardone ve ark., 2011). MT1 ve MT2 reseptörlerinin aktivasyonu, kısmen glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonu ile nöroprotektif etki göstermektedir (Choi ve ark., 2011; Chang ve ark., 2015).

Ayrıca MPTP ile oluşturulan deneysel PH modeli çalışmalarında, melatoninin antioksidan bir etkiyle (Ianas ve ark., 1991; Ozsoy ve ark., 2015) SNpc'da TH pozitif nöronların ekspresyonlarını koruduğu ve motor fonksiyonları olumlu etkilediği görülmüştür (Absi ve ark., 2000; S. T. Chen ve ark., 2002; L. J. Chen ve ark., 2005; Patki ve Lau, 2011; Zaitone ve ark., 2013; Naskar ve ark., 2015) (Şekil 2.14).



**Şekil 2.14.** MPTP ile oluşturulmuş PH'da melatoninin etki mekanizmaları şematize edilmiştir (Mayo ve ark., 2005).

Bu bilgiler ışığında, MPTP ile oluşturulan deneysel PH modelinde melatonin, TLR4 aracılı nöroinflamasyonu baskılayarak inflamatuvar yanıtla bağlı oluşan sitokin salınımını

inhibe eder ve dopaminerjik nöron kaybını azaltır hipotezimizden yola çıkarak, çalışmamızda MPTP ile oluşturulacak PH modelinde; DN kaybına bağlı olarak ortaya çıkacak mikrogliyal aktivasyon ile bu yanıtlarla tetiklenmesi beklenen TLR4 aktivasyonunun yaratacağı nöroinflamatuvar yanıtların değerlendirilmesi planlanmıştır. MPTP etkisiyle aktive olması tahmin edilen proinflamatuvar yanıtların melatonin uygulamasıyla nasıl şekillendiği de çalışmamızla ilk defa ortaya konmuştur. Melatoninin  $\alpha$ -sinüklein katlantıları, TLR4 yolağı ve proinflamatuvar sitokinler üzerine etkisi PH modelinde bu çalışmayla ilk defa literatüre kazandırılacaktır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ile Fizyoloji Anabilim Dallarının laboratuvarlarında gerçekleştirilen çalışmamızda 80 adet 8-10 haftalık, 25-30 gr ağırlığında erkek C57BL/6 fareler kullanıldı. Deney süresince (7 gün) hayvanlar ortam ısısı  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  olan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngü otomasyonuna sahip Deney Hayvanları Ünitesi Laboratuvarı'nda barındırıldı. Tüm gruplardaki hayvanlar normal ticari kemirgen yemi ve musluk suyu ile beslendi. Çalışma süresince hayvanların yem ve su alımı serbest bırakıldı.

#### 3.1. Deney grupları

C57BL/6 fareler çalışmamız için rastgele 5 gruba ayrılmıştır.

- 1) Kontrol grubu (K) (n=10)
- 2) Çözücü (EtOH) verilen grup (Ç) (n=10)
- 3) Melatonin verilen grup (M) (n=20)
- 4) Parkinson hastalığı modeli oluşturulan grup (P) (n=20)
- 5) Parkinson hastalığı modeli oluşturulan ve melatonin verilen grup (P+M) (n=20)

#### 3.2. MPTP ve Melatonin İçin Kullanılacak Dozun Belirlenmesi

MPTP dozu; çalışmamızda MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride) (Cayman; #16377-100 mg) toksini serum fizyolojikte çözüldü (3 mg/ml) ve C57BL/6 farelere 12 saat aralıklarla 2x20 mg/kg/gün dozda, 2 gün boyunca, intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Literatürde çoğunlukla 4x20 mg/kg dozda, 2 saat aralıklarla uygulama yapıldığı belirtilmektedir (Conte ve ark., 2017). Fakat daha önce yapılan çalışmalarımızda 12 saat aralıklı uygulama sonrasında da modelin oluştuğunu ve hayvan kaybının çok daha az olduğunu gördüğümüz için bu yolla uygulama tercih edildi (Aras ve ark., 2014).

Melatonin dozu; melatonin (Sigma; #M-5250-5 gr) %6'lık absol alkol (EtOH) (Merck; #1.00986.2500) içerisinde çözüldü ve günde 2 kez 2x10 mg/kg dozda 7 gün boyunca i.p. olarak uygulandı (Yildirim ve ark., 2014). Melatoninin uygulama saatleri sabah 8.<sup>00</sup>-9.<sup>00</sup> ve akşam 17.<sup>00</sup>-18.<sup>00</sup> olarak belirlendi. Bunun sebebi, sabah azalan melatoninin eksikliğini

i.p olarak eklemek ve akşam salınım sırasında bu oranı biraz daha arttırarak anti-inflamatuvar etkinliğini gösterip göstermeyeceğini değerlendirebilmek içindir.

EtOH dozu; Literatürde melatoninin %10'luk EtOH'de çözüldüğü belirtilmiştir (Yildirim ve ark., 2014) fakat çalışmamızda etanolün zararlı etkisini en aza indirebilmek için dereceli olarak etanol miktarını azaltıp çözünme değerlendirildi. Buna göre %6'lık etanolde de çözünebildiğinden etanol oranı düşürülerek çalışmaya başlandı. %6'lık EtOH 1 ml. olacak şekilde i.p olarak enjekte edildi.

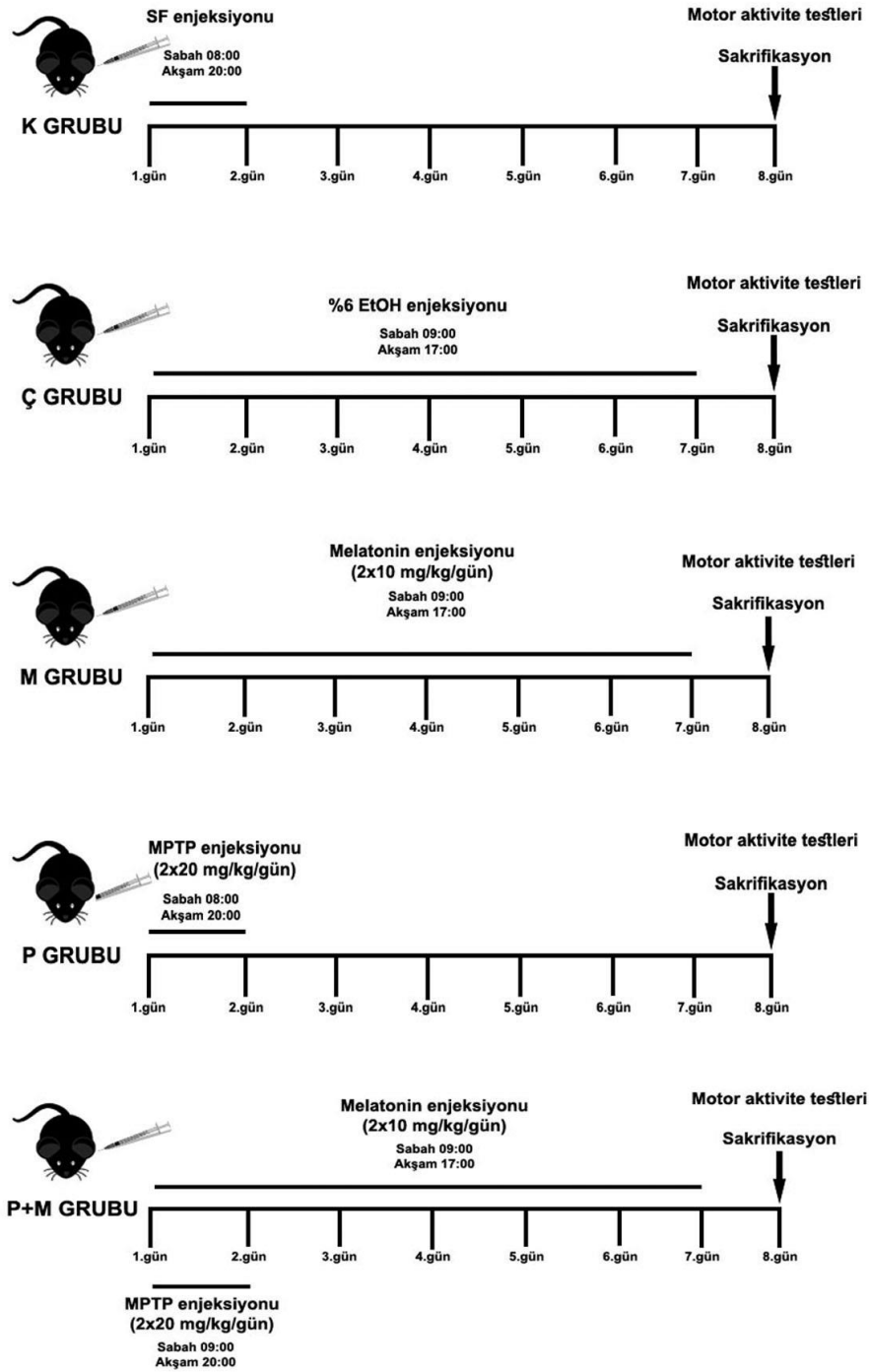
### **3.3.Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinin Oluşturulması**

Deney başlangıcında ilk 2 gün MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride) (Cayman; #16377-100 mg) toksini, P ve P+M gruplarına, serum fizyolojikte çözülerek (3 mg/ml), toplamda 4x20 mg/kg dozda (12 saat aralıklarla 4 doz olacak şekilde 2 gün boyunca), intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. M grubuna 7 gün boyunca %6'lık absol alkol (EtOH) (Merck; #1.00986.2500) içerisinde çözünmüş olan Melatonin (Sigma; #M-5250-5 gr) günde 2 kez, sabah 8.<sup>00</sup>-9.<sup>00</sup> ve akşam 17.<sup>00</sup>-18.<sup>00</sup> saatlerinde i.p. olarak uygulandı. Ç, melatoninin içinde çözüldüğü %6'lık EtOH enjeksiyonu yapıldı. Kontrol grubu hayvanlarına sadece enjeksiyon stresi için serum fizyolojik (SF) verildi.

1. K (n=10): MPTP çözücüsü olarak kullanılan SF (3 mg/ml) 2 gün boyunca 12 saat aralıklarla günde 2 doz i.p. olarak uygulandı.
2. Ç (n=10): Melatonin çözücüsü olarak kullanılan %6'lık EtOH 7 gün boyunca sabah 9.<sup>00</sup> ve akşam 17.<sup>00</sup> saatlerinde günde 2 doz (2x1ml) i.p. olarak uygulandı.
3. M (n=20): 10 mg/kg doz Melatonin %6'lık EtOH içerisinde çözdürüldü ve 7 gün boyunca sabah 09.<sup>00</sup> ve akşam 17.<sup>00</sup> saatlerinde günde 2 doz i.p. olarak 1ml olacak şekilde verildi.
4. P (n=20): MPTP toksini, SF'de çözülerek (3 mg/ml), 4x20mg/kg dozda, 12 saat aralıklarla toplamda 4 doz olacak şekilde 2 gün boyunca, sabah 08.<sup>00</sup> ve akşam 20.<sup>00</sup> saatlerinde i.p. olarak uygulandı.
5. P+M (n=20): %6'lık EtOH içerisinde çözünmüş olan 10 mg/kg Melatoninin ilk dozu i.p. olarak 1ml olacak şekilde sabah 08.<sup>00</sup> de verildi. 09.<sup>00</sup> da MPTP toksini, SF'te çözülerek (3 mg/ml), 4x20 mg/kg dozda i.p. olarak enjekte edildi. Toksin 12

saat aralıklarıyla toplamda 4 doz olacak şekilde 2 gün boyunca uygulandı. Melatonin enjeksiyonu sabah 09.<sup>00</sup> ve akşam 17.<sup>00</sup> saatlerinde i.p. olarak 1ml. olacak şekilde 7 gün boyunca uygulandı (Şekil 3.1).





**Şekil 3.1:** Gruplara özgü oluşturulan deney modeli şekilde gösterilmektedir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları, SF; Serum fizyolojik, EtOH; Etanol olarak kısaltılmıştır)

### **3.4.Ağırlık takibi**

Deney gruplarımızda uygulanan nörotoksinin başka herhangi bir etkisi olup olmadığını ve melatoninin olası etkilerini değerlendirmek için, farelerin deneyden önce ve deneyin son günü ağırlıkları ölçüldü.

### **3.5.Periferik Kan Yayma Analizi**

Her grupta yer alan 10 hayvandan alınan periferik kan örnekleri lamalar üzerine 45 derecelik açı ile yayma yapıp hematoksilen-eozin ile boyandı. Periferik kandaki inflamatuvar yanıtları değerlendirmek için yapılan analizlerde monosit, lenfosit ve nötrofil miktarları sayıldı. Bu işlem için; her hayvandan 2 slayt periferik kan yayması elde edildi ve bu 2 slaytta 10 farklı alanın fotoğrafı çekildi. Her fotoğrafta sayılan hücrelerde istatistiksel analizler yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

### **3.6.Davranış Deneyleri: Motor aktivite tayini**

Deney modeli oluşturulduktan sonra 3. 4. ve 5. günlerde toplamda 3 kez davranış testi alıştırmaları yapıldı. Deney hayvanları Rotorod testi için sırayla 3'er tekrar olacak şekilde 5-10-20-30-40 rpm hızlarda toplamda 300 sn yürütüldü. Hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce (8.gün) davranış testleri yapıldı. Bu deneylerle Parkinson hastalığı modelinin hayvan davranışlarına yansıyor yansımadığı test edildi.

#### **3.6.1. Lokomotor Aktivite Testi**

Lokomotor aktivite; PH modelinde hayvanların hareketindeki kısıtlanmaları, ekstremitelerdeki koordinasyon bozukluklarını ve bunların şiddetini belirlemek yapılan bir test olup; bu test için açık alan aktivite görüntüleyici sistem (MAY 9908 model Aktivite Görüntüleyici Sistem: Commat Ltd, Türkiye) kullanılmaktadır. Bu sistem, kızılötesi fotoseller ile donatılmış sekiz plastik cam kafesten (42 cm x 42 cm x 30 cm) oluşmaktadır. Kafeslerin yan bloklarında, yerden 4,5 cm yükseklikte ve 2,5 cm aralıklarla 15 yayıcı ve algılayıcı fotosel çifti bulunmaktadır. Diğer 15 fotosel çifti ise yerden 11,5 cm yukarıya yerleştirilmiştir. Fotosel ışınlarının kesilmesi bilgisayar sistemi ile belirlenmektedir. Deney hayvanının lokasyonu ise 0,1 s hassasiyetteki yazılım ile hesaplanmaktadır. Eğer deney hayvanının lokasyonu tamamen değişirse bu durum ambulatuvar aktivite olarak ifade edilmektedir. Işınlardan kesilmesine neden olan fakat lokasyonu değiştirmeyen diğer davranışsal cevaplar horizontal aktivite olarak ifade

edilmektedir. Yükselme gibi vertikal hareketler ise yerden 11,5 cm yukarıya yerleştirilen fotoseller aracılığıyla belirlenmektedir. Sistem ayrıca, toplam lokomotor aktivite ve alınan mesafeyi de vermektedir. Tüm parametreleri test etmek için deney hayvanı açık alanın tam ortasına konulmuş ve 5 dakika boyunca kayıt alınmıştır.

### **3.6.2. Bradikinezi Şiddetinin Belirlenmesi**

DeneySEL PH modeli oluşturulduktan sonra, motor aktiviteyi belirlemek için PH'nın spesifik semptomlarından bradikinezi değerlendirildi. Bradikinezinin derecesini ölçmek için küçük modifikasyonlara uğratılmış olan 'Pole Test = Çubuk Testi' metodu kullanıldı. Kelime anlamı istemli hareketlerde yavaşlama olan bradikinezi, genellikle hareketin başlatılmasında gecikme şeklinde tanımlanmaktadır. Bu gecikme süresinin uzaması bradikinezi şiddetinin arttığını göstermektedir. Test için yaklaşık olarak 0,8 cm çapında ve 50 cm uzunluğunda metal çubuk, sargı bezi ile sarılarak hayvanın daha iyi tutunabilmesi için uygun hale getirildi. Fare, çubuğun en üst noktasına başı yukarıya bakacak şekilde bırakıldı ve bu konumdayken tamamen geriye dönüp zemine doğru hareket etme anına kadar geçen toplam süre kaydedildi.

### **3.6.3. Rotarod Testi**

Farelerin motor performans ve koordinasyonunu test etmek için kullanıldı. Hayvanlar 3 ardışık gün boyunca rotarod aletine (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italy) alıştırıldı. Her gün aynı saatte, deneye başlamadan 30 dakika önce, hayvanlar laboratuvara alınarak çevreyle ilişki kurmaları sağlandı ve 5 dakika arayla 2 ardışık ölçüm yapıldı. Hayvanlar bireysel bölmelerine, dönen çubuğun (7,3 cm çapta) tersi yönünde yerleştirildikten sonra çubuk üzerinde kalma süreleri tespit edildi. Rotarod sisteminde, dönen çubuk üzerinde kalma süresi kaydedildi. Kayıt alma süresi 300 sn olarak belirlendi. Değişen hızlarda (5-40 rpm (dakikada dönme sayısı)) ölçüm yapıldı ve rotarod performansı hızlanan çubuk üzerinde geçirilen toplam saniye cinsinden ifade edildi. Hayvanlarda meydana gelebilecek stres ve yorgunluğu azaltmak amacıyla farklı hızlar arasında 5 dakika dinlenme periyodu uygulandı.

### **3.7. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması**

7. günün sonunda, motor aktivite tayinini takiben hayvanlar 1/2 ml dozda ketamin (Pfizer; Ketalar-500 mg/ 10 ml) ksilazin (Bioveta; XYLAZINBIO %2-ROMETAR 20 mg/ml) çözeltisinin intraperitoneal uygulanması ile anesteziye alındıktan sonra orta hat kesisi yapılarak abdomen ve göğüs kafesleri açıldı. Aortanın iliak bölgesine yerleştirilen bir branül ile (1/1000) oranında serum fizyolojik (SF) ile seyreltilmiş heparinize SF çözeltisi verilerek dokuların perfüzyonu sağlandı. Bu esnada sağ atrium kesilerek heparinize SF boşaltıldı. İmmünohistokimyasal analizler için kullanılacak hayvanlar heparinize SF'e ek olarak %10'luk formalin (Merck; #1.03999.2500) ile perfüze edildi, perfüzyon sonrası beyin dokuları çıkartıldı. Alınan dokuların bir kısmı parafin (Tissue-Tek; #4509-10 kg) takip için %10'luk formalin içine alınırken, bir kısmı da Western Blot yöntemi için ependorflara alınarak -80°C'de saklandı.

### **3.8. Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması**

%10'luk formaline alınan beyin dokuları 24 saat fiksatifte bekletildi. 1 günün sonunda dokulardan fiksatifi uzaklaştırmak için 4 saat akarsuda yıkandı. Suyu uzaklaştırmak için artan alkol serilerinden %70 ve %80 alkolde 2 gün, %90 alkolde 1 gün bekletildi. %100'lük alkolde 3 saat bekletilen dokular daha sonra şeffaflaştırma aşaması için Ksilol (Interlab; # 990-019-2501) serilerinden geçirildi. Ksilol I'de 5 dakika, Ksilol II'de ve Ksilol III'de 3 dakika alkolün dokudan çıkması ile şeffaflaştırma işlemi tamamlandı. Ardından dokular 56°C'ye ayarlanmış etüvde sıvı parafin serilerinden geçirilip, toplamda 5 buçuk saat ksilolün parafinle dokudan uzaklaştırılması sağlandı ve dokular temiz parafine gömüldü.

### **3.9. İmmünohistokimyasal Analizler**

Fare beyin dokularının SNpc bölgesinde; TH,  $\alpha$ -sinüklein, TLR4 ve p65 proteinlerinin ekspresyonlarını göstermek amacıyla immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildi.

#### **3.9.1. Kullanılan Solüsyonlar**

- 1XPBS (Phosphate Buffer Saline) (0,2M) Tamponu;  
2,85 gr Disodyum Hidrojen Fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck; #1.06585.5000)  
0,8 gr Potasyum Hidrojen Fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck; #1.05101.1000)

16 gr Sodyum Klorür (NaCl) (Merck; #1.06400.1000)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2M NaOH ile pH=7,4 olacak şekilde ayarlandı.

Sitrik Asit Tamponu: 2,1 gr sitrik asit ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) (Merck; #1.00241.5000) 900 ml distile suda çözüldü. pH'sı 2M NaOH ile pH=6,0 olacak şekilde ayarlandı.

- %3'lük  $H_2O_2$  Solüsyonu; 63 ml metanol ( $CH_3OH$ ) (Merck; #1.06009.2511) ve 7 ml %35'lik  $H_2O_2$  (Merck; #1.08600.1000) karıştırılarak alüminyum folyo ile sarılmış şale içerisinde hazırlandı.
- Bloklama Solüsyonu; Ultra V Block (Thermo; #TA-125-UB)
- Streptavidin Peroksidaz Kompleksi; HRP (Scytek; #ABG125)
- Kromojen; 3,3'-Diaminobenzidin tablet (DAB) (Sigma; #D4168)
- Mayer Hematoksilen; Mayer's hemalum solüsyonu (Merck; #1.09249.2500)
- Kapatma Solüsyonu; Entellan (Merck; #1.07960.0500)

İmmünohistokimya boyaması için parafine gömülen dokular bloklar halinde mikrotom cihazında (Leica; #RM2125RT) kesit alma işlemi için hazırlandı ve 5µm kalınlığındaki kesitler Poly-L-Lizin'li lamlara (Thermo Fisher; #10143265) alındı. Alınan kesitler gece boyu 60°C etüvde bekletilerek lama yapışması sağlandı. Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 2 defa 10'ar dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika muamele edildi. Dokudaki antijenik epitoplara ortaya çıkması için kesitler, sitrik asit tamponu (pH:6,0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak 1 defa 7 dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu. Mikrodalga uygulamasından sonra kesitler sitrik asit içerisinde 20 dakika boyunca oda ısısında soğutuldu. Kesitler fosfat tamponuna (PBS) alınıp 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanolla hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 25 dakika bekletildi. Ardından, kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'ten geçirildi. Dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildi ve özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla, bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlarla aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi +4°C'de

gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah tekrar PBS ile 3 kez 5 dakika yıkayıp, biyotinli sekonder antikorlar ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 defa 5 dakika PBS ile yıkandı ve streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben PBS ile yıkama sonrasında DAB substratı (Sigma; #D4168) damlatılarak enzim substrat ilişkisi sonucunda reaksiyon bölgelerinin kahverengi olması için beklendi. Bu basamak slaytları suya almak kaydıyla durduruldu. Kesitlere Mayer hematoksisleninde zıt boyama yapıp ardından entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu düzeyinde beynin SN bölgesinde TH, TLR4,  $\alpha$ -sinüklein ve p65 proteinlerinin dağılımları ve immünoreaktivite dereceleri tespit edilip fotoğraflandırıldı.

**Tablo 3.1.** İmmunohistokimyasal analizler için kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile dilüsyonları gösterilmektedir.

| <b>Primer Antikor/<br/>Kullanılan Dilüsyon</b> | <b>Firma Adı/<br/>Katalog Numarası</b> | <b>Sekonder Antikor/<br/>Kullanılan Dilüsyon</b> | <b>Firma Adı/<br/>Katalog Numarası</b> |
|------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------|
| TH (1:200)                                     | Santacruz;<br>#sc25269                 | Biyotinlenmiş Keçi Anti-Fare IgG / 1:600         | Vector Lab.;<br>#BA 9200               |
| $\alpha$ -sinüklein (1:200)                    | Cell signaling;<br>#4179               | Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:600       | Vector Lab.;<br>#BA 1000               |
| TLR4 (1:750)                                   | Abcam;<br>#ab13556                     | Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:600       | Vector Lab.;<br>#BA 1000               |
| p65 (1:1000)                                   | Cell signaling;<br>#8242               | Biyotinlenmiş Keçi Anti-Tavşan IgG / 1:600       | Vector Lab.;<br>#BA 1000               |

### 3.10. Western Blot

Fare total beyininde Tumor nekroz alfa (TNF- $\alpha$ ) proteinin varlığındaki değişimleri göstermek amacıyla western blot analizleri gerçekleştirildi.

#### 3.10.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Lizat Elde Edilmesi

**0,1 M Tris:** 0,6 gr Tris (Merck, # 1.08387.0500) 40 ml distile suda çözüldü, saf HCl ile pH 7,4'e ayarlandı ve hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

**100X Na-Ortovanadat:** 0,184 gr Na-ortovanadat (Sigma; #S6508-50G) 10 ml 0,1 M Tris ile çözdürüldü.

**Liziz tamponu:** 10 ml 0,1 M Tris (pH: 7,4) 90 ml distile su ile çözüldü, 1 ml 100X Na-Ortovanadat ve 1 gr SDS (Bio-Rad, #161-0302) eklendi.

**Protein İnhibitör Kokteyli:** 1 adet Proteaz inhibitör kokteyl (PİK) tableti (Roche-Complete; #11697498001) 2 ml steril suda çözülerek 25X'lik PİK hazırlandı ve steril suyla 1X'e dilüe edilip kullanıldı.

Farelerden alınan ve -80°C'de saklanan beyin dokuları, altında buz olan cam levha üzerine alındı ve bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı. Üzeri isimlendirilmiş yeni ependorfların darası alındı ve parçalanmış her bir doku tartılarak miktarları (gr) not edildi. Tartılan dokular yeni ependorflara aktararak buza alındı ve ependorfların içerisindeki her 0,2 gr doku için 600  $\mu$ l liziz tamponu ve 10  $\mu$ l PİK solüsyonu eklendi. Bir saat boyunca +4°C'de inkübe edildi ve her 15 dakikada bir vortekslendi. Daha sonra sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Tüm örnekler +4°C'de 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımları yeni ependorflara alınıp pelet kısımları atıldı. Bu homojenatlar içerdikleri protein konsantrasyonunu belirlemek üzere -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.10.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Homojenize edilmiş beyin dokularında protein miktarı tayini Bicinchoninic Acid Kit (BCA) yöntemi ile yapıldı.

#### Kullanılan Solüsyonlar ve Cihazlar:

- BCA protein assay Kit (Thermo; #23225)
- Nüve EN 500 inkübatör
- µQuant BioTek Spektrofotometre

BCA yönteminde standart protein olarak BSA kullanıldı. 1 mg/ml BSA (S0) hazırlandı, hazırlanan BSA steril suyla dilüe edildi ve S1 (500 µg/ml protein), S2 (250 µg/ml), S3 (125 µg/ml), S4 (62,5 µg/ml), S5 (31,3 µg/ml), S6 (15,6 µg/ml), S7 (7,8 µg/ml) standart proteinler elde edildi. Lizatlar, 1:50 oranında liziz tamponu (600 µl) ve PİK (10 µl) karışımı ile dilüe edilerek vortekslendi. Liziz tamponu-PİK karışımı “blank” olarak kullanıldı. BCA kit içeriğindeki Bicinchoninic asit solüsyonu Reagent A’dan 10 ml ve Bicinchoninic asit solüsyonu Reagent B’den 200 µl karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu yöntem için 96 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Her kuyucuğa iki tekrar olacak şekilde 25 µl standartlar, ardından iki tekrar olacak şekilde 25 µl örnekler eklendi. Daha sonra standartların ve örneklerin üzerine her kuyucuğa toplam 200 µl olacak şekilde çalışma solüsyonu eklendi ve kap alüminyum folyoya sarılarak 60°C’lik inkübatörde 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir örneğin protein konsantrasyonu tespit edildi. Örnekler protein konsantrasyonları eşit olacak şekilde Laemli tamponu (Sigma; #S-3401) ve steril su kullanılarak hazırlandı. Örnekler 5 dakika kaynatıldıktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.10.3. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protokolü

**%30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu:** 15,4 gr 37,5:1 oranındaki akrilamid-bisakrilamid (Bio-Rad, #161-0125) 40 ml distile su içerisinde çözülür.

**4X Tris-HCl/SDS (pH: 6,8):** 6,05 gr Tris (Merck; # 1.08387.0500) 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH, saf HCl ile 6,8'e ayarlandı. Distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı ve üzerine 0,4 gr SDS (Bio-Rad, #161-0302) eklendi.

**4X Tris-HCl/SDS (pH: 8,8):** 40 ml distile su içerisinde 18,15 gr Tris (Merck; # 1.08387.0500) çözüldü. pH saf HCl ile 8,8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0,4 gr SDS eklendi.

**%10'luk Amonyum Persülfat (APS):** 0,1 gr APS (Bio-Rad; #161-10700) 1 ml distile su içerisinde çözüldü.

**N, N, N'', N'''-Tetramethylethylenediamidine (TEMED):** Sigma; #T-7024

**5X Yürütme Tamponu (Elektroforez solüsyonu):** 9 gr Tris (Merck; # 1.08387.0500) ve 43.2 gr Glisin (Bio-Rad; #161-0718) 600 ml distile su içerisinde çözüldü. Üzerine 3gr SDS (Bio-Rad, #161-0302) eklendi. 180 ml 5X stok 720 ml distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

**10X TBS Tamponu (Tris tamponlu salin):** 60.55 gr Tris (Merck; # 1.08387.0500) ve 87.66 gr NaCl 800 ml distile suda çözüldü. pH'ı 7,4'e ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

**TBS-T Solüsyonu:** Hazırlanan 10X TBS'ten alınan 100 ml solüsyon distile su ile 1 litreye tamamlandı ve böylece 1X TBS elde edilmiş oldu. Elde edilen 1 litre 1X TBS içerisine 1000 µl Tween-20 (Merck; #8.22184.0500) eklendi.

**Transfer Tamponu (Blotlama solüsyonu):** 14,3 gr Glisin (Bio-Rad; #161-0718) ve 3 gr Tris (Bio-Rad; #161-0719) 700 ml distile su içerisinde çözüldü. Çözülen solüsyona 200 ml Metanol (Merck; #1.06009.2511) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

**Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):** 2 gr süt tozu (Bio-Rad; #170-6404) 40 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.

**Ayırıcı %10'luk poliakrilamid jel hazırlamada kullanılan solüsyonlar;**

- %30 Akrilamid-bisakrilamid: 5 ml
- 4X Tris-HCl/SDS (pH: 8,8): 3,75 ml
- dH<sub>2</sub>O: 6,25 ml
- %10 Amonyum persülfat: 50 µl
- TEMED: 10 µl

#### **Toplayıcı poliakrilamid jel için kullanılan solüsyonlar;**

- %30 Akrilamid-bisakrilamid: 650 µl
- 4X Tris-HCl/SDS (pH: 6,8): 1250 µl
- dH<sub>2</sub>O: 3050 µl
- %10 Amonyum persülfat: 25 µl
- TEMED: 5 µl

Proteinlerin kilodalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Kaynatılıp yüklenmeye hazır hale gelen örnekler moleküler ağırlık standardı başta olmak üzere her kuyucuğa 30 µg protein içerecek şekilde 15 µl yüklendi ve 15 dakika 80 voltta, 2-3 saat de 100 voltta yürütülecek şekilde jel elektroforezi hazırlandı. Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış proteinlerin poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transferi için membranlar kesildi ve 5 dakika metanolde çalkalandı. Elektroforez sonrasında blotlama yapıldı ve jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için +4°C’de 32 voltta gece boyu akım uygulanarak transfer işlemi gerçekleştirildi. Proteinlerin membrana transferinin tamamlanmasından sonra membran üç kez 10 dakikada bir değiştirilerek TBS-T tamponu ile yıkandı. %5’lik süt tozu hazırlanarak membran oda ısısında bir saat bloklandı. Ardından membranlar TBS-T içeren 1:1000 oranında seyreltilen TNF-α (Thermo; #PA5-19810) ve beta aktin (Cell signaling; #8457) antikoru içeren solüsyon ile gece boyunca, 4°C’de, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Gece boyu primer antikorla muamele edilen membranlar TBS-T ile 30 dakika boyunca üç kez yıkandı ve 1:3000 oranında seyreltilmiş Horseradish Peroksidaz (HRP) konjuge anti-tavşan IgG (keçide üretilmiş) (Vector lab.; #BA-1000) sekonder antikor içeren %5’lik süt tozu solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında membranlar tekrar 30 dakika TBS-T ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirildi.

#### **3.10.4. Görüntüleme ve Değerlendirme**

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin kemiluminesans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı (Thermo; #34580) ile muamele edilen membranlar 3-5 dakika bekleme süresinin sonunda Azure c280 Jel Görüntüleme Cihazı ile görüntülendi. Antikorların bağlanma yerleri bantlar şeklinde tespit edildi ve bu bantların Image J paket programı ile yarı kantitatif analizleri yapıldı. TNF- $\alpha$  için elde edilen matematiksel değerler beta aktin için elde edilen değerlere oranlanıp gruplar arası karşılaştırma istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### **3.11. Image-J Analizi**

İmmünohistokimyasal boyanmaları ve western blot sonuçlarını değerlendirmek, her antikoru ekspresyon derecesini bir diğeri ile kıyaslamak ve kantitatif bir değer belirlemek gerektiğinden; tüm boyanma reaksiyonları gruplara göre Image-J (Image Processing and analysis in Java–NIH) analizleri yapılarak değerlendirildi.

#### **3.12. Sonuçların Değerlendirilmesi**

Her grup için ayrı ayrı hesaplanan Image-J verileri Varyans Analizi (ANOVA) istatistiksel olarak değerlendirildi, ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) hesaplandı. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanılarak gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık  $p \leq 0,0001$  olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz ve hesaplamalar GraphPad Prism versiyon 5 ile gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

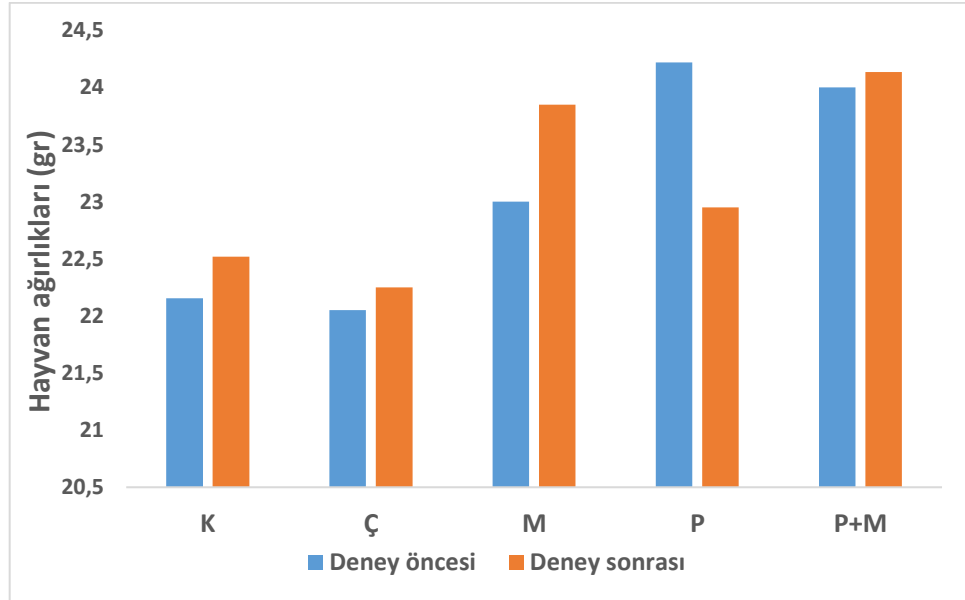
### 4.1. Genel Görünüm

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

### 4.2. Ağırlık Değişimi

Deneyin ilk ve son günü deney hayvanlarının vücut ağırlıkları tartıldı. Grupların kendi içinde deney öncesi ve deney sonrası ağırlık ortalaması alındı ve istatistiksel analizler yapıldı. Gruplar arası analiz yapılmadı çünkü P ve P+M gruplarında toksisiteye bağlı ölüm riski olduğundan hayvanların ağırlıkları en az 25 g olarak seçildi. K grubu hayvanlarında bu ağırlık 20-25 g arasında değişkenlik göstermekteydi.

Deney grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde; P grubunda toksisiteye bağlı ağırlık azalışı olduğu fakat bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). P+M grubunda ise deney sonrasında ağırlık ortalaması deney öncesiyle benzerlik gösterdi (Şekil 4.1).

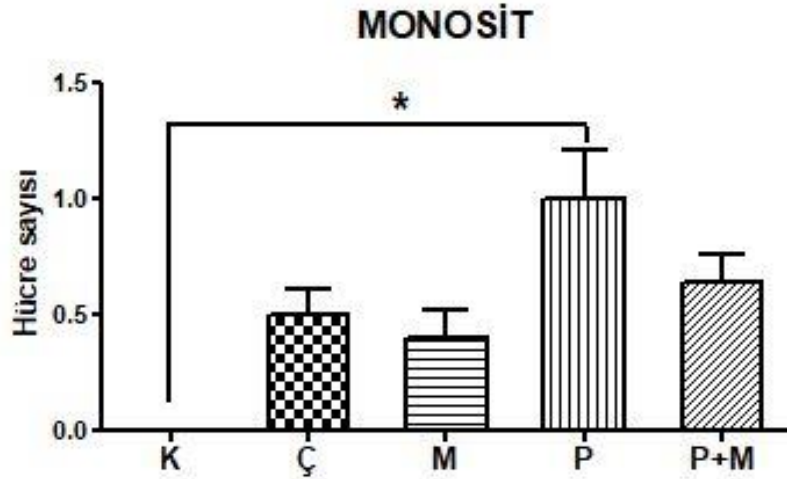


**Şekil 4.1:** Gruplarda deney öncesi ve deney sonrası ağırlık değişimi gösterilmektedir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları olarak kısaltılmıştır)

#### 4.3. Periferik Kan Yayma Analizi

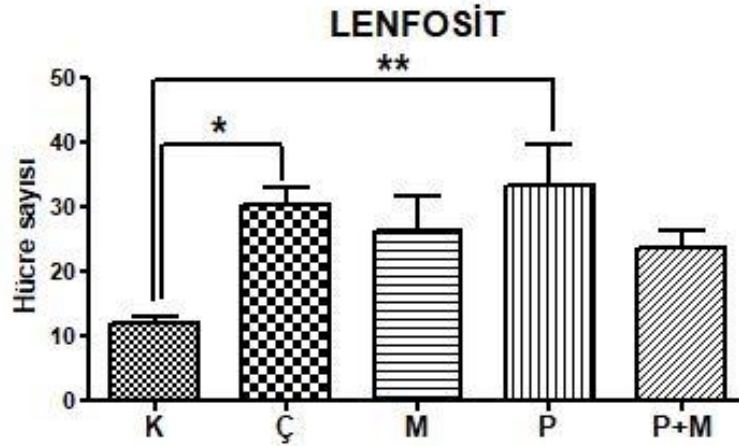
MPTP; deneysel PH modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılan toksik bir madde olduğundan inflamatuvar bir yanıt oluşturmaktadır. Oluşan bu yanıtları kanda test etmek için yapılan periferik yayma analizleriyle; gruplar arasında inflamatuvar yanıt monosit, lenfosit ve nötrofil sayıları ile değerlendirildi.

Yapılan analizler monosit sayısı açısından değerlendirildiğinde; K grubu ile kıyaslandığında; Ç grubunda etanol etkisi ile artış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ), P grubunda ise MPTP toksisitesine bağlı olarak anlamlı artış olduğu görüldü ( $p<0.0001$ ). P+M grubunda monosit sayısında azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmediği görüldü ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.2).



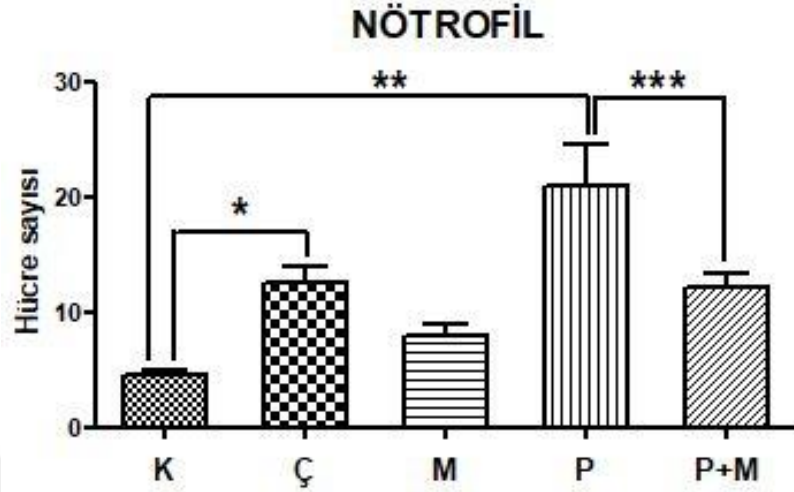
**Şekil 4.2:** Periferik kan yayma analizi sonucunda monosit sayısının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir. Uygulanan nörotoksine bağlı olarak P gruplarında monosit sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamlılık sergilemektedir (\*). (\*;  $p<0.0001$ ). (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları olarak kısaltılmıştır)

Lenfosit sayısı açısından değerlendirildiğinde; K grubuna oranla Ç ve P grubunda artış olduğu görüldü. Ç grubunda gözlenen lenfosit artışı ( $p<0.05$ ) etanolün toksik etkisiyle ortaya çıkabilecek bir yanıt olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle; M grubundaki artış da melatoninin içinde çözülmesi etanolünden kaynaklanıyor olabilir. Ancak bu artışın K grubu ile kıyaslandığında anlamlılık ifade etmediği görülmektedir. P grubundaki artış ( $p<0.001$ ) toksisiteyle ilişkilendirilirken; P+M grubunda ise azalmanın olduğu ancak bunun bir anlamlılık ifade etmediği görüldü ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3:** Periferik kan yayma analizi sonucunda lenfosit sayısının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir. K grubuyla kıyaslandığında; Ç grubunda lenfosit sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmektedir (\*). M grubunda da artış vardır fakat anlamlı değildir. Benzer şekilde P grubunda da MPTP toksisitesine bağlı anlamlı artış olduğu, P+M grubunda ise P grubuna oranla lenfosit sayısının azaldığı fakat anlamlı olmadığı görülmektedir (\*\*). (\*  $p<0.05$  ve \*\* $p<0.001$ ). (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları olarak kısaltılmıştır)

Nötrofil sayısı açısından değerlendirildiğinde; Ç ( $p<0.05$ ) ve P ( $p<0.0001$ ) gruplarında, K grubuna göre anlamlı artış olduğu, P+M grubunda ise; P grubuna oranla anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Ç grubundaki artışın etanolün toksik etkisinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.4).



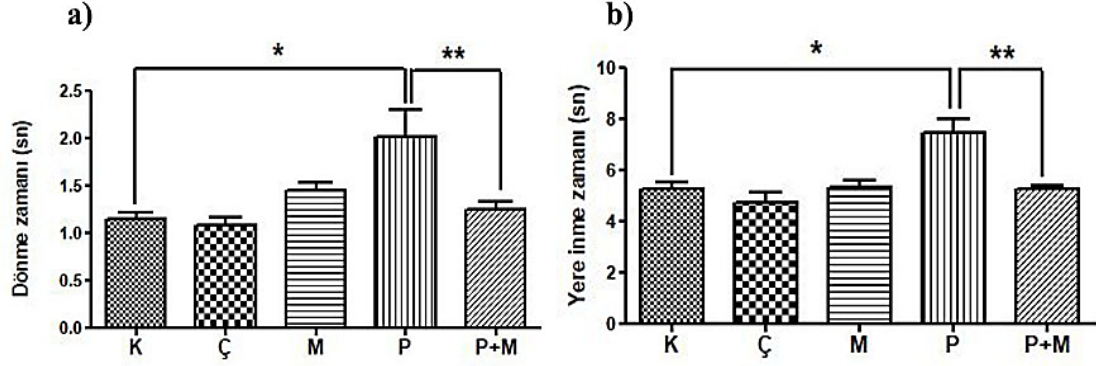
**Şekil 4.4:** Periferik kan yayma analizi sonucunda nötrofil sayısının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir. K grubuna göre Ç grubunda etanolün etkisi anlamlı artışla nötrofil sayısına yansırken (\*), P grubunda da MPTP kaynaklı nötrofil sayısında artış görülmektedir (\*\*). P grubuna göre melatonin uygulanan P+M grubu ise, nötrofil sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalış sergilemektedir (\*\*\*) (\* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.0001$ ). (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları olarak kısaltılmıştır)

#### 4.4. Davranış Deneyleri: Motor Aktivite Tayini

Hayvanlarda meydana gelen motor aktivite değişimlerini incelemek için çubuk testi, lokomotor aktivite ve rotarod testleri yapıldı.

##### 4.4.1. Pole (Çubuk) Testi

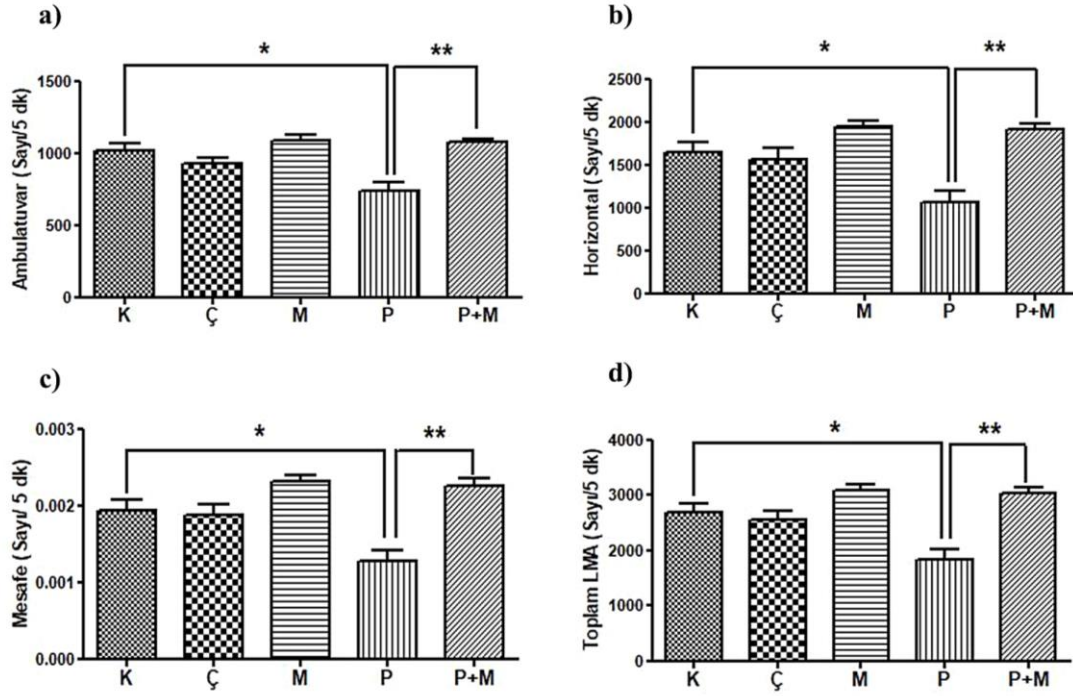
Bradikinezi şiddetinin belirlenmesi için yapılan çubuk testinde, hayvanların çubukta dönme süresi (Şekil 4.5a) ve yere inme zamanının (Şekil 4.5b) P grubunda, K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede uzadığı görüldü ( $p < 0.001$ ). Ayrıca; P+M grubu P grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). Sonuç olarak; MPTP verilerek PH oluşturulan grupta; PH'nın bradikinezi şiddetini arttırdığı, MPTP ile PH oluşturulup Melatonin verilen grupta ise bradikinezinin anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ( $p < 0.001$ ).



**Şekil 4.5:** P grubunda çubuk testi dönme (a) ve yere inme süresinin (b) K grubuna göre anlamlı derecede arttığı (\*), P+M grubunda ise P grubuna oranla anlamlı derecede azaldığı (\*\*) görülmektedir (\*/\*\*  $p < 0.001$ ).

#### 4.4.2. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite kafesinde ölçülen toplam mesafe ve toplam lokomotor aktivite değerleri incelendiğinde ambulator (Şekil 4.6a) ve horizontal (Şekil 4.6b) aktivitenin P grubunda K grubuna göre azaldığı ( $p < 0.0001$ ), P+M grubunda ise anlamlı olarak arttığı görüldü ( $p < 0.0001$ ). Toplam mesafenin (Şekil 4.6c) P grubunda K grubuna kıyasla azaldığı bulundu ( $p < 0.05$ ). P+M grubunda ise sürenin uzamasıyla birlikte mesafede artış olduğu tespit edildi ( $p < 0.0001$ ). Toplam lokomotor aktivitenin (Şekil 4.6d) P grubunda K grubuna göre azaldığı ( $p < 0.001$ ), P+M grubunda ise melatonin ile aktivitenin arttığı görüldü ( $p < 0.0001$ ).



**Şekil 4.6:** Lokomotor aktivite testi ambulatuvar hareket (a), horizontal hareket (b), lokomotor aktivite mesafesi (c) ve toplam lokomotor aktivite sonuçları (d) gösterilmektedir. Ambulatuvar (a) ve horizontal hareketin (b) P grubunda K grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı ( $p<0.0001$ ), P+M grubunda ise P grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı görülmektedir ( $p<0.0001$ ). P grubunda K grubuna göre toksisite kaynaklı davranışsal bozukluk nedeniyle lokomotor aktivite mesafesinde (c) azalış olurken ( $p<0.05$ ) melatonin uygulaması ile P+M grubunda P grubuna göre hareketin arttığı ve buna bağlı mesafede artış olduğu görülmektedir ( $p<0.0001$ ). Toplam lokomotor aktivite değerlendirildiğine (d) K grubuna göre P grubu toplam lokomotor aktivitede azalma gösterirken ( $p<0.001$ ), P grubuna göre melatonin uygulanan P+M grubu ise istatistiksel olarak anlamlı artış sergilemektedir ( $p<0.0001$ ).

#### 4.4.3. Rotarod Testi

Hayvanların motor koordinasyonunu ve dengeyi tespit etmek amacıyla yapılan rotarod testinde değişen hızlarda (5-40 rpm) kayıt alınarak hayvanların dönen çubuk üzerinde kalma süreleri kaydedildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

#### 4.5. İmmunohistokimyasal Analizler

C57BL/6 fareler sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları immunohistokimyasal analizler için çıkartıldı ve doku takibi işleminin ardından parafine gömüldü.

Dokulardan seri kesitler alınarak serebrumun SNpc bölgesinde;

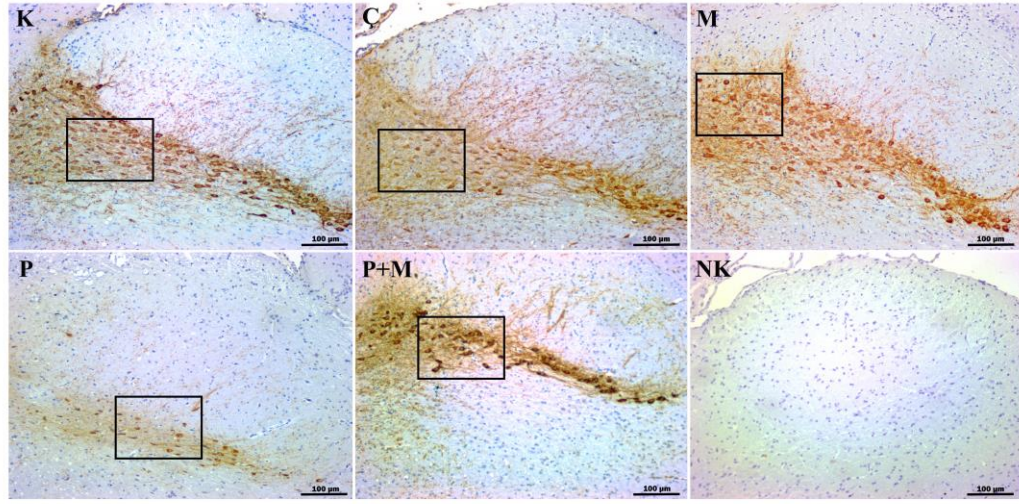
- Dopaminerjik nöron belirteci TH (Tirozin hidroksilaz),
- PH'da arttığı bilinen  $\alpha$ -sinüklein,
- İnflamasyonda rol alan ve mikroglialar üzerinde lokalize olduğu bilinen TLR4,
- NF-kB yolağında aktif olan p65 proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimya yöntemiyle değerlendirildi.

Çalışmamız; her grupta yer alan en az 6 hayvanın aynı alanlarından elde edilen en az 5 fotoğrafın değerlendirilmesiyle yapıldı. Buna göre yapılan Image J analizleri sonrasında elde edilen boyanma şiddetleri grafik haline getirildi ve gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

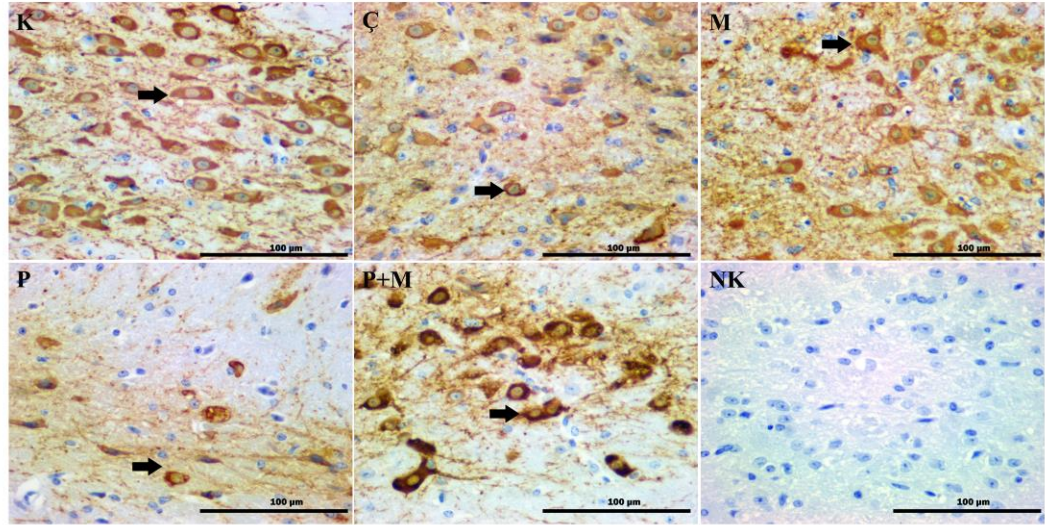
##### 4.5.1. Tirozin Hidroksilaz (TH) İmmünohistokimya Analizleri

TH immunohistokimyası; DN'ları işaretlediğinden özellikle gruplar arasındaki DN farkını gösterebilmek ve modelimizi test etmek için kullanıldı.

Parkinson modeli oluşturulan grubumuzda K, Ç ve M gruplarına göre DN sayısında ciddi bir azalmanın olduğu dikkati çekmekteydi. Parkinson grubunda TH ekspresyonunun azalmasına karşın; P+M grubunda DN sayısının büyük oranda korunduğu görüldü. Bu durum, P+M grubunda uygulanan melatoninin dopaminerjik nöronları ölüm yolağından koruduğunu düşündürmektedir. Bu da P+M grubundaki işaretlenen TH immunreaksiyonlarından net olarak anlaşılmaktadır (Şekil 4.7a, 4.7b).

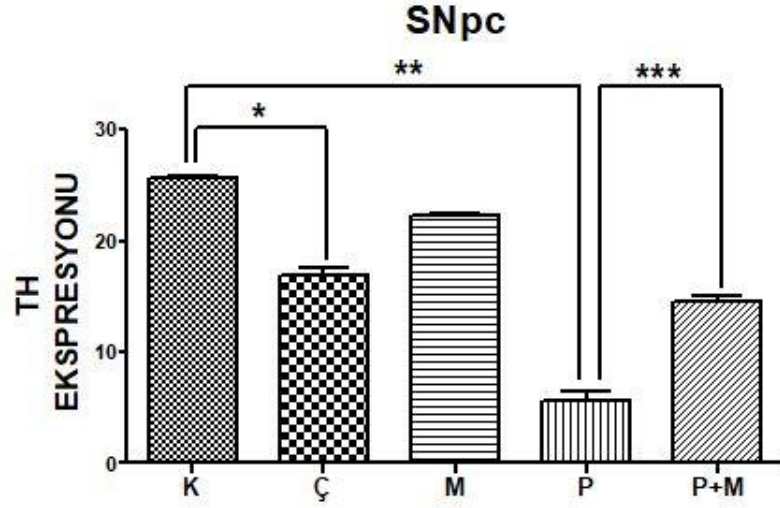


**Şekil 4.7a:** Serebrumun SNpc bölgesinde görülen TH immunohistokimyasal reaksiyonlarının gruplara göre dağılımı görülmektedir. Kutu içerisine alınan alanlar 40x büyütme ile panele yansıtılan alanlardır. Skala bar 100µm'dir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları, NK; Negatif kontrol).



**Şekil 4.7b:** Serebrumun SNpc bölgesinde DN ve liflerinin TH immünohistokimyasal boyanmaları sonucu gruplara göre dağılımı görülmektedir. Oklar TH ile boyanmış DN'ları işaret etmektedir. P grubunda DN'ların nörotoksin etkisiyle ölümü bu alanda az sayıdaki TH boyanmasıyla görülmektedir. K, Ç ve M gruplarında yoğun olarak görülen hücresel dağılımın P grubunda azalışı ve P+M grubunda da nöronların ölüm yolağından korunduğunu düşündürmektedir. Skala bar 100µm'dir (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları, NK; Negatif kontrol olarak kısaltılmıştır).

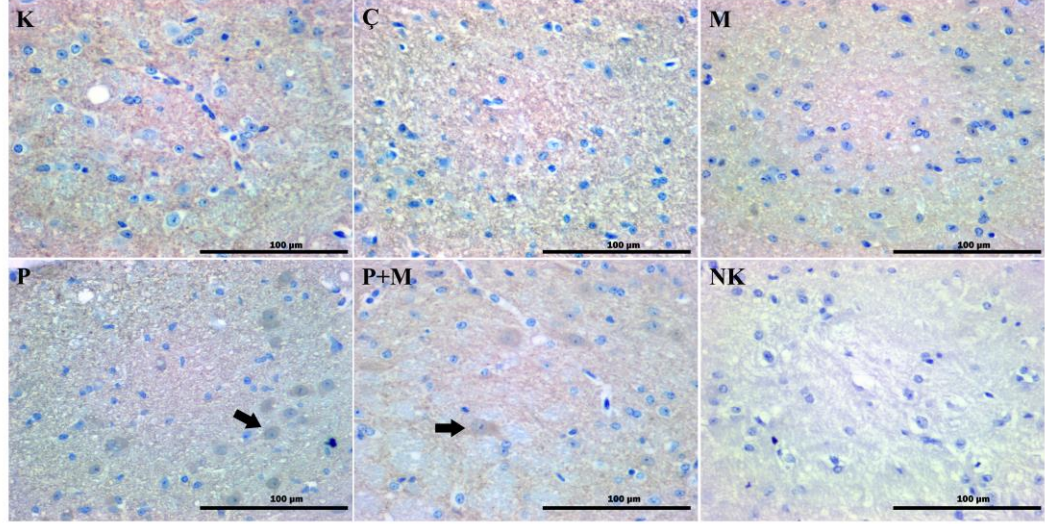
SNpc alanında değerlendirilen TH ekspresyonları Image J analizi ile istatistiksel olarak yorumlandı. K ve M gruplarında görülen TH ekspresyonunun Ç grubunda biraz azaldığı dikkati çekti. Bu durum melatoninin çözücüsü olarak kullandığımız etanolün etkisinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürdü ( $p<0.0001$ ). Ancak P grubunda; TH ekspresyonunun düşük olması; SNpc alanında DN sayısının az oluşu ile ilişkilendirilmiştir ( $p<0.0001$ ). P+M grubunda ise değerin kontrollere yaklaşması Parkinson sonrası melatoninin koruyucu etkisini göstermektedir ( $p<0.0001$ ). (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8:** Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan DN'ların, TH immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen grafik görülmektedir. K grubuna göre Ç grubunda daha az ekspresyonun olması çözücünün toksik olabilecek etkinliğini göstermektedir. P grubunda TH reaksiyonunun oldukça düşmesi bu alandaki nöron sayısının da azalmasıyla ilişkili olup; P+M grubundaki ekspresyon da melatoninin nöronları ölüm yolağına girmekten koruduğunu göstermektedir (\*/\*\*/\*\*\*;  $p<0.0001$ ). (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları).

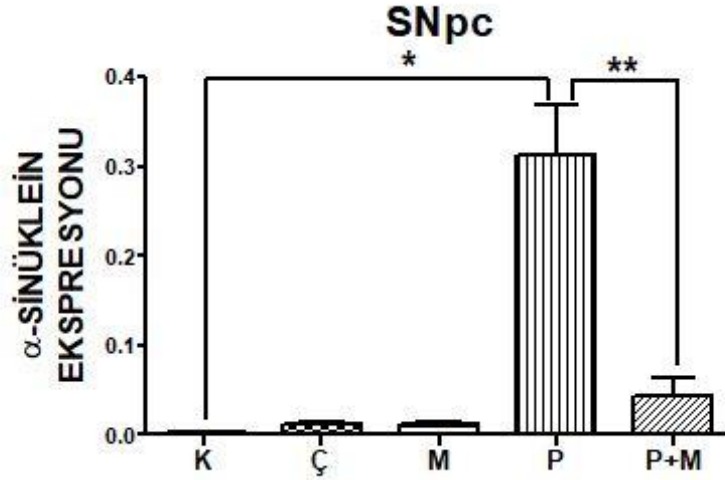
#### 4.5.2. $\alpha$ -Sinüklein İmmunohistokimya Analizleri

Beyinde yanlış katlanan  $\alpha$ -sinüklein proteinlerinin degrade edilememesi sonucu oluşan nörodejenerasyon, PH'nın tipik bulgularından biridir. MPTP ile oluşturulan deneysel PH modellerinde özellikle SNpc alanındaki nöronlarda  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonları net olarak görülmektedir (P; ok). Kontrol, çözücü ve melatonin gruplarında ekspresyonların gözlenmemesi beklenen bir durum olup; parkinson sonrası melatonin uygulanan grupta ise Parkinson grubuna göre daha az bir ekspresyon dikkati çekmektedir (P+M; ok)(Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** Serebrumun SNpc bölgesinde  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonlarının gruplara göre dağılımı görülmektedir. Panelde P grubunda MPTP toksisitesine bağlı DN'larda gözlenen  $\alpha$ -sinüklein immunoreaktivitesi sitoplazmik ve nükleerdir (ok). P+M grubunda daha az nöronda ekspresyonun olması dikkat çekicidir (ok). Skala bar 100µm'dir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları, NK; Negatif kontrol)

$\alpha$ -sinüklein ekspresyonunun MPTP ile ortaya çıkan toksik etkiye bağlı olarak arttığı görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizlerde;  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunun K grubu ile kıyaslandığında, P grubunda toksisite kaynaklı olarak arttığı ( $p<0.0001$ ); P+M grubunda ise bu ekspresyon profilinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.10).

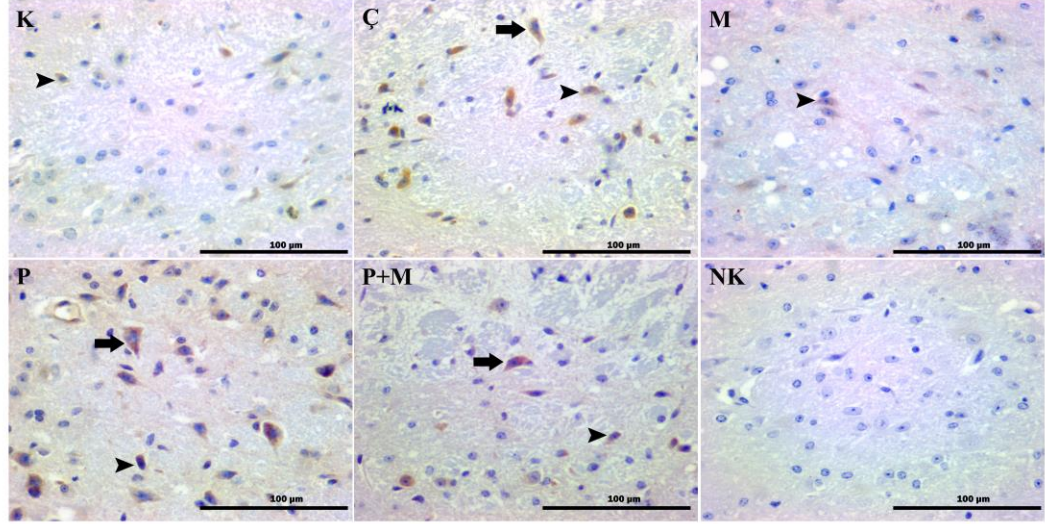


**Şekil 4.10:** Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan  $\alpha$ -sinüklein immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel analizleri sonucu elde edilen grafik görülmektedir. K grubunda neredeyse hiç görülmeyen  $\alpha$ -sinüklein agregasyonunun, P grubunda MPTP toksisitesiyle anlamlı şekilde arttığı görülmektedir ( $p<0.0001$ ). P+M grubunda ise; toksisitenin melatonin etkisiyle azaldığı ve P grubuna göre daha az  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.001$ ). (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları).

#### 4.5.3. TLR4 İmmunohistokimya Analizleri

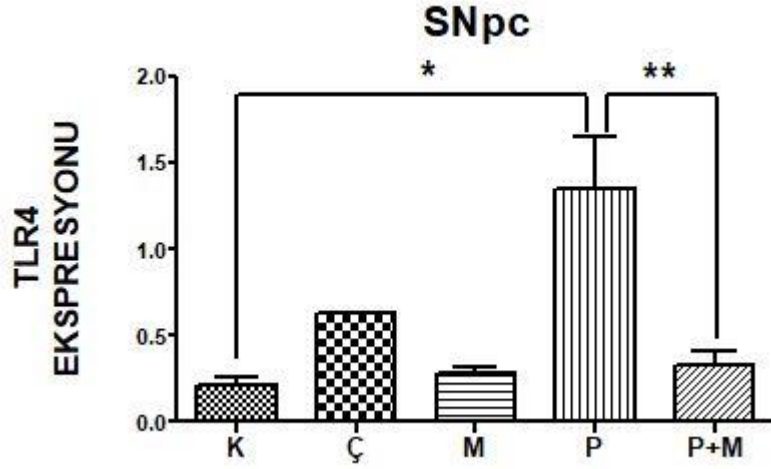
PH patogeneğinde mikroglial aktivasyonun temel kaynağı olan  $\alpha$ -sinüklein agregasyonları ve toksisite maruziyetinin, nöroglialarda TLR4 ekspresyonlarının artışına sebep olduğu ve bu artışın da mikroglial aktivasyona bağlı olarak ortaya çıkacak yanıtlar aracılı DN hasarına da ayrıca sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda TLR4 immünohistokimyasal boyanmaları gerçekleştirildi ve ekspresyonlar Image J analizi ile değerlendirilip istatistiksel olarak yorumlandı (Şekil 4.11).

İmmünohistokimyasal boyanmalar sonucunda dopaminerjik nöronlarda TLR4 ekspresyonu olduğu ancak PH oluşturulan grupta ekspresyonun ciddi olarak arttığı görüldü. Zurolo ve arkadaşları tarafından yapılan epilepsi çalışmasında, hastalardan alınan fokal kortikal displazi örneklerinde TLR4 immünohistokimyasal boyanması yapılmış ve kortikal nöronların sitoplazmalarında TLR4 ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür (Zurolo ve ark., 2011). Bu durum çalışmamızın boyanma paternini destekler şekildedir.



**Şekil 4.11:** Serebrumun SNpc bölgesinde mikrogliaların membranında lokalize olan TLR4 immünohistokimyasal boyanmalarının gruplara göre dağılımı görülmektedir. K grubunda nadir olarak gözlenen TLR4 ekspresyonunun, P grubunda toksisiteyle birlikte mikroglia membranında ve sitoplazmasında arttığı, P+M grubunda ise; melatoninin etkisi ile ekspresyonun azaldığı görülmektedir. Ok başları TLR4 ile işaretlenmiş mikrogliaları, oklar ise; TLR4 ile işaretlenmiş DN'ları göstermektedir. Skala bar 100µm'dir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları, NK; Negatif kontrol)

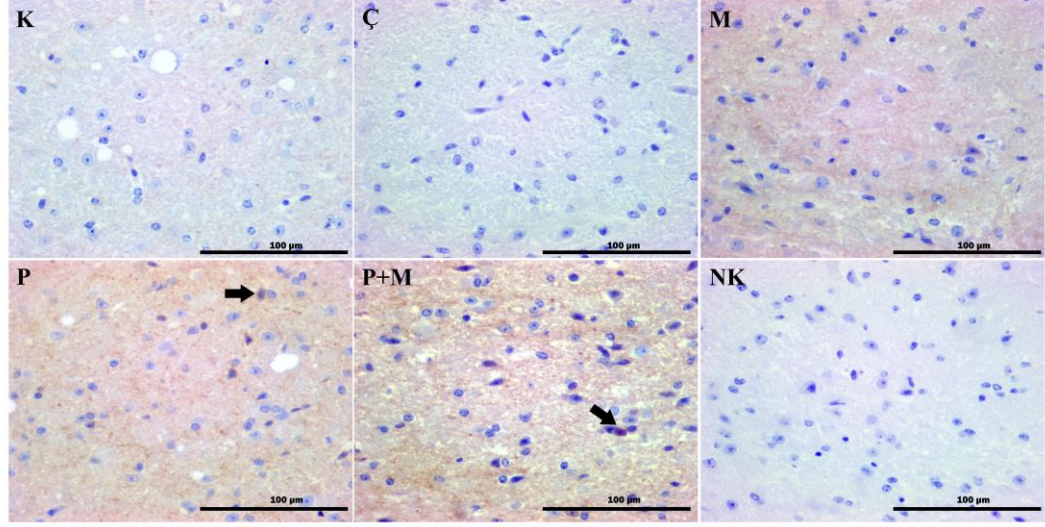
TLR4 immunohistokimya boyanmalarına ait Image J analizlerinde ekspresyonlar istatistiksel olarak değerlendirildi. K grubunda nadir gözlenen TLR4 ekspresyonunun, Ç grubunda etanolün toksik etkisiyle arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). P grubunda toksisiteyle birlikte mikroglia sayısının artışına bağlı olarak TLR4 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı ( $p<0.0001$ ), P+M grubunda ise; melatoninin etkisi ile aktif mikroglia sayısının azalmasıyla ekspresyonunun da azaldığı görülmektedir ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.12).



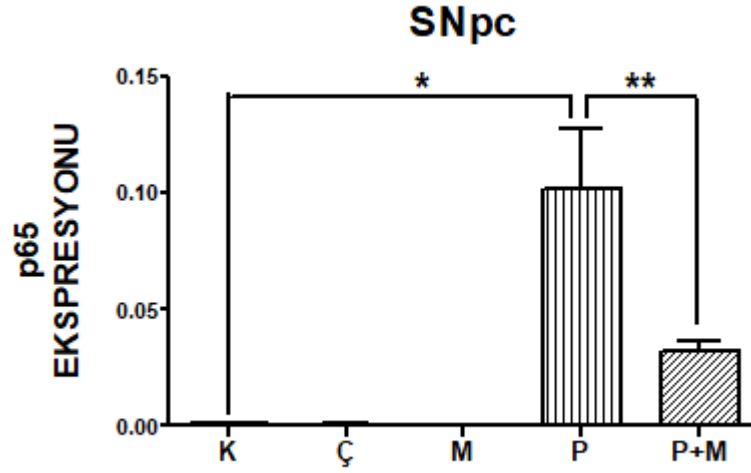
**Şekil 4.12:** Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan TLR4 immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen grafiktir. K grubuyla kıyaslandığında nadir olarak görülen TLR4 ekspresyonunun, P grubunda MPTP toksisitesiyle anlamlı şekilde arttığı görülmektedir (\*). P+M grubunda ise; toksisitenin melatonin etkisiyle P grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (\*\*) (\*/\*\*;  $p<0.0001$ ). (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları)

#### 4.5.4. p65 İmmünohistokimya Analizleri

Mikroglialarda varlığı bilinen TLR4'ün, inflamasyona bağlı yanıtları tetiklendiği bilgisinden yola çıkarak; yolağın sadece membranda sınırlı olup olmadığının değerlendirilmesi için, nükleer aktivasyonun da değerlendirilmesi için p65 immünohistokimyasal reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13). K grubunda nadir gözlenen p65 ekspresyonunun, P grubunda mikroglia aktivasyonuna bağlı sayısal artışıyla da doğru orantılı olarak arttığı ( $p<0.0001$ ), P+M grubunda ise; P grubuna oranla melatoninin etkisi ile aktif mikroglia sayısının ve buna bağlı olarak p65 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.14).



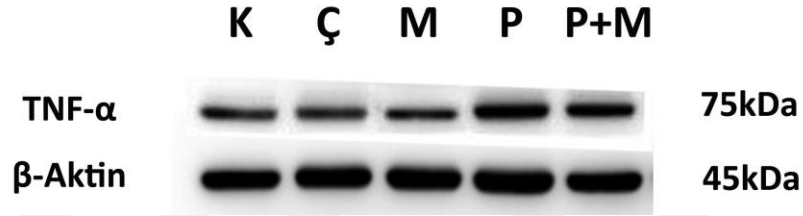
**Şekil 4.13:** Serebrumun SNpc bölgesinde mikrogliyalarda lokalize p65 immünohistokimyasal ekspresyonların gruplara göre dağılımı görülmektedir. K grubunda gözlenmeyen p65 ekspresyonunun, PH oluşturulan P grubunda toksisiteyle birlikte mikrogliyalarda arttığı, P+M grubunda ise; P grubuna oranla melatoninin etkisi ile ekspresyonun azaldığı görülmektedir. Oklar p65 ile işaretlenmiş mikrogliyalrı göstermektedir. Skala bar 100µm'dir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları, NK; Negatif kontrol)



**Şekil 4.14:** Serebrumun SNpc bölgesinde bulunan p65 immünohistokimyasal reaksiyonlarının Image J analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeleri görülmektedir. p65 ekspresyonunun, P grubunda MPTP toksisitesine bağlı olarak anlamlı şekilde arttığı (\*;  $p<0.0001$ ); P+M grubunda ise; P grubuna oranla azaldığı (\*\*;  $p<0.05$ ) görülmektedir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları)

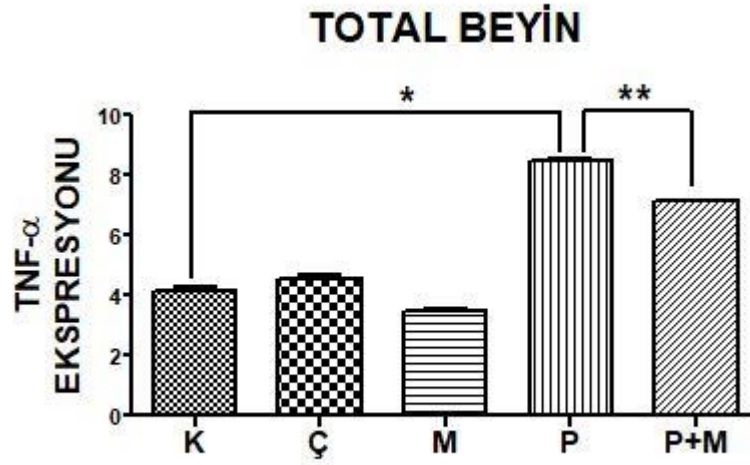
#### 4.6. Western Blot Bulguları

PH patolojisiyle ortaya çıkabilecek nöroinflamasyon sitokin yanıtlarını tetikleyebileceğinden, serebrumda TNF- $\alpha$  ekspresyonlarının değerlendirilmesi planlandı. Amacımız; melatoninin bu mekanizmaya olan etkisinin yorumlanması olduğundan, gruplara ait ekspresyonlar beta aktine oranlanarak sonuçlar değerlendirildi. Her bir gruptan en az 6 hayvan olacak şekilde yapılan analizlerde; K,Ç ve M gruplarında TNF- $\alpha$  ekspresyonunun daha az olduğu görülürken; P grubunda ekspresyonun artışı dikkat çekiciydi. Bu durum; inflamatuvar yanıtın artışının bir göstergesidir. P+M grubunda ise P grubuna oranla TNF- $\alpha$  ekspresyonunun azalması, melatonin etkisiyle nöroinflamatuvar sitokin salınımının azaldığını düşündürmektedir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15:** Beyin dokusunda TNF- $\alpha$  ve  $\beta$ -aktinin tüm gruplara ait western blot yöntemiyle elde edilen bantları görülmektedir. P grubunda görülen TNF- $\alpha$  ekspresyonunun K,Ç ve M gruplarındaki ekspresyonuna kıyasla P grubundaki artışı ve P+M grubundaki azalışı; TNF- $\alpha$  inflamatuvar yanıtlarının PH'da arttığını ve melatoninle de bu artışın kontrol altına alınabildiğini göstermektedir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları olarak kısaltılmıştır)

Tüm örneklerin Image J analizi sonrası istatistiksel değerlendirmeler yapılmış ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunun, MPTP ile PH modeli oluşturulan P grubunda anlamlı derece arttığı ( $p<0.0001$ ); P+M grubunda ise bu ekspresyon yoğunluğunun anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür ( $p<0.0001$ ). Bu durum melatonin etkisiyle; P+M grubunda TNF- $\alpha$  yanıtlarının kontrol altına alınabildiğini düşündürmektedir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16:** Total beyin dokusunda yapılan western blot yöntemiyle elde edilen TNF- $\alpha$  ekspresyonlarını gösteren bantların  $\beta$ -aktine oranlanmasıyla elde edilen grafik gösterilmektedir. K grubunda gözlenen düşük TNF- $\alpha$  ekspresyonunun, P grubunda anlamlı şekilde arttığı (\*), P+M grubunda ise anlamlı derecede düştüğü görülmektedir. Bu durum, nöroinflamatuvar yanıtın melatonin etkisiyle azaldığı göstermektedir. (K; Kontrol, Ç; Çözücü, M; Melatonin, P; Parkinson, P+M; Parkinson+Melatonin grupları olarak kısaltılmıştır)

## 5. TARTIŞMA

Yaşla bağılı ortaya çıkan nörodejeneratif hastalıklar yaşam süresi uzadıkça artmaktadır. Alzheimer hastalığından sonra en yaygın görülen Parkinson hastalığı (PH), dopaminerjik nöron (DN) kaybıyla karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (Mulhearn, 1971; Dorsey ve ark., 2007; Tansey ve Goldberg, 2010). Hastalığın moleküler mekanizması bilinmemekle birlikte serbest radikallerin artışı, antioksidan sistemin azalması, endoplazmik retikulum stresi,  $\alpha$ -sinüklein agregasyonu, nöroinflamasyon, bazı çevresel faktörler ve genetik altyapı hastalığın temelini oluşturmaktadır (Corti ve ark., 2011; Klein ve Westenberger, 2012; Sidransky ve Lopez, 2012; Gautier ve ark., 2014; Niranjan, 2014; Bolner ve ark., 2016; Shephard ve ark., 2016).

MPTP modeli, insana benzer en iyi yanıtı primatlarda verdiği için PH çalışmalarında tercih edilen bir modeldir. Ancak primat bakımının zorluğu nedeniyle çalışmalar kemirgenlerle yapılmaktadır (Bedard ve ark., 1986). Yapılan çalışmalarda, MPTP'nin sistemik verildikten sonra MPP<sup>+</sup>'ye dönüştüğü, dopamin taşıyıcısından girerek ROS oluşumunu indüklediği ve bazal gangliyonların SNpc alanında toksisite oluşturarak DN hasarına neden olduğu bilinmektedir (Schober, 2004; G. Anderson ve ark., 2007). Ortaya çıkan DN hasarı PH'nı taklit etmek açısından uygun bulunmuş ve literatürde birçok çalışmada tercih edilen bir model olmuştur. MPTP'nin oluşturduğu toksisite sonrası DN kaybına bağılı olarak mikrogliyaların da aktive olduğu gösterilmiştir (Fornai ve ark., 2005). MPTP'nin deney hayvanlarına uygulanmasında en yaygın formu sistemik uygulamadır (subkutan, intravenöz, intraperitoneal ve intramusküler). C57BL/6 fare ırkının sistemik MPTP uygulamasına diğer ırklardan daha duyarlı olduğu, DN'ların seçici hasar gördüğü bilinmektedir (Schober, 2004; Meredith ve Rademacher, 2011).

Melatonin karanlıkta epifiz bezi tarafından sentezlenen bir hormondur (Esposito and Cuzzocrea 2010). Melatoninin çeşitli fizyolojik fonksiyonları ile epifiz ve retina dışında monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere, çeşitli hücreler tarafından üretildiği ve inflamasyona karşı koruma yönünde etkin rol oynadığı çalışmalarda gösterilmiştir (Guney ve ark., 2007; Kang ve ark., 2010). Melatoninin PH modellerinde; korpus striatum ve hipokampusta lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği (Acuna-Castroviejo ve ark., 1997),

SNpc’da DNA fragmentasyonunu önlediği ve oluşan oksidatif stresi azalttığı (Ortiz ve ark., 2001) bilinmektedir. DN’larda ortaya çıkan hasarda, melatoninin mitokondriyal komplekslerin indüksiyonu ile ATP üretimini artırdığı ve bu durumun da DN’ları kısmen koruduğu ve motor aktivite bozulmalarını engellediği bildirilmiştir (Martin ve ark., 2002). Ayrıca melatoninin ROS yolağını baskılayarak nöronları apoptozdan koruduğu da söylenmektedir (Jou ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2013).

MPTP ile 7 günlük subakut deneysel PH oluşturduğumuz çalışmamızda, deney sonunda hayvanlardan alınan kan örnekleriyle yaptığımız periferik kan yayma analizlerinde; sistemik toksisitenin neden olduğu inflamatuvar yanıt monosit, lenfosit ve nötrofil miktarıyla değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda PH oluşturulan grupta inflamatuvar yanıtın yüksek olduğu, melatonin verilen grupta ise bu yanıtın azaldığı görülmüştür. Literatürde deneysel PH modellerinde periferik kan yayma parametresi kullanılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; erken ve geç evre PH bireylerden aldıkları kan örneklerinde biyokimyasal analizlerle inflamatuvar yanıtlar değerlendirmiş ve geç evre PH’larında erken evre hastalara göre monosit, lenfosit ve nötrofil sayısında artış olduğunu belirtmişlerdir (Jiang ve ark., 2019). İnsanlarda yapılan bu çalışma, PH ile artan sistemik inflamatuvar yanıt sonucumuzu destekler niteliktedir.

Çalışmamızda, deneysel PH modellerinde hastalığın oluşup oluşmadığını test etmek amacıyla, lokomotor testler kullanılarak lokomotor aktivite, motor koordinasyon ve bradikinezi şiddetleri ölçülmüş, melatoninin Parkinson kaynaklı davranış bozuklukları üzerine etkisinin olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda; MPTP modelinde rotarodda hayvanların kalış sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir (Rozas ve ark., 1998; Park ve ark., 2012). Fakat bizim çalışmamızda çubukların üzerinde kalış süreleri gruplararası kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; rotarod testi, öğrenme testi olarak da kullanılmaktadır (M. J. Kim ve ark., 2019; Stachowicz ve ark., 2020). Bu durum çalışmamızda hayvanların alıştırma sürecinde platformu öğrendiği ve bu nedenle kalış sürelerinde anlamlı fark olmadığını düşündürmüştür.

Deneysel PH modellerinde total lokomotor aktivite ortalamasının anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Grieb ve ark., 2013; Yildirim ve ark., 2014; Ozsoy ve ark., 2015).

Çalışmamızda; P grubunda toplam lokomotor aktivite, ambulator aktivite ve toplam mesafenin K grubuna göre azaldığı bulundu. P+M grubunda ise, total lokomotor aktivite, ambulator hareket ve toplam mesafenin anlamlı olarak arttığı görüldü. 6-OHDA ile oluşturulan deneysel PH çalışmalarında melatonin uygulamasının diskineziyi azalttığı ve motor aktivite bozukluklarını düzelttiği gösterilmiştir (Yildirim ve ark., 2014; Ozsoy ve ark., 2015). Bradikineziyi belirleyen diğer bir test ise çubuk testidir (Ogawa ve ark., 1987). Yapılan PH çalışmalarında; deney hayvanlarının çubukta uzun süre dengede kalmaya çalıştıkları ve aşağı iniş süresinin uzadığı görülmektedir (Zhao ve ark., 2016; Lv ve ark., 2019). Çalışmamızda; literatürü destekler şekilde P grubunda, hareketin başlamasında gecikme olduğu ve aşağıya iniş süresinde uzama olduğu gözlemlendi. Melatonin verilen grupta ise sürenin kısaldığı ve bradikinezinin anlamlı derecede azaldığı saptandı. Bulgularımız, deneysel PH modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir.

Deneysel PH modeli oluşumunu destekleyen diğer bir bulgu tirozin hidroksilazla (TH) işaretlenmiş nöron sayısıdır. Birçok çalışmada TH immünohistokimyası ile MPTP toksisitesine bağlı olarak DN kaybı meydana geldiği ve deneysel PH modelinin olduğu gösterilmiştir (Mariucci ve ark., 2018; Campolo ve ark., 2019; Lv ve ark., 2019). Çalışmamızda gruplara ait TH immünohistokimyasal boyanmaları literatürü destekler şekildedir. K grubunda SNpc bölgesinde yoğun olarak bulunan DN'lar TH ile işaretlenmiştir. Deneysel PH modeli oluşturulan P grubunda ise; DN sayısındaki azalmaya bağlı olarak TH ekspresyonunun düştüğü görüldü. Bu ekspresyon paterni de DN'ların ölüm yoluna girdiğinin bir göstergesidir. P+M grubunda ise; P grubuna kıyasla daha fazla hücrenin korunduğu, ekspresyon ettikleri TH reaksiyonlarıyla belirlenmiştir. Bu durum melatoninin DN hasarlanmasında nöronlara karşı koruyucu bir etki gösterdiğini kanıtlar niteliktedir.

MPTP,  $\alpha$ -sinüklein proteininin yanlış katlanmalarında etkili olup agregasyona neden olur ve hücre içinde birikerek Lewy cisimciğini oluşturur (Breydo ve ark., 2012; Karampetsou ve ark., 2017). Ortaya çıkan nöroinflamatuvar koşullar altında aktive olan gliyal hücreler, nöronal hasarı ve nörodejenerasyonu indükleyen proinflamatuvar ve nörotoksik faktörleri serbest bırakmaktadır (Harry ve Kraft, 2008). Bu faktörlerin aktivasyonu ile DN hasarı

görülmekte ve PH belirtileri olan motor aktivite bozuklukları ortaya çıkmaktadır (Jankovic, 2008).

Postmortem Parkinson hastaları ve hayvan PH modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, nöroinflamasyon ve mikrogliyal aktivasyonun, PH patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Tufekci ve ark., 2011).

İnsanlarda interlökin-1 reseptörünün (IL-1R) homologu olan Toll-like reseptörler (TLRs); birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup transmembran protein ailesidir. Doğal immün sistem, patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve savunmayı başlatabilmektedir (Buraczynska ve ark., 2009; Browne, 2012). TLR4; mikrogliya membranında bulunan nörotoksik inflamatuvar sitokinlerin üretimini uyaran bir transmembran proteindir (Lehnardt ve ark., 2003; Olson ve Miller, 2004). PH'da ortaya çıkan inflamatuvar yanıt; mikrogliyal aktivasyonun etkisiyle şiddetlenmekte ve çeşitli nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu aktivasyon sırasında mikrogliyaların membranında lokalize olan TLR4 ve alt yolağındaki NF- $\kappa$ B nüklear p50 ve p65 ilişkili proinflamatuvar sitokinlerin artışı DN'ların hasarlanmasına ve bu nöronların geri dönüşü olmayan ölüm yolağına girmesine sebep olmaktadır. Bu mekanizma içerisinde  $\alpha$ -sinüklein proteinlerinin yanlış katlanması ya da sitoplazmik inklüzyonlar oluşturmalarının sebebi tam olarak bilinmemektedir. Alvarez-Erviti ve arkadaşları *in vitro* çalışmalarında  $\alpha$ -sinükleinin mikrogliyal aktivasyonu arttırdığını göstermişlerdir (Alvarez-Erviti ve ark., 2011).

Noelker ve arkadaşları tarafından yapılan *in vivo* çalışmada; TLR4 geni susturulmuş, 2 saat aralıklarla 4x30 mg/kg doz MPTP ile PH modeli oluşturulmuş 8-10 haftalık C57BL/6 fareler ve diğer grup olarak yabanıl tip 2 saat aralıklarla 4x30 mg/kg doz MPTP ile PH modeli oluşturulmuş 8-10 haftalık C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Bu çalışmada TH ve Iba-1 immünohistokimyası ile TLR4 aracılı mikrogliya aktivasyonu ve DN hasarı değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; TLR4 geni susturulmuş farelerde mikrogliya aktivasyonunun azaldığı ve buna bağlı olarak DN kaybının azaldığı ve dolayısıyla DN canlılığın PH'da kısmen TLR4 aktivasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Noelker ve ark., 2013).

Mariucci ve arkadaşları tarafından yapılan *in vivo* çalışmada; TLR4 geni susturulmuş, 2 saat aralıklarla 4x20 mg/kg doz MPTP ile PH modeli oluşturulmuş 6-8 haftalık C57BL/6 fareler ve diğer grup olarak yabancı tip 2 saat aralıklarla 4x20 mg/kg doz MPTP ile PH modeli oluşturulmuş 6-8 haftalık C57BL/6 fareler kullanılmıştır. TH ile yapılan DN tayininde TLR4 geni susturulmuş PH farelerin DN'larında yabancı tip PH olan farelere göre kaybın daha az olduğu görülmüştür. Kontrol grubuna oranla Parkinson gruplarında  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunun oldukça arttığı, Parkinson grupları birbirleriyle kıyaslandığında ise; TLR4 geni susturulmuş PH farelerin  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir. DN'ların sitoplazmasında  $\alpha$ -sinüklein birikiminin, mikrogliya membranında yer alan TLR4'ü aktive ederek DN hasarına neden olduğu bu çalışmayla ortaya konmuştur (Mariucci ve ark., 2018).

Lv ve arkadaşları BV2 hücreleriyle yaptıkları *in vitro* PH modelinde,  $\alpha$ -sinükleinin TLR4 aracılı inflamasyona sebep olup mikrogliyal aktivasyonla proinflamatuvar sitokin salınımının arttığını göstermişlerdir (Lv ve ark., 2019).

Campolo ve arkadaşları tarafından MPTP ile PH modeli oluşturulan *in vivo* çalışmada; TLR4 geni susturulmuş ve yabancı tip olarak iki PH grubu oluşturulmuştur. PH gruplarında TH ekspresyonunun kontrole göre azaldığı görülmüş ve PH grupları arasında değerlendirildiğinde yabancı tip PH farelerde ekspresyonun çok daha azaldığı gösterilmiştir. Yabancı tip PH farelerde  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunun daha fazla olduğu ve TLR4 aracılı NF- $\kappa$ B/p65 aktivasyonu ile oluşan sitokin (IL-1B, iNOS, COX2) yanıtların arttığı western blot analizi ile gösterilmiştir (Campolo ve ark., 2019). Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda; TH'a ek olarak  $\alpha$ -sinüklein, TLR4 ve NF- $\kappa$ B/p65 immünokimyası değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal analizler sonucunda MPTP ile PH modeli oluşturulmuş gruba ait serebrumların SNpc alanındaki DN'larda  $\alpha$ -sinüklein ekspresyonunun arttığı görüldü. Melatonin verilen Parkinson grubunda ise bu boyanma şiddetinin oldukça azaldığı saptandı. TLR4 ekspresyonunun ise P grubuna ait beyin dokularının SNpc alanında yer alan mikrogliyalarda K grubuna oranla anlamlı derecede arttığı, P+M grubunda ise mikrogliyal TLR4 ekspresyonunun azaldığı görüldü. Aynı alanda nükleer p65 ekspresyonunun parkinsonda arttığı, melatoninle birlikte azaldığı saptandı.

Ping ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Parkinson hastalarının kan serumundan ELISA ve real time PCR yöntemi ile inflamatuvar yanıt değerlendirilmiş ve bu doğrultuda TLR2, TLR3, TLR4, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8 ve IL-10 miktarları ölçülmüştür. Çalışma sonucunda normal bireylerin kan serumuna oranla PH bireylerde inflamatuvar yanıt belirteçlerinin arttığı gösterilmiştir (Ping ve ark., 2019).

Shao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; LPS toksisitesi oluşturulan Balb/c farelerde NF- $\kappa$ B aracılı inflamatuvar yanıt değerlendirilmiş ve melatonin verilen hayvanlarda toksisitenin baskılandığı ve inflamatuvar yanıtın azaldığı görülmüştür (Shao ve ark., 2015). Çalışmamızda; NF- $\kappa$ B ilişkili proinflamatuvar sitokin yanıtını değerlendirmek amacıyla total beyin dokusunda TNF- $\alpha$  ekspresyonu western blot analiziyle değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda TNF- $\alpha$  pro-inflamatuvar sitokininin P grubunda K grubuna göre oldukça arttığı, P+M grubunda ise melatonin etkisiyle anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda melatoninin protektif etkisi ortaya konmuştur.

Çalışmamız, MPTP ile oluşturulan deneysel PH modelinde,  $\alpha$ -sinüklein proteinlerinin yanlış katlanmasıyla oluşan sitoplazmik inklüzyonların, mikrogliya membranında yer alan TLR4'ü aktive ederek inflamatuvar yanıtı şiddetlendirdiğini doğruladı ve bu yanıtta melatoninin inflamatuvar yanıtı TNF- $\alpha$  üzerinden baskılayıcı bir rol üstlendiği gösterildi. Literatürde melatoninin PH'da TLR4 aracılı inflamatuvar yanıt üzerine etkisini gösteren bir yayının olmayışı çalışmamızı bu alanda yapılan ilk çalışma olma statüsüne taşımaktadır. Bu çalışmayla melatonin uygulamasının net bir şekilde; PH ile ortaya çıkan DN hasarının kısmen engellendiği, hasar sonucu ortaya çıkan nöroinflamasyonun TLR4 ve TNF- $\alpha$  aracılı baskılanabildiği gösterilmiştir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada; MPTP ile deneysel PH oluşturulmuş 8-10 haftalık C57BL/6 farelerde davranış analizlerine ek olarak; immünohistokimyasal analizlerle TH,  $\alpha$ -sinüklein, TLR4 ve p65, western blot analizi ile TNF- $\alpha$  lokalizasyon ve ekspresyonları değerlendirilmiş ve melatoninin PH'da inflamatuvar yanıtta etkisi araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre sonuçlar maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Çalışmamızda, MPTP verilerek oluşturulan deneysel Parkinson hastalığı modelinde meydana gelen lokomotor aktivite bozukluklarına melatoninin etkisi incelenmiş ve DN hasarına sebep olan nöroinflamasyonda anti-inflamatuvar etkisi olduğu görülmüştür.
2. Melatonin Parkinson hastalığının belirtileri olan motor aktivite bozukluklarını düzeltici etki göstermiştir.
3. Periferik kan yayması ile MPTP'nin oluşturduğu sistemik toksisite incelenmiş ve melatoninin oluşan sistemik inflamasyonu kanda değerlendirilen monosit, lenfosit ve nötrofil sayılarının yorumlanmasıyla baskılayabildiği gösterilmiştir.
4. Oluşturulan deneysel PH modelinde DN kaybını değerlendirmek için TH immunohistokimyası yapılmış ve melatonin etkisiyle DN'ların korunduğu gösterilmiştir.
5. MPTP ile oluşturulmuş deneysel PH modelinde  $\alpha$ -sinüklein agregasyonunun varlığı tespit edilmiş ve inflamatuvar yanıtta etkisi olup olmadığı tayin edilmiştir. Parkinson grubunda artan ekspresyonun melatonin etkisiyle azaldığı gösterilmiştir.
6. Beyinde oluşan nöroinflamasyonun DN kaybına neden olan alt yolağı incelemek amacıyla mikrogliyaların membranında yer alan TLR4 ekspresyonunun Parkinson grubu artışına karşılık melatonin uygulamasıyla ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır.
7. NF- $\kappa$ B aktif formu nükleer p65 ekspresyonları değerlendirilmiş ve melatoninin bu yolaktaki etkisi incelenmiştir.

8. Nörotoksin ile aktive olan yolak inflamatuvar yanıtları tetikleyerek sitokinlerinden TNF- $\alpha$  ekspresyonunu arttırmış ve melatonin uygulaması da bu yanıtları normale çevirmeye yani anti-inflamatuvar bir etki göstermeye çalışmıştır.

Bu çalışmayla melatoninin nöroinflamatuvar yanıt üzerine koruyucu etkisi ile klinikte PH tedavisi gören birçok hastanın L-DOPA kullanımına ek uygulamalar getirilebileceği kanaatindeyiz.



## KAYNAKLAR

Aarsland, D., Andersen, K., Larsen, J. P., Lolk, A., & Kragh-Sorensen, P. Prevalence and characteristics of dementia in parkinson disease: An 8-year prospective study. *Arch Neurol.* 2003; 60 (3): 387-392.

Aarsland, D., & Kurz, M. W. The epidemiology of dementia associated with parkinson's disease. *Brain Pathol.* 2010; 20 (3): 633-639.

Absi, E., Ayala, A., Machado, A., & Parrado, J. Protective effect of melatonin against the 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced inhibition of complex i of the mitochondrial respiratory chain. *J Pineal Res.* 2000; 29 (1): 40-47.

Acuna-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Gaia Monti, M., Ortiz, G. G., & Reiter, R. J. Melatonin is protective against mptp-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 1997; 60 (2): PL23-29.

Agostinho, P., Cunha, R. A., & Oliveira, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2010; 16 (25): 2766-2778.

Aid, S., & Bosetti, F. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie.* 2011; 93 (1): 46-51.

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2 (8): 675-680.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124 (4): 783-801.

Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989; 12 (10): 366-375.

Alexander, G. E. Biology of parkinson's disease: Pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci.* 2004; 6 (3): 259-280.

Alexander, G. E., Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. Basal ganglia-thalamocortical circuits: Parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res.* 1990; 85: 119-146.

Alexander, G. E., DeLong, M. R., & Strick, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 1986; 9: 357-381.

Alvarez-Erviti, L., Couch, Y., Richardson, J., Cooper, J. M., & Wood, M. J. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neurosci Res.* 2011; 69 (4): 337-342.

Anderson, E., & Nutt, J. The long-duration response to levodopa: Phenomenology, potential mechanisms and clinical implications. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011; 17 (8): 587-592.

Anderson, G., Noorian, A. R., Taylor, G., Anitha, M., Bernhard, D., Srinivasan, S., & Greene, J. G. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an mptp mouse model of parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007; 207 (1): 4-12.

Aras, S., Tanriover, G., Aslan, M., Yargicoglu, P., & Agar, A. The role of nitric oxide on visual-evoked potentials in mptp-induced parkinsonism in mice. *Neurochem Int.* 2014; 72: 48-57.

Bäck, S. *Cdnf* in an experimental model of parkinson's disease: Studies on gene therapy and protein infusion. 2014.

Bedard, P. J., Di Paolo, T., Falardeau, P., & Boucher, R. Chronic treatment with l-dopa, but not bromocriptine induces dyskinesia in mptp-parkinsonian monkeys. Correlation with [3h]spiperone binding. *Brain Res.* 1986; 379 (2): 294-299.

Benarroch, E. E. Intrinsic circuits of the striatum: Complexity and clinical correlations. *Neurology.* 2016; 86 (16): 1531-1542.

Berardelli, A., Rothwell, J. C., Thompson, P. D., & Hallett, M. Pathophysiology of bradykinesia in parkinson's disease. *Brain*. 2001; 124 (Pt 11): 2131-2146.

Beraud, D., Twomey, M., Bloom, B., Mittereder, A., Ton, V., Neitzke, K., . . . Maguire-Zeiss, K. A. Alpha-synuclein alters toll-like receptor expression. *Front Neurosci*. 2011; 5: 80.

Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000; 3 (12): 1301-1306.

Bianchi, M. E. Damps, pamps and alarmins: All we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007; 81 (1): 1-5.

Biundo, R., Weis, L., & Antonini, A. Cognitive decline in parkinson's disease: The complex picture. *NPJ Parkinsons Dis*. 2016; 2: 16018.

Bode, J. G., Ehling, C., & Haussinger, D. The macrophage response towards lps and its control through the p38(mapk)-stat3 axis. *Cell Signal*. 2012; 24 (6): 1185-1194.

Bolner, A., Micciolo, R., Bosello, O., & Nordera, G. P. A panel of oxidative stress markers in parkinson's disease. *Clin Lab*. 2016; 62 (1-2): 105-112.

Bove, J., Prou, D., Perier, C., & Przedborski, S. Toxin-induced models of parkinson's disease. *NeuroRx*. 2005; 2 (3): 484-494.

Bowman, C. C., Rasley, A., Tranguch, S. L., & Marriott, I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*. 2003; 43 (3): 281-291.

Breydo, L., Wu, J. W., & Uversky, V. N. Alpha-synuclein misfolding and parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822 (2): 261-285.

Brooks, A. I., Chadwick, C. A., Gelbard, H. A., Cory-Slechta, D. A., & Federoff, H. J. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res*. 1999; 823 (1-2): 1-10.

Brown, L. L., Schneider, J. S., & Lidsky, T. I. Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7 (2): 157-163.

Browne, E. P. Regulation of b-cell responses by toll-like receptors. *Immunology.* 2012; 136 (4): 370-379.

Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015; 33: 257-290.

Brundin, P., Li, J. Y., Holton, J. L., Lindvall, O., & Revesz, T. Research in motion: The enigma of parkinson's disease pathology spread. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9 (10): 741-745.

Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. Broad expression of toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61 (11): 1013-1021.

Buddhala, C., Loftin, S. K., Kuley, B. M., Cairns, N. J., Campbell, M. C., Perlmutter, J. S., & Kotzbauer, P. T. Dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic deficits in parkinson disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015; 2 (10): 949-959.

Buraczynska, M., Baranowicz-Gaszczyk, I., Tarach, J., & Ksiazek, A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol.* 2009; 70 (2): 121-124.

Buzas, B., & Max, M. B. Pain in parkinson disease. *Neurology.* 2004; 62 (12): 2156-2157.

Caballero, B., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Huidobro-Fernandez, C., Soria-Valles, C., De Gonzalo-Calvo, D., . . . Coto-Montes, A. Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 2009; 46 (1): 106-114.

Campolo, M., Paterniti, I., Siracusa, R., Filippone, A., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. Tlr4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in parkinson's diseases in vivo model. *Brain Behav Immun.* 2019; 76: 236-247.

- Chang, M., Chang, M. Y., Lin, W. S., & Gabayno, J. L. Magnetic control of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanomaterial for fat ablation in microchannel. *Materials (Basel)*. 2015; 8 (11): 7813-7820.
- Chaudhuri, K. R., & Martinez-Martin, P. Quantitation of non-motor symptoms in parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2008; 15 Suppl 2: 2-7.
- Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. Non-motor symptoms of parkinson's disease: Dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*. 2009; 8 (5): 464-474.
- Chen, L. J., Gao, Y. Q., Li, X. J., Shen, D. H., & Sun, F. Y. Melatonin protects against mptp/mpp<sup>+</sup>-induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. *J Pineal Res*. 2005; 39 (1): 34-42.
- Chen, S. T., Chuang, J. I., Hong, M. H., & Li, E. I. Melatonin attenuates mpp<sup>+</sup>-induced neurodegeneration and glutathione impairment in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Pineal Res*. 2002; 32 (4): 262-269.
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37 (5): 942-946.
- Choi, S. I., Dadakhujaev, S., Ryu, H., Im Kim, T., & Kim, E. K. Melatonin protects against oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membrane melatonin receptors. *J Pineal Res*. 2011; 51 (1): 94-103.
- Cipriani, S., Chen, X., & Schwarzschild, M. A. Urate: A novel biomarker of parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark Med*. 2010; 4 (5): 701-712.
- Cohen, G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*. 1984; 5 (1): 77-82.
- Conte, C., Roscini, L., Sardella, R., Mariucci, G., Scorzoni, S., Beccari, T., & Corte, L. Toll like receptor 4 affects the cerebral biochemical changes induced by mptp treatment. *Neurochem Res*. 2017; 42 (2): 493-500.
- Cookson, M. R. Alpha-synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener*. 2009; 4: 9.

Corti, O., Lesage, S., & Brice, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of parkinson's disease. *Physiol Rev.* 2011; 91 (4): 1161-1218.

Dauer, W., & Przedborski, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron.* 2003; 39 (6): 889-909.

De Pedro, N., Martinez-Alvarez, R. M., & Delgado, M. J. Melatonin reduces body weight in goldfish (*carassius auratus*): Effects on metabolic resources and some feeding regulators. *J Pineal Res.* 2008; 45 (1): 32-39.

de Rijk, M. C., Launer, L. J., Berger, K., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Baldereschi, M., . . . Hofman, A. Prevalence of parkinson's disease in europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology.* 2000; 54 (11 Suppl 5): S21-23.

Dickson, D. W. Parkinson's disease and parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2 (8).

Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., . . . Tanner, C. M. Projected number of people with parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007; 68 (5): 384-386.

Driver, J. A., Logroscino, G., Gaziano, J. M., & Kurth, T. Incidence and remaining lifetime risk of parkinson disease in advanced age. *Neurology.* 2009; 72 (5): 432-438.

Drouin-Ouellet, J., & Cicchetti, F. Inflammation and neurodegeneration: The story 'retolled'. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33 (10): 542-551.

Drouin-Ouellet, J., St-Amour, I., Saint-Pierre, M., Lamontagne-Proulx, J., Kriz, J., Barker, R. A., & Cicchetti, F. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of parkinson's disease. *The international journal of neuropsychopharmacology.* 2014; 18 (6).

Eikelenboom, P., van Exel, E., Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., Rozemuller, A. J., & van Gool, W. A. Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 2010; 7 (1-3): 38-41.

Erridge, C. Endogenous ligands of tlr2 and tlr4: Agonists or assistants? *J Leukoc Biol.* 2010; 87 (6): 989-999.

Feany, M. B. New genetic insights into parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2004; 351 (19): 1937-1940.

Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., . . . Stefanova, N. Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia.* 2013; 61 (3): 349-360.

Fornai, F., Schluter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., . . . Sudhof, T. C. Parkinson-like syndrome induced by continuous mptp infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (9): 3413-3418.

Gao, H. M., & Hong, J. S. Why neurodegenerative diseases are progressive: Uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 2008; 29 (8): 357-365.

Gautier, C. A., Corti, O., & Brice, A. Mitochondrial dysfunctions in parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris).* 2014; 170 (5): 339-343.

Gay, N. J., Gangloff, M., & Weber, A. N. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (9): 693-698.

Gillette, M. U., & Wang, T. A. Brain circadian oscillators and redox regulation in mammals. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20 (18): 2955-2965.

Giraldez-Perez, R., Antolin-Vallespin, M., Munoz, M., & Sanchez-Capelo, A. Models of alpha-synuclein aggregation in parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 176.

Giros, B., & Caron, M. G. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci.* 1993; 14 (2): 43-49.

Gomez-Corvera, A., Cerrillo, I., Molinero, P., Naranjo, M. C., Lardone, P. J., Sanchez-Hidalgo, M., . . . Rubio, A. Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, c57bl/6 and swiss strains. *J Pineal Res.* 2009; 47 (1): 15-22.

Goode, B. L., Wong, J. J., Butty, A. C., Peter, M., McCormack, A. L., Yates, J. R., . . . Barnes, G. Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *J Cell Biol.* 1999; 144 (1): 83-98.

Gorbatyuk, O. S., Li, S., Sullivan, L. F., Chen, W., Kondrikova, G., Manfredsson, F. P., . . . Muzyczka, N. The phosphorylation state of ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105 (2): 763-768.

Guney, Y., Hicsonmez, A., Uluoglu, C., Guney, H. Z., Ozel Turkcu, U., Take, G., . . . Zengil, H. Melatonin prevents inflammation and oxidative stress caused by abdominopelvic and total body irradiation of rat small intestine. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40 (10): 1305-1314.

Ha, D., Stone, D. K., Mosley, R. L., & Gendelman, H. E. Immunization strategies for parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012; 18 Suppl 1: S218-221.

Hardeland, R. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8 (3): 168-181.

Harry, G. J., & Kraft, A. D. Neuroinflammation and microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; 4 (10): 1265-1277.

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., . . . Bates, E. E. Human tlr10 is a functional receptor, expressed by b cells and plasmacytoid dendritic

cells, which activates gene transcription through myd88. *J Immunol.* 2005; 174 (5): 2942-2950.

Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. The toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988; 52 (2): 269-279.

Helmich, R. C., Hallett, M., Deuschl, G., Toni, I., & Bloem, B. R. Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: A tale of two circuits? *Brain.* 2012; 135 (Pt 11): 3206-3226.

Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Carrillo-Jimenez, A., Oliva-Martin, M. J., Garcia-Revilla, J., Garcia-Quintanilla, A., . . . Venero, J. L. Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 312.

Hirsch, E. C., & Hunot, S. Neuroinflammation in parkinson's disease: A target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009; 8 (4): 382-397.

Hoebe, K., & Beutler, B. Lps, dsrna and the interferon bridge to adaptive immune responses: Trif, tram, and other tir adaptor proteins. *J Endotoxin Res.* 2004; 10 (2): 130-136.

Hua, F., Ma, J., Ha, T., Xia, Y., Kelley, J., Williams, D. L., . . . Li, C. Activation of toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of Neuroimmunology.* 2007; 190 (1-2): 101-111.

Hughes, C. D., Choi, M. L., Ryten, M., Hopkins, L., Drews, A., Botia, J. A., . . . Klennerman, D. Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes tlr4 to play an initiating role in parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 2019; 137 (1): 103-120.

Ianas, O., Olinescu, R., & Badescu, I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie.* 1991; 29 (3-4): 147-153.

Iranzo, A., Molinuevo, J. L., Santamaria, J., Serradell, M., Marti, M. J., Valdeoriola, F., & Tolosa, E. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: A descriptive study. *Lancet Neurol.* 2006; 5 (7): 572-577.

Janda, E., Boi, L., & Carta, A. R. Microglial phagocytosis and its regulation: A therapeutic target in parkinson's disease? *Front Mol Neurosci.* 2018; 11: 144.

Jankovic, J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79 (4): 368-376.

Janssens, S., & Beyaert, R. A universal role for myd88 in tlr/il-1r-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27 (9): 474-482.

Jin, M. S., & Lee, J. O. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity.* 2008; 29 (2): 182-191.

Joers, V., Tansey, M. G., Mulas, G., & Carta, A. R. Microglial phenotypes in parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol.* 2017; 155: 57-75.

Jou, M. J., Peng, T. I., Reiter, R. J., Jou, S. B., Wu, H. Y., & Wen, S. T. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res.* 2004; 37 (1): 55-70.

Kang, K., Lee, K., Park, S., Kim, Y. S., & Back, K. Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin n-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. *J Pineal Res.* 2010; 49 (2): 176-182.

Karampetsou, M., Ardah, M. T., Semitekolou, M., Polissidis, A., Samiotaki, M., Kalomoiri, M., . . . Vekrellis, K. Phosphorylated exogenous alpha-synuclein fibrils exacerbate pathology and induce neuronal dysfunction in mice. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 16533.

Kaushik, S., & Cuervo, A. M. Proteostasis and aging. *Nat Med.* 2015; 21 (12): 1406-1415.

Kebabian, J. W., & Calne, D. B. Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 1979; 277 (5692): 93-96.

Kerfoot, S. M., Long, E. M., Hickey, M. J., Andonegui, G., Lapointe, B. M., Zanardo, R. C. O., . . . Kubes, P. Tlr4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *Journal of Immunology*. 2004; 173 (11): 7070-7077.

Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., . . . Lee, S. J. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of tlr2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*. 2013; 4: 1562.

Kim, S. D., Allen, N. E., Canning, C. G., & Fung, V. S. Postural instability in patients with parkinson's disease. *Epidemiology, pathophysiology and management. CNS Drugs*. 2013; 27 (2): 97-112.

Kim, Y. S., & Joh, T. H. Microglia, major player in the brain inflammation: Their roles in the pathogenesis of parkinson's disease. *Exp Mol Med*. 2006; 38 (4): 333-347.

Klein, C., & Westenberger, A. Genetics of parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2 (1): a008888.

Kumar, A., Rinwa, P., Kaur, G., & Machawal, L. Stress: Neurobiology, consequences and management. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013; 5 (2): 91-97.

Langston, J. W., Langston, E. B., & Irwin, I. Mptp-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1984; 100: 49-54.

Lardone, P. J., Guerrero, J. M., Fernandez-Santos, J. M., Rubio, A., Martin-Lacave, I., & Carrillo-Vico, A. Melatonin synthesized by t lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res*. 2011; 51 (4): 454-462.

Lee, J. H., Jung, H. S., Giang, P. M., Jin, X., Lee, S., Son, P. T., . . . Lee, J. J. Blockade of nuclear factor-kappab signaling pathway and anti-inflammatory activity of cardamomin,

a chalcone analog from *alpinia conchigera*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316 (1): 271-278.

Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., . . . Vartanian, T. Activation of innate immunity in the cns triggers neurodegeneration through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (14): 8514-8519.

Levy, G. The relationship of parkinson disease with aging. *Arch Neurol*. 2007; 64 (9): 1242-1246.

Lewis, S. J., & Barker, R. A. Understanding the dopaminergic deficits in parkinson's disease: Insights into disease heterogeneity. *J Clin Neurosci*. 2009; 16 (5): 620-625.

Lim, K. L., & Zhang, C. W. Molecular events underlying parkinson's disease - an interwoven tapestry. *Front Neurol*. 2013; 4: 33.

Litvan, I., Bhatia, K. P., Burn, D. J., Goetz, C. G., Lang, A. E., McKeith, I., . . . Movement Disorders Society Scientific Issues, C. Movement disorders society scientific issues committee report: Sic task force appraisal of clinical diagnostic criteria for parkinsonian disorders. *Mov Disord*. 2003; 18 (5): 467-486.

Llewellyn, K. J., Nalbandian, A., Weiss, L. N., Chang, I., Yu, H., Khatib, B., . . . Kimonis, V. E. Myogenic differentiation of vcp disease-induced pluripotent stem cells: A novel platform for drug discovery. *PLoS One*. 2017; 12 (6): e0176919.

Lucas, S. M., Rothwell, N. J., & Gibson, R. M. The role of inflammation in cns injury and disease. *Br J Pharmacol*. 2006; 147 Suppl 1: S232-240.

Luthman, J., Fredriksson, A., Sundstrom, E., Jonsson, G., & Archer, T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: Motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res*. 1989; 33 (3): 267-277.

Lv, R., Du, L., Liu, X., Zhou, F., Zhang, Z., & Zhang, L. Rosmarinic acid attenuates inflammatory responses through inhibiting hmgb1/tlr4/nf-kappab signaling pathway in a mouse model of parkinson's disease. *Life Sci.* 2019; 223: 158-165.

Ma, Y., Haynes, R. L., Sidman, R. L., & Vartanian, T. Tlr8: An innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle.* 2007; 6 (23): 2859-2868.

Maasz, G., Zrinyi, Z., Reglodi, D., Petrovics, D., Rivnyak, A., Kiss, T., . . . Pirger, Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (pacap) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis Model Mech.* 2017; 10 (2): 127-139.

Mariucci, G., Pagiotti, R., Galli, F., Romani, L., & Conte, C. The potential role of toll-like receptor 4 in mediating dopaminergic cell loss and alpha-synuclein expression in the acute mptp mouse model of parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 2018; 64 (4): 611-618.

Martin, M., Macias, M., Leon, J., Escames, G., Khaldy, H., & Acuna-Castroviejo, D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of atp in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34 (4): 348-357.

Mayo, J. C., Sainz, R. M., Tan, D. X., Antolin, I., Rodriguez, C., & Reiter, R. J. Melatonin and parkinson's disease. *Endocrine.* 2005; 27 (2): 169-178.

Meredith, G. E., & Rademacher, D. J. Mptp mouse models of parkinson's disease: An update. *J Parkinsons Dis.* 2011; 1 (1): 19-33.

Mulhearn, R. J. The history of james parkinson and his disease. *Aust N Z J Med.* 1971; 1: Suppl 1:1-6.

Mullin, S., & Schapira, A. H. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in parkinson disease. *Neurol Clin.* 2015; 33 (1): 1-17.

Naranjo, M. C., Guerrero, J. M., Rubio, A., Lardone, P. J., Carrillo-Vico, A., Carrascosa-Salmoral, M. P., . . . Molinero, P. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (6): 781-790.

Naskar, A., Prabhakar, V., Singh, R., Dutta, D., & Mohanakumar, K. P. Melatonin enhances l-dopa therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *J Pineal Res.* 2015; 58 (3): 262-274.

Nicholls, D. G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1147: 53-60.

Nicklas, W. J., Vyas, I., & Heikkila, R. E. Inhibition of nadh-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985; 36 (26): 2503-2508.

Niranjan, R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of parkinson's disease: Focus on astrocytes. *Mol Neurobiol.* 2014; 49 (1): 28-38.

Noelker, C., Morel, L., Lescot, T., Osterloh, A., Alvarez-Fischer, D., Breloer, M., . . . Hartmann, A. Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse mptp model of parkinson disease. *Sci Rep.* 2013; 3: 1393.

Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for parkinson disease. *Ann Neurol.* 2012; 72 (6): 893-901.

Nusslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature.* 1980; 287 (5785): 795-801.

O'Neill, L. A., & Dinarello, C. A. The il-1 receptor/toll-like receptor superfamily: Crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today.* 2000; 21 (5): 206-209.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., & Olanow, C. W. Pathophysiology of the basal ganglia in parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2000; 23 (10 Suppl): S8-19.

Olson, J. K., & Miller, S. D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple tlrs. *J Immunol.* 2004; 173 (6): 3916-3924.

Ortiz, G. G., Crespo-Lopez, M. E., Moran-Moguel, C., Garcia, J. J., Reiter, R. J., & Acuna-Castroviejo, D. Protective role of melatonin against mptp-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001; 22 (2): 101-108.

Ozsoy, O., Yildirim, F. B., Ogut, E., Kaya, Y., Tanriover, G., Parlak, H., . . . Aslan, M. Melatonin is protective against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *Free Radic Res.* 2015; 49 (8): 1004-1014.

Patki, G., & Lau, Y. S. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 99 (4): 704-711.

Ping, Z., Xiaomu, W., Xufang, X., & Liang, S. Vinpocetine regulates levels of circulating tlrs in parkinson's disease patients. *Neurol Sci.* 2019; 40 (1): 113-120.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., . . . Lang, A. E. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17013.

Polentarutti, N., Rol, G. P., Muzio, M., Bosisio, D., Camnasio, M., Riva, F., . . . Mantovani, A. Unique pattern of expression and inhibition of il-1 signaling by the il-1 receptor family member tir8/sigirr. *Eur Cytokine Netw.* 2003; 14 (4): 211-218.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., . . . Beutler, B. Defective lps signaling in c3h/hej and c57bl/10sccr mice: Mutations in tlr4 gene. *Science.* 1998; 282 (5396): 2085-2088.

Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M., & Lafon, M. Virus infection switches tlr-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol.* 2005; 79 (20): 12893-12904.

Przedborski, S., & Vila, M. The last decade in parkinson's disease research. *Basic sciences. Adv Neurol.* 2001; 86: 177-186.

Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* 2016; 353 (6301): 777-783.

Rappold, P. M., Cui, M., Chesser, A. S., Tibbett, J., Grima, J. C., Duan, L., . . . Tieu, K. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (51): 20766-20771.

Raza, C., Anjum, R., & Shakeel, N. U. A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* 2019; 226: 77-90.

Reich, S. G., & Savitt, J. M. Parkinson's disease. *Med Clin North Am.* 2019; 103 (2): 337-350.

Ribelayga, C., Pevet, P., & Simonneaux, V. H101 drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the siberian hamster. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2000; 278 (5): R1339-1345.

Riley, D., Lang, A. E., Blair, R. D., Birnbaum, A., & Reid, B. Frozen shoulder and other shoulder disturbances in parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1989; 52 (1): 63-66.

Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9 (9): 1081-1088.

Sanders, L. H., & Greenamyre, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 62: 111-120.

Sato, S., Uchihara, T., Fukuda, T., Noda, S., Kondo, H., Saiki, S., . . . Hattori, N. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 2813.

Sawada, M., Imamura, K., & Nagatsu, T. Role of cytokines in inflammatory process in parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2006; (70): 373-381.

Sawle, G. Movement disorders in clinical practice. Lee Smith&Paul Wilkinson of In Perspective Ltd. 1999.

Schober, A. Classic toxin-induced animal models of parkinson's disease: 6-ohda and mptp. *Cell Tissue Res*. 2004; 318 (1): 215-224.

Shao, G., Tian, Y., Wang, H., Liu, F., & Xie, G. Protective effects of melatonin on lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2015; 29 (2): 263-268.

Shephard, F., Greville-Heygate, O., Liddell, S., Emes, R., & Chakrabarti, L. Analysis of mitochondrial haemoglobin in parkinson's disease brain. *Mitochondrion*. 2016; 29: 45-52.

Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., . . . Greenamyre, J. T. Mechanism of toxicity in rotenone models of parkinson's disease. *J Neurosci*. 2003; 23 (34): 10756-10764.

Shieh, J. M., Wu, H. T., Cheng, K. C., & Cheng, J. T. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a pkczeta-akt-gsk3beta pathway in hepatic cells. *J Pineal Res*. 2009; 47 (4): 339-344.

Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., . . . Shiono, H. Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res*. 2001; 906 (1-2): 135-142.

Sidransky, E., & Lopez, G. The link between the gba gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012; 11 (11): 986-998.

Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S. A., & DeLong, M. R. Parkinson's disease therapeutics: New developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37 (1): 213-246.

Steward, R., McNally, F. J., & Schedl, P. Isolation of the dorsal locus of drosophila. *Nature.* 1984; 311 (5983): 262-265.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Sanchez-Barcelo, E., Mediavilla, M. D., & Reiter, R. J. Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8 (3): 162-167.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007; 42 (1): 28-42.

Tang, S. C., Arumugam, T. V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M. R., Jo, D. G., . . . Mattson, M. P. Pivotal role for neuronal toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (34): 13798-13803.

Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., . . . Langston, J. W. Rotenone, paraquat, and parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2011; 119 (6): 866-872.

Tansey, M. G., & Goldberg, M. S. Neuroinflammation in parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis.* 2010; 37 (3): 510-518.

Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses.* 2011; 3 (6): 920-940.

Trudler, D., Farfara, D., & Frenkel, D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010.

Tufekci, K. U., Genc, S., & Genc, K. The endotoxin-induced neuroinflammation model of parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2011; 2011: 487450.

Ve, T., Gay, N. J., Mansell, A., Kobe, B., & Kellie, S. Adaptors in toll-like receptor signaling and their potential as therapeutic targets. *Curr Drug Targets.* 2012; 13 (11): 1360-1374.

Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Rideout, H. J., & Stefanis, L. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2011; 10 (11): 1015-1025.

Vieregge, P., & Heberlein, I. Increased risk of parkinson's disease in relatives of patients. *Ann Neurol.* 1995; 37 (5): 685.

Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., & Lee, V. M. Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to lewy body and lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc.* 2014; 9 (9): 2135-2146.

Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., . . . Lee, V. M. Exogenous alpha-synuclein fibrils induce lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron.* 2011; 72 (1): 57-71.

Wadachi, R., & Hargreaves, K. M. Trigeminal nociceptors express tlr-4 and cd14: A mechanism for pain due to infection. *J Dent Res.* 2006; 85 (1): 49-53.

Watson, M. B., Richter, F., Lee, S. K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., . . . Chesselet, M. F. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol.* 2012; 237 (2): 318-334.

Xilouri, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. Alpha-synuclein and protein degradation systems: A reciprocal relationship. *Mol Neurobiol.* 2013; 47 (2): 537-551.

Yildirim, F. B., Ozsoy, O., Tanriover, G., Kaya, Y., Ogut, E., Gemici, B., . . . Aslan, M. Mechanism of the beneficial effect of melatonin in experimental parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2014; 79: 1-11.

Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., & Ros-Bernal, F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 322.

Zaitone, S. A., Hammad, L. N., & Farag, N. E. Antioxidant potential of melatonin enhances the response to l-dopa in 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine-parkinsonian mice. *Pharmacol Rep.* 2013; 65 (5): 1213-1226.

Zurolo, E., Iyer, A., Maroso, M., Carbonell, C., Anink, J. J., Ravizza, T., . . . Aronica, E. Activation of toll-like receptor, rage and hmgb1 signalling in malformations of cortical development. *Brain.* 2011; 134 (Pt 4): 1015-1032.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                     |            |                |                            |
|---------------------|------------|----------------|----------------------------|
| <b>Adı</b>          | Sendegül   | <b>Uyruğu</b>  | T.C.                       |
| <b>Soyadı</b>       | YILDIRIM   | <b>Tel no</b>  | 05078510843                |
| <b>Doğum tarihi</b> | 13.10.1989 | <b>e-posta</b> | sendegulyildirim@gmail.com |

### Eğitim Bilgileri

| Mezun olduğu kurum   |                                                                             | Mezuniyet yılı |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Lise</b>          | Aydınlıkevler Anadolu Lisesi                                                | 2006           |
| <b>Lisans</b>        | Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü                        | 2014           |
| <b>Yüksek Lisans</b> | Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı | 2020           |

### İş Deneyimi

| Görevi             | Kurum                                                  | Süre (yıl-yıl) |
|--------------------|--------------------------------------------------------|----------------|
| Biyolog            | Antalya Medikal Park Hastanesi                         | 2014-2016      |
| Biyoloji öğretmeni | Konyaaltı Sanat ve Eğitim merkezi ve Elit Etüt Merkezi | 2016-2017      |

| Yabancı Dilleri | Sınav türü | Puanı |
|-----------------|------------|-------|
| İngilizce       | Yök-Dil    | 66,25 |

### Proje Deneyimi

| Proje Adı                                                                                                                                                      | Destekleyen kurum                                               | Süre (Yıl-Yıl) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------|
| Rotenon ile Oluşturulmuş Parkinson Hastalığı Modelinde Vortioksetinin Nörodejenerasyon ve Bilişsel Disfonksiyon Üzerine Etkilerinin İn Vivo Olarak İncelenmesi | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TDK-2019-4412) | 2019-          |

|                                                                                                                                                                            |                                                                 |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| PKA Aracılı E2F1'in Post-Translasyonel Modifikasyonlarının Kanser Proliferasyonu Ve Metastaz Üzerine Etkilerinin Araştırılması                                             | TÜBİTAK-1002 (119S338)                                          | 2019-     |
| Fare Meme Kanseri Modelinde Karsinogenik Yanıtlara Karşı Ortaya Çıkacak Anksiyete Ve Depresyonun Düzenlenmesinde Melatoninin Etkisi                                        | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TKA-2018-3808) | 2018-     |
| Sıçanlarda Metilglioksal İle İndüklenen Endotel Disfonksiyonuna Melatoninin Etkisinin Değerlendirilmesi                                                                    | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TYL-2018-3801) | 2018-     |
| E2F1 ve Post-Translasyonel Modifikasyonlarının Adipoz Kökenli Kök Hücrelerin Nöronal Hücrelere Farklılaşmasına Olan Etkilerinin Araştırılması                              | TÜBİTAK-1001 (118S328)                                          | 2018-     |
| Prilokain Toksisitesinde Timokinonun Koruyucu Etkinliği                                                                                                                    | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TTU-2017-2551) | 2017-2019 |
| Rotenonla İndüklenen Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde Metforminin Olası Etkileri ve Etki mekanizmaları                                                               | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TSA-2017-2392) | 2017-2019 |
| Fare Meme Kanseri Modeli Metastatik ve Non Metastatik Tümörlerde ve Hücre Hatlarında SIRT1 ile FoxO Proteinlerinin Ekspresyonlarının in vivo ve in vitro Değerlendirilmesi | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TSA-2017-2088) | 2017-2019 |

### **Burslar-Ödüller:**

TÜBİTAK 1001 Araştırma Projesi Bursu, 2018

## **Yayınlar ve Bildiriler:**

### **Yayın:**

Ozbey G, Nemutlu-Samur D, Parlak H, **Yıldırım S**, Aslan M, Tanrıöver G, Agar A.

“Metformin protects rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration by reducing lipid peroxidation.” Pharmacological Reports, 2020, doi: 10.1007/s43440-020-00095-1.

### **Bildiriler:**

1. **Sendegül Yıldırım**, Gamze Tanrıöver, Barış Akgül, İlker Öngüç Aycan, Enis Hidişoğlu, Ebru Afşar, Mutay Aslan. “Prilocaine induced epileptiform activity and cardiac toxicity is alleviated by thymoquinone treatment” 04-07 Nisan 2019 Trabzon, 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sözlü Sunum
2. **Sendegül Yıldırım**, Güneş Aytaç, Hande Parlak, Aysel Ağar, Gamze Tanrıöver. “Responses to TLR4 increase triggers inflammatory pathways in a Mouse model of Parkinson’s disease” 04-07 Nisan 2019 Trabzon, 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Poster Sunum
3. Gamze Tanrıöver, **Sendegül Yıldırım**, Mustafa Gökhan Ertosun. “SOX2 and NANOG expressions in glioblastoma multiforme” 04-07 Nisan 2019 Trabzon, 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Poster Sunum
4. Gül Özbey, Dilara Nemutlu Samur, Hande Parlak, **Sendegül Yıldırım**, Gamze Tanrıöver, Aysel Ağar. “Metformin dopaminerjik nöronlarda rotenonla indüklenen dejenerasyonu azaltmaktadır” 20-23 Mayıs 2018 İstanbul, 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sözlü Sunum.
5. **Sendegül Yıldırım**, Sayra Dilmaç, Nilay Kuşcu, Dileyra Adıgüzel, Şükran Burçak Yoldaş, Nuray Erin, Gamze Tanrıöver. “Sirt1 özel bir yolak ile FoxO proteinlerinin hedefini metastazı tetikleyecek şekilde etkileyebilir mi?” 10-13 Mayıs 2018 Antalya, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Sözlü Sunum.
6. **Sendegül Yıldırım**, Hande Parlak, Aysel Ağar, Gamze Tanrıöver. “Farelerde oluşturulan deneysel Parkinson hastalığı modelinde Toll like reseptör-4 (TLR4) Ekspresyonu” 04-05 Mayıs 2018 Tuzla, Hücre Ölümü Araştırma Derneği Uluslararası Katılımlı Nörodejenerasyon/Nörorejenerasyon Çalıştayı, Poster Sunum.