



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PARKİNSON HASTALIĞI VE TRP KANALLARININ  
İLİŞKİSİ; KARVAKROL'ÜN OLASI TEDAVİ EDİCİ  
ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**TÜLAY KOCA**

**DANIŞMAN**

**Prof.Dr. YASEMİN AYDIN**

**2020**





T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PARKİNSON HASTALIĞI VE TRP KANALLARININ  
İLİŞKİSİ; KARVAKROL'ÜN OLASI TEDAVİ EDİCİ  
ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**TÜLAY KOCA**

**DANIŞMAN**

**Prof.Dr. YASEMİN AYDIN**

**2020**

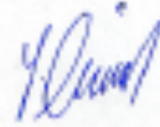
**i**

## KABUL VE ONAY SAYFASI


Tülay KOCA'nın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Parkinson hastalığı ve TRP kanallarının ilişkisi; Carvacrol'un olası tedavi edici etkileri" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih  
15.01.2020


Üye : Prof. Dr. Yasemin AYDIN



Üye : Prof. Dr. Emel ULUPINAR



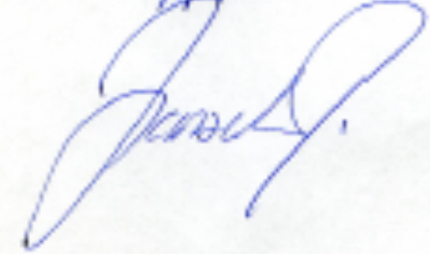
Üye : Doç. Dr. Gökhan KUŞ



Üye : Prof. Dr. Ayşegül KÜÇÜK



Üye : Doç. Dr. Orhan Tansel KORKMAZ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Özkan ALATAŞ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### **Parkinson Hastalığı ve TRP Kanallarının İlişkisi; Karvakrol'ün Olası Tedavi Edici Etkileri**

#### **Giriş ve Amaç:**

Parkinson hastalığı (PH), substantia nigra pars compacta'dan (SNpc) striatuma projeksiyon yapan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize ve ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. PH'nda nörodejenerasyona yol açan başlıca nedenlerden biri bozulmuş kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) homeostazisidir. Geçici reseptör potansiyel (Transient Receptor Potential-TRP) proteinleri, hücrelerin  $Ca^{2+}$  sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde görev alan başlıca katyon kanallarıdır ve bu nedenle TRP kanallarının aktivitelerinin modülasyonu ile oluşan hücresel etkilerin; dopaminerjik nöronlarda ve astrositlerde değerlendirilmesi PH'nda önem taşıyabilir.

Bu tez çalışmasında; 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturduğumuz Parkinson modelimizde CA'ün, dopaminerjik nöronlarda yer alan TRPC1 ve astrositlerde yer alan TRPA1 kanalı üzerindeki etkilerinin PH'nın ilerlemesinde ve önlenmesinde katkısı araştırılmıştır. Ayrıca literatür araştırmamızda benzer bir başka çalışmaya rastlanmamıştır.

#### **Gereç ve Yöntem:**

Deneylerimizi, genç erişkin erkek Sprague-Dawley cinsi 64 adet sıçan kullanarak, her biri 16 sıçandan oluşan 1-Sham (Taklit Operasyon), 2- 6-OHDA verilen, 3- 6-OHDA verilen ve DMSO (Dimetil sülfoksit) uygulaması yapılan, 4- 6-OHDA verilen ve CA uygulaması yapılan; 4 grupta gerçekleştirdik. Sıçanlarımıza 14 gün boyunca gün aşırı intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon uyguladık. Her grubun 8 hayvanın beyin doku kesitlerinde TRPC1 ve TRPA1 immünreaktivitesini, immünohistokimyasal boyama yöntemiyle belirledik. Gruplardaki diğer 8 hayvana servikal dislokasyon yaptıktan sonra çıkarttığımız beyinlerinin SNpc ve striatal alanlarını moleküler incelemeler için kullandık.

## **Bulgular:**

İmmünohistokimyasal analiz sonuçlarına göre, kontrol grubumuza kıyasla Parkinson oluşturduğumuz gruplarda 6-OHDA ile parkinson oluşumuna bağlı olarak beklendiği şekilde TRPC1(+) nöron sayısında azalma olmuştur. Hücre sayısındaki bu azalma DMSO ve CA grubumuzda da görülmüş, hücre sayısında artış sağlanmamıştır. Ancak CA uygulanan grubumuza ait preparatlardaki dopaminerjik nöronların, CA'ün nöroprotektif etkisinden dolayı daha sağlıklı bir görünüme sahip olduğu, DMSO grubundaki hücelere göre hücre bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Dopaminerjik nöron TRPC1 kanallarının gen ekspresyonu ve protein düzeylerinde ise CA'ün anlamlı bir etkisi olmamıştır. Astrositlerdeki TRPA1(+) hücre sayısı ise kontrol grubuna kıyasla CA tedavi grubunda azalmışken gen ekspresyon ve protein düzeyleri çok belirgin düzeyde artmıştır. TRPC1(+) dopaminerjik hücelerde olduğu gibi tedavi grubu astrosit hücelerinin hücresel bütünlüğünün de CA ile korunduğu görülmüştür.

## **Sonuç ve Öneriler:**

Verilerimize göre; CA'ün Parkinson hayvan modelimizde nöroprotektif etki gösterdiği, TRPC1'in dopaminerjik hücelerde ana  $Ca^{2+}$  kanalı olduğu ve CA ile inhibe edildiği, yanı sıra CA'ün, TRPA1 kanallarını aktive ettiği, kanalın ekspresyonunu arttırması nedeniyle astrositlerin nöromodülatör etkilerini tetikleyerek belki de nöron sağkalımında yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda tedavi süresinin uzatılması ve ayrıntılı moleküler mekanizmaların çalışılmasıyla çeşitli TRP kanallarının Parkinson patogenezindeki detaylı rolleri ve CA'ün PH'nın tedavisindeki olumlu etkileri daha anlaşılabilir hale gelebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Parkinson Hastalığı, TRP kanalları, Karvakrol, Nöroproteksiyon, Kalsiyum Sinyali

## **SUMMARY**

### **The Relationship Between Parkinson's Disease and TRP Channels; Possible Therapeutic Effects of Carvacrol**

#### **Introduction and Aim:**

Parkinson's disease (PH) is the second most common neurodegenerative disease, characterized by the degeneration of dopaminergic neurons projecting from the substantia nigra pars compacta (SNpc) to the striatum. One of the main causes of neurodegeneration in PH is impaired calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis. Transient Receptor Potential (TRP) proteins are the major cation channels involved in the regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanism of cells, and therefore the cellular effects induced by the modulation of the activities of TRP channels; evaluation in dopaminergic neurons and astrocytes is important in PD.

In this thesis; In our Parkinson model with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), the effects of carvacrol (CA) on TRPC1 and TRPA1 channels in dopaminergic neurons on the progression and prevention of PH were investigated. In addition, no other similar study was found in our literature research.

#### **Materials and Methods:**

Our experiments were carried out using 64 adult male Sprague-Dawley rats, each consisting of 16 rats and performed in 4 groups; 1-Sham (Imitation Operation), 2- 6-OHDA applied, 3- 6-OHDA and DMSO (Dimethyl sulfoxide) applied and 4- 6-OHDA and CA applied. We administered intraperitoneal (i.p.) injection to our rats every other day for 14 days. We determined the immunoreactivity of TRPC1 and TRPA1 in brain tissue sections of 8 animals of each group by immunohistochemical staining method. After performing cervical dislocation to the other 8 animals in the groups, we used SNpc and striatal areas of their brains for molecular investigations.

## **Results:**

According to the results of immunohistochemical analysis, compared to our control group, the number of TRPC1(+) neurons decreased as expected due to drug parkinson formation in the groups we created Parkinson's. This decrease in cell number was also observed in our DMSO and CA group, but no increase in cell number was observed. However, it was observed that dopaminergic neurons in the preparations belonging to our CA group had a healthier appearance due to the neuroprotective effect of CA and cell integrity was maintained compared to the cells in the DMSO group. In gene expression and protein levels of dopaminergic neuron TRPC1 channels, CA had no significant effect. While the number of TRPA1(+) cells in astrocytes was decreased in CA treatment group compared to control group, gene expression and protein levels increased significantly. As in TRPC1(+) dopaminergic cells, cellular integrity of the treatment group astrocytes was also maintained by CA.

## **Conclusion and Suggestions:**

According to our data; CA showed neuroprotective effect in our Parkinson animal model, TRPC1 is the main  $\text{Ca}^{2+}$  channel in dopaminergic cells and inhibited by CA, in addition, CA activates TRPA1 channel, because of increased channel expression, astrocytes may be useful in neuron survival by triggering the neuromodulatory effects. In this context, by increasing the duration of treatment and studying the detailed molecular mechanisms, the detailed roles of various TRP channels in the pathogenesis of Parkinson's disease and the positive effects of CA in the treatment of PH may become more understandable.

**Keywords:** Parkinson's Disease, TRP channels, Carvacrol, Neuroprotection, Calcium Signal



# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO DİZİNİ .....	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Bazal Ganglionlar .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Bazal gangliyon devreleri ve bazal gangliyon devrelerinin kimyası .	5
<b>2.2. Parkinson Hastalığı.....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Parkinson hastalığı'nın epidemiyolojisi .....	8
2.2.2. Parkinson hastalığı'nın etiyolojisi ve tanımlanması .....	9
2.2.3. Parkinson hastalığı'nda patolojik mekanizmalar .....	12
2.2.4. Parkinson hastalığı'ndaki nörodejenerasyonun nedenleri .....	15
2.2.5. Parkinson hastalığı'nda tedavi yaklaşımları .....	26
<b>2.3. Karvakrol.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Astrositler .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5. TRP Kanalları .....</b>	<b>37</b>
2.5.1. TRPC kanalları.....	40
2.5.1.1. TRPC1 kanalı .....	42
2.5.2. TRPA kanalları.....	43
2.5.2.1. TRPA1 kanalları .....	44
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Kullanılan Materyaller .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	48
3.1.1.1. RNA izolasyon malzemeleri.....	48
3.1.1.2. RT-PCR malzemeleri .....	49
3.1.1.3. Protein izolasyon malzemeleri.....	49

3.1.1.4. Western blot malzemeleri.....	49
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	50
<b>3.2. Yöntem.....</b>	<b>51</b>
3.2.1. 6-OHDA ile Parkinson modeli oluşturulması.....	53
3.2.2. Karvakrol Uygulanması.....	53
<b>3.3. Histolojik İncelemeler İçin Yapılan İşlemler .....</b>	<b>53</b>
3.3.1. Perfüzyon fiksasyonu.....	53
3.3.2. İmmünohistokimyasal işlemler.....	54
3.3.3. İmmunhistokimyasal ikili boyama (TH-TRPC1 ve GFAP-TRPA1) .	55
<b>3.4. Gen Ekspresyonu .....</b>	<b>56</b>
3.4.1. RNA izolasyonu.....	56
3.4.1.1. Kullanılan çözeltiler.....	56
3.4.1.2. RNA izolasyon protokolü.....	57
3.4.2. RNA konsantrasyonu ölçümü.....	58
3.4.3. cDNA sentezi.....	59
3.4.4. RT-PCR ile hedef genlerin cDNA amplifikasyonu.....	60
<b>3.5. Western Blot Analizi.....</b>	<b>62</b>
3.5.1. Doku homejanatı hazırlanması ve protein izolasyonu.....	62
3.5.2. Protein konsantrasyonu ölçümü.....	63
3.5.3. Örneklerin jele yüklenmesi ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez işlemi.....	63
3.5.4. Protein örneklerinin nitroselüloz membrana aktarılması (blotlama) .....	64
3.5.5. Bloklama ve antikor uygulanması.....	65
3.5.6. Kemilüminesans görüntüleme.....	66
<b>3.6. İstatiksel Analiz.....</b>	<b>67</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1. İmmünohistokimyasal Veriler .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2. Gen Ekspresyon Sonuçları .....</b>	<b>74</b>
4.2.1. Substantia Nigra'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları.....	74
4.2.2. Korpus striatum'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları.....	75
<b>4.3. Western Blot Sonuçları.....</b>	<b>76</b>
4.3.1. Substantia Nigra'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları.....	76

4.3.2. Korpus striatum'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları .....	78
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>80</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>95</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>97</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>129</b>



## TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Parkinson hastalığı patogenezinin mekanizması ve olası hedef terapiler.....	16
Tablo 3.1. Çalışmada sıçanlarda kullanılan kimyasallar .....	52
Tablo 3.2. Kullanılan antikolar ve dilüsyon oranları .....	55
Tablo 3.3. 200 µl Qubit çalışma solüsyonu içeriği .....	58
Tablo 3.4. cDNA sentezi için PCR karışımı .....	60
Tablo 3.5. RT-PCR protokolünde kullanılan kitler .....	60
Tablo 3.6. RT-PCR karışımında kullanılan reaktifler .....	61
Tablo 3.7. 1 ml RIPA lizis solüsyonu için kullanılan çözeltiler .....	62
Tablo 3.8. 200 µl Qubit çalışma solüsyonu içeriği .....	63
Tablo 3.9. Jele yükleme karışımının içeriği.....	64
Tablo 3.10. iBind solüsyon içeriği .....	65
Tablo 3.11. Kemilüminesans substrat solüsyonu.....	66
Tablo 4.1. İmmünohistokimyasal olarak GFAP(+) astrosit ve TH(+) dopaminerjik nöron hücrelerinin ortalama sayıları.....	68
Tablo 4.2. İmmünohistokimyasal olarak TRPA1(+) astrosit ve TRPC1(+) dopaminerjik nöron hücrelerinin ortalama sayıları.....	70
Tablo 4.3. SN'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları.....	74
Tablo 4.4. KS'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları .....	75

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Koronal kesitte BG'nin lokalizasyonu .....	4
Şekil 2.2. Kortikal-BG yolları.....	5
Şekil 2.3. (a) Normal beyinde, striatumun paralel nöronal ağları. (b) PH'nda, BG devrelerinin doğal dengesi .....	6
Şekil 2.4. PH'na yol açan mekanizmalar.....	24
Şekil 2.5. PH için önerilen çeşitli tedavi yöntemlerinin şeması. ....	27
Şekil 2.6. CA'nın kimyasal yapısı ve biyolojik aktiviteleri. ....	30
Şekil 2.7. Memeli TRP-kanal süper familyasının filogenetik ağacı. ....	38
Şekil 4.1. İmmünohistokimyasal olarak GFAP(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.....	68
Şekil 4.2. İmmünohistokimyasal olarak TH(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.....	69
Şekil 4.3. İmmünohistokimyasal olarak TRPA1(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.....	70
Şekil 4.4. İmmünohistokimyasal olarak TRPC1(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.....	71
Şekil 4.5. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde SNpc bölgesindeki seri kesitlerden elde edilen GFAP(+)-TRPA1(+) işaretli astrosit hücre görüntüleri .....	72
Şekil 4.6. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde SNpc bölgesindeki seri kesitlerden elde edilen TH (+)-TRPC1(+) işaretli dopaminerjik nöron görüntüleri.....	73
Şekil 4.7. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde SN'da ölçülen TRPA1 ve TRPC1 gen ekspresyon sonuçları. ....	74
Şekil 4.8. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde KS'da ölçülen TRPA1 ve TRPC1 gen ekspresyon sonuçları. ....	76

Şekil 4.9. SN ve CS'daki TRPA1 ve TRPC1 protein bantlarının dansitometrik analizi .....	77
Şekil 4.10. SN'da TRPA1 ve TRPC1 protein bantlarının dansitometrik analizi .....	77
Şekil 4.11. KS'da TRPA1 ve TRPC1 protein bantlarının dansitometrik analizi .....	78



## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>:</b>	İntrasellüler kalsiyum
<b>2APB:</b>	Aminoetoksidifenil borat
<b>6-OHDA:</b>	6-hidroksidopamin
<b>AH:</b>	Alzheimer Hastalığı
<b>AMPA:</b>	Alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol propiyonik asit
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>BG:</b>	Bazal ganglionlar
<b>CA:</b>	Karvakrol
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b>	Kalsiyum
<b>CaM:</b>	Kalmodulin
<b>cAMP:</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>cDNA:</b>	Komplamenter deoksiribo nükleik asit
<b>CaV:</b>	Voltaj kapılı Ca <sup>2+</sup> kanalları
<b>CT:</b>	Threshold Cycle
<b>DKG:</b>	Dorsal kök ganglion
<b>DMSO:</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA:</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>ENS:</b>	Enterik sinir sistemi
<b>ER:</b>	Endoplazmik retikulum
<b>ERG:</b>	Elektroretinogram
<b>GABA:</b>	Gama-aminobütirik asit
<b>GAPDH:</b>	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<b>GFAP:</b>	Glial fibriler asidik protein
<b>GP:</b>	Globus pallidus
<b>GPi:</b>	Globus pallidus pars interna
<b>GPe:</b>	Globus pallidus pars eksterna
<b>GSH:</b>	Glutatyon
<b>Homer1:</b>	Homer protein homologu 1
<b>IP3:</b>	İnositol-1,4,5-trisfosfat

<b>ISH:</b>	İntraserebral hemoraji
<b>i.p.:</b>	İntraperitoneal
<b>K<sup>+</sup>:</b>	Potasyum
<b>KBB:</b>	Kan beyin bariyeri
<b>KS:</b>	Korpus striatum
<b>L-DOPA:</b>	L-3,4 - dihidroksifenilanin
<b>LDS:</b>	Lityum Dodesil Sülfat
<b>mGluR:</b>	Metabotropik glutamat reseptörleri
<b>MPP<sup>+</sup>:</b>	1-methyl-4-phenylpyridinium
<b>MPTP:</b>	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine
<b>mRNA:</b>	Haberci ribo nükleik asit
<b>MSN:</b>	Orta dikensi nöronlar
<b>MSS:</b>	Merkezi sinir sistemi
<b>mtDNA:</b>	Mitokondriyal deoksiribo nükleik asit
<b>Na<sup>+</sup>:</b>	Sodyum
<b>NMDA:</b>	N-metil-D-aspartat
<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>NOS:</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>OS:</b>	Oksidatif stres
<b>PBS:</b>	Fosfat tamponlu salin
<b>PH:</b>	Parkinson hastalığı
<b>PPN:</b>	Pedunkulopontin çekirdeği
<b>RES:</b>	Reserpin
<b>RIPA:</b>	Radioimmunoprecipitation assay
<b>RNA:</b>	Ribo nükleik asit
<b>RNaz:</b>	Ribonükleaz
<b>ROS:</b>	Reaktif oksijen ürünleri
<b>RT-PCR:</b>	Gerçek zamanlı - Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SDS-PAGE:</b>	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
<b>SEM:</b>	Ortalama standart hata
<b>siRNA:</b>	Küçük interferans ribonükleik asit



<b>SN:</b>	Substantia nigra
<b>SNCA:</b>	$\alpha$ -sinüklein geni
<b>SNpc:</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SNpr:</b>	Substantia nigra pars retikularis
<b>SOCE:</b>	Store operated $Ca^{2+}$ entry
<b>STIM-1:</b>	Stromal etkileşim molekülü-1
<b>STN:</b>	Subtalamik nukleus
<b>TBH:</b>	Travmatik beyin hasarı
<b>TG:</b>	Trigeminal gangliyon
<b>TH:</b>	Tirozin hidroksilaz
<b>TRP:</b>	Geçici reseptör potansiyel (Transient Receptor Potential)
<b>UCH-L1:</b>	Ubiquitin karboksi terminal hidrolaz L1
<b>UNG:</b>	Uracil-N glycosylase
<b>UPS:</b>	Ubiquitin-proteozom sistemi
<b>WB:</b>	Western blot

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson Hastalığı (PH), dünyada en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve yaşlı nüfusta prevalansı daha yüksektir. PH temel olarak, substantia nigra (SN)'dan striatuma projeksiyon yapan dopaminerjik nöronların genetik ve çevresel etmenlere ya da moleküler patogeneze bağlı nedenlerle ölümü ile gerçekleşir. Bazal ganglionlarda (BG) oluşan dopamin eksikliği öncelikle motor semptomların kaybı ile karakterize edilen bir dizi hareket bozukluğuna yol açar ve sonrasında bilişsel ve davranışsal bozukluklar da tabloya eşlik eder. Striatal dopamin eksikliğine neden olan temel etken SN'daki dopaminerjik nöronların kaybı ve  $\alpha$ -sinüklein agregatlarını içeren hücre içi inklüzyonların birikimidir. Fakat altta yatan moleküler patogeneze, çoklu yollar ve mekanizmalar içerir. Proteinlerin hatalı katlanması ve agregasyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres (OS), aşırı nitrik oksit (NO) üretimi, ubikuitin-proteozom yolağının bozulması, aksonal taşınmada düzensizlikler, nöroinflamasyon, glutamat ekzitotoksitesi, apoptozis, reaktif astroglizis ve anormal mikroglial hücre aktivitesi, yetersiz nörotrofinler, nörotoksinlere maruziyet ve  $Ca^{2+}$  dishomeostazı nörodejenarasyon nedenlerinin başında gelir. Hastalığın erken aşamada ayırıcı tanısının yapılamayışı ve striatal dopaminin farmakolojik ikamesinin sağlanmasında kesin bir çözüm bulunmayışı PH'nın tedavi edilemez olmasına neden olmaktadır. Mevcut tedavilerle yan etkiler olmadan hastaların motor ve non-motor semptomlarını tamamen ortadan kaldırmak, nörodejenasyonu engellemek ve geriye döndürmek henüz mümkün değildir.

Elde edilen birçok kanıt hücreSEL  $Ca^{2+}$  homeostazının bozulmasının nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde kritik rol oynadığını ve hücreSEL proseslerin bozulmasına yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle  $Ca^{2+}$  homeostaz bozukluğunun düzeltilmesi nörodejeneratif hastalıkların iyileştirilmesi için uygun bir strateji olabilir. Hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarının değişimini sağlayan kanalların modülasyonunun değişimi dopaminerjik nöronun mitokondri, endoplazmik retikulum (ER), lizozom veya golgi aparatının stresine

neden olarak hücrel işlevlerin bozulmasına ve nöronun savunmasız hale gelmesine yol açar ve böylece dopaminerjik nöron kaybı yaşanır. Bu düzenlemede yer alan katyon kanallarının önemli bir grubunu da TRP kanalları oluşturmaktadır. TRP kanalları nöronların ve diğer hücrelerin  $Ca^{2+}$  regülasyonunda önemli rol oynarlar. Bir çok çeşit eksojen ve endojen faktör ya da madde TRP kanallarının işleyişini etkileyerek hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinin değişimine neden olabilir ve hücrel fonksiyonların düzenlenmesine TRP kanalları üzerinden olumlu/olumsuz katkı sağlayabilir.

CA bazı TRP kanallarının aktivasyon/inaktivasyonunu sağlayan eksojen lipofilik bir monoterpendir. CA'ün, termosensitif TRP kanalları olan TRPV3 ve TRPA1'i aktive ederken; non-termo sensitif TRP kanalları olan TRPC1 ve TRPM7'yi inhibe ettiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca CA kan beyin bariyerini (KBB) geçebilen, nöronlar ve astrositler üzerinde antioksidan, anti-inflamatuar, antimutagenik, analjezik, antidepresan, anti-apoptotik ve nöroprotektif etkiler sağlayabilen, hasarlı organı korumak gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip biyoaktif bir moleküldür. Bu özellikleri ve etkileri CA'ün PH için terapötik bir ajan olabilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenlerle Parkinson gibi hastalıklarda SN dopaminerjik nöronlarındaki ve astrositlerdeki TRP gibi  $Ca^{2+}$  kanallarının işlevlerinin CA gibi modülatörleri kullanılarak incelenmesinin faydalı etkiye sahip olması olasıdır.

Yapılan literatür çalışmasında CA'ün, dopaminerjik nöronların ana  $Ca^{2+}$  kanalı olan TRPC1 ile nöronal işlevlerin desteklenmesinde, sürdürülmesinde ve düzenlenmesinde görev alan astrositlerin TRPA1 kanalları üzerinden PH'da olası yararlı etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Amacımız nörodejeneratif bir hastalık olan PH'nın etyopatogenezinde TRPC1 ve TRPA1 kanallarının CA ile modülasyonu yoluyla CA'ün olası tedavi edici rolünü gösterebilmek ve PH'na neden olan nörodejenerasyonu engelleyebilecek yeni bir tedavi yöntemini literatüre kazandırmaktır.

Bu amaçla sunduğumuz tez çalışmasında, 6-OHDA ile Parkinson modeli oluşturduğumuz sıçanlarda; CA'ın dopaminerjik nöron TRPC1 ve astrosit TRPA1 kanalları üzerinden olası yararlı etkilerini göstermeye yönelik aşağdaki çalışmaları gerçekleştirdik:

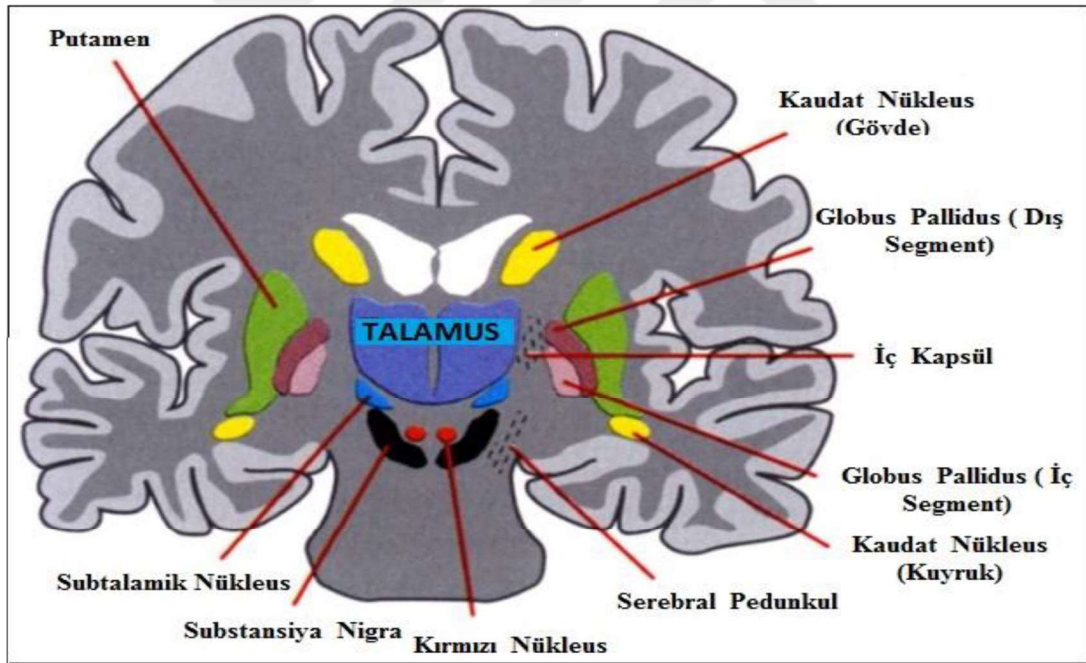
1) İmmünohistokimyasal olarak Tirozin Hidroksilaz (TH) ile işaretlenmiş SN dopaminerjik nöronlarında ve glial fibriler asidik protein (GFAP) ile işaretlenmiş astrositlerde TRPC1 ve TRPA1 kanallarının immünreaktivitesinin belirlenmesi

2) Gerçek zamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile TRPC1 ve TRPA1 proteinlerinin gen ekspresyonunun ve sonrasında CA'ın, TRPC1 ve TRPA1 gen ifadeleri üzerine etkisinin gösterilmesi için western blot (WB) yöntemi ile bu genlerin ürünü olan protein miktarına bakılarak moleküler düzeyde incelenmesi

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bazal Ganglionlar

Bazal ganglionlar; motor öğrenme, yönetici işlevler, davranışlar ve duygular gibi geniş bir rol çeşitliliği ile birlikte, esas olarak motor kontrolde görev alan; beyin hemisferlerinin derininde substantia alba içerisinde telensefalon, diensefalon ve mezensefalona yayılan, birbirleri ile bağlantılı beş çift nükleusdan oluşmuş subkortikal nükleuslar topluluğudur (Albin, Young & Penney, 1989; Lanciego, Luquin & Obeso, 2012). Bu nükleuslar; nükleus kaudatus, putamen, globus pallidus (GP) (pars interna (GPi) ve pars eksterna (GPe)), SN (pars compacta (SNpc) ve pars reticularis (SNpr)) ve subtalamik nükleus (STN) olarak adlandırılmaktadır. Kaudat nükleus ve Putamen birlikte Korpus Striatum (KS) adını alırken; Putamen ve GP'a birlikte, nükleus lentiformis adı verilir (Ward, Seri & Cavanna, 2013; Taner, 2011) (Şekil 2.1.).



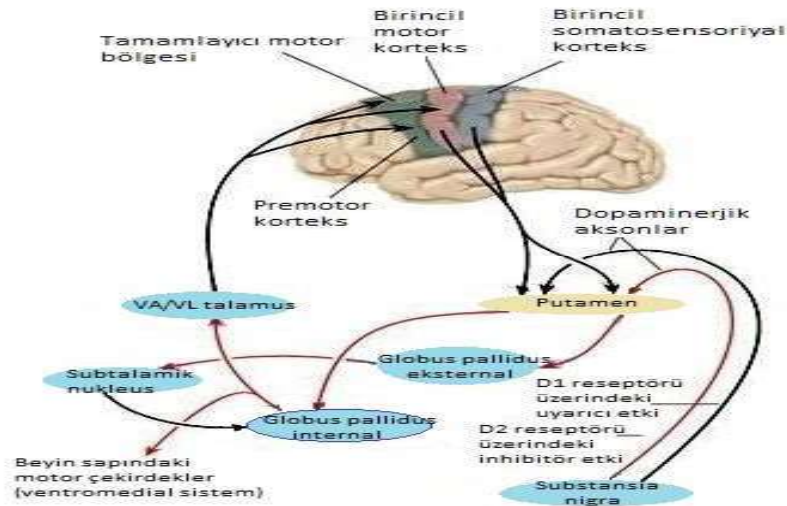
Şekil 2.1. Koronal kesitte BG'nin lokalizasyonu (Leisman, Melillo & Carrick, 2013'den modifiye edilerek alınmıştır).

BG; başlıca istemli hareketi, motor planlamayı ve prosedürel öğrenmeyi düzenleyen yapılar olarak görülmüştür. Ancak son literatür bazal

gangliyonların bilişsel, davranışsal ve duygusal süreçlerle ilgili kortikal alanlarla da bağlantılı olduğunu göstermiştir (Ward vd., 2013).

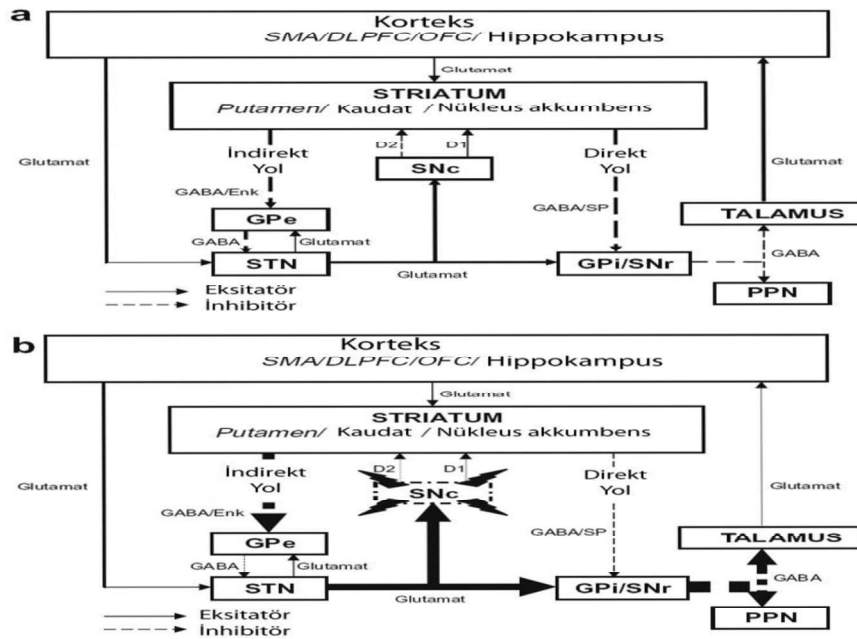
### 2.1.1. Bazal gangliyon devreleri ve bazal gangliyon devrelerinin kimyası

Bazal gangliyonların motor hareketler üzerindeki etkileri serebral korteks aracılığıyla olur (Taner, 2011). BG'ın, neostriatumuna birçok farklı kortikal bölgeden gelen afferent bilgi, GPe, STN ve SNpc'dan geçer; efferentlerinin çıkış yeri olan GPi ve SNpr'e ilerleyerek direkt ve indirekt yollarla işlenir ve talamusun ventral anterior ve lateral çekirdeklerine gider. Talamustan çıkan aksonlar motor korteksle bağlantı kurarak devreyi tamamlar. Bu bağlantılar aracılığıyla, korteksten başlayıp BG ve talamusta nöron değiştirdikten sonra tekrar kortekse dönen ve BG'ların işlevinde ve organizasyonunda son derece önemli olan motor halka (frontal-subkortikal loop) oluşur (Ward vd., 2013; Taner, 2011; Gökmen, 2003). Motor halkanın BG'dan talamusa uzanan bölümü iki farklı yol izler: GPi' nin tek durak olduğu direkt yol ve uyarının önce GPe ve STN'ta ve daha sonra GPi'da sinaps yaptıktan sonra talamusa ulaştığı üç sinapslı indirekt yol (Gökmen, 2003; Leisman vd., 2013) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Kortikal-BG yolları. Tüm beyin keksi bölgeleri BG'a yansır, ancak BG'ın çıktısı frontal lob'a, özellikle premotor ve tamamlayıcı motor korteks bölgelerine doğru yönlendirilir (Leisman, 2013'den modifiye edilerek alınmıştır).

BG devresinde korteksten striatumdaki orta dikensi nöronlara (MSN), STN'dan GPe ve Gpi'ye, talamustan kortekse uzanan nöronlar glutamata, striatumdaki MSN'lar ise gama-aminobütirik asiti (GABA), yardımcı nörotransmitter olarak da substans P veya enkefalini kullanarak; "direkt" ve "indirekt" yolları organize ederler. SNpc'dan striatuma gelen dopaminerjik nöronlar striatumdaki MSN'ler üzerindeki etkilerini D1 ve D2 dopamin reseptörlerini uyararak gerçekleştirmektedirler. Bu birbirini tamamlayan yolların ortaya çıkardığı dopaminerjik stimülasyonun dinamik dengesi ise hareket miktarını düzenlemektedir (Yelnik, 2002; Galvan & Wichmann, 2009; Lewis & Barker, 2009). Daha açık ifade etmek gerekirse; SNpc'daki dopaminerjik nöronlardan salınan dopamin, direkt yolda MSN'larındaki D1 reseptörlerine bağlanarak Gpi'nin inhibisyonuna ve böylece motor korteksin aktivasyonuna neden olurken; indirekt yolda MSN'larının D2 reseptörlerine bağlanarak GPe'nin inhibisyonunun inhibisyonuna yol açarak korteks aktivitesini arttırmaktadır (Galvan & Wichmann, 2009; Lewis & Barker, 2009; Taner, 2011; Albin vd.,1989; Lanciego vd., 2012; Leisman vd., 2013) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** (a) Normal beyinde, striatumun paralel nöronal ağları. BG serebral korteksin, talamus ve pedunkulopontin çekirdeğinin (PPN) çeşitli bölgelerini birbirine bağlar ve birleştirir. (b) PH'nda, BG devrelerinin doğal dengesi, striatumdaki dopamin tükenmesi nedeniyle kaybedilir (motor halka) (Lewis & Barker, 2009'dan modifiye edilerek alınmıştır).

Böylece; direkt ve indirekt yollar, birbiri ile denge içerisinde çalışarak kas tonusunun ve motor hareketin düzenlenmesinde ve daha önceden öğrenilmiş otomatik hareketlerin gerçekleştirilmesinde önemli rol oynarlar. BG'lar motor hareketi başlatamaz; korteks merkezleri tarafından başlatılan ve yürütülen tüm hareketlerin amaca uygun olarak yapılmasını sağlarlar. Öğrenilmiş motor hareketlerin gerçekleştirilmesinde kortikal merkezlerin ve piramidal yolun yükünü azaltırlar (Gökmen, 2003).

BG motor halka dışında kognitif, limbik ve okulomotor halkalar aracılığıyla da fonksiyonlarını gösterirler. BG'lar kognitif halka aracılığıyla, daha önceden yapılacak motor hareketlerin önceden planlamasında rol oynarken; BG devresinin limbik halkası motivasyon, karar verme ve hedefe yönelik ödülün altında yatan davranışların düzenlenmesinden ve kontrolünden sorumludur. Limbik halka ayrıca, ruhsal durumları ve düşünceleri ifade eden mimik kaslarının hareketleri ve çeşitli jestlerin oluşumunda da görev almaktadır. Okulomotor halka ise BG'nin frontal görme merkezi ile yaptığı bağlantıdır ve bu halka; gözün takip hareketlerinin düzenlenmesine yardımcı olur (Gökmen, 2003; Lewis & Barker, 2009).

BG devrelerindeki nörotransmitterlerin metabolizmasındaki bozukluklarda veya bu nukleuslardaki lezyonlarda, direkt ve indirekt yollar arasındaki dengenin bozulması sonucu hipokinetik (bradikinezi ve akinezi) ya da hiperkinetik (atetoz, kore, ballizm) hareket bozuklukları, göz hareket bozuklukları ve bir takım bilişsel bozukluklar ortaya çıkar (Albin vd.,1989; Leisman vd., 2013; Wichmann & Dostrovsky, 2011).

En sık görülen BG hastalığı, PH'dır. PH, SNpc'dan striatuma uzanan dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu içeren kronik ve progresif bir hastalıktır. Bu hastalık sonucunda meydana gelen SN ve striatumdaki dopamin eksikliği gerek direkt gerekse indirekt yoldan GPi üzerindeki düzenleyici etkiyi bozarak korteksin motor aktivitesinde azalmaya ve ayrıca kognitif ve limbik fonksiyon kayıplarına neden olur (Bkz. Şekil 2.3-b) (Taner, 2011; Wichmann & Dostrovsky 2011; Rappold & Tieu, 2010).



## 2.2. Parkinson Hastalığı

Parkinson Hastalığı, ilk olarak 1817 yılında; günümüzden 200 yıl kadar önce, İngiliz cerrah James Parkinson tarafından *The London Medical and Physical Journal* dergisinde yayımlanan “Essay on the Shaking Palsy” başlıklı makalede “shaking palsy” (titrek felç) adı altında tanımlanmıştır (Parkinson, 1817). Bundan yaklaşık 50 yıl sonra Fransız bilim adamı Jean-Martin Charcot, bir grup önemli bilim insanı ile dünyada Alzheimer hastalığı (AH)’ndan sonra ikinci sırada yer alan nörodejeneratif bir bozukluk olan PH’nın, James Parkinson’un belirttiği klinik semptomlarına bir miktar eklemelerle katkıda bulunmuş ve hastalığın orijinal tanımını yaparak hastalığa onu ilk tarif eden kişi olan James Parkinson’un adını vermiştir (Charcot vd., 1872; Goetz, 2011; Przedborski, 2017). J.Parkinson’un PH’nın dönüm noktası olan yazısından ancak 100 yıl sonra 1913’de Frederich Lewy, PH’nın patolojik bulgularından olan daha sonraları “Lewy Cisimciği” olarak tanımlanan nöronal birikimleri tanımlamış (Lewy, 1913) ve SNpc’da dopamin içeren hücrelerde kayıp olduğu Tretiakoff ve arkadaşlarının 1919’daki çalışmalarında anlaşılmıştır (Trétiakoff,1919). 1957’de Carlsson ve arkadaşları, dopamin için fonksiyonel bir rolün ilk kanıtını bildiren bir dönüm noktası makale yayınlamış; bir dopamin öncüsü olan L-3,4 - dihidroksifenilalaninin (L-DOPA) hayvanlara uygulanmasının, dopamin seviyelerini arttırdığını ve reserpin (RES - bir monoamin boşaltıcısı) tarafından indüklenen motor aktivitedeki azalmaları tersine çevirdiğini belirtmişlerdir (Carlsson, Lindqvist & Magnusson, 1957). Bu bulgular o zamanlar pek çok kişi tarafından motor kontrolünde BG’da dopamin sinyalleşmesinde önemli rolün kanıtı olarak alınmıştır. İlk olarak, 1960’da Ehringer ve Horn Parkinson hastalarının striatumunda dopaminin eksildiğini bildirmişlerdir (Ehringer & Hornykiewicz, 1960; Przedborski, 2017).

### 2.2.1. Parkinson hastalığı’nın epidemiyolojisi

Parkinson Hastalığı, 65 yaş üstü popülasyonun %2-3’ünü etkileyen ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (Poewe vd., 2017). Hastalıkla ilgili yapılan prevalans çalışmaları; endüstrileşmiş ülkelerde PH prevalansının genel olarak tüm popülasyonun %0-3’ünü oluşturduğunu ve 60 yaşın üzerindeki kişilerin

yaklaşık %1'nin Parkinson hastası olduğunu göstermektedir. Rapor edilen standardize edilmiş yıllık PH insidans oranları 100.000'nde 8 - 18 arasındadır ve insidansın en önemli belirleyicisi yaştır. Bazı çalışmalarda, erkeklerde kadınlardan daha fazla PH görülme sıklığı bildirilmiş, diğer çalışmalarda erkeklerde ve kadınlarda PH sıklığında anlamlı bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır (de Lau & Breteler, 2006; Van Den Eeden vd., 2003).

Türkiye'de yapılan az sayıdaki prevalans çalışmalarından biri olan Eskişehir'de yapılan bir çalışmada prevalans değeri 111/100.000 (Torun, Uysal Gücüyener & Özdemir, 1995), Mersin bölgesinde yapılan başka bir çalışmada ise 310,4/100.000 olarak bulunmuştur (Doğu, 2010). Bu değerler gelişmiş ülkelerde bulunan prevalans değerleri ile benzerdir.

Mortalite, hastalığın başlamasından sonraki ilk on yılda artmaz, ancak daha sonra genel popülasyona kıyasla iki katına çıkar (Poewe vd., 2017). Yirmi yıllık bir çalışma; sağlık hizmetlerinde iyileşmenin, zamanla PH'nın prevalansının artmasına karşın daha uzun sağkalım sağladığını ortaya koymuştur (Lix, Hobson, Azimae, Leslie, Burchill, Hobson, 2010). Ayrıca, PH olan kişilerin sayısının 2005 ile 2030 arasında iki katına çıkması beklenmektedir. Bunlara bağlı olarak gelecekte, hastalıkla ilişkili kişisel, toplumsal ve ekonomik yükte ilerleyici bir artış meydana gelecektir (Poewe vd., 2017).

### ***2.2.2. Parkinson hastalığı'nın etiyolojisi ve tanımlanması***

Parkinson Hastalığı'nın oluşumu hastaların küçük bir kısmında genetik anomalilerle ilişkili iken, çoğu olgu idiyopatikdir. Birçok faktör SNpc nöron işlevini ve / veya yaşayabilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir, ancak PH'daki seçici dejenerasyonu açıklayacak kesin kanıt henüz bulunmamaktadır. Literatürdeki son görüşler, PH'daki nöronal dejenerasyonun birden fazla faktörün eş zamanlı etkileşiminden kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Olanow, 2007, Sulzer, 2007; Chung, 2010).

SNpc bölgesindeki dopaminerjik nöronların nörodejenerasyonu, PH'nın motor semptomlarının ortaya çıkmasından sorumlu primer patoloji olmasına

rağmen PH'daki patolojik hasardan beynin birçok bölgesi etkilenmektedir ve bu durum dopamin başta olmak üzere noradrenalin, serotonin, asetilkolin, GABA, glutamat ve nöropeptid gibi nörotransmitterlerin içeriklerinde de yaygın değişikliklere yol açmaktadır. Patolojik ve biyokimyasal özellikleri, PH'nın basit bir hastalık olmadığını ve beynin motor işlevleri ile doğrudan ilişkili olmayan pek çok kısmını da etkilediğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, patolojik değişiklikler dopaminerjik nöronlarda Lewy cisimciklerinin bulunması ile başlamaktadır (Akbostancı, 2008).

Diğer nörodejaneratif hastalıklar gibi PH için de yaşlılık önemli bir risk faktörüdür. Yaşlanma ile birlikte nöronal metabolik süreçlerde değişiklikler meydana gelir; OS'e karşı defans mekanizmaları bozulur ve enerji metabolizmasında yer alan proteinlerin gen ekspresyonunda değişiklikler oluşur (Lev vd., 2012). SN'daki dopaminerjik nöron sayısı yaşlanmaya bağlı olarak her on yılda %4.7' den %9.8'e kadar artan oranlarda azalmaktadır (Ma, Roytt, Collan, & Rinne, 1999). Bu nedenlerle daha çok yaşlı kesimde görülen PH, çeşitli araştırmalarca yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir. Hastalığın genç yaşta gelişimi daha nadir olduğundan 40 yaşından önce başlaması hastalığın genetik mutasyonlar neticesinde geliştiğini düşündürür (Wickremaratchi, Ben-Sholomo & Morris, 2009). Çoğu çalışmada erkek-kadın oranı yaklaşık 3:2 olarak tespit edilmiştir (Massano & Kailash, 2012; de Lau & Breteler, 2006).

PH'na yakalanma riski açısından yaş ve cinsiyet dışında etnik farklılıklar, ailesel yatkınlık genlerini içermek, çevresel risk faktörlerine farklı derecelerde maruz kalma, iş hayatında kullanılan toksik maddeler, kuyu suyu kullanımı ve kırsal alanlarda yaşama, tarım ilaçlarının kullanımı, beyin hasarı, sigara ve kafein kullanımı gibi faktörler de rol oynamaktadır (de Lau & Breteler, 2006; Schapira & Jenner, 2011).

Son yıllarda, Parkinson hastalarının mikrobiyotalarında değişiklikler olduğunu ya da bu değişikliklerin PH'na yol açtığını ileri süren çalışmalar giderek artmıştır. PH sırasında, enterik sinir sistemi (ENS) ve parasempatik sinirler  $\alpha$ -sinüklein patolojisinden en erken ve en sık etkilenen yapılar arasındadır. Yanı sıra, gastrointestinal disfonksiyon, özellikle kabızlık, PH'nda

motor dışı önemli bir semptomdur ve sıklıkla motor semptomların başlamasından yıllarca önce gelir. Son araştırmalar, bağırsak mikrobiyosunun, ENS ve vagal sinir de dahil olmak üzere çeşitli yolaklar aracılığıyla otonom sinir sistemi ve merkezi sinir sistemi (MSS) ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Scheperjans vd., 2015). Örneğin; Scheperjans ve arkadaşları intestinal mikrobiyomun PH'nda değiştiğini ve motor fenotip ile ilişkili olduğunu, Kezhavarsian ve arkadaşları da benzer şekilde PH hastalarının kolonik mikrobiyotasında meydana gelen değişikliğin (kolonal disbiyozisin), PH patolojisine yol açan nöroinflamasyon mekanizmasını ve  $\alpha$ -sinüklein yanlış katlanmasını tetikleyebileceğini öne sürmüşlerdir (Scheperjans vd., 2015; Kezhavarsian vd., 2015).

Epidemiyolojik veriler ayrıca L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları ve PH gelişme riski arasındaki bağlantıyı da desteklemektedir. PH'da nörodejeneratif değişiklikleri yönlendiren primer faktörün, özellikle oksidatif savunmaları veya proteostatik yeterliliği tehlikeye atan genetik veya çevresel faktörler karşısında, sürekli  $Ca^{2+}$  girişi tarafından oluşturulan metabolik stres olduğu hipotezini savunan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; Surmeir ve arkadaşları, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının, nigral dopaminerjik hücrelerin yaşlanmasında rol aldığını savunmuşlardır (Surmeier, Guzman & Sanchez-Padilla, 2010).

PH'nda klinik belirtilerin ortaya çıkması için dopaminerjik hücre kaybının %70-80 seviyelerine ulaşması ve striatal dopamin miktarının anlamlı oranda azalması gerekir (Miller & O'Callagan, 2015). Hastalığın karmaşıklığına, hastalığın en erken evrelerinde kesin bir teşhis koyulamaması ve ilerleyen aşamalarda semptomların yönetimindeki zorlukların yanı sıra klinik zorluklar da eşlik etmektedir. Dahası, nörodejeneratif süreci yavaşlatan hiçbir tedavi bulunmamaktadır. Tüm bu nedenler dolayısıyla PH'nın tanımlanması ve tedavisi ile ilgili araştırmalar günümüzde de yoğun şekilde devam etmektedir (Kalia & Lang, 2015; Miller & O'Callagan, 2015).

PH tanısını koydurabilecek kan ya da beyin omurilik sıvısı testi henüz bulunmamasına rağmen nörogörüntüleme teknikleri tanımlamaya yardımcı olmaktadır. Günümüzde PH tanısı hastalığın klinik belirtileri ortaya çıkmadan

önce konulamamaktadır ve bu konuda araştırmalar yoğun şekilde devam etmektedir. Koku duyusunun bozulması PH'nın en erken bulgularından biridir. Çok sayıda çalışma nörodejenerasyonun başlaması ve klinik belirtilerin ortaya çıkması arasında geçen sürenin çok uzun olmadığını düşündüren kanıtlar sağlamaktadır (Morrish, 1996; Miller & O'Callagan, 2015). Fearnley ve Less, 36 kontrol ve 20 Parkinson hastası üzerinde yaptıkları bir çalışmada nöron kaybı belirtilerinin ortaya çıkış süresinin beş yıl olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Fearnley & Less, 1991).

Gelb ve arkadaşlarına göre; PH'nın histopatolojik olarak doğrulanması için gerekli kriterler ise şöyledir:

- 1) SN'de yüksek oranda nöron kaybı ve eşlik eden gliozis
- 2) SN ve locus coeruleus'da en az bir tane Lewy cisimciği varlığı
- 3) Parkinsonizm oluşturan diğer hastalıklar açısından kanıt olmamasıdır (Gelb, Oliver & Gilman, 1999).

PH'nın tanımlanmasında ilgili beyin doku alanlarından yararlanılarak yapılan gen ekspresyon analizleri de yer almaktadır. Örneğin; Hauser ve arkadaşları PH'nın beyin dokularında kontrollere göre farklı 12 gen tespit etmişlerdir (Hauser, vd., 2005).

### ***2.2.3. Parkinson hastalığı'nda patolojik mekanizmalar***

Parkinson Hastalığı klasik olarak bradikinezi, rijidite, istirahat tremoru, postural refleks kaybı, fleksiyon postürü ve donma (motor blok) ile karakterize altı motor bulgunun kombinasyonu şeklinde ortaya çıkan bir sendromdur. Bu hastalarda, hareketin başlamasında gecikme ve yapılmasında yavaşlama ile karmaşık hareketlerin gerçekleştirilmesinde güçlük görülür. Fakat Parkinson hastalarının %28'inde non-motor olarak adlandırılan bilişsel ve nörodavranışsal bozukluklar ve bunlardaki dalgalanmaların motor belirtilerden daha çok özürlülüğe yol açtığı bulunmuştur. Bu bozukluklar; anksiyete, aşırı terleme, düşüncenin yavaşlaması, yorgunluk, akatizi, depresyon, demans, kelime bulma kusuru, çeşitli psikiyatrik belirtiler ve uyku bozuklukları olarak bildirilmiştir (Akboşancı, 2008; Taner, 2011; Kalia & Lang, 2015; Miller & O'Callagan, 2015).

PH'ında görülen en önemli patolojik bulgulardan biri Lewy patolojisidir. Lewy patolojisi,  $\alpha$ -sinüklein proteininin anormal agregatlarından meydana gelmektedir (Przedborski, 2017). Polymeropoulos ve arkadaşları 1997'de yaptıkları çalışma ile  $\alpha$ -sinüklein genindeki (SNCA) beş hatalı mutasyonu (A30P, E46K, H50Q, G51N ve A53T) saptayarak PH'nın ilk genetik nedenini belirlemişlerdir ve böylece PH'nın genetiği üzerine çalışmalar artarak devam etmiştir (Polymeropoulos vd.,1997).  $\alpha$ -sinüklein presinaptik proteininin Lewy cisimlerinde bol miktarda saptanması birçok araştırmacının  $\alpha$ -sinüklein aracılı nörotoksisitenin yanlış katlanma, oligomerler ve protofibriller oluşturma eğiliminden kaynaklandığını ileri sürmelerine neden olmuştur. Çünkü, sporadik Parkinson hastalarında SNCA mutasyonları bulunmamasına rağmen,  $\alpha$ -sinüklein proteini bu bireylerin Lewy cisimlerinde bulunmuştur (Przedborski, 2017).  $\alpha$ -sinüklein proteini özellikle ubiquitin-proteozom sistemi (UPS) ile ilişkilidir ve ayrıca hücre farklılaşmasının, sinaptik plastisitenin, hücre sağkalımının ve dopaminerjik nörotransmisyonun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir.  $\alpha$ -sinüklein proteinin agregasyonu UPS'nin inhibisyonuna neden olarak daha fazla  $\alpha$ -sinüklein agregasyonuna yol açar ve böylece dopaminerjik nöron, hatalı katlanmış farklı diğer proteinlerin etkilerine karşı duyarlı hale gelir (Lucking & Brice, 2000). Lewy cisimciklerinin oluşumu, akson içindeki nörofilamentlerin fonksiyonunu bozar ve böylece SNpc'dan striatuma uzanan aksonal bağlantı zarar görür. Ayrıca Lewy cisimciklerinin oluşumu yaşla artmaktadır (Kalia, 2015; Gibb & Lees 1988).

PH'daki genetik faktörlerin araştırılması sonucunda PH ile ilişkili olan ve PARK olarak adlandırılan, 18 gen lokusu ve patolojik mekanizma ile ilişkili olan 6 gen ürünü saptanmıştır. Gen ürünleri sırasıyla 4., 6. ve 1. kromozomlar üzerindeki  $\alpha$ -sinüklein (otozomal dominant) ve UCH-L1 (Ubiquitin karboksi terminal hidrolaz L1) (otozomal dominant) genleri, Parkin geni (otozomal resesif), DJ-1 geni (otozomal resesif) ve ayrıca 1,2,4,12. kromozomlar üzerinde yeri saptanan ancak henüz tam olarak tanımlanmayan gen ürünleridir (Alan, Guttmacher & Collins, 2003; Klein & Westenberger, 2012). PH ile ilişkili pek

çok gen tanımlanmış olmasına rağmen genetik nedenler vakaların çok az bir kısmını oluşturur.

Epidemiyolojik çalışmalarda, pestisitler, solventler, ağır metaller ve egzoz dumanları, genel anestezipler, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP), izokinolinler, beta karboniller, n-hekzan, karbon monoksit ve karbon disülfid gibi çevresel toksik maddelere maruz kalma ile ilişkili PH riskinde artış olduğu, bu bileşiklerin birçoğunun kullanılması ile hazırlanan Parkinson hayvan modellerinde gösterilmiştir (Goldman, 2014; Akbostancı, 2008). Tarım ilacı olarak kullanılan parakuat ve maneb türevleri ve rotenon, dieldrinin gibi toksik maddelere maruz kalınmasının ve kuyu suyu tüketiminin PH nöropatolojisini, özellikle genç başlangıçlı PH'nın görülme riskini arttırdığı bulunmuştur (Gatto vd., 2010; Chin-Chan, Navarro-Yepes & Quintanilla, 2015). Demir, kurşun ve mangenez gibi ağır metallere kronik maruz kalınmasının, metallerin SN'da birikmesine ve dolayısıyla OS üretiminde artışa neden olarak PH riskini arttırdığı öne sürülmüştür (Chin-Chan vd., 2015). Sigara kullanımı, alkol ve kafein tüketimi gibi yaşam tarzı ile ilgili bazı faktörlerin ise PH riskini %30'a kadar azaltma etkisi olduğu görülmüştür (Checkoway, Powers, Smith-Weller, Franklin, Longstreth, Swanson, 2002). Ayrıca aspirin ve non-steroidal ilaçların kullanımının da PH gelişme riskini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Akbostancı, 2008).

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki; dopaminerjik nöronların kaybına, esas olarak aktive edilmiş mikroglial hücreler ve bir dereceye kadar reaktif astrositlerden oluşan bir glial tepki de eşlik edebilir. Bu glial cevap, trofik faktörlerin kaynağı olabilir ve reaktif oksijen ürünlerine (ROS) ve glutamata karşı koruma sağlayabilir. Fakat bu yararlı etkilerin yanı sıra, glial cevap, reaktif türlerin ve pro-enflamatuar prostaglandin ve sitokinlerin üretimi ile ilgili çeşitli zararlı olaylara da aracılık edebilir (Vila vd., 2001).

Bütün bu bilgiler ışığında PH'nı başta yaş ve cinsiyetin etken rol aldığı, çevresel etmenlerin nörodejenerasyona yol açtığı genetik bileşeni olan, moleküler mekanizmaların patolojisi ile seyreden bir hastalık olarak kabul etmek en doğru yaklaşım olacaktır.

#### ***2.2.4. Parkinson hastalığı'ndaki nörodejenerasyonun nedenleri***

Parkinson Hastalığında nörodejenerasyona; mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, OS, aşırı NO üretimi, ubikuitin-proteozom yolağının bozulması sonucu proteinlerin hatalı katlanması ve agregasyonu, nöroinflamasyon, anormal glial hücre aktivasyonu, yetersiz nörotrofinler, yaşlılık, MPTP, rotenon, 6-OHDA gibi toksinler, apoptotik yolların aktivasyonu, glutamat ekzitotoksitesi ve kötü Ca<sup>2+</sup> homeostasisi, hücre içi demir miktarının artması, çevresel ve genetik faktörler ve bunlarla ilişkili nöronal hücre disfonksiyonu neden olarak görülmektedir (Takada, Numata & Mori, 2013; Akbostancı, 2008; Sarkar, Raymick, & Imam, 2016; Yacoubian & Standaert, 2009).





**Tablo 2.1.** Parkinson hastalığı patogenezinin mekanizması ve olası hedef terapiler (Sarkar, Raymick & Imam, 2016'dan modifiye edilerek alınmıştır).

PH Patojenik Mekanizma	Nöroproteksiyon için Hedefler
<b>OS ve mitokondriyal disfonksiyon</b>	Dopamin metabolizma inhibitörleri (ör; MAO inhibitörleri, dopamin reseptör agonistleri)
	Elektron transport artırıcılar (ör; CoQ10)
	Diğer oksidantlar (ör; Vitamin-E, Ürik asit)
	Glutasyon düzenleyiciler (ör; selenyum)
	$\alpha$ -sinüklein agregasyon inhibitörleri
	$\alpha$ -sinüklein protein düzeyini azaltan terapötik ajanlar
<b>Protein agregasyonu ve hatalı katlanmalar</b>	Parkin fonksiyon artırıcılar
	UCH-L1 fonksiyon artırıcılar
	Proteozomal veya lizozomal yolak artırıcılar
<b>Nöroinflamasyon</b>	Anti-inflamatuar ajanlar (ör; NSAID, statinler, minosiklin)
	NMDA reseptör antagonistleri, $Ca^{2+}$ kanal antagonistleri
<b>Eksitotoksisite</b>	Anti-apoptotik ajanlar
<b>Apoptozis ve hücre ölüm yolları</b>	
<b>Tropik faktörlerin kaybı</b>	Nörotropik faktörler (ör; GDNF, nöroturin)

PH'na neden olan yukarıda saydığımız nörodejenaratif proseslerin başlıcaları;

**1. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres:** Mitokondriler, oksidatif fosforilasyon süreci yoluyla adenozin trifosfat (ATP) şeklinde enerji üreten,  $Ca^{2+}$  metabolizması ve hücre ölümünün düzenlenmesine katkı sağlayan, hücrel reaksiyonların merkezi olan organellerdir. Mitokondri iç zarında yer alan elektron transport zincirinin reaktif yapısı nedeniyle bu organellerde önemli miktarda ROS üretilmektedir (Moon & Paek, 2015). ATP üretiminde bir azalmaya yol açan mitokondriyal disfonksiyon; UPS'nin engellenmesi,  $K_{ATP}$

kanallarının aktivasyonu ve  $Ca^{2+}$  taşıyıcılarının inhibisyonu gibi çoklu hücrel sistemleri etkiler. Ayrıca, hasarlı mitokondri, ROS üretimini artırabilir ve hücre  $Ca^{2+}$  tamponlama kapasitesini kaybedebilir. Tersine, ROS, mitokondriye doğrudan zarar verebilir.

PH'nın hayvan modellerini oluşturmak için ve PH patolojisinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun olası rolünü açıklayabilmek için kullanılan, mitokondriyal solunum zincirinde kompleks I'in inhibisyonu ile etki eden MPTP ve rotenon gibi toksinler; mitokondriyal disfonksiyon yoluyla SNpc nöronlarının hasarına neden olarak PH'nın başlıca oluşum mekanizmalarından birini oluşturmaktadır (Moon & Paek, 2015; Yacoubian & Standaert, 2009). Kompleks I'in inhibisyonu; ATP miktarında azalmaya, hücre bileşenlerinin zarar görmesine, apoptotik hücre ölümüne neden olan serbest radikal oluşumuna, OS'e, eksitotoksositeye ve böylece nörodejenerasyona neden olur (Moon & Paek, 2015; Hu & Wang, 2016; Akbostancı, 2008). Bunların yanısıra; SN dopaminerjik nöronlarının mitokondriyal DNA (mtDNA) delesyonlarına karşı hassas olduğunu ve mtDNA hasarının Parkinson patogeneğinde rol aldığını gösteren kanıtlar da vardır. Ailevi PH ile ilgili yapılan yeni çalışmalar, etkilenmiş gen ürünlerinin, mitokondriyal proteinlerle etkileşim içinde olduğunu göstermektedir. Ayrıca zarar görmüş mitokondriyi temizlemenin tek yolu olan, mitokondrinin otofaji ile seçici bir şekilde ayrışmasını sağlayan ve hücrel bir süreç olan mitofajinin indüklenmesinin PH'nda yararlı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Hu & Wang, 2016).

OS, reaktif türlerinin aşırı üretilmesine veya normalde birikimlerini sınırlayan hücre tamponlama mekanizmalarının yetersizliğine bağlı olarak gelişir. Aşırı reaktif türler, hücrel makromoleküllerle reaksiyona girerek normal fonksiyonlarını bozabilir ve toksik moleküllerin oluşumuna neden olurlar (Yacoubian & Standaert, 2009; Davies, 2000). PH'ndan etkilenen beyinlerin postmortem çalışmaları, oksidatif hasarlı deoksiribo nükleik asit (DNA), protein ve lipitlerin daha yüksek seviyelerde olduğunu göstermiştir (Zhang vd., 1999). Bu nedenle OS'in PH'da, hem hastalık sürecinin

başlatılmasında hem de ikincil hasar mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Chung, 2010).

Dopaminerjik nöronların uzun, miyelinsiz aksonlara ve çok sayıda sinaptik bağlantıya sahip olmaları, enerji kullanımı gerektiren ER ve mitokondriyal  $Ca^{2+}$  kanallarını çok fazla kullanmaları ve bu nedenle intrasellüleler  $Ca^{2+}$  seviyelerinin sürekli değişimi, artan dopamin ve diğer metabolitlerin birikiminin mitokondriyal disfonksiyon ve OS'e yol açması; bu hücrelerin dejenerasyonuna neden olan başlıca nedenleri oluşturmaktadır (Poewe vd., 2017; Blesa, Damas, Quriga-Varela & Lewis, 2015).

PH ile ilişkili DJ-1, PINK-1, SCNA, Parkin gibi genlerde genetik mutasyonlar ya da bu proteinlerin değişmiş ekspresyonları kaynaklı OS artışı, beraberinde çeşitli hücresel işlevsel bozukluklar, mitokondriyal bozulma, UPS'nin bozulması dolayısıyla proteinlerin yanlış katlanması ve anormal proteinlerin üretimi ve birikimi gibi sonuçlar doğurur. Örneğin;  $\alpha$ -sinüklein modifiye olur ve dopaminerjik nöronlarda birikir ve nörodejenerasyon nedenlerinden birini oluşturur (Blesa vd., 2015). Ayrıca dopamin metabolizması, kinonların, peroksitlerin ve diğer ROS'nin üretilmesi yoluyla OS'i arttırır (Yacoubian & Standaert, 2009). Bunların dışında, OS aracılı nöroinflamatuvar mekanizmalar, hücre ölümüne yol açan sonuçların artmasına katkıda bulunabilir. Özetle, OS'e atfedilen bu hücresel mekanizmalar, dopaminerjik nöronların seçici dejenerasyonuna ve dolayısıyla PH'na yol açmaktadır (Blesa vd., 2015).

ROS çeşitli farklı yollarla oluşur. Bunlar Fenton / Haber-Weiss gibi reaksiyonlarla, redoks-aktif metaller ile oksijen türleri arasındaki doğrudan etkileşim veya fosfolipazların, nitrik oksit sentaz (NOS) ve ksantin oksidazın aktivasyonunu içeren dolaylı yollardır. Moleküler oksijenin indirgenmesiyle süperoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri meydana gelir. Aynı zamanda Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla süperoksit anyon radikallerinden de üretilen hidroksil radikalleri oldukça toksik bir formdur. PH olan kişilerin SNpr'lerinde hidroksil radikali oluşum yolları daha fazladır. Üstelik süperoksit anyon radikalleri NO ile reaksiyona girerek

eksitoksisiteyi düzenleyen ve oksidatif DNA hasarını ve lipid oksidasyonunu indükleyen yüksek oranda reaktif peroksinitrit meydana getirirler (Takada vd., 2013; Levy, Malagelada & Greene, 2009).

NO gaz formunda bir serbest radikaldır ve nöronlarda önemli bir biyolojik haberci olup, NOS tarafından üretilir. Reaktif nitrojen ürünleri olarak bilinen NO ve peroksinitrit oksidatif hasar yoluyla DNA parçalanmasını artırabilir ve tirozin nitrasyonu yoluyla da protein fosforilasyonunu engelleyebilir. Böylece tirozin kinazların aracılık ettiği sinyal iletimini bozabilir (Takada vd., 2013; Levy, Malagelada & Greene, 2009). PH'nda dopaminerjik nöronlarda ve glial hücrelerde indüklenebilir-NOS aktivasyonuna, SN'da peroksinitrit oluşumuna, proteinleri nitratif hasara uğradığına ve Lewy cisimciklerinde nitrantlanmış  $\alpha$ -sinüklein varlığına dair kanıtlar vardır (Akbostancı, 2008).

PH patolojisinde OS aracılı mitokondriyal disfonksiyona neden olan ve Parkinson modeli oluşturmada kullanılan nörotoksinlerden biri de 6-OHDA'dır. 6-OHDA, SN'nın dopaminerjik nöronları gibi katekolaminerjik nöronlara seçici hasar sağlayan, dopamin taşıyıcı tarafından hücre içine alınarak biriken, yüksek derecede oksitlenebilir bir dopamin analogudur. Ungerstedt, 1968'de 6-OHDA'nın intraserebral stereotaktik enjeksiyonunun, nigrostriatal yolun dejenerasyonuna neden olduğunu göstermiştir (Ungerstedt, 1968). Biz de çalışmamızda 6-OHDA'nın tek taraflı stereotaktik enjeksiyonu ile, PH'da gözlenen nigrostriatal hasarı stimüle ederek SN'nın dopaminerjik nöronlarının progresif kaybını sağladık.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, 6-OHDA'nın sitotoksik etkisini açıklamak için 3 mekanizma önerilmiştir: 1) Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikallerinin üretimini destekleyen 6-OHDA'nın, bu ürünlerin hücre içi veya hücre dışı oto-oksidasyonuna neden olması 2) Monoamin oksidaz enzimi aracılı olarak hidrojen peroksit oluşumuna ve dolayısıyla lipid peroksidasyonuna neden olması 3) Mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I'in doğrudan inhibisyonu yoluyla apoptotik süreci indüklemesi. Bu mekanizmalar bağımsız olarak veya ROS oluşturmak için kombinasyon halinde hareket edebilirler. Sonuçta ortaya çıkan OS sitoplazmik serbest  $Ca^{2+}$  artışıyla (glutamat

eksitotoksitesine ya da mitokondriyal membran geçirgenliği değişimine neden olarak) hücre ölümünü indükleyebilir (Hernandez-Baltazar, Zavala-Flores, Villanueva-Olivo, 2017; Blum vd.,2001; Halliwell, 2006).

**2. Ubikitin-Proteozom sisteminin bozulması:** Fizyolojik olarak çalışan hücrelerde bile, mutasyona uğramış genlerden kopyalanan proteinler, yanlış katlanmış ya da denatüre olmuş proteinler ve OS tarafından zarar gören proteinler gibi düşük seviyelerde "anormal" proteinler mevcuttur. Bununla birlikte, bu proteinlerin degradasyonu için UPS gibi hücrenel mekanizmalar bulunmaktadır (Chung, 2010). UPS, öncelikle yıkıma gidecek hatalı hedef proteinleri, E1, E2 ve E3 ligazlar olarak adlandırılan bir dizi enzimle, poliubikuitin zinciri ilavesi yaparak etiketler. Daha sonra bu etiketi almış hatalı proteinler sistem tarafından tanınır ve degradasyona uğratarak ortadan kaldırılır. Bu sistemdeki herhangi bir fonksiyon bozukluğu ise bu proteinlerin uzaklaştırılmamasına ve sonuçta oluşan hasar hücrenin ölümüne neden olur (Zheng vd., 2016).

UPS sisteminin bozulmasının dopaminerjik nöronlarda nörodejenerasyona yol açtığına ve böylece PH'nın patogeneze katkıda bulunduğuna yönelik kanıtlar vardır. Bu kanıtlar sporadik PH'da oksitlenmiş ve nitratlanmış proteinlerin ve ailevi PH'da UPS'nin bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan parkin ve UCHL-1 gibi mutant ve hatalı katlanmış proteinlerin,  $\alpha$ -sinuklein genindeki bir hasar sonucu oluşan Lewy cisimciklerinin içinde çok sayıda yabancı tip ve radikaller tarafından bozulmuş proteinlerin ve eklerinin varlığının keşfedilmesi sonucu ortaya çıkmıştır (Levy, Malagelada & Greene, 2009; Akbostancı, 2008). Post mortem beyin dokularında SNpc'da proteazom aktivitesinde seçici olarak %40'lık bir azalmanın var olduğu gösterilmiştir. Bu azalmanın bir nedeninin normal yaşlanma süreci olduğunu, bu durumun özellikle SN nöronlarını etkilediğini gösteren kanıtlar da vardır (Zheng vd., 2016). UPS'nin sentetik ve doğal inhibitörlerinin 2 hafta boyunca kemirgenlere uygulanması, bradikinezi, rijidite ve titreme belirtileriyle birlikte seçici nigral hücre kaybına ve Lewy cisimlerinin üretimine neden olduğu gösterilmiştir (McNaught, Perl, Brownell, & Olanow, 2004). Sonuçta UPS sisteminin PH'nın

oluşumundaki etkisini daha net anlayabilmek için daha çok kanıtı ihtiyaç vardır. Fakat şu açıktır ki UPS'nin bozulmasını engelleyici bir mekanizma Lewy cisimlerini ve  $\alpha$ -sinüklein toksisitesini azaltacağı için PH için yararlı olacaktır (Gandhi & Wood, 2005).

**3. Nöroinflamasyon ve reaktif gliozis:** Nöroinflamasyon, temel olarak beyinde yer alan glial hücrelerin kronik olarak (astrozitler ve mikroglia) aktivasyonundan kaynaklanır ve reaktif gliozis olarak adlandırılan bu durum PH patolojisinin erken evresinde ortaya çıkar. Çeşitli çalışmalar göstermektedir ki; MPTP, 6-OHDA, Rotenon gibi kimyasalarla indüklenen PH modellerinin tümü beyinde nöroinflamasyon ve astroglial aktivasyon üretmektedir. Mikroglial aşırı aktivasyona bağlı olarak, nigrostriatal yol dejenerasyonuna sahip postmortem beyin dokularının analizlerinde tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa), interlökin 1-beta ve interlökin-6 başta olmak üzere birkaç sitokin seviyesinin ayrıca ROS ve RNS gibi reaktif ürünlerin seviyelerinin SN bölgesinde önemli derecede yükseldiği gösterilmiştir (Niranjan, 2014). Mikrogliazisın yanı sıra aktif astroglialar da, PH'na neden olan toksik inflamatuvar mediatörler ve oksidatif ürünler oluşturarak nörodejenerasyona katkı sağlamaktadır. Astrozitler, mikroglialarla birlikte nöronlara zararlı sitokinler ve kemokinler salgırlar. Çalışmalar göstermektedir ki; astrozitlerin, hem nöroprotektif hem de nörodejeneratif rolleri, büyük ölçüde astrozitlerin, nöronlarla paylaştığı mikro-ortam olan hücre dışı boşluğa saldıkları ve hücre dışı ortamdan uzaklaştırdıkları moleküllere ve iyonlara bağlı olarak değişmektedir. Örneğin astrozitler, sinir büyüme faktörü, nörotrofin-3 ve fibroblast büyüme faktörü gibi nörotrofik faktörlerin yanı sıra laktat ve glutatyon (GSH) gibi metabolik substratları serbest bırakarak ya da tedarik ederek ayrıca hücre dışında artışı eksitotoksik etki oluşturan glutamat, potasyum ( $K^+$ ) ve  $Ca^{2+}$  gibi ajanları uzaklaştırarak nöronların nöroproteksiyonuna katkı sağlayabilmektedir. Mevcut kanıtlar; astrozitlerin nöromodulatör rollerini ortaya koyarak, astrozitlerin dopaminerjik nöronların yaşamlarını ve işlevlerini değiştirebildikleri fikrini desteklemektedir. PH tedavisi için astrozitleri hedef alan terapötik stratejilerin bu nedenle

değerlendirilmesi gerekmektedir (Rappold & Tieu, 2010). Biz de bu nedenlerle oluşturduğumuz PH modelinde CA'ün indüklediği astrosit TRPA1 kanalının aktivasyonundaki değişimin nasıl bir katkı sağladığını gösterebilmeyi amaçladık.

**4. Glutamat eksitotoksitesi:** 1957 yılında Lucas ve Newhouse, ilk olarak monosodyum glutamatın fare retina hücrelerine olan nörotoksik etkisini tarif etmiş ve bundan yirmi yıl sonra, retinal sinir hücrelerinde meydana gelen bu nörotoksik olay John Olney (1978) tarafından eksitotoksite olarak adlandırılmıştır (Doble, 1999). Eksitotoksitenin sadece inme, travmatik beyin hasarı (TBH) ve epilepsi gibi nörolojik bozukluklarla değil, AH, PH, Hunginton hastalığı ve Amiyotrofik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif bozukluklarla da ilişkilendirilen; glutamat ve reseptörleri ile yönlendirilen bir mekanizma olduğu hem in vitro hem de in vivo deneysel çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Takada vd., 2013; Doble, 1999).

PH'da meydana gelen dopamin salınımının azalması, BG'ın işleyişinde karmaşık bir dizi değişikliklere neden olmaktadır. En belirgin olarak, striatuma gönderilen dopaminerjik mesajdaki azalma, STN'un aşırı aktifleşmesi ile sonuçlanır. Böylece dopamin homeostazını korumak için SNpc'da yer alan iyonotropik glutamat reseptörleri olan N-metil-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol propiyonik asit (AMPA) ve kainat reseptörlerinin yanı sıra metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR1 ve mGluR2/3) açısından zengin olan dopaminerjik hücre gövdelerine glutamat salınımında bir artış meydana gelir (Caudle & Zang, 2009). Bu reseptörlerin aşırı stimülasyonu; voltaj aracılı  $Ca^{2+}$  kanallarını aktive ederek hücre dışı  $Ca^{2+}$ 'un hücre zarından hücre içine akışına yol açmakta, ayrıca diğer katyonların hücre içine göçüne neden olmaktadır. Ek olarak, hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının serbest bırakılması da hücre içi  $Ca^{2+}$  artışına katkıda bulunur ve böylece intrasellüler  $Ca^{2+}$  miktarının artışı glutamat aracılı eksitotoksiteyi oluşturur (Takada vd., 2013). Eksitotoksitenin, glutamatın sinaptik aralıktan uzaklaştırılmasındaki bir azalmanın sonucu olarak oluşması da mümkündür. Sonuçta glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması büyük hacimde  $Ca^{2+}$ 'un sitozole akışına,  $Ca^{2+}$

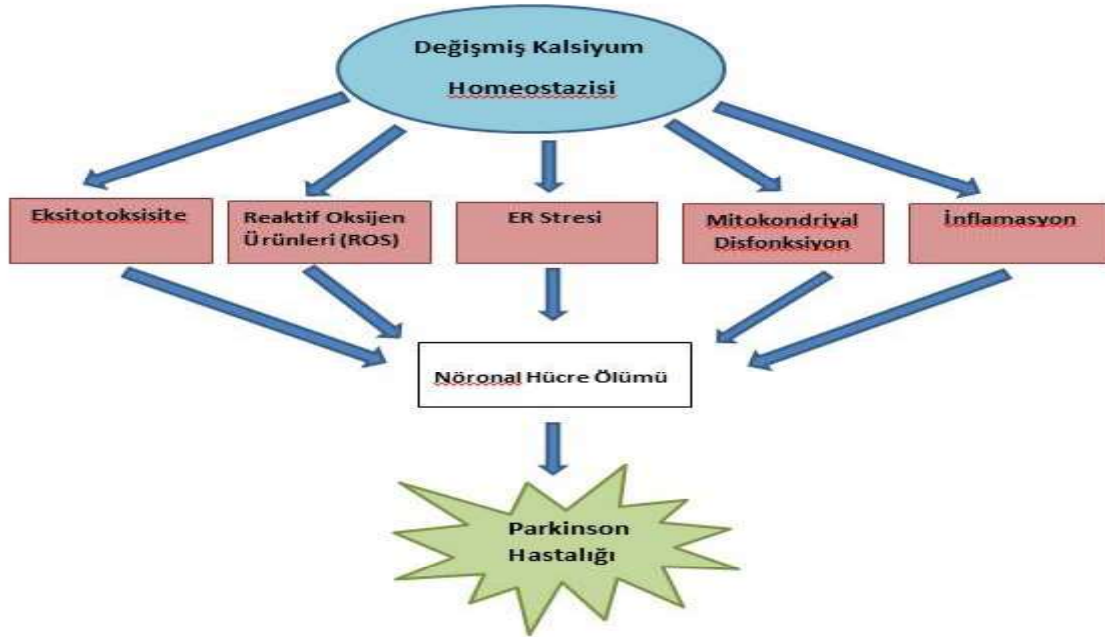
regülatuar mekanizmaların kapasitelerinin aşılmasına ve sonuçta mitokondriyal disfonksiyon, aşırı ROS üretimi ve çeşitli enzimlerin uygun olmayan aktivasyonlarına neden olarak apoptotik kaskatın indüklenmesine neden olur (Orrenius, Zhivotovsky & Nicotera, 2003; Caudle & Zang, 2009). Böylece, zaten tehlikeye atılmış bir dopaminerjik hücre popülasyonu üzerine salınan glutamatın sürekli artışı, eksitotoksik bir kaskadı ortaya çıkararak PH'na yol açan nörodejenerasyonu güçlendirebilir (Caudle & Zang, 2009). Meredith ve arkadaşları ise glutamat eksitotoksitesinin, hem otofaji hem de apoptozla bağlantılı olduğunu keşfetmişlerdir (Meredith, Totterdell, Beales & Meshul, 2009).

PH'nın patofizyolojisi ve patogenezinde glutamaterjik yolların bu kadar önemli bir rolü olduğu gerçeği, glutamaterjik devrelerin terapötik müdahale potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten de, PH'nın fare ve insan olmayan primat modellerinden elde edilen kanıtlar, belirli NMDA ve AMPA reseptör antagonistlerinin, parkinson semptomlarının çoğunu hafiflettiğini göstermiştir. mGluR 2/3 reseptör antagonistleri ile yapılan tedaviyle farelerde MPTP ile indüklenmiş dopaminerjik nörodejenerasyonun azaldığı da gösterilmiştir (Johnson, Conn & Niswender, 2009).

**5. Kalsiyum dishomeostazisi:**  $Ca^{2+}$ , nöronlarda kritik bir öneme sahip regülatör bir iyonudur. Nöronlarda; transkripsiyon ve gen regülasyonu, hücre büyümesi ve farklılaşması, motilite ve aksonal gelişim, sinyalizasyon kaskadı, sinaptik vezikül salınımı ve sinaptik plastisite gibi olaylarda rol oynar (Sukumaran, Sun, Schaar, Selvaraj & Singh, 2017). Buna karşı, intrasellüler kalsiyumun ( $[Ca^{2+}]_i$ ) uzamış ve kontrolsüz artışı mitokondriyal disfonksiyon, OS, ER disfonksiyonu, lizozomal otofajik etkileşim, golgi aparatı fonksiyonunun bozulması ve  $Ca^{2+}$  bağımlı enzimler üzerinden düzensiz sinyalleşmeler dahil olmak üzere birçok potansiyel yoldan hücre ölümüne yol açabilmektedir. Ayrıca glutamatın aşırı salınımı sonucu sürekli uyarılan NMDA reseptörleri aracılığıyla oluşan glutamat eksitotoksitesi de  $Ca^{2+}$ 'un nörotoksik etkilerine neden olabilmektedir (Levy vd., 2009). Bu sebeplerle nöronlar,  $[Ca^{2+}]_i$  seviyelerini,  $Ca^{2+}$  kanallarını ve pompalarını düzenlemek için çok sayıda



mekanizma geliştirmiştir ve böylece  $Ca^{2+}$  homeostazı, nöronal hücrelerde sıkı bir şekilde korunmaktadır. Çünkü,  $Ca^{2+}$  homeostazının nöronal hücrelerde bozulması, azalmış nöronal fonksiyonlara neden olarak Parkinson, Huntington ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna yol açmaktadır (Sukumaran vd., 2017). Tipik bir nörondaki istirahat  $[Ca^{2+}]_i$  düzeyi nanomolar aralıkta muhafaza edilirken, hücre dışı  $Ca^{2+}$  ise milimolar aralıktadır. '  $Ca^{2+}$  dis-homeostaz hipotezi'  $[Ca^{2+}]_i$ 'un hassas kontrolünün, yaşlanan beyinlerde ve nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen kişilerde zamanla kademeli olarak kaybolduğunu öne sürmektedir (Surmeier, 2007; Chan, Gertler & Surmeier, 2009; Chung, 2010). Bu nedenle  $Ca^{2+}$  homeostaz bozukluğunun düzeltilmesinin nörodejeneratif hastalıkların iyileştirilmesi için uygun bir strateji olabileceği düşünülmektedir (Takada vd., 2013) (Şekil 2.4.).



**Şekil 2.4.** PH'na yol açan mekanizmalar. ER stresi, ROS, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, eksitotoksisite ve inflamasyon gibi çeşitli mekanizma(lar) ile PH'na neden olan nöronal hücrelerde  $Ca^{2+}$  homeostazını değiştiren şematik model (Sukumaran vd., 2017'den modifiye edilerek alınmıştır).

PH'da mitokondrinin  $Ca^{2+}$  tamponlama kapasitesinin uygun yaştaki kontrollere kıyasla azaldığı belirtilmiştir (Sheehan ve ark. 1997). Bunun yanısıra PH ve PH modellerinde hücre ölümüne karşı daha dirençli olan nigral

dopaminerjik nöronların, bir  $Ca^{2+}$  bağlayıcı protein olan kalbindin D28k'yi eksprese ettikleri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Yamada ve diğerleri, 1990; German ve diğerleri, 1992; Damier ve ark., 1999; Chung, 2010). Mitokondriyal disfonksiyonun belirgin olduğu PH'nda, nöronal voltaj kapılı  $Ca^{2+}$  kanalları (CaV), SNpc hücrelerini  $Ca^{2+}$  kaynaklı eksitotoksisiteye daha duyarlı hale getirebilir (Chan ve diğerleri, 2009; Hurley & Dexter, 2012). L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının PH benzeri patolojideki önemini test etmek için Parkinson modeli oluşturulmuş farelerin ortabeyin bölgeleri, bir L-tipi  $Ca^{2+}$  kanal bloke edicisi olan Isradipine ile ön işleme tabi tutulduğunda  $Ca^{2+}$  girişinin engellenmesinin nöronal koruma sağladığı gözlemlenmiştir (Chan, 2007).

Sonuç olarak; kümülatif çalışmalar,  $[Ca^{2+}]_i$ 'un hem aşırı yükselmesinin hem de zayıflamasının, farklı mekanizmalarla da olsa nöronal dejenerasyona yol açabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, nöronal hücrelerde  $Ca^{2+}$ 'un farklı etkilerinin sadece hücresel konsantrasyonuna değil,  $Ca^{2+}$  girişini modüle eden iyon kanallarına da bağlı olabileceğini düşündürmektedir (Sukumaran vd., 2017).

Birçok hücre tipinde plazma membranı boyunca  $Ca^{2+}$  akışı voltaj bağımlı, ligand-girişli, reseptör-kontrollü ve depo-kontrollü  $Ca^{2+}$  kanalları aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca TRP kanal ailesinin çeşitli üyeleri depo-kontrollü ve reseptör-kontrollü  $Ca^{2+}$  geçişi ile ilişkilendirilmiş,  $Ca^{2+}$  regülasyonunda önemli rol oynayan, memeli hücrelerinde geniş miktarda eksprese edilen seçici-olmayan diğer katyon kanallarıdır ve çeşitli hücresel fonksiyonlarda rol oynamaktadırlar (Takada vd., 2013).

TRP kanallarının aktivasyon ya da inhibisyonuna neden olan pek çok endojen ve eksojen kimyasal molekül bulunmaktadır. CA eksojen TRP kanal modülatörlerinden biri olarak termo-TRP kanallarından TRPV3 ve TRPA1'i aktive ederken, non-termo TRP kanallarından olan TRPL (memelilerde eksprese edilmez), TRPC ve TRPM7 kanallarının inhibitörü olarak etki göstermektedir (Parnasa vd., 2009). TRP kanallarının aktivitesinin modülasyonu hücrelerin  $[Ca^{2+}]_i$ 'un seviyesinin değişimine neden olmaktadır. Eğer bu modülasyon  $Ca^{2+}$  dishomeostazisine yol açarsa; nörodejenerasyon da

dahil olmak üzere bir dizi bozukluğun başlaması ve ilerlemesiyle ilgili süreçler tetiklenmektedir (Takada vd., 2013). Biz de bu nedenlere bağlı olarak çalışmamızda; TRPA1 ve TRPC1 kanallarının CA aracılı modülasyonunu sağlayarak deneysel Parkinson modelinde CA'ün olası yararlı terapötik etkisini gösterebilmeyi amaçladık.

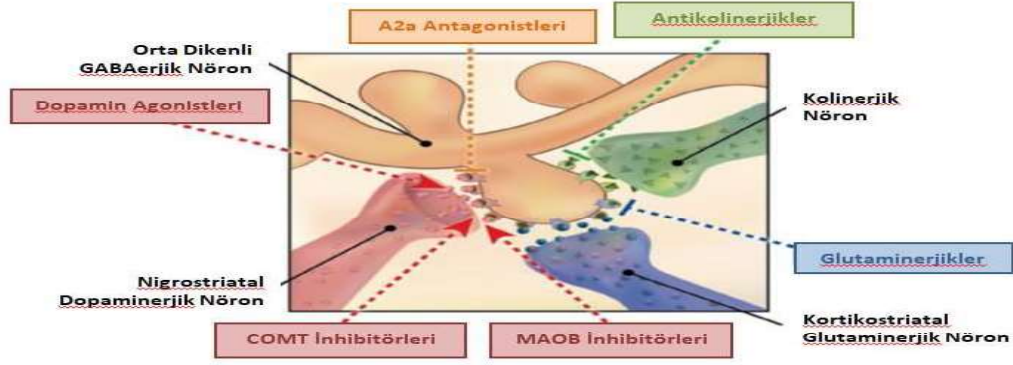
### ***2.2.5. Parkinson hastalığı'nda tedavi yaklaşımları:***

Nörodejeneratif hastalıklar yaşlılarda önde gelen ölüm nedenidir ve Dünya Sağlık Örgütü, 2040 yılında dünya nüfusunun artışına bağlı olarak, nörodejeneratif hastalıkların kardiyovasküler hastalık sonrası ikinci genel ölüm nedeni olacağını öngörmektedir (Dua, 2004). Bu nedenle, bu bozukluklar için etkili tedaviler geliştirmek, araştırma ve farmasötik alanlarında önemli bir önceliktir (Valera & Masliah, 2016).

Günümüzde PH tedavisi için onaylanmış tüm tedaviler, ilişkili motor bozuklukları iyileştirmek için striatal dopamin düzeylerini artırmayı amaçlamaktadır. Ne yazık ki, bu yaklaşımlar uzun süreli bir çözümü temsil etmemektedir; çünkü her biri zaman içinde dopaminerjik nörodejenerasyon ilerledikçe etkilerini kaybetmektedirler (Ellis & Fell, 2017).

Son yarım yüzyılda PH tedavisinde çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir, ancak L-DOPA PH semptomlarını kontrol etmek için en etkili ilaç olmaya devam etmektedir (Jankovic 2008a). Tıbbi tedaviye başlamadan önce, doğru bir PH tanısı konulmalı ve bozulma seviyesi (motor, duyuşsal, otonomik ve zihinsel) belirlenmelidir. Her hastanın tedavisi bireyselleştirilmeli ve hastaya uygun hale getirilmelidir.

Aşağıdaki şekil, PH'nın semptomatik tedavisinde dopamin seviyelerini modüle etmek için halihazırda kullanılan tedavi mekanizmalarını temsil etmektedir (Ellis & Fell, 2017) (Şekil 2.5.).



**Şekil 2.5.** PH için önerilen çeşitli tedavi yöntemlerinin şeması (Ellis & Fell, 2017' den modifiye edilerek alınmıştır).

PH tedavisinde konvansiyonel tedavilerin yanı sıra semptomatik ve onarıcı olarak iki gruba ayrılan yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir. Semptomatik tedavi yaklaşımları; genellikle L-DOPA kullanımının sebep olduğu diskinezi ve motor dalgalanmaları düzeltmeye yönelik olarak; derin beyin stimülasyonu, subkütan apomorfin, karbidopa/L-DOPA intestinal jel, the Accordion Pill® (karbidopa/L-DOPA gibi ilaçların biyolojik olarak parçalanabilen polimerik film formunda verildiği; bir ilaç uygulama şeklidir) uzatılmış salımlı amantadin, adenozin reseptör antagonistleri, metabotropik glutamat reseptör antagonistleri ve gen tedavisi uygulamalarını içermekte iken, onarıcı yaklaşımlar; dopamin agonistleri, katekol-O-metiltransferaz inhibitörleri, monoamin oksidaz tip B inhibitörleri gibi ilaçların kullanımını ayrıca nörotrofik faktörler ve hücre transplantasyonu gibi henüz başlangıç aşamasında olan yöntemlerin kullanımını içermektedir (Yiğit & Arıcıoğlu, 2015; Jankovic & Aguilar, 2008).

Vurgulanması gereken ana nokta; PH patogenezinin, belirli bir yolun işlevsizliğinin bir sonucu değil, patojeniteye katkıda bulunan birbirine bağlı olayların bir birleşimi olduğudur (Lim & Zhang, 2013; Sarkar vd.,2016). PH genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkılarıyla karmaşık bir etiyolojiye sahiptir. Hastalıktan etkilenen hastalar hem motor hem de motor olmayan semptomlar gösterir ve L-DOPA ve diğer dopamin agonistleri kullanılarak dopamin replasmanına yönelik mevcut tedaviler esas olarak eskiye yöneliktir. Her ne kadar L-DOPA, 1960'lı yılların başlarında PH tedavisinde bir devrim

olsa da, PH ile ilişkili motor dışı semptomları hafifletmemektedir (Sarkar vd.,2016). Bununla birlikte nörodejeneratif süreci veya PH'nın yavaş ilerlemesini etkili bir şekilde hedefleyen hiçbir ilaç veya tedavi mevcut değildir; fakat bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. Bu araştırmalar, nöroprotektif ajanlar tasarlanmasının ve uyarılmasının mümkün olabileceğini ümit etmektedir. Hücre dejenerasyonu ile etkin bir şekilde mücadele etmek ve PH'da nöronal fonksiyonları geri kazanmak tek bir tedavi yöntemi ile değil, kombine bir tedavi ile mümkündür (Lindholm vd., 2016). Bu nedenlerle, kaudat nükleus ve putamende dopamin seviyelerini geri getirebilen ve orta beyindeki dopamin nöronlarının dejenerasyonunu önleyen veya geciktirebilen ve PH ile ilişkili nihai motor semptomları önleyen veya geciktirebilen nöroprotektif ajanlar bulmak önemlidir. Biz araştırmacıların üzerine düşen, sadece dopaminerjik kaybı önlemeyecek, aynı zamanda PH hastalarında otonomik, psikiyatrik ve bilişsel işlev bozukluklarını hafifletmeye yardımcı olacak tedavi yöntemlerini geliştirmek ve karakterize etmektir (Sarkar vd.,2016).

Son yıllarda nöroproteksiyonu hedefleyen, antiinflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik ve anksiyolitik, antinosiseptif, antidepresan, antikonvülsan, antioksidan, Ca<sup>2+</sup> kanal antagonisti kısaca nöroprotektif etkilere sahip bir molekül veya bu etkileri tek tek içeren molekül kombinasyonlarının kullanılmasına yönelik tedavi yaklaşımlarına olan ilgi giderek artmaktadır (Cristina vd.,2018). Bu etkilerin birçoğuna sahip ekzojen maddelerden biri de CA'dür.

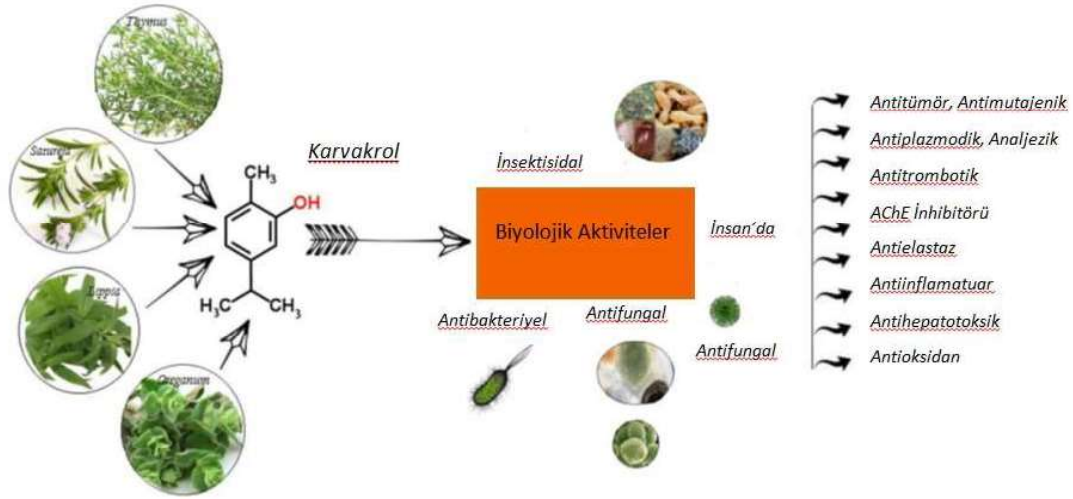
CA; iskemi, epilepsi ve travmatik nöron yaralanması dahil olmak üzere birçok hayvan nörodejenerasyon modelinde nöroproteksiyon ile ilişkilendirilmiş bir monoterpendir (Dati, Ulrich, Real, Feng, Sun & Britto, 2017.). CA, KBB'ni geçerek MSS'nde yer alan çeşitli kanallar ve reseptörlerle etkileşerek MSS'nin farklı bölge ve fonksiyonları üzerine etkiler gösterebilmektedir (Baluchnejadmojarad, Hassanshahi, Roghani, Mansouri & Raoufi, 2014; Cristina vd., 2018). CA'ün MSS nöronlarındaki başlıca hedeflerinden biri de katyon kanallarıdır (Dati vd., 2017). Belirli katyon kanallarını modüle edebilen CA, özellikle hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazisinin değişimine neden olarak etkilerini

göstermektedir (Parnasa vd., 2009). CA'ün potansiyel nöroprotektif etkilerini gösterebilmek için deneysel Parkinson modelleri üzerinde yapılan az sayıdaki çalışma da bu nedenlerle son derece umut vaatetmektedir (Dati vd., 2017).

### **2.3. Karvakrol**

Karvakrol, *Origanum*, *Thymus*, *Satureja* ve *Corydthymus* gibi *Lamiaceae* familyası bitkilerinin essansiyel yağlarının ana bileşeni olan fenolik bir monoterpendir (Başer, 2008; Lins vd., 2018). CA, gıdalarda kullanım ve tüketim için güvenli olarak kabul edilip Food and Drug Administration ve Avrupa Konseyi tarafından onaylanarak kimyasal aromalar listesine dahil edilmiştir (De Vincenzi, Stammati De Vincenzi, Silano, 2004; Lins vd., 2018). Ayrıca CA içeren ilaçlar ve / veya uçucu yağlar geleneksel tıpta yaygın şekilde kullanılmaktadır ve bu moleküle dayalı çok sayıda besin katkı maddesi ticari olarak mevcuttur (Edris, 2007; Zotti vd., 2013).

Son yıllarda, CA'ün biyolojik etkilerini belirlemek amacıyla önemli pek çok araştırma yapılmıştır. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar göstermektedir ki, CA antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiparazitik, antitümör, anti-inflamatuar, antimutagenik, analjezik, hepatoprotektif, antidepresan, antiapoptotik, nöroprotektif, antiplatelet, asetilkolin esteraz inhibe edici, antielastaz, spazmolitik ve vazorelaksan, hasarlı organı korumak / yeniden canlandırmak gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip biyoaktif bir moleküldür (Baser, 2008; Suntres, Coccimiglio & Alipour, 2015; Mohammedi, 2018) (Şekil 2.6.).



**Şekil 2.6.** CA'ün kimyasal yapısı ve biyolojik aktiviteleri (Mohammedi, 2018' den modifiye edilerek alınmıştır).

CA'ün MSS'nin farklı bölge ve fonksiyonları üzerine etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar; CA'ün anksiyolitik benzeri (Melo vd., 2010), antinosiseptif (Melo vd, 2012; Guimarães vd., 2012), antidepresan (Melo vd., 2011), antikonvülsan (Quintans-júnior vd., 2010), anti-enflamatuar, antioksidan, ve nöroprotektif (Deng, Lu & Teng, 2013; Yu vd., 2012; Baluchnejadmojarad, Hassanshahi, 2014; Li, Hua, Pan, Fu & Wu, 2016) etkilerini göstermişlerdir (Lins vd., 2018).

CA, MSS'ndeki nörotransmitter sistemleri modüle edebilen nöromodülatör bir moleküldür. Örneğin Zotti ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma; CA'ün beyindeki dopaminerjik transmisyonların bir düzenleyicisi olduğunu ortaya koymaktadır (Zotti vd., 2013). Mechan ve arkadaşları da CA'ün, monoamin oksidaz aktivitesini inhibe ederek enzimatik yıkımın azaltılması yoluyla monoamin nörotransmitterlerinin geri alınımını ve bozulmasını engellediğini göstermişlerdir. Bu değişiklikler, sinaptik aralıkta monoamin transmitterinin birikmesine neden olarak etkisinin daha uzun süreli olmasını sağlamıştır (Mechan vd., 2011). CA'ün i.p. uygulaması, 6-OHDA ile oluşturulmuş hemiparkinson sıçan modelinde meydana gelen davranışsal bozukluklar üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir. Buna göre nigral nöronların dejenerasyonunun önlenmesinde ve striatal dopamin miktarının normale yakın bir seviyede muhafaza edilmesinde, CA'ün antioksidan etkisinin rol oynadığı

düşünülmüştür (Baluchnejadmojarad ve diğerleri, 2014). Buna ek olarak, CA'ün OS'i nötralize ederek, nöronal hasarın ve ölümün azalmasına neden olduğunu gösteren bir başka çalışmada ise; CA'ün amiloid- $\beta$  veya skopolamin ile indüklenen bilişsel zayıflamayı iyileştirebileceği gösterilmiştir (Azizi, Ebrahimi, Saadatfar, Kamalinejad & Majlessi, 2012). Dahası, CA analjezik etkili bir bileşik olarak çeşitli nosiseptif modellerde, muhtemelen in-vitro olarak gözlenen güçlü antioksidan etkileri yoluyla periferal mediatörlerin inhibisyonuna neden olmaktadır (Guimarães vd., 2012). CA'ün, antikonvülsif etkisine bağlı olarak sinir aksiyon potansiyel iletimini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Joca vd., 2012). Bir başka çalışmada; CA'ün orta dereceli serebral arter tıkanıklığı oluşturulmuş fare modelinde kaspaz-3 seviyesini azaltıp, fosfotidilinositol 3-kinaz/Akt sinyal yolunda yer alan fosforilize Akt seviyesini arttırarak anti-apoptotik mekanizmalara dahil olduğu gösterilmiştir (Yu vd., 2012). Ayrıca CA, siklooksijenaz ekspresyonunu ve poli-ADP-riboz polimerazın aktivasyonunu inhibe ederek antienflamatuar etki de göstermektedir (Hotta, Nakata, Katsukawa, Hori, Takahashi, & Inoue, 2010) ve potansiyel nöroprotektif özelliklere sahip olduğundan dolayı yüksek dozlarda bile toksik etkilere neden olmaz (Peters vd., 2012; Suntres, Coccimiglio & Alipour, 2015).

CA'ün nöromodülatör etkisine iyon kanalları aracılık etmektedir. CA; GABA-A ve Na<sup>+</sup> kanallarını içeren çeşitli kanallarda etkilere sahip olmasına rağmen, nöromodülasyon ve nöroproteksiyon bağlamında ana hedefini, bir katyon kanalı ailesi olan TRP kanalları oluşturmaktadır (Parnas vd, 2009; Oz, Lozon, Sultan, Yang & Galadari, 2015). Sayısız uyaranlara yanıt olarak ortamdaki değişiklikleri tespit eden biyolojik sensör olarak görev yapan TRP kanalları, birçok önemli biyolojik olayda görev yapar. Ca<sup>2+</sup> iyonlarına karşı geçirgen olan bu reseptörlerin işleyişini düzenleyen kimyasallardan biri de CA'dür ve pek çok hücrede Ca<sup>2+</sup> homeostasisine katkıda bulunur (Suntres vd., 2015).

Bu etkilerini göz önüne aldığımızda CA, pek çok nörolojik hastalığın önlenmesi veya tedavisi için umut vadeden bir moleküldür. Biz de bu nedenlerle CA'ün MSS'nin en yaygın ikinci nörodejaneratif hastalığı olan PH'nın



fizyopatolojik değişikliklerine karşı koruyucu etki sağlayabileceğini düşündük. Çünkü nöroprotektif, nöromodülatör, anti-apoptotik, anti-enflamatuar ve antioksidan etkilere sahip maddeler PH'nın önlenmesi veya tedavisi için alternatif stratejiler oluşturabilir (Lins vd., 2018).

Parnas ve arkadaşları CA'ün farklı TRP kanalları üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; CA'ün termosensitif TRP kanalları, TRPV3 ve TRPA1'i aktive ettiğini ve non-termo sensitif TRP kanalları olan *Drosophila* TRPL'yi (TRPC ailesinin üyesi) ve memelilerde bulunan TRPM7'yi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca üç farklı alt ailenin TRP kanallarının benzer bir doğal bileşimin hedefleri olması, çeşitli TRP kanal alt ailelerinin fonksiyonel özelliklerinin de ortak olduğunu ortaya koymaktadır (Parnas vd., 2009).

Peters ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; farelerin beyin dokusunda oluşturdukları travmatik hasar sonrası TRPC1'in genetik eliminasyonu ve CA'ün TRPC1 üzerindeki inhibisyon etkisinin kombinasyonunun, sinerjistik bir şekilde nöroprotektif bir etki oluşturduğunu göstermişlerdir. Böylece TBH sonrası CA uygulamasının yararlı olduğu gözlenmiştir (Peters vd., 2012).

CA'ün TRP kanalları üzerinden etkileriyle belirgin bir nöroproteksiyona yol açtığını ve bunun da PH için terapötik yaklaşımlarda potansiyel bir hedefi temsil edebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Dati vd., 2017). Dati ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı kırk beş yetişkin (üç aylık) erkek fare kullanılan çalışmada, hayvanların sağ striatumlarında tek taraflı olarak 6-OHDA ile hemiparkinson modeli oluşturulmuş ve hayvanlar CA tedavisine alınmışlardır. CA tedavisi sonrası, CA'ün hem SN'da hem de striatumda TH'ın immün boyanmasını önemli ölçüde azalttığı; apoptotik süreçte yer alan kaspaz-3 düzeylerini toksin enjeksiyonlarından sonra çok yüksek iken, kontrol seviyelerine düşürdüğünü ve CA'ün, muhtemelen TRPM7 kanalları üzerindeki non-spesifik engelleme etkisiyle, PH'nın 6-OHDA modelinde belirgin bir nörokoruma sağladığını göstermişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlar, CA'ün TRPM7 kanalı üzerinden nöroproteksiyona yol açtığını ve bunun da PH için terapötik

yaklaşımlarda potansiyel bir hedefi temsil edebileceğini göstermektedir (Dati vd.,2017).

## 2.4. Astrositler

Glia hücreleri; sinir sisteminin özelleşmiş bağ doku hücreleri olarak kabul edilen, sayıları nöronlardan daha fazla olan, sinir dokusuna metabolik ve yapısal destek sağlayan hücrelerdir. Mikroglia ve makroglia olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Taner D, 2007). MSS'nde en çok bulunan makroglial hücre tipi olan astrositler, morfolojileri ve fonksiyonları bakımından oldukça heterojendirler ve MSS'nin homeostazından sorumludurlar. İki ana astrosit türü vardır: fibröz astrositler Ranvier nodlarının oligodendroglialar ile etkileştiği bölgelerde; protoplazmik astrositler ise nöronal hücre gövdeleri ve sinapsların çevrelerinde daha yoğun bulunurlar (Halliday & Stevens, 2011). Astrositler, sinaptik aralıkta; iyonların ve nörotransmitterlerin homeostazını sağlayan, nöronlara lokal metabolik ve trofik destek veren, ROS'un uzaklaştırılmasında görev alan, KBB'ne katkıda bulunarak MSS'nin "glymphatic" drenaj sistemini oluşturan çok yönlü hücrelerdir (Verkhratsky, Nedergaard & Hertz, 2014). Bunların yanı sıra astrositlerin, nöronal sağkalım ve farklılaşma, nöronal yönlendirme, sinaptogenesis gibi MSS'nin gelişmesi ve fizyolojisinde sayısız rol oynadığı bilinmektedir. Aynı zamanda, iyon ve nörotransmitterlerin yerel konsantrasyonlarını düzenleyen ve yerel kan akışının kontrolünde yer alan kilit unsurlardır. Bununla birlikte, sinir sistemi tarafından bilgi işlemine aktif olarak katılmazlar ve elektriksel olarak uyarılabilir değildirler. Fakat nöronlarla aralarındaki gap junction bağlantılarının olması, astrositlerin membranındaki iyon akımlarının, lokal potansiyel değişiklikler oluşturmaya neden olmaktadır ve böylece nöronların elektriksel aktivitelerini düzenleyebilmektedirler (Araque & Navarrete, 2010).

Birçok nörolojik hastalığın patogenezi, homeostatik fonksiyon kaybından kaynaklanır. Bu nedenle MSS'ndeki nörodejeneratif hastalıkların başlangıcında ve ilerlemesinde astrositlerin yer almaları şaşırtıcı değildir. Astrositlerin normal destekleyici ve düzenleyici rollerinin kaybının ya da reaktif

astrogliosis olarak bilinen astrositlerin toksik bir işlev kazanmasının ya da her ikisinin birden nöropatolojilere katkıda bulunduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır (Verkhatsky vd., 2014; Phatnani & Maniatis 2015).

Astrositler, PH'nda nöronal sağkalım ve fonksiyona aracılık etmede doğrudan, önemli, aktif ve kritik roller oynarlar. GSH, SOD, Katalaz gibi antioksidan maddeler ve nörotrofik büyüme faktörleri salgılayarak nöronal; Hsp70 gibi şaperonların aşırı ekspresyonuna neden olarak mitokondriyal koruma sağlarlar. Dopaminerjik nöronlarda  $\alpha$ -sinüklein birikimini engellerler. Modüle edilebilir  $Ca^{2+}$  aktiviteleri aracılığı ile nöroaktif ve glioaktif gliotransmitterleri (örn.GABA) salgılamaları ve ayrıca glutamat,  $K^+$  ve  $Ca^{2+}$  gibi hücre dışı sıvıda artışları eksitotoksik etki yaratan ajanları uzaklaştırmalarıyla nöroprotektif etki gösterirler. Fakat astrositlerin bu yararlı etkilerinin yanı sıra salgıladıkları potansiyel olarak toksik moleküller de bulunmaktadır. Bu toksik moleküller, astroglial enflamatuar ve OS mekanizmasını harekete geçirerek nörodejenerasyonu teşvik edebilmektedir. Bu nedenlerle; nöronları çevreleyen astroglial hücrelerde küçük bir değişiklik, beyindeki diğer herhangi bir hücre tipine kıyasla etkili bir şekilde nöronal hücre ölümüne neden olabilmektedir (Niranjan, 2014; Phatnani & Maniatis 2015; Jennings & Rusakov, 2016).

PH hayvan modellerinde,  $\alpha$ -sinüklein klerensini sağlayan astrositlerin,  $\alpha$ -sinüklein birikimine bağlı olarak proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler ürettiği (Lee vd, 2010) ve interferon-gama ve TNF- $\alpha$  gibi nöroinflamatuvar mediatörlerin astrositleri ve mikroglia'yı sinerjik olarak aktive ettikleri gösterilmiştir (Barcia vd, 2011; Phatnani & Maniatis 2015). Ayrıca, Parkinson modeli oluşturmada kullandığımız 6-OHDA; hidrojen peroksit ve kinon üretimini arttırarak ve bunun yanısıra, belirgin bir GFAP ekspresyonuna yol açarak, sıçan korteksi ve striatumunda astrositik proliferasyonun artması ile karakterize olan mikroglia'ya ve astroglia'ya neden olmaktadır (Bové, Prou, Perier & Przedborski, 2005; Wachter vd.,2010). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki; bu mikroglial aktivasyonun baskılanması nöronların hayatta kalma süresini uzatmaktadır (Phatnani & Maniatis 2015). Reaktif astrogliazis sürecinde astrositler, hem indüklenmiş ROS üretimi hem de lipid

peroksidasyonu ve nöronal dopaminerjik ölümü indükleyen apoptotik mekanizmaların aktivasyonu ile çevre nöronları etkileyebilen enflamatuvar sitokinleri salgırlar. Astrositler tarafından salınan bu sitokinler, TNF reseptörü-1 ve 2 gibi dopaminerjik nöronlardaki spesifik reseptörlerine bağlanabilir ve kaspaz 3, kaspaz 8 ve sitokrom c'nin aktivasyonu ile proapoptotik mekanizmaları aktive edebilirler (Rappold & Tieu, 2010; Hirsch, Breidert, Rousselet, Hunot, Hartmann & Michel, 2003). Bu sonuçlar, glial reaksiyonun inhibisyonunun PH sırasında oluşan hasara ve diğer enflamatuvar süreçlere karşı, nöronal hasarı azaltmak için ümit verici bir tedavi olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Hirsch vd.,2003).

Farklı insan ve fare beyin hücre alt tiplerinin transkriptomunu karşılaştıran bir araştırma; PH'na yol açan monogenik mutasyonların tanımlandığı genlerin çoğunun, astrositlerde, nöronlarinkinden daha yüksek veya bazı durumlarda karşılaştırılabilir seviyelerde eksprese edildiğini göstermiştir (Booth, Hirst & Wade-Martins 2017). PH'da, DJ-1 ve PARKIN gibi resesif PH genlerinin astrosit fonksiyonlarının disregülasyonuna neden olarak hastalığın oluşumuna ilave bir katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Phatnani & Maniatis 2015).

SN ve striatum bölgesindeki eksik astrositik aktivite, GSH salınımının azalması yoluyla dopaminerjik nöronların ölümünde kritik bir rol oynar. Örneğin, GSH salgılayan astrositler sağlıklı dopaminerjik nöronların yakınında dejenere olanlara oranla daha fazla sayılırken, sayıları AH hastalarındaki nörodejenerasyon ile ters orantılı olarak tespit edilmiştir. Tutarlı bir şekilde, PH hastalarının ve hayvan modellerinin beyninde GSH düzeylerinde azalma gözlenmiştir (Finsterwald, Magistretti & Lengacher, 2015). Yakın zamanda yapılan bir çalışma; Parkinson modeli oluşturulmuş sıçan beynine sağlıklı astrositlerin transplantasyonunun dopaminerjik nöron popülasyonlarını kurtardığını göstermiştir (Proschel, Stripay, Shih, Munger & Noble, 2014). Sonuç olarak; son literatürlerde, astrositlerin, özellikle antioksidan yanıtın kontrolü yoluyla, PH etiyolojisindeki önemi vurgulanmaktadır (Finsterwaldetal vd., 2015).

Astroditlerin dopaminerjik reseptörleri ve dopamin taşıma kapasitesine sahip plazma membran proteinlerini eksprese ettiği yaygın olarak bildirilmektedir. Astroitik dopamin reseptörlerinin aktivasyonu, hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve serbest  $Ca^{2+}$  gibi sinyal moleküllerinin değişimine neden olur ve özellikle sitoplazmik serbest  $Ca^{2+}$ , önde gelen astroitik hücre içi sinyal molekülü olarak kabul edilir. Astroitlerde, dopamine bağlı  $Ca^{2+}$  yükselmesi ile  $Ca^{2+}$  bağımlı gliotransmitter ekzositozu, nörotrofik ve inflamatuvar faktörlerin salınımında belirgin bağlantılar vardır (Jennings & Rusakov, 2016). Bu nedenlerle PH'nda meydana gelen dopamin seviyesinin azalması astroitik aktiviteyi de doğrudan etkilemektedir.

Astroglial uyarılabilirlik,  $Ca^{2+}$  ve  $Na^{+}$ 'daki değişikliklerin öncü rolü üstlendiği hücre içi iyon konsantrasyonlarının uzaysal-zamansal olarak koordineli dalgalanmalarına dayanır.  $Ca^{2+}$  ve  $Na^{+}$ 'un aracılık ettiği hücre içi sinyaller, gen ekspresyonunu, enerji üretimini ve astroitlerin birçok homeostaz fonksiyonunu kontrol eden çok sayıda moleküler kaskadı hedefler. Astroitler, iyon kanalları içinde önemli bir yere sahip olan birçok TRP kanalının türünü ifade ederler. Astroitlerin ifade ettiği TRP kanallarının başlıcaları TRPA1, TRPC1-4 ve 5 ile TRPV4 kanallarıdır. Astroitlerde ifade edilen TRPA1 kanallarının aktivasyonu dinlenim sırasında intrasellüler  $Ca^{2+}$  regülasyonunun sağlanması, inaktivasyonu ise intrasellüler  $Ca^{2+}$ 'un azalmasına neden olmaktadır (Verkhratsky, Reyes & Parpura, 2013). Bunun dışında GABA transporterlarının fonksiyonel ekspresyonlarının düzenlenmesinde de astroitlerdeki TRPA1 kanallarının rolü vardır (Shigetomi, Tong, Kwan, Corey & Khakh 2012). TRPC kanalları ise astroglialarda  $Na^{+}$  ve  $Ca^{2+}$  sinyallerinin koordinasyonunu sağlamaktadır (Verkhratsky, Rodriguez & Parpura, 2012; Verkhratsky, Noda, Parpura, Kirischuk, 2013).

Yukarıda da bahsettiğimiz gibi MSS'nin merkezi homeostatik ve hüresel savunma unsurları olan astroitler, nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde yer almaktadır ve nörolojik patolojinin ilerlemesini ve sonucunu büyük ölçüde belirlemektedirler. Astroglial TRP kanallarının nörofizyolojik hastalıklarda olası katkısı ve muhtemel patofizyolojik uygunluğu ile ilgili araştırmalar ise

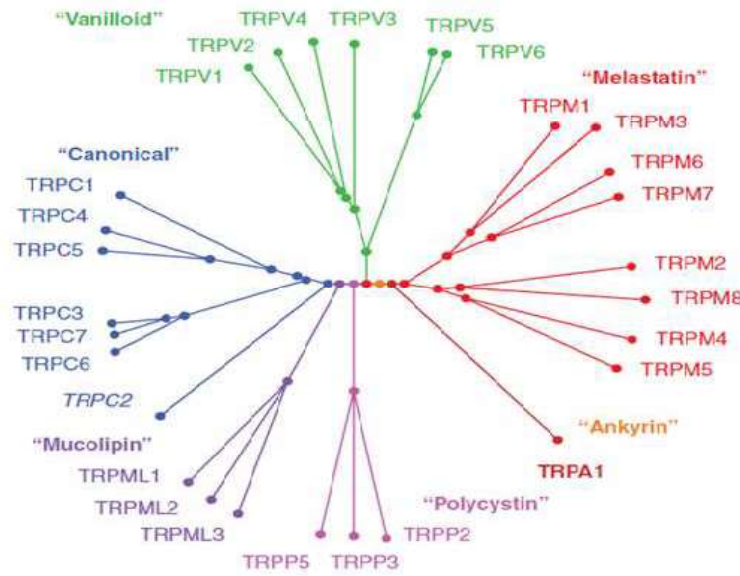
oldukça sınırlıdır. Fakat astrositlerdeki TRP kanalları gibi iyonik kanalların astrosit fonksiyonundaki rolü göze alındığında; TRP kanallarının nörolojik hastalıklarda terapötik hedefler olabilmesi mümkün görülmektedir.

## 2.5. TRP Kanalları

TRP kanalları, ubiquitanöz, non-selektif katyon kanallarının büyük bir ailesidir (Nilius & Owsianik, 2011). 1969 yılında Dr. Cosens ve Dr. Manning *Drosophila melanogaster* türünün yabancı tipinde yaptıkları bir elektoretinogram (ERG) kaydı sırasında; sürekli bir ERG yerine uzun süreli sabit ışık maruziyeti sonrasında geçici ve kısa süreli anormal bir ERG kaydı veren kör mutant bir tür tespit etmişlerdir. Mutant türün fotoreseptörlerine ait ERG kaydında sadece geçici bir depolarize edici değişiklik; yabancı sineklerin fotoreseptörlerinden elde edilen ERG kaydında ise bir plato fazı oluşmaktadır. Mutant sineklerde farkedilen bu geçici değişiklik seçici olmayan bir Ca<sup>2+</sup> kanal blokleri kullanılarak bir iyon kanalı varlığına bağlanmış ve böylece 1969'da Cosens ve Manning; bu mutant suşu, geçici reseptör potansiyeli olarak adlandırmıştır (Cosens & Manning, 1969; Eraç, Selli & Tosun, 2009 Nilius & Owsianik, 2011; Nilius & Szallasi, 2014). Ancak TRP geninin moleküler karakterizasyonunun Montell ve Rubin tarafından tanımlanması yirmi yıl kadar sonra 1989'da gerçekleşmiştir (Nilius & Owsianik, 2011; Nilius & Szallasi, 2014). Montell ve Rubin, daha önce analiz edilen herhangi bir proteine benzemeyen TRP proteininin, 1275 aminoasitten oluşan varsayılan sekiz transmembran alanı ve 9 kez art arda tekrarlanan hidrofilik bir 8 amino asit dizisi ile 143 kd olduğunu ispatlamışlardır (Montell & Rubin, 1989). Sonrasında TRP kanalları üzerine yapılan çalışmalar giderek artmış ve bu çalışmalara göre, TRP kanal süper ailesinin 50 kadar farklı türü tanımlanmıştır. Memelilerde 28 TRP kanalı bulunmuştur ve bu kanallar sekans homolojisi bakımından 6 alt aileye sınıflandırılmıştır: İlk üç alt aile, birbirine yapısal olarak benzer olan; kanonik (standart) ya da klasik TRP kanalları (TRPC1-7), ısı ile aktive edilen vanilloid TRP kanalları (TRPV1-6) ve melastatin (TRPM1-8) TRP kanallarını, diğer üç alt aile ise polikistin alt ailesini (TRPP1-3), mucolipin alt ailesini

(TRPML1-3) ve ankirin reseptörünü (TRPA1) içermektedir (Clapham, Runnels & Strübing, 2001; Clapham, 2003; Nilius, Owsianik, Voets & Peters 2007; Nilius & Owsianik, 2011, Samanta, Taylor & Vera, 2018; Nilius & Szallasi, 2014; Eraç vd.,2009).

TRP kanalları moleküler yapıları bakımından voltaj kapılı katyon kanallarına benzerlik gösterirler ve altı transmembran segment içerirler. TRP proteinlerinin -N ve -C terminalleri sitoplazmik yüzeyde yer alır. S1 ve S6 segmentleri iyon kanalı oluşturacak por şeklinde yerleşirler (Gaudet, 2008). TRP kanalları, hem homomerik hem de heteromerik tetramerler oluşturarak işlev göstermektedirler (Montell, 2005; Nilius & Szallasi, 2014; Eraç vd.,2009; Gees, Colsoul & Nilius, 2010) (Şekil 2.7.).



**Şekil 2.7.** Memeli TRP-kanal süper familyasının filogenetik ağacı. TRPC (kanonik), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPA (ankirin), TRPP (polikistin) ve TRPML (mukolipin) (Gees, Colsoul & Nilius, 2010).

TRP kanalları tüm hücre tiplerinde değilse de, uyarılabilir ve uyarılamayan pek çok hücre tipinde eksprese edilebilirler (Gees vd., 2010). Non-selektif, polimodal tip kanallardır; yani, fiziksel (voltaj, sıcaklık, kuvvet, basınç ve gerginlik) ve kimyasal (hem endojen hem de eksojen) uyarıların bir çoğu ile aktive edilebilirler (Nieto-Posadas, Jara-Oseguera & Rosenbaum, 2011; Jara-Oseguera & Islas, 2013). Pek çok farklı hüresel uyarıları saptar ve elektrik

sinyalleri (membran potansiyelindeki değişiklikler aracılığıyla) veya kimyasal sinyaller (intraselüler  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu değiştirerek) olarak değiştirirler (Takahashi, Kozai & Mori, 2012). Bütün TRP kanalları  $Ca^{2+}$  ve diğer katyonların mobilizasyonunda ve düzenlenmelerinde, tonisite değişikliklerinde, ısı duyarlılığında, pH, UV ışık, mekanik uyarı, ozmolarite değişikliklerinde; birçok homeostatik mekanizmada, OS, nosisepsiyon ve inflamasyon da dahil olmak üzere pek çok hücresele fonksiyonda rol oynamaktadır (Clapham, 2003; Holzer, 2011, Bradshaw, Raboune, & Hollis, 2013; Chung, 2010). Genellikle hücre zarında yer alan TRP kanalları; ayrıca lizozomlar, endozomlar, Golgi aygıtı, ER ve sinaptik veziküller gibi bazı hücre organellerinde, esasıyla  $Ca^{2+}$  kanalları olarak işlev görürler (Gees vd.,2010).

Yaygın ifadeleri ve işlevsele çeşitlilikleri göz önüne alındığında; TRP kanal süper ailesi üyelerinin ortak bir aktivasyon modeline sahip olmaması ve birbirinden farklı uyarıcılarla modüle edilebiliyor olmaları nedeniyle; TRP kanallarının fizyolojisini ve insan hastalıklarıyla ilişkilerini anlamak için önemli bilimsel çaba harcanmaktadır. TRP kanallarının sistemik ve nöronal, çeşitli hastalıklara dahil edilmesinin güçlü göstergeleri, kanal ekspresyonu seviyeleri ile hastalık semptomları arasındaki korelasyonlardan kaynaklanmaktadır (Nilius, Owsianik, Voets & Peters, 2007). Örneğin; defektif TRP genlerinden kaynaklanan birçok kanalopati, nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde doğrudan yer almıştır (Nilius & Owsianik, 2010). Bu nedenlerle TRP kanallarının nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde varsayılan farmakolojik hedefler olup olmadığını anlamak için kanalların aktivasyonunu değiştiren eksojen maddelerin kullanılması doğru bir yaklaşım olabilir.

Biz de çalışmamızda, eksojen bir TRP kanal modülatörü ve nöroprotektif bir bileşik olan CA'ün, astrosit TRPA1 ve dopaminerjik nöron TRPC1 kanallarının aktivite değişimlerine neden olarak PH'nda olası etkilerini gözlemlemeyi amaçladık.



### 2.5.1. TRPC kanalları

İlk tanımlanan TRP kanalı olan *Drosophila* TRP kanalının memeli homologları TRPC1, TRPC2 ve TRPC3 olarak adlandırılmıştır. O zamandan günümüze memelilerde yedi farklı TRPC proteini (TRPC 1-7) tanımlanmıştır (Venkatachalam & Montell, 2007). TRPC ailesi, fonksiyonel benzerliklerinin yanı sıra sekans homolojilerine göre üç alt gruba ayrılmaktadır: depo kontrollü TRP kanalları TRPC1 / C4 / C5 / C3, reseptör kontrollü TRP kanalları TRPC6 / C7 ve TRPC2. (Clapham, Julius, Montell, & Schultz, 2005; Morelli, Amantini, Liberati, Santoni & Nabissi, 2013) Bununla birlikte, insanlarda sadece altı TRPC kanalı ifade edilmektedir; çünkü insan TRPC2 kanalı bir psödojendir (Venkatachalam & Montell, 2007).

Yedi farklı memeli TRPC alt tipinin sitoplazmik N-terminali 750-900 amino asitlik dizi bakımından birbirleriyle ve *Drosophila* TRPC'lerle  $\geq$  % 30 benzerlik gösterir (Venkatachalam & Montell, 2007). Ayrıca tüm TRP kanalları altı adet transmembran bölgesine sahiptir (Montel, 2005). TRPC proteinleri, C-terminallerinde korunmuş bir TRP kutusu alanına, prolince zengin bir diziyeye ve ayrıca çift bükülmüş sarmal alanlara, fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat bağlayıcı ve kalmodulin (CaM) ile etkileşim için CaM bağlayıcı alanlara sahiptir. Ayrıca, bu kanalların, Homer protein homologu 1 (Homer1), inositol trisfosfat reseptörü ve caveolin-1-bağlanma alanlarını koruduğu görülmüştür. TRPC kanallarının N-terminallerinde 33 aminoasitte bir yer alan ve protein-protein etkileşiminde görevli olduğu düşünülen üç veya dört ankrin tekrarı bulunur (Morelli vd., 2013; Eraç vd.,2009; Minke & Cook, 2002). Tüm TRPC'ler, hücre içi  $Ca^{2+}$  salınımını düzenlemekle görevli CaM ve inositol-1,4,5-trisfosfat (IP3) reseptörü (CaM / IP3R bağlanma yeri olarak adlandırılır) ya da G proteini kaplı reseptör bölgesi içermektedirler (Clapham vd., 2005). Ek olarak, TRP'lerin, özellikle TRPC'lerin çoğunun, benzersiz kanal özelliklerine sahip homo veya heteromerik fonksiyonel kanallar oluşturmak için multimerize olduğu gösterilmiştir (Nilius ve Owsianik, 2011; Sukumaran vd., 2017; Minke & Cook, 2002).

TRPC kanallarının, düz kas aktivitesinin (Albert, Saleh & Large, 2009), endotel hücre fonksiyonunun (Morita, Okada, Hara & Yamawaki 2011),

KBB'nin düzenlenmesinin (Brown, Wu, Hicks & O'neil, 2008) ve hücre döngüsünün kontrolünde (Madsen, Klausen, Fabian, Hansen, Pedersen & Hoffmann, 2012) ayrıca nörotransmitter salınımı, sinaptik plastisite [uzun vadeli depresyon ve uzun vadeli güçlenme] ve beyin gelişimi gibi çeşitli fonksiyonların kontrolünde ve nöronal sağkalımda rol aldığı bildirilmiştir (Tai, Feng, Du & Wang, 2009; Chae, Ahn, Hong, Chang, Kim & Kim, 2012; Amaral & Pozzo-Miller, 2012; Nilius & Szallasi, 2014).

Özellikle belirtmek gerekir ki; TRPC alt ailesinin yedi üyesi de (TRPC 1-7) nöronal hücrelerde yüksek oranda ifade edilirler (Bollimuntha, Selvaraj & Singh, 2011; Sun, Sukumaran, Bandyopadhyay & Singh, 2014) ve nöronal hücreler, işlevlerini ve yaşamlarını sürdürebilmek için  $Ca^{2+}$  sinyaline büyük ölçüde bağımlıdırlar (Komuro & Kumada, 2005). Aksiyon potansiyelinin başlatılması, nörosekresyonu modüle eden voltaj kapılı  $Ca^{2+}$  kanallarını aktive eder. Ek olarak, NMDA, AMPA ve diğerleri gibi kanallara sahip post-sinaptik nöronlarda, nöronal fonksiyonların modülasyonu,  $Ca^{2+}$  girişinin indüklenmesi ile mümkündür. Ayrıca ER'deki ya da mitokondrideki  $Ca^{2+}$  depolarının tükenmesi ile aktive olan depo kontrollü TRP kanalları aracılı hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyeleri düzenlenmesi ile sitozolik, ER ve mitokondriyal  $Ca^{2+}$  seviyeleri olması gerekli aralıkta korunmaktadır. Bu nedenlerle, TRPC proteinlerinin nöronal sağkalım, çoğalma ve farklılaşmada kritik bir rol oynadıklarına dair giderek artan kanıtlar vardır (Sukumaran vd., 2017).

TRPC kanallarının MSS'inde yüksek oranda eksprese edilmeleri, PH'nın oluşumuna neden olan patofizyolojik süreçler arasında yer alan  $Ca^{2+}$  dishomeostezisinin (Sukumaran vd., 2017) ve glutamat ekzotoksitesinin (Narayanan, Irmady, Subramaniam, Unsicker & von Bohlen und Halbach, 2008) oluşumuna aktivitelerindeki değişimlerin sebep olması nedeniyle, çalışmamızı dopaminerjik nöronlarda varlığı bilinen TRPC1'in aktivitesi ve onun ekzojen bir inhibitörü olan CA'un etkileri üzerine planladık.

### 2.5.1.1. TRPC1 kanalı

TRP kanallarının memelilerde ilk keşfedilen türü olan TRPC1'in, eksprese edildiği beyin, düz kas, kalp, karaciğer, akciğer, dalak, börek, testis, over, endotel hücreleri ve salgı bezleri gibi dokularda birbirinden farklı aktivasyon mekanizmasına ve fizyolojik role sahip olduğunu öne süren kanıtlar vardır (Minke & Cook, 2002; Eraç vd.,2009). Depo kontrollü Ca<sup>2+</sup> kanalları arasında yer alan TRPC1 kanallarının aktivasyonuna deponun boşalması neden olsa da fizyolojik koşullarda bu boşalmanın nasıl bir moleküler mekanizma ile kanalın aktivasyonuna neden olduğu bilinmemektedir (Eraç vd., 2009).

Bazı çalışmalar, dopaminerjik nöronlarda plazma membranı Ca<sup>2+</sup> kanalı olarak TRPC1 fonksiyonlarının ve TRPC1'in ekspresyonunun /lokalizasyonunun PH-benzeri semptomlara neden olan bileşikler yoluyla inhibe edildiğini/değiştirildiğini göstermiştir (Selvaraj, Sun & Singh, 2010). Örneğin; TRPC1'in aşırı ekspresyonunun, Parkinson modeli oluşturmada kullanılan nörotoksinlerden biri olan 1-methyl-4-phenylpyridiniumun (MPP<sup>+</sup>) indüklediği nörotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Bu etkisini mitokondiyal sitokrom c salımını inhibe ederek ve Bax ve Apaf-1 protein seviyelerini azaltıp PH'na dahil olan dejeneratif apopitozun inhibisyonunu sağlayarak gösterdiği düşünülmektedir (Bollimuntha, Singh, Shavali, Sharma & Ebadi, 2005). TRPC1'in inhibisyonu ise [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>'deki azalmaya neden olarak kaspaz-3 aktivasyonuna yol açmakta ve proapoptotik yolları aktive ederek apopitozisi tetikleyebilmektedir (Moran, Itoh, Reddy, Chen, Alnemri & Pleasure, 1999). Narayanan ve ark. glutamatın TRPC1 kanalı üzerinden [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>'de büyük artışlara neden olarak hücre ölümünü aktive ettiğini; glutamat muamelesinden sonra artan TRPC1 ekspresyonunun bir TRPC kanalı engelleyicisi olan 2-Aminoetoksidifenil borat (2APB) ile baskılanmasının ise hipokampal bölgede hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (Narayanan, Irmady, Subramaniam, Unsicker & von Bohlen und Halbach, 2010). Li ve arkadaşlarının sonuçları da aynı şekilde, CA ile yapılan tedavinin, TBH sonrası TRPM7 inhibisyonu üzerinden hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunu azalttığını göstermiştir ve onlar bu durumun apopitozisin azalmasına ve nöronal canlılığın artmasına

neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu sonuç CA'ün neden olduğu TRPM7 inhibisyonunun TBH tedavi araştırmaları için gelecekte olumlu bir terapötik hedef olacağını göstermektedir (Li vd., 2015). Bu verilere göre; hücrenel sağkalım ve ölümdede TRPC kanalları “çift kenarlı kılıç” gibi davranmaktadır (Selveraj vd., 2010). Çalışmamızda TRP kanal modülatörü olarak kullandığımız CA de, TRPC1 kanalı inhibisyonuna neden olan bir kimyasaldır (Parnas vd, 2009). Sonuç olarak, hiçbir veri TRPC1 kaybına bağlı olarak bozulan Ca<sup>2+</sup> akışı üzerinden PH patogenezi ortaya koyacak kadar anlaşılır ve ayrıntılı değildir. Bu nedenle, TRPC1 kanal aktivitesinin karakterizasyonunun daha iyi tanımlanması PH'nın ilerlemesinde ve başlamasında yer alan moleküler yolların anlaşılmasında önemlidir. TRPC kanal aktivitesini/ekspresyonunu modüle eden tedaviler PH'nın tedavisinde yardımcı olarak hedeflenebilir (Selvaraj vd., 2010).

### **2.5.2. TRPA kanalları**

TRP kanallarının sadece memelilerde bulunan TRPA altfamilyasının, şimdiye kadar bilinen tek üyesi TRPA1 olarak adlandırılır. TRPA1 kanalları voltaj-bağımlı Ca<sup>2+</sup> geçirgen kanallar arasındadır. Kanalların N-terminal sitozolik ucunda, protein-protein etkileşimlerinde görev alan ve 14 kez tekrar eden ankirin proteinleri (Story vd., 2003; Gees vd., 2015), Ca<sup>2+</sup> bağlayıcı EF el bölgesi ve kovalent modifikasyon için en az 11 adet reaktif sistein bölgesi yer alır (Nilius and Owsianik, 2011). C-terminal sitozolik ucunda CC- bölgesi vardır ve bu bölgenin etrafı 5 ankirin proteini ile sarılmış hilal benzeri yapıya sahiptir (Paulsen, Armache, Gao, Cheng & Julius 2018). Ancak diğer TRP kanallarında bulunan tipik 25-amino asitlik TRP-box bölgesinden yoksundur (Nilius and Owsianik, 2011). Tetramerik bir yapıya sahip olan TRPA kanallarının por bölgesi S5 ve S6 segmentleri arasına yerleşmiştir; hem tek hem çift değerlikli katyonlara geçiş oluşturabilir. Böylece hücre zarını depolarize edebilir ve ifade edildiği hücrelerde Ca<sup>2+</sup> sinyalini başlatabilirler (Chen & Hackos, 2015). TRPA kanalları; beyin, kalp, ince bağırsak, akciğer (fibroblastların ve epitel hücrelerinin her ikisinde), iskelet kası, cilt (keratinositler), mesane, prostat,

vasküler endotel hücreleri ve pankreasta yaygın olarak eksprese edilir (Nilius & Szallasi, 2014). TRPA1, hem insanda hem de farede akciğer fibroblastları, alveoler epitel hücreleri ve akciğer düz kas hücreleri dahil olmak üzere birçok nöronal olmayan hücre tiplerinde tespit edilmiştir (Mukhopadhyay vd., 2011). Deride TRPA1, melanositler, keratinositler ve fibroblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunmuştur (Atoyan, Shander & Botchkareva 2009). İdrar yollarını kaplayan epitel hücrelerinde bulunan TRPA1 kanallarının miktürisyonda rol oynayabildiği düşünülmektedir (Gratzke vd., 2010). Pankreasın beta adacık hücrelerinin TRPA1'i eksprese ettiği gösterilmiştir ve bu hücrelerde TRPA1'in aktivasyonunun insülin salınımı ile sonuçlandığı (Cao vd. 2012) keşfedilmiştir. (Chen & Hackos, 2015). Termosensitif, kemosenitif ve mekonosensitif kanallardır. TRPA1'i ideal bir kemosenör yapan N-terminal sisteinlerin veya lizinlerin elektrofilik bileşikler tarafından kovalent modifikasyonudur (Bandell vd, 2004). Fakat kovalent modifikasyona neden olmayan non-elektrofilik bileşikler tarafından da aktive edilebilirler (Nilius & Szallasi, 2014).

#### *2.5.2.1. TRPA1 kanalları*

TRPA1 iyon kanallarının sinir siteminde; iç kulaktaki tüy hücreleri (Corey vd., 2004), dorsal kök gangliyon (DKG) ve trigeminal gangliyon (TG) nöronlarında (Chen & Hackos, 2015), superior servikal gangliyon ( gibi sempatik nöronlarda (Smith, Beacham, Ensor & Koltzenburg, 2004), ince ve kalın bağırsaktaki miyenterik nöronlar ve enterokromaffin hücrelerinde (Anand vd., 2008; Nozawa vd, 2009) ve astrositlerde (Shigetomi vd., 2012) eksprese edildiği bilinmektedir.

Isıya duyarlı (özellikle zararlı soğuk) olan TRPA1 kanalları (Karashima vd., 2009) aynı zamanda çok yönlü kemosenörler olarak da işlev görürler; alil izotiyosiyanat (hardal yağındaki keskin bileşik), allisin (sarımsaktan), sinnamaldehit (tarçından), mentol (naneden), tetra-hidrokanabinoid (kenevirde), nikotin (tütün) (Karashima vd., 2007; Gees vd., 2015; Scimemi,

2013), CA (kekikten), çevresel iritanlar, proaljesik ajanlar, UV ışık, oksidan stress (Viana, 2016) TRPA1 kanalları için uyarıcıdır.

TRPA1 kanalları; bradikinin gibi proinflamatuvar peptitlerle indüklenen kimyasal nosisepsiyonda, büyüme faktörlerinin salınımında ve mekanik transdüksiyonda rol almaktadır (Gees vd., 2015; Scimemi, 2013). Nosiseptif nöronların dışındaki TRPA1 ekspresyonu birçok grup tarafından rapor edilmiştir, ancak sonuçlar her zaman DKG ve TG nöronlarında görülen tutarlılık seviyesine sahip değildir (Chen & Hackos, 2015).

MSS'de yer alan TRPA1 kanalları, medüller DKG nöronlarının sinapslarındaki gliserjik iletimi modüle eder (Nilius, Appendino & Owsianik, 2012). TRPA1 aktivasyonu; supraoptik çekirdekte vazopressin üreten magnoselüler nöro-regülatör hücrelerin presinaptik terminallerinde, glutamat salınımını arttırır ve hipokampüste kanabinoid reseptörü-1'in uyarılmasında rol oynar. Beyin sapında, TRPA1 viseral afferent yolda eksprese edilir ve glutamat salınımını düzenler. Alilizotiyosiyanat gibi TRPA1 agonistleri, nükleus traktus solitarius nöronlarını etkiler (Vennekens, Menigoz & Nilius 2012) (Nilius & Szallasi, 2014) (Nilius vd., 2012). TRPA1 kanallarının aracılık ettiği astrosit istirahat  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarının azalması, hücre dışı GABA içeriğinin artmasına neden olarak, bozulmuş GABA taşınımı ile inhibitör sinaps etkinliğini azaltır (Shigetomi vd., 2012; Nilius vd., 2012). Stuebera ve arkadaşları; TRPA1-agonistleri arasında yer alan CA'ün, hücre dışından ve aynı zamanda ER gibi hücre içi depolardan  $Ca^{2+}$  salınımı tetikleyerek hücre içi  $Ca^{2+}$  artışına neden olduğunu; fakat yine de TRPA1'in nörotoksisite ve dolayısıyla nöropatik ağrının tedavisi için uygulanan epidermal nosiseptif sinir uçlarının dejenerasyonu için uygun bir hedef olmadığını göstermişlerdir (Stuebera, Eberhardta, Caspi, Levb, Binshtokb & Leffler, 2017). Bosson ve arkadaşları; hipokampal bölgedeki astrositlerin TRPA1 kanallarının, global ve yerel bir  $Ca^{2+}$  hiperaktivitesine neden olarak astrosit kaynaklı glutamat salınımını arttırdığını ve bunun nöronal hiperaktiviteye neden olarak AH'nda erken toksisiteye katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Bosson, Paumier, Boisseau, Jacquier-Sarlin, Buisson & Albrieux, 2017). Ayrıca TRPA1'in OS koşulları

sırasında üretilen birkaç farklı ajan tarafından aktive edilebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Hidrojen peroksit, TRPA1 aktivasyonuna neden olan ajanların başında yer alır ve bu yolla TRPA1 aktivasyonu in vivo nöronal stimülasyon için önemli bir yol olabilir (Andersson, Gentry, Moss & Bevan, 2008).

Tong ve arkadaşlarının 2013, Shigetomi ve arkadaşlarının 2012'de yaptıkları çalışmalar; astrositlerin bazal  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun, nöronların homeostatik fonksiyonlarının kontrolünde ve düzenlenmesinde önemli olduğunu göstermektedir. (Shigetomi vd, 2012; Tong, Shigetomi, Looger & Khakh, 2013). 2012'de astrositlerin TRPA1 kanallarının GABA alımını düzenlediklerini gösteren Shigetomi ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada ise astrosit TRPA1 kanallarının yapısal d-serin salınımını düzenlediğini, göstermişlerdir (Shigetomi vd, 2012; Shigetomi, Jackson-Weaver, Huckstepp, O'Dell, & Khakh, 2013; Tong vd., 2013). Bu mekanizmaların her ikisi de, TRPA1 kanallarıyla astrositlerin, nöromodülatör olarak nöron fonksiyonuna önemli ölçüde katkıda bulunduğunu, astrositlerin gliotransmisyonun yanı sıra (Haydon, 2001; Halassa ve Haydon, 2010), nöronları ve mikro devreleri kontrol etmek / düzenlemek için kullanabilecekleri mekanizmaların çeşitliliğini vurgulamaktadır. Bu nedenlerle, TRPA1 kanalı kaynaklı astrosit  $Ca^{2+}$  akışlarının ve bunun ardından ortaya çıkan nöronal sonuçların, bilişe (Turpin vd., 2011), travmatik yaralanmaya ve beyin hastalıklarına (Mustafa vd., 2010) katkıda bulunup bulunmadığını değerlendirmenin yararlı olacağı aşikardır. Bu nedenlerle, astrosit TRPA1 kanalları beyin hastalıkları için değerli terapötik hedefler olarak değerlendirilebilirler (Shigetomi vd., 2013).

Elde ettiğimiz literatür bilgisi ve bizim sonuçlarımız TRPA1 kanalının astrositlerde eksprese edildiğini ve CA'ün bu kanalın bir aktivatörü olduğunu göstermektedir. Ancak PH'nda, SN ve striatum bölgesinde astrosit TRPA1 kanallarının rolünün CA gibi bir modülatör kullanılarak incelendiğine rastlanmadık. Bununla birlikte, kanal fonksiyonunun değerlendirilmesi, muhtemelen astrositler yerine nöronlar için geliştirilen deneysel prosedürlerin

kullanılması nedeniyle mümkün olmadı. Bu nedenle, TRPA1 kanallarının PH'nın oluşumunda astrositlerdeki rolünü açıklamak için ileri çalışmalar gerektiğini öngörmekteyiz. Çünkü astrosit TRPA1 kanallarının CA kaynaklı sitümülyasyonunun neden olduğu Ca<sup>2+</sup> aktivitesi değişiminin gliotransmitter ve reseptör salınımlarını etkileyebildiğini, bunun da astrositlerin sinaptik düzenleme ve nöromodülatör rolünü değiştirebileceğini ve Parkinson modeli oluşturmak için kullandığımız 6-OHDA'nın neden olduğu OS kaynaklarından bazılarının TRPA1 kanalının aktivasyonuna neden olduğunu bilmekteyiz.





### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:**

Çalışmamızda toplam 64 adet, 200-250 gr. ağırlığında erişkin erkek Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma öncesinde gerekli olan etik kurul onayı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2016/525 karar numarası ile alınmış, deney hayvanları ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TİCAM) temin edilmiştir.

Araştırmalarımızda stereotaksimetric cerrahi, immünohistokimyasal boyama, RT-PCR ve WB yöntemleri kullanılmıştır.

Araştırmalarımız, ESOĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na 2017-1773 numaralı projemiz ile talepte bulunduğumuz malzemelerin temin edilmesini takiben 2018-2019 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Kullanılan Materyaller**

##### ***3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler***

Paraformaldehit: Merck, Almanya

PBS: Santa Cruz, İspanya

Ultra saf su: Millipore Synergy Water Purification System; Rotterdam, Hollanda

Ketamin: Bayer, Almanya

Ksilazin: Bayer, Almanya

6-OHDA: Sigma, ABD

Askorbik asit: Merck, Almanya

Anti-ADNP: Abcam, Cambridge, İngiltere

Anti-GFAP: Calbiochem, Darmstadt, Almanya

Hidrojen peroksit: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

##### ***3.1.1.1. RNA izolasyon malzemeleri***

PureLink™ RNA Mini Kit: Life Technologies Corporation, KA, ABD

2-merkaptoetanol: Sigma, ABD

%96-100'lük etanol: Sigma, ABD

Qubit® RNA BR Assay Kit: Life Technologies Corp., KA, ABD

#### *3.1.1.2. Real-time PCR malzemeleri*

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit: Life Technologies Corp., KA, ABD

TRPA1, TaqMan® Gene Expression Assay: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

TRPC1, TaqMan® Gene Expression Assay: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

GAPDH, TaqMan® Gene Expression Assay: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

TaqMan™ Fast Advanced Master Mix: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

#### *3.1.1.3. Protein izolasyon malzemeleri*

RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) Lizis Solüsyonu: Santa Cruz Biotechnology Inc., KA, ABD

Qubit Protein Assay Kit: Life Technologies Corp., KA, ABD

#### *3.1.1.4. Western blot malzemeleri*

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X): Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X): Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD,

NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X): Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

MagicMark™ XP Western Protein Standard: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

iBlot Transfer Stack, Nitrocellulose Regular: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

iBind™ Flex Solution Kit: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

Anti-TRPC1 (ab75322): Abcam plc., Cambridge, İngiltere

Anti-TRPA1 (ab58844): Abcam plc., Cambridge, İngiltere

Anti-GFAP (ab7260): Abcam plc., Cambridge, İngiltere

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alkaline Phosphatase) (ab6722): Abcam plc., Cambridge, İngiltere

iBind™ Flex Cards: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

WesternBreeze™ Chemiluminescent Kit: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

### ***3.1.2. Kullanılan cihazlar***

Hassas terazi: E12139, Ohaus, İsviçre

Buzdolabı: Arçelik, Türkiye

Perfüzyon pompası: KD Scientific, ABD

Mikrodiyaliz pompası: CMA 102, CMA Co. , İsveç

Mikrodiyaliz probu: CMA 12(PAES Memb.), CMA Co., İsveç

Diyalizat toplayıcı: CMA 170, CMA Co., İsveç

Isıtıcı ped: CMA 149, CMA Co., İsveç

Stereotaksimetrik düzenek: Kopf 5600, David Kopf Ins. , ABD

Vorteks: NM110, Nuvemix, Türkiye

Beyin Blokeri: Kopf PA-001, David Kopf Inst., ABD

İstatistik programı: SPSS 22, ABD

-86°C Derin Dondurucu Buzdolabı: Panasonic Twin Guard ULT Freezers (-86°C), Panasonic Healthcare Holdings Co., Tokyo Japonya

Çalkalamalı Su Banyosu: SHEL-LAB SWBR17, Sheldon Manufacturing, Inc., OR, ABD

Mikrosantrifüj: Sigma 1-14K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Almanya

Sonikatör: Vibra-cell VCX 750, Sonics & Materials Inc., CT, ABD

Fluorometre: Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies Corp., CA, ABD

Thermal Cycler: Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

RT-PCR Cihazı: Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

Mini Gel Tank: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

Güç Kaynağı: PowerEase 90W Power Supply (230 VAC), Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

iBlot 2 Dry Blotting System: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

iBind Western Device: Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD

Kodak Gel Logic 1500 Molecular Imaging System: Eastman Kodak Company, NY, ABD

Nikon NIS Elements 4.2 Image Analysis Software Programme: Nikon Instruments Inc., NY, ABD

Leica DCM 3000: Leica, Germany.

Etüv: Nüve, Türkiye

### 3.2. Yöntem

Bu çalışmada erişkin erkek Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanıldı ve deneyler her bir grupta 16 adet sıçan olmak üzere 4 grup üzerinde gerçekleştirildi. Her grup kendi içinde farklı deneysel amaçlar için iki gruba ayrıldı (her grupta 8 adet hayvan olacak şekilde). Gruplar:

**Grup 1- Sham (Taklit Operasyon) grubu:** Bu gruptakilere intrastriatal olarak %0.3'lük 2 µl askorbik asit çözeltisi ve daha sonra takip eden 14 gün boyunca %0.9'lük saline çözeltisi iki günde bir i.p. olarak verildi.

**Grup 2- 6-OHDA (6-Hidroksidopamin) verilen grup:** Bu gruptakilerin KS'larına, 2 µl %0.3'lük askorbik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmış olan 12 µg 6-OHDA (6 µg/µl), stereotaksimetrik sistem altında verilerek Parkinson modeli

oluşturuldu. Parkinson modeli oluşturulduktan 1 saat sonra başlamak üzere 14 gün boyunca iki günde bir i.p. olarak %0.9'luk saline çözeltisi verildi.

**Grup 3- 6-OHDA + DMSO verilen grup:** Bu gruptakilerin KS'larına, 2 µL %0.3'lük askorbik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmış olan 12 µg 6-OHDA (6 µg/µl), stereotaksimetrik sistem altında verildi ve parkinson modeli oluşturuldu. Parkinson modeli oluşturulduktan 1 saat sonra başlamak üzere 14 gün boyunca iki günde bir i.p. olarak DMSO verildi.

**Grup 4- 6-OHDA verilen + CA uygulaması yapılan grup:** Bu gruptakilerin KS'larına, 2 µL %0.3'lük askorbik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmış olan 12 µg 6-OHDA (6 µg/ µl) stereotaksimetrik sistem altında verilerek parkinson modeli oluşturulduktan 1 saat sonra başlamak üzere DMSO içerisinde çözülmüş 10 mg/kg CA, i.p. olarak 14 gün süreyle iki günde bir verildi.

Her gruptaki 8 hayvan immünohistokimyasal işlemler için intrakardiak yolla perfüze edilerek fiksasyonu sağlandı. Gruplardaki diğer 8 hayvana servikal dislokasyon yapılarak beyinleri çıkarıldı, beyin blokerında SNpc ve striatal alanları dikkatle ayrılıp sıvı nitrojene atılarak moleküler parametreler (RT-PCR ve WB) için çalışma yapılınca kadar -80 °C'de saklandı.

**Tablo 3.1.** Çalışmada sıçanlarda kullanılan kimyasallar

Ajanın adı	Doz	Hacim	Veriliş yolu	Veriliş sıklığı	Etki süresi
Xylazin	10 mg/kg		i.p	1kez	2 saat
Ketamin	75 mg/kg		i.p	1kez	2 saat
DMSO			i.p	7 kez	
CA	10 mg/kg		i.p	7 kez	
6-OHDA	6 µg/µL	2 µL	intrastriatal	1 kez	
Askorbik asit çözeltisi	% 0.3	2 µL	intrastriatal	1 kez	
Üretan	1.5 g/kg		i.p	1 kez	4 saat

### ***3.2.1. 6-OHDA ile Parkinson modeli oluşturulması***

PH modeli oluşturma aşamasından önce sıçanlar ketamin (75 mg/kg i.p.) + xylazine (10 mg/kg i.p.) kombinasyonu ile anestezi altına alındı. Stereotaksimetrik sistem yardımıyla (KOPF Model 5000) unilateral olarak sıçan beyninde KS'a girilip (Stereotaksimetrik koordinatlar Watson-Paxinos atlası kullanılarak Bregma'ya göre striatum için: Anterior-Posterior (AP): 1.60; Lateral (L): 2.6; Vertikal (V): 5.1) Hamilton mikroenjeksiyon enjektörü ile sham grupları için 2 µl askorbik asit çözeltisi, Parkinson modeli oluşturulan gruplar için toplam 2µl (6µg/µl) 6-OHDA çözeltisi enjekte edildi. Sıçanların vücut ısıları operasyon sırasında rektal termometre ve ısıtıcı ped aracılığı ile sabit tutuldu (37±0.5°C). İn vivo işlemler, hayvanlardaki gün içi ritim değişiklikleri göz önünde bulundurularak, her sıçan için günün aynı saatlerine denk getirilerek yapıldı. Operasyon sonrası kafatası üzerindeki kesi steril koşullarda dikkatlice dikilip, sıçanlar özel koşullarda farklı kafeslerde bakıma alındı.

### ***3.2.2. Karvakrol uygulanması***

4. gruptaki sıçanlara CA, 6-OHDA uygulamasından 1 saat sonra 10 mg/kg i.p. olarak DMSO içerisinde verildi. CA verilme işlemi 14 gün süreyle 2 günde bir tekrarlandı.

## **3.3. Histolojik incelemeler için yapılan işlemler**

### ***3.3.1. Perfüzyon fiksasyonu***

14. günün sonunda sıçanlar, üretan anestezisi (1.5 g/kg i.p) altında alınıp anestezi derinliği kontrol edildi. Sıçanların göğüs kafesleri, ksifoid kıkırdaklarından başlanıp göğüs kafesi içerisindeki organlara zarar verilmemesine dikkat edilerek açıldı. Sonrasında etrafındaki dokulardan uzaklaştırılan kalp, açığa çıkarıldı. Kalbin sol ventrikülüne, peristaltik bir pompaya bağlı olan kateter yerleştirildikten sonra kalbin sağ atriumuna bir

kesi atılarak, perfüzyon sıvısının çıkması sağlandı ve perfüzyon işlemine başlandı.

Perfüzyon işlemi için 37,5 C°'de fosfat tamponlu salin (PBS, pH:7,4) ve fiksatif (%4 Paraformaldehit) çözeltileri kullanıldı. Tampon çözelti vücuttaki kan boşalınca kadar (5dk., 100 ml) olacak şekilde verildi. Fiksatif çözelti ise tüm vücut istenen sertliğe ulaşınca kadar (10dk., 100 ml) uygulandı. Fiksasyon işleminin tamamlanmasının ardından sıçanın baş kısmı vücuttan ayrıldı ve kafatası açılarak beyin dokusu bir bütün olarak çıkarıldı. Beyin blokuna (Kopf PA-001) yerleştirilen beyin dokusundan striatal ve nigral bölgeleri içeren beyin alanları (Bregma 1.70 ile Bregma 0.80 arası) kesilerek fiksatif çözeltiliye alındı ve fiksatif çözelti içerisinde 1 gün bekletildi.

### ***3.3.2. İmmünohistokimyasal işlemler***

Fiksasyonu yapılan beyin doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak %4'lük paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 2 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 %100) geçirildiler. Sonrasında dokular şeffaflaştırılmak amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından erimiş parafine gömüldüler.

Hazırlanan parafin bloklardan 4 µ kalınlığında seri kesitler alındı. Bu seri kesitlerin ilkinde dopaminerjik nöronları belirlemek için TH, ikincisinde ise dopaminerjik nöron kaynaklı TRPC1 kanallarını belirlemek için TRPC1 işaretlemeleri yapıldı. Yine aynı şekilde ardarda alınan iki kesitin ilkinde astrositleri belirlemek için GFAP işaretlemesi ve hemen sonrasında alınan kesitten elde edilen preparatta da astrosit kaynaklı TRPA1 kanallarının işaretlemesi yapıldı. Bunun için kesitlere aşağıdaki immünohistokimya protokolü uygulandı.

### 3.3.3. İmmunhistokimyasal ikili boyama (TH-TRPC1 ve GFAP-TRPA1)

Tüm deney gruplarına ait beyin dokusu bloklarından pozitif şarjlı lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak deparifizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (%100, %96, %80, %70) edildi. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1'er dakika distile sudan geçirildi. Antigen maskesini kaldırmak için 1/10 dilue citrat buffer (AP-9003-999 Thermo scientific) mikrodalga ile uygulandı. Distile su ile yıkama aşamasından sonra 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika Protein Bloke (TA-125-PBQ ThermoScientific) edildi. Daha sonra seri kesitlerden birincisi anti-GFAP ile ve hemen takibeden ikinci kesit ise anti-TRPA1 primer antikoru ile aynı nemli ortamda 60 dakika süreyle ayrı ayrı lamlarda inkübe edildi. Diğer bir seri kesit grubu da aynı şekilde birinci kesiti anti-TH ile ve hemen takibinde ki ikinci kesiti de TRPC1 primer antikoru ile etüvde aynı şartlar altında inkübe edildi.

Tablo 3.2. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları

ANTİKOR	MARKA	KATALOG NO	DİLÜSYON
Anti GFAP antibody (fare antikoru)	Calbiochem	IF03L	1/100
Anti TRPA1 antibody (tavşan antikoru)	Millipore	ABN1009	1/100
Anti TH antibody (tavşan antikoru)	Sigma	T8700	1/100
Anti TRPC1 antibody (fare antikoru)	Santa Cruz	sc-133076	1/50

İnkübasyon sonrası GFAP ve TRPA1 ile boyanan kesitler DAB (Kahve rengi) ile konjuge edilmiş Goat anti-Mouse sekonder antikoru (BA1001-Boster Bio USA) ile; TH ve TRPC1 ile inkübe edilen kesitler ise Goat-anti Rabbit sekonder antikoru (BA1003-Boster Bio USA) ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Her aşamada PBS ile yıkama yapıldı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden



geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

İmmunopozitif hücrelerin sayımı sürecinde SN bölgelerinden ardarda alınan ve farklı boyaarla boyanan preparatların değerlendirilmesinde; her bir kesit immunoreaktivitesi seri halde değerlendirilmiş ve bu sayede birbirine komşu alanlardaki immunoreaktiviteler sıfıra yakın hata ile tespit edilmiş oldu. Örneğin GFAP ve TRPA1 ile yapılan değerlendirmede ilk kesit GFAP boyası ile boyandı ve ışık mikroskop altında GFAP (+) astrositler sayıldı. Daha sonra mikrotomda daha önceden bu kesitten bir sonra alınmış kesite ait preparat alınarak bu kez TRPA1 ile boyandı ve TRPA1 (+) astrositler sayıldı. Bu sayede aynı alanın 4 µ altındaki hemen hemen aynı yoğunlukta bulunan aynı tip hücrelerdeki immunoreaktivite değerlendirilerek görüntüler elde edildi. Boyama sonrası kesitlerde yer alan immunopozitif hücreler Nikon Nıs Elements 4.2 görüntü analiz programı ile sayıldı. Her grup ve her hayvan için istatistiki veriler oluşturuldu.

### **3.4. Gen Ekspresyonu**

SN ve KS beyin bölgelerine ait dokulardan dopaminerjik nöron ve astrosit hücrelerinin ribo nükleik asiti (RNA) izole edilerek hedef genler TRPA1 ve TRPC1 ile kontrol geni olan GAPDH'in haberci ribo nükleik asitlerinin (mRNA) kantitatif miktarlarını tespit etmek için RT/PCR tekniği kullanıldı.

#### **3.4.1. RNA izolasyonu**

Dopaminerjik nöron ve astrosit hücrelerinin RNA izolasyonu yapmak için PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies Corporation, KA, ABD) kullanıldı.

##### **3.4.1.1. Kullanılan çözeltiler**

- i.** 2-merkaptoetanol
- ii.** %70'lik etanol (ribonükleaz (RNaz) içermeyen saf su ile hazırlanmış.)
- iii.** %96-100'lük etanol

- iv. Lizis Solüsyonu (Kitin içinde bulunuyor.)
- v. Wash I (Kullanıma hazır şekilde kitin içinde bulunuyor.)
- vi. Wash II (Kitin içinde bulunuyor.)

Lizis solüsyonunu kullanıma hazır duruma getirmek için 2-merkaptetanol kullanıldı. Lizis ve homojenizasyon aşamalarında kullanılmak üzere lizis solüsyonu ile %1'lik 2-merkaptetanol solüsyonu hazırlandı.

Wash II solüsyonunu kullanıma hazır duruma getirmek için üzerine 60 ml %96-100'lük etanol eklendi.

#### 3.4.1.2. RNA izolasyon protokolü

RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpler içerisinde -80°C'de saklanan dopaminerjik nöron ve astrosit içeren dokular buz üzerine yerleştirilerek oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı.

RNA izolasyonu için aşağıdaki protokolü uygulandı:

1. Örnek sayısı kadar RNaz içermeyen 15 ml'lik santrifüj tüpleri taze 600 µl %1 oranında 2-merkaptetanol içeren lizis solüsyonu ile dolduruldu. Buz üzerinde eritilen doku örneklerinin her biri bu tüpler içersine yerleştirildi.
2. 15 ml'lik santrifüj tüpleri içerisindeki örnekler sonikatör cihazında (Vibra-cell VCX 750, Sonics & Materials Inc., CT, ABD) homojenizasyona tabi tutuldu.
3. Homojenat oda sıcaklığında 12.000xg'de 2 dk santrifüj edildi.
4. RNA içeren sıvı fazın hepsi RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 500 µl %70'lik etanol eklendi.
5. Sonrasında vortekslenerek karıştırılan örneklerin 700 µl'si kit içerisinde mevcut olan kolonlara aktarıldı.
6. Oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi.
7. Geri kalan kısım da en fazla 700 µl kullanılarak kolonlara aktarıldı. Aynı şartlarda santrifüj edildi. Santrifüj aşamaları sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı her defasında boşaltıldı.

8. Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II solüsyonları ile yapıldı. Örnekleri içeren kolonlara 700 µl Wash I eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi.
9. Örnekleri içeren kolonlara 500 µl Wash II eklenerek 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüplerin altındaki sıvı her defasında boşaltıldı.
10. Kolonlar hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Kolonlar yeni RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 50 µl RNaz içermeyen saf su ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
12. İnkübasyon sonrası kolon yerleştirilmiş mikrosantrifüj tüpleri 12.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
13. Santrifüj sonrası kolondan mikrosantrifüj tüpüne geçen sıvı kısım RNA içerdiğinden komplementer deoksiribo nükleik asit (cDNA) sentezi için kullanıldı. cDNA sentez aşamasına kadar RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

### 3.4.2. RNA konsantrasyonu ölçümü

Örneklerin RNA konsantrasyonları florometre cihazında (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies Corp., KA, ABD) Qubit® RNA BR Assay Kit (Life Technologies Corp., KA, ABD) kullanılarak ölçüldü. Örnek ölçümü yapılmadan önce kit içerisinde bulunan solüsyonlar ile çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonunun içeriği Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.3.** 200 µl Qubit çalışma solüsyonu içeriği

Çalışma Solüsyonu İçeriği	Hacim
Qubit® RNA BR Buffer	199 µl
Qubit® RNA BR Reagent	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>200 µl</b>

Kit içerisinde mevcut olan 0,5 ml'lik tüplerden standart ve örnek miktarı kadar hazırlandı. Her birine 190 µl çalışma solüsyonu eklendi. Üzerlerine standart ve örneklerden 10 µl eklenerek vortekslendi. Sonrasında oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı. Florometre cihazında önce standartlar okutularak standart eğrisi çizildi. Sonrasında örnekler okutularak standart eğrisine göre örnek konsantrasyonları belirlendi. En düşük örnek konsantrasyonu referans alınarak RNA konsantrasyonları eşitlendi.

### ***3.4.3. cDNA sentezi***

Konsantrasyonları eşitlenmiş RNA örneklerinden cDNA Sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corp., KA, ABD) kullanıldı. Kit içerisinde 10X RT Buffer, 25X dNTP mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase çözeltileri hazır halde bulunmaktadır.

cDNA sentezi toplam 20 µl reaksiyon haciminde gerçekleştirildi. Sentez için 10 µl RNA örneği, 2 µl 10X RT random primerler, 2 µl 10X RT tamponu, 0.8 µl 25X dNTP karışımı, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı (Tablo 3.4). Her örnek için ayrı ayrı hazırlanan PCR karışımları 0.2 ml PCR tüpleri içerisinde termal döngü cihazına (Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) yerleştirildi. Cihazda 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde cDNA sentezi protokolü yürütüldü. Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

**Tablo 3.4.** cDNA sentezi için PCR karışımı

Reaktif	Hacim
10X RT Tamponu	2 µl
25X dNTP Karışımı	0.8 µl
10X RT Random Primerler	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	4.2 µl
RNA Örneği	10 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>

#### 3.4.4. RT-PCR ile hedef genlerin cDNA amplifikasyonu

Ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primer ve problemlerin varlığında RT-PCR ile amplifiye edildi. RT-PCR protokolünde Taq Polimeraz içeren enzim kiti ile birlikte hedef genler TRPA1 ve TRPC1 ile internal pozitif kontrol geni GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz)'in amplifikasyonu için dizayn edilmiş primer-prob karışımlarını içeren kitler kullanıldı. Kullanılan kitler Tablo 3.5'de gösterilmiştir. Primer-prob karışımındaki problemler; Taqman kimyasına göre üretilmiş, parçalandığında floresan ışık saçan, hedef genlerin sekanslarına spesifik bağlanma yapabilen oligonükleotidlerdir.

**Tablo 3.5.** RT- PCR protokolünde kullanılan kitler

Malzeme	Marka	Katalog Numarası
TRPA1, TaqMan® Gene Expression Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD	Rn01473803_m1
TRPC1, TaqMan® Gene Expression Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD	Rn00585625_m1
GAPDH, TaqMan® Gene Expression Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD	Rn01775763_g1
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD	4444557

RT-PCR protokolünde her örnek için hazırlanan reaktiflerin miktarı Tablo 4'de gösterilmiştir. Reaksiyon karışımındaki cDNA dışındaki reaktifler örnek miktarına göre hazırlanarak 96 kuyucuklu PCR plakalarına dağıtıldı. Sonrasında her bir kuyucuğa cDNA örnekleri eklenerek PCR plakasının üstü optik yapışkan film ile kapatıldı. Kuyucuklar içerisindeki reaksiyon karışımının tamamen dibe çökmesi için PCR plakası 1500xg'de 2 dakika santrifüj edildi.

**Tablo 3.6.** RT-PCR karışımında kullanılan reaktifler

Reaktif	Hacim
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	7 µl
TaqMan® Gene Expression Assay	1 µl
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	10 µl
cDNA Örneği	2 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

RT-PCR protokol koşulları Uracil-N glycosylase inkübasyonu için 50°C'de 2 dk, polimeraz aktivasyonu için 95°C'de 2 dk, amplifikasyon için (45 siklüs) 95°C'de 1 sn, 60°C'de 20 sn olacak şekilde Applied Biosystems StepOnePlus™ RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) cihazına programlandı. PCR plakası cihaza yerleştirildikten sonra reaksiyon koşullarına göre yürütüldü.

RT-PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildikten sonra her örneğin CT (Threshold Cycle) değeri elde edildi. En doğru sonucu elde etmek için reaksiyon birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlandı.

Hedef gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduna göre karşılaştırmalı olarak yapıldı (Pfaffl, 2001).

$\Delta CT$  (Kontrol grubu) = Hedef genin CT değeri - Referans genin CT değeri

$\Delta CT$  (Uygulama grubu) = Hedef genin CT değeri - Referans genin CT değeri

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (Uygulama grubu) -  $\Delta CT$  (Kontrol grubu)

Normalleştirilmiş hedef gen ekspresyon seviyesi =  $2^{-\Delta\Delta CT}$

### 3.5. Western Blot Analizi

Herhangi bir doku örneği içerisindeki proteinler arasından tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak ve göreceli olarak deney grupları arasındaki miktarını karşılaştırmak (yarı kantitatif) için kullanılan yöntem WB denir.

Dopaminerjik nöron ve astrosit içeren beyin dokularında TRPA1 ve TRPC1 proteinlerinin göreceli olarak miktarlarını belirlemek için WB yöntemi kullanıldı. Hedef proteinlerin göreceli miktarlarını tayininde pozitif kontrol proteini olarak GFAP kullanıldı.

#### 3.5.1. Doku homejenatı hazırlanması ve protein izolasyonu

Dokuların parçalanarak homejenat hazırlanması ve protein izolasyonu için RIPA lizis solüsyonu kullanıldı. 1 ml RIPA lizis solüsyonu hazırlamak için kit prospektüsüne göre kullanılan çözeltiler Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.7.** 1 ml RIPA lizis solüsyonu için kullanılan çözeltiler

Çözelti	Hacim
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) Solüsyonu	10 µl
Sodium Orthovanadate Solüsyonu	10 µl
Protein İnhibitörü	20 µl
RIPA Tamponu	960 µl
<b>Toplam</b>	<b>1 ml</b>

İlk önce WB analizi için -80°C’de saklanan dopaminerjik nöron ve astrosit dokuları buz üzerine yerleştirilerek oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı. Her doku örneğinden 80 mg alınarak bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış örnekler sonrasında buz üzerinde proteaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 240 µl (Doku örneklerinin ağırlıklarına göre kit prospektüsünde belirtilen oranla hesaplandı.) RIPA lizis solüsyonu eklendi. Örnekler buz üzerinde sonikatör (Vibra-cell VCX 750, Sonics & Materials Inc., CT, ABD) yardımıyla üç kez 10 sn’lik parçalama işlemine tabi tutuldu. Buz üzerinde 30 dk inkübasyondan sonra +4°C’de 10000xg’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant fazda bulunan protein karışımı yeni bir

mikrosantrifüj tüpüne alınarak protein miktarının ölçümüne kadar -20°C'de saklandı.

### **3.5.2. Protein konsantrasyonu ölçümü**

Protein miktarının ölçümü Qubit Protein Assay Kit (Life Technologies Corp., KA, ABD) kullanılarak, Qubit 2,0 Fluorometer (Life Technologies Corp., KA, ABD) cihazında yapıldı. Örnek ölçümü yapılmadan önce kit içerisinde bulunan solüsyonlar ile çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonunun içeriği Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.8.** 200 µl Qubit çalışma solüsyonu içeriği

<b>Çözelti</b>	<b>Hacim</b>
Qubit Protein Buffer	199 µl
Qubit Protein Reagent	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>200 µl</b>

Kit içerisinde mevcut olan 0,5 ml'lik tüplerden standart ve örnek miktarı kadar hazırlandı. Her birine 190 µl çalışma solüsyonu eklendi. Üzerlerine standart ve örneklerden 10 µl eklenerek vortekslendi. Sonrasında oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı. Florometre cihazında önce standartlar okutularak standart eğrisi çizildi. Sonrasında örnekler okutularak standart eğrisine göre konsantrasyonlar belirlendi. En düşük örnek konsantrasyonuna göre bütün örnekler 100 µg/ml'ye eşitlendi.

### **3.5.3. Örneklerin jele yüklenmesi ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez işlemi**

Her biri 100 µg/ml protein içeren örnekler jele yüklenmeden önce denatürasyon yapan ve negatif yükle yükleyen ajanlar NuPAGE® Lityum Dodesil Sülfat (LDS) Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) ve NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) ile muamele edildi. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez'e (SDS-PAGE) yüklenecek toplam hacmi 20 µl olan karışımın



bileşenleri Tablo 3.9'de gösterilmiştir. Bu yükleme karışımı ısıtıcı tabla üzerinde 70°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra SDS-PAGE'e yüklemek için hazır duruma geldi.

**Tablo 3.9.** Jele yükleme karışımının içeriği

<b>Jele Yükleme Karışımın Bileşenleri</b>	<b>Hacim</b>
NuPAGE® LDS Sample Buffer	5 µl
NuPAGE® Sample Reducing Agent	2 µl
Protein Örneği	13 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

SDS-PAGE işlemi için Mini Jel Tank (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) sistemi kullanıldı. Poliakrilamid jel olarak bu sisteme uyumlu NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) hazır jel kasetleri kullanıldı. Jel kaseti Mini Gel Tank sistemine yerleştirildikten sonra tank NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) ile dolduruldu. Jelin ilk kuyucuğuna 10 µl MagicMark™ XP Western Protein Standard (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) ve 5 µl SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) karışımı eklendi. Geriye kalan kuyucuklara SDS-PAGE işlemi için hazır hale getirilmiş protein örneklerinden 20 µl yüklendi.

#### ***3.5.4. Protein örneklerinin nitroselüloz membrana aktarılması (blotlama)***

İlk olarak protein örneklerinin aktarılacağı nitroselüloz membran iBlot® 2 Transfer Stacks (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) hazır duruma getirildi. Poliakrilamid jel, jel kasetinden çıkartılarak dikkatli bir şekilde membran üzerine yerleştirildi. Sonrasında membran paketi blotlama için iBlot 2 Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) cihazına yerleştirildi. Cihaz içerisinde 9 dk blotlama işlemi uygulandıktan sonra membran bloklama ve antikor muamelesi hazır duruma getirildi.

### 3.5.5. Bloklama ve antikor uygulanması

Bloklama ve antikor muamelesi için iBind Western Device (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) sistemi kullanıldı. Bu sistemde kullanılmak üzere bloklama işlemi için 30 ml iBind solüsyonu hazırlandı. iBind solüsyonu, iBind™ Flex Solution Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) içerisinde mevcut olan Tablo 3.10'da belirtilen çözeltiler kullanılarak hazırlandı.

**Tablo 3.10.** iBind solüsyon içeriği

<b>iBind Solüsyon İçeriği</b>	<b>Hacim</b>
iBind Flex 5X Buffer	6 ml
iBind Flex 100X Additive	0,3 ml
Distile Su	23,7 ml
<b>Toplam</b>	<b>30 ml</b>

Antikor uygulaması için Anti-TRPC1 (ab75322, Abcam plc., Cambridge, İngiltere), Anti-TRPA1 (ab58844, Abcam plc., Cambridge, İngiltere) ve Anti-GFAP (ab7260, Abcam plc., Cambridge, İngiltere) primer antikorları ile Goat Anti-Rabbit IgG H&L (ab6722, Abcam plc., Cambridge, İngiltere) sekonder antikorunu 1/1000 oranında seyreltildi.

iBind cihazı iBind™ Flex Cards (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) ile çalışan bir sistemdir. Bu kartlardan bir tanesi cihaza yerleştirilerek kartın tüm yüzeyi 5 ml, tam ortası ise 1 ml iBind solüsyonu ile muamele edildi. Sonrasında proteinlerin aktarıldığı nitroselüloz membran iBind solüsyonu ile 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası proteinlerin aktarıldığı taraf karta bakacak şekilde membran iBind kart üzerine yerleştirilerek cihazın kapağı dikkatli bir şekilde kapatıldı.

Cihazın üzerinde dört adet kuyucuk bulunmaktadır.

Kuyucuklara sırası ile;

1. Kuyucuğa : 2 ml Primer Antikor,
2. Kuyucuğa : 2 ml iBind Solüsyonu,
3. Kuyucuğa : 2 ml Sekonder Antikor

4. kuyucuğa : 6 ml iBind Solüsyonu eklenerek membran cihaz içerisinde tüm gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

### **3.5.6. Kemilüminesans görüntüleme**

Kemilüminesans görüntüleme işlemi için alkalın fosfataz konjugatlı WesternBreeze™ Chemiluminescent Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, ABD) kullanıldı. Kemilüminesans boyama için kit içerisinde mevcut olan solüsyonlardan Tablo 3.11'deki hacim miktarlarına göre her membran için 2.5 ml kemilüminesans substrat solüsyonu hazırlandı.

**Tablo 3.11.** Kemilüminesans substrat solüsyonu

<b>Kemilüminesans Substrat Solüsyonu</b>	<b>Hacim</b>
Chemiluminescent Substrate	2,375 ml
Chemiluminescent Substrate Enhancer	0,125 ml
<b>Toplam</b>	<b>2,5 ml</b>

Membranın kurummasına izin vermeyen şeffaf plastik bir levha üzerine yerleştirildi. Yüzeyle temas etmeden membrana eşit şekilde 2,5 ml kemilüminesans substrat uygulandı. Reaksiyonun gerçekleşmesi için membran 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Kodak Gel Logic 1500 Molecular Imaging System (Eastman Kodak Company, NY, ABD) kemilüminesans görüntüleme cihazına yerleştirildi. Görüntüleme yapıldıktan sonra elde edilen veriler ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) programı yardımıyla dansitometre analizi yapılarak değerlendirildi. Yapılan dansitometre analizi sonucu elde edilen bant yoğunlukları GFAP ile normalize edilerek kat değişimi olarak grafiğe aktarılmıştır.

### 3.6. İstatiksel analiz

Verilerin normal dağılıma uyup uymadıklarını test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılıma uyan gruplarda One way ANOVA varyans analizi, normal dağılıma uymayan gruplarda ise Kruskal-Wallis H testi yapıldı. Sonuçlar  $\pm$ ortalama standart hata (SEM) olarak verildi.  $p < 0.05$  değeri anlamlılık düzeyi olarak belirlendi. İstatistiksel analizler için *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0* kullanıldı.



## 4. BULGULAR

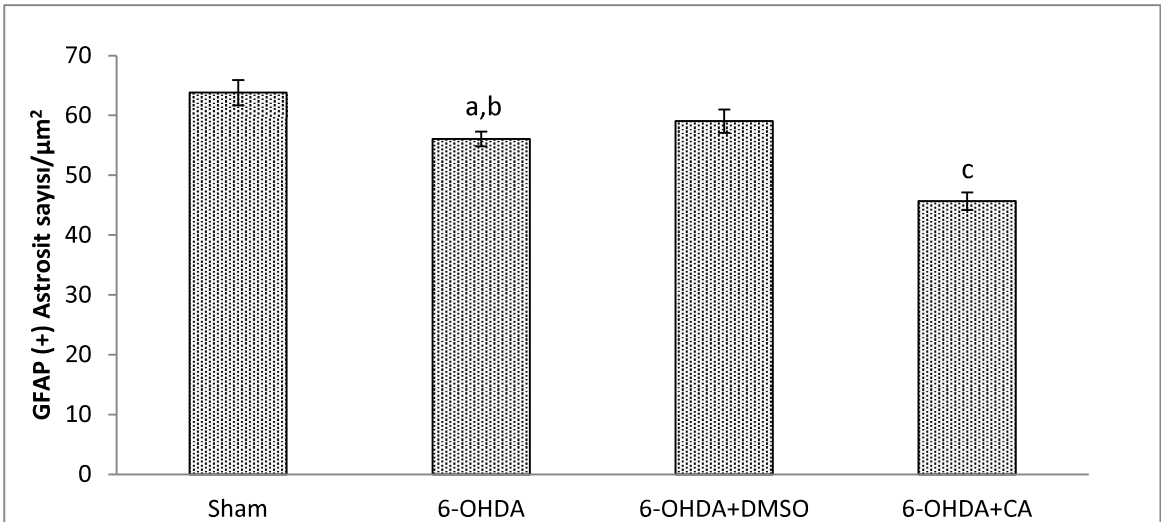
### 4.1. İmmünohistokimyasal Veriler

SNpc beyin bölgesini içeren beyin alanından alınan kesitlerden yapılan immünohistokimyasal işaretlemelere bağlı olarak, birim alanda ( $\mu\text{m}^2$ ) elde ettiğimiz hücre sayılarının ortalama değerleri Tablo 4.1. ve 4.2. ile Şekil 4.1., 4.2., 4.3. ve 4.4.'de gösterilmektedir.

**Tablo 4.1.** İmmünohistokimyasal olarak GFAP(+) astrosit ve TH(+) dopaminerjik nöron hücrelerinin ortalama sayıları

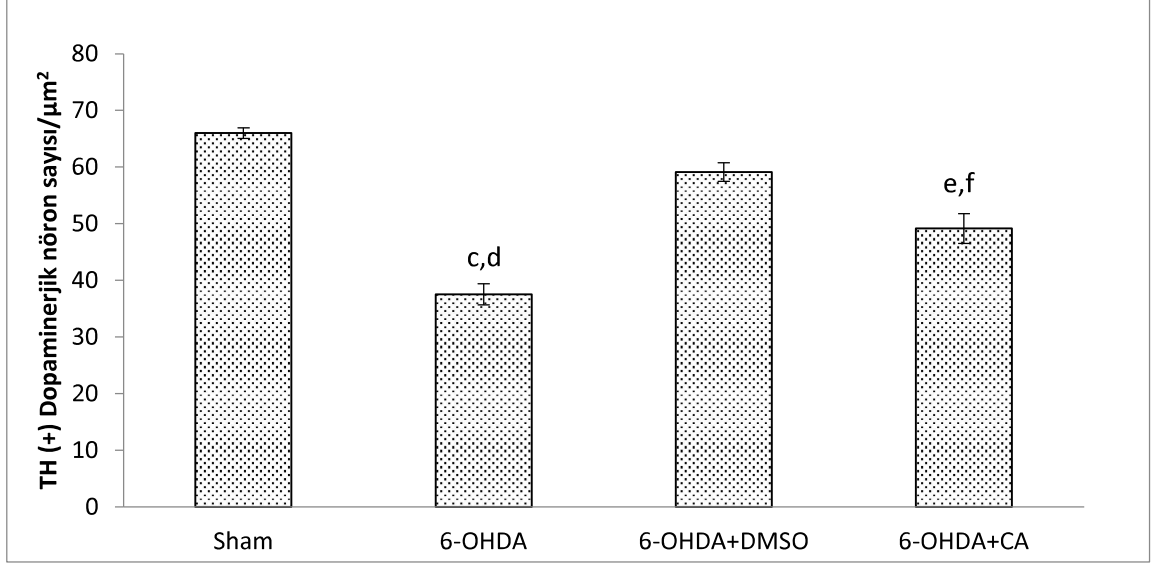
Grup	GFAP (+) Astrosit sayısı/ $\mu\text{m}^2$ (Ort $\pm$ SEM)	TH (+) Dopaminerjik nöron sayısı/ $\mu\text{m}^2$ (Ort $\pm$ SEM)
Sham (n=8)	63,79 $\pm$ 2,10	66,00 $\pm$ 0,94
6-OHDA (n=8)	56,05 $\pm$ 1,23 a,b	37,53 $\pm$ 1,84 c, d
6-OHDA+DMSO (n=8)	59,06 $\pm$ 1,94	59,11 $\pm$ 1,62
6-OHDA+CA (n=8)	45,68 $\pm$ 1,46 c	49,14 $\pm$ 2,62 e,f

- a:  $p < 0,05$ , sham grubuna göre  
b:  $p < 0,01$ , 6-OHDA+CA grubuna göre  
c:  $p < 0,001$ , sham ve 6-OHDA+DMSO gruplarına göre  
d:  $p < 0,01$ , 6-OHDA+CA grubuna göre  
e:  $p < 0,001$ , sham grubuna göre  
f:  $p < 0,01$ , 6-OHDA+DMSO grubuna göre



**Şekil 4.1.** İmmünohistokimyasal olarak GFAP(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.

- a:  $p < 0,05$ , sham grubuna göre  
b:  $p < 0,01$ , 6-OHDA+CA grubuna göre  
c:  $p < 0,001$ , sham ve 6-OHDA+DMSO gruplarına göre



**Şekil 4.2.** İmmünohistokimyasal olarak TH(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları. c:  $p < 0,001$ , sham ve 6-OHDA+DMSO gruplarına göre d:  $p < 0,01$ , 6-OHDA+CA grubuna göre e:  $p < 0,001$ , sham grubuna göre f:  $p < 0,01$ , 6-OHDA+DMSO grubuna göre

Şekil 4.1.'de gösterilen istatistiki değerlendirme sonucunda, parkinson oluşturmak amacı ile uygulanan 6-OHDA'nın kontrol grubuna göre astrositlerin GFAP(+) sayısında azalmaya yol açtığı görülmektedir. DMSO ve CA uygulanan grupların GFAP(+) hücre sayılarına bakıldığında, DMSO'nun astrosit sayılarında anlamlı olmayan azalmalara yol açarken, 6-OHDA+CA uygulanan grubun SNpc bölgesinde ki GFAP(+) hücre sayısının, diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. CA tek başına GFAP(+) hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. Buna rağmen sayılan astrositlerin, 6-OHDA uygulanan diğer gruplara göre morfolojik olarak daha sağlıklı bir nükleus ve hücre membran bütünlüğüne sahip olduğu görülmüştür.

Şekil 4.2.'deki sonuçlara göre, Sham grubuna kıyasla 6-OHDA uygulaması yapılan tüm gruplarda Dopaminerjik nöron TH(+) hücre sayısının azalması Parkinson modeli oluşturabildiğimizi göstermektedir. Parkinson grubuna göre CA uygulanan grubun hücre sayılarında artma vardır ama bu artış DMSO grubundan aşağıda kalmıştır. Buna rağmen 6-OHDA+CA grubunda TH(+) hücrelerin morfolojik bütünlüğü 6-OHDA+DMSO grubuna oranla çok daha sağlıklıdır. Bu CA'nın nöroprotektif etkilerini işaret etmektedir.

**Tablo 4.2.** İmmünohistokimyasal olarak TRPA1(+) astrosit ve TRPC1(+) dopaminerjik nöron hücrelerinin ortalama sayıları

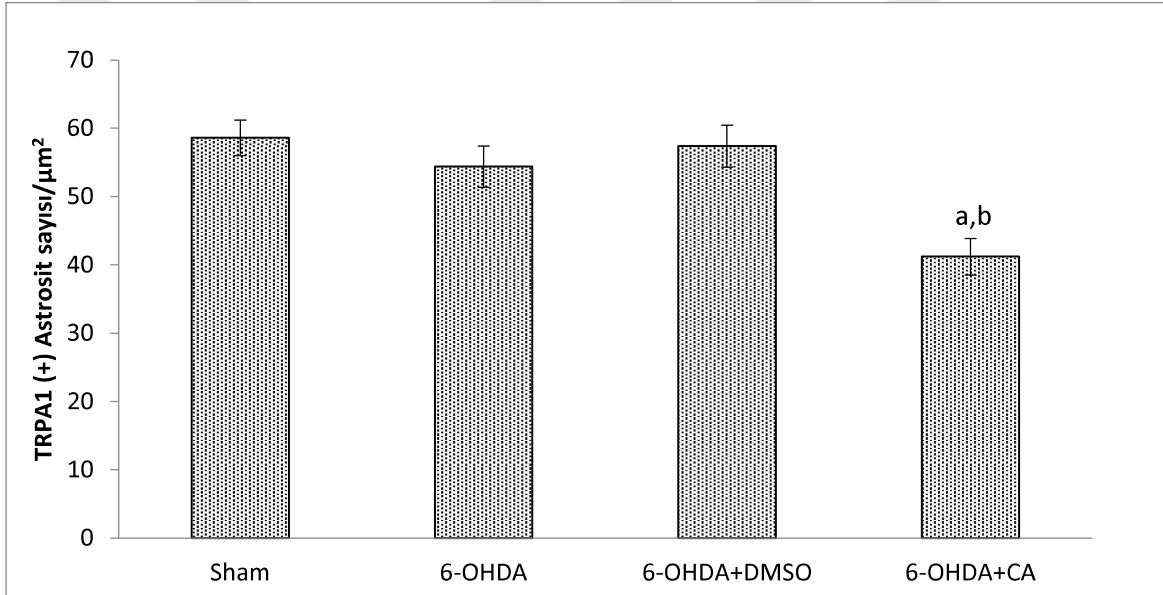
Grup	TRPA1(+) hücre sayısı/ $\mu\text{m}^2$ (Ort $\pm$ SEM)	TRPC1(+) hücre sayısı/ $\mu\text{m}^2$ (Ort $\pm$ SEM)
Sham (n=8)	58,62 $\pm$ 2,59	61,12 $\pm$ 0,89 c
6-OHDA (n=8)	54,39 $\pm$ 3,02	34,56 $\pm$ 4,35
6-OHDA+DMSO (n=8)	57,4 $\pm$ 3,07	55,89 $\pm$ 2,16 c
6-OHDA+CA (n=8)	41,21 $\pm$ 2,67 a,b	44,39 $\pm$ 3,07 a,d

a:  $p < 0,01$ , sham ve 6-OHDA+DMSO gruplarına göre

b:  $p < 0,05$ , 6-OHDA grubuna göre

c:  $p < 0,001$ , 6-OHDA grubuna göre

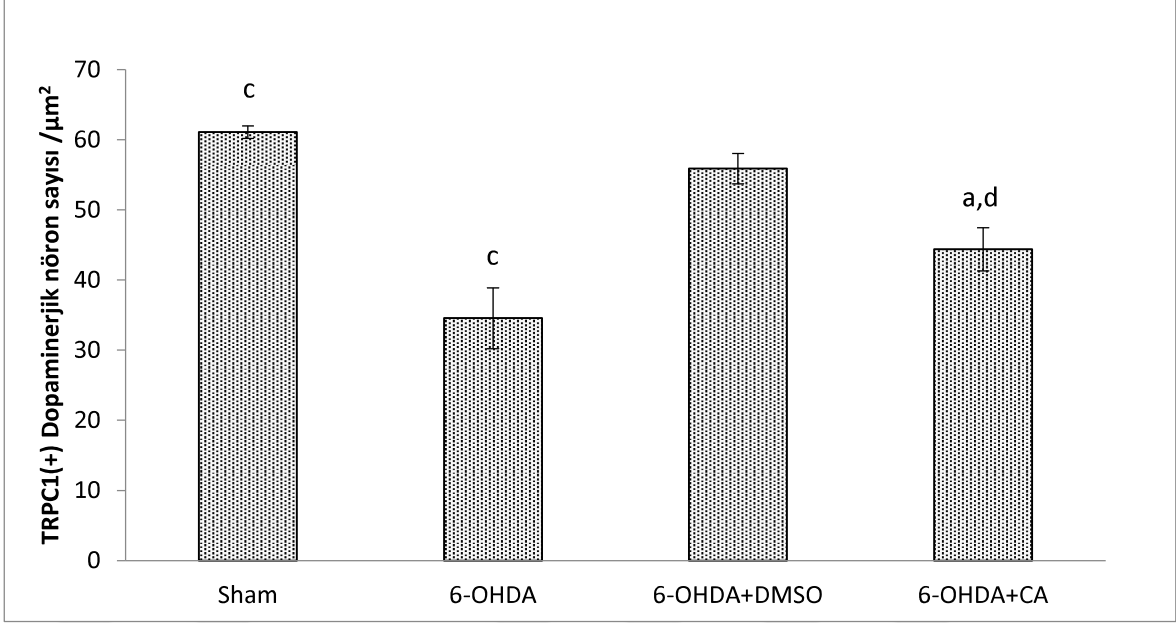
d:  $p < 0,05$ , 6-OHDA+DMSO grubuna göre



**Şekil 4.3.** İmmünohistokimyasal olarak TRPA1(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.

a:  $p < 0,01$ , sham ve 6-OHDA+DMSO gruplarına göre

b:  $p < 0,05$ , 6-OHDA grubuna göre



**Şekil 4.4.** İmmünohistokimyasal olarak TRPC1(+) işaretleme yapılan hücrelerin ortalama sayıları.

a:  $p < 0,01$ , sham ve 6-OHDA+DMSO gruplarına göre

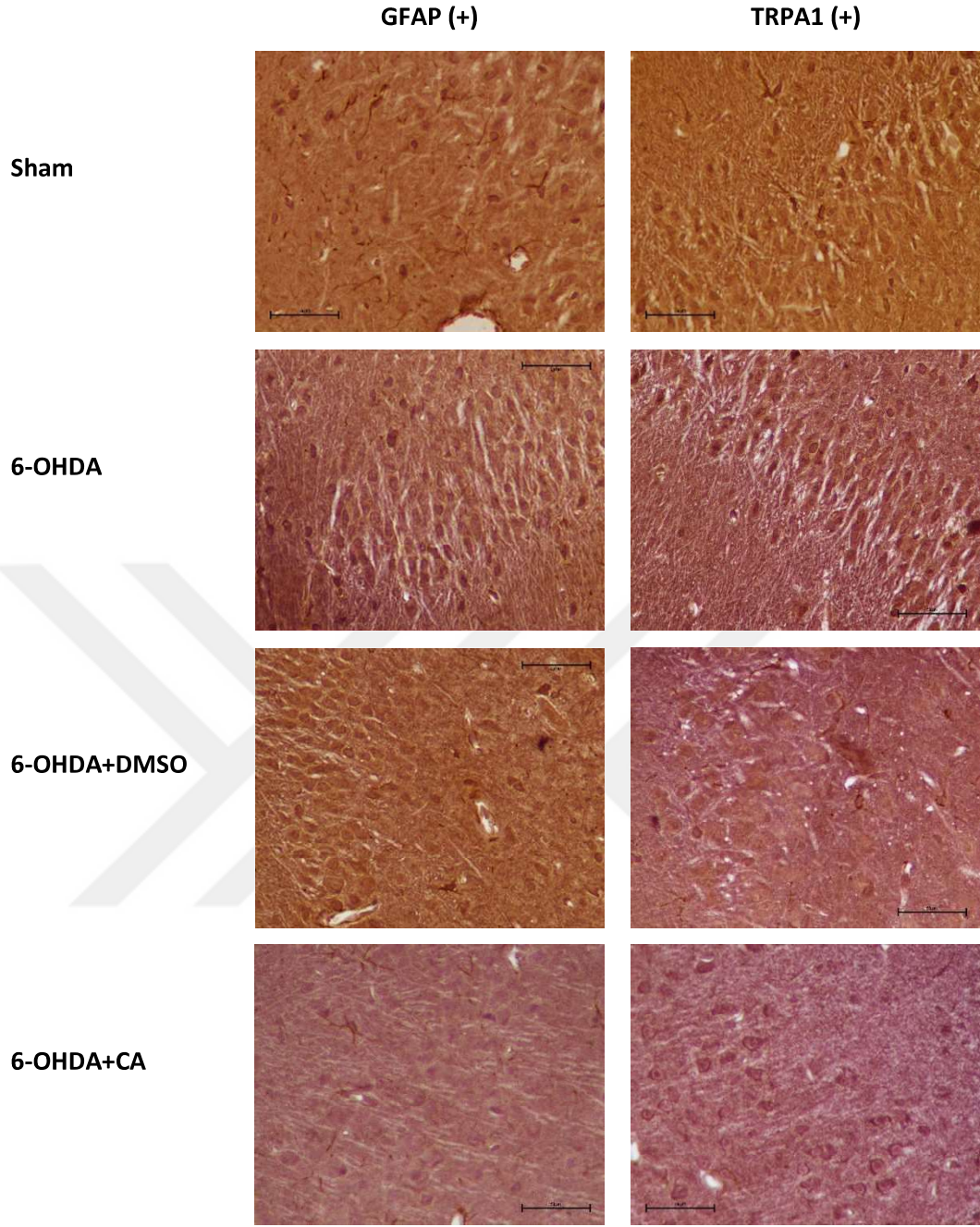
c:  $p < 0,001$ , 6-OHDA grubuna göre

d:  $p < 0,05$ , 6-OHDA+DMSO grubuna göre

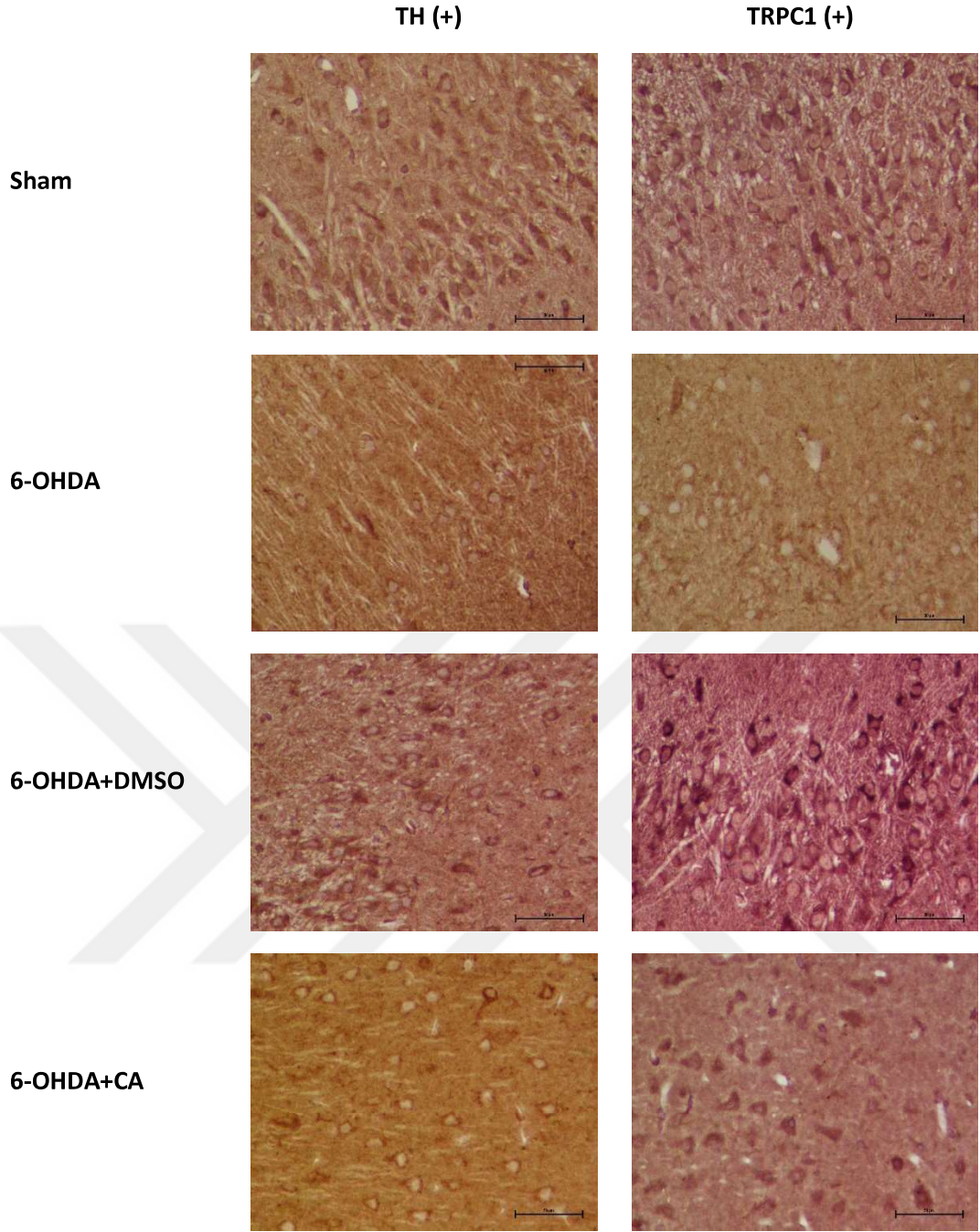
Tablo 4.2., Şekil 4.3. ve 4.4.'de gösterilen verilere bağlı olarak yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda 6-OHDA+CA uygulanan grubun TRPA1(+) hücre sayısı, diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Sham grubuna göre PH ve DMSO astrosit TRPA1 kanallarının immünreaktivitesi azalmıştır. Fakat CA grubunda TRPA1 (+) hücre sayısı azalmasına rağmen sayılan astrositlerin, morfolojik olarak daha sağlıklı bir nükleus ve hücre membran bütünlüğüne sahip olduğu görülmüştür. 6-OHDA+CA uygulaması TRPC1(+) hücre sayısını 6-OHDA verilen gruba göre anlamlı olarak artırmıştır. Ancak, 6-OHDA+DMSO verilen gruptaki TRPC1(+) hücre sayısı da 6-OHDA verilen gruba göre anlamlı olarak artmıştır. Bu sonuç DMSO'nun TRPC1(+) hücre sayısını arttırdığını düşündürsede gözlemlenen hücreler dejenere görünümündedir. CA grubundaki sayısı düşük olmasına rağmen hücrelerin morfolojik bütünlüğü 6-OHDA+DMSO grubuna oranla daha sağlıklıdır.

Her 4 grup için seri kesitlerden elde edilen GFAP(+)-TRPA1(+) ile TH(+)-TRPC1(+) hücre fotomikrografları Şekil 4.5. ve 4.6.'da gösterilmiştir.





**Şekil 4.5.** Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde SNpc bölgesindeki seri kesitlerden elde edilen GFAP(+)-TRPA1(+) işaretli astrosit hücre görüntüleri. Skala=50µm.



**Şekil 4.6.** Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde SNpc bölgesindeki seri kesitlerden elde edilen TH (+)-TRPC1(+) işaretli dopaminerjik nöron görüntüleri. Skala=50µm.

## 4.2. Gen Ekspresyon Sonuçları

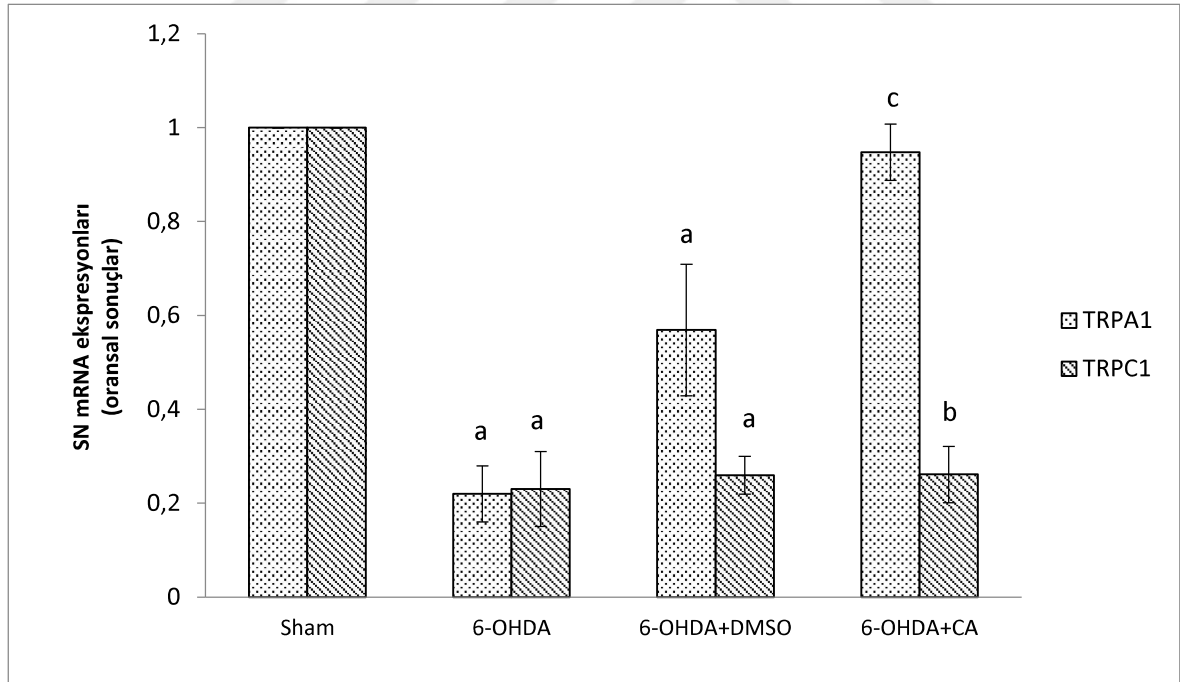
### 4.2.1. Striatum Nigra'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları

Striatum Nigra bölgesini içeren beyin doku örneklerindeki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları RT-PCR ile ölçülmüştür, Sham grubuna göre oranlanarak sonuçlar Tablo 4.3. ile Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** SN'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları

Grup	TRPA1 ekspresyonları (oransal $\pm$ SEM)	TRPC1 ekspresyonları (oransal $\pm$ SEM)
Sham (n=8)	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
6-OHDA (n=8)	0,22 $\pm$ 0,06 a	0,23 $\pm$ 0,08 a
6-OHDA+DMSO (n=8)	0,57 $\pm$ 0,14 a	0,26 $\pm$ 0,04 a
6-OHDA+CA (n=8)	0,95 $\pm$ 0,06 c	0,26 $\pm$ 0,06 b

a:  $p < 0,001$ , sham grubuna göre  
b:  $p < 0,01$ , sham grubuna göre  
c:  $p < 0,01$ , 6-OHDA grubuna göre



Şekil 4.7. Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde SN'da ölçülen TRPA1 ve TRPC1 gen ekspresyon sonuçları.

a:  $p < 0,001$ , sham grubuna göre  
b:  $p < 0,01$ , sham grubuna göre  
c:  $p < 0,01$ , 6-OHDA grubuna göre

6-OHDA uygulaması TRPA1 ekspresyon düzeyini anlamlı olarak azaltırken CA uygulaması TRPA1 ekspresyon düzeyini Sham grubuna yakın seviyelere yükseltmiştir. 6-OHDA uygulaması TRPC1 ekspresyon düzeyinde anlamlı azalmaya neden olurken CA uygulaması TRPC1 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

#### 4.2.2. *Korpus striatum'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları*

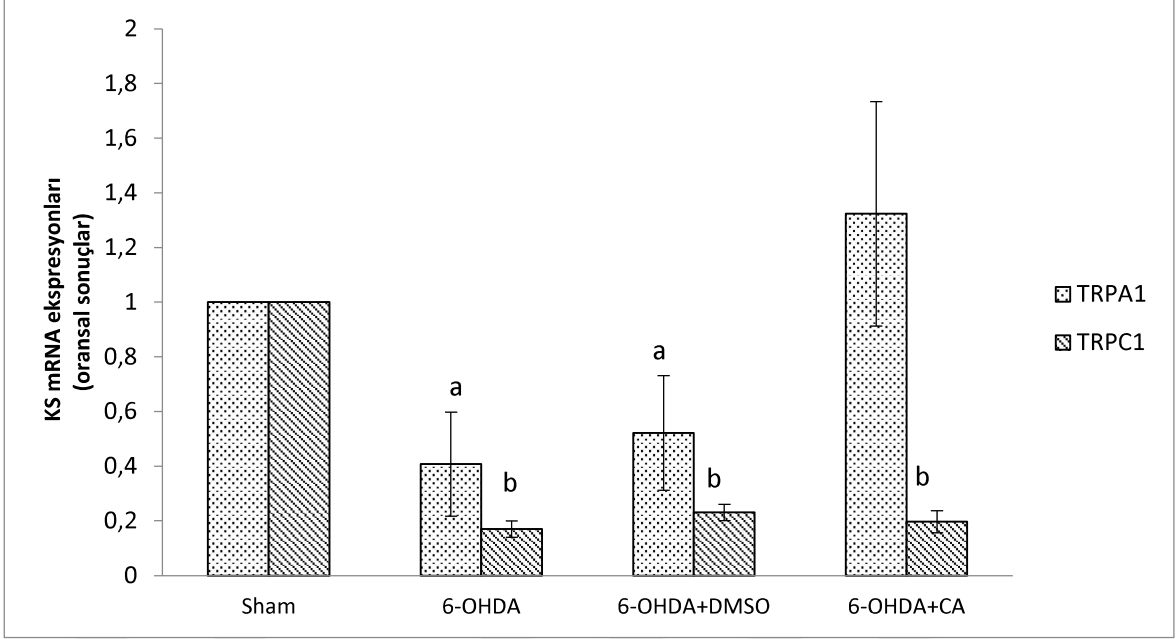
Korpus Striatum bölgesini içeren beyin doku örneklerindeki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları RT-PCR ile ölçülmüştür, Sham grubuna göre oranlanarak sonuçlar Tablo 4.4. ile Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** KS'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları

<b>Grup</b>	<b>TRPA1 ekspresyonları (oransal ± SEM)</b>	<b>TRPC1 ekspresyonları (oransal ± SEM)</b>
Sham (n=8)	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
6-OHDA (n=8)	0,41 ± 0,19 a	0,17 ± 0,03 b
6-OHDA+DMSO (n=8)	0,52 ± 0,21 a	0,23 ± 0,03 b
6-OHDA+CA (n=8)	1,32 ± 0,41	0,20 ± 0,04 b

a: p<0,05; sham grubuna göre

b: p<0,001; sham grubuna göre



**Şekil 4.8.** Sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan ve CA ile tedavi edilen deneysel Parkinson modelinde KS'da ölçülen TRPA1 ve TRPC1 gen ekspresyon sonuçları.

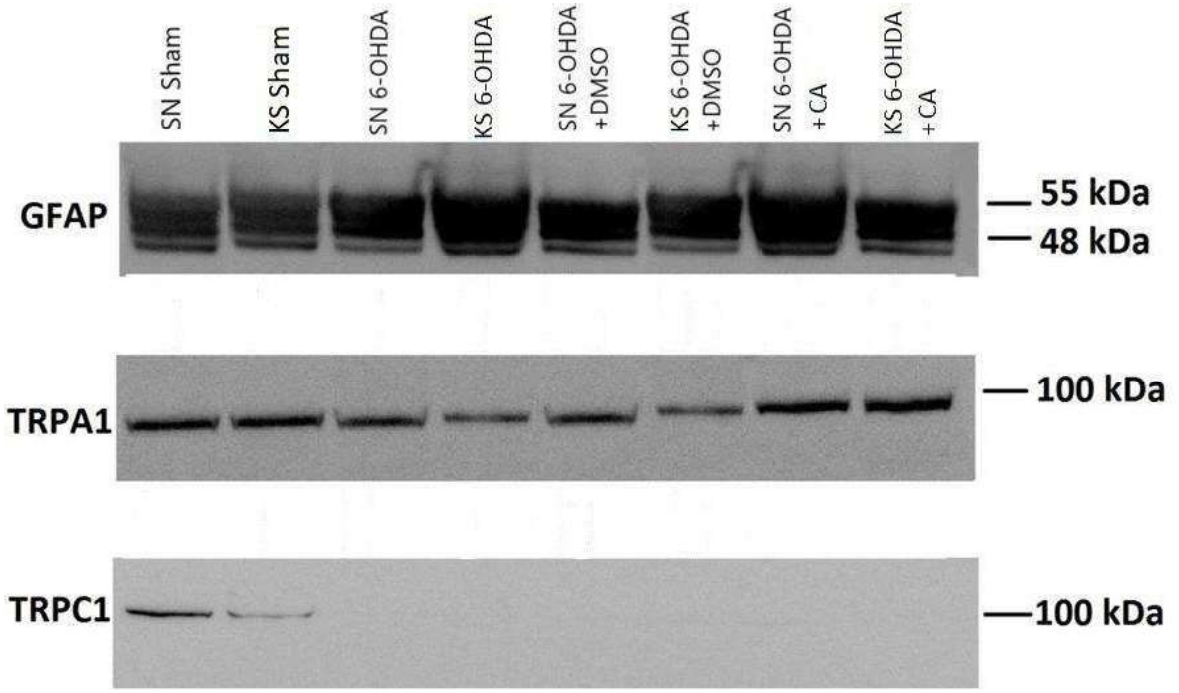
a:  $p < 0,05$ ; sham grubuna göre  
b:  $p < 0,001$ ; sham grubuna göre

6-OHDA uygulaması TRPA1 ekspresyon düzeyini anlamlı olarak azaltırken CA uygulaması TRPA1 ekspresyon düzeyini Sham grubu düzeylerine yükseltmiştir. 6-OHDA uygulaması TRPC1 ekspresyon düzeyinde anlamlı azalmaya neden olurken CA uygulaması TRPC1 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

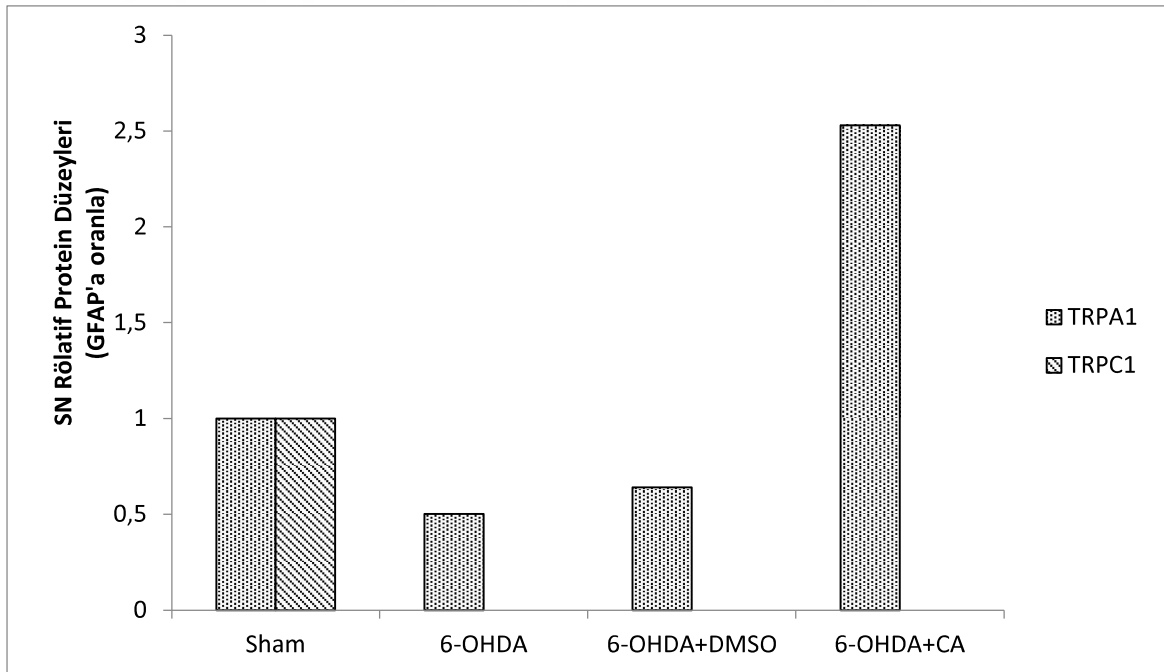
### 4.3. Western Blot Sonuçları

#### 4.3.1. Substantia Nigra'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları

Substantia Nigra örneklerindeki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları WB ile ölçülmüştür, Sham grubuna göre oranlanarak sonuçlar Şekil 4.9. ile Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. SN ve KS'daki TRPA1 ve TRPC1 protein bantlarının dansitometrik analizi gösterilmektedir.

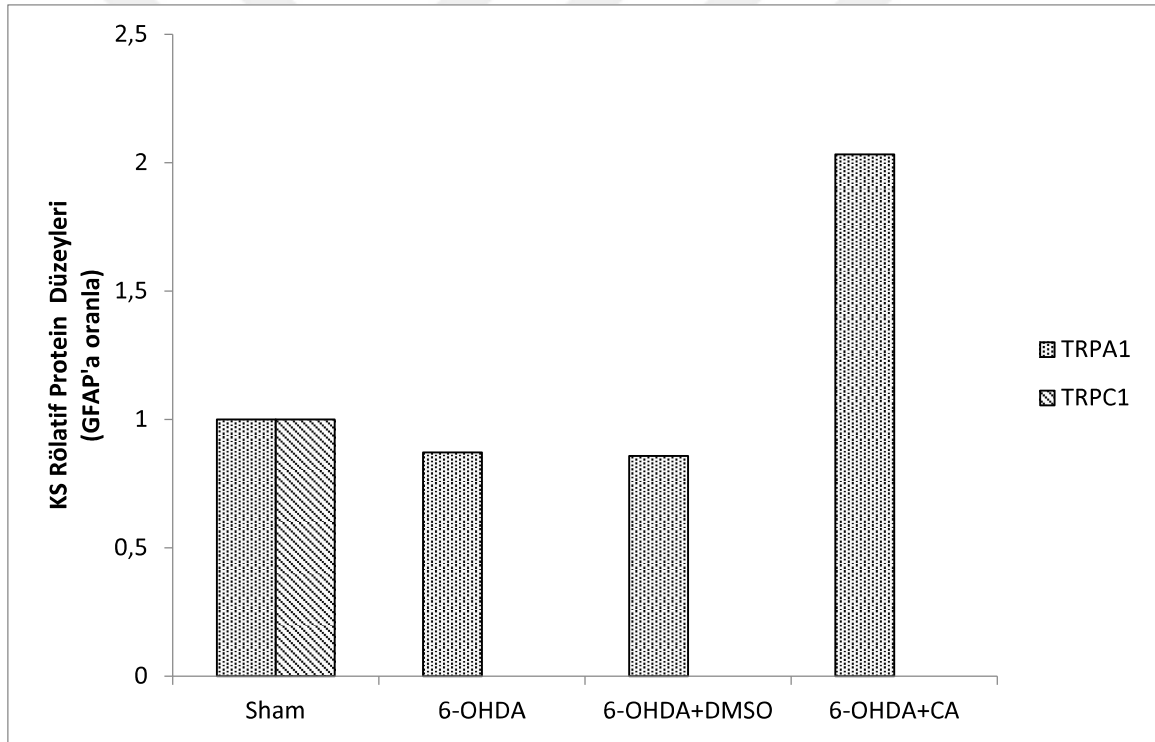


Şekil 4.10. SN'da TRPA1 ve TRPC1 protein bantlarının dansitometrik analizi gösterilmektedir. Veriler, sham grubuna kıyasla kat değişimi olarak ifade edilen toplam GFAP'a normalize edildi.

6-OHDA uygulaması TRPA1 protein düzeyini anlamlı olarak azaltırken CA uygulaması TRPA1 protein düzeyini Sham grubundan daha yüksek düzeylere artırmıştır. 6-OHDA uygulaması TRPC1 protein düzeyinde anlamlı azalmaya neden olurken CA uygulaması TRPC1 protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

#### 4.3.2. Korpus striatum'daki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları

Korpus striatum örneklerindeki TRPA1 ve TRPC1 ekspresyonları Western Blot ile ölçülmüştür, Sham grubuna göre oranlanarak sonuçlar Şekil 4.9. ile Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. KS'da TRPA1 ve TRPC1 protein bantlarının dansitometrik analizi gösterilmektedir. Veriler, sham grubuna kıyasla kat değişimi olarak ifade edilen toplam GFAP'a normalleştirildi.

6-OHDA uygulaması TRPA1 protein düzeyini azaltırken CA uygulaması TRPA1 protein düzeyini Sham grubunda daha yüksek düzeylere artırmıştır. 6-OHDA uygulaması TRPC1 protein düzeyinde anlamlı azalmaya neden olurken

CA uygulaması TRPC1 protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.





## 5. TARTIŞMA

Parkinson, SNpc'da ki dopaminerjik nöronların ölümü ile karakterize en yaygın nörodejeneratif hastalıkların başında gelmektedir. Hastalığın patogenezi üzerine yapılan çalışmalarda geline en son nokta  $Ca^{2+}$  homeostazisindeki anormallikler üzerine odaklanmaktadır. Bu nedenle nöronlara ve astrositlere  $Ca^{2+}$  girişinden sorumlu TRP ailesi kanallar ve bu kanalların modülasyonunda agonist ve antagonist etkiler gösteren monoterpenik bir bileşik olan CA ile çalışmayı amaçladık. SNpc dopaminerjik nöronlarına özellikle  $Ca^{2+}$  girişinden ve  $Ca^{2+}$  homeostazisinden sorumlu major TRP kanalı TRPC1, astrositlerde ise TRPA1 kanallarının olması çalışmamızın bu kanallar üzerine yoğunlaşmasına sebep olmuştur.

Çalışmamızda, 6-OHDA ile deneysel Parkinson modeli oluşturmayı amaçladığımız sıçanların SNpc beyin bölgelerinde immünreaktivite incelememizde 6-OHDA uygulanan gruplarda sham grubuna göre TH(+) hücre sayısının azaldığını gözlemledik. Bu bulgu bize deneysel Parkinson modeli oluşturabildiğimizi ispatladı. DMSO ve CA verilen grupların her ikisinde de TH(+) hücre sayısı 6-OHDA grubuna yani tedavisiz parkinson grubuna göre daha yüksekti. Benzer şekilde DMSO ve CA uygulamasının TRPC1(+) hücre sayısını 6-OHDA verilen gruba göre anlamlı olarak arttırdığını gözlemledik. Ancak DMSO grubunda hücreler dejenere ve membran yapıları bozuk iken tedavi grubumuzdaki hücrelerin membran yapısının daha sağlıklı olduğu, hücre bütünlüklerinin korunduğunu tespit ettik. Moleküler incelememize göre 6-OHDA'nın TRPC1 kanallarının gen ekspresyon ve protein düzeylerini anlamlı olarak azalttığını ve CA'ün anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bulduk. Astrosit TRPA1 kanallarının değerlendirildiği ilk araştırma olan çalışmamızın diğer sonuçlarına göre; Sham grubuna kıyasla 6-OHDA, 6-OHDA+DMSO ve 6-OHDA+CA gruplarında astrosit TRPA1 kanallarının immünreaktivitesinin azaldığını, fakat CA'ün, astrosit hücrelerinin membran bütünlüğünü korumada katkı sağlayarak hücrelerin daha sağlıklı görünmesine neden olduğunu gözlemledik. Diğer yandan moleküler sonuçlarımıza göre CA'ün astrosit TRPA1

kanallarının gen ekspresyon ve protein düzeylerini kontrol değerlerinin üzerinde arttırdığını bulduk.

PH'nın ana patolojik özelliği, SNpc dopaminerjik nöronlarının progresif dejenerasyonu ile ortaya çıkan, striatumdaki dopaminerjik deafferentasyondur. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, OS, enflamasyon, proteinlerin hatalı katlanması ve birikiminin nöronal hasara katkıda bulunduğu çeşitli çalışmalarda öne sürülmüştür (Tolleson ve Fang 2013). Bunların yanısıra son zamanlarda, Ca<sup>2+</sup> düzensizliğinin PH patogenezinde yer alması ihtimalinin lehine birkaç endikasyon ortaya çıkmıştır (Surmeier, Guzman, Sanchez & Schumacker, 2012). Bu nedenle, dopaminerjik nöronlardaki Ca<sup>2+</sup> kullanım özelliklerinin ve PH ile ilişkili proteinlerin hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazisinin kontrolündeki olası rolünün araştırılması son zamanlarda büyük ilgi görmüştür (Cali, Ottolini & Brini, 2011). Şimdiye kadar toplanan veriler, Ca<sup>2+</sup> sinyalindeki düzensizliklerin, PH patogenezindeki en erken olaylardan biri olduğunu ve SNpc dopaminerjik nöronlarının hücre içi Ca<sup>2+</sup> bozulmasına duyarlı olduğunu göstermektedir. L-tipi Ca<sup>2+</sup> kanal aktivitesinin veya TRP kanal aktivitesinin, muhtemelen mitokondriyal Ca<sup>2+</sup> tamponlama kapasitesinin değişimi ve ER-mitokondri etkileşiminin farmakolojik modülasyonunun, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için terapötik bir stratejiyi temsil ettiğini öne süren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle Ca<sup>2+</sup> kanallarının ve bu kanalların aktivasyonu ya da inhibisyonunda yer alan maddelerin kanallar üzerindeki etkilerinin incelenmesi ile hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak veya durdurmak yeni bir strateji olabilir. Tüm bunların sonucu olarak; sadece semptomatik tedavilerin yer aldığı PH için hastaların motor semptomlarını iyileştirebilecek ve PH seyrini değiştirebilecek yeni ilaçları belirlemeye yönelik çalışmalar önem arz etmektedir (Cali, Ottolini & Brini, 2014). Çeşitli araştırmalar, bitkisel ilaçlardan türetilmiş bir dizi saf bileşimin, PH'nın patogenezinde yer alan çoklu hedeflerin modülasyonu yoluyla in vivo ve in vitro PH modellerinde etkili olduğunu göstermiştir (Lins vd., 2018). CA, birçok aromatik bitkinin esansiyel yağlarında bulunan hem Ca<sup>2+</sup> kanalı olarak fonksiyon gören TRP katyon kanallarının bir düzenleyicisi, hem de

antioksidan ve nöroprotektif etkiler sunan ve son zamanlarda *in vivo* ve *in vitro* hayvan modellerinde beynin belirli alanlarında nöromodülatör özelliklere sahip olduğu gösterilmiş fenolik bir monoterpen olarak PH için umut vadeden maddelerden biridir (Suntres vd., 2015). CA'ün serebral iskemi (Chen vd., 2015), epilepsi (Khalil, Kovac, Morris & Walker, 2017), travmatik nöronal hasar (Li vd., 2015) ve PH modellerinde (Baluchnejadmojarad vd., 2014; Dati vd., 2017; Haddadi vd., 2017) olası etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmış ve yararlı etkileri yönünde kanaatlar artmıştır. Bu nedenlerle 6-OHDA ile oluşturulmuş hemiparkinson sıçan modelinde CA'ün dopaminerjik nöron TRPC1 ve astrosit TRPA1 kanalları üzerine olan etkilerini incelemenin PH'nda bazı mekanizmaları aydınlatmada ve tedavide fayda sağlayacağını düşündük.

Literatürü incelediğimizde, CA'ün PH üzerindeki etkilerini araştıran az sayıda başka çalışmaların da var olduğunu gördük. Fakat bu çalışmalar CA'ün yararlı etkilerini gösterse de bunun altında yatan moleküler mekanizmaları açıklamak için yetersiz kalmaktadır. Örneğin; CA'ün *i.p.* uygulaması, antioksidan etkisi ile (Baluchnejadmojarad vd., 2014) 6-OHDA ile oluşturulmuş hemiparkinsonizm sıçan modelinde; 6-OHDA tarafından indüklenen davranışsal bozukluklar üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir. Zotti ve arkadaşları, CA'ün sıçanlarda beyin nörokimyası ve davranışsal sonuç üzerindeki etkilerini tanımlamak üzere yaptıkları çalışmada; sıçanlarda oral CA uygulamasının prefrontal korteks ve hipokampusteki etkisini gözlemlemek için biyolojik amin düzeyini ölçmüşler ve CA'ün dopamin ve serotonin seviyelerini arttırabildiğini, böylece dopaminerjik sistem de dahil olmak üzere MSS'deki nörotransmitter sistemlerini modüle edebildiğini bildirmişlerdir. Verilerine göre; CA'ün düşük dozda nörotransmitterlerin modülasyonu yoluyla nöronal aktiviteyi açıkça etkileyen beyin-aktif bir molekül olduğunu, düzenli olarak düşük konsantrasyonlarda alındığı takdirde, iyileşme sağlayacağını ve muhtemelen olumlu güçlendirici etkileri olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Zotti vd., 2013). Lins ve arkadaşları, CA'ün RES kaynaklı PH sıçan modelinde etkisini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında 30 gün boyunca tüm sıçanlara gün aşırı subkutan olarak 0.1 mg / kg RES ve 14 sıçana 12.5 mg / kg,

farklı 14 sıçana da 25 mg / kg dozlarında i.p. olarak CA uygulaması yaparak sıçanları çeşitli davranış testlerine tabi tutmuşlar ve tedavi bitiminde perfüze ettikleri beyin doku örneklerinde immünohistokimyasal olarak dopaminerjik nöronları TH ile işaretlemişlerdir. Davranış testi sonuçları CA'ün RES tarafından indüklenerek PH oluşturulan sıçanlarda katalepsi davranışındaki artışı ve boş çiğneme hareketlerinin sayısını önlediğini, ancak açık alan lokomotor aktivitesini geri döndürmediğini, ek olarak her iki dozdaki CA'ün, SNpc ve dorsal striatumda TH immün boyamasındaki azalmayı önlediğini göstermiştir. Birlikte ele alındığında sonuçlar, CA'ün RES tarafından indüklenen sıçan PH modelinde motor ve nörokimyasal bozuklukları önleyen koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Lins vd., 2018). Ayrıca Dati ve arkadaşları 6-OHDA ile oluşturdukları hemiparkinson modellerinde, CA tedavisi uyguladıkları grupta TH(+) dopaminerjik hücre sayısını parkinson grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. 6-OHDA (parkinson) gruplarında tespit edilen ( $45 \pm 13$ ;  $p < 0.05$ ) yaklaşık %55'lik bir düşüşün CA ( $92 \pm 13$ ) ile muameleden sonra tamamen ortadan kalktığı görülmüştür. Sonuçlarına göre TH için immüno-blotlama, CA ile olası bir nöroproteksiyonu doğrulamıştır. CA ön işlemi TRPM7 inhibisyonu yoluyla immüno-boyama deneylerinde 6-OHDA modelinde belirgin bir nörolojik koruma sağlamıştır (Dati vd., 2017). 2015 yılında Chen ve arkadaşları da iskemik beyin hasarında CA ile TRPM7 inhibisyonunun hipokampal nöronlarda sağ kalımı arttırdığını bulmuşlardır. İmmüno-floresan boyama sonuçları; CA'ün kültürlenmiş nöronları anoksik toksisiteten koruyabildiğini göstermektedir (Chen vd.,2015).

Bizim sonuçlarımız da Lins, Dati ve Chen'in arkadaşlarıyla yaptıkları çalışmaların bulgularına benzer olarak CA'ün yararlı etkilerini desteklemektedir. Verilerimize göre tedavi grubumuzda TRPC1(+) hücre sayısı 6-OHDA grubuna göre anlamlı olarak yüksektir. Bu artış 6-OHDA+DMSO gruplarında da görülmüştür fakat bu grubun preparatlarında incelediğimiz dopaminerjik nöronlar dejenere haldedir, 6-OHDA+CA gruplarındaki nöronlar ise çok daha sağlıklı görülmektedir. Tahminimize göre deney süremizi uzatmamız sayıca fazla ama dejenere görünümde olan 6-OHDA+DMSO

grubundaki hücrelerin ölümüne neden olacakken, CA grubumuzda sağlıklı görünümdeki TRPC1(+) hücrelerin sayıca artmasını sağlayacaktır. Bu da bize CA'un dopaminerjik nöronlar üzerindeki koruyucu etkisini TRPC1 kanallarını inhibe ederek yaptığını düşündürmektedir. RT-PCR ve WB sonuçlarımıza göre CA'ün, TRPC1 gen ekspresyonu ve protein düzeylerini arttırmaması inhibisyonu işaret etmektedir. Ama mevcut verilerimizle dopaminerjik nöronların tedavi grubumuzdaki bu sağlıklı halini tamamen TRPC1 kanallarına bağlamak mümkün değildir. Birçok çalışmada TRPM7 kanal aktivitesinin artışının nöron ölümüne yol açtığı ortaya konmuş bir bilgidir. Dati ve Chen yaptıkları çalışmalarda CA'ün TRPM7 kanallarını inhibe etmesinin nöroprotektif etki sağladığını göstermişlerdir; belki de bizdeki hücrelerin iyilik halinin nedeni de CA'ün farklı TRP kanalları üzerindeki etkilerinin toplam sonucudur. Bu nedenlerle CA'ün farklı TRP kanalları ve Ca<sup>2+</sup> kanalları üzerinde de modülatör etkinliğe sahip olmasını akıldan çıkarmamak ve daha spesifik incelemelerde bulunmak gereklidir.

Çalışmamızda hidrofobik bir bileşik olan CA'ün enjeksiyon formunu, bu tür bileşiklerden ilaç çözeltilerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan polar bir organik çözücü olan DMSO'da çözerek hazırladık. DMSO'nun hem periferik hem de MSS nöronları üzerindeki klinik etkilerini açıklamaya çalışan ve eksitotoksik - nörodejeneratif koşulların tedavisinde DMSO için potansiyel kullanım öneren çeşitli yayınlar mevcuttur. DMSO'nun antioksidan, analjezik ve antienflamatuar etkiler dahil olmak üzere hücre ve dokulardaki çeşitli etkileri belgelenmiştir (Lu & Mattson, 2001). Ayrıca, DMSO'nun kemirgenlere sistemik (periton içi veya intravenöz) uygulanmasının, deneysel inme modellerinde (Phillis, Estevez & O'Regan, 1998) ve travmatik beyin yaralanmasında (de la Torre, 1995.) nöronal hasarı azaltabildiği rapor edilmiştir. Lu ve Mattson yaptıkları çalışmalarında; DMSO'nun glutamatın NMDA ve AMPA reseptörlerine bağlı iyon akımlarını ve Ca<sup>2+</sup> akışını baskılayarak hipokampal nöronları glutamat eksitotoksitesinin neden olduğu eksitotoksik ölüme karşı koruyabildiğini göstermişlerdir (Lu & Mattson, 2001). Fakat DMSO'nun MSS'inde patolojik etkileri de bulunmaktadır. Yuan ve

arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışma DMSO'nun astrosit hücre kültüründe mitokondriyal hasar, OS, membran potansiyelinde değişiklikler, kaspaz 3 aktivitesinde artışa ve sonunda apoptoza neden olarak astrosit toksisitesinde rol oynadığını ortaya koymaktadır. % 1'lik konsantrasyonlardaki DMSO, 24 saatlik bir maruz kalma süresinde hayatta kalma ve apoptoza neden olmasa da, hücre canlılığını, mitokondriyal bütünlüğü ve astrositlerin glutamat ekspresyonunu bozmaktadır. Bu sonuçlar bize DMSO'nun astrositler üzerinde sitotoksik etkileri olduğunu göstermektedir (Yuan vd., 2014). Bir başka çalışma da ise DMSO'nun  $\leq\%0.5$  konsantrasyonlarında nöron sayısı veya nöronal markerların ekspresyonu üzerinde 24 saate kadar bir etkisi olmazken,  $\geq\%1.0$  konsantrasyonlarda 12 saat sonra bile hem canlılıkta hem de nöronal markerların ekspresyonunda progresif ve dramatik bir kayıp yarattığını bulmuşlardır. Buna göre; [DMSO]  $\geq\%0.5$  konsantrasyonlarının, nöronal morfolojiyi belirgin şekilde bozabileceği ve kısa süreli maruziyetten sonra bile canlılığı azaltacağı ayrıca astrositlerde de düşük dozlarda reaktif astrogliozisi tetikleyebileceği sonucuna varmışlardır. Bu nedenle; sinir hücrelerinin tedavisinde kullanılan ya da kullanılacak maddelerin etkilerini maskeleyememek ve çözücü etkilerini engellemek için [DMSO]  $\leq\%0,25$  olmalıdır (Zhang vd., 2017). Bizim immünohistokimyasal sonuçlarımıza göre 6-OHDA-DMSO grubunda TRPC1(+) hücre sayısı tedavi grubumuza göre daha yüksek bulunmuştur. Fakat hücrelerin görüntüsü apoptotik ve dejenere bir haldedir. Çözücü olarak kullanılan DMSO apoptotik süreci başlatmış ve CA nöroprotektif etkisiyle bir kısım nöronun sağkalımını ve sağlıklı görülmelerini sağlamıştır. Astrosit TRPA1(+) hücre sayısı da 6-OHDA+DMSO grubunda tedavi grubuna göre daha yüksektir; fakat DMSO grubunda hücrelerin immün reaktivitesi daha düşük ve morfolojileri daha sağlıksızdır. Muhtemelen DMSO astrositlerde de toksik etki yaratmış ve hücrelerde apoptotik süreci tetiklemiştir. Öte yandan tedavi grubumuzda TRPA1'in protein ve gen ekspresyon düzeyleri CA'nın etkisiyle artmaktadır. Böylece CA, DMSO'nun toksik etkisine karşı, astrositlerin sağkalımında etkili olmuştur.

Ca<sup>2+</sup> homeostazını korumak; nörodejenerasyon, kanser ve yaşlanma gibi hastalık koşullarında hücre sağkalımı ve hücre ölümü gibi çeşitli ve bazen zıt süreçleri düzenlemek için gereklidir. Ayrıca Ca<sup>2+</sup> sinyali, beyin gelişimi sırasında nöron ve glial hücrelerin gelişimi ve olgunlaşması için en önemli sinyallerden biridir. PH'na yol açabilecek birçok faktör tanımlanmıştır, ancak bunların hemen hepsi doğrudan veya dolaylı olarak Ca<sup>2+</sup> sinyalleşmesine bağlıdır. Önemli olarak, Ca<sup>2+</sup> homeostazındaki bozukluklar, PH'nda ve diğer nöronal hastalıklarda yer almasına rağmen, Ca<sup>2+</sup> kanalının kimliği hastalık oluşumunda belirleyici olmaya devam etmektedir. Ca<sup>2+</sup> kanalları arasında yer alan TRPC kanal ailesinin üyeleri, özellikle PH'da ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda önemli roller üstlenmektedirler (Sukumaran, Schaar, Sun & Singh, 2016; Chen vd., 2017). Nöronların yanı sıra astrositler de, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda, nöronal sağkalım ve fonksiyona aracılık etmede, doğrudan, aktif ve kritik öneme sahiptirler. Astrositler de, PH'ndaki nörodejeneratif süreçleri etkileyebilecek bazı potansiyel mekanizmalarda yer almaktadırlar (Rappold & Tieu, 2010). Çeşitli çalışmalar astrositlerin iyon kanallarını ve taşıyıcıları ifade ettiğini göstermektedir ve astrosit Ca<sup>2+</sup> sinyallerinin sinaptik fonksiyon ve plastisitede rolü olduğuna dair lehte ve alehte kanıtlar vardır. Astrositlerde ifade edildiği bilinen TRP kanallarından birisi de TRPA1'dir (Shigetomi vd., 2012). Ca<sup>2+</sup> homeostazının korunmasında TRP kanallarının işlevsel düzenlemesinin, benzersiz lokalizasyonlarının ve diğer Ca<sup>2+</sup>-duyarlı elementlerle etkileşimlerinin pek çok farklı hücresel süreçte rol aldığına ve bu yolları tanımladığına dair çok sayıda kanıt ortaya çıkmaktadır. Aynı ayrı her TRP kanalının, hücrelerin kaderinin düzenlenmesinde farklı katkılarda bulunmasına izin veren ve belirli bir kanal üzerinden Ca<sup>2+</sup> sinyalini modüle etmenin kesin etkisini belirleyen bu benzersiz işlevleridir (Sukumaran vd., 2016; Chen vd., 2017). Parnas ve arkadaşları CA'ün termosensif TRP kanalları olan TRPA1 ve TRPV3'ün aktivatörü; non-termosensif kanallar olan TRPL, TRPC ve TRPM kanallarının inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir (Parnas, 2008). Biz de bu bilgilerimize dayanarak çalışmamızı TRP kanalı ailesinin memelilerde ilk keşfedilen türü olan TRPC1,

astrozitlerde varlığı tespit edilmiş olan TRPA1 ve kanalların ortak düzenleyicisi olan CA'un, PH modelimizde bu kanallar üzerinden olası yararlı etkilerini ortaya koymak üzerine kurguladık.

TRPC kanalları, dopaminerjik nöronlarda ifade edilen ana  $Ca^{2+}$  kanallarıdır ve TRPC1 gibi bazı üyeleri depo kontrollü  $Ca^{2+}$  kanalı olarak görev alırlar. TRPC1 kanalları, nöronal sağkalımda, nöronal rejenerasyonda önemli bir rol oynar ve nöronları nörotoksik hasardan korurlar. Kanıtlar ayrıca TRPC1'in, PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığını ve nörotoksinlere maruz kaldığında dopaminerjik nöronların hayatta kalmasını düzenlediğini göstermektedir (Chen vd., 2017; Sun vd., 2017). PH modellerinde, SOCE (store operated  $Ca^{2+}$  entry) kanallarının kaybının ER stresini ve dopaminerjik nöronların işlev bozukluğunu / dejenerasyonunu tetikleyen başlıca unsurlardan birisi olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (Secondo, Bagetta & Amantea, 2018). Örneğin; Selvaraj ve ark. fare nörotoksin bazlı bir PH modelinde, dopaminerjik nöronların plazma zarındaki TRPC1 kanallarından  $Ca^{2+}$  akışı azalmasının, ER'de katlanmamış protein yanıtını arttırarak hücre ölümüne neden olan ER stresini tetiklediğini bildirmiştir (Selvaraj vd., 2012). Bu bulgular, TRPC1 kanallarının normalde  $Ca^{2+}$  kaynaklı sinyal yollarında işlev gösterdiğini, metabolik ve OS'e karşı adaptif / nörotrofik tepkileri birleştirdiğini ve bu yolların bozulmasının PH'na katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedir (Mattson, 2012). He ve arkadaşları ise; TRPC1 eksikliğinin yüzme testi, modifiye açık alan testi ve ayçiçeği tohumu yeme testi ile ölçülen hareket bozukluklarına olan etkilerini inceledikleri 5 aylık çalışmalarının sonunda, denek farelerin beyin doku örneklerinde immünfloresans boyama yaparak TRPC1 nakavt farelerin, vahşi tip farelerin BG bölgelerine kıyasla hem NeuN-pozitif hücrelerinde hem de TH-pozitif hücrelerinde önemli bir kayıp olduğunu göstermişlerdir. Birlikte ele alındığında, bu veriler TRPC1'in BG'nin nöronal hücrelerinin apoptozunu inhibe ederek motor fonksiyonunun kontrolünde rol oynadığını göstermektedir (He vd., 2016). Ayrıca Chen ve arkadaşları, tiroid hormonlarının TRPC1 aracılı olarak dopaminerjik nöron gelişimine ve sağkalımına katkı sağlayarak motor



kontrolde rol oynadığını ortaya koymuştur (Chen vd., 2017). Öte yandan Peters ve arkadaşları ise TBH sonrası TRP kanallarının inhibe edilmesinin, MSS'i nöronlarının ölümünün önlenmesi için etkili bir strateji oluşturduğunu bulmuştur. Araştırmacılar, TBH sonrasında farelere TRPC kanal inhibisyonuna neden olan CA vererek CA'ün birkaç hafta boyunca fonksiyonel iyileşme üzerindeki etkilerini takip etmiş ve TBH sonrası nörolojik iyileşmenin CA uygulaması ile önemli ölçüde arttığı görmüştür. CA uygulaması ile TRPC1 eliminasyonu arasında ise sinerjistik bir etkileşim olduğundan TRPC1'e duyarlı mekanizmaların TBH patolojisine dahil olduğu ve bu kanalın CA tarafından inhibe edilmesinin toparlanmayı arttırdığından hayvan modelleri ve insanlarda daha ileri çalışmalar için dikkate alınması gerektiği, CA'ün, TRPC1 yokluğunda kuvvetlenen yeni bir nöro-koruyucu ajan olduğu sonucuna varmışlardır (Peters vd., 2012). Dati ve arkadaşları ise 6-OHDA hemiparkinson modeli oluşturdukları farelerde CA'ün muhtemelen TRPM7 kanalları üzerindeki spesifik olmayan bloke edici etkisiyle belirgin bir nöroproteksiyonu desteklediğini göstermişlerdir. TRPM7 kanallarının aktivite seviyeleri cAMP ve pH gibi çeşitli faktörlerle düzenlendiğinden ayrıca ROS ve ATP azalmasıyla belirgin şekilde aktive edildiğinden bahsetmek önemlidir. Bu sebeple, oluşum nedenlerinden biri OS olan PH'da ROS ile aktive olan ve böylece hastalığın oluşumuna katkı sağlayan TRPM7'nin CA ile inhibisyonun PH'da yararlı etkileri olduğu bulunmuştur (Dati vd., 2017). TRPM7 kanalı da TRPC1 kanalı gibi CA ile inhibe olan bir kanaldır. Bu nedenle CA'ün bizim çalışmamızda da TRPC1'in yanısıra TRPM7 inhibisyonu yapmış olması immünohistokimya sonuçlarımıza yansımış olabilir.

Mevcut literatür bilgimize göre TRPC ailesinin üyelerinin hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun yükselmesine katkıda bulunduğu açık olmakla birlikte, bu kanalların nöronal hasardaki rolleri; artan  $Ca^{2+}$  girişinin hem hücrenin hayatta kalmasında hem de hücre ölümü süreçlerinde ortaya çıkmasından dolayı tartışmalıdır (Ambudkar, Bandyopadhyay, Liu, Lockwich, Paria & Ong, 2006; Putney, 2005; Zheng vd., 2013) Örneğin; Sun ve arkadaşlarının 2017 yılına ait çalışmalarında, PH semptomlarını tetikleyen nörotoksinlerin, TRPC1

ekspresyonunu hedeflediğini ve  $Ca^{2+}$  akışını, dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna yol açan Cav1.3 kanalları (L-tipi Voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanalı) yoluyla arttırdığını göstermiştir. STIM-1 (stromal etkileşim molekülü 1), TRPC1 gibi depo kontrollü  $Ca^{2+}$  kanalları aracılığıyla hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyini Cav1.3 kanallarını aktive ederek düzenleyen bir membran proteindir. Depoların tükenmesi Cav1.3-TRPC1-STIM1 arasındaki etkileşimi artırır. PH'nı taklit eden nörotoksinler Cav1.3 fonksiyonunu artırıp, TRPC1 ekspresyonunu azaltarak, STIM1-Cav1.3 etkileşimini inhibe eder ve kaspaz aktivasyonunu indükler. TRPC1 ekspresyonunun restorasyonu ise Cav1.3 fonksiyonunu inhibe eder ve hücre sağkalımını artırır. Yani; TRPC1, dopaminerjik nöronun hayatta kalması için gerekli olan STIM1 tabanlı bir iskele sağlayarak Cav1.3 aktivitesini baskılayarak dejenerasyonu engeller. (Sun vd, 2017). Öte yandan Li ve arkadaşları, PC12 hücre hattında küçük interferans ribonükleik asit (siRNA) aracılı SOCE gen ifadesinin baskılanması ve SOCE kanal antagonistleriyle kanalın inhibisyonunun MPP<sup>+</sup> toksisitesine karşı potansiyel koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar PC12 hücrelerinde SOCE inhibisyonunun hücre canlılığını önemli ölçüde arttırdığını, apoptotik hücre ölümünü azalttığını ve hücre içi ROS düzeylerini ve MPP<sup>+</sup> aracılı lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermiştir. Ayrıca SOCE inhibisyonu, MPP<sup>+</sup> kaynaklı mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu ve mitokondriyal apoptotik faktörlerin aktivasyonunu da önlemiştir. Tüm bu sonuçlar, SOCE inhibisyonunun PC12 hücrelerini, Homer1a (membran kanal aktivasyonunu düzenleyen protein) ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla MPP<sup>+</sup> hareketine karşı koruduğunu ve SOCE'nin, PH hastalarında nöronal hasara karşı terapötik stratejiyi araştırmak için ideal bir hedef olabileceğini göstermiştir (Li, Chen, Zhang, Liu & Fei, 2013). Ayrıca bu veriler dopaminerjik nöronlarda bulunan ve SOCE kanalları olduğu kanıtlanan TRPC1 kanallarının antagonisti kullanılarak primer mezensefalik hücreler üzerinde yapılan bir araştırma ile tutarlılık göstermektedir. Zeng ve arkadaşları yürüttükleri bu çalışmada kültürlenmiş sıçan mezensefalik hücrelerinde MPP<sup>+</sup> ile indüklenen nöronal hasara karşı, orjinal olarak tanımlanmış bir reseptör aracılı  $Ca^{2+}$  kanal

blokerı olan SKF-96365'in potansiyel koruyucu etkisini araştırmışlar ve MPP<sup>+</sup> uygulamasından 30 dakika önce SKF-96365 ile ön muamelenin nükleer hasarı önemli ölçüde azalttığını, laktat dehidrogenaz salınımını azalttığını ve apoptotik nöronal ölümü inhibe ettiğini bulmuşlardır. Fakat SKF-96365'in bu etkisini TRPC1 üzerinden göstermediği sonucuna varmışlardır. Bunun üzerine TRPC1'in seçici antagonisti olan 2APB ve Lantan ile TRPC1 fonksiyonunun bloke edilmesinin yararlı bir etkisi olup olmadığını incelemişler ve TRPC1 fonksiyonunun inhibe edilmesinin, PH modellerinde toksinin hasarladığı dopaminerjik hücrelerin canlılığını koruduğunu, DA alımını ve hücre içi Ca<sup>2+</sup> aşırı yüklenmesini daha da azalttığını bulmuşlardır. (Zeng vd., 2013). Arshad ve arkadaşları ise 2013 yılındaki çalışmalarında TRPC1'in, dopaminerjik SH-SY5Y hücrelerini MPP<sup>+</sup>, salsolinol ve N-metil-(R)-salsolinol ile indüklenen sitotoksisiteden koruduğunu göstermeyi amaçladıkları çalışmalarında, nörotoksinlerin TRPC1 ekspresyonu üzerinde belirgin bir düşüşe yol açmakla kalmayıp, immünohistokimya deneylerine göre nörotoksinlerin TRPC1 kanal proteinlerinin lokalizasyonlarının değişimine de neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Arshad, Chen, Cong, Qing, & Deng, 2013).

Bizim alışma sonuçlarımız Li ve arkadaşları ile Zeng ve arkadaşlarının ve de Arshad ve arkadaşlarının çalışmalarının sonuçları ile uyumludur. SNpc ve KS bölgelerinde; 6-OHDA uygulaması dopaminerjik hücre sayısını azalttığı için TRPC1 ekspresyon ve protein düzeyinde de anlamlı azalmaya neden olurken, CA uygulaması hücre sayısını artırıp hücre morfolojisini düzeltirken TRPC1 ekspresyon ve protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır hatta moleküler sonuçlara göre tamamen silinmiştir, bunu CA'ün inhibitör etkilerine bağlamaktayız.

Genel olarak, literatür bilgileri ve bizim sonuçlarımız, TRPC1'in PH patogenezi ile yakın ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar sağlamaktadır. Buna göre bizim düşüncemiz CA'ün TRPC1 kanal aktivitesini inhibe edip 6-OHDA aracılı PH'da nöronal dejenerasyonu engelleyerek hücreyi apoptotik süreçten koruduğu yöndedir. CA çok yönlü etkileri ile özellikle kuvvetli antioksidan etkileri ile de 6-OHDA'nın nörotoksik oksidatif etkilerini engellemiş olabilir.

Çalışmamız CA'ün dopaminerjik nöronlarda sağkalımı arttırdığını düşündüren veriler sunmasına rağmen, bu durumun altında yatan mekanizmaları tanımlayacak daha ayrıntılı ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Astroditler, memeli beynindeki en yaygın hücre tipidir, eksprese ettikleri GFAP ve vimentin ara filamentleriyle karakterize edilirler (Maragakis & Rothstein, 2006). Uyarılabilir hücreler değildirler, fakat Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> kanallarının yanı sıra bazı TRP kanallarını ifade ederler. Hücre içi Ca<sup>2+</sup> değişikliklerinin astroditlerin sinaptik iletimde doğrudan bir rol oynamasına olanak sağladığına dair kanıtlar da mevcuttur (Sofroniew & Vinters, 2010).

Yıllardır süren patolojik ve fizyolojik çalışmalar nörodejeneratif hastalıklarda nöronal anormalliklere odaklansa da, astroditlerin bu ve diğer nörolojik hastalıklarda önemli aktörler olduğu çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Bu modeller astroditleri hedefleyen tedavilerin geliştirilmesine yol açmıştır ve bu araştırmalar nörodejeneratif hastalıkların klinik tedavisini etkilemektedir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalar PH'nda astroditlerin nöroprotektif rolünü desteklemektedir ancak, patolojik incelemelerde, GFAP ekspresyonunda olduğu kadar astroditlerin sayısında da artış gözlenmiş ve sinüklein-pozitif astroditlerin varlığının, nigral nöronal hücre ölümü ile korele olduğu gösterilmiştir (Maragakis & Rothstein, 2006). Moreles ve arkadaşları yetişkin erkek Sprague Dawley sıçanlarının lateral ventrikülüne 6-OHDA uygulayarak oluşturdukları PH modelinde yaptıkları incelemede 6-OHDA'nın striatal bölgede reaktif astrogliozise neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Morales, Sanchez, Rodriguez-Sabate & Rodriguez, 2016). Yelkenli ve arkadaşları ise 6-OHDA ile indüklenen nörodejenerasyon modelinde, astroditlerin striatal nörokimyayı modüle ederek ön savunma için aktif hale getirdiğini göstermişlerdir (Yelkenli vd., 2016). Zhang ve arkadaşları da benzer şekilde astroditlerin Ca<sup>2+</sup> akışının nöronal aktiviteyi düzenleyişini inceledikleri çalışmalarında; nöronal aktivitenin düzenlenmesinde glial Ca<sup>2+</sup> sinyalinin önemli bir işleve sahip olduğunu vurgulamışlardır. Bu sinyalleşme yoluyla nörotransmitter alım hızının akut modülasyonunun; astroditlerin, nöral

devrelerin fonksiyonunu aktif olarak modüle etmeleri için güçlü bir mekanizma sağladığını ortaya koymuşlardır (Zhang, Ormerod & Littleton, 2017).

TRPA1 kanalı, beyin gelişimini ve astrositlerin fizyolojik işlevini düzenlemede önemli bir rol oynayan katyon kanalıdır. TRPA1 kanalları; ROS, soğuk-sıcak ve kanabinoidler, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesindeki değişiklikler, bakteriyel endotoksinler, çevresel tahriş edici maddeler veya enflamatuar mediatörler de dahil olmak üzere çeşitli uyarılarla aktive olarak enflamasyonda ve ağrının algılanmasında kilit görev alabilirler (Lee vd., 2016). CA de TRPA1 kanal aktivatörü olarak işlev gören en iyi kimyasal bileşiklerden biridir (Stueber, Eberhardt, Caspi, Lev, Binshtok, & Leffler, 2017). Pek çok PH araştırması,  $Ca^{2+}$  ile ilişkili sinyal yollarının, PH'nın patogenezinde ortaya çıkan rolüne odaklanmıştır. Fakat bu araştırmalarda dopaminerjik nöronlar astrositlerden daha ön plandadır ve PH patogenezinde astrosit TRPA1- $Ca^{2+}$  sinyal kaskadının rolü hiç araştırılmamıştır. Bu nedenle PH'nda astrosit TRPA1 kanallarının aktivite değişiklikleri ve astrositlerin hastalığındaki rolü üzerine moleküler mekanizma(lar) hala belirsizdir. Çalışmamızda, TRPA1 kanalı modülasyonu ile astrosit fonksiyonlarının ilerlemesi ve buna bağlı dopaminerjik nöron sağkalımı arasındaki ilişkiyi incelemek en can alıcı soru olarak belirlendi. Dolayısıyla çalışmamızdaki deneysel PH modelimizde, CA'ün etkilediği kanallar arasında yer alan dopaminerjik nöron TRPC1 kanalının yanısıra astrosit TRPA1 kanalını seçmemizin nedeni bu olmuştur.

Literatürü taradığımızda astrosit TRPA1 kanalları ile çalışılmış bazı çalışmalara rastladık ve onların sonuçları da oldukça ilgi çekiciydi. Örneğin; Lee ve arkadaşları, dünyanın en sık görülen nörodejeneratif hastalığı olan AH'na ait fare modeli kullandıkları çalışmalarında; TRPA1 kanallarının AH patogenezindeki rolünü ve olası moleküler mekanizmaları araştırmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla hipokampal bölgedeki astrosit hücrelerinde TRPA1 protein ifadesini WB yöntemi ile, histokimyasal incelemeyi de immün boyama ile gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca astrosit içi  $Ca^{2+}$  ölçümü ve bazı enflamatuar belirteçleri ölçmüş, moleküler parametrelere geçmeden önce ise farelere çeşitli davranış testleri uygulamışlardır. Çalışma sonuçlarına göre,

TRPA1 kanallarının protein ekspresyonu hipokampusun astrositlerinde artmış, bu durum davranış testlerini olumlu etkilemiş ve ayrıca enflamatuar sitokin seviyelerini azaltmıştır. TRPA1'in inhibisyonu ise astrogliazisi şiddetlendirmiştir. Bu sonuçlar; TRPA1-Ca<sup>2+</sup> sinyalleşmesinin amiloid-β ile tetiklenen enflamasyon ve AH ilerlemesinin düzenlenmesinde kritik rolünü destekleyen deneysel kanıtlar sunmaktadır (Lee vd., 2016). Ayrıca, Shigetomi ve arkadaşları astrositlerde TRPA1 aktivitesini inceledikleri çalışmalarında; test edilen TRPA1 agonistlerinin, nöron-astrosit ko-kültürlerinde, astrositlerdeki Ca<sup>2+</sup> seviyesini arttırdığını vurgulamışlardır. Verilerine göre; TRPA1, astrosit istirahat Ca<sup>2+</sup> seviyelerinde değişime neden olarak, inhibe edici sinapsları düzenler ve GABA taşıyıcı-3 yoluyla GABA taşınımını azaltarak hücre dışı GABA seviyelerini yükseltir. Böylece internöronların inhibe edici sinaps etkinliği azalmış olur (Shigetomi vd., 2012). Stueber ve arkadaşları ise DKG nöronlarında yer alan TRPA1 ve TRPV1 kanallarının hücre Ca<sup>2+</sup> sinyali ve sitotoksosite üzerindeki etkilerini inceledikleri araştırmalarında; kanalların CA ile aktivasyonunun, hem hücre dışı kaynaklardan hem de hücre içi depolardan Ca<sup>2+</sup> akışını tetikleyerek hücre içine Ca<sup>2+</sup> salınımında artışa neden olduğunu ama yalnızca TRPV1'in Ca<sup>2+</sup> bağımlı hücre ölümüne aracılık ettiğini, TRPA1 mitokondriyal Ca<sup>2+</sup> artışı yaratmadığından bu etkide yer almadığını göstermişlerdir (Stueber vd., 2017). Xia ve arkadaşları TRPA1'in bir fare intraserebral hemoraji (ISH) modelinde miyelin hasarı ve OS yaralanmasına dahil olduğunu ve TRPA1 aracılı miyelin hasarına yönelik müdahalenin, ISH'ın erken evresindeki hastaların motor fonksiyonlarını iyileştirmek için yeni bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir (Xia vd., 2019). Görüldüğü üzere TRPA1 konusunda da birbirine zıtlık içeren çalışmalar mevcuttur.

Biz çalışmamızda CA'ün TRPA1 kanallarının agonisti olduğunu, astrositlerdeki TRPA1 gen ekspresyonu ve protein düzeylerini arttığını, ayrıca CA grubunda TRPA1(+) hücre sayısının diğer gruplara kıyasla küçük bir oranda azaldığını fakat sayılan hücrelerin, morfolojik olarak daha sağlıklı bir nükleus ve hücre membran bütünlüğüne sahip olduklarını gözlemledik. Bulgularımıza göre; CA'ün astrositlerdeki TRPA1 gen ekspresyonunun sitümülasyonuna

neden olarak TRPA1 protein düzeyini arttırdığını ve astrositlerin hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyini değiştirdiğini düşünmekteyiz. Astrositlerin hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyelerinin artması da astrosit kaynaklı GABA, Glutamat ve GSH seviyelerinde artış oluşturabilir. Astrositlerin nöron sağkalımı ve nöromodülasyondaki etkilerini düşündüğümüzde GFAP ve TRPA1(+) hücre sayısı azalsa da TRPA1 ekspresyonun artması nöron canlılığına katkı sağlayabilir. Fakat çalışmamız bu aktivasyonun sağlayabileceği yarar/zararın altında yatan mekanizmaları tam açıklayamamaktır. Tedavi süresi uzatılarak TRPA1 aktivasyonunun astrosit işlevindeki ve PH'ndaki etkisini gözlemlemek eminiz ki yararlı olacaktır. Sonuçlarımıza göre astrosit kaynaklı kanal fonksiyonunun değerlendirildiği çalışmaların yetersiz olduğunu, PH da astrosit TRP kanallarının rolünü açıklamak için ileri çalışmalar gerektiği söylemek mümkündür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturduğumuz Parkinson modelinde CA verilen grupta, SNpc dopaminerjik nöronlarında sayıca bir artış ve hücre morfolojisinde belirgin bir düzelme gözlemledik. Tedavi grubumuzdaki immünohistokimya bulgularına göre nöronların sağlıklı görüntüleri nedeniyle CA'ün nöroprotektif etki sağladığı sonucuna vardık. CA'ün TRPC1 kanallarının inhibitörü olduğu literatür bilgisi ile ortaya konmuş olmasına rağmen, bizim moleküler çalışmalarımızda da SN ve KS bölgelerinde TRPC1 gen ekspresyonun ve protein düzeylerinin neredeyse tümüyle ortadan kalkması bu nöroprotektif etkinin TRPC1 kanallarının inhibisyonu kaynaklı olduğunu düşündürmekle birlikte bu konudaki bulguların daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. CA'ün, özellikle hücre ölümündeki etkileri bilinen TRPM7 kanalları üzerine olan inhibitör etkileri ve kuvvetli antioksidan etkileri ile de hücre sağkalımına yol açabileceğini gözardı etmemek gerekir. Öte yandan, astrositlerin TRPA1 kanallarının ise CA ile aktive olduğunu ve CA ile tedavinin TRPA1 protein düzeyini ve gen ekspresyonunu arttırdığını fakat immünohistokimyasal bulgularımıza göre TRPA1(+) hücre sayısının bir miktar azaldığını, ancak tedavi grubumuzda ki astrosit hücrelerinin daha sağlıklı olduğunu gözlemledik. Bu durumu CA'ün TRPA1 ekspresyonlarını arttırmasına yönelik sonuçlarımızı da göz önünde bulundurarak; astrositlerin yararlı etkilerinin ortaya çıkması ve nöronal sağkalıma katkı sağlamasının mümkün olabileceği yönünde yorumladık. Açıkçası, çalışmamız da CA'ün nöroprotektif etkisini belirlesekte bunun dopaminerjik nöron TRPC1 inhibisyonu ya da astrosit TRPA1 kanalları aktivasyonu üzerinden yapıp yapmadığını söylemek erken bir sonuç olur, bu konuda ki literatür bilgiside adeta ikiye bölünmüş, birbiriyle zıtlıklar içermektedir. Vurgulamak gerekir ki çalışmamız PH modelinde CA'ün TRPC1 ve TRPA1 kanalları üzerine etkisinin birlikte incelendiği ilk araştırmadır ve PH ile ilgili araştırmalara ek olarak literatüre yeni bilgiler eklediği için önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın ve daha önce yapılmış çalışmaların sonuçları neticesinde; dopaminerjik nöronların ve astrositlerin TRP kanallarının, CA gibi



düzenleyicilerin etkisindeki hücrel fonksiyon değişimlerini moleküler mekanizmalarıyla açıklayabilecek araştırmaların artırılması gerektiği düşünceindedir. Böylece gelecekteki çalışmalar, CA'ün nöromodülatör bir molekül olarak TRP kanalları aracılığıyla hücrel değişimlere ya da umut ettiğimiz gibi dopaminerjik nöronların sağkalımına nasıl katkı sağladığını belirlemede bize daha fazla ışık tutacaktır. Ayrıca farklı TRP kanalları üzerinde CA'ün rolünü moleküler mekanizmaları ile araştırmak da yararlı olacaktır. Nihai amaç, CA'ün modüle ettiği TRP kanallarının PH'nın klinik tedavisi için uygun hedefler olup olmadığını belirlemektir.

Bu çalışma dopaminerjik nöron TRPC1 ve astrosit TRPA1 kanalları üzerinden CA'ün etkilerine odaklanmış olmasına rağmen çalışmamızı bütünüyle değerlendirdiğimizde, PH'nda SNpc nöronlarının zarar görmesine nöron ve astrosit kaynaklı TRP kanalların katkıda bulunup bulunmadığının sorusunu aydınlatmak ve bu kanallarını çeşitli ajanlarla modülasyonunun tedaviye katkısını anlamak için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu bir kez daha vurgulamak doğru olacaktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akbostancı C. M., (Ed.). (2008). *Hareket Bozuklukları İlkeler ve Uygulamalar*. İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık
- Alan, E., Guttmacher, M. & Collins, F.S. (2003). *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. The New England J of Med. 348:1356-1364. DOI:10.1056/NEJM2003ra020003
- Albert, A.P., Saleh, S.N. & Large, W.A. (2009). *Identification of canonical transient receptor potential (TRPC) channel proteins in native vascular smooth muscle cells*. Curr Med Chem 16:1158–1165. DOI: 10.2174/092986709787581815
- Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. (1989). *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. Trends Neurosci.:12 (10). 366-75. DOI:10.1016/0166-2236(89)90074-x
- Amaral, M.D. & Pozzo-Miller, L. (2012). *Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> influx are both required for BDNF to rapidly increase quantal vesicular transmitter release*. Neural Plast. 2012:203536. DOI: 10.1155/2012/203536
- Ambudkar, I.S., Bandyopadhyay, B.C., Liu, X., Lockwich, T.P., Paria, B. & Ong,H.L. (2006). *Functional organization of TRPC-Ca<sup>2+</sup> channels and regulation of calcium microdomains*. Cell Calcium 40, 495–504. DOI: 10.1016/j.ceca.2006.08.011
- Anand, U., Otto, W.R., Facer, P., Zebda, N., Selmer, I., Gunthorpe, M.J., Chessell, I.P., Sinisi, M., Birch, R., & Anand, P. (2008). *TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons*. Neurosci Lett. 438:221– 227. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.04.007

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S. & Bevan, S. (2008). *Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress*. J Neurosci. 28:2485–2494. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5369-07.2008
- Araque, A. & Navarrete, M. (2010). *Glial cells in neuronal network function*. Phil. Trans. R. Soc. B. 365, 2375-2381. doi: 10.1098/rstb.2009.0313
- Arshad,A., Chen, X., Cong, Z., Qing,H. & Deng, Y. (2013). *TRPC1 protects dopaminergic SH-SY5Y cells from MPP+, salsolinol and N-methyl-(R)-salsolinol-induced cytotoxicity*. Acta Biochim Biophys., 46: 22–30. DOI: 10.1093/abbs/gmt127.
- Atoyan, R., Shander, D. & Botchkareva, N.V. (2009). *Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin*. J Invest Derm. 129:2312–2315. DOI: 10.1038/jid.2009.58
- Azizi, Z., Ebrahimi, S., Saadatfar, E., Kamalinejad, M. & Majlessi, N. (2012). *Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia*. Behavioral Pharmacology.; 23(3):241-9. DOI: 10.1097/FBP.0b013e3283534301
- Baluchnejadmojarad, T., Hassanshahi, J., Roghani, M., Mansouri, M. & Raoufi, S. (2014). *Protective Effect of Carvacrol in 6-hydroxydopamine Hemiparkinsonian Rat Model*. Journal of Basic and Clinical Pathophysiology.; 2; 29-34.
- Baluchnejadmojarad,T., Hassanshahi, J., Roghani, M., Mansouri, M. & Raoufi, S. (2014). *Protective Effect of Carvacrol in 6-hydroxydopamine Hemiparkinsonian Rat Model*. Journal of Basic and Clinical Pathophysiology, 2014, 2; 29-34.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J. & Patapoutian, A. (2004). *Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin*. *Neuron* 41:849–857. DOI: 10.1016/s0896-6273(04)00150-3
- Barcia, C., Ros, C.M., Annese, V., Gomez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Yera, D., Martinez-Pagan, M.E., de Pablos, V., Fernandez-Villalba, E. & Herrero, M.T. (2011). *IFN-  $\gamma$  signaling, with the synergistic contribution of TNF  $\alpha$ , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease*. *Cell Death Dis* 2: e142. DOI: 10.1038/cddis.2011.17
- Baser, K.H.C., (2008). *Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils*. *Curr. Pharm. Des.* 14 (29), 3106–3119. DOI: 10.2174/138161208786404227
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quriga-Varela, A. & Jackson-Lewis, V.R. (2015). *Oxidative stress and Parkinson's disease*. *Front Neuroanatomy*. doi: 10.3389/fnana.2015.00091.
- Blum, D, Sakina, T, Lambeng, N., Nissou, M-F., Benabid, A-L., Sadoul, R. & Verna, J-M. (2001). *Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinsons disease*. *Progress in Neurobiology*. 65: 135-17. DOI: 10.1016/s0301-0082(01)00003-x
- Bollimuntha, S., Selvaraj, S. & Singh, B.B. (2011). *Emerging roles of canonical TRP channels in neuronal function*. *Adv Exp Med Biol.*; 704:573–593. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3\_31

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bollimuntha, S., Singh, B.B., Shavali, S., Sharma, S.K. & Ebadi, M. (2005). *TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells*. J Biol Chem.; 280:2132–2140. doi: 10.1074/jbc.M407384200
- Booth, D.H., Hirst, D.W. & Wade-Martins R. (2017). *The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis*. Trends in Neurosciences. Vol. 40, No. 6. 358-370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>
- Bosson, A., Paumier, A., Boisseau, S., Jacquier-Sarlin, M., Buisson A & Albrieux, M. (2017). *TRPA1 channels promote astrocytic Ca<sup>2+</sup> hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- $\beta$  peptide*. Mol Neurodegener. 12(1):53. doi: 10.1186/s13024-017-0194-8.
- Bové, J., Prou, D., Perier, C. & Przedborski, S. (2005). *Toxin-induced models of Parkinson's disease*. NeuroRX: the journal of the American society for experimental Neurotherapeutics.; 2(3) 484–494. DOI: 10.1602/neurorx.2.3.484
- Bradshaw, B.H., Raboune, S. & Hollis, L.J. (2013). *Opportunistic activation of TRP receptors by endogenous lipids: Exploiting lipidomics to understand TRP receptor cellular communication*. Life Sci. 92(8-9): 404–409. doi:10.1016/j.lfs.2012.11.008.
- Brown, R.C., Wu, L., Hicks, K. & O'neil, R.G. (2008). *Regulation of blood-brain barrier permeability by transient receptor potential type C and type v calcium-permeable channels*. Microcirculation. 15:359–371. DOI: 10.1080/10739680701762656

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Cali, T., Ottolini, D. & Brini, M. (2011). *Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease*. Biofactors. 37(3):228-40. doi: 10.1002/biof.159.
- Cali, T., Ottolini, D. & Brini, M. (2014). *Calcium signaling in Parkinson's disease*. Cell Tissue Res. 357:439–454. DOI 10.1007/s00441-014-1866-0
- Cao, D.S., Zhong, L., Hsieh, T.H., Abooj, M., Bishnoi, M., Hughes, L. & Premkumar, L.S. (2012). *Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells*. PLoS One. 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0038005
- Carlsson, A., Lindqvist, M. & Magnusson, T. (1957). *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists*. Nature 180.
- Caudle, M.W. & Zhang, J. (2009). *Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in parkinson disease*. Experimental Neurology.220; 230–233. DOI:10.1016/j.expneurol.2009.09.027
- Chae, H.G., Ahn, S.J., Hong, Y.H., Chang, W.S., Kim, J. & Kim, S.J. (2012). *Transient receptor potential canonical channels regulate the induction of cerebellar long-term depression*. J Neurosci. 32:12909–12914. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0073-12.2012
- Chan, C. S., Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G. E. and Surmeier, D. J. (2007). *'Rejuvenation' protects neurons in Mouse models of Parkinson's disease*. Nature.: 447, 1081-1086. DOI:10.1038/nature05865
- Chan, C.S., Gertler, T.S. & Surmeier, D.J. (2009). *Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease*. Trends Neurosci.: 32:249-256. DOI: 10.1016/j.tins.2009.01.006

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Charcot, J. M. (1872). Sinir sistemi hastalıkları hakkında derler-I. *in Oeuvres Complètes (Tome 1). Leçons sur les Maladies du Système Nerveux* (eds Delahaye, A. & Lecrosnier, E.) 155–188. French. Bureaux du Progrès Médical
- Checkoway, H., Powers, K., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Longstreth, W.T., Swanson, Jr. P. D. (2002). *Parkinson's Disease Risks Associated with Cigarette Smoking, Alcohol Consumption, and Caffeine Intake*. *American Journal of Epidemiology*, Volume 155, Issue 8, Pages 732–738, DOI:10.1093/aje/155.8.732
- Chen, C., Maa, Q., Denga, P., Yangb, j., Yanga, L., Lina, M., Yua, Z. & Zhoua, Z. (2017). *Critical role of TRPC1 in thyroid hormone-dependent dopaminergic neuron development*. *BBA – Molecular Cell Research*:1864. 1900–1912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.019>.
- Chen, J & Hackos, H.D. (2015). *TRPA1 as a drug target—promise and challenges*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 388:451–463 DOI 10.1007/s00210-015-1088-3
- Chen, W., Xu, B., Xiao, A., Liu, L., Fang, X., Liu, R., Turlova, E., Barszczyk, A., Zhong, X., Sun, C.L., Britto, L.R., Feng, Z.P. & Sun, H.S. (2015). *TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury*. *Mol Brain* 8:11. doi: 10.1186/s13041-015-0102-5.
- Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J. & Quintanilla-Vega, B. (2015). *Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson disease*. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 1-22. DOI:10.3389/fncel.2015.00124
- Chung, K.K.H., (2010). *The expression and role of specific trp channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra*. Doktora Tezi, The University of Auckland

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Clapham, D.E. (2003). *TRP channels as cellular sensors*. Nature 426:517–524.  
DOI: 10.1038/nature02196
- Clapham, D.E. (2003). *TRP channels as cellular sensors*. Nature. 426:517–524.  
DOI: 10.1038/nature02196
- Clapham, D.E., Runnels, L.W. & Strübing, C. (2001). *The TRP ion channel family*. Nat Rev Neurosci. 2:387–396. DOI: 10.1038/35077544
- Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C. & Schultz, G. (2005). *Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels*. Pharmacol Rev.: 57:427–450. DOI: 10.1124/pr.57.4.6
- Corey, D.P., Garcia-Anoveros, J., Holt, J.R., Kwan, K.Y., Lin, S.Y., Vollrath, M.A., Amalfitano, A., Cheung, E.L., Derfler, B.H., Duggan, A., Geleoc, G.S., Gray, P.A., Hoffman, M.P., Rehm, H.L., Tamasauskas, D. & Zhang, D.S. (2004). *TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells*. Nature. 432:723–730. DOI: 10.1038/nature03066
- Cosens, D.J. & Manning, A. (1969). *Abnormal Electroretinogram from a Drosophila mutant*. Nature. Vol.224. 285-287
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y. & Graybiel, A.M. (1999). *The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease*. Brain.:122(Pt8); 1437-1448.  
DOI:m10.1093/brain/122.8.1437
- Datı, L.M., Ulrich, H., Real, C.C., Feng, Z.P., Sun, H.S. & Britto, L.R., (2017). *Carvacrol Promotes Neuroprotection In The Mouse Hemiparkinsonian Model*. Neuroscience.356; 176–181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.013.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Datı, L.M., Ulrich, H., Real, C.C., Feng, Z.P., Sun, H.S. & Britto, L.R., (2017). *Carvacrol Promotes Neuroprotection In The Mouse Hemiparkinsonian Model*. Neuroscience.356; 176–181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.013.
- Davies, K.J. (2000). *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. IUBMB life 50:279-289. DOI: 10.1080/713803728
- de la Torre, J. C. (1995). *Treatment of head injury in mice, using a fructose 1,6-diphosphate and dimethyl sulfoxide combination*. Neurosurgery 37: 273–279.
- de Lau L.M. & Bretele, M.M. (2006). *Epidemiology of Parkinson's disease*. Lancet Neurology. 5 (6): 525-535. DOI: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9
- De Vincenzi, M., Stamatii, A. De Vincenzi, A. & Silano, M. (2004). *Constituents of aromatic plants: carvacrol*. Fitoterapia.; 75 (7–8), 801–804. DOI: 10.1016/j.fitote.2004.05.002
- Deng, W., Lu, H. & Teng, J., 2013. *Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats*. J. Mol. Neurosci. 51 (3), 813–819. DOI: 10.1007/s12031-013-0069-6
- Doble, A., (1999). *The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy*. Pharmacol. Ther. Vol. 81, No. 3, pp. 163–221. DOI:10.1016/s0163-7258(98)00042-4
- Doğu O. (2010). *Parkinson Hastalığı'nın epidemiyoloji ve risk faktörleri*. (Edt.Prof.Dr. Emre, M., Parkinson Hastalığı). Güneş Tıp Kitapevi Yayınları: Ankara.
- Dua, T. (2004). *Atlas : country resources for neurological disorders 2004*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Programme for Neurological Diseases and Neuroscience. Geneva.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Edris, A.E. (2007). *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother. Res.*; 21, 308–323. DOI: 10.1002/ptr.2072
- Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. (1960). *Verteilung von noradrenalin und dopamin (3-hydroxytyramin) im gehirn des menschen und ihr verhalten bei erkrankungen des extrapyramidalen systems. Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239
- Ellis, M. J. & Fell, J. M. (2017). *Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*; 27.4247–4255. DOI:10.1016/j.bmcl.2017.07.075
- Eraç, Y., Selli, Ç. & Tosun, M. (2009). *Kalsiyumun Çok Yönlü İşlevselliğinde TRPC İyon Kanallarının Rolü. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy.* Volume 28. Number 2. pp. 161-183
- Fearnley, J.M. & Less, A.J. (1991). *Ageing And Parkinson's Disease: Substantia Nigra Regional Selectivity. Brain,* 114, 2283-2301. DOI:10.1093/brain/114.5.2283
- Finsterwald, C., Magistretti, J.P. & Lengacher, S. (2015). *Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. Current Pharmaceutical Design.*;21(25):3570-81. DOI: 10.2174/1381612821666150710144502
- Galvan, A. & Wichmann, T. (2008). *Pathophysiology of Parkinsonism. Clin. Neurophysiol.* 119(7): 1449-1464. DOI: 10.1016/j.clinph.2008.03.017
- Gandhi, S. & Wood, W.N. (2005). *Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. Human Molecular Genetics.* Vol. 14, No. 18 2749–2755 doi:10.1093/hmg/ddi308

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gatto, N.M., Rhodes, S.L., Manthipragada, A.D., Bronstein, J., Cockburn, M., Farrer, M. & Ritz, B. (2010).  *$\alpha$ -synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's Disease*. Neuroepidemiol; 35: 191-195. DOI:10.1159/000315157.
- Gaudet, R. (2008). *TRP channels entering the structural era*. J Physiol 586: 3565–3575. doi: 10.1113/jphysiol.2008.155812
- Gees vd., 2015 yok bulmadım. 2010 olma ihtimali var
- Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). *The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a003962. doi: 10.1101/cshperspect.a003962
- Gelb, D.J., Oliver E. & Gilman, S. (1999). *Diagnostic criteria for Parkinson's Disease*. Arch. Neurol. 56: 33-39. DOI:10.1001/archneur.56.1.33
- German, D.C., Manaye, K.F., Sonsalla, P.K., & Brooks, B.A. (1992). *Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells*. Ann N Y Acad Sci. : 648:42-62. DOI:10.1111/j.1749-6632.1992.tb24523.x
- Gibb, W.R. & Lees, A.J. (1988). *The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 51: 745–52. DOI: 10.1136/jnnp.51.6.745
- Goetz G Christopher. (2011). *The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies*, Cold Spring Harb Perspect Med. doi:10.1101/chsperspect.a008862.
- Goldman, S.M. (2014). *Environmental toxins and Parkinson's disease*. An Rev Pharmacol Toxicol. 54: 141-164. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937
- Gökmen, G.F. (2003). *Sistematik Anatomi*. İzmir: İzmir Güven Kitabevi

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gratzke, C., Streng, T., Waldkirch, E., Sigl, K., Stief, C., Andersson, K.E. & Hedlund, P. (2009). *Transient receptor potential A1 (TRPA1) activity in the human urethra—evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region*. Eur Urol 55:696–704. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.04.042
- Guimarães, A.G., Xavier MA, de Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, Barreto EO, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Oliveira RC, Quintans-Júnior LJ. (2012). *Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 385 (3), 253–263. DOI: 10.1007/s00210-011-0715-x
- Haddadi, H., Rajaei, Z., Alaei, H. & Shahidani, S. (2017). *Chronic treatment with carvacrol improves passive avoidance memory in a rat model of Parkinson's disease*. Arq. Neuro-Psiquiatr. vol.76 no.2. <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282x20170193>
- Halassa, M. & Haydon, P.G. (2010). *Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior*. Annu Rev Physiol. 72:335–355. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135843
- Halliday, G.M. & Stevens, C.H. (2011). *Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease*. Movement Disorders.; 26(1) 6-17. DOI: 10.1002/mds.23455
- Halliwell, B. (2006). *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* Journal of Neurochemistry. 97: 1634-1658. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hauser MA<sup>1</sup>, Li YJ, Xu H, Nouredine MA, Shao YS, Gullans SR, Scherzer CR, Jensen RV, McLaurin AC, Gibson JR, Scott BL, Jewett RM, Stenger JE, Schmechel DE, Hulette CM, Vance JM. (2005). *Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism*. Arch Neurol. 62(6):917-21. DOI:10.1001/archneur.62.6.917
- Haydon, P.G. (2001). *GLIA: listening and talking to the synapse*. Nat Rev Neurosci. 2:185–193. doi:10.1038/35058528
- He, K., Qi,F., Guo, C., Zhan, S., Xu, H., Liu, J. & Yang, X. (2016). *Movement deficits and neuronal loss in basal ganglia in TRPC1 deficient mice*. Oncotarget, Vol. 7, No. 43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12567>
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L.M. & Villanueva-Olivo, A. (2017). *The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model*. Neurología. 32:533—539. DOI:10.1016/j.nrl.2015.06.011
- Hirsch, E.C., Breidert, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A. & Michel, P.P. (2003). *The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease*. Annals of the New York Academy of Sciences.; 991 214-228. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07478.x
- Holzer P. (2011). *Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system*. Pharmacology and Therapeutics.; 131:142–170. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.006
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., and Inoue, H. (2010). *Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR alpha and gamma and suppresses COX-2 expression*. J. Lipid Res. 51, 132–139. DOI: 10.1194/jlr.M900255-JLR200

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hu, Q. & Wang, G. (2016). *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. *Transl Neurodegener.*; 5 (1): 14. doi: 10.1186/s40035-016-0060-6
- Hurley, J. M. & Dexter, T.D., (2012). *Voltage-gated calcium channels and Parkinson's disease*. *Pharmacology & Therapeutics* 133 (2012) 324–333. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.11.006
- Jankovic J. (2008). *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*; 79:368–76. DOI:10.1136/jnnp.2007.131045
- Jankovic, J. & Aguilar, G.L. (2008). *Current approaches to the treatment of Parkinson's disease*. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.*:4(4) 743–757. DOI:10.2147/ndt.s2006
- Jara-Oseguera, A. & Islas, L.D. (2013). *The role of allosteric coupling on thermal activation of thermo-TRP channels*. *Biophys J* 104:2160–2169. doi: 10.1016/j.bpj.2013.03.055
- Jennings, A. & Rusakov, A.D. (2016). *Do Astrocytes Respond to Dopamine?* *Opera Med Physiol*. Vol. 2 (1): 34-43. doi:10.20388/OMP2016.001.0017
- Joca, H.C., Cruz-Mendes, Y., Oliveira-Abreu, K., Maia-Joca, R.P.M., Barbosa, R., Lemos, T.L., Lacerda Beirão, P.S. & Leal-Cardoso, J.H. (2012). *Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels*. *J. Nat. Prod.* 75, 1511–1517. DOI:10.1021/np300050g
- Johnson, A.K., Conn J. P. & Niswender, M. C. (2009). *Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease*. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 8(6): 475–491. DOI:10.2174/187152709789824606
- Kalia, L.V. & Lang E. A. (2015). *Parkinson's disease*. *Lancet.* 386: 896–912. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T. & Nilius, B. (2007). *Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1*. J Neurosci. 27: 9874–9884. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2221-07.2007
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B. & Voets, T. (2009). *TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 1273–1278. DOI: 10.1073/pnas.0808487106
- Keshavarzian, A., Green, J.S., Engen, P.A., Voigt, M.R., Naqib, A., Forsyth, B. C., Mutlu, E. & Shannon, K. M. (2015). *Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease*. Movement Disorders, Vol. 30, No. 10. DOI: 10.1002/mds.26307
- Khalil, A., Kovac, S., Morris, G. & Walker, M.C. (2017). *Carvacrol after status epilepticus (SE) prevents recurrent SE, early seizures, cell death and cognitive decline*. Epilepsia 58:263–273. doi: 10.1111/epi.13645.
- Klein, C. & Westenberger, A. (2012). *Genetics of Parkinson's Disease*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2:a008888. doi: 10.1101/cshperspect.a008888
- Komuro, H. & Kumada T. (2005). *Ca<sup>2+</sup> transients control CNS neuronal migration*. Cell Calcium.; 37:387–393. DOI: 10.1016/j.ceca.2005.01.006
- Lanciego, L.J., Luquin, N. & Obeso, A. J. (2012). *Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia*. Cold Spring Harb Perspect in Medicine. doi: 10.1101/cshperspect.a009621
- Lee, H.J., Suk, J.E., Patrick, C., Bae, E.J., Cho, J.H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E. & Lee, S.J. (2010). *Direct transfer of  $\alpha$ -synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies*. J Biol Chem. 285: 9262–9272. DOI: 10.1074/jbc.M109.081125

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lee, K-I., Lee, H-T., Lin, H-C., Tsay, H-C., Tsai F-C., Shyue, S-K & Lee, S-T. (2016). *Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease*. *Journal of Neuroinflammation*. 13:92. DOI 10.1186/s12974-016-0557-z
- Leisman, G., Melillo, R. & Carrick, F.R. (2013). *Clinical Motor and Cognitive Neurobehavioral Relationships in the Basal Ganglia*. *Neuroscience "Basal Ganglia—An Integrative View"*, book edited by Fernando A., Barrios and Clemens Bauer, Chapter 1. <http://dx.doi.org/10.5772/55227>
- Lev, N., Barhum, Y., Pilosof, P.S., Ickowicz, D., Cohen, H.Y., Melamed, E., Offen, D. (2012). *DJ-1 protects against dopamine toxicity: implications for Parkinson's disease and aging*. *Journals of Gerontology: Biological Science*. 68 (3): 215 –225. DOI:10.1093/gerona/gls147.
- Levy, O.A., Malagelada, C. & Greene, L.A. (2009). *Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps*. *NIH Public Access*. 14(4): 478–500. doi:10.1007/s10495-008-0309-3.
- Lewis, S.J.G & Barker, R.A. (2009). *Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: Insights into disease heterogeneity*. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16, 620–625. doi:10.1016/j.jocn.2008.08.020
- Lewy, F.H. (1913). *Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans*. *Dtsch. Z. Nervenheilk* 50, 50–55
- Li, X., Chen, W., Zhang, L., Liu, W.B. & Fei, Z. (2013). *Inhibition of store-operated calcium entry attenuates MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress via preservation of mitochondrial function in PC12 cells: involvement of Homer1a*. *PLoS One* 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0083638.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Li, Z., Hua, C., Pan, X., Fu, X. & Wu, W. (2016). *Carvacrol exerts neuroprotective effects via suppression of the inflammatory response in middle cerebral artery occlusion rats*. *Inflammation*; 39 (4), 1566–1572. DOI: 10.1007/s10753-016-0392-5
- Li, W.T., Zhang, S.Y., Zhou, Y.F., Zhang, B.F., Liang, Z.Q., Liu, Y.H., Wei, Y., Li, C.K., Meng, X.J., Xia, M., Dan, Y. & Song, J.N. (2015). *Carvacrol attenuates traumatic neuronal injury through store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-independent regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis*. *Neurochem Int* 90:107–113. doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.020.
- Li, W.T., Zhang, S.Y., Zhou, Y.F., Zhang, B.F., Liang, Z.Q., Liu, Y.H., Wei, Y., Li, C.K., Meng, X.J., Xia, M., Dan, Y. & Song, J.N. (2015). *Carvacrol attenuates traumatic neuronal injury through store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-independent regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis*. *Neurochem Int* 90:107–113. doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.020.
- Lim, K.L. & Zhang, C.W. (2013). *Molecular Events Underlying Parkinson's Disease—An Interwoven Tapestry*. *Front. Neurol.*;4, 33. DOI:10.3389/fneur.2013.00033
- Lindholm, D., Mañkela, J. Libert, V.D. Mudo, G., Belluardo, N., Eriksson, O. & Saarma, M. (2016). *Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease*. *Cell. Mol. Life Sci.*;73:1365–1379 DOI 10.1007/s00018-015-2101-1
- Lins, R.F.C.L., Souza, F.M., Bispo, M.M.J., Gois, M.A., Melo, S.C.T., Andrade, S.A.R., Lucindo, J. Q-J., Ribeiro, M.A., Silva, H.R., Santos, J.R. & Marchioro, M. (2018). *Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine*. *Brain Research Bulletin*. 139. 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.01.017>

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lins,R.F.C.L., Souza, F.M., Bispo, M.M.J., Gois, M.A., Melo, S.C.T., Andrade, S.A.R., Lucindo, J. Q-J., Ribeiro, M.A., Silva, H.R., Santos, J.R. & Marchioro, M. (2018). *Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine.* Brain Research Bulletin. 139. 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.01.017>
- Lix, L. M., Hobson, D.E., Azimae, M., Leslie, W.D., Burchill, C., Hobson, S., (2010). *Socioeconomic variations in the prevalence and incidence of Parkinson's disease: a population-based analysis.* J. Epidemiol. Community Health 64, 335–340. doi: 10.1136/jech.2008.084954.
- Lu, C. & Mattson, P.M. (2001). *Dimethyl Sulfoxide Suppresses NMDA- and AMPA-Induced Ion Currents and Calcium Influx and Protects against Excitotoxic Death in Hippocampal Neurons.* Experimental Neurology 170, 180–185. doi:10.1006/exnr.2001.7686
- Lucking, C.B. & Brice, A.(2000). *Alpha-synuclein and Parkinson's disease.* Cell Mol Life Sci. 57:1894-1908. DOI:10.1007/PL00000671
- Ma, S.Y., Roytt, M., Collan, Y., Rinne, J.O. (1999) *Unbiased morphometrical measurements show loss of pigmented nigral neurones with ageing.* Neuropathology and Applied Neurobiology 1999; 25: 394-399. DOI: 10.1046/j.1365-2990.1999.00202.x
- Madsen, C.P., Klausen, T.K., Fabian, A., Hansen, B.J., Pedersen, S.F., & Hoffmann, E.K. (2012). *On the role of TRPC1 in control of Ca<sup>2+</sup> influx, cell volume, and cell cycle.* Am J Physiol Cell Physiol. 303:C625–C634. DOI: 10.1152/ajpcell.00287.2011
- Maragakis, N.J. & Rothstein, J.D. (2006). *Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease.* Nature Clinical Practice Neurology; 2(12) 679-689. DOI:10.1038/ncpneuro0355.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Massano, J. & Bhatia, K.P. (2012). *Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management*. Cold Spring Harb Perspect Med. DOI:10.1101/cshperspect.a008870
- Mattson, B.M. (2012). Parkinson's disease: don't mess with calcium. *J Clin Invest*. 122(4):1195-1198. <https://doi.org/10.1172/JCI62835>.
- McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L. and Olanow, C.W. (2004) *Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease*. *Ann. Neurol.*, 56, 149–162. DOI:10.1002/ana.20186
- Mechan, A.O., Fowler, A., Seifert, N., Rieger, H., Wöhrle, T., Etheve, S., Wyss, A., Schüler, G., Colletto, B., Kilpert, C., Aston, J., Elliott, J.M., Goralczyk, R. & Mohajeri, M.H. (2011). *Monoamine reuptake inhibition and mood-enhancing potential of a specified oregano extract*. *British Journal of Nutrition.*; 105(8): 1150–1163. DOI: 10.1017/S0007114510004940
- Melo, F.H.C., Moura, B.A., de Sousa, D.P., de Vasconcelos, S.M., Macedo, D.S., Fonteles, M.M., Viana, G.S. & de Sousa, F.C., (2011). *Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system*. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25 (3), 362–367. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00850.x
- Melo, F.H.C., Venâncio, E.T., de Sousa, D.P., de França, F.M.M., de Vasconcelos, S.M., Viana, G.S. & de Sousa, F.C. (2010). *Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission*. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24 (4), 437–443. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2009.00788.x
- Meredith, G.E., Totterdell, S., Beales, M. & Meshul, C.K., (2009). *Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease*. *Exp Neurol*. 219, 334–340. DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.06.005

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Miller, B.D. & O'Callagan P.J. (2015). *Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future*. *Metabolism Clinical Experimental*. 64, S40–46 DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.030
- Minke, B. & Cook, B., (2002). *TRP Channel Proteins and Signal Transduction*. *Physiol Revi.*: 82. 429–472, DOI: 10.1152/physrev.00001.2002.
- Mohammedi Z. (2017). *Carvacrol: An Update of Biological Activities and Mechanism of Action*. *Open Access Journal of Chemistry* Volume 1, Issue 1, PP 53-62.
- Montell, C. & Rubin, G.M. (1989). *Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction*. *Neuron*. 2:1313-1323
- Montell, C. (2005). *The TRP superfamily of cation channels*. *Sci STKE*. DOI: 10.1126/stke.2722005re3
- Moon, H.E. & Paek, S.H. (2015). *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. *Experimental Neurobiology*.; 24 (2): 103-116. doi: 10.5607/en.2015.24.2.103
- Morales, I., Sanchez, A., Rodriguez-Sabate, C. & Rodriguez, M. (2016). *The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum*. *J. Neurochem*. 139(1):81-95. doi: 10.1111/jnc.13684.
- Moran, J., Itoh, T., Reddy, U.R., Chen, M., Alnemri, E.S. & Pleasure, D., (1999). *Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP*. *J. Neurochem*. 73, 568–577. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730568.x>
- Morelli, M.B., Amantini, C., Liberati, S., Santoni, M. & Nabissi, M. (2013). *TRP Channels: New Potential Therapeutic Approaches in CNS Neuropathies*. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*.; Vol. 12, No. 2. DOI: 10.2174/18715273113129990056

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Morita, T., Okada, M., Hara, Y., & Yamawaki, H. (2011). Mechanisms underlying impairment of endothelium-dependent relaxation by fetal bovine serum in organocultured rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 668:401–406. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.07.040
- Morrish, P.K., Sawle, G.V & Brooks, D.J. (1996). *An [<sup>18</sup>F]dopa -PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease*. *Brain*, 119: 558-591.
- Mukhopadhyay, I., Gomes, P., Aranake, S., Shetty, M., Karnik, P., Damle, M., Kuruganti, S., Thorat, S. & Khairatkar-Joshi, N. (2011). *Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells*. *J Recept Signal Transduct Res* 31:350–358. DOI: 10.3109/10799893.2011.602413
- Mustafa, A.K., Ahmad, A.S., Zeynalov, E., Gazi, S.K., Sikka, G., Ehmsen, J.T., Barrow R.K., Coyle, J.T., Snyder, S.H. & Doré, S. (2010). *Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity*. *J Neurosci*. 30:1413–1416, doi:10.1523/JNEUROSCI.4297-09.2010, pmid:20107067.
- Narayanan, K.L., Irmady, K., Subramaniam, S., Unsicker, K. & von Bohlen und Halbach, O. (2008). *Evidence that TRPC1 is involved in hippocampal glutamate-induced cell death*. *Neurosci Lett*. 446:117–122. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.09.034
- Nieto-Posadas, A., Jara-Oseguera, A. & Rosenbaum, T. (2011). *TRP channel gating physiology*. *Curr Top Med Chem*. 11:2131–2150. DOI: 10.2174/156802611796904870
- Nilius, B & Szallasi, A. (2014). *Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine*. *Pharmacol Rev*. 66:676–814. DOI: 10.1124/pr.113.008268

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Nilius, B. & Owsianik, G. (2010). Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch.*; 460(2), 437-450. DOI: 10.1007/s00424-010-0788-2
- Nilius, B. & Owsianik, G. (2011). *The transient receptor potential family of ion channels*. *Genome Biol.*: 12:218–229. DOI: 0.1186/gb-2011-12-3-218
- Nilius, B., Appendino, G. & Owsianik, G. (2012). *The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology*. *Pflugers Arch.* 464:425–458. DOI: 10.1007/s00424-012-1158-z
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. & Peters, J.A. (2007). *Transient receptor potential cation channels in disease*. *Physiol Rev* 87:165–217. DOI: 10.1152/physrev.00021.2006
- Niranjan, R., (2014). *The Role of Inflammatory and Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Focus on Astrocytes*. *Mol. Neurobiol.* 49:28–38 DOI 10.1007/s12035-013-8483-x
- Nozawa, K., Kawabata-Shoda, E., Doihara, H., Kojima, R., Okada, H., Mochizuki, S., Sano, Y., Inamura, K., Matsushime, H., Koizumi, T., Yokoyama, T. & Ito, H. (2009). *TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells*. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 106:3408–3413. DOI: 10.1073/pnas.0805323106
- Olanow, C.W. (2007). *The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease*. *Mov. Disord.* 22:S335-S342. DOI: 10.1002/mds.21675
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. (2003). *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 4(7), 552-565. DOI:10.1038/nrm1150
- Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K.H. & Galadari, S. (2015). *Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells*. *Pharmacol Ther.* 152:83–97. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.006

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy*. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. Spring, 14, 223–236; discussion 222.
- Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I. & Minke, B. (2009). *Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels*. Cell Calcium 45; 300–309. doi:10.1016/j.ceca.2008.11.009
- Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I. & Minke, B. (2009). *Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels*. Cell Calcium 45; 300–309. doi:10.1016/j.ceca.2008.11.009
- Paulsen, C.E., Armache, J-P., Gao, Y., Cheng, Y. & Julius, Y. (2018). *Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms*. NATURE. Vol.520. doi:10.1038/nature14367
- Peters, M., Trembovler, V., Alexandrovich, A., Parnas, M., Birnbaumer, L., Minke, B. & Shoham, E. (2012). *Carvacrol Together with TRPC1 Elimination Improve Functional Recovery after Traumatic Brain Injury in Mice*. Journal of Neurotrauma.; 29:2831–2834. doi: 10.1089/neu.2012.2575.
- Peters, M., Trembovler, V., Alexandrovich, A., Parnas, M., Birnbaumer, L., Minke, B. & Shoham, E. (2012). *Carvacrol Together with TRPC1 Elimination Improve Functional Recovery after Traumatic Brain Injury in Mice*. Journal of Neurotrauma.; 29:2831–2834. doi: 10.1089/neu.2012.2575.
- Pfaffl, M.W. (2001). *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res.;29(9):e45.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Phatnani, H. & Maniatis, T. (2015). *Astrocytes in Neurodegenerative Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a020628. DOI: 10.1101/cshperspect.a020628
- Phillis, J. W., A. Y. Estevez & M. H. O'Regan. (1998). *Protective effects of the free radical scavengers, dimethyl sulfoxide and ethanol, in cerebral ischemia in gerbils*. Neurosci. Lett. 244: 109–111.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.E., Lang, A.E. (2017). *Parkinson Disease*. Nat Rev Dis Primers. 3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.
- Polymeropoulos MH., Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. (1997). Science. 276:2045-2047.
- Proschel, C., Stripay, J.L., Shih, C.H., Munger, J.C. & Noble, M.D. (2014). *Delayed transplantation of precursor cell-derived astrocytes provides multiple benefits in a rat model of Parkinson's*. EMBO Mol Med.; 6: 504-18. DOI: 10.1002/emmm.201302878
- Przedborski, S. (2017). *The Two-Century Journey Of Parkinson Disease Research*. Nature Reviews. 18: 251-259. doi:10.1038/nrn.2017.25
- Putney, J.W. (2005). *Physiological mechanisms of TRPC activation*. Pflugers Arch. 451. 29–34. DOI 10.1007/s00424-005-1416-4



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Quintans-Junior, L.J., Guimarães, A.G., Araujo, B.E.S., Oliveira, G.F., Santana, M.T., Moreira, F.V., Santos, M.R.V., Cavalcanti, S.C.H., De Lucca, W.J., Botelho, M.A., Ribeiro, L.A.A., Nobrega, F.F.F. & Almeida, R.N. (2010). *Carvacrol, (-)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents*. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 6566-6572.
- Rappold, P.M. & Tieu K. (2010). *Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease*. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics. Vol. 7, 413–423. DOI: 10.1016/j.nurt.2010.07.001
- Rappold, P.M. & Tieu K. (2010). *Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease*. The American Society for Experimental Neuro Therapeutics. Vol. 7, 413–423. doi: 10.1016/j.nurt.2010.07.001.
- Samanta, A., Taylor, E.T.H. & Vera Y.M-B. (2018). *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. *Subcell Biochem.* 87: 141–165. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_6
- Sarkar, S., Raymick, J. & Imam, S. (2016). *Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives*. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 904; doi:10.3390/ijms17060904
- Schapira, A.H. & Jenner, P. (2011). *Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease*. *Mov Disord.* 26(6):1049-55. doi: 10.1002/mds.23732.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pedro A. B. P., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K. & Auvinen, P. (2015). *Gut Microbiota Are Related to Parkinson's Disease and Clinical Phenotype*. *Movement Disorders*, Vol. 30, No. 3, DOI: 10.1002/mds.26069
- Scimemi, A., (2013). *A TRP among the astrocytes*. *J Physiol.* 591.1. pp 9–15. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.237883

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Secondo, A., Bagetta, G. & Amantea, D. (2018). *On the Role of Store-Operated Calcium Entry in Acute and Chronic Neurodegenerative Diseases*. *Front. Mol. Neurosci.* 11:87. doi: 10.3389/fnmol.2018.00087
- Selvaraj, S., Sun, Y., Watt, J.A., Wang, S., Lei, S., Birnbaumer, L. & Singh, B.B. (2012). *Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling*. *J Clin Invest.*;122(4):1354–1367. doi: 10.1172/JCI61332.
- Selvaraj, S., Sun, Y. & Singh, B.B. (2010). *TRPC Channels and their Implications for Neurological Disease*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 9(1): 94–104. DOI: 10.2174/187152710790966650
- Sheehan, J.P., Swerdlow, R.H., Parker, W.D., Miller, S.W., Davis, R.E. & Tuttle, J.B. (1997). *Altered calcium homeostasis in cells transformed by mitochondria from individuals with Parkinson's disease*. *J Neurochem* 68:1221-1233. DOI:10.1046/j.1471-4159.1997.68031221.x
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, T.R., O'Dell, J.T. & Khakh B.S. (2013). *TRPA1 Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive d-Serine Release*. *Journal of Neuroscience.*; 33 (24) 10143-10153; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5779-12.2013>
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P. & Khakh, B.S. (2012). *TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3*. *Nat Neurosci* 15:70–80. doi: 10.1038/nn.3000.
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P. & Khakh, B.S. (2012). *TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3*. *Nat Neurosci* 15:70–80. doi: 10.1038/nn.3000.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Smith, M.P., Beacham, D., Ensor, E. & Koltzenburg, M. (2004). *Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system*. Neuroreport. 15:1399–1403. DOI:10.1097/01.wnr.0000126559.35631.54
- Sofroniew, V.M. & Vinters, V.H. (2010). *Astrocytes: biology and pathology*. *Acta Neuropathol.* 119:7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2003). *ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures*. Cell. 112, 819–829. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00158-2
- Stueber, T., Eberhardt, J.M., Caspi, Y., Lev, S., Binshtok, A. & Leffler, A. (2017). *Differential cytotoxicity and intracellular calcium-signalling following activation of the calcium-permeable ion channels TRPV1 and TRPA1*. Cell Calcium. 68:34-44. doi: 10.1016/j.ceca.2017.10.003.
- Stueber, T., Eberhardt, J.M., Caspi, Y., Lev, S., Binshtok, A. & Leffler, A. (2017). *Differential cytotoxicity and intracellular calcium-signalling following activation of the calcium-permeable ion channels TRPV1 and TRPA1*. Cell Calcium. 68. 34–44. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.10.003
- Sukumaran, P., Schaar, A., Sun, Y. & Singh, B.B. (2016). *Functional role of TRP channels in modulating ER stress and autophagy*. Cell Calcium 60(2):123–132. doi: 10.1016/j.ceca.2016.02.012.
- Sukumaran, P., Sun, Y., Schaar, A., Selvaraj, S. & Singh, B. B. (2017). *Role of TRPC channels in Parkinson's disease*. Adv Exp Med Biol. 976: 85–94. doi:10.1007/978-94-024-1088-4\_8.
- Sulzer, D. (2007). *Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease*. Trends Neurosci. 30:244-250. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.009

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sun, Y., Sukumaran, P., Bandyopadhyay, B.C. & Singh, B.B. (2014). *Physiological Function and Characterization of TRPCs in Neurons*. *Cells*. 2014; 3:455–475. doi: 10.3390/cells3020455
- Sun, Y., Zhang, H., Selvaraj, S., Sukumaran, P., Lei, S., Birnbaumer, L. & Singh, B.B. (2017). *Inhibition of L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels by TRPC1-STIM1 Complex Is Essential for the Protection of Dopaminergic Neurons*. *J Neurosci.*; 37: 3364-3377 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3010-16.2017.
- Suntres, E.Z., Coccimiglio, J. & Alipour, M. (2015). *The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Suntres, E.Z., Coccimiglio, J. & Alipour, M. (2015). *The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Surmeier, D.J. (2007). *Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease*. *Lancet neurology.*: 6:933-938. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70246-6
- Surmeier, D.J., Guzman, J.N. & Sanchez-Padilla, J. (2010). *Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease*. *Cell Calcium*. 47:175–182. doi:10.1016/j.ceca.2009.12.003
- Surmeier, D.J., Guzman, J.N., Sanchez, J. & Schumacker, P.T. (2012). *Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(7):a009290. 1-27. DOI:10.1101/cshperspect.a009290
- Tai, Y., Feng, S, Du, W. & Wang, Y. (2009). *Functional roles of TRPC channels in the developing brain*. *Pflugers Arch* 458:283–289. DOI: 10.1007/s00424-008-0618-y

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Takada, Y., Numata, T., Mori, Y., *Targeting TRPs in Neurodegenerative Disorders*. (2013). *Current Topics in Medicinal Chemistry*.;13(3):322-34. DOI: 10.2174/1568026611313030009
- Takahashi, N., Kozai, D. & Mori, K. (2012). *TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals*. *Frontiers in Physiology*. Vol.3. 324. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00324>
- Taner, D. (2011). *Fonksiyonel Nöroanatomi, 10*. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.
- Tolleson, C.M. & Fang, J.Y. (2013). *Advances in the mechanisms of Parkinson's disease*. *Discov. Med.* 15:61–66.
- Tong, X., Shigetomi, E., Looger, L.L. & Khakh, B.S. (2013). Genetically encoded calcium indicators and astrocyte calcium microdomains. *Neuroscientist* 19:274–291, doi:10.1177/1073858412468794
- Torun, Ş., Uysal, M., Gücüyener, D. & Özdemir, G. (1995). *Parkinson's Disease in Eskisehir, Turkey*. *European Journal of Neurology*. 2(1):44-45.
- Trétiakoff, C. (1919). *Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson*. Université de Paris
- Turpin, F.R., Potier, B., Dulong, J.R., Sinet, P.M., Alliot, J., Oliet, S.H., Dutar, P., Epelbaum, J., Mothet, J.P. & Billard, J.M. (2011). *Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function*. *Neurobiol Aging*. 32:1495–1504, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.001
- Ungerstedt, U. (1968). *6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons*. *Eur J Pharmacol*.;5(1):107-10. DOI: 10.1016/0014-2999(68)90164-7.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Valera, E. & Masliah, E. (2016). *Therapeutic approaches in Parkinson's disease and related disorders*. J.Neurochem.;139(Suppl1):346–352. doi:10.1111/jnc.13529.
- Van Den Eeden S.K., Tanner, C.M., Bernstein, A.L., Fross, R.D., Leimpeter, A., Bloch, D.A. & Nelson, L.M. (2003). *Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity*. Am J Epidemiol. 157: 1015–22. DOI: 10.1093/aje/kwg068
- Venkatachalam, K. & Montell, C. (2007). *TRP Channels*. Annu Rev Biochem. 76: 387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Vennekens, R., Menigoz, A. & Nilius, B. (2012). TRPs in the Brain. Rev Physiol Biochem Pharmacol 163:27–64. DOI: 10.1007/112\_2012\_8
- Verkhratsky, A., Nedergaard, M. & Hertz, L. (2014). *Why are Astrocytes Important?* Neurochem. Res. DOI: 10.1007/s11064-014-1403-2
- Verkhratsky, A., Noda, M., Parpura, V. & Kirischuk, S. (2013). *Sodium fluxes and astroglial function*. Adv Exp Med Biol. 961:295–305. DOI: 10.1007/978-1-4614-4756-6\_25
- Verkhratsky, A., Reyes, C.R. & Parpura, V. (2013). *TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, doi: 10.1007/112\_2013\_15
- Verkhratsky, A., Rodriguez, J.J. & Parpura, V. (2012). *Calcium signalling in astroglia*. Mol Cell Endocrinol. 353:45–56. DOI: 10.1016/j.mce.2011.08.039
- Viana, F. (2016). *TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage*. J Physiol. 594.15. pp 4151–4169. DOI: 10.1113/JP270935

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Wu, D.C., Teismann, P., Choi, D.K., Tieu, K., Przedborski, S. (2001). *The role of glial cells in Parkinson's disease*. *Curr Opin Neurol*. 14(4):483-9. DOI: 10.1097/00019052-200108000-00009
- Wachter, B., Schurger, S., Rolinger, J., von Ameln-Mayerhofer, A., Berg, D., Wagner, H.J. & Kueppers, E. (2010). *Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes*. *Cell and Tissue Research*.; 342(2) 147-60. DOI: 10.1007/s00441-010-1061-x
- Ward, P., Serib, S., & Cavanna, A. E. (2013). *Functional neuroanatomy and behavioural correlates of the basal ganglia*. *Behavioural Neurology*, 26(4), 219–223. doi: 10.3233/BEN-2012-120264
- Whicmann, T. & Dostrovsky, J. (2011). *Pathological basal ganglia activity in movement disorders*. *Neuroscience*.198:232–244. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.048
- Wickremaratchi, M.M., Ben-Shlomo, Y., Morris, H.R., (2009). *The effect of onset age on the clinical features of Parkinson's disease*. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 16:450-6. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02514.x>
- Xia, M., Chen, W., Wang, J., Yin, Y., Guo, C., Li, C., Li, M., Tang, X., Jia, Z., Hu, R., Liu, X. & Feng, H. (2019). *TRPA1 Activation-Induced Myelin Degradation Plays a Key Role in Motor Dysfunction After Intracerebral Hemorrhage*. *Mol. Neurosci*. 12:98. doi: 10.3389/fnmol.2019.00098
- Yacoubian, T.A. & Standaert, D.G. (2009). *Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1792, 676–687. DOI:10.1016/j.bbadis.2008.09.009

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yamada, T., McGeer, P.L., Baimbridge, K.G. & McGeer, E.G. (1990). *Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K*. Brain Res.: 526:303-307. DOI:10.1016/0006-8993(90)91236-a
- Yelkenli, H.İ., Ulupinar, E., Korkmaz, O.T., Şener, E., Kuş, G., Filiz, Z. & Tunçel, N. (2016). *Modulation of Corpus Striatum Neurochemistry by Astrocytes and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) in Parkinsonian Rats*. J Mol Neurosci. DOI 10.1007/s12031-016-0757-0
- Yelnik J., (2002). *Functional Anatomy of the Basal Ganglia*. Movement Disorders Vol. 17: S15-S21. DOI: 10.1002/mds.10138
- Yiğit, G. & Arıcıoğlu, F. (2015). *Günümüz ve Gelecekte Parkinson Hastalığı için Farmakolojik Tedavi Yaklaşımları*. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi Cilt:5,Sayı:4,265-273 DOI: 10.5455/musbed.20150827011840
- Yu, H., Zhang, Z.L., Chen, J., Pei, A., Hua, F., Qian, X., He, J., Liu, C.F. & Xu, X. (2012). *Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice*. PLoS One.; 7 (3), 3–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0033584
- Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., Wang, L. & Xiao, M. (2014). *Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes*. PLoS One. 9(9): e107447. doi: 10.1371/journal.pone.0107447
- Zeng, X., Pan, Z.G., Shao, Y., Wu, X.N., Liu, S.X., Li, N.L. & Wang, W.M. (2013). *SKF-96365 attenuates toxin-induced neuronal injury through opposite regulatory effects on Homer1a and Homer1b/c in cultured rat mesencephalic cells*. Neurosci Lett 543: 183-188. doi:10.1016/j.neulet.2013.03.030.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Zhang, C., Deng, Y., Dai, H., Zhou, W., Tian, J., Bing, G. & Zhao, L. (2017). *Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes*. Brain Res Bull. 128:34-39. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.11.004.
- Zhang, J., Perry, G., Smith, M.A., Robertson, D., Olson, S.J., Graham, D.G. & Montine, T.J. (1999). *Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons*. Am J Pathol 154:1423-1429. DOI:10.1016/S0002-9440(10)65396-5
- Zhang, V.Y., Ormerod, K.G. & Littleton, J.T. (2017). *Astrocyte  $Ca^{+2}$  Influx Negatively Regulates Neuronal Activity*. Neuronal Excitability. 4(2) e0340-16.1–12. DOI:http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0340-16.2017.
- Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H. & Wang, X. (2016). *Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases*. Frontiers in Aging Neuroscience doi: 10.3389/fnagi.2016.00303
- Zotti, M., Colaianna, M., Morgese, G.M., Tucci, P., Schiavone, S., Avato, P. & Trabace, L. (2013) *Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent*. Molecules 18 (6), 6161–6172. doi:10.3390/molecules18066161

# ÖZGEÇMİŞ

## Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Tülay KOCA

Doğum tarihi ve yeri : 18.10.1981 - BERGAMA

Uyruğu : T.C.

İletişim adresleri : [tulay\\_akan@yahoo.com](mailto:tulay_akan@yahoo.com)

Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi – Tıp Fakültesi – Fizyoloji AD.

Selçuklu M. Şehit Erdal Hamamcı C. No:2B. B Blok D.21 Uydükent-Afyon

## Eğitim Durumu

Derece	Okul - Bölüm - Program	Üniversite	Yıl
İlkokul	Şehit Fazıl Bey İlkokulu		1992
Ortaokul	Alsancak Ortaokulu		1995
Lise	İzmir Kız Lisesi		1998
Ön Lisans	Atatürk Sağlık Hizmetleri MYO	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2001
Lisans	Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2004
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Ens. – TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/Tıbbi Biyokimya AD.	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2007

Doktora	Sağlık Bilimleri Ens. - TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/FIZYOLOJİ AD.	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Devam ediyor
---------	---	--	--------------

**İNGİLİZCE** (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

**Mesleki Deneyim :** 2008 yılından beri Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi'nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktayım.

**Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:** TFBD (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği)

**Yayınlar :**

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Pektaş Mehmet Bilgehan, Sadi Gökhan, Koca Halit Buğra, Yuksel Yasemin, Vurmaz Ayhan, Koca Tülay, Tosun Murat (2015). Resveratrol Ameliorates the Components of Hepatic Inflammation and Apoptosis in a Rat Model of Streptozotocin Induced Diabetes. *Drug Development Research*, 77(1), 12-19., Doi: 10.1002/ddr.21287 (Yayın No: 2120775)
2. Sadi Gökhan, Pektaş Mehmet Bilgehan, Koca Halit Buğra, Tosun Murat, Koca Tülay (2015). Resveratrol improves hepatic insulin signaling and reduces the inflammatory response in streptozotocin induced diabetes. *Gene*, 570(2), 213-220., Doi: 10.1016/j.gene.2015.06.019 (Yayın No: 2120509)
3. Koca Tülay, Berber Asiye, Koca Halit Buğra, Demir Temir Ali, Köken Tülay (2010). Effects of hemodialysis period on levels of blood trace elements and oxidative stress. *Clinical and Experimental Nephrology*, 14(5), 463-468., Doi: 10.1007/s10157-010-0310-3 (Yayın No: 632645)

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. Yıldırım Onur Gökhan, Korkmaz Ömer Adil, Koca Tülay, Pektaş Mehmet Bilgehan, Öztürk Gözde, Şumlu Esra, Sadi Gökhan, Akar Fatma (2017). Fructose Feeding Suppresses Insulin Signaling and Increases Inflammatory Markers in Kidney of Rats. 1st International Congress on Cancer Ion Channels (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3884661)

2. Pektaş Mehmet Bilgehan, Yıldırım Onur Gökhan, Koca Tülay, Öztürk Gözde, Şumlu Esra, Sadi Gökhan, Akar Fatma (2017). Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammatory Pathways in Testicular Tissue of Rats. 1st International Congress on Cancer Ion Channels (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3885448)

3. Pektaş Mehmet Bilgehan, Koca Tülay, Öztürk Gözde, Sadi Gökhan, Akar Fatma (2016). High fructose consumption causes pancreatic inflammation in rats. 7th European Congress of Pharmacology EPHAR 2016 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3310423)

4. Pektaş Mehmet Bilgehan, Koca Halit Buğra, Sadi Gökhan, Tosun Murat, Koca Tülay (2015). Resveratrol down regulates Visfatin and improves hepatic dysfunction in streptozotocin induced diabetes. Pharma Middle East (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2120701)

5. Sadi Gökhan, Pektaş Mehmet Bilgehan, Koca Halit Buğra, Tosun Murat, Koca Tülay (2015). Changes in hepatic insulin signaling antinflammatory responses in streptozotocin induced diabetes: Effects of resveratrol. 40th FEBS Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2120587)

C. Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler:

1. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı, Bölüm adı: Temel Laboratuvar Uygulamaları, (2013)., Tülay Koca, Nobel Tıp Kitapevleri, Editör: Prof.Dr. Mustafa Altındış, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 415, ISBN:978-975-420-982-2, Türkçe(Ders Kitabı), (Yayın No: 633473)

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1.Koca Halit Buğra, Yıldırım İrfan, Işık Özkan, Koca Tülay, Bal Tuncay (2018). Genç Yetişkin Kadınlarda Düzenli Aerobik Egzersizlerin İnflamatuvar Belirteçler Üzerine Etkisi. Spor ve Performans Araştırmaları Dergisi, 9(1), 25-34., Doi: 10.17155/omuspd. 406607 (Kontrol No: 4226962)

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Tülay Akan Koca, Halit Buğra Koca, Asiye Berber, Sema Akgün, Temir Ali Demir, Tülay Köken. Hemodializ Süresinin Kan Eser Element Düzeylerine ve Oksidatif Stres Biyomarkerları Üzerine Etkisi. VII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi Program ve Özet Kitabı(7), 29 (I)(Yayın No:633695)

Teknik Not, Vaka Takdimi, Araştırma notu vb.

1. Vaka Takdimi, Yıldız Erkan, Koca Yıldız Selcen, Ulu Şahin, Koca Tülay (2019). Comparison of therapeutic efficacy of antihistaminics and combinations of montelukast with allergic rhinitis. Medicine Science International Medical Journal (Yayın No: 5278924)

2. Vaka Takdimi, Yıldız Erkan, Kahveci Orhan Kemal, Ulu Şahin, Koca Tülay (2019). Facial paralysis caused by the bee sting. Medicine Science International Medical Journal (Yayın No: 5278076)

3. Özet, Köken Tülay, Koca Halit Buğra, Koca Tülay, Altunbaş Korhan (2018). Apium graveolens extract induces apoptosis via Bax and p-53 proteins in the LNCaP human prostate cancer cell line. FEBS Open Bio (Yayın No: 5279135)

4. Özet, Koca Halit Buğra, Sadi Gökhan, Köken Tülay, Koca Tülay (2018). Effect of Acorus calamus and Apium graveolens extracts on Egfr and Erbb2 in LNCaP cells. Febs Open Bio (Yayın No: 5278942)

## **Bilimsel Etkinlikler**

### **Projeler :**

1. Acorus calamus ve apium graveolens ekstraktlarının lncap hücrelerinde kaspaz-3,-6, -9 ve apaf-1 üzerine etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Koca Halit Buğra, Araştırmacı: Koca Tülay, Araştırmacı: Köken Tülay, 20/12/2016 - 27/04/2018 (ULUSAL)
2. Acorus calamus ve apium graveolens ekstraktlarının lncap hücrelerinde Egfr ve Erbb2 üzerine etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Koca Halit Buğra, Araştırmacı: Koca Tülay, Araştırmacı: Sadi Gökhan, Araştırmacı: Köken Tülay, 17/11/2017 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
3. Mesleki Becerilerin Niteliğinin Arttırılması İçin Uygulama Laboratuvarı Geliştirme Projesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 15/07/2014 - 14/07/2015 (ULUSAL)
4. Acorus calamus ve apium graveolens ekstraktlarının lncap hücrelerinde miRNA-141, 96 ve 222 üzerine etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Köken Tülay, Araştırmacı: Sadi Gökhan, Araştırmacı: Koca Tülay, Araştırmacı: Koca Halit Buğra, 17/11/2017 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
5. Acorus calamus ve apium graveolens ekstraktlarının lncap hücrelerinde Bax, Bcl-2, Bcl-Xl ve p53 üzerine etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Köken Tülay, Araştırmacı: Koca Halit Buğra, Araştırmacı: Koca Tülay, 20/12/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

### **Kurslar ve Eğitim Programları:**

- 2014 - Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ