T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ZEBRA BALIKLARINDA OLUŞTURULAN PARKİNSON MODELİNDE AĞRI MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

DERYA CANSIZ

DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET ATA ALTURFAN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Derya CANSIZ

(İmza)

İTHAF

Tezimi hayatım boyunca yanımda olup bana destek olan Anneme ve Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İbn-i Rüsd' ün "Her şey kader kısmet; fakat onun için de çabalamak gerek" sözüyle çalışmanın hayattaki en temel etken olduğunu bana öğütleyen ve bu disiplinle ilerlemeyi öğreten, doktora eğitimim boyunca yapmış olduğumuz her çalışmada, belirlediğimiz her hedefte benim menfaatlerimi her zaman önde tutan, daima yanımda olan, sahip olduğu tecrübe ve bilgisiyle yoluma ışık tutan, öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Ahmet Ata ALTURFAN' a

Yapmak istediğim her işte daima yanımda olup işler yolunda gitmediğinde de hala yapılacak bir şeylerin olduğunu ve vazgeçmemek gerektiğini bana öğütleyen ve bu disiplinle yetişmemi sağlayan, kendisini tanımaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Marmara Üniversitesi öğretim üyesi sevgili hocam Prof. Dr. Ebru Işık ALTURFAN' a

Tez çalışmam boyunca histolojik analizler konusunda bilgisinden faydalandığımız Marmara Üniversitesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Esin AK' a, deneysel aşamalarda birlikte çalıştığımız, bilgilerini benimle paylaşan ve her zorlukta yanımda olan Marmara Üniversitesi Zebra Balığı Araştırma laboratuvarındaki arkadaşlarım İsmail ÜNAL, Ünsal Veli ÜSTÜNDAĞ, Fümet Duygu ÜSTÜNDAĞ, Merih BELER ve Gül KAPLAN' a, her zaman yanımda olup bana desteklerini hissettiren arkadaşlarım Zehra SEZER ve Ebru Nur AY' a,

Desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim ve hep yanımda olan kardeşlerim Kübra ve Enes' e, çok kısa süredir hayatımda olmasına rağmen bana sevginin çocuk halini hissettiren yeğenim Ömer' e, sonuca ulaştırmak için çabalayıp başardığım her işimde başarının asıl sahibi, tüm hayatım boyunca yanımda olan, beni her yapmak istediğim işte sorgulamadan destekleyen, sevgilerini hep hissettiren ve bana yaşadığım güzel hayatı sunan değerli Annem' e ve Babam' a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34542

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İ
BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2. 1. Parkinson Hastalığı 3
2.1.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi 3
2.1.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi 6
2.1.3. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri 6
2.1.3.1. Motor Semptomlar 7
2.1.3.2. Motor Olmayan Semptomlar 8
2.1.3.3. Parkinson Hastalığının Motor Olmayan Semptomplarından "Ağrı" 8
2.1.4. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi 9
2.1.4.1. Katekolaminler ve Parkinson Hastalığı Gelişmesinde Etkili Genler 10
2.1.4.2. Katekolaminlerin Metabolizması 10
2.1.4.3. *pink1* (PTEN ile indüklenen kinaz 1/PARK6) 12
2.1.4.4. *park2* (Parkin RBR E3 Ubikitin Protein Ligaz) 13
2.1.4.5. *lrrk2* (Lösince zengin tekrarlayan kinaz 2) 13
2.1.4.6. *dj-1/park7* (Parkinson hastalığı proteini 7) 13
2.1.4.7. *bdnf* (Beyin türevli nörotrofik faktör) 14
2.1.4.8. *th* (Tirozin Hidroksilaz) 15
2.1.4.9. *sncga* (Sinüklein gama) 15
2.1.5. Parkinson Hastalığının Patogenezinde Oksidatif Stres, Mitokondriyel Fonksiyon Bozukluğunun ve Asetilkolinesterazın Rolü 16
2.1.6. Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Parkinson Modeli 17

2.2. Ağrı 19
2.2.1. Ağrının Sınıflandırılması 20
2.2.1.1. Süresine Göre Ağrı Sınıflaması 20
2.2.1.1.1. Akut Ağrı 20
2.2.1.1.2. Kronik Ağrı 20
2.2.1.2. Kaynaklandığı Bölgelere Göre Ağrı Sınıflandırması 21
2.2.1.2.1. Somatik Ağrı 21
2.2.1.2.2. Visseral Ağrı 21
2.2.1.2.3. Sempatik Ağrı 21
2.2.1.3. Mekanizmalarına Göre Ağrı Sınıflaması 22
2.2.1.3.1. Nosiseptif Ağrı 22
2.2.1.3.2. Nöropatik Ağrı 22
2.2.1.3.3. Deafferantasyon Ağrısı 22
2.2.1.3.4. Reaktif Ağrı 22
2.2.1.3.5. Psikosomatik Ağrı 22
2.2.2.Ağrı Mekanizmaları ve İletimi 22
2.2.2.1. Periferal Mekanizmalar 23
2.2.2.1.1. Nosiseptif Nöronlar ve Reseptörler 23
2.2.2.1.2. Primer Afferent Nöronlar 27
2.2.2.2. Merkezi Mekanizmalar 28
2.2.3.Ağrının Nörokimyası 29
2.2.4.Opioid Sistemi 31
2.2.4.1. Endojen Opioidler ve Kodlayan Genler 31
2.2.4.2. Endojen Opioid Peptidleri ve Kodlayan Genler 32
2.2.4.3. Opioid Reseptörler 36
2.2.4.3.1. Mü Opioid Reseptörü (MOR) ve Kodlayan Gen 37
2.2.4.3.2. Kappa Opioid Reseptörü (KOR) ve Kodlayan gen 37
2.2.4.3.3. Delta Opioid Reseptörü (DOR) ve Kodlayan gen 38
2.2.4.3.4. Nosiseptin/Orfanin FQ (NOP) Reseptörü 39
2.2.5.Ağrı ile ilişkili İyon Kanalları ve Kodlayan Genler 39
2.2.5.1. TRP Kanalları ve trpa1a geni 39
2.2.5.2. Sodyum İyon Kanalları ve *naV1.6a* (*scn8aa*) geni 40
2.2.5.3. Asit Kanalları ve *zasic1.1, zasic1.2, zasic1.3* genleri 41

2.2.6.Zebra Balıklarında Opioid Sistemi 41
2.2.7.1. Hayvanlarda Ağrı Modeli Oluşturulması 43
2.3. Oksidan-Antioksidan Sistem Parametreleri 44
2.3.1. Lipit Peroksidasyonu (LPO) 44
2.3.2. Nitrik oksit (NO) 45
2.3.3. Glutatyon *S*-transferaz (GST) 45
2.3.4. Asetilkolin Esteraz Aktivitesi (AChE) 45
2.3.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD) 46
3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1. Kullanılan Cihazlar 47
3.2. Kullanılan Kimyasallar 48
3.3. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü 50
3.4. Grupların Oluşturulması ve Maruziyet Uygulanması 50
3.5. Davranış Testleri 51
3.5.1. Writhing Testi 51
3.5.2. Lokomotor Aktivite 52
3.6. Homojenat Hazırlanması 52
3.7. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi 52
3.7.1. Total protein tayini 52
3.7.2. Lipit peroksidasyon (LPO) tayini 54
3.7.3. Total nitrik oksid tayini 55
3.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi tayini 57
3.7.5. Glutatyon- S- transferaz (GST) aktivitesi tayini 58
3.7.6. Asetilkolin esteraz aktivitesi tayini 59
3.8. İmmünohistokimyasal İnceleme 60
3.8.1. Parafin Bloktan kesit Alma İşlemi 61
3.8.2. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi 62
3.8.3. İmmünohistokimyasal Görüntülerin Analizi 64
3.9. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR) 64
3.10. LC-MS/MS ile Nörotransmitter Miktar Tayini 65
3.11. İstatistiksel Analizi 65
4. BULGULAR 66
4.1. Davranış Analizlerinin Sonuçları 66

4.1.1. Writhing testi....66
4.1.2. Lokomotor Aktivite....67
4.1.2.1. Keşfedilen yol (Exploration Area)....67
4.1.2.2. Grupların Keşfedilen (Exploration Area) yollarının Karşılaştırılması....69
4.1.2.3. Katedilen Mesafe....70
4.1.2.4. Ortalama Hız....70
4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları....71
4.2.1. LPO Analiz Sonuçları....71
4.2.2. SOD Analiz Sonuçları....72
4.2.3. NO Analiz Sonuçları....72
4.2.4. GST Analiz Sonuçları....73
4.2.5. Asetilkolin Esteraz Aktivitesi....74
4.3. RT-PCR Analiz Sonuçları....74
4.3.1. Parkinson ile İlişkili Genlerin RT-PCR Sonuçları....74
4.3.2. Ağrı ile İlişkili Kanalların RT-PCR Sonuçları....76
4.3.3. Ağrı ile İlişkili ile Endojen Opioid Genlerinin RT-PCR Sonuçları....78
4.3.4. Ağrı İle ilişkili Opioid Reseptör Genlerin RT-PCR Sonuçları....79
4.4. LC-MS/MS Analiz Sonuçları....80
4.4.1. Dopamin, Dopac ve Norepinefrin Analiz Sonuçları....80
4.4.2. Serotonin ve 5-HIAA Analiz Sonuçları....81
4.5. İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları....82
4.5.1. Tirozin Hidroksilaz Antikoru ile İmmünohistokimyasal Analizi Sonuçları....82
4.5.2. Met- Enkefalin Antikoru ile İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları....88
5. TARTIŞMA....95
KAYNAKLAR....133
ETİK KURUL KARARI....162
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....163
ÖZGEÇMİŞ....164

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2- 1: İnsan ve zebra balığı opioid reseptör genlerinin benzerlik oranları 42
Tablo 3- 1: Kullanılan cihazlar 47
Tablo 3- 2: Kullanılan kimyasalların listesi 48
Tablo 3- 3: Total protein tayininde kimyasal miktarları 54
Tablo 3- 4: Lipit peroksidasyon tayininde kimyasal miktarları 55
Tablo 3- 5: Total nitrik oksid tayininde kimyasal miktarları 56
Tablo 3- 6: Süperoksit dismutaz tayininde kimyasal miktarları 58
Tablo 3- 7: Glutatyon-S-transferaz tayininde kimyasal miktarları 59
Tablo 3- 8: Asetilkolin esteraz aktivitesi tayininde kimyasal miktarları 60
Tablo 3- 9: Işık mikroskobu doku takibi aşamaları 61
Tablo 3- 10: Parafin bloktan kesit alma işlemi 62
Tablo 3- 11: İmmunohistokimya boyama işlemi basamakları 63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1: Parkinson hastalığının 200 yıllık tarihi 5
Şekil 2- 2: Katekolaminlerin sentezi 11
Şekil 2- 3: Dopamin Yıkımı 12
Şekil 2- 6: Parkinson hastalığı modeli oluşturulurken kullanılan kimyasalların mekanizması 18
Şekil 2- 7: Nosiseptörlerin kısımları 23
Şekil 2- 8: Beyne çıkan ve inen yollar 24
Şekil 2- 9: Periferde nosiseptör duyarlılığının özellikleri 25
Şekil 2- 10: Spinal iletinin basitleştirilmiş hali 26
Şekil 2- 11: Ağrının algılanma mekanizması 28
Şekil 2- 12: Endojen opioid peptidlerinin moleküler yapıları 33
Şekil 2- 13: Omurilikteki opioid etki ile ilişkili moleküler mekanizmalar 35
Şekil 2- 15: Opioid sinyal yolağı ve kanallarla ilişkisi 37
Şekil 2- 17: Zebra balığı 41
Şekil 2- 18: İnsan ve zebra balığı opioid reseptörlerini kodlayan proteinlerin dizi ilişkisini gösteren filogenetik diagram 42
Şekil 3- 1: Deneysel aşamalar 50
Şekil 3- 2: Balıkların kinovea programı ile vücutlarının altında kalan alanda eğrilme açısının ölçümü 51
Şekil 4- 1: Vücut eğriliği 66
Şekil 4- 2: Kontrol grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi 67
Şekil 4- 3: Asetik asit grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi 68
Şekil 4- 4: Rotenon grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi 68
Şekil 4- 5: Rotenon+Asetik asit grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi. 69
Şekil 4- 6: Keşif oranı 69
Şekil 4- 7: Katedilen mesafe 70
Şekil 4- 8: Ortalama hız 71

Şekil 4- 9: Grupların Lipit Peroksidasyon düzeyleri 71
Şekil 4- 10: Grupların Süperoksit Dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması 72
Şekil 4- 11: Grupların Nitrik Oksit düzeyleri karşılaştırılması 73
Şekil 4- 12: Grupların Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivitesi karşılaştırılması 73
Şekil 4- 13: Grupların Asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) karşılaştırılması 74
Şekil 4- 14: Parkinson ile ilişkili genlerin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri. 75
Şekil 4- 15: Parkinson ile ilişkili th, sncga, bdnf genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri. 76
Şekil 4- 16: Ağrı ile ilişkili trpa1, scn8aa ve cox-1 genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri 77
Şekil 4- 17: Ağrı ile ilişkili zasic1.1., zasic 1.2 ve zasic 1.3 genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri 78
Şekil 4- 18: Ağrı ile ilişkili pomca, pomcb, penka, pdyn endojen opioid genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri. 79
Şekil 4- 19: Ağrı ile ilişkili oprm1, oprd1b, oprk1, oprl1 genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri 80
Şekil 4- 20: Maruziyet sonrası zebra balıklarının beyin dokularında Dopamin ve Dopac düzeyleri. 81
Şekil 4- 21: Maruziyet sonrası zebra balıklarının beyin dokularında Serotonin ve 5-HIAA düzeyleri. 81
Şekil 4- 22: Kontrol grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması. 83
Şekil 4- 23: Asetik asit grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması. 84
Şekil 4- 24: Rotenon grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması. ... 85
Şekil 4- 25: Rotenon+ Asetik asit grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması. 86
Şekil 4- 26: Negatif Kontrol Tirozin Hidroksilaz (TH) 87
Şekil 4- 27: TH immunohistokimyasal analizi sonuçları 88
Şekil 4- 28: Kontrol grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması 89
Şekil 4- 29: Asetik asit grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması 90
Şekil 4- 30: Rotenon grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması. 91
Şekil 4- 31: Rotenon+ Asetik asit grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması. 92
Şekil 4- 32: Negatif kontrol Met-Enkefalin 93
Şekil 4- 33: Met-Enkefalin immunohistokimsayal analizi sonuçları 94

SEMBOLLER / kısaltmalar listesi

5-HIAA: 5-hidroksiindolasetik asit

5-HT: Serotonin

6-OHDA: 6-hidroksi dopamin

AA: Asetik asit

AChE: Asetilkolinesteraz aktivitesi

ACTH: Adrenokortikotropin hormon

AMPA: α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro- pionik asit

bdnf: Beyinden türetilmiş nörotropik faktörü

CDNB: 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin

CGRP: kalsitonin geni ile ilişkili peptid

cox: Siklooksijenaz

DOP (d): Delta opioid reseptörü

DA: Dopaminerjik nöron

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

DKG: Dorsal kök gangliyonu

DOPAC: 3,4-dihidroksifenilasetik asit

DTNB: 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)

FQ/NOP: Nosiseptin/Orfanin opioid reseptörü

GABA: Gama aminobütirik asit

GPCR: G-protein-bağlı reseptörler

GSH: Glutatyon-S-Transferaz

GST: Glutatyon

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HCl: Hidroklorik asit

HVA: homovanillik asit

IASP: Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği

IHK: İmmünohistokimya

KOP (k): Kappa opioid reseptörü

K_2HPO_4: Dipotasyum fosfat

KH_2PO_4: Mono potasyum fosfat

Kont: Kontrol

LC: lewy cisimcikleri

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

L-DOPA: Dihidroksifenilalanin

Leu-ENK: Lösin Enkefalin

LPS: Lipopolisakkarit

lrrk2: Lösince zengin tekrarlayan kinaz 2

MDA: malondialdehit

Met-ENK: Met-enkefalin

MOP (μ): Mü opioid reseptörü

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridin

MSH: Melanosit uyarıcı hormonlar

MSS: Merkezi sinir sistemi

NA: Noradrenalin

Na_2HPO_4: Disodyum Fosfat

$Na_2HPO_4.2H_2O$: Sodyum fosfat dibazik hidrat

Na-EDTA: Disodyum etilendiamin tetraasetik asit

NaH_2PO_4: Monosodyum fosfat

NaOH: Sodyum hidroksit

NEDD: N-(1-Naftil)-etilendiamin- dihidroklorür

NGF: Sinir büyüme faktörü

NK1: Neurokinin 1

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

NO: Nitrik oksit

NSAID: Non steroidal anti-inflamatuar ilaçlar

oprd1: opioid reseptörü delta 1

oprk1: opioid reseptörü kappa 1

oprl1: opioid reseptör benzeri 1

oprm1: opioid reseptörü mü 1

PBS: Fosfat tamponlu tuz

pdyn: Preprodinorfin

penk: Preproenkefalin

PG: Prostaglandin

PGE2: Prostaglandin E2

PH: Parkinson hastalığı

pınk1: PTEN ile indüklenen kinaz 1-PARK6

parkın: parkin RBR E3 ubikuitin protein ligaz

park7: Parkinson hastalığı proteini 7

PNOC: Pronosiseptin

pomc: Proopiomelanokortin

ROT: Rotenon

ROT+AA: Rotenon+Asetik asit

scn8aa: Sodyum kapılı voltaj kapılı 8AA

sncga: Sinüklein gama a

SOD: Süperoksit dismutaz

SP: P maddesi

SNpc: Substantia nigra pars compacta

SULF: Sülfanilamid

TBA: tiyobarbitürik asit

TCA: Triklorasetik asit

TH: Tirozin hidroksilaz

TKG: Trigeminal gangliyonlar

TNF−α: Tümör nekroz faktörü alfa

TrKA: Tirozin kinaz reseptörü tip 1

trpa1: Geçici reseptör potansiyeli ankirin 1

VCI: Vanadyum (III) klorür

VGSC: Voltaj kapılı sodyum kanalları

zasıc: Zebra balığı Asit duyarlı iyon kanalı

$ZnSO_4$: Çinko sülfat

$ZnSO_4.7\ H_2O$: Çinko sülfat heptahidrat

ÖZET

Cansız, D. (2021). Zebra Balıklarında Oluşturulan Parkinson Modelinde Ağrı Mekanizmasının İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Parkinson hastalığı (PH) substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronların dejenere olması sonucu Lewy cisimciklerinin birikimi ile meydana gelen en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Ağrı, PH' de motor olmayan en yaygın semptomlardan biridir ancak PH'de ağrının moleküler mekanizmasının tam olarak bilinmemesi PH' nin erken dönemde teşhisini engellemektedir. PH' de ağrı dopaminerjik yolakların yanı sıra kolinerjik ve opioiderjik yolaklarla da ilişkili olduğundan dolayı çalışmamızda PH' de ağrı mekanizmasının opioiderjik yolaklarını incelemeyi amaçladık. Kontrol (K), Asetik asit (AA), Rotenon (ROT), ve Rotenon+Asetik asit (ROT+AA) gruplarında davranış analizleri sonrasında beyin dokularında katekolamin seviyeleri LC MS/MS, opioid peptit ve reseptörlerinin ekspresyonlarını RT PCR, tirozin hidroksilaz ve met-enkefalin proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimyasal, oksidan-antioksidan parametrelerin analizleri ise spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirildi. Çalışmamızda ROT grubunda katedilen mesafe, ortalama hız gibi davranışsal parametreler ile beyin dokusunda dopamin düzeyleri azalmış, oksidatif hasar göstergesi olarak LPO ve NO artarken antioksidan enzim olan SOD azalmıştır. Oksidatif strese yanıt olarak PH ile ilişkili genlerden *lrrk, pink1, park7* ifadelerinde artış, *park2* ifadesinde ise azalma rotenon uygulamasının zebra balıklarında PH oluşturmak için uygun bir ajan olduğunu göstermiştir. AA grubunda vücut eğriliğinin ROT ve ROT+AA gruplardan daha fazla olması, periferik ağrının algılanması ile ilişkili iyon kanalları, *penka* ile *pdyn* ifadelerinin ROT+AA grubunda azalmış olması zebra balıklarında rotenon oluşturulan PH modelinde ağrıya yanıt ile ilgili mekanizmaların bozulduğunu işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: ağrı, davranış, opioidler, parkinson hastalığı, zebra balığı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34542

ABSTRACT

Cansız, D. (2021). Tezin İngilizce Adı. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Anabilim Dalının İngilizce Adı. Doktora Tezi. İstanbul.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease caused by the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the accumulation of Lewy bodies. Pain is one of the most common non-motor symptoms in PD, but the molecular mechanism of pain in PD is not fully known, preventing early diagnosis of PD. For this purpose, we aimed to see the changes in opioidergic pathways when external pain is given by causing pain intraperitoneally in zebrafish for which we generated a PD model with rotenone. After behavioral analysis in Control (C), Acetic acid (AA), Rotenone (ROT), and Rotenone+Acetic acid (ROT+AA) groups, catecholamine levels in brain tissues were determined by LC MS/MS, opioid peptide and its receptors' expressions by RT PCR, tyrosine hydroxylase and expressions of met-enkephalin proteins were performed by immunohistochemical methods, and analyzes of oxidant-antioxidant parameters were performed by spectrophotometric methods. In the ROT group distance traveled, average speed and brain dopamine levels decreased, LPO and NO increased as indicators of oxidative damage, while the antioxidant enzyme SOD decreased. In response to oxidative stress, an increase in the expression of PD-related genes *lrrk, pink1, park7* and a decrease in *park2* expression showed that rotenone application is a suitable agent to induce PD in zebrafish. The fact that the body curvature was higher in the AA group than the ROT and ROT+AA groups, decreased expressions of *penka*, *pdyn* and ion channels associated with the perception of peripheral pain in the ROT+AA group indicate that the mechanisms related to pain response are impaired in rotenone-induced PD model in zebrafish.

Key Words: pain, behaviour, opioids, Parkinson disease, zebrafish

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No. 34542

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (IASP) tarafından ağrı, "gerçek veya potansiyel doku hasarı ile ilişkili veya bu tür hasarlar açısından tarif edilen hoş olmayan bir duyusal ve duygusal deneyimdir" şeklinde tanımlanmaktadır. Parkinson Hastalığı (PH) en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve beyindeki dopaminerjik nöronların hasarına bağlı olarak yeterli miktarda dopamin üretilemez. PH motor ve non motor olmak üzere iki farklı semptom grubuna sahiptir. Ağrı, PH' de en önemli non-motor semptomlardan biri olarak kabul edilir.

Ağrı konusunda yüzyıllardan beri birçok teori ortaya atılmış ve ağrının meydana gelişi ve giderilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda dopaminerjik, serotonerjik ve kolinerjik yolakların ağrı ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur; fakat ağrı ile mücadelede kullanılan mevcut tedaviler ağrının tamamen giderilmesi konusunda yetersiz kalmıştır. Bu nedenle ağrının oluşumu ve algısında etkili olan farklı yolakların da olduğu düşünülmektedir.

Ağrı tedavisinde opioidler yaygın olarak kullanılmaktadır. Opioidler endojen ve ekzojen olarak ayrılırlar. Ekzojen opioidler doğal, yarı sentetik ve sentetik olarak üç gruba ayrılabilir. Endojen opiodiler ise canlı organizmalarda bulunan opioidlerdir. Ekzojen opioid olan morfin 1804 yılında Friedrich Wilhelm Adam Sertürner tarafından keşfedilmiştir. İlk olarak *Papaver somniferum* bitkisinden izole edilen morfin canlı organizmada etkisini göstermek için opioid reseptörlerine bağlanarak hücre içerisine girer. Morfin ile yapısal ve fonksiyonel benzerleri nedeniyle endojen opioidlere "morfin benzeri moleküller" de denilmektedir. Morfin gibi endojen opioidler de vücutta analjezik etki gösterirler. Endojen opioidlerin morfinle aynı reseptörlere bağlanması ve yapısal benzerliği ilk olarak 1970' li yıllarda ortaya konulmuştur. Bu opioidler merkezi sinir sistemine etki ederek analjezik özellik gösterirler. Ekzojen opiodler analjezik olarak yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte birçok yan etkiye ve bağımlılık yapma özelliğine de sahiptirler. Bu nedenler ağrının giderilmesi için yeni yolların aranmasına neden olmuştur. Ekzojen opioidlerle benzer fonksiyona sahip olan endojen opiodlerin bu amaç için uygun olabileceği düşünülmektedir.

Endojen opioidler, G proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesine ait olan spesifik opioid reseptörleri üzerinde etki ederler (1). Endojen opioid sistemi klasik μ (MOP), d (DOP) ve k (KOP) reseptörleri ve klasik olmayan Nosiseptin/Orfanin FQ/NOP

reseptöründen oluşur. MOP, DOP ve KOP opioid reseptörleri sırasıyla OPRM1, OPRK1 ve OPRD1 genleri tarafından kodlanır. Bunun yanı sıra, opioid peptidleri olan enkefalin, β-endorfin, dinorfin ve endomorfinden oluşur. Bu peptidlerden Met-Enkefalin ve Leu-enkefalin ilk kez 1975 yılında izole edilmiş sonraki yıllarda ise beta endorfin izole edilmiştir (2).

Litetürde opioidler ve ağrı mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda asetik asit ile oluşturulan ağrı modelinde farklı opiodler kullanılmış ve bu opioidlerin kullanımı sonucu deney modelinde oluşturulan ağrıdaki değişim davranış testleri, beyin dokusundaki dopamin, endorfin, noradrenalin, serotonin seviyelerine bakılarak tespit edilmeye çalışılmıştır.

Ağrı, nosiseptör (ağrı reseptörleri) adı verilen spesifik reseptörler tarafından algılanır. Nosiseptörler periferik terminalleri ağrılı uyaranlara hassas primer afferent ve deri ile deri altı dokularında bulunan çıplak ve serbest sinir uçlarıdır. Nosiseptörler, Drosophila ve Caenorhabditis elegans gibi basit hayvan modelleri de dahil olmak üzere, solucanlar, böcekler, memeliler ve omurgalılara kadar çok çeşitli hayvan türlerinde bulunmuştur (3). Canlı mekanizmalar zararlı uyaranlarla (kimyasal, terminal veya mekanik) uyarıldıklarında bu uyaranlar nösiseptörler tarafından algılanır, ardından algılanan uyarıyı işlemek üzere beyne iletir (4).

Nosiseptörlerin hücre gövdeleri, dorsal kök gangliyonunda bulunur ve periferik dokularda serbest uçlar olarak son bulur. Periferden kaynaklanan ağrı sinyalleri, C-fiber sinirler ve miyelinli A-fiber sinirler tarafından taşınan dorsal kök gangliyonundan geçer. Sinyaller, çıkan yollarla beyne iletilir ve beyinden inen yollar, engelleyici sinyaller gönderir. Bu inen yollarda ağrıyı engellemek amacıyla serotonin, P maddesi, histamin, prostaglandin, endorfin gibi moleküler yapıların salınımı sağlanır. İnen yollar ağrıyı engellemede etkili olması sebebiyle ağrının mekanizmasının anlaşılmasında önemlidir.

Tüm bu bilgilerin ışığında, ağrı mekanizmasının aydınlatılması konusunda dopaminerjik, serotonerjik ve kolinerjik yolakların yanı sıra opioid sistem yolaklarınınn da önemli bir etkiye sahip olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle PH'de önemli bir non-motor semptom olan ağrının mekanizmasını çalışmamızda rotenon ile oluşturduğumuz PH modelinde asetik asit ile intraperitonel olarak akut ağrı oluşturarak opioid sistem üzerinden değerlendirmeye çalıştık ve PH'de ağrının histolojik, moleküler ve biyokimyasal olarak analizlerini yapmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

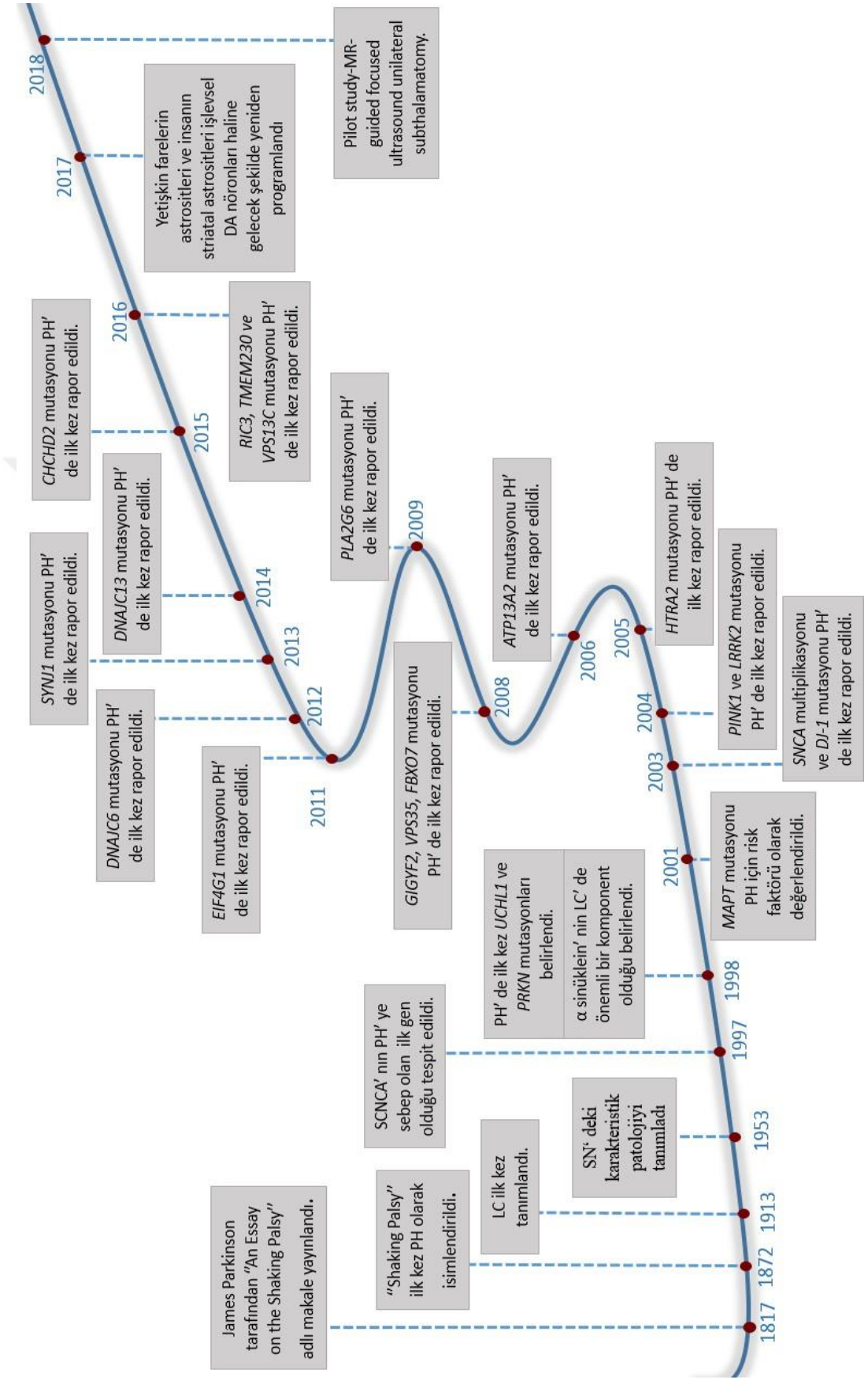
2. 1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) genellikle 60 yaş ve üzeri bireylerin % 1 ini etkileyen ve en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (5). Bu hastalık substantia nigra pars compacta' daki dopaminerjik nöronların yaklaşık olarak % 70' inin, striatum' daki dopaminerjik nöronların büyük bir kısmının dejenere olmasının ardından intrasitoplazmik kalıntılar olarak bilinen Lewy cisimciklerinin (LC) oluşması sonucu meydana gelir (6). Hastalık dopamin üreten hücrelerin hasara uğraması nedeniyle yeterli miktarda dopamin üretilememesi sonucu gelişir. PH' de görülen semptomlar motor ve motor olmayan semptomlar olmak üzere ikiye ayrılır. Klinik açıdan, titreme, hareketlerde yavaşlama, vücut katılığı, denge sorunu gibi semptomlar motor semptomlar olarak kabul görürken, uyku bozukluğu, gastrointestinal semptomlar (kabızlık), koku alma bozukluğu, depresyon ve ağrı gibi semptomlar da motor olmayan semptomlar olarak bilinmektedir.

2.1.1. Parkinson Hastalığının Tarihçesi

PH ilk olarak 1817' de James Parkinson tarafından "shaking palsy" (titreyen felç) olarak tanımlanmış ve yaklaşık 50 yıl sonrada nörolog Jean Martin Charcot hastalığı "maladie de Parkinson" (Parkinson hastalığı) olarak yeniden adlandırmıştır (7,8). Fransız nörolog Édouard Brissaud, 1953'te Greenfield ve Bosanquet tarafından onaylanan bir bulgu olan substantia nigra'daki karakteristik patolojiyi tanımladı (9). Barger ve Ewens 1910' da dopamini sentezlediler, fakat 1950' lerin sonlarına kadar nörokimyacılar, substantia nigra'daki dopamin tükenmesini James Parkinson hastalığı ile ilişkilendiremedi. Birkmayer ve Hornykiewicz, 1961' de PH olan hastalara dopamin öncüsü l-dihidrofenilalanini (levodopa) enjekte ettiklerinde, hızlı ancak kısa süreli iyileşme gözlemlediler. İlerleyen yıllarda periferik etkili dopamin blokerlerinin geliştirilmesiyle levodopanın merkezi sinir sistemi tarafından emilimi artmış ve böylece yan etkilerin sıklığının azalması sağlanmıştır. PH'nin küresel olarak yaygın bir nörodejeneratif hastalık haline gelmesi sebebiyle bu hastalığa yönelik kombine kimyasal ve cerrahi uygulamalar için yeni yöntemler geliştirilmek adına daha fazla çalışma yapılmaya başlandı (9). Sonraki yıllarda, çok sayıda bilim insanı, PH' nin motor ve motor olmayan özelliklerinin, nöropatolojik, nörokimyasal, nörofizyolojik ve nörogörüntüleme özelliklerinin tanımlanmasına katkıda bulunmuştur (**Şekil 2-1**) (10,11). Özellikle PH' nin moleküler mekanizmasının aydınlatılması adına son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır

ve bu çalışmalar ümit vadetmektedir; fakat henüz PH' nin tedavisi ya da PH' ye yakalanma riskinin azaltılması konusunda net somut bir bulgu literatürde henüz yer almamaktadır (12).



Şekil 2- 1: Parkinson hastalığının 200 yıllık tarihi

2.1.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

Literatürde PH' nin prevalansını, insidansını, cinsiyet oranını, etnisitesini, riskini ve koruyucu faktörlerini inceleyen çok sayıda epidemiyolojik çalışma mevcuttur, ancak bu çalışmalardan elde edilen veriler oldukça değişken, bazen de tutarsız sonuçlar ortaya koymaktadır (13).

PH, Alzheimer hastalığından sonra en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Yüksek gelirli ülkelerde ortalama yaşa göre standartlaştırılmış yıllık insidans oranları toplam nüfustaki her 100.000 kişi arasında 14 kişide görülürken, 65 yaş ve üzeri her 100.000 kişiden 160 kişide görülür (14). Hem insidansı hem de mortaliteyi yansıtan yaşa göre ayarlanmış PH prevalansı, Afrika' da Avrupa ve Amerika' dakinden daha düşük görünmektedir (14–16). Asya' daki PH insidansı, Avrupa ve Amerika' dakine benzerdir (14).

Türk Nöroloji Derneği' nin verilerine göre Türkiye' de PH'li bireylerin sayısının 100 bin civarında olduğu tahmin edilmekte ve bu hastaların yaklaşık % 60 kadarı tedavi görmektedir. Bunun yanı sıra Türkiye' de hızla yaşlanan nüfus yoğunluğu nedeniyle bu sayının gelecek yıllarda daha da çok artması beklenmektedir (17).

PH' nin 50 yaşından önce görülme sıklığı düşüktür, ancak yaşla birlikte PH' ye yakalanma hızla artar ve çoğu çalışmaya göre, muhtemelen artan yaşla birlikte yetersiz teşhis nedeniyle yaklaşık 80 yaşında zirveye ulaşır (18). Artan yaşla birlikte PH insidansında sahte bir düşüş de görülebilir. Bu düşüş motor semptomların başlangıcında ise PH' nin teşhisi için bir dışlama kriteri olan demans prevalansının artması nedeniyle meydana gelebilir. Erkekler ile kadınlar arasındaki insidans oranı, çoğu çalışmada yaklaşık 1,3 ila 2,0 arasında değişmektedir, ancak Asya'da 0,95' e kadar düşük oranlar gözlenmiştir. PH' ye yaş, cinsiyet, kilo, etnik köken, yaşam koşulları, beslenme alışkanlığı, genetik etkiler gibi birçok faktörün neden olabileceği bildirilmekle beraber, bu nedenler konusunda kesin bir fikre henüz varılamamıştır (14).

2.1.3. Parkinson Hastalığının Klinik Özellikleri

PH devamlı olarak ilerleyen bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu ilerleyiş süresince oluşan motor ve non-motor semptomlar hastalığın karakterizasyonunda önemlidir. Motor semptomlar, titreme, denge bozukluğu, vücut katılığı, istemsiz hareketler gibi klasik

klinik özellikleri barındırırken; uyku bozukluğu, depresyon, anksiyete, demans, koku alma bozukluğu, ağrı gibi semptomlar klasik olmayan non-motor semptomlardır.

Motor olmayan/non-motor klasik semptomlar bazen motor semptomlardan çok daha önce ortaya çıkarak yanlış veya gecikmiş tanıya yol açabilir ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyebilir (19–24). Bu sebeple PH' nin ilerleyişini takip ederken üç evrenin takibi önerilmektedir (25).

1.Evre: Preklinik Parkinson Hastalığı

Bu evrede klinik belirtiler görülmezken merkezi ve/veya periferal otonom sinir sisteminde α-sinüklein agregatları birikmeye başlamış olur.

2. Evre: Motor Öncesi/Prodromal Parkinson Hastalığı

PH' nin ikinci evresidir ve hastalığın klinik tanısından sonraki yaklaşık 10 yıllık dönemi kapsar. Bu evrede genellikle ekstranigral değişikliklere bağlı olarak motor olmayan semptomların ortaya çıkması ile ilişkilendirilir. Hastalığın bu evresinde erken ince motor semptomların da geliştiği bildirilmektedir (26). Bunların yanı sıra Parkinson hastalarında bu aşamada hastalığın teşhisinden 10-15 yıl önce daha yüksek anksiyete gösterebilir. Bununla birlikte hastalığın teşhisinden 2-3 yıl kadar önce depresyon bu hastalarda yoğun olarak görülmeye başlar (27).

3. Evre: Motor Parkinson Hastalığı

Bu evrede hastada titreme, vücut katılığı ve denge sorunu gibi motor semptomlar belirgin olarak gelişir ve böylece hastalık klinik olarak daha kolay tespit edilebilir. Bu evre, motor PH olarak tanımlanır.

2.1.3.1. Motor Semptomlar

Orta beyindeki substantia nigra pars compacta'da (SNpc) dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve nigrostriatal yol boyunca striatuma uzanan aksonlarının eşzamanlı kaybı ile karakterize olan PH' de striatumda meydana gelen dopamin kaybı, PH' nin birincil motor semptomlarına, yani bradikinezi, tremor, rijidite ve postüral insitabiliteye yol açar. Nöron kaybının yanı sıra, PH' nin nöropatolojik bir ayırt edici özelliği, nöronal hücre gövdelerinde çözünmeyen sitoplazmik inklüzyonların (Lewy cisimcikleri) ve nöronal süreçler boyunca çözünmeyen fibrilin (Lewy nöritler) ortaya çıkmasıdır. Hem Lewy cisimcikleri hem de Lewy nöritleri birincil olarak protein alfa-sinüklein fibrillerinden oluşur (28). Bu nedenle de PH' nin patalojisinde önemli rol oynarlar.

2.1.3.2. Motor Olmayan Semptomlar

PH' de motor olmayan semptomlar, hastaların yaşam kalitesi üzerindeki etkileri ve ileri hastalık aşamasında yaşam kalitesini düşürmesi nedeniyle oldukça önemlidir (29,30). PH' de motor olmayan semptomlar motor semptomlardan önce gelişebilir. Motor olmayan semptomların patofizyolojisi hala tam olarak anlaşılamamıştır ve hem dopaminerjik hem de nondopaminerjik sistemlerin disfonksiyonunun gelişimlerine katkıda bulunduğu bilinmektedir (31). PH' de yaklaşık otuz motor olmayan semptom bildirilmekle beraber, uyku bozukluğu, gastrointestinal bozukluk, koku alma bozukluğu, anksiyete, depresyon ve bilişsel bozukluk gibi semptomlar ön plana çıkmaktadır (32). PH' de hastaların % 70 ila % 90' ını etkilediği tahmin edilen koku alma bozuklukları ve yaklaşık % 84' üne kadar bildirilen otonomik sistem açıkları görülür (11,28). Bunların yanı sıra, ortostatik hipotansiyon, değişen ağrı algısı, idrar ve cinsel işlev bozukluğu gibi semptomların da görüldüğü bildirilmektedir (28,33–37).

2.1.3.3. Parkinson Hastalığının Motor Olmayan Semptomplarından "Ağrı"

Ağrı, James Parkinson tarafından PH' nin orijinal tanımında belirtilmiş olmasına rağmen, gerçekten etkili bir tedavisi olmayan, genellikle ihmal edilen ve en sık görülen non-motor semptomlardan biridir (38). Ele alınan epidemiyolojik çalışmaya bağlı olarak hastaların % 30 ile % 83' ü arasında bir prevalansı vardır (23,38–40). Klinik veriler, Parkinson hastalarında hem ağrı eşiklerinin hem de ağrıya toleransın, kontrol popülasyonuna kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğunu ve bu hastaların çeşitli farklı ağrılardan muzdarip olabileceğini göstermiştir (40,41).

Parkinson hastaları tarafından ifade edilen ağrının çeşitliliği nedeniyle, PH' de ağrının farklı türlerini belirlemek için bir sınıflandırma önerilmiştir. Bu sınıflandırmada, topografi, süre, sıklık, ağırlaştırıcı faktörler, PH ile zamansal ve topografik ilişki, motor komplikasyonların etkisi, antiparkinson ilaçlarının etkisi ve hastanın ağrı ile PH arasındaki ilişki hakkındaki görüşleri gibi kriterler kullanılarak farklı türleri tanımlamak için bir sınıflandırma önerilmiştir (42).

PH' deki ağrı, Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği tarafından "nöropatik olmayan ve nosiseptörlerin aktivasyonundan kaynaklanan ağrı" olarak tanımlanmıştır. Bu tür ağrılar motor bozukluğu ile ilişkili ve kısmen kas sertliğinden kaynaklanır. Sertlik, akinezi, postural anormallik veya distoninin kas-iskelet sisteminde nosiseptif ağrıya yol açabildiği bildirilmektedir (42). Bunların yanı sıra PH' de, radiküler ağrı veya

somatosensör sinir sisteminin bir lezyonundan veya periferik kaynaklı nöropatik ağrı da görülebilmektedir (42,43). PH' de semptomların azaltılması için levodopa gibi ilaçlar kullanılmakla beraber bunların etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. PH' de ağrı eşiğinin ve toleransının düşmesi, bazal gangliyonlardaki dopamin kaybı ile ilişkilendirilse de semptomların dopaminerjik ilaçla (levodopa) tamamen iyileşmemesi, dopaminerjik olmayan mekanizmaların da ağrı semptomlarının ortaya çıkmasında etkili olduğunu düşündürmektedir (44,45). Brefel-Courbon ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, PH' de dopaminerjik stimulasyondaki artışın ağrıyı azalttığını, ancak dalgalanma olan PH hastalarında levodopanın ağrı eşiğini etkilemediğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar dopamin düzeylerinin PH' de anormal ağrı algısında kısmen etkili olabileceğini göstermektedir (44). Literatürde Parkinson ile ilişkili olan ağrılar nosiseptif, nöropatik ve diğer ağrılar olarak da bildirilmektedir (37).

Literatürde 6-OHDA maruziyeti ile PH modeli oluşturulan sıçanlarda ağrılı uyaranlara karşı aşırı duyarlılık geliştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (46–48). PH modelinde nosiseptif ağrı eşiklerinin, incelenen model organizmadan (fare ya da sıçan) veya uygulanan nörotoksinden bağımsız şekilde azaldığı belirtilmektedir (49,50,59,51–58). Mekanik duyarlılıktaki değişikliklerin, substantia nigra pars kompaktada tirozin hidroksilaz ekspresyonunun azalması ile korele olduğu belirtilmiştir (59).

2.1.4. Parkinson Hastalığı Nöropatolojisi

PH, substantia nigra pars compacta' daki dopaminerjik nöronların yaklaşık olarak % 70' inin, striatum' daki dopaminerjik nöronların ise büyük bir kısmının dejenere olması ve bunun ardından intrasitoplazmik kalıntılar olarak bilinen Lewy cisimciklerinin (LC) oluşması sonucu meydana gelir (6). Lewy cisimcikleri nöronların sitoplazmasında bulunan anormal protein kalıntılarıdır. Bu cisimcikler 14kDa olan α-sinüklein proteinlerinden meydana gelir ve genellikle hastalığın patolojisini oluşturur (60,61).

Geçtiğimiz 20 yıl içinde, hem moleküler genetik hem de nöropatolojideki gelişmeler, hastalığın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Buna bağlı olarak da, PH' nin substantia nigra ile sınırlı olmayıp bununla beraber sistemik bir bozukluk olduğu ve nöronal protein alfa-sinükleinin hastalığın ilerlemesinde önemli bir etken olduğu daha net olarak anlaşılmıştır. Fakat hastalığın ilerleyişinin tam olarak anlaşılabilmesi için alfa sinükleinin hastalık ile olan ilişkisinin aydınlatılmaya

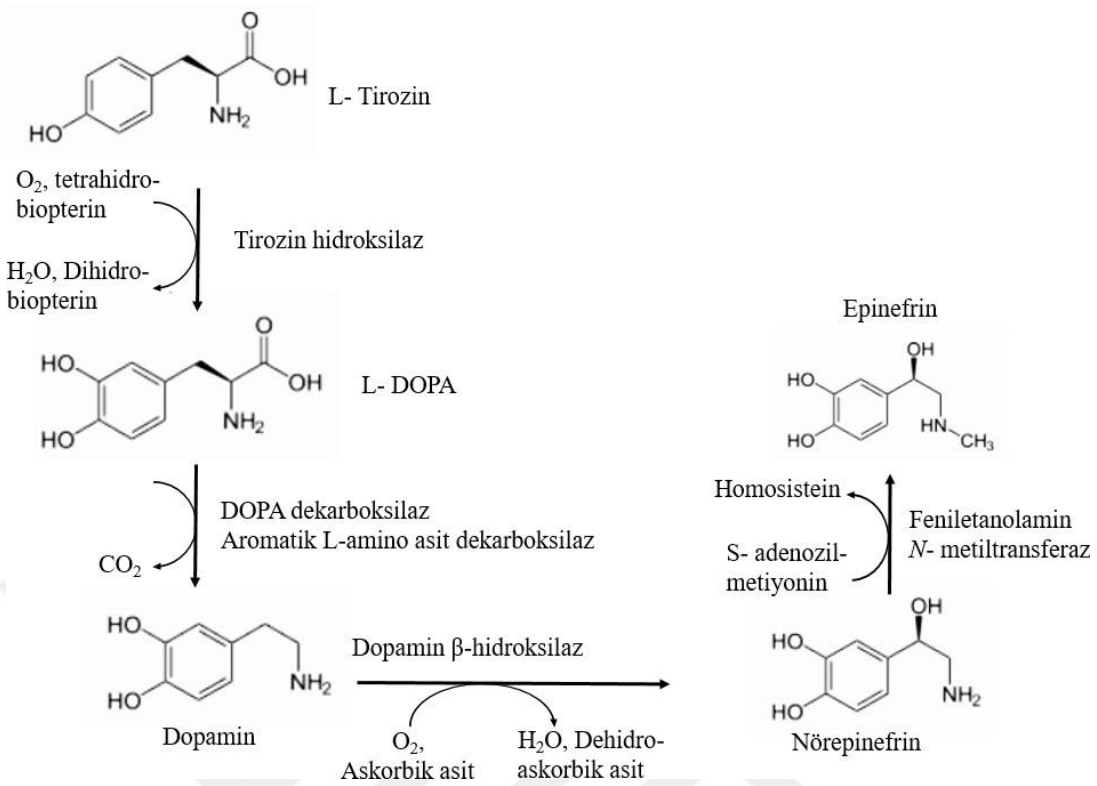
çalışılmasının yeterli olmadığı bunun yanı sıra sistemik inflamasyon ve endosomal-lizozomal sinyal yolaklarının da aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir (62).

2.1.4.1. Katekolaminler ve Parkinson Hastalığı Gelişmesinde Etkili Genler

Beyin ve sinir dokusu ile adrenal bezler tarafından üretilen katekolaminler, vücudun "savaş ya da kaç" tepkisinden sorumludur. Dopamin, adrenalin ve noradrenalin başlıca katekolaminlerdendir. Bunun yanı sıra PH patogenezinde etkili proteinlerin sentezinde görevli başlıca genler *pink1, parkin, lrrk2, park7, bdnf, th, sncga*'dır. *sncga* ve *lrrk2* otozomal dominant; *parkin, pink1* ve *dj-1(park7)* otomozal resesif etkiye sahip genlerdir.

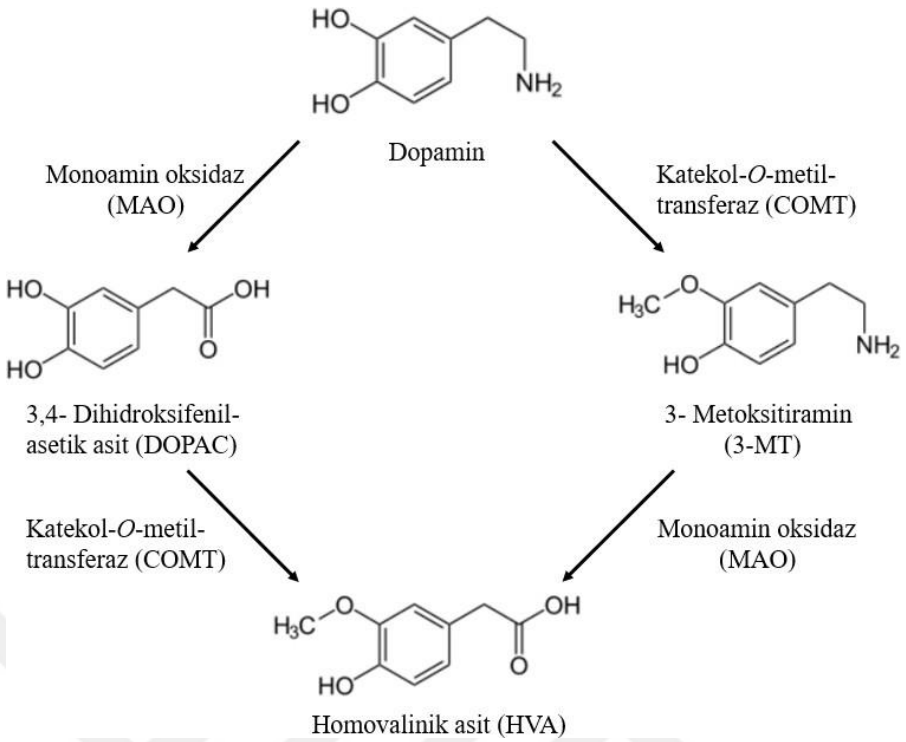
2.1.4.2. Katekolaminlerin Metabolizması

MSS' deki dopaminerjik nöronlar, davranışsal, bilişsel, motor ve nöroendokrin sistemler de dahil olmak üzere bir dizi temel fizyolojik işlevin kontrolünde rol oynar. Dopamin (DA) biyosentezi, l-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) üretmek için sitoplazmatik tirozin hidroksilaz (TH) ile tirozinin hidroksilasyonunu başlatır. DA, aromatik amino asit dekarboksilaz (AAADC) tarafından L-DOPA' dan üretilir (**Şekil 2-2**). Nöronal sitoplazmada DA sentezinin ardından, DA intra-nöronal mitokondriyal monoamin oksidaz (MAO) tarafından metabolik parçalanmaya duyarlı hale gelir ve bu yola girer veya veziküler mono-amin taşıyıcı (VMAT2) tarafından depolama granüllerine alınır. Ekzositotik salınımın ardından, sinaptik DA, yüksek afiniteli nöronal membran DA taşıyıcısı (DAT), düşük afiniteli plazma membran amin taşıyıcı PMAT ve organik katyon taşıyıcılar tarafından pre-sinaptik dopaminerjik nöronlara alınır (63).



Şekil 2- 2: Katekolaminlerin sentezi

Dopamin kan beyin bariyerini geçemediği için metabolizmada dopamin miktarının azaldığı PH' de dopamin öncülü olan L-DOPA hastaya verilerek beyindeki dopamin miktarı arttırılmaya çalışılır. Bunun yanı sıra dopamin yıkım enzimleri olan COMT (Katekol-O-metiltransferaz) ve MAO' nun (**Şekil 2-3**) inhibitörleri de PH' yi tedavi amacıyla hastaya verilir.



Şekil 2- 3: Dopamin Yıkımı

2.1.4.3. *pink1* (PTEN ile indüklenen kinaz 1/PARK6)

PARK6 geni, 581 amino asit protein fosfatazı ve tensin homologu (PTEN) ile uyarılan kinaz 1'i (PINK1) kodlar (64). PINK1' in mitokondriyal olarak yerleşim gösterdiği ve hücresel mutasyonlarla bozulan koruyucu bir etki sağlayabildiği bilinmektedir. Valente ve ark. (2004)' nin yaptığı çalışmalar mitokondri ile Parkinson hastalığının patogenezi arasında doğrudan bir moleküler bağlantı olduğunu göstermektedir (64,65). 2001 yılında erken başlangıçlı otozomal resesif PH' li italyan bir ailenin soyağacında PARK6 lokusundaki 1. kromozom üzerinde mutasyon tespit edilmiştir (66,67). PARK6 geninde mutasyon olan hastaların semptomları, sporadik PH formları olan hastalarınkiler ile klinik olarak örtüşmüştür (66,68).

Hücre biyolojisi çalışmaları, Parkin'in, hasarlı organelin otofaji yardımı ile çıkarılmasına yardım etmek için sitozolden depolarize mitokondriye alındığını göstermiştir. PINK1 disfonksiyonel mitokondride birikir ve PINK1' in kinaz aktivitesi parkin' in mitokondriye translokasyonu için gereklidir. Bunun yanı sıra bu otozomal resesif PARK gen ürünlerinin işlevini aynı biyokimyasal yola bağlayan mitofaji için de PINK1' in kinaz aktivitesi gereklidir (65).

2.1.4.4. *park2* (Parkin RBR E3 Ubikitin Protein Ligaz)

Erken başlangıçlı otozomal resesif parkinsonizmde meydana gelen birçok mutasyon vardır. Bu mutasyonların birçoğunun parkin geni üzerinde gerçekleştiği bilinmektedir. Bu nedenle parkin geni erken başlangıçlı otozomal resesif parkinson hastalığının belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak düşünülmektedir. Parkin geni, N-terminalinde ubikitin benzeri bir alan (UBL) ve RING' ler arasında sistein açısından zengin parmak alanı içeren C-terminaline yakın bir RBR alanı olan 465 amino asitlik bir sitosolik proteini kodlar. RBR alanının varlığı, parkinin, ubikitinin substrat proteinlerine kovalent bağlanmasına aracılık eden bir E3 ubikuitin ligaz aktivitesine sahip olduğunu gösterdi (69,70). E3 ubikuitin ligazlarının iyi bilinen bir işlevi, proteazom tarafından degradasyon için substrat proteinlerini hedeflemektir. Bununla birlikte, parkinin proteazomdan bağımsız her yerde bulunmayı indükleyebildiğine ve bu her yerde bulunma tarzının parkinin geniş nöroprotektif aktivitesinin altında yatabileceğine dair artan deneysel kanıtlar vardır (71).

2.1.4.5. *lrrk2* (Lösince zengin tekrarlayan kinaz 2)

lrrk2 geni, Wingless (Wnt) ve mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yollarını, kalsiyum sinyal kaskadını ve MET sinyal yolunu modüle ederek hareket eden ve böylece sinaptik bakım, hücre proliferasyonu ve otofaji gibi süreçleri düzenleyen karmaşık ve çok işlevli bir proteindir (72). Merkezi sinir sisteminde (MSS), lrrk2 geni dendritik omurga oluşumunda, sinaptik bileşenlerin geri alımında ve sinaptik plastisitede rol oynar (73). PH bağlamında, bu proteinin kinaz aktivitesini artıran mutasyonlar, hastalığın ailesel vakalarında tipik olan artmış nöronal toksisite ile ilişkilidir.

2004 yılında *LRRK2*, PARK8 lokusuyla ilişkili PH kalıtımından sorumlu gen olarak tanımlandı ve 51 eksondan oluştuğu bulundu(74,75). Daha sonra, LRRK2 birincil yapısında, sporadik PH' de ve kanserde de meydana gelen ailesel PH ile ayrılan baskın mutasyonlar ve sporadik PH gelişimi için yaşam boyu riski artıran LRRK2 lokusundaki polimorfizmler dahil olmak üzere birçok varyant tanımlanmıştır. LRRK2 lokusundaki polimorfizmler, sporadik PH gelişimi için yaşam boyu riski arttırmasının yanı sıra inflamatuar bağırsak rahatsızlığından da etkili olduğu bildirilmiştir (74–80).

2.1.4.6. *dj-1/park7* (Parkinson hastalığı proteini 7)

dj-1 geni, şaperon aktivitesi sonucu sinüklein agregasyonunu inhibe eder. Nöronları oksidatif stres ve hücre ölümüne karşı korur. Bu genin defekti PH' ye neden

olabilir. Otozomal resesif, erken başlangıçlı parkinsonizm için üçüncü bir lokus (PARK7, kromozom 1p36 üzerinde) haritalanmıştır. *dj-1 / park7* mutasyonları, otozomal resesif kalıtım ve erken başlangıçlı PH klinik belirtileri ile bağlantılıdır. *dj-1'* de meydana gelen işlev kaybı, nadir görülen erken başlangıçlı Parkinsonizm formlarına neden olur ve bu bozukluk beyin dopamin nöronlarının koruma mekanizmaları ve nörodejenerasyon ile ilişkilendirilir (81). *dj-1*, DJ-1 / Pfp1 / YajL (Thij) protein ailesinin bir üyesidir (82) ve flavodoksin benzeri sarmal-zincir-sarmal sandviç yapısına sahip dimerik bir proteindir. *dj-1* ekspresyonu geniş yayılım gösterir (83). *dj-1* transkripsiyonun düzenlenmesi (84–86), RNA'ya bağlanma (83,87), sumolasyonun düzenlenmesi (88), şaperon olarak protein katlanması (89–91) ve hücre ölümü (92) gibi birçok yolla ilişkilendirilmiştir. *dj-1* proteininin oksidatif strese karşı sitoprotektif olduğu bulunmuştur, bu da *dj-1*'in bir antioksidan olarak hareket eden ve apoptozu önleyen bir belirteç olduğunu düşündürmektedir (93–96).

2.1.4.7. *bdnf* (Beyin türevli nörotrofik faktör)

BDNF, merkezi sinir sisteminin işlevini destekleyen bir protein ailesi olan nörotrofinlere aittir. Nörotrofinler esas olarak MSS' de olmak üzere, T ve B lenfositleri, monositler, vasküler endotelyalve düz ve iskelet kası hücreleri gibi nöronal olmayan periferik hücrelerde de sentezlenir (97). BDNF ekspresyonu hipokampus, frontal korteks, orta beyin, amigdala, hipotalamus, striatum (ST), pons ve medulla oblongata'da olur (98). BDNF, hücre farklılaşması, nöronal gelişim, büyüme ve hayatta kalma, nörogenez, sinaptogenez ve sinaptik plastisiteyi etkileyerek sinir sisteminin gelişiminde anahtar rol oynar. Ayrıca, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıkların kısmen, BDNF' nin nöronal yetersizliği ve diğer nörotrofik faktörlerle ilişkili sinaptik plastisitedeki kusurlardan kaynaklanabileceği gösterilmiştir (97,99).

***bdnf* geni** 11. kromozom üzerinde lokolizedir ve 9 promotörden oluşur. Bu promotörler 24 transkriptin transkripsiyonunu başlatarak BDNF proteininin sentezini sağlayabilirler. Pre-proBDNF öncüsü, endoplazmik retikulumda sentezlenir ve daha sonra, proBDNF izoformunu üretmek için ön bölge sekansının bölündüğü Golgi aparatına taşınır. Daha sonra proBDNF, endoproteazların subtilisin-keksin ailesi tarafından trans-Golgi ağında veya konvertazlar ile hücre içi veziküllerde olgun BDNF'ye (mBDNF) dönüştürülebilir (97,100). MBDNF' nin hücre dışı oluşumu, plazmin ve matris metaloproteazlar tarafından katalize edilir. Yapılan çalışmalarda, PH ve AH (Alzheimer

hastalığı)’ de kandaki ve beyindeki BDNF seviyelerinde bir düşüş gözlendiği belirtilmektedir. Serum ve beyindeki azalmış BDNF konsantrasyonuna, PH' de dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda bir artışın eşlik ettiği, bunun da hareket bozukluklarına, bilişsel eksikliğe yol açtığı ileri sürülmektedir. PH' de BDNF seviyelerindeki bir azalmanın, alfa-sinükleinin aşırı ekspresyonuna ve dopamin (DA) sentezinin inhibisyonuna katkıda bulunabileceğini gösteren veriler de vardır. Bu nedenlerden dolayı, nörolojik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde bir araç olarak BDNF düzeyini artırmak için yeni stratejiler araştırmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (97).

2.1.4.8. *th* (Tirozin Hidroksilaz)

Tirozin hidroksilaz (TH) [EC1.14.16.2], katekolaminlerin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimdir (101). Çoğu memelinin tek bir TH formu varken, daha yüksek primatlarda iki tane bulunur (102). İnsanlar, dört TH izoformuna sahip tek türdür (103). Zebra balıklarında ise iki *th* (*th1*ve *th2*) geni olduğu bildirilmiştir. Her iki gen de sekans homolojisine göre klonlanmış, bu nedenle sırasıyla tirozin hidroksilaz 1 *(th1*) ve tirozin hidroksilaz 2 (*th2*) olarak adlandırılmıştır (104). Zebra balığı *th1, th2*' den daha çok memelilerdeki TH' ye benzerlik göstermektedir. Yetişkin zebra balığı dokularında, *th1* mRNA beyinde ve gözlerde *th2* mRNA'dan daha fazla bulunurken, th2 mRNA karaciğer, böbrek, kalp ve solungaçlarda daha fazladır (105). *th,* dopaminerjik nöron gelişimi ve PH’ nin patolojik mekanizmasının araştırılmasında dopaminerjik nöronların bir belirteci olarak kabul edilmektedir (106).

2.1.4.9. *sncga* (Sinüklein gama)

Sinükeinlerin α, β, γ olmak üzere üç formu bulunmaktadır. PH patolojisinde α-sinüklein proteininin önemli rolü olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu proteinin aşırı ekspresyonu sonucu olarak yine PH patolojisinde belirgin olarak oluşan Lewy cisimcikleri meydana gelir. İnsan PH genlerininin birçoğunun homoloğu zebra balığında bulunmasına rağmen, zebra balığı genomunda insan α-sinükleinin ortologunun bulunmadığı görülmektedir(107). Bunun yerine, zebra balığında üç sinüklein izoformu olan β-, γ1- ve γ2-sinükleinleri eksprese edilir. İşlevsel olarak, zebra balığı γ1-sinükleini, insan α-sinükleinine en yakın olanıdır. β- veya γ1-sinükleinlerin ekspresyonunun knockdown edilmesi, zebra balıklarında motor bozukluklarına neden olur (108). Her iki sinükleinden yoksun zebra balığı, dopaminerjik nöronların gecikmiş farklılaşması ve

düşük dopamin seviyeleri dahil olmak üzere dopaminerjik sistemde anormal bir gelişmeye sahiptir. Zebra balıklarında γ1-sinükleinin aşırı ekspresyonu, insan α-sinükleinine benzer şekilde nöronal agregatların oluşumuna ve nörotoksisiteye yol açar (109).

2.1.5. Parkinson Hastalığının Patogenezinde Oksidatif Stres, Mitokondriyel Fonksiyon Bozukluğunun ve Asetilkolinesterazın Rolü

PH patofizyolojisinde mitokondriyel fonksiyon bozukluğu önemli rol oynar. PH' nin gelişiminde oksidatif strese bağlı mitokondri fonksiyonlarının bozulmasının dopaminerjik nöronlarda ölüm ile sonuçlandığı bilinmektedir (60). PH bireylerin substantia nigrasında yaklaşık % 35 oranında kompleks I eksikliği olduğu gösterilmiştir. PH'de substantia nigra'daki azalmış kompleks I aktivitesine, lipit ve protein oksidasyonu dahil olmak üzere oksidatif stres hasarlarının belirteçlerinin eşlik ettiği gösterilmiştir (62). Biyolojik mekanizmalar için gerekli olan enerjinin sağlandığı yer olan elektron trasnport zincirinin ilk basamağı kompleks I' dir. Bu basamağın inhibe olması beyin dokularının enerjiden yoksun kalarak dopaminerjik nöronların ölümlerine sebebiyet vermektedir.

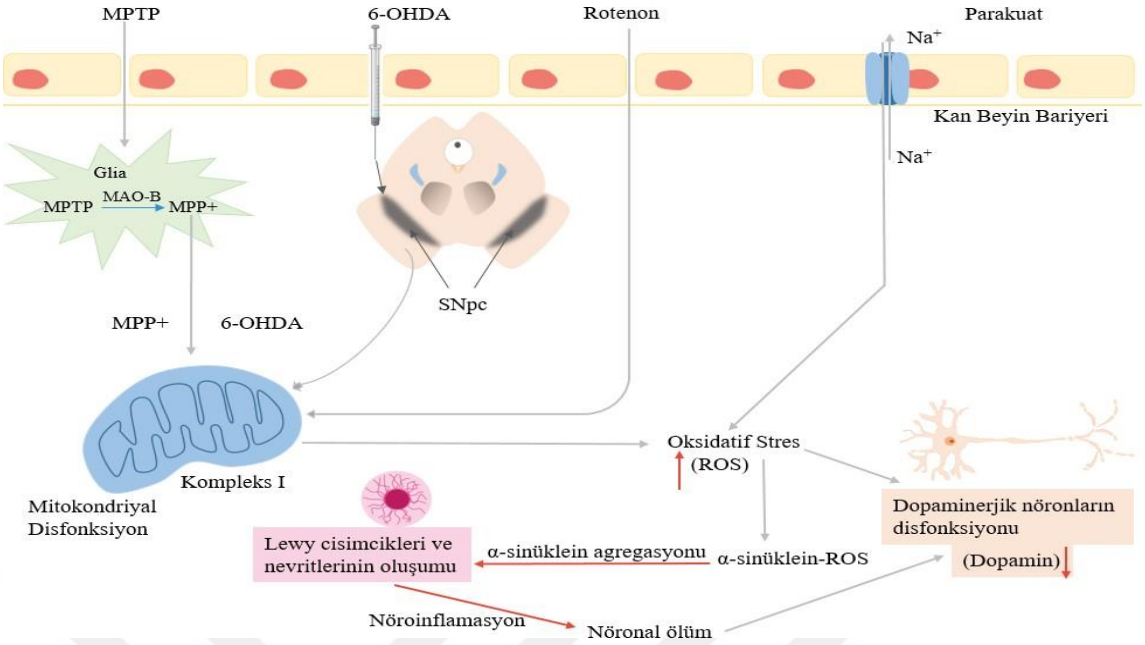
Beyindeki yoğun ROS üretimi, bu reaktif moleküllerin PH' de oynadığı rolün büyüklüğü için bir açıklama sağlayabilir. Beyin, vücuttaki oksijen kaynağının yaklaşık % 20' sini tüketir ve bu oksijenin önemli bir kısmı ROS' a (reaktif oksijen türleri) dönüştürülür (110). ROS, beyinde hem nöronlarda hem de glia' da çeşitli kaynaklardan üretilebilir ve elektron taşıma zinciri mitokondriyal düzeyde ana katkıda bulunur (111,112). RNS (Reaktif nitrojen türleri) kaynakları arasında, NOS (nitrik oksit sentaz) varlığı nedeniyle beyinde bol miktarda bulunan NO ile birlikte monoamin oksidaz (MAO), NADPH oksidaz (NOX) ve diğer flavo enzimleri bulunur (110). Deneysel çalışmalar, PH' de beyindeki dopaminerjik nöronal kayba önemli bir katkının, SNpc'deki dopamin metabolizması, düşük glutatyon (GSH) ve yüksek seviyelerde demir ve kalsiyumdan kaynaklanan ROS olduğunu göstermektedir (113). Bunun yanı sıra beyin, oksidatif stres koşulları altında lipit peroksidasyonuna ve toksik ürünlerin oluşumuna neden olan yüksek konsantrasyonlarda çoklu doymamış yağ asitleri içerir (114). Beyindeki artan oksidatif stres, alfa sinüklein agregasyonuna katkıda bulunabilir. α-Sinüklein, veziküler ve membranöz yapılarla ilişkilendirilebilen ve nörotransmiterlerin sinaptik vezikül geri dönüşümü, depolanması ve kompartmantalizesinde rol oynayan doğal olarak katlanmamış bir proteindir SNCA geninin mutasyonları ve çoğalması,

baskın olarak kalıtsal PH ile bağlantılıdır ve proteinin kümelenme eğilimini arttırır. Lewy cisimciklerinde alfa-sinüklein fibrilleri bulunur ve agregaların oluşumu oksidatif stresin artmasıyla ilişkilidir (113). Dopaminin alfa-sinüklein ile oksidatif konjugasyonu, alfa-sinükleinin protofibrillerden olgun fibrillere geçişini inhibe ederek, dopaminerjik nöronlarda sitotoksik çözünür protofibrillerin potansiyel birikimine yol açar (115). Oksidatif stres, çekirdek membran modifikasyonlarına ve alfa-sinüklein translokasyonuna neden olabilir ve burada histonlarla kompleksler oluşturarak çözünmez fibrillere dönüşmesine yol açar (116). İn vivo çalışmalar, rotenona sistemik maruziyetin ardından α-sinüklein agregasyonunu göstermiştir. Oksidatif stresin α-sinüklein kümeleşmesini yol açmadaki etkisinin yanı sıra, α-sinükleinin aşırı ekspresyonu veya yanlış katlanması, artan ROS üretimi ile ilişkilidir. Sonuç olarak ROS, α-sinüklein agregasyonunu teşvik eder ve bu da ROS' u artırır. Böylece nörodejenerasyona yol açan kısır bir döngü oluşturur (113).

Asetilkolinesteraz (AChE), nörotransmiter asetilkolinin (ACh) hızlı hidrolizini katalize ederek kolinerjik sinapslarda iletimi sonlandıran ve kolinerjik iletimde anahtar rol oynayan bir hidrolazdır (117). Striatumda dopaminin işlevi, striatonigral ve striatopallidal nöronları inhibe etmektir. ACh ise dopaminin bu etkisine karşı çıkar. Striatumun dopamin ve ACh sistemleri arasındaki bu dengenin bozulmasının, nörotoksin kaynaklı PH modelinin patogenezinde kritik bir rol oynadığına inanılmaktadır (118).

2.1.6. Zebra Balıklarında Rotenon ile Oluşturulan Parkinson Modeli

Fare sıçan gibi deney hayvanların PH üzerine çalışma yapmak adına rotenon, MPTP, 6-OHDA, parakuad ve maneb gibi nörotoksinler kullanılarak parkinson modeli oluşturulmaktadır. Son yıllarda bu hayvanlara zebra balıkları da eklenmiştir. Zebra balıklarının PH oluşturmak için uygun modeller oldukları bildirilmiş, sıçanlarda PH oluşturmak için kullanılan kimyasalların zebra balıklarında da PH semptomlarına neden olduğu gösterilmiştir (119,120).



Şekil 2- 4: Parkinson hastalığı modeli oluşturulurken kullanılan kimyasalların mekanizması

MPTP ile oluşturulan PH modelinde α-sinuklein agregatları oluşmamaktadır. Rotenon ise kan beyin bariyerini geçebildiği için intraperitanol olarak uygulanabilmesinin yanı sıra balıkların suyuna da karıştırılabilmekte ve PH belirteci olan sinuklein agregatlarının gözlemlenebilmesini de sağlamaktadır. Fakat literatürde PH' de ağrı çalışmalarında çoğunlukla MPTP ve 6- OHDA kullanılarak model oluşturulup ağrı bu modellerde incelenmiştir (37). Oysa 6-OHDA enjeksiyon yolu ile uygulanması, MPTP ise sinüklein agregatlarını oluşturmaması nedeni ile PH'de ağrı araştırmalarında uygunlukları tartışmalıdır. PH' de ağrı mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalarda dopaminerjik yolağın PH' de ağrı mekanizmasını aydınlatmada yetersiz olduğu ve çok sayıda soru işaretlerinin olduğu bildirilmiştir (**Şekil 2-6**) (60) .

Rotenon ilk olarak 1985 yılında Heikkila tarafından doğrudan beyne enjekte edilerek kullanılmıştır ve bunun sonucunda dopaminerjik nöronların ölümüne sebep olduğu görülmüştür (121,122). Rotenon, tropikal bitkilerden izole edilen nörotoksinlerin rotenoid ailesine aittir ve tarımda hem herbisit hem de böcek ilacı olarak işlev görür. Yüksek lipofilik özelliğe sahip olması nedeniyle, kan-beyin bariyerini kolayca geçebilir ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve mitokondriyal disfonksiyonu indükleyen mitokondriyal kompleks I' in aktivitesini inhibe eder (123,124). Rotenon tarafından kompleks I'in sistematik veya kısmi hasarı, sıçanda davranışsal ve nöropatolojik Parkinson özelliklerini yeniden ortaya koyar. Ayrıca Lewis sıçanında ozmotik mini

pompalar tarafından intravenöz rotenon infüzyonu (3 mg/kg/gün), dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (125). İntravenöz uygulama sadece dopaminerjik nöronlara zarar vermekle kalmaz, aynı zamanda α-sinüklein birikimini, Lewy cismi oluşumunu ve oksidatif stresi de neden olur (60). Bununla birlikte, intraperitonel rotenon enjeksiyonunun yalnızca davranışsal ve nörokimyasal hasarı çok yüksek bir ölüm oranıyla beraber tetiklediği bildirilmiştir (126).

2.2. Ağrı

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (IASP) tarafından ağrı, "gerçek veya potansiyel doku hasarı ile ilişkili veya bu tür hasarlar açısından tarif edilen hoş olmayan bir duyusal ve duygusal deneyimdir" şeklinde tanımlanmaktadır (127). Ağrının temel işlevi organizmayı zarardan koruyan ya da yaralanmayı en aza indirmeyi sağlayan bir uyarı sinyali olmaktır. Canlı organizmalarda ağrı reseptörleri yaygındır. Nosiseptör ağı, derinin herhangi bir yerinden, kaslar ve iç organlar dahil daha derin dokulardaki hasarın sinyalini verebilir. Nosiseptörler, soğuk, ısı, basınç ve kimyasal uyarım gibi bir dizi modaliteye duyarlılığı olan sistemlerden meydana gelir. Ağrının ikinci ana işlevi yaralanmadan sonra ortaya çıkar. İçsel mekanizmalar ağrı şiddetini, yerini ve süresini şiddetlendirir. Ağrı, hasarlı bölgeden hasarlanmamış bölgelere yayılır ve iyileşme sırasında da bu devam eder (128,129).

Ağrı deneyiminin iki farklı sinir yolu olduğu bilinmektedir (130). İlk yolda ağrı sinyali vücudun herhangi bir yerinden gelir ve ağrının algılanmasıyla ilişkilendirilen beynin anterior singulat korteksini harekete geçirir. Duygu, motivasyon ve duygu ile ilişkili medial prefrontal korteksi ve akümbens çekirdeğini içeren ikinci yolun aktivasyonuna bağlı olarak insanlar bu uyarıma farklı tepkiler verirler (130). Bunun yanı sıra, kişilik, bilişler, inançlar, sosyokültürel değişkenler, öğrenme ve duygusal tepkisellik gibi ağrı algısına katkıda bulunan fizyolojik olmayan faktörler vardır (131).

IASP' ın verdiği terminolojiye göre ağrı eşiği, "acı verici olarak algılanan bir uyaranın minimum yoğunluğu" olarak ifade edilir. Bunun yanı sıra geleneksel olarak eşik, daha önce tanımlandığı gibi, bir deneğin ağrıyı algıladığı en düşük uyaran yoğunluğu olarak da tanımlanır (132). IASP' ye göre ağrı toleransı ağrı eşiğinden farklıdır ve "ağrı toleransı bireyin dayanabileceği ya da tolere edebileceği maksimum ağrı" olarak ifade edilir. Ağrı toleransı bireyin dayanabileceği maksimum ağrı miktarı iken ağrı eşiği minimum ağrı miktarı olarak ifade edilir (132).

2.2.1. Ağrının Sınıflandırılması

Ağrı, süresine, kaynağına ve mekanızmasına göre sınıflandırılabilir. Süresine göre akut ve kronik ağrı; kaynaklandığı bölgeye göre somatic, visceral ve sempatik ağrı; mekanizmasına göre nosiseptif, nöropatik ağrı, deafferantasyon ağrısı ve reaktif ağrı şeklinde sınıflandırılır. Bunların yanı sıra psikolojik durum, yaş, cinsiyet ve kültür gibi özel hususlar da ağrı oluşumunda etkilidir (133)

2.2.1.1. Süresine Göre Ağrı Sınıflaması

Kısa vadede bireyi zarardan korumayı sağlayan evrensel bir deneyimdir, ancak uzun vadede zayıflatıcı bir durum haline gelebilmektedir.

2.2.1.1.1. Akut Ağrı

İnsanlarda akut ağrı kısa süreli ağrı olarak tanımlanır ve doğrudan kesik, yanık veya kırık kemik gibi yaralanma veya doku hasarı ile ilişkilendirilmektedir (134,135). Akut ağrı genellikle normal işleyen bir ağrı algılama sisteminin uyarılmasının bir sonucu olarak oluşur ve doku hasarını önlememize veya en aza indirmemize yardımcı olur (133). Genel olarak akut ağrı mekanik ve termal uyaranlarla meydana gelir. Akut ağrı miyelinli A-delta lifleri aracılığıyla iletilir. Akut ağrısı olan kişilerde artmış kas gerilimi, kan basıncı, kalp hızı ve terleme gibi otonomik değişiklikler gelişebilir ve bu ağrı zararlı uyaranın ortadan kalkmasının ardından sonlanır.

2.2.1.1.2. Kronik Ağrı

Kronik ağrı, ağrının uzun bir süre boyunca algılanması anlamına gelir ve genellikle 3 ila 6 ay süren ağrılar kronik ağrı olarak tanımlanır. Bununla birlikte, ağrının kronolojisi, ağrıları temelde "akut" ve "kronik" olarak daha da alt bölümlere ayırmada mekanik bir ilişki gözönüne alınır, yani akut ağrı basit nosiseptif ağrıdır ve kronik ağrı, sinir yolları boyunca karmaşık bir patolojiye sahiptir (133). Kronik ağrıda, akut ağrıdaki kadar otonomik cevaplar yoktur (136). Akut ağrıdan farklı olarak kronik ağrı yararlı bir sinyal değildir ve yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Kronik ağrı mekanik ve termal uyaranlar sonucu gelişebilir. Özellikle kimyasal uyaranlar ile etkileşim sonucu ortaya çıkan bradikinin, histamin, asetilkolin, prostaglandinler gibi kimyasal maddeler kronik ağrının oluşumunda oldukça önemlidirler. Kronik ağrı oluşumu ağrılı bir uyaranda ile başlar, artarak devam eder. Kronik ağrı myelinsiz C lifleri ile taşınır. Kronik ağrı devamlıdır ve ağrılı uyaran faktörü ortadan kalktıktan sonra da devam eder. C liflerinin

beyin sapında ve talamusda geniş bir yayılım göstermesi sebebiyle bu ağrının lokalizasyonu yaygındır.

2.2.1.2. Kaynaklandığı Bölgelere Göre Ağrı Sınıflandırması

Geleneksel visseral ağrı tanımına göre, visseral ağrı basitçe somatik ağrının bir çeşidi olduğu bilinmektedir.

2.2.1.2.1. Somatik Ağrı

Somatik, vücut anlamına gelen Yunanca kökenli bir kelimedir. Temel olarak somatik ağrı, vücudun yapısını oluşturan herhangi bir dokudan kaynaklanan nosiseptif bilginin uyandırdığı ağrıdır. Daha açık bir ifadeyle somatik ağrı, vücudun iç organlarından (visseral) kaynaklanmayan ağrıyı ayırt etmek için kullanılır. Bu yapılardan kaynaklanan ağrı ise viseral ağrı olarak adlandırılır. Sonuç olarak, somatik ağrı etkili bir şekilde kas-iskelet yapıları, uzuvlar, omurga, göğüs duvarı ve karın duvarından kaynaklanan ağrıyla sınırlandırılmıştır (137). Somatik ağrı iyi lokalizdir, ani başlayan ve keskin bir ağrıdır (136).

2.2.1.2.2. Visseral Ağrı

Geleneksel visseral ağrı tanımına göre, visseral ağrı basitçe somatik ağrının bir çeşidi olarak bilinmektedir. Viseral ağrıyı somatik ağrıdan ayıran klinik özellikleri bulunur (138). Bu özellikler şunlardır: (1) viseral ağrı tüm iç organlarda ortaya çıkmaz; (2) viseral yaralanmayla bağlantılı değildir; (3) ağrı belli bir bölgede lokalize değildir ve dağınıktır; (4) ağrıya abartılı motor ve otonom refleksler eşlik eder (139). Visseral ağrı, mide, mesane gibi iç organlarda hissedilen bir ağrı çeşididir. Bu, genellikle inflamasyona sebep olan bir durumun neden olduğu bir tür nosiseptif ağrıdır. Mesanedeki inflamasyon sonucu pelvik ağrısı ve irritabl bağırsak sendromunun neden olduğu karın ağrısı bu ağrı türüne girer. Bu ağrı genellikle mide, mesane bağırsak gibi organlardaki ağrı reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşur.

2.2.1.2.3. Sempatik Ağrı

Sempatik sinir sisteminin aktivasyonu sonucu ortaya çıkan damarsal kökenli ağrılar, kompleks rejyonal ağrı sendromu ve kozaljiler (deride şiddetli yanma hissi ile gelişen yakıcı ağrıdır ve genellikle sinir hasarına bağlı olarak gelişir) sempatik ağrı olarak tanımlanır (136).

2.2.1.3. Mekanizmalarına Göre Ağrı Sınıflaması

2.2.1.3.1. Nosiseptif Ağrı

Nosiseptif ağrı, nosiseptörlerin uyarılması ile başlayan, tedavi ile sonlanan bir ağrıdır. Kas, kemik, eklem ve organ ağrıları nosiseptif ağrılardır (140–142). Nosiseptif ağrı yalnızca nöral sensör/ algılama sisteminin normal işleyişidir. Bu sistem, beyni bedensel yaralanmalara karşı uyarmayı hedefler (133).

2.2.1.3.2. Nöropatik Ağrı

Somatosensoriyel sinir sisteminin bir lezyonu veya hastalığının neden olduğu ağrı olarak ifade edilir. Nöropatik ağrı sinirlerde, darbe ya da diyabet gibi metabolik bir hastalık sonucunda ağrı algılayıcılarının doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkar. Baş ağrıları, nöropatiler, sinir sıkışmaları nöropatik ağrılardır. Nöropatik ağrı mekanizmasının nosiseptif ağrıdan en belirgin farkı nosiseptif uyarı veren kaynağın bulunmamasıdır (141–143). Nöropatik ve merkezi ağrı, gerçek işlev bozukluğunun bir belirtisidir ve hastalığın kendisi olabilir (133).

2.2.1.3.3. Deafferantasyon Ağrısı

Periferik ve santral sinir sistemi yaralanmaları sonucun duyusal uyaran iletiminin merkezi sinir sistemine ilerleyişinin engellenmesi ile ortaya çıkar. Talamik ağrılar ve fantom ağrıları bu ağrı sınıfına girer (136).

2.2.1.3.4. Reaktif Ağrı

Motor ya da sempatik girdilerin (afferent) refleks aktivasyonuyla nosiseptörlerin uyarılması sonucu oluşan ağrıdır ve miyofasiyal ağrı bu ağrı sınıfına girer (136).

2.2.1.3.5. Psikosomatik Ağrı

Anksiyete ve depresyon gibi psikolojik sorunlarda olmayan bir ağrıyı ya da önemsiz bir doku sorunu sonucu oluşan hafif ağrıyı abartılı bir ağrı biçiminde algılayarak ifade edilen ağrıdır (136).

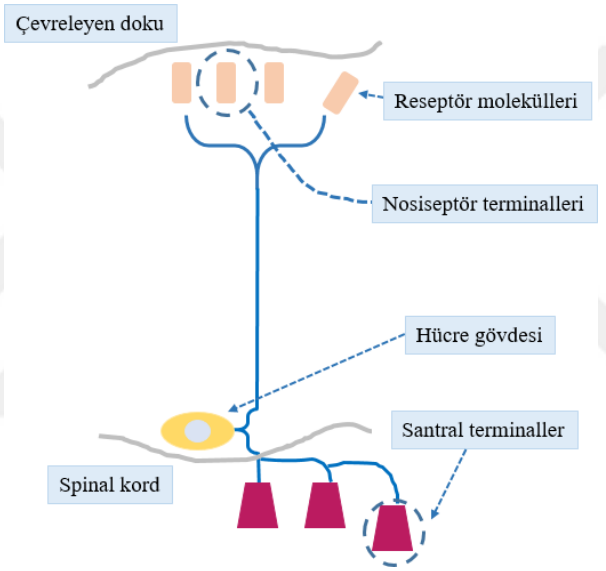
2.2.2.Ağrı Mekanizmaları ve İletimi

Ağrı uyarısının iletiminden sorumlu periferal ve merkezi olmak üzere iki ana yapı vardır.

2.2.2.1. Periferal Mekanizmalar

2.2.2.1.1. Nosiseptif Nöronlar ve Reseptörler

Ağrılı uyaranın iletiminden sorumlu olan duyu reseptörlerine "**nosiseptör**" denir. Bu reseptörler en çok serbest sinir uçlarında, sinir terminallerinde ve vücuttaki hemen her dokuda bulunurlar (144) (**Şekil 2-7**). Nosiseptörlerin eksitasyonu sıcak ve soğuğun şiddetine, kuvvetli mekanik deformasyona ve kimyasal maddelere bağlı olarak değişir. Bazı reseptörler sadece tek bir ağrılı uyarandan sorumlu olup "spesifik nosiseptörler" olarak tanımlanırlarken birden çok ağrılı uyarandan sorumlu olan reseptörlere "polimodel nosiseptör" denir (127).



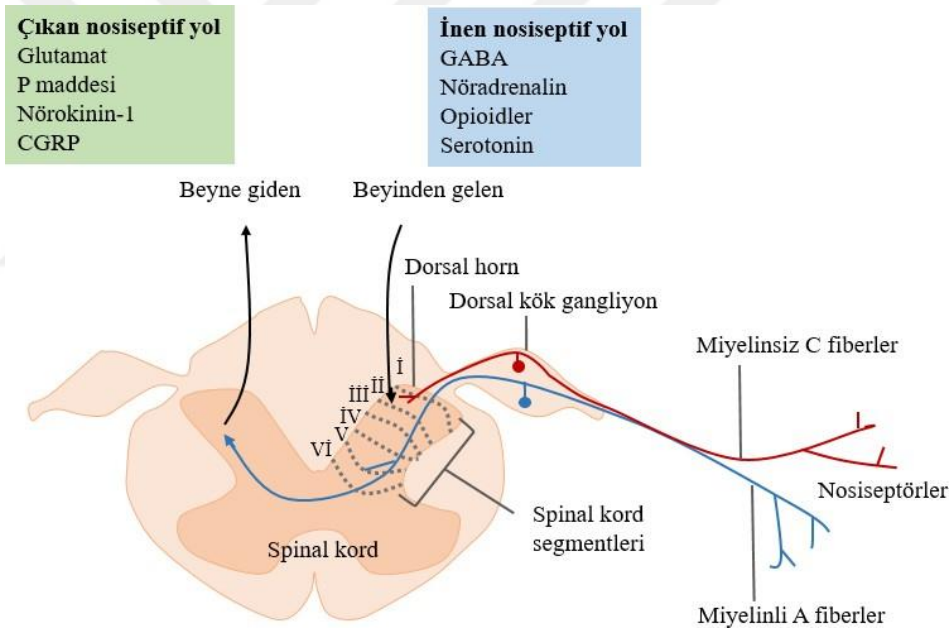
Şekil 2- 5: Nosiseptörlerin kısımları

Nosiseptörler periferik terminalleri ağrılı uyaranlara karşı yüksek hassasiyetteki afferent ve deri ile deri altı dokularda bulunan çıplak ve serbest sinir uçlarıdır. Nosiseptörler, Drosophila ve Caenorhabditis elegans gibi basit hayvan modelleri de dahil olmak üzere, solucanlar, böcekler, memeliler ve omurgalılara kadar çeşitli hayvan türlerinde bulunmuştur (3,145–147). Nosiseptörler tarafından tespit edilen zararlı uyaranların sinyalleri işlenmek üzere beyne iletilir (4,148). Nosisepsiyon, bir hayvanı veya insanı olası hasara karşı uyaran temel bir duyu sistemidir. Nosiseptif yollar, motivasyon için önemli olan beyin bölgeleri ile bağlantılıdır ve hayvanlar, zararlı uyarandan kaçınmak ve kendilerini daha fazla hasardan korumak için modüle edilir (149).

Nosiseptörlerin iki ana kategorisi vardır: miyelinli A-lifleri ve miyelinsiz C-lifleri. İletim hızı, miyelinli olup olmadıklarına bağlı olarak duyu nöronlarının akson çapı ile

ilişkilidir. Nosiseptörlerin çoğu, zayıf lokalize ikincil ağrı hissine katkıda bulunan miyelinsiz C lifleridir. Bunun aksine, hızlı başlayan, keskin bir ağrıya miyelinli A lifleri aracılık eder (150).

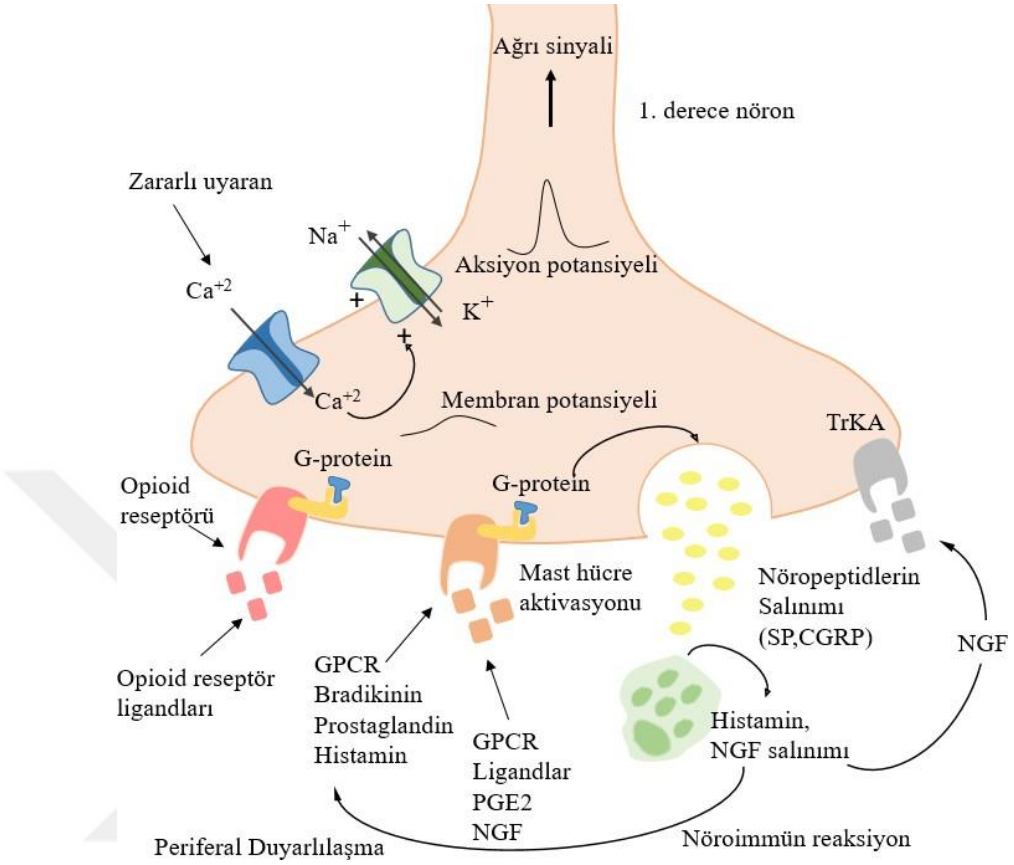
Dorsal kök gangliyonunda (DKG), nosiseptif nöronların hücre gövdeleri iki sinyal gönderir: birinci akson periferik dokuya, ikinci akson ise omuriliğin dorsal boynuzundaki ikinci dereceden nöronlara sinaps yapar. Omuriliğe dorsal kök yoluyla giren DKG nöronlarının merkezi aksonu, çıkan (afferent) nosiseptif yolların çıktığı rostral ve kaudal yönde (lamina I, II, IIA ve V) birden fazla spinal segmenti innerve etmek için dallanır (**Şekil 2-8**). DKG nöronları, bu laminalar içindeki hem uyarıcı hem de inhibe edici internöronlarla etkileşime girerek gelen sinyallerin modülasyonuna yardımcı olabilir (150).



Şekil 2- 6: Beyne çıkan ve inen yollar

Nosiseptörlerin hücre gövdeleri, dorsal kök gangliyonunda bulunur ve periferik dokularda serbest uçlar olarak son bulur. Periferden kaynaklanan ağrı sinyalleri, C-fiber sinirler (kırmızı) ve miyelinli A-fiber sinirler (mavi) tarafından taşınan DKG' dan geçer. İnternöronların üzerindeki dorsal boynuz sinapsına yönelik girdiler nosiseptif sinyallerinin yüksek MSS merkezine iletimini modüle eder. Sinyaller, çıkan yollarla beyne iletilir ve beyinden inen yollar, zararlı ağrı uyaranını engelleyici sinyaller gönderir.

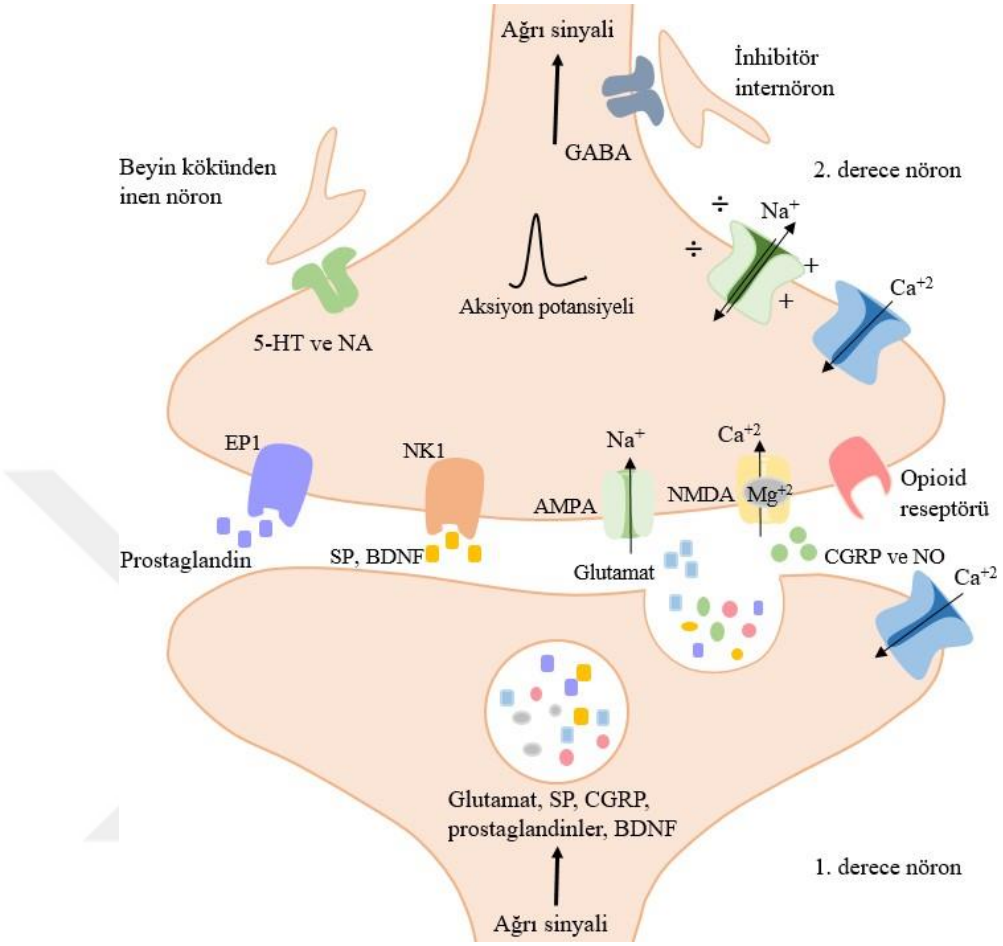
Glutamate, P maddesi, GABA, nöradrenalin, opioidler gibi maddeler ağrının işlenmesi, iletilmesinde ve modülasyonunda önemli roller oynayan temel aracılardır (150).



Şekil 2- 7: Periferde nosiseptör duyarlılığının özellikleri

Termal, kimyasal veya mekanik kaynaklı zararlı bir uyarı, merkezi sinir sistemine giden aksiyon potansiyellerini ortaya çıkarmak için kalsiyum ve sodyum kanallarıyla güçlendirilmiş bir elektrik sinyaline dönüştürülür. Bir yaralanmadan sonra sinir terminaline yakın mast hücreleri aktive olur. Bu, histamin, NGF, prostaglandin ve bradikinin gibi inflamatuar aracıların salınmasına yol açar. Bunlar, G-protein-bağlı reseptörler (GPCR) ve tirozin kinaz reseptörü tip 1 (TrKA) gibi, nosiseptör sinir terminallerinde eksprese edilen reseptörler üzerine etki ederek periferik nosiseptör duyarlılaşmasına yol açar. Ayrıca, immün hücreler ve nosiseptörler arasında etkileşim ile sonuçlanan nöropeptitlerin (örn., SP ve CGRP) salımı söz konusudur. PGE2, prostanglandin E2 (151), glutamat gibi nörotransmitterlere ek olarak P maddesi, nörokinin 1 ve kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) gibi nöropeptidlerin tetiklenmiş salınımı ile ağrı sinyalinin iletilmesinde kalsiyum kanalları önemli bir rol oynar (**Şekil 2-9)**. Hem dorsal boynuzdaki lokal GABA salgılayan inhibitör internöronlar, hem de

beyinden kaynaklanan inen noradrenerjik nöronlar ağrı sinyalini inhibe edebilir (**Şekil 2-10**).



Şekil 2- 8: Spinal iletinin basitleştirilmiş hali

Birincil nosiseptör afferentlerin merkezi terminalleri glutamat, P maddesi (SP), CGRP, nitrik oksit (NO), prostaglandinler (PG) ve beyinden türetilmiş nörotropik faktörü (BDNF) salgılar ve bunlar farklı reseptörlere bağlanarak ağrı modülasyonunda etkili olurlar. Normal olarak, glutamat gibi uyarıcı amino asitler, metabotropik glutamata özgü reseptörlere ve iyonotropik AMPA reseptörlerine bağlanır. SP ve BDNF, G proteinine bağlı NK1 reseptörüne bağlanır. Prostaglandinler ise postsinaptik membranda EP1 reseptörüne bağlanır. Reseptörlere bağlanmaların ardından, sinir hücrelerinin ağrı sinyalleri birinci derece nörondan ikinci dereceden nöronlara iletilmesi sağlanmış olur. Duyarlı hale getirilmiş durumda, NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri gibi ligand kapılı iyon kanalları yukarı regüle edilir ve magnezyum tıkacı(plug) çıkarılır, bu da glutamat duyarlılığını arttırır, böylece sinyal yoğunlaşır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarındaki bir artış, AMPA reseptörlerini fosforile eden protein kinazların

aktivasyonu için ana tetikleyicidir ve aktivitede bir artışa yol açar. Normalde GABA ve glisinerjik reseptörler aracılığıyla sinyal veren inhibe edici internöronlar da kaybolur ve diğerleri arasında örneğin opioid reseptörlerinin ve 2 adrenerjik reseptörün daha az aktivasyonuna ya da inhibisyonuna neden olur. Beyin sapından inen inhibe edici yollar, esas olarak omurilikteki nörotransmiterleri, özellikle serotonin (5HT) ve noradrenalini (NA) salgılar veya opioid peptitleri serbest bırakmak için spinal dorsal boynuzdaki opioid içeren internöronları aktive eder. Hassaslaştırılmış durumda, beyinden inen inhibe edici yollar daha az aktive olur (151). Nosiseptörlerden iletilen sinyaller, hiperaljeziye veya allodiniye yol açan değişiklikler üreterek birlikte hareket edebilir (150).

2.2.2.1.2. Primer Afferent Nöronlar

Beyne ağrı sinyalleri taşıyan üç tür lif vardır: - A-beta, A-delta ve C-lifleri. İlk ikisi, miyelinli (yalıtılmış) ve sinir uyarılarını hızla beynin kortikal bölgelerine taşıyan evrimsel olarak modern liflerdir (152). Kısa, keskin ağrı duyusunu taşıyanlar ince myelinli A lifleridir ve iletim hızları 5-30m/sn' dır. A-delta fiberleri, soğuk zararlı uyaranı iletilmesine ek olarak, termal ve mekanik ağrı iletilerini nispeten daha hızlı bir şekilde ve hassas konum bilgisiyle merkezi sinir sistemine iletir. A-delta lifleri, beynin kortikal bölgelerine birincil bağlantıları olan somatik liflerdir. Bu lifler keskin, sivri uçlu, kolayca lokalize ağrı sinyalleri iletir; bu ağrı hisleri, sürekli veya tekrarlayan uyarı olmadıkça genellikle çabuk geçer. Öte yandan C-lifleri, termal ve mekanik ağrı uyaranlarına nispeten daha yavaş bir şekilde merkezi sinir sistemine sinyali iletir. Bunların iletim hızları ise 0,5-2m/sn olup uzun süreli yanıcı tarzdaki ağrıyı taşırlar. C-lifleri miyelin ile kaplı değildir. Beynin subkortikal kısmına doğru oldukça yavaş ilerler (152). Ağrı uyaranları akut ya da kronik ağrıya göre farklı liflerle taşınırlar ve arka spinal kökler içerisinden medulla spinalise ulaşırlar. Ağrı arka boynuzdaki Lamina II – IV ile ilişkilidir;

Substantia→ Lamina I (A- Δ lifleri)

Gelatinosa → Lamina II (C lifleri)

Lamina III-IV →(A β lifleri)

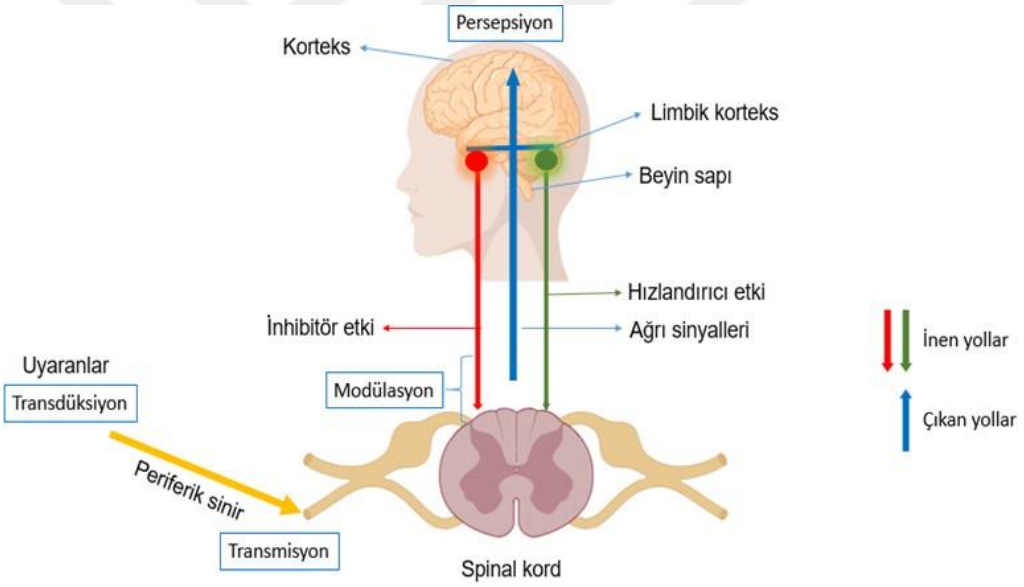
Lamina V–VI →(Yansıyan ağrı ile ilgili liflerin sinaps yaptıkları alanlardır)

Evrimsel süreçle gelişmiş somatik A-delta liflerinin ve ilkel sempatik C-liflerinin belirli koşullar altında ağrı sinyallerini ilettiği uzun yıllardır bilinmektedir. Sinirler hücreleri, zayıf iletken miyelin ile çevrili olan veya olmayan uzun protoplazma tüpleridir. Sinir

hücreleri genellikle çeşitli boyutlarda ve özelliklerdedirler ve birbirleriyle bağlantılı çok sayıda dalları vardır. Sinir hücreleri, çok sayıda elektriksel (boşluk kavşağı) ve kimyasal sinapslar aracılığıyla birbirleriyle etkileşirler. Temel olarak beyinden kaslara sinyaller taşıyan motor (efferent) nöronlar ve çevreden beyne sinyaller taşıyan duyusal (afferent) nöronlar vardır (152).

2.2.2.2. Merkezi Mekanizmalar

A delta ve C lifleri Lamina I- II' de yani T hücrelerinde (substantia gelatinozada santral transmisyon hücresinde) sinaps yaparlar. T hücreleri yeterince uyarıldığında ağrının algılanması ve cevaplanmasından sorumlu aksiyon sistemi aktive olur. Daha sonra ağrı sinyallerinin beyne iletilmesinde akut veya kronik ağrı durumuna göre iki farklı yolu kullanabilir. Akut ağrı neospinotalamik yol ile üst merkezlere iletilirken, kronik ağrı paleospinotalamik yol aracılığıyla iletilir.



Şekil 2- 9: Ağrının algılanma mekanizması

Ağrının iletimi dört aşamalı olarak gerçekleşir. Transdüksiyon; ağrı reseptörleri olarak da adlandırdığımız nosiseptörlerde ağrılı uyaranın elektriksel iletiye dönüştürüldüğü aşamadır. Transmisyon; nosiseptif sinyalin sinir sistemi boyunca iletildiği aşamadır. Transmisyon sırasında, öncelikle primer sensöriyel afferent nöronlar elektriksel iletiyi omuriliğe taşır. Ardından, nosiseptif sinyaller omurilikten çıkan ileti aracılığıyla beyin sapı ve talamusa ulaşır. Son aşamada, talamustan somatosensöriyel kortekse ulaşır. Modülasyon; nosiseptif iletinin sinirsel etkenler aracılığıyla modifiye olmasıdır. Persepsiyon ise omurilikten çıkan ağrının bireyin ağrı deneyimine de bağlı olarak çıkan

yollar aracılığıyla beyne iletilerek ağrının algılandığı aşama olarak tanımlanır (**Şekil 2-11**) (136).

Cilt, kas, vissera, kemik gibi birçok yerde bulunan nosiseptörlerce uyarılan nöronlardan ağrıyı destekleyici olarak salınan glutamat gibi eksitatör nörotransmitter ve ağrıyı azaltma amacıyla salınan inhibitör nörotransmitter olan GABA gibi maddeler salınır (153–155). Omurilik, periferden gelen ağrı sinyallerini çıkan yollar (afferent) aracılığıyla üst merkezlere iletir. Kortekse ulaşan bu sinyaller, üst merkezlerde değerlendirilmesinin ardından beyin sapı ile omuriliğe geri dönerek ağrıyı kontrol eden inen yolları (efferent) oluşturur. Efferent yollarda, noradrenalin, seratonin ve dopamin gibi monoaminler yer alır. Bu nedenle bu yollar monoaminerjik bir yolak olarak bilinmektedir. Bu yollar hem ağrıyı azaltan özelliğe sahiptir hem de ağrıyı reseptörün alt tipi ve yoğun olan monoamin tipine göre arttırabilmektedir. Bu yüzden, bu yolak modülasyon yolağı olarak da adlandırılır (156,157).

2.2.3.Ağrının Nörokimyası

Doku hasarı meydana geldiğinde, ağrının iletimini düzenleyen kimyasal maddeler hücre dışına salınır. Ağrı reseptörleri sinir uçlarının tahrip edilmesi ile harekete geçer. Periferal çıplak sinir uçları uyarıldığında nörotransmitter salınımına yol açar. P maddesi ve diğer nöroaktif substratların lokal salınımı, vazodilatasyon ve de plazmanın subkutan dokulara sızması sonucu ödem oluşumuna neden olabilir. Vazodilatasyonu takiben kan hücrelerinden lokal olarak salınan histamin ve bradikinin, nosiseptörleri sonraki uyarılar için duyarlı hale getirebilir, bu hiperaljezi olarak adlandırılır. Doku yaralanması ve P maddesi mast hücrelerini aktive eder (158). Primer duyu nöronlarının uyarılması, omurilikte postsinaptik nöron çekirdeklerinde c-fos proteini ekspresyonuna neden olur. C-fos'un önemli rolü, omurilikte nosiseptif uyarıya tepkinin bir parçası olarak ağrı durumunu göstermesidir. Omurilikte, yüksek frekanslı elektriksel uyarımını takiben, P maddesi, glutamat ve nörokininler etkisi ile uyarıcı amino asitler aspartat ve glutamatın salınımı gerçekleşir (159).

Siklooksijenazlar (COX) ve prostaglandinler, inflamatuar hastalıklarda anahtar medyatörlerdir. Bu medyatörler ağrı duyarlılığına önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Özellikle indüklenebilir COX-2 izoenzimi aracılığıyla sentezlenen prostaglandinler dokudaki inflamatuvar reaksiyonları tetikler. COX-1' in, hayvan modellerinde, nöropatik ağrının gelişimi için benzer şekilde önemli olduğu gösterilmiştir. Zhu ve Eisenach (2003),

spinal COX-1 ekspresyonunun deneysel nöropatinin erken dönemlerinde arttığını göstermiştir (160), Erken aşamalarda COX-1 inhibisyonunun, ağrılı nöropatilerin tipik semptomlarını önlediği belirtilmektedir. Bahsi geçen semptomlar; hafif dokunma gibi genellikle ağrılı olarak algılanmayan uyaranlara yanıt olarak artan ağrı hissi durumunu tanımlayan allodini ile ağrılı uyaranlara karşı artan duyarlılık olan hiperaljezi durumudur (161).

Ağrıya duyarlı nosiseptörlerin aktivasyonu sonucu endorfin, serotonin, P maddesi ve bradikinin salgılanır. Nosiseptörler ile bunları çevreleyen düz kaslar, kapiller ve afferent sempatik sinir uçları nosiseptörlerin mikro çevresini oluşturur. Nosiseptörler mekanik uyaranlarla uyarılmalarına ek olarak, endojen ağrıya neden olan madde olarak tanımlanan P maddesi, bradikinin, histamin, prostaglandinler, lökotrienler, interlökinler, asetilkolin ve TNF−α gibi biyokimyasal moleküller aracılığıyla da düzenlenebilir (158,162). Zararlı uyaranlara maruz kalındığında hücre zarının geçirgenliği bozulur ve lokal hücre yıkımı sonrası hücre dışına öncül maddeler çıkar. Nosiseptörü direkt olarak aktive eden bradikinin periferdeki damarlarda vazodilatasyona neden olur. Ayrıca hücre zarları üzerine etki yaparak prostoglandin oluşumuna da katkıda bulunur. Trombositlerden salınan serotonin de, nosiseptörü aktive eder ve hücre zarlarına etki ederek yine prostaglandinlerin salınmasına yol açar. Prostaglandinler, nosiseptif duyarlılığı ve vazodilatasyonu artırarak daha fazla ağrıya neden olan maddelerin birikmesine yol açar. Prostaglandinler, inflamasyonu ve diğer inflamatuvar aracıları indükler. Aspirin, prostaglandin sentezi için gerekli enzim olan siklooksijenaz 2' yi inhibe ederek ağrıyı azaltır (163). Nitrik oksitin (NO) nosiseptif olaylardaki rolü tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. İnflamasyonda olduğu gibi NO'nun ağrı mekanizmasında da rol oynayabileceği öne sürülmüştür. NO'nun özellikle kronik ağrı durumlarında indüksiyonunun önem taşıdığı ve hücre ölümünde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (136).

Periferik nosiseptör terminallerinde ağrı için eşik değeri düşürmek amacıyla (164) bir dizi iyon kanalı (örn. ASICS) ve çeşitli G-protein bağlantılı reseptörler mevcuttur. İlgili antinosiseptif G-protein reseptörleri arasında opioid, kannabinoid, somatostatin, muskarinik asetilkolin, GABAB ve α2-adrenerjik reseptörler yer alır. Bunların büyük kısmı esas olarak Ca^{+2} kanallarının modülasyonu yoluyla hareket eder ve böylece hücreye Ca^{+2} girişini azaltır. Bu durum, eksojen opioid agonistlerinin klinik uygulama sonrası

periferal bölgelerde, önemli analjezik ve anti-inflamatuvar etkiler üretebileceklerini göstermektedir (165,166).

Dorsal boynuz, beyin sapı ve periferal dokulardaki lifler, ağrı uyarılarını ileten nöronların sinyal iletimini engelleyen nöromodülatörler olan endojen opioidleri salgılar (158). Vücudumuzda ağrı durumunda üretilen mediyatörlerden en yaygın olanı, yaralanma veya diğer zararlı uyaranlara karşı üretilen endojen opioidler olan endorfinlerdir (167). Endorfinler, ağrının giderilmesinden sorumlu doğal opioid benzeri maddelerdir. Endorfin seviyeleri bireyler arasında farklılık gösterir; bu nedenle, ağrının algılanmasının bireylere göre değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (158).

2.2.4.Opioid Sistemi

Opioid sistemi ağrıyı, ödülü ve bağımlılık yapıcı davranışları kontrol eder. Opioidler farmakolojik etkilerini, üç opioid reseptörü, mu, delta ve kappa (sırasıyla oprm, oprd ve oprk) aracılığıyla uygular. Beyindeki opioid reseptörleri, nöronlar tarafından salınan enkefalinler, dinorfinler ve endorfin gibi bir endojen peptid ailesi tarafından aktive edilir.

2.2.4.1. Endojen Opioidler ve Kodlayan Genler

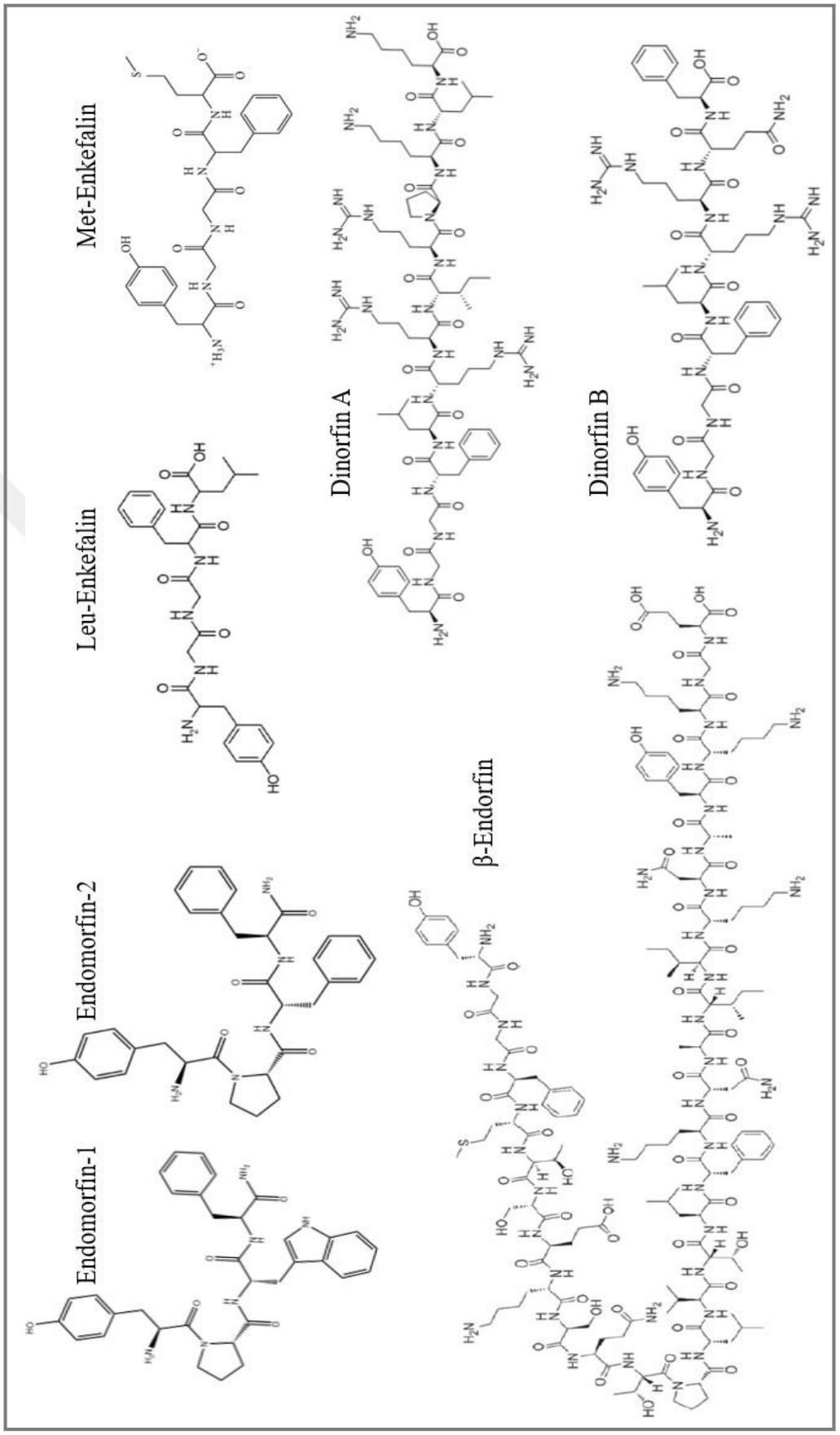
Endojen opioidler, G proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesine ait olan spesifik opioid reseptörleri üzerine etki ederler (168). Endojen opioid sistemi klasik μ (MOP), d (DOP) ve k (KOP) reseptörleri ve klasik olmayan Nosiseptin/Orfanin FQ/NOP reseptöründen oluşur. Bunun yanı sıra, opioid peptidleri olan enkefalin, β-endorfin, dinorfin ve endomorfinden oluşur. MOP, DOP ve KOP opioid reseptörleri sırasıyla OPRM1, OPRK1 ve OPRD1 genleri tarafından kodlanır (169). FQ/NOP reseptörlerinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Klasik opioid reseptörleri naloksonun antagonistik etkisine ve endojen opioidlerin agonistlerine duyarlıyken klasik olmayan opioid reseptörleri duyarlı değildir (170). Opioid peptidleri, sırasıyla spesifik öncüleri olan preproenkefalin [PENK], proopiomelanokortin [POMC], preprodinorfin' den [PDYN] meydana gelirler (171). Enkefalinler ve β-endorfin, MOP ve DOP reseptörlerinin endojen ligandlarıdır. β-endorfin, MOP ve DOP reseptörlerini yaklaşık olarak eşit afinite ile bağlarken, enkefalin, DOP reseptörü için on kattan daha fazla afiniteye sahiptir. Dinorfinlerin seçici olarak KOP reseptörlerini ve bunun yanında birkaç opioid olmayan reseptörü de aktive ettiği belirtilmektedir (172).

2.2.4.2. Endojen Opioid Peptidleri ve Kodlayan Genler

Opioid peptidler temel olarak proenkefalin (PENK), prodinorfin (PDYN), proopiomelanokortin (POMC) ve pronosiseptin (PNOC) olmak üzere dört öncüden türetilir (173) (**Şekil 2-12**). En yaygın bulunan opioid peptidler, POMC adı verilen tek bir prohormondan türetilen endorfinler iken, metiyonin-enkefalin (M-ENK; Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) ve lösin-enkefalin (L-ENK; Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) formunda bulunan enkefalinler. PDYN, dinorfin A (DYN-A), dinorfin B (DYN-B), neoendorfin ve enkefalinlere karşılık gelen iki motiften oluşurken NOC, PNOC adlı daha büyük bir öncünün bölünmesinden türetilir (174). Bunlara ek olarak, endomorfinler de keşfedilmiştir (175), ancak bunların öncü proteinleri henüz tanımlanmamıştır.

Hughes ve ark. (1975) tarafından beyinde mu reseptörlerini bağlayabilen iki pentapeptid (met- ve leu-enkefalinler) olduğuna dair ilk kanıt sağlanmıştır (176). Bu çalışmaları daha sonra β-endorfin ve dinorfinlerin keşfi izledi. Ardından bu moleküllerin canlılarda bulunan ağrı giderici sistemdeki ve bağışıklık sinyalizasyonundaki rolleri gösterildi (176–179) Özellikle bazal gangliyonlarda yaygın olarak bulunan β-endorfin, enkefalin ve dinorfin gibi opioid peptidleri nöromodülatörler olarak fonksiyon gösterir. Bu peptitler işlevlerini μ, δ ve κ opioid reseptör alt tipleri üzerindeki etkileri aracılığıyla gerçekleştirirler (180).

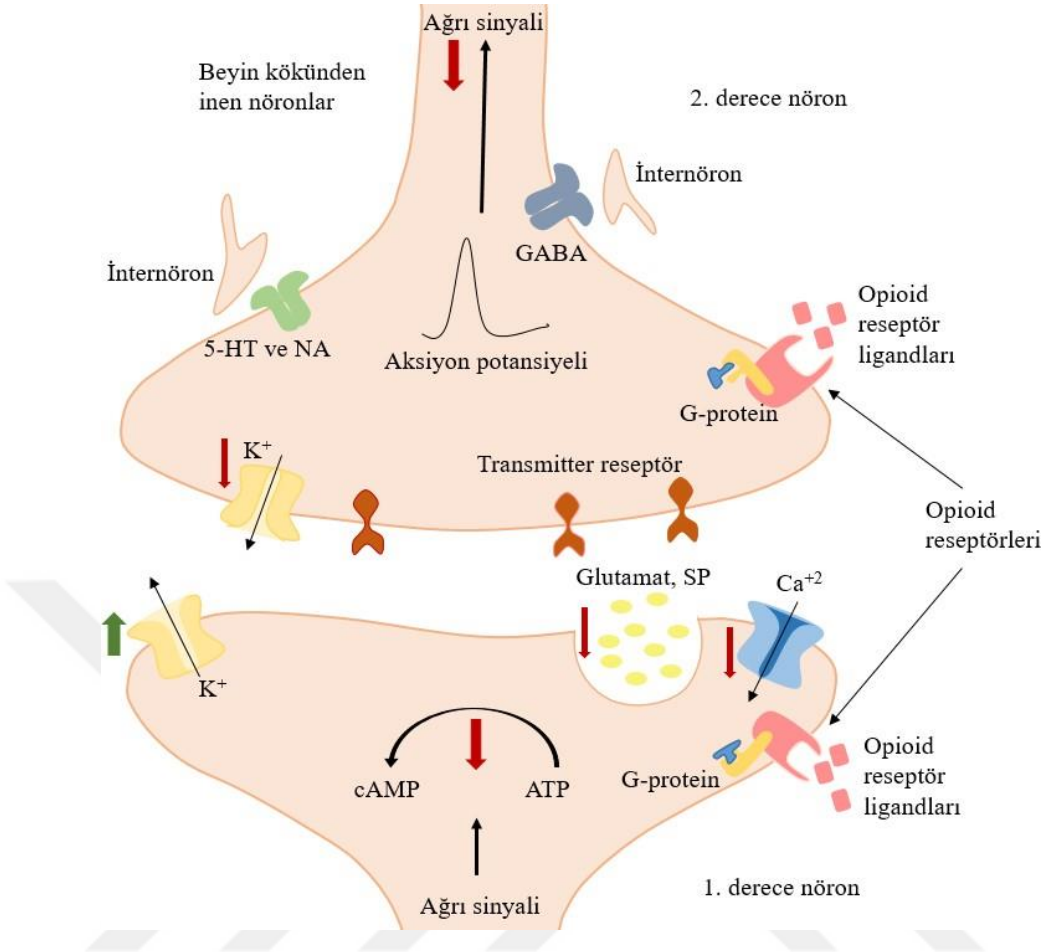
Memelilerde opioidleri kodlayan gen ailesinin proenkefalin, prodinorfin, proopiomelanokortin ve proorfanin olmak üzere dört üyesi vardır. Bu ailenin en belirgin ortak özelliği, her genin, kendi opioid çekirdek sekansı içinde YGGF veya memeli orfanin çekirdek sekansı içinde FGGF' ye sahip en az bir kimyasal sinyale sahip bir öncü proteini kodlamasıdır (181). Proenkefalin geni, pentapeptid sekansı YGGFM (met Enkefalin) veya YGGFL (leu-Enkefalin) olan ve genelde delta opioid reseptörüne bağlanan küçük opioidler bulundurur. Bunlar enfekalinlerin öncüllerini kodlar (182,183). Proopiomelanokortin geni, β-endorfin ve melanokortinleri kodlar (184). Melanokortinler, polipeptit hormonları ve nöropeptitler olarak işlev görür. Memelilerde dört melanokortin vardır: ACTH, α-MSH (melanosit uyarıcı hormon), β-MSH ve γ-MSH. Bu polipeptitler, melanokortin reseptör gen ailesinin üylerine seçici olarak bağlanır (185).



Şekil 2- 10: Endojen opioid peptidlerinin moleküler yapıları

Enkefalinler bağırsak, sempatik sinir sistemi ve adrenal bezlerde sentezlenen opioid peptitlerdir. (186). Spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Enkefalinler, ilk olarak memelilerde keşfedilen pentapeptidlerdir (176). PENK geninin translasyon sonrası işlenmesi, altı Met-ENK kopyası ve bir Leu-ENK kopyası içeren yedi opioid dizisini kodlar (173).

β endorfin, 31 amino asit içeren, μ reseptörüne bağlanan endojen bir opioiddir (187). β-endorfin, POMC' den türetilen peptit yapıda bir hormondur. β-endorfinler, ağrı gibi fizyolojik stres faktörlerine yanıt olarak hipofiz bezi ön lobunda sentezlenir (186,188). μ opioid reseptörlerine bağlandığında ağrıyı hafifletmek için hem merkezi hem de periferik sinir sistemindeki çeşitli mekanizmalar yoluyla işlev görürler. Periferik sinir sisteminde, β-endorfinler, μ opioid reseptörlerine bağlanarak analjezik etki gösterir. Bağlandığında ise, özellikle ağrının iletilmesinde rol oynayan önemli bir protein olan P maddesi salınımının inhibisyonu ile sonuçlanır. Merkezi sinir sisteminde de β-endorfinler benzer şekilde aynı reseptörlere bağlanır ve presinaptik sinir terminallerinde etkilerini gösterir, fakat periferalden farklı olarak P maddesini inhibe etmek yerine, inhibitör bir nörotransmitter olan GABA' nın salımını inhibe ederek analjezik etki gösterirler. Bu da aşırı dopamin sentezine neden olur. Cerrahi bir işlem sırasında ve sonrasında hastanın yaşadığı ağrı derecesinin plazma β-endorfin düzeyi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (189).



Şekil 2- 11: Omurilikteki opioid etki ile ilişkili moleküler mekanizmalar

Opioid reseptör aktivasyonunun presinaptik etkisi, potasyumun ekstraselüler alana transferini sağlayarak veya adenilat siklazı inhibe ederek kalsiyumun intraselüler alana geçişini inhibe eder. P maddesi ve CGRP gibi nörotransmiterlerin salınımı inhibe edilir. Opioid reseptörlerinin yaklaşık % 70 kadarı presinaptik yerleşimlidir. ***Opioid reseptör aktivasyonunun postsinaptik etkisi*** ise nöron uyarılabilirliğini azaltan potasyum iyon akışının inhibisyonunu sağlar. İnen yollar noradrenalin veya serotonin salgılar ve bunun sonucunda ağrı sinyalinin omurga seviyesinde modülasyonunu sağlar (**Şekil 2-13**).

κ opioid reseptörü için endojen peptit olan **dinorfin**, birçok forma sahip karmaşık bir nöropeptiddir. Bu nöropeptid, öncelikle ödül arama, motivasyon, stres tepkisi ve ağrı duyarlılığını düzenleyen ve böylece madde ve alkol kullanım bozukluğunun gelişimini etkileyen nöronal yolları/yolakları modüle eder (190). Dinorfin beyinde birçok bölgede yoğun olarak bulunmasının yanı sıra amigdala, entorinal korteks, dentat girus, hipotalamus, orta beyin, striatum, hipokampus ve medulla-pons'ta (191–193) serebellum ve kortekse oranla daha yüksek seviyelerde bulunur (192). κ opioid reseptörünün stres ile

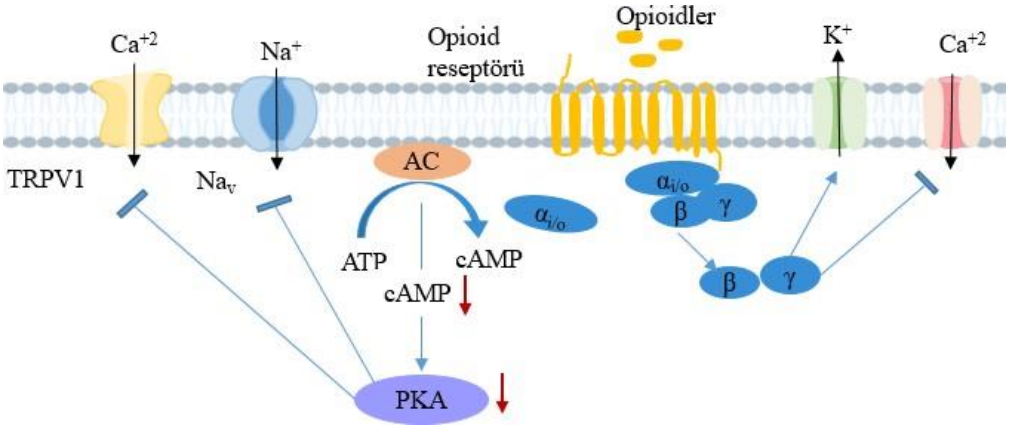
ilişkisini inceleyen bir çalışma, κ opioid reseptörünün blokajının, ameliyatla ilişkili anksiyetenin ve ameliyat öncesi artan stresin sonuçlarının önlenmesinde de faydalı olabileceği düşündürmektedir (194).

Endomorfinler, μ opioid reseptörü için afinitesi olan bir opioid peptidler sınıfına aittir. İlk olarak sığır beyninde (175) ve daha sonar insan korteksinde keşfedilmiştir (195). İki endomorfin formu tanımlanmıştır; endomorfin-1 (EM-1, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH_2) ve endomorfin-2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2). EM-1 ve EM-2 amino asit dizilerindeki diğer opioid peptidlerden farklılıkları olmasına rağmen, kodlayan haberci molekülü bilinmemektedir. Güçlü bir antinosiseptif etkiye sahip olmasının yanı sıra, endomorfinlerin memelilerde otonomik, nöroendokrin ve ödül işlevlerinin modülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (196).

Orfanin FQ/nosiseptin (OFQ/N), on yedi amino asit içeren bir peptittir ve opioidlerle yapısal olarak büyük oranda benzerlik göstermesinin yanı sıra yapılan bir dizi çalışmada farmakolojik olarak opioidlerden farklı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca OFQ/N'nin hem merkezi hem de periferik sinir sisteminin temel fonksiyonlarından olan nosisepsiyon modülasyonu (197–199), lokomotor aktivitede etkinlik (198), nörotransmitter ve hormon salınımının regülasyonu, hafıza ve öğrenme modülasyonu (200–202) gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara da sahip olduğu belirtilmiştir.

2.2.4.3. Opioid Reseptörler

MOP, DOP, KOP ve NOP reseptörlerinin aktivasyonu, Gai / o-bağımlı adenilil siklazların ve siklik adenozin monofosfat oluşumunun inhibisyonuna neden olabileceği düşünülmektedir (203,204). Bununla birlikte, bu etkilerin ağrı inhibisyonu ile sonuçlandığı kesin yol, sadece MOP reseptörleri için açıklanmıştır. Bu nedenle, azalmış cAMP üretimi, protein kinaz A (PKA) aktivitesinin inhibisyonuna yol açar, bu da ağrının kolaylaştırılmasında (ağrı algısının artmasında) rol oynayan çeşitli iyon kanallarının baskılanmasıyla sonuçlanır. Bu kanallar arasında ısı sensörü geçici reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi V üyesi 1 (TRPV1), hiperpolarizasyon aktive edilmiş siklik nükleotid-kapılı (HCN) kanallar, asit algılayıcı iyon kanalları (ASIC) ve voltaj kapılı Na^+ (Nav) kanalları yer alır **(Şekil 2-15)** (170).



Şekil 2- 12: Opioid sinyal yolağı ve kanallarla ilişkisi

2.2.4.3.1. Mü Opioid Reseptörü (MOR) ve Kodlayan Gen

Mü opioid reseptörü morfin için primer bağlanma bölgesi olduğunun bulunmasının ardından bu ismi almıştır. Mü opioid reseptörleri, opioidlerin antinosiseptif özelliklerinin yanı sıra, kannabinoidler, alkol ve nikotin gibi opioid olmayan uyarıcı/uyuşturucu ilaçların kendisine bağlanarak bu ilaçların ödüllendirici yönlerinin aktive olmasında önemli bir etkiye sahiptir. Bu reseptörler, supraspinal lokasyonlarda, özellikle presinaptik bölgelerde yüksek yoğunlukta bulunur ve genellikle çıkan yolları etkisiz hale getirirken inen yolları etkinleştirir. Limbik sistemde ve hipotalamus gibi nörohormonal sekresyonla ilişkili bölgelerde yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Yukarıda belirtilen işlevlere ek olarak, Mü reseptörleri ağrı ve strese yanıtın düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir (186). Mü reseptörü, ağrıyı tedavi etmek için kullanılan güncel opioid agonistlerinin çoğunun birincil hedefidir.

oprm1 geni, zebra balıklarında Mü opioid reseptörünü kodlayan gendir. Mü opioid reseptörü morfinin ve diğer analjezik ilaçların kendisine bağlanması sonucu ağrı kesici etkiye katkı sağlayan opioid reseptörüdür. Bu reseptör Mü1, Mü2 ve M6G olmak üzere üç alt üniteden oluşur. Bu alt üniteler oprm geni tarafından kodlanır. İnsanlarda bu gen bir tane olmasına rağmen zebra balıklarında *oprm1* gibi farklı alt birimleri de içermektedir. oprm geni yaklaşık olarak 130 kb uzunluğundadır (205).

2.2.4.3.2. Kappa Opioid Reseptörü (KOR) ve Kodlayan gen

Kappa opioid reseptörlerinin, Mü reseptörü ile karşılaştırıldığında farklı fizyolojik süreçlere aracılık ettiği düşünülmektedir. Omurilikte daha yüksek konsantrasyonda bulunurlar ve hiperaljezi oluşumunda önemli rol oynamalarının yanı sıra bu reseptörlerin

viseral ağrının modülasyonunda da önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bugüne kadar ki çalışmalarda kappa agonistlerinin, ilaç geliştirilmesinde kullanımını sınırlayan bir özellik olan güçlü disforik özelliğe sahip olduğu da belirtilmektedir (206).

Hücre zarını yedi kez geçmeleri sebebiyle yedi transmembran parçalı (7TM) reseptör olarak da adlandırılan G proteinine bağlı reseptör ailesinin bir üyesi olan Kappa opioid reseptörü (KOR) kappa1, kappa2 ve kappa3 olmak üzere üç alt üniteden oluşur ve **oprk geni** tarafından kodlanır (207). Bu gen yaklaşık 16 kb'lik bir uzunluğa sahiptir ve dört ekzon içerir. İnsan OPRK1 geni, kromozom 8q11.2 üzerinde bulunur (208).

KOR endojen ligandlar ve çeşitli sentetik opioidler için bir reseptör olarak işlev görür. Ligand bağlanması, adenilat siklaz aktivitesinin ve nörotransmiter salımının inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu opioid reseptörü, ağrının algılanmasında ve sentetik opioidlerin hipolokomotor ve analjezik etkilerine aracılık etmede rol oynar. oprk1 genindeki varyasyonlar ayrıca alkol bağımlılığı ve afyon bağımlılığı ile de ilişkilendirilmiştir. Bu gen için farklı izoformları kodlayan alternatif olarak uç uca eklenmiş transkript varyantları bulunmuştur (209).

oprk1 ekspresyonu ilk olarak embriyonik safhadaki zebra balıklarında 48 hpf' (döllenmeden sonra 48. saat) de RT-PCR ile tespit edilmiş ve en yüksek ekspresyonu yetişkin balıklarda gözlenmiştir. Bununla birlikte, genel ekspresyon seviyelerinin *oprm1, oprd1a* ve *oprd1b* için gözlemlenenden iki kat daha düşük olduğu da belirtilmektedir (210).

2.2.4.3.3. Delta Opioid Reseptörü (DOR) ve Kodlayan gen

Üçüncü tip opioid reseptörü, delta (δ) reseptörüdür. Mü reseptörleri ile kıyaslandığında, delta opioid reseptörleri orta beyinde nispeten düşük konsantrasyonlarda bulunurken periferik sinirlerin dorsal kök ganglionlarında yüksek yoğunlukta bulunur. Akut ağrı algısı üzerinde daha düşük etkiye sahiptirler ancak periferdeki kronik ağrı ve nosisepsiyonu modüle etmede daha önemli bir role sahip olabilecekleri düşünüldüğü için güncel farmakolojik araştırmaların önemli bir hedefi olarak görülmektedir (186,211,212).

***oprd* geni** delta opioid reseptörünü kodlayan gendir. Tüm türlerde oprd geni, kromozom üzerinde yaklaşık 32 kb yer kaplar. in situ hibridizasyon ile *oprd1b*' nin yetişkin zebra balığında hipotalamusta, optik tektumun periventriküler katmanında ve serebellumun granüler katmanında güçlü ekspresyonu ortaya koyulmuştur (213).

2.2.4.3.4. Nosiseptin/Orfanin FQ (NOP) Reseptörü

Klasik olmayan NOP reseptörleri, nalokson ile antagonizmaya karşı duyarsızdır. Opioid peptidlere karşı düşük afiniteye sahip olup seçici endojen agonistleri, prepro-N/OFQ' dan türeyen nosiseptin/orfanindir. Beyindeki NOP reseptörlerinin aktivasyonu, hayvan modellerinde hiperaljezi veya anti-opioid etkilere yol açabilmektedir (197,198,214).

oprl1 geni (opioid ilişkili nosiseptin reseptor 1) geni KOR3, NOP, OOR, OPRL, ORL1 şeklinde de isimlendirilmektedir. Nöropeptid bağlanma aktivitesi ve nosiseptin reseptör aktivitesi sergiler. Nöropeptid sinyal yolu ve duyusal ağrı algısında rol oynadığı tahmin edilmektedir. Zebra balıklarındaki oprl1 geni beyin, sindirim sistemi, solungaç, kalp ve kasta eksprese edilir. Bu gen tarafından kodlanan reseptör proteini, G protein-bağlı reseptör ailesinin bir üyesidir ve endojen, opioid ile ilişkili nöropeptid, nosiseptin / orfanin FQ için bir reseptör olarak işlev görür. Bu reseptör-ligand sistemi, stres tepkileri ve anksiyete davranışı, öğrenme ve hafıza, lokomotor aktivite, inflamatuvar ve bağışıklık tepkileri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonu ve nörodavranışı modüle eder.

2.2.5.Ağrı ile ilişkili İyon Kanalları ve Kodlayan Genler

2.2.5.1.TRP Kanalları ve trpa1a geni

Nosiseptif nöronlar, afferent lifler yoluyla periferden viseral, trigeminal ve somatik bölgelere sinyaller gönderir ve ayrıca omuriliği beyne bağlar, böylece merkezi (MSS) ve periferik sinir sistemleri (PSS) arasındaki ağrılı uyaran aktarımında aracı olarak fonksiyon gösterir. Bu nöronlarda, lifler ve somalar boyunca dağılmış çok çeşitli reseptörler ve iyon kanalları eksprese edilir. Bu reseptörler ve iyon kanalları, zararlı uyaranları algılayıp bunları elektrik sinyallerine dönüştürerek MSS'ye yönlendirir (141). Zararlı uyaranları algılayan ve ileten en önemli iyon kanalı ailesi, geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanal ailesidir. Bu aile, seçici olmayan kalsiyum geçirgen kanallar olan proteinleri içerir (**Şekil 2-15**) (215).

Genel olarak TRP kanalları, pH, kimyasal maddeler, sıcaklık ve ozmolaritedeki değişikliklerden çok sayıda uyaranın moleküler sensörleri olarak işlev görür. TRP iyon kanalları ailesi, kanonik (TRPC), vanilloid (TRPV), trpa1a tarafından kodlanan **ankirin (TRPA)**, melastatin (TRPM), polikistin (TRPP) ve mukolipin (TRPML) olarak sınıflandırılan altı alt aileye bölünmüş 28 üyeden oluşur (216). Nosiseptif sinyaller,

doğrudan agonistleri tarafından ve dolaylı olarak proinflamatuar aracılar tarafından aktive edilen TRP iyon kanalları ailesinin bazı üyeleri tarafından tespit edilir.

TRPA1 iyon kanalı, soğuk zararlı uyaranları (örmeğin buzla temas) algılar. TRPA1 kanalının bir alt birimi, transmembran segmentlerini (S1–S6), S5 ve S6 arasında oluşan bir por domeni, geniş amin ucunda (NH_2) bulunan birkaç ankirin tekrarını ve proksimal karboksil ucunda (COOH) bulunan TRP kutusunu gösteren bir alt birimden oluşur. TRPA1 kanalı, ekzojen zararlı bileşiklerin (mustard oil-hardal yağı, allisin gibi) varlığıyla ve doku hasarı veya nörojenik inflamasyon sırasında üretilen endojen bileşikler tarafından etkinleştirildiği için zararlı kimyasal sinyalleri iletir (216).

2.2.5.2. Sodyum İyon Kanalları ve *naV1.6a* (*scn8aa*) geni

Voltaj kapılı sodyum kanalları, aksiyon potansiyeli elektrojenezinde ve nöronlarda iletimin sağlanmasında rol alır. Sodyum kanal / alt birimleri, SCN1A – SCN5A ve SCN8A (zebra balıklarındaki ortoloğu *scn8aa* geni), SCN11A genleri tarafından kodlanan dokuz üyeli (Nav1.1- Nav1.9) bir alt aileden oluşur (217). Alt birimleri benzer yapısal motifleri ve sekans homolojisini paylaşırken, polipeptit sekanslarındaki küçük farklılıklar, farklı voltaj bağımlılıkları, kinetikleri ve farmakolojik özelliklere sahip farklı kanal alt tiplerini meydana getirir (218). NaV1.6 bir sodyum kanalı izoformudur ve ranvier boğumundaki primer voltaj kapılı sodyum kanalıdır ve yoğun olarak burada eksprese edilir. Bunun yanı sıra daha düşük yoğunlukta aksonların distal uçlarında, serebeller granül hücrelerinde ve purkinji hücrelerinde, daha az olarak da miyelinsiz akson ve dentritlerde eksprese edilir (219). Aksiyon potansiyellerinin başlatılmasındaki ve yayılmasındaki rolleri sayesinde, sodyum kanalları nöronların girdi-çıktı ilişkilerini tanımlamada çok önemlidir ve dendritik yanıtların entegrasyonunu, aksiyon potansiyeli eşiğini, patlama süresini ve ateşleme yapısını etkiler. Protein kinaz A ve C' nin fosforilasyonu, sodyum akışını azaltarak sodyum kanallarını modüle eder. Bunun yanı sıra, dopamin ve asetilkolin de fosforilasyon yoluyla hipokampal piramidal nöronlardaki sodyum akışını azaltır. Benzer şekilde prefrontal korteksteki serotonin reseptörleri, sodyum akımlarını azaltmak için protein kinaz C ile module edilir. Kanallardaki bu fosforile düzenleme ile inaktivasyonda yavaşlama meydana gelir. Bununla birlikte, fosforilasyonun meydana geldiği Ser573 ve Ser687 amino asit kalıntılarındaki fosforilasyon bölgeleri NaV1.6 kanalları hariç diğer sodyum kanallarında bulunur. Bu nedenle NaV1.6 kanalları yeterli protein kinaz bölgeleri içermez. Serin

kalıntılarının olmaması sebebiyle inaktivasyon hızlanır ve bunun ardından hızlı bir şekilde kanalların ateşlenmesine yol açar (219).

2.2.5.3. Asit Kanalları ve *zasic1.1, zasic1.2, zasic1.3* genleri

Asit algılayan iyon kanalları (ASIC'ler), hücre dışı H^+ tarafından aktive edilen Na^+ kanallarıdır. Merkezi sinir sisteminde H^+, diğer transmitter moleküllerle birlikte salınır. Bunun nedeni sinaptik veziküllerin asidik pH'da olmasıdır (pH:5,7). Böylece, ASIC'ler uyarıcı reseptörler olarak işlev görebilir. İnflamasyon sırasında, hücre dışı H^+ konsantrasyonu da önemli ölçüde artabilir. ASIC' ler bu nedenle periferik sinir sistemindeki ağrılı uyaranların algılanmasına katkıda bulunmuş olur (220). Zebra balıklarında asit kanallarını kodlayan genler *zasic1.1, zasic1.2, zasic1.3* şeklindedir.

2.2.6.Zebra Balıklarında Opioid Sistemi

Zebra balıkları *(Danio rerio)* Himalaye bölgesinde yaşayan tropikal tatlı su balıklarıdır ve insan genlerinin % 71,4' ü ve hastalığa neden olan insan proteinlerinin % 82' si zebra balıklarında ortologa sahiptir (221). Zebra balığı embriyosu şeffaf olması sebebiyle embriyonik gelişimi döllenmeden itibaren 5 gün boyunca mikroskop altında gözlemlenebilmektedir (**Şekil 2-17**). Son yıllarda, zebra balığı moleküler biyoloji, genetik, gelişimsel biyoloji, sinirbilim ve farmakoloji araştırmaları için umut verici yeni bir omurgalı model organizması haline gelmiştir (222). Zebra balığı modellerinin avantajları arasında genetik izlenebilirlik, dış döllenme, yüksek doğurganlık, küçük boyut, düşük maliyet ve kolay bakım yer alır (223).



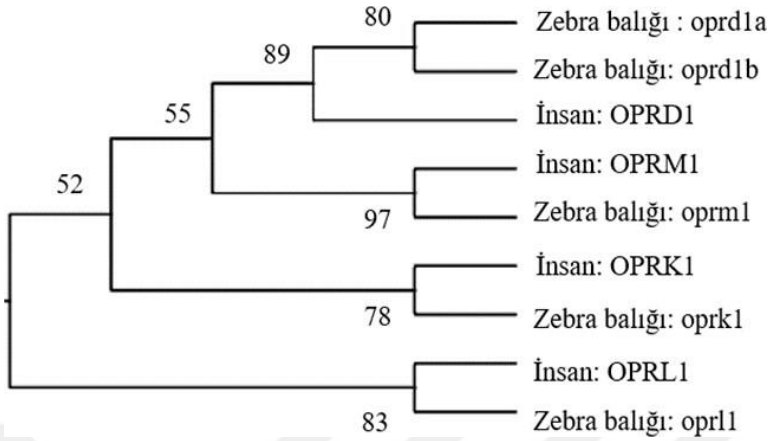
a b c

Şekil 2- 13: Zebra balığı

a) Koryonda zebra balığı embriyosu (24hpf), b) Zebra balığı larvası (72hpf), c) Yetişkin Zebra balığı (yaklaşık 18 aylık)

İnsan opioid reseptör genleri, zebra balığı genomunda karşılığı bulunmaktadır. İnsan ORPM1, OPRK1, OPRL1 genleri için *tek homologlar* ve insan OPRD1 geni için bir çift homolog vardır. İnsan ve zebra balığında kodlanmış protein dizileri arasında, insan

protein dizisinin ortalama % 87' sini (% 77-100 aralığı) kapsayan ortalama % 72 (% 64-77 aralığı) aynı protein kalıntısı vardır(210) (**Tablo 2-1**).



Şekil 2- 14: İnsan ve zebra balığı opioid reseptörlerini kodlayan proteinlerin dizi ilişkisini gösteren filogenetik diagram

Dört insan opioid reseptör geninin tümü en az bir zebra balığı ortoloğuna sahiptir (210). (Klee 2012' den modifiye edilmiştir.)

Tablo 2- 1: İnsan ve zebra balığı opioid reseptör genlerinin benzerlik oranları

İnsan gen sembolü	Zebra balığı gen sembolü	Benzerlik (%)	Aralığı (%)
OPRM1	oprm1	75	90
OPRD1	oprd1a	76	77
OPRD1	oprd1b	77	77
OPRK1	oprk1	68	100
OPRL1	oprl1	64	91

Tüm insan opioid genleri için, zebra balığı genomu, insan OPRD1, PENK, POMC ve PNOC genleri için çift a/b ortologları olan en az bir homologa sahiptir. Bu nedenle, zebra balığı opioid sistemi, genomlarında her gen kategorisi için tek bir ortologa sahip olan insanlar ve diğer omurgalılara (örneğin fareler, sıçanlar ve tavuklar) kıyasla biraz daha karmaşıktır. Zebra balıklarında *dop* geni oprd1a'nın keşfinden bu yana, bu türdeki diğer opioid reseptörleri ve propeptid genleri karakterize edilmiştir (224). Çeşitli genom

dizileme yöntemleri, zebra balığı da dahil olmak üzere çeşitli omurgalı türlerinde opioid sistem genlerinin kapsamlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır (225,226). **Şekil 2-18**'deki filogenetik ağaçta gösterildiği gibi, zebra balıklarındaki opioid reseptör homologları, ilgili insan genlerinde yüksek bir oranda eşleşmektedir. İnsandaki OPRD1 geninin Zebra balığındaki karşılığı *orpd1a* ve *oprd1b* genleridir. Bu genlerin sekans uzunlukları yüksek derecede sekans benzerliğine sahiptir. Buna rağmen çalışmalar, paralogların reseptörlere, agonistlere ve antagonistlere karşı farklı yanıtlara sahip olduğunu ve aynı zamanda farklı ekspresyon modelleri gösterdiğini belirtmiştir (213,227).

Zebra balığı opioid reseptörlerinin farmakolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Tüm klasik reseptörler DOPa/b, MOP ve KOP (sırasıyla *oprd1a*, *oprd1b*, *oprm1* ve *oprk1* genleri tarafından kodlanır), doygunluk bağlanma deneylerinde seçici olmayan opioid ligand [3H]-diprenorfin için yüksek afinite göstermiş ve bağlanma deneylerindeki çeşitli opioid ligandları bağlı [3H]-diprenorfinin yerini almıştır (213,228–231). Zebra balığı klasik opioid reseptörleri, memelilerdeki seçici olmayan ligandlar için benzer bir bağlanma profilini paylaşırken, memelilerde oldukça seçici olan ligandlar için genellikle daha düşük bir afinite gösterir (232).

2.2.7.1. Hayvanlarda Ağrı Modeli Oluşturulması

Hayvanlarda ağrı modeli oluşturulurken kimyasal, termal ve mekanik zararlı uyaranlar kullanılmaktadır. Termal zararlı uyaran olarak ısı ve soğuk maruziyeti kullanılırken mekanik uyaranlar çeşitli elektriksel düzenekler kullanılmaktadır.

Hayvanlarda kimyasal zararlı uyaran olarak asetik asit (233), CO_2 (234), formalin (235) kullanılarak ağrı modeli oluşturulabilmektedir. Bu kimyasallar intraperitonel, subkutan veya dudak kenarına (236–238) enjeksiyon şeklinde hayvana verilebilmesinin yanı sıra balıklarda akvaryum suyuna ilave edilerek de maruziyet uygulanabilmektedir. Kimyasal maruziyetin ardından hayvanlarda davranış testleri (Writhing testi) yapılarak ağrı oluşumu gözlenir. Asetik asit ya da formalinin intraperitonel olarak verildiği hayvanlarda (sıçan, fare, balık) Writhing testi ile yapılan analizler sonucu karın kısmından içe doğru bir kıvrılma gözlenir. Bunun yanı sıra hayvanın ağız kısmına yakın bölgelere bu kimyasalların enjeksiyonu ile balıklarda yapılan çalışmalarda balıkların enjeksiyon sonrası suyun yüzeyine yakın yüzme davranışı sergiledikleri ve suyun üst kısmında daha uzun süre vakit geçirdikleri bildirilmiştir.

Ağrı modeli oluşumunda son yıllarda zebra balıkları da kullanılmaya başlanmıştır. Zebra balıkları hem ağrı modeli oluşturulmasında hem de ağrının izlenmesinde kolaylık sağlayan bir türdür. Ağrı oluşumu için genellikle asetik asit, formalin, sitrik asit gibi kimyasallar kullanılmasının yanı sıra elektrotlarla (patch clamp gibi) uyarım yapılarak da ağrı oluşumu sağlanmaktadır (239,240). Sneddon (2019) zebra balıklarında ağrı oluşturmak amacıyla asetik asidi farklı dilüsyonlarda (%10, %5, %2.5, %1) uygulayarak doza bağlı olarak asetik asidin zebra balığında oluşturduğu ağrıyı değerlendirmiştir (241). Costa ve ark. (2019) yaptığı bir çalışmada asetik asit, enjeksiyonundan sonra 25-30 dakika boyunca sürdürülen vücut eğrilik indeksinin arttığını gözlemiştir (233). Maksimum yanıt enjeksiyondan sonraki ilk 6 dakika içinde gözlendiğinden, tüm davranışlar bu sürede analiz edilmiştir. Ayrıca, Ağrı algısının altında yatan nörokimyasal mekanizmalar kemirgenlerde ve insanlarda cinsiyetler arasında farklılık gösterse de zebra balığına asetik asit i.p. olarak uygulandığında ağrıya yanıtta cinsiyete bağlı bir farklılık görülmediği bildirilmiştir (233). Reilly ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, sazangillerin (Cyprinus carpio) dudaklarına asetik asit enjeksiyonunun "sallanma (rocking)" davranışı meydana getirdiğini ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörünün ifadesini değiştirdiğini göstermişlerdir (242,243). Maximino ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada zebra balıklarına asetik asit enjekte edildiğinde balıkların yüzmelerinde düzensizliğin arttığını ve kuyruk hareketinin değiştiğini bildirmiştir (239).

2.3. Oksidan-Antioksidan Sistem Parametreleri

2.3.1. Lipit Peroksidasyonu (LPO)

Lipit peroksidasyonu çapraz bağlı lipit-lipit ve lipit-protein bağlantılarının oluşumuna ve bunun sonucunda da membran bütünlüğünün ve akışkanlığının bozulmasına neden olur. Membran bütünlüğünün bozulması sonucu mitokondride gerçekleşen elektron transport zincirinin indirgen eşleniklerinin ATP' ye çevrilme kabiliyetinde azalma meydana gelir. Böylece ROS üretimine sebep olur (244). Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler (malondialdehit, 4-hidroksinonenal gibi) biyolojik olarak aktiftir. Bu ürünler ya hücrede metabolize edilir ya da hücrenin diğer kompartmanlarına yayılarak hasara yol açar. MDA (malondialdehit), lipit peroksidasyonu sonucu ençok oluşan üründür ve lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi bir korelasyona sahiptir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda aşırı MDA üretimi oksidatif

stresin bir göstergesi olarak Parkinson, Alzheimer hastalığı, kanser, kardiovasküler hastalıklar gibi farklı patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir (245).

2.3.2. Nitrik oksit (NO)

NO merkezi sinir sisteminde birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Beyin dokusunda glutamat reseptörleri ile etkileşimde olan NMDA ile uyarılan nöronlar endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olan NO' yu sentezlerler. NO glutamat reseptörünü uyararak hücre içerisindeki cGMP konsantrasyonunu artırırlar. Glutamat ile indüklenen bir sinirsel iletimde NO da bir nörotransmitter olarak görev yapar. Yapılan bir çalışmada in vitro spesifik reseptör uyarımından sonra postsinaptik nöronlardan NO salınarak presinaptik olarak nöronları etkilediği ve bununla beraber glutamat salınımının artmasıyla sinaptik geçişlerin arttığı belirtilmektedir. NO' nun koku alma, ağrı algısı ve görme işlevinde de rol aldığı bilinmektedir (246). Nitrik oksit, lipit peroksidasyonunu hem tetikleyebilir hem de inhibe edebilir. Nitrik oksit kendi başına, çoğaltıcı lipit peroksil radikallerini temizleyerek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunun güçlü bir inhibitörü olarak görev yapar. Ek olarak, nitrik oksit, peroksidaz enzimleri gibi lipit peroksidasyonunun birçok potansiyel başlatıcısını da inhibe edebilir. Bununla birlikte, süperoksit varlığında, nitrik oksit, lipit peroksidasyonunu başlatabilen ve lipitte çözünür antioksidanları oksitleyebilen güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Bunun sonucunda çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olarak MDA artışına sebebiyet verir (247).

2.3.3. Glutatyon *S*-transferaz (GST)

GST' nin iki temel fonksiyonu vardır. Birincisi ksenobiyotik metabolizmasında ortaya çıkan reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunun sağlaması, diğeri ise hücre içi transport proteini özelliği ile suda çözünürlüğü az olan bileşikleri bağlayarak hücre içerisinde taşınımını sağlamaktır (248).

2.3.4. Asetilkolin Esteraz Aktivitesi (AChE)

En önemli nörotransmitterlerden biri olan asetilkolin (ACh) Asetil KoA ve lipit metabolizması ürünü olan kolinden meydana gelir. Asetilkolin esteraz (AChE)' ın ACh' yi hidrolizi sonucu kolin ve asetat oluşur. ACh nörotransmisyon sırasında nöronlardan sinaptik boşluğa yayılırak postsinaptik membrandaki reseptörlerine bağlanır ve sinyal oluşturur. Bu sinyal postsinaptik membranda bulunan AChE' nin ACh' yi hidroliz ederek

kolin ve asetata dönüştürmesi ile son bulur. Oluşan kolin nöronlar tarafından alınarak kolin asetiltransferaz' ın kataliziyle asetil KoA ile birleşerek tekrar ACh' yi meydana getirir (249).

2.3.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)

SOD Cu-Zn-SOD, Mn-SOD ve Cu-SOD olmak üzere üç izoforma sahiptir. SOD, reaktif oksijen türleri ve süperoksit anyon radikallerine karşı en iyi antioksiden mekanizmalarından biridir. Organizmada serbest radikalleri substrat olarak kullanan tek enzim olma özelliğine de sahiptir. SOD, süperoksit radikallerinin O_2' ye ve H_2O_2 molekülüne dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Bu dönüşümü katalizlemesi sonucu oksidatif stresin sebep olduğu birçok hastalığa (inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar) karşı savunmada önemli rol oynar (245).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar **Tablo 3-1**' de verilmiştir.

Tablo 3- 1: Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
RT-PCR	Rotor Gene-Q, Qiagen
DNA-RNA izolasyon cihazı	QIAcube, Qiagen
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
Santrifüj	Sigma 1-16K, Sigma
Vorteks	V-1 PLUS, Biosan
pH metre	Hanna HI 2211
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Otomatik pipet	Rainin
Homojenizatör	Tissuelyser LT, Qiagen
Etüv	Nüve EN 400
Manyetik karıştırıcı	Witeg Wisd Hotplate Stirrer MSH
Mikrotom	Thermo Fisher Scientific
Parafin dağıtıcı	Kaplan
Sterio Discovery V8 mikroskop	Zeiss
Görüntüleme Mikroskobu	Olympus BX51
Işık Mikroskobu	CH20, Olympus
Akvaryum	Zebtec mini sistem
Distile su cihazı	Elga Option-Q Ultra saf su sistemi
Buzdolabı	İndesit TAA 12 V
Termostat	EHEIM thermocontrol
Akvaryum hava motoru	EHEIM
Kamera	Canon Zoom Lens 5X IS

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneyler sırasında kullanılan malzemeler **Tablo 3-2'** de verilmiştir.

Tablo 3- 2: Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal	Marka
1-kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB)	ACROS 160511000
4-(2-hidroksietil)-1-piperazineethansulfonik asit (HEPES)	Sigma Aldrich H3375
5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic (DTNB)	Sigma Aldrich
Albumin	Sigma Aldrich A3912
Anti-Met Enkefalin antikor	ABCAM ab22620
Asetik asit	Fisher chemical
Asetilkolintiyoiyodür	Sigma Aldrich
Bakır (III) sülfat	Fisher Chemical C/8600/50
Çinko sülfat heptahidrat	MERCK 1.08883.1000
Dipotasyum hidrojen fosfat	Sigma Aldrich P2222-100G
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma Aldrich 255793-10G
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich 472301
Etanol	MERCK 1009862500
Entellan	Merck, Germany
Folin çözeltisi	Sigma Aldrich F9252
Formaldehit	Sigma Aldrich 252549
Fosfat Tampon Tuzu Tablet (PBS)	Sigma Aldrich P4417-100TAB
Hidroklorik asit	MERCK 1.00317.2500
Sitrat Tamponu pH:6	Bio-Optica

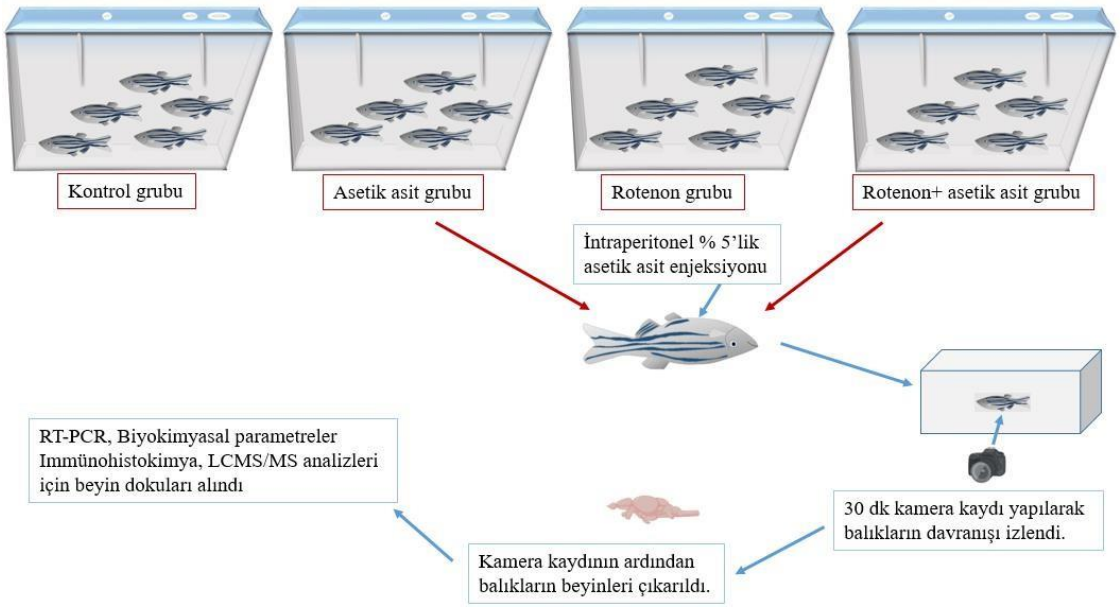
Sodyum Etilendiamin tetraasedik asit (Na-EDTA)	Sigma Aldrich E4884-100G
Sodyum hidroksit	MERCK 1.06482.1000
Sodyum karbonat	MERCK 1.06392.1000
Sodyum klorür	Sigma Aldrich S9888
Sodyum potasyum tartarat	MERCK 1.08087.1000
Sülfanilamid (SULF)	Sigma Aldrich S9251
Tiyobarbürik asit (TBA)	Sigma Aldrich T5500-25G
Tirozin Hidroksilaz Antikor	Immunostar 22941
Toluen	Sigma Aldrich 32249-2,5L
Triklorasetik asit (TCA)	ACROS 421451000
Vanadyum (III) Klorür	ACROS 197000250
L-Glutatyon (GSH)	Sigma Aldrich G4251-5G
Lam positive charged 1.0 mm	HDA
Lamel 22X22 mm	Citoglas/Cover Glass
Mayer	Bio-Optica 05-06002/L
n-bütanol	Fisher Bioreagents B/4800/17
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	MERCK 1.06237.0025
o-dianisin	ACROS 407890050
Parafin	
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma Aldrich P5655-100G
Riboflavin	Fisher Bioreagents BP167-50
Rotenon	Sigma Aldrich 45656-250MG

3.3. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü

Deney öncesinde ve deney sırasında balıklara sabah ve akşam olmak üzere günde 2 defa yem verilmiştir. Günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlığa maruz bırakıldılar. Sıcaklık ve nem sırasıyla 28,5°C ve % 61 olarak ayarlandı. Sıcaklık kontrolü akvaryum için kullanılan özel termostatla (Lutron thermometer Model: MT-917) sağlandı. Suyun pH'sının 7-8 arasında kalması sağlandı. Tanktaki suyun pH' sı günlük olarak kontrol edildi. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon mekanizmaları (EHEIM pickup 60) ile balıkların ortam temizliği sağlandı.

3.4. Grupların Oluşturulması ve Maruziyet Uygulanması

Zebra balıklarının akvaryuma adapte olabilmesi için maruziyetlere başlamadan 1 hafta önce balıklar akvaryuma koyularak akvaryum şartlarına adaptasyonu sağlandı.



Şekil 3- 1: Deneysel aşamalar

Grup 1: Kontrol grubu, 15 adet balıktan oluşmaktadır.

Grup 2: Asetik asit maruziyet grubu, 15 adet balıktan oluşmaktadır.

Grup 3: Rotenon maruziyet grubu, 15 adet balıktan oluşmaktadır.

Grup 4: Rotenon + Asetik asit grubu, 15 adet balıktan oluşmaktadır.

Deneysel süreçte dört grup oluşturulmuştur.

1. grup: Rotenon (5 µg/L)

2. grup: Rotenon (5 µg/L) + Asetik asit (% 5)

3. grup: Asetik asit (% 5)

4. grup: Kontrol

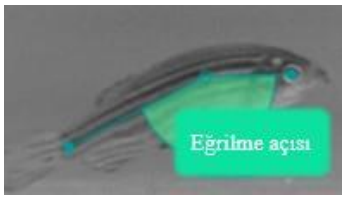
1. ve 2. grup bir ay boyunca rotenona maruz bırakılmışlar. Bir ayın sonunda 2. ve 3. gruba asetik asit maruziyeti yapılmıştır. Maruziyet gruplarındaki balıklar 6 L'lik tanklarda her grupta 15 hayvan olacak şekilde barındırılmışlardır. Tankların herbirinde akvaryumlarında yaşadıkları ortamı oluşturmak için sistem suyu kullanılmış, tank içerisine hava motoru ve ısıyı sabit tutmak amacıyla ısıtıcı konulmuştur.

3.5. Davranış Testleri

Maruziyet süresinin sonucunda zebra balıklarında ağrı modeli oluşumunu incelemek için Writhing testi ve parkinson modelinin oluşumunu gözlemlemek amacıyla lokomotor aktivite izlenmiştir.

3.5.1. Writhing Testi

Asetik aside maruz bırakılan zebra balıklarında ağrı analizi için yapılan bir testtir. Bu test sırasında asetik asit maruziyetinden önce zebra balıkları birer birer tanka bırakıldı ve 30 dakika boyunda kamera kaydı yapıldı. Ardından % 5'lik 5µl asetik asit maruziyeti intraperitonel olarak uygulandı ve 30 dakika boyunca tankın yan yüzüne yerleştirilen kamera ile izlendi. Ağrı oluşumu meydana gelen balıklarda karın kısımlarına doğru kıvrılma gözlenmektedi (233,250–252). Kamera kayıtları toxtrac programı ile analiz edilerek istatistikleri yapıldı.



Şekil 3- 2: Balıkların kinovea programı ile vücutlarının altında kalan alanda eğrilme açısının ölçümü

Zebra balıklarının asetik asit enjeksiyonu sonrası vücutlarındaki kıvrılmayı ölçmek amacıyla Kinovea 8.15 programı kullanıldı. Her bir balığına vücudunda üç nokta baz alınarak ölçüm yapıldı (233,253) (**Şekil 3-2**). Her gruptan 6 zebra balığına Writhing testi uygulandı.

3.5.2. Lokomotor Aktivite

Deney sonunda tüm gruplarda balıkların hareketliliklerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek için lokomotor aktivite ölçüldü. Bu amaçla boyutları (21 cm x 9 cm x 11 cm) ve hacmi (1,5 L) olan tank kullanıldı. Balıkların deney tankında katedilen yol, keşif oranı ve hareket oranı toxtrac programı ile analiz edilerek istatistikleri yapıldı. Her gruptan 6 zebra balığına lokomotor aktivite testi uygulandı.

3.6. Homojenat Hazırlanması

Zebra balıkları ile davranış testleri tamamlandıktan sonra buz tankı ile aneztezi yapılarak beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokuları RT-PCR analizi, biyokimyasal parametreler, LC-MS/MS analizi ve histolojik incelemeler için alikotlandı ve deney yapılacağı zamana kadar -20°C de saklandı.

3.7. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

Beyin dokularında toplam protein seviyesi, protein başına parametrelerin sonuçlarını ifade etmek için Lowry yöntemi kullanıldı. Yagi yöntemi ile tiobarbitürik asit reaktif maddeler olarak lipit peroksidasyonunun (LPO) son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi ölçüldü. Miranda yöntemine göre Nitrik Oksit seviyesi ölçüldü. Süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri, SOD' nin o-dianisidin'in riboflavine duyarlı foto-oksidasyonunun etkisini arttırma kabiliyetine dayanan Mylorie ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak belirlendi. GSH' nin konjugasyonunu katalizleyen Glutatyon-S-Transferaz (GST)' ın aktivitesi Habig yöntemi kullanılarak ölçüldü.

3.7.1. Total protein tayini

Prensip

Bu yöntemde önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik - fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır (254).

Gerekli Çözeltiler

A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g, 0,1 N NaOH); 0,4 g NaOH biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml' ye distile su ile tamamlanır. İki gr sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100 ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır. (Önceden hazırlanır ve plastik şişede, oda sıcaklığında karanlıkta saklanır)

Bakır sülfat çözeltisi (% 1 g) : 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. (Taze hazırlanır)

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (% 2 g): 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. (Taze hazırlanır)

B çözeltisi : %1 g lık Bakır sülfat çözeltisi ile % 2 g lık Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır. (Önceden hazırlanan bu iki çözelti kullanılacağı zaman 1/1 karıştırılarak taze hazırlanır).

C çözeltisi: 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır. (Taze hazırlanır)

Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat. $2H_2O$, 50 ml % 85 g lik fosforik asit, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır ve ardından soğutulur. Üzerine 150 g Li_2SO_4 ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dakika daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla Brom katılır. (Çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik (% 0,9 g NaCl) : 0,9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. (Önceden hazırlanır ve oda sıcaklığında karanlıkta saklanır)

Protein stok standart çözeltisi (% 100 mg lık albumin çözeltisi):100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır. (Önceden hazırlanır ve buzdolabında karanlıkta saklanır)

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 5, 15, 25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır

Deneyin Yapılışı

5 deney tübü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2(St2), standart 3(St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3- 3: Total protein tayininde kimyasal miktarları

	Numune (N)	St1 % 5 mg Albumin	St2 % 10 mg Albumin	St3 % 15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (%100mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku homojenatı (veya süpernatanat)	10 µl	-	-	-	-
Serum fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0.5 ml
Toplam hacim	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Vortekste karıştırılır.					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.					
Folin ayıracı	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilir. 30 dakika sonunda 500 nm de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. Standart grafiği çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

3.7.2. Lipit peroksidasyon (LPO) tayini

Prensip

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir (255).

Gerekli Çözeltiler

NaOH (1 M): 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi 100 ml ye distile su ile tamamlanır. (Taze Hazırlanır, TBA çözeltisi için)

TBA çözeltisi (0,047 M): 500 mg TBA ile 6 ml 1 M lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir. (Önceden Hazırlanır, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklanır)

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1,22 M, 0,6 M HCl deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanır. (Önceden hazırlanır, oda sıcaklığında karanlıkta saklanır)

n-butanol: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı

İki tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3- 4: Lipit peroksidasyon tayininde kimyasal miktarları

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0,25 ml	-
TCA	1,25 ml	-
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0,75 ml	-
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilir		
n-butanol	2 ml	1 ml

İlave edilir, ardından vortekslenir ve 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir.1ml butanol fazı alınarak 532 nm'de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56.10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplanır.

3.7.3. Total nitrik oksid tayini

Elde edilen beyin dokularından hazırlanan homojenatla total nitrik oksit tayini aşağıdaki yönteme göre gerçekleştirildi (256).

Prensip

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülür. Nitritlesülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiaminedihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Gerekli Çözeltiler

0,3 M NaOH çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.

% 10'luk $ZnSO_4$: 5 g $ZnSO_4$ ya da 8,9 g $ZnSO_4.7\ H_2O$ tartılır bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 ml tamamlanır.

1 M HCl: 4,20 ml HCl çekilir ve üzeri distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.

VCl_3: 0,4 g VCl_3 bir miktar 1 M HCl de çözülür ve üzeri aynı çözelti ile 50 ml' ye tamamlanır.

% 5' lik HCl: 5,67 ml % 37'lik HCl çekilir ve üzeri distile su ile 50 ml ye tamamlanır.

%2'lik SULF(Sülfanilamid): 0,5 g Sülfanilamid tartılır, 25ml % 5' lik HCl içerisinde çözülür.

%0,1'lik NEDD(N-(1-Naftil)-etilendiamindihidroklorür): 0,025 g NEDD tartılır. Bir miktar deiyonize suda çözlür ve üzeri deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. 0,3 ml süpernatant alınır, üzerine 0,3 ml 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir. 0,3 ml % 10'luk $ZnSO_4$ ilave edilir. Vortekslenir. +4 ^{0}C 'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Üst faz alınır ve +4'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. İki adet deney tübü anılır, kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3- 5: Total nitrik oksid tayininde kimyasal miktarları

	Numune	Kör
Deprotenize Sıvı	0,3 ml	-
Distile Su	-	0,3 ml
VCl_3	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	0,15 ml

NEDD	0,15 ml	0,15 ml
30 dakika 37°C'de etüvde inkübe edilir.		

Köre karşı 540 nm'deabsorbans kaydedilir. Sonuçlar 53000 M^{-1}/cm^{-1}ekstinsiyon katsayısı ile % µmol cinsinden hesaplanır.

3.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi tayini

Prensip

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin foto-oksidasyon hızındaki artış ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (257).

Gerekli Çözeltiler

Fosfat Tamponu (50 mM, pH = 7,8): 0,136 gram KH_2PO_4 ve 0,697 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. (2^0C de saklanır).

Fosfat tamponu + 0,1 mM lık Na-EDTA: 0,0037 gram Na-EDTA tartılır biraz 50mM lık fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 50 mM lık fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır. (Önceden Hazırlanır, Buzdolabında 2 - 4 ^{0}C'de Karanlıkta Saklanır)

Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7.5): 0,041 gram KH_2PO_4 ve 0,122 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile100 ml'ye tamamlanır. (2^0C de saklanır).

Riboflavin (0,2 mM): 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10mM lık, pH = 7,5) çözülür. (Önceden hazırlanır, buzdolabında 2–4 ^{0}C'de karanlıkta saklanır)

o- dianisin (6 mM): 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözülür. Kullanılacağı zaman süzülür. (Taze hazırlanır ve ışıktan korunur)

Deneyin Yapılışı

% 10 gramlık doku homojenatı 10 dakika 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır tam veya 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alınır.

Tablo 3- 6: Süperoksit dismutaz tayininde kimyasal miktarları

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu EDTAlı (pH = 7,8)	2,6 ml	2,6 ml
o- dianisidin	0,1 ml	0,1 ml
Distile Su	-	0,1 ml
Dilue süpernatant	0,1 ml	-
Her tüpe 30 saniye ara ile 0,2 ml riboflavin konur, vorteksle karıştırılır. Plastik makro küvette 460 nm 'de absorbans okunur		
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dakika inkübe edilir ve 460 nm'de absorbans okunur.		

Not: Lamba 20' önceden açılır ve ısınması sağlanır.

3.7.5. Glutatyon- S- transferaz (GST) aktivitesi tayini

Prensip

GST aktivitesi tayini, GSH ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır (258).

Gerekli Çözeltiler

Sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH= 6,5): 0,534gram $Na_2HPO_4.2H_2O$ ve 2,3 gram KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözülerek birbirine karıştırılır ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. (Önceden hazırlanır, buzdolabında ve karanlıkta 2^0C' de saklanır).

Glutatyon (GSH) (60 mM):1,84 gram glutatyon biraz distile suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır

1-klor-2,4-dinitro-benzen (CDNB) (60 mM) : Absolü etanolde taze hazırlanır. 1,22 gram CDNB tartılır ve biraz etanolde çözülür. Sonra hacmi 100 ml' ye tamamlanır (Taze hazırlanır).

Deneyin Yapılışı

% 10 gramlık doku homojentı 10 dakika 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve 1/40 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş iki tüp alınır ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3- 7: Glutatyon-S-transferaz tayininde kimyasal miktarları

	Numune	Kör
Dilue süpernatant	0,5 ml	-
SF veya Distile Su	-	0,5 ml
Fosfat Tamponu	1,5 ml	1,5 ml
GSH çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
CDNB çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
Distile su	0,90 ml	0,90 ml
Toplam Hacim	3 ml	3 ml

CDNB ve Glutatyonu okuma almadan 1 dakika önce koyulur.

Karıştırılır. 3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm'de (25 ^{o} C) absorbansları izlenir ve kaydedilir. Absorbans artışı hesaplanır. Glutatyon ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstrinksiyon katsayısı 9,6 mM^{-1} x cm^{-1} kullanılarak sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplanır.

3.7.6. Asetilkolin esteraz aktivitesi tayini

Prensip

Asetilkolin esteraz aktivitesi**,** asetilkolin esteraz' ın asetilkolini hidrolizlemesi sonucu kolin ve asetik asit oluşumuna dayanır.

Fosfat Tamponu: (100mM Ph:8.0)

1,070 gr Na_2HPO_4 ve 0,295 gr NaH_2PO4 alınır ve 80 ml distile suda çözülür. pH 8' e ayarlanarak son hacim 100 ml ye tamamlanır.

DTNB: (0,01M) 39,6 mg DTNB 10 ml (0,1M pH:7.0) fosfat tamponunda çözülür. Ardından 15 mg sodyum bikarbonat ilave edilir.

Asetiltiyokolin iyodür: (0,88mM) 12,1 mg asetiltiyokolin iyodür tartılır ve 50 ml distile suda çözülür. (15 güne kadar +4 ^{0}C de saklanabilir)

Beyin Doku homojenatı: % 2,5' luk homojenat 1/400 oranında seyreltilir.

Tablo 3- 8: Asetilkolin esteraz aktivitesi tayininde kimyasal miktarları

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu	1,3 ml	1,3 ml
DTNB	0,05 ml	0,05 ml
Dilüe süpernatant	0,2 ml	-
Absorbanstaki artışın sabitlenmesini beklenir (yaklaşık 15 dakika)		
Asetiltiyokolin iyodür (substrat)	0,010 ml	0,010 ml
Serum fizyolojik	-	0,2 ml

412 nm'de dakika başına 7 dakika boyunca absorbans alınarak Ellman metoduna göre uygulanmıştır (259).

Hesaplama:

$$5,74*(10^{-4})*\Delta A/Co$$

Co: Dokunun ilk konsantrasyonu (mg/ml)

ΔA: Ortalama absorbans farkı

3.8. İmmünohistokimyasal İnceleme

Zebra balıklarından çıkartılan beyin dokuları alınarak doku takibi yapıldı. Dokular alınarak parafine gömüldü ve ardından mikrotom ile doku kesitleri alındı ve IHK için Met-ENK (Met-Enkefalin) ve TH (Tirozin Hidroksilaz) antikorları ile doku kesitlerine muamele edildi ve boyama yapıldı.

Doku takibi yapılabilmesi amacıyla zebra balıklarından alınan beyin dokularına **Tablo 3-9**' deki aşamalar uygulanmıştır. Doku takibinin sonunda beyin dokuları horizontal olarak gömüldü.

Tablo 3- 9: Işık mikroskobu doku takibi aşamaları

% 10'luk nötral tamponlu formaldehit içerisinde (maksimum 24 saat) doku örnekleri fikse edilir.
Dehidratasyon işlemi, doku örnekleri % 70'lik etanolde 15 dakika, % 90'lık etanolde 30 dakika, % 96'lık etanolde 60 dakika % 100'lük etil alkolde 60 dakika (X2) tutularak yapılır.
Şeffaflaştırma işlemi, doku örnekleri Toluen ya da ksilende 30-60 dakika (X2) tutularak yapılır.
İnfiltrasyon işlemi için doku örnekleri 60 ^{0}C etüvde sıvı parafin içinde bir gece tutulur.
Doku örneğinin gömüleceği kalıplara bir miktar erimiş parafin dökülür ve örnek pens yardımıyla tutularak horizontal olarak yerleştirilir.
Örneğin üzerine erimiş parafin dalmatılarak örnek kapatılır ve kurşun kalem ile kaset üzerine kimlik bilgileri yazılır.
Oda sıcaklığında tüm bloklar sertleşene kadar beklenir ve sonrasında kalıplardan çıkartılır.

3.8.1. Parafin Bloktan kesit Alma İşlemi

Doku takibi yapılarak parafin bloklara gömülen beyin dokularından kesit almak için **Tablo 3-10**' teki prosedür izlendi.

Tablo 3- 10: Parafin bloktan kesit alma işlemi

Yaklaşık 40^0C su banyosu açılarak ısınması sağlanır.
Bıçak bıçak tutucusuna yerleştirilir.
Parafin bloğun kenarı, bıçağa paralel ve kesit alınacak yüz bıçağa bakacak şekilde blok tutucuya yerleştirilir.
Parafinin fazlası doku örneği gelinceye kadar trimlenerek uzaklaştırılır.
Doku örneğinden 4 µm kalınlığında kesitler alınır.
Kesitler suluboya fırçası ya da bir iğne ucu yardımıyla su banyosuna alınarak, açılmaları sağlanır.
Lamlar üzerine gerekli bilgiler yazılır.
Lamlar 45°'lik açı ile su banyosuna daldırılarak açılan kesitler lam üzerine alınır.
Lamlar yatay olarak konularak kurumaları sağlanır.
Kesit alınan parafin bloğun yüzeyi sıcak parafin ile kapatılır.
Tüm kesitler 1 gece etüvde 37 ^{0}C' de tutularak lama yapışmaları sağlanır.
Kesitler kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklanabilir.

3.8.2. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

IHK için beyin dokularının gömülü olduğu parafin bloklardan mikrotom (Thermo Fisher) ile 4 mikromluk kesitler alındı. TH ve Met-ENK antikorları ile IHK analizi yapıldı. TH 1/50 dilüsyon ile çalışılırken Met-ENK 1/200 dilüsyon ile çalışıldı. Her iki antikor için de bir gece +4 ^{0}C de inkübasyon yapıldı. IHK yapılmadan bir gece önce parafindeki dokular +60 ^{0}C' de bekletildi ve parafinin çözünmesi sağlandı.

Tablo 3- 11: İmmunohistokimya boyama işlemi basamakları

1.gün	
İşlem sırası	İnkübasyon süresi
% 100 toluende bekleme	2X5 dakika
% 100 etanolde bekleme	2X5 dakika
% 90 etanolde bekleme	2X5 dakika
Distile sudan geçirme (daldır-çıkar)	
% 10 luk sitrat tamponunda mikrodalgada medium modunda şalede tutulma	10 kez 1 dakikalık aralıklarla fokurdama görülene kadar mikrodalgada çevirilir.
Soğutma	~ 20 dakika
H_2O_2 blokajı damlatma	15 dakika
PBS-Triton ile yıkama	3X5 dakika
Protein blokajı damlatma	10 dakika
Pabpen ile kesitler sınırlama	
Primer antikorlar damlatma	1 gece +4 ^{0}C' de
2. gün	
PBS ile yıkama	3X5 dakika
Komplement uygulama (TH için)	10 dakika
PBS ile yıkama	3X5 dakika
Sekonder antikor	30 dakika
PBS ile yıkama	3X5 dakika

DAB uygulama (Haze hazırlanır.)	~ 30 sn
PBS ile yıkama	3X5 dakika
Mayer-Hematoksilen boyaması	2 dakika
Musluk suyunda bekleme	5 dakika
% 90 ve % 100 etanolde bekleme	2X5 dakika
Toluende bekleme	15 dakika
Kapatma	

3.8.3. İmmünohistokimyasal Görüntülerin Analizi

İmmünohistokimya boyamalarının ardından ışık mikroskobu ile görüntüler alındı. Bu görüntülerin düzenlenmesi için Adope Photoshop CS6 programı kullanıldı. Bunun yanı sıra görüntülerin numerik veriye çevrilmesi için fiji imagej programı kullanıldı ve integrated density alınarak veriler istatistiksel analize alındı.

3.9. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR)

Maruziyet sonrası gen ifadeleri analizi için çıkarılan beyin dokuları (her gruptan 5 adet) RLT Lizis tamponu içinde homojenize edildi (Tissue lyser, Qiagen). Bu homojenatlardan mRNA elde edilerek (RNA-easy kit, Qiagene) sonrasında cDNA sentezi yapılmış ve gen ifade düzeyleri RT SYBR Green kiti (Qiagene, Almanya) kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagene, Almanya) ile analiz edilmiştir. cDNA eldesi SuperScript™ IV kiti ile gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek genlerin ifadeleri, RT2 SYBR Green Master Mix karışımına elde edilen cDNA örneklerinin eklenmesi şeklinde Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Housekeeping gen olarak actb1 kullanılmıştır. Örnekler 3 tekrarlı çalışılmıştır. Verilerin analizi house keeping gen β-aktin ile normalizasyona dayalı delta delta CT (ΔΔCT) metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntem ile PCR'da belirlenen eşik değer döngü sayısı (threshold cycle number = Ct), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırılır. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki Ct değer farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip ΔΔCt oranı belirlenerek bulunur. "Housekeeping" genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler. Bu amaçla kullanılan gen

bölgeleri arasında β-aktin, albumin, β-globin, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Çalışmamızda house keeping gen olarak β-aktin kullanılmıştır. Karşılaştırmalı Ct metodu aynı zamanda 2–[delta][delta]Ct olarak bilinmektedir.

RT-PCR analizinde tüm gruplarda *lrrk2, pink1, park2, park7, trpa1, scn8aa, cox1, th, sncga, bdnf, pomca, pomcb, penka, pdyn, zasic 1.1, zasic 1.2, zasic 1.3, oprm1, oprd1b, oprk1* ve *oprl1* genlerinin ekspresyon seviyelerine bakıldı.

3.10. LC-MS/MS ile Nörotransmitter Miktar Tayini

Çalışmamızda dopamin, serotonin, 5-HIAA, DOPAC ve norepinefrin beyin dokusunda düzeyleri LC-MS/MS yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla deney süresi sonunda çıkarılan beyin dokuları serum fizyolojik ile homojenize edildi ve homejenatlar 13,000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Şırınga filtreden süzülen homojenatlarda nörotransmitter ölçümleri LC-MS/MS metodu ile belirlendi. LC-MS/MS ile nörotransmitter miktar tayini için homojenatın kolona yüklenme aşamaları aşağıdaki prosedür uygulanarak yapılmıştır. Öncelikle 0,45 µm naylon filtre kullanılarak numune direkt süzüldü. Ardında süzüntüden 950 µL bir viale aktarıldı ve üzerine 50 µL internal standard eklendi ve son olarak da LC-MS/MS sistemine (Agilent 6470 QQQ) 10 µL numune enjekte edildi. LC-MS/MS Kalibrasyon Aralığı* (ng/ml) 0,05-0,1-0,5-1,0-5,0 *% 0,9 NaCl çözeltisi kullanılarak hazırlandı.

3.11. İstatistiksel Analizi

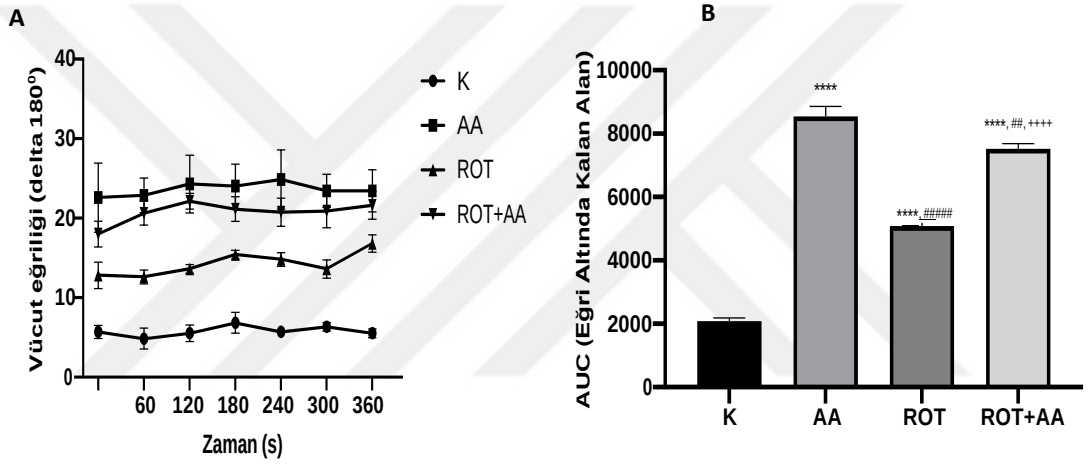
Verilerin istatistiksel analizi One Way Anova sonrası Post Hoc Tukey Çoklu Karşılaştırma Analizi kullanılarak Graph Pad 9 İstatistik programı ile yapılmıştır. Sonuçlar Ortalama±Standart Sapma şeklinde verilmiş ve $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Davranış Analizlerinin Sonuçları

4.1.1. Writhing testi

Zebra balıklarında maruziyet sonrası yapılan davranış testlerinin sonuçlarına göre balıkların asetik asit ile intraperitonel enjeksiyonu sonucunda vücut eğriliği **Şekil 4-1'** de gösterilmiştir. Bunların sonucunda kontrol ile kıyasla AA, ROT ve ROT+AA gruplarında eğri altında kalan alan anlamlı derecede artmıştır. ROT grubunda eğri alanın altında kalan alan AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken, ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır.



Şekil 4- 1: Vücut eğriliği

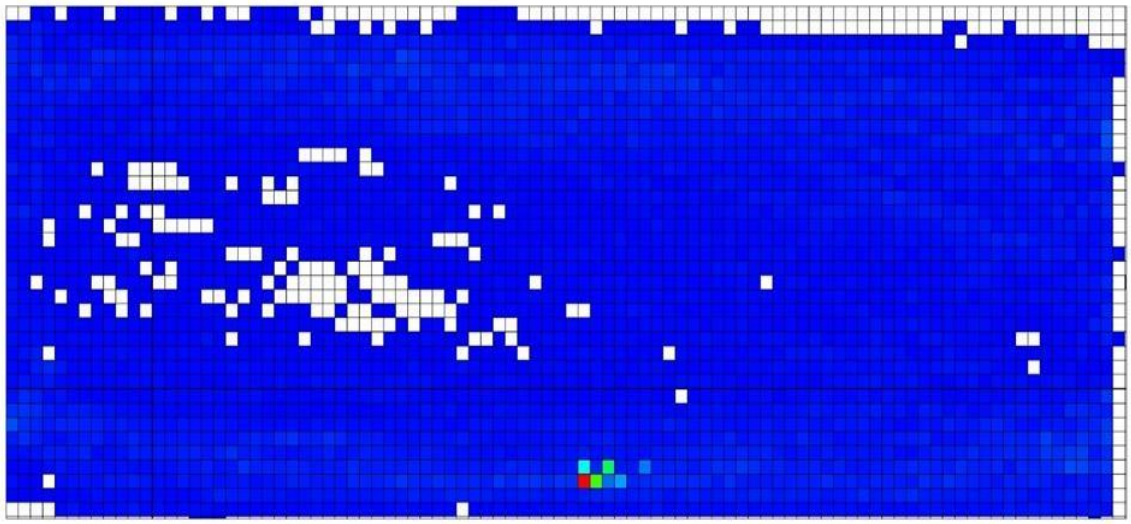
A. Zaman içinde vücut eğrilik indeksindeki değişikliklerin grafiği. Uygulanan ajanların etkileri abdominal daralmaya benzer bir yanıtı temsil eden vücut eğrilik indeksinin ölçülmesi ile değerlendirildi. Vücut eğriliğinin belirlemesi için ön (başın önünde), merkezi (hayvanın vücudunun ortasında) ve bir arka nokta (kuyruk yüzgecinde) olmak üzere 3 nokta seçildi ve kinovea programı ile ölçüldü. Bulunan değerler 180° 'den çıkarılarak delta 180° olarak ifade edildi. **B.** Vücut eğrilik indeksinde belirlenen zamansal değişimler eğri altındaki alan (AUC, Area under the curve) olarak ifade edildi. Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi. **** $p<0,0001$ Kontrolden farklı; #### $p<0,0001$ AA'dan farklı; ## $p<0,01$ Kontrolden farklı ++++ $p<0,0001$ ROT'dan farklı

4.1.2. Lokomotor Aktivite

Maruziyet sonra kamera ile yapılan 30 dakikalık çekimin ardından görüntüler kinovea 8.15 programında düzenlendi ve daha sonra toxtrac ile her gruptan 6 balık olmak üzere analizleri yapıldı.

4.1.2.1. Keşfedilen yol (Exploration Area)

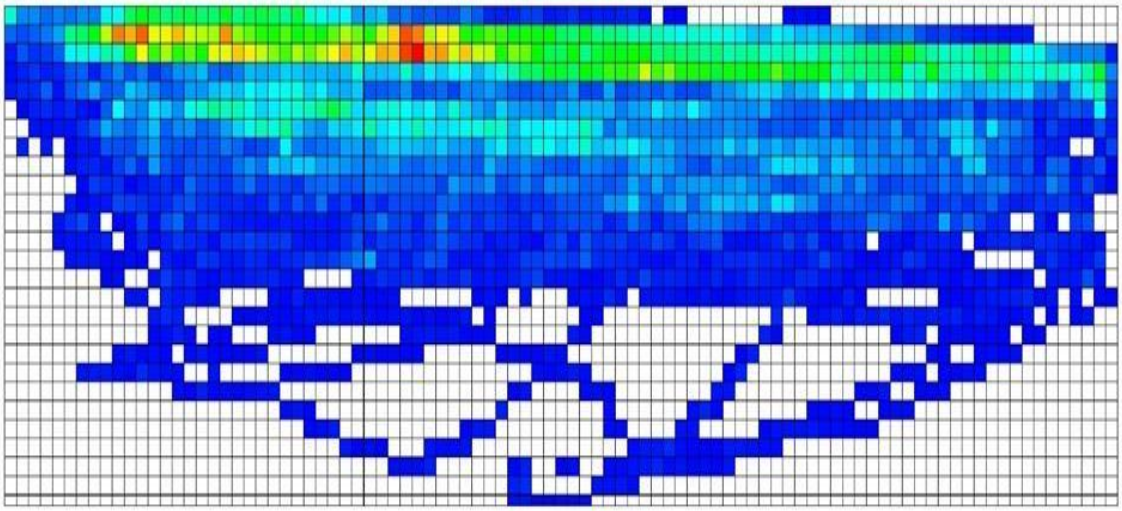
Kontrol grubundaki zebra balıklarında kamera kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları **Şekil 4-2**'de verilmiştir. Bu sonuca göre kontrol grubundaki balıklar tank içerisinde kaldığı süre boyunca tankın tüm alanında yüzme davranışı gösterdiler.



Şekil 4- 2: Kontrol grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi.

Kırmızı ve yeşil renkler en yoğun bulunduğu alanları mavi ve açık mavi renkleri daha az bulunduğu kısımları göstermektedir.

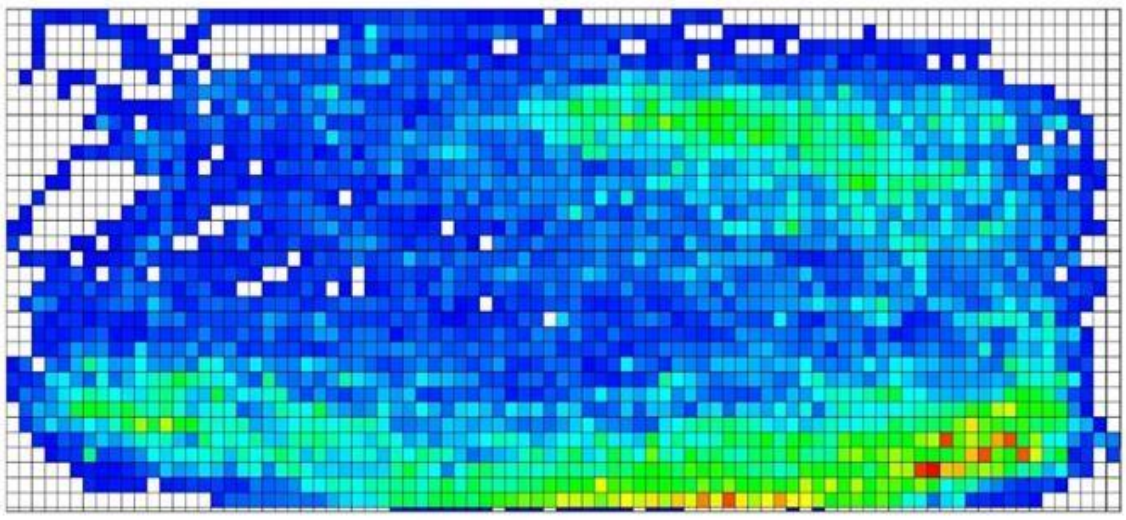
Asetik Asit grubundaki zebra balıklarında kamera kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları **Şekil 4-3**'te verilmiştir. AA grubundaki balıklar tankın yüzeyine yakın yüzme davranışı göstermişlerdir. Balıklar yeşil ve kırmızı renkli alanlarda daha fazla zaman geçirmiştir.



Şekil 4- 3: Asetik asit grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi

İntraperitonel olarak akut asetik aside maruz bırakılan zebra balıklarında kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları verilmiştir.

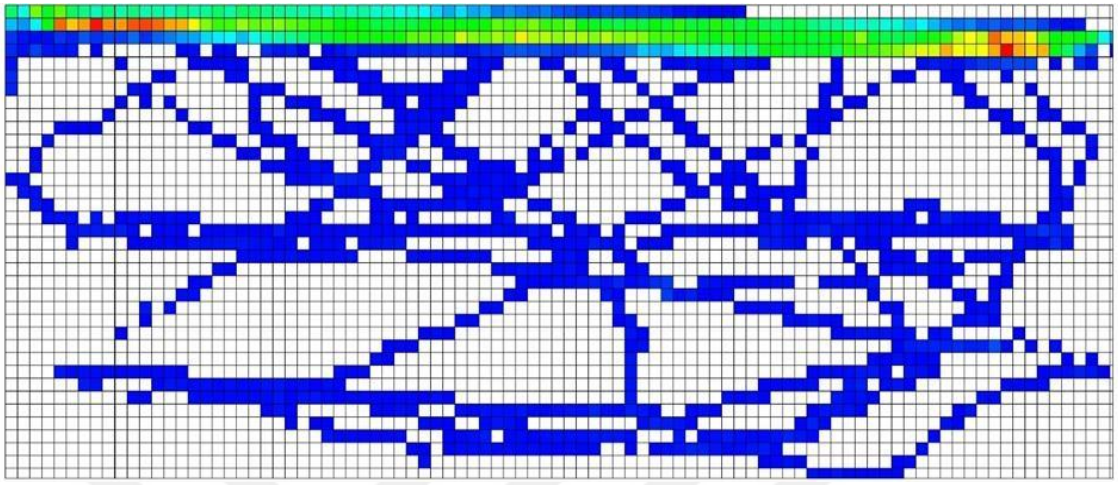
Rotenon grubundaki zebra balıklarında kamera kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları **Şekil 4-4**'te verilmiştir. Rotenon grubundaki balıklar yeşil ve kırmızı renkli alanlarda daha fazla zaman geçirmiştir.



Şekil 4- 4: Rotenon grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi.

Bir ay boyunca rotenona maruz bırakılan zebra balıklarında kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları verilmiştir.

ROT+AA grubundaki zebra balıklarında kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları **Şekil 4-5'** te verilmiştir. ROT+AA grubundaki balıklar kırmız ve yeşil renkli alanlarda daha fazla zaman geçirmiştir.

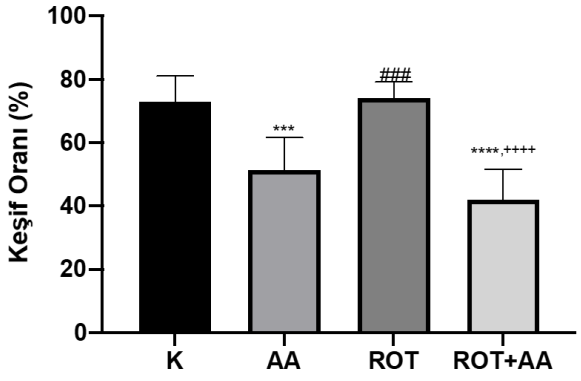


Şekil 4- 5: Rotenon+Asetik asit grubununda bulunan Zebra balıklarının tank içerisinde 20 dakika boyunca kullandıkları alanın piksel olarak gösterimi.

Bir ay boyunca rotenona ve intraperitonel olarak akut asetik aside maruz bırakılan zebra balıklarında kamera kaydı ile tank içerisinde kullanmış olduğu alanların yoğunlukları verilmiştir.

4.1.2.2. Grupların Keşfedilen (Exploration Area) yollarının Karşılaştırılması

Zebra balıklarının 30 dakikalık kamera kayıtları alındıktan sonra toxtrac programı ile yaptığımız analizlerin sonuçları **Şekil 4-6'** da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre AA, ROT ve ROT+AA gruplarının kontrol grubuna kıyasla tankın alanındaki keşif oranlarının anlamlı derecede azaldı. ROT grubunda keşif oranı AA grubuna göre anlamlı derecede arttı. ROT+AA grubunda keşif oranı ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldı.

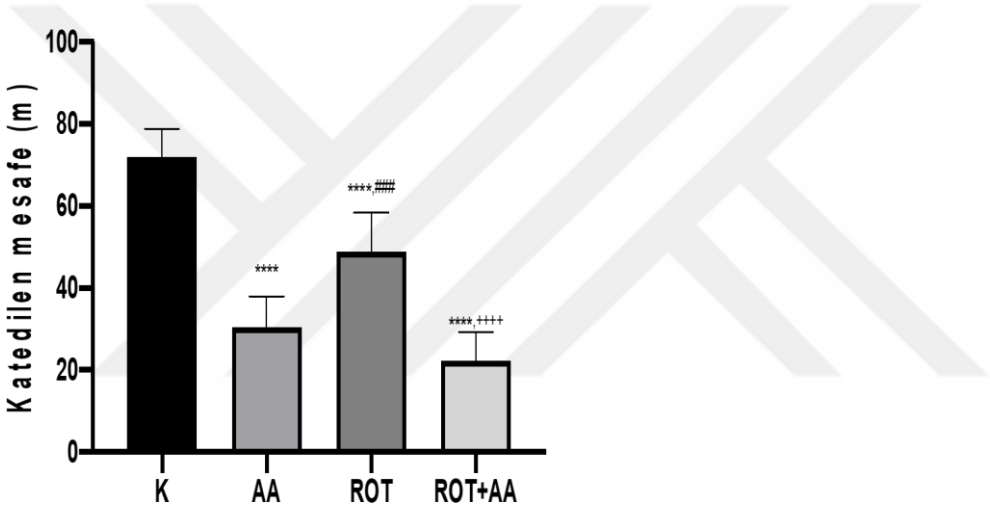


Şekil 4- 6: Keşif oranı

Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi. **** p<0,0001 Kontrolden farklı; *** p<0,001 Kontrol Grubundan farklı #### p<0,0001 AA Grubundan farklı; ++++ p<0,05 ROT Grubundan farklı

4.1.2.3. Katedilen Mesafe

Zebra balıklarında tank içinde bulundukları süre boyunca katedilen mesafeye analiz edildi ve sonuçlar **Şekil 4-7'** de gösterildi. Bu sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla AA, ROT ve ROT+AA grubunda katedilen mesafede anlamlı derecede bir azalma oldu. ROT grubunda katedilen mesafe AA grubuna göre anlamlı derecede arttı. ROT+AA grubundaki katedilen mesafe ROT grubuna göre anlamlı derecede azaldı.

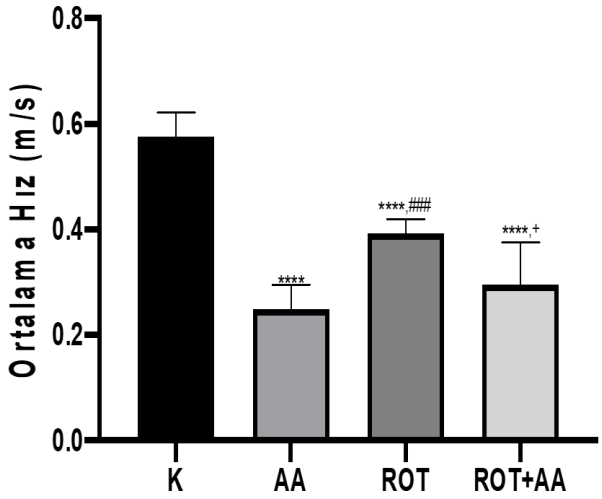


Şekil 4- 7: Katedilen mesafe

Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi. **** p<0,0001 Kontrolden farklı; #### p<0,0001 AA'dan farklı; ## p<0,01 Kontrolden farklı ++++ p<0,0001 ROT'dan farklı

4.1.2.4. Ortalama Hız

Zebra balıklarının tankta bulundukları süre içerisinde ortalam hızlarını analiz sonuçları **Şekil 4-8**' de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrole kıyasla AA, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede azalma görüldü. ROT grubunda ortalam hız AA grubuna göre anlamlı derecede arttı. ROT+AA grubundaki ortalama hız ROT grubuna göre anlamlı derece azaldı.



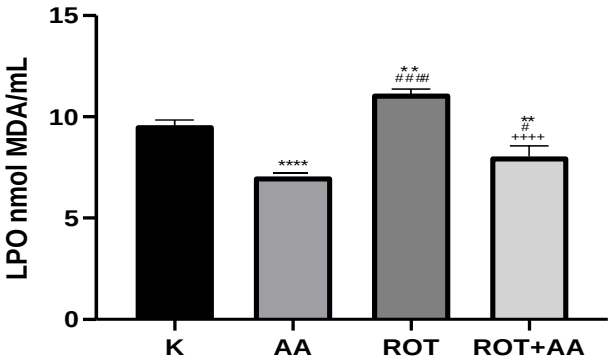
Şekil 4- 8: Ortalama hız

Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi. **** p<0,0001 Kontrolden farklı; #### p<0,0001 AA'dan farklı; ## p<0,01 Kontrolden farklı +p<0,05 ROT Grubundan farklı

4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.2.1. LPO Analiz Sonuçları

Çalışmamızda lipit peroksidasyon (LPO) düzeyleri Yagi'nin metoduna (1984) göre malondialdehit düzeyleri belirlenmek sureti ile ölçülmüştür. Grupların LPO düzeylerinin karşılaştırılması **Şekil 4-9**'da verilmiştir. Buna göre LPO düzeyleri Asetik Asit ve Rotenon+Asetik Asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. LPO düzeyleri, Rotenon grubunda ise kontrol, Asetik Asit ve Rotenon+Asetik Asit gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır.

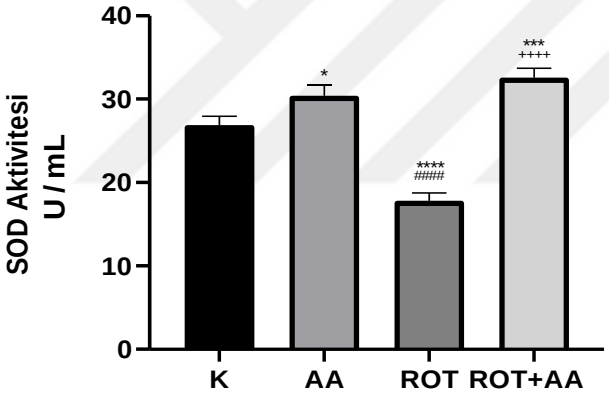


Şekil 4- 9: Grupların Lipit Peroksidasyon düzeyleri

Grupların Lipit Peroksidasyon düzeyleri. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. **** p<0,0001; ** p<0,01 K grubundan farklı; #### p<0,0001; # p<0,05 AA grubundan farklı; ++++ p<0,0001 ROT grubundan farklı. K:Kontrol; AA: Asetik Asit; ROT: Rotenon; ROT+AA: Rotenon+Asetik Asit, MDA: Malondialdehit

4.2.2. SOD Analiz Sonuçları

Grupların Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi düzeyleri karşılaştırılması **Şekil 4-10**' da verilmiştir. SOD aktivitesi Mylori (1986)'nin metoduna göre yapılmıştır. Buna göre SOD aktiviteleri Asetik Asit ve Rotenon+Asetik Asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (p<0,05). SOD aktivitesi, Rotenon grubunda ise kontrol, Asetik Asit ve Rotenon+Asetik Asit gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır (p<0,05). ROT+AA grubunda ise hem Kontrol hem de ROT gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır (p<0,05).



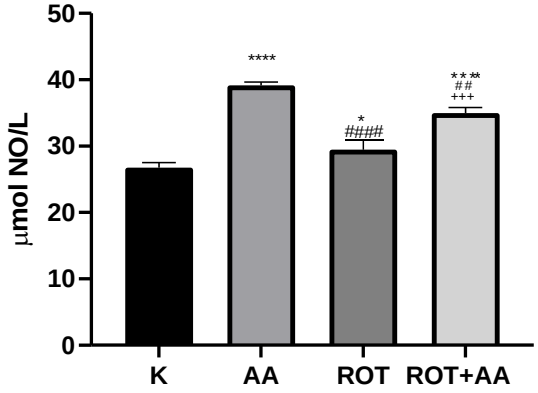
Şekil 4- 10: Grupların Süperoksit Dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Grupların Süperoksit Dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. **** p<0,0001; *** p<0,001; * p<0,05 K grubundan farklı; #### p<0,0001; ++++ p<0,0001 ROT grubundan farklı. K:Kontrol; AA: Asetik Asit; ROT: Rotenon; ROT+AA: Rotenon+Asetik Asit

4.2.3. NO Analiz Sonuçları

Grupların Nitrik oksit analizler Miranda (2001)'in metoduna göre yapılmıştır. Grupların NO düzeyleri karşılaştırılması **Şekil 4-11**'de verilmiştir. Buna göre NO miktarı Asetik Asit, Rotenon ve Rotenon+Asetik Asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (p<0,05). Rotenon grubunda ise NO düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (p<0,05). Ayrıca Rotenon grubunda asetik asit

uygulanması NO düzeylerini Rotenon grubuna göre anlamlı derecede arttırmıştır ($p<0,05$).

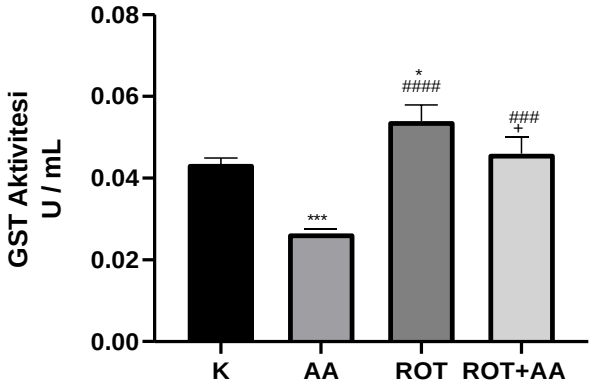


Şekil 4- 11: Grupların Nitrik Oksit düzeyleri karşılaştırılması

Grupların Nitrik Oksit düzeyleri karşılaştırılması. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. **** $p<0,0001$; * $p<0,05$ K grubundan farklı; #### $p<0,0001$; ## $p<0,01$ AA grubundan farklı; +++ $p<0,001$ ROT grubundan farklı. K:Kontrol; AA: Asetik Asit; ROT: Rotenon; ROT+AA: Rotenon+Asetik Asit

4.2.4. GST Analiz Sonuçları

Grupların Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi Habig (1981)'in metdoduna göre yapılmıştır. Grupların GST aktivitesi karşılaştırılması **Şekil 4-12**'de verilmiştir. Buna göre GST aktivitesi Asetik Asit grubunda Kontrol gubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Rotenon grubunda ise Kontrol ve Asetik Asit gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Ayrıca Rotenon grubunda asetik asit uygulanması GST aktivitesini Rotenon grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0,05$).

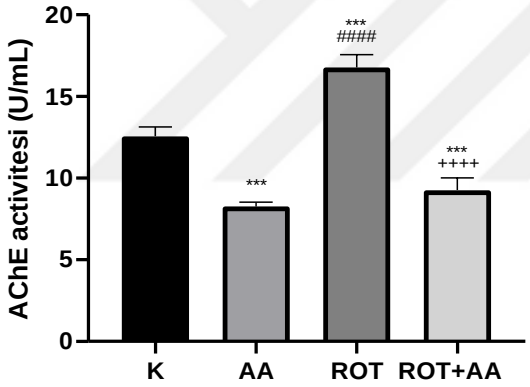


Şekil 4- 12: Grupların Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivitesi karşılaştırılması

Grupların Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivitesi karşılaştırılması. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. *** p<0,001; * p<0,05 K grubundan farklı; #### p<0,0001 AA grubundan farklı; + p<0,05 ROT grubundan farklı. K:Kontrol; AA: Asetik Asit; ROT: Rotenon; ROT+AA: Rotenon+Asetik Asit

4.2.5. Asetilkolin Esteraz Aktivitesi

Grupların Asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) Ellman (1961)'in metoduna göre yapılmıştır. AChE sonuçlarının karşılaştırılması **Şekil 4-13**'te verilmiştir. Buna göre AChE aktivitesi Asetik Asit grubunda Kontrol gubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (p<0,05). Rotenon grubunda ise Kontrol, Asetik Asit ve Rotenon+Asetik Asit gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır (p<0,05). Ayrıca Rotenon grubunda asetik asit uygulanması AChE aktivitesini Rotenon grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır (p<0,05).



Şekil 4- 13: Grupların Asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) karşılaştırılması

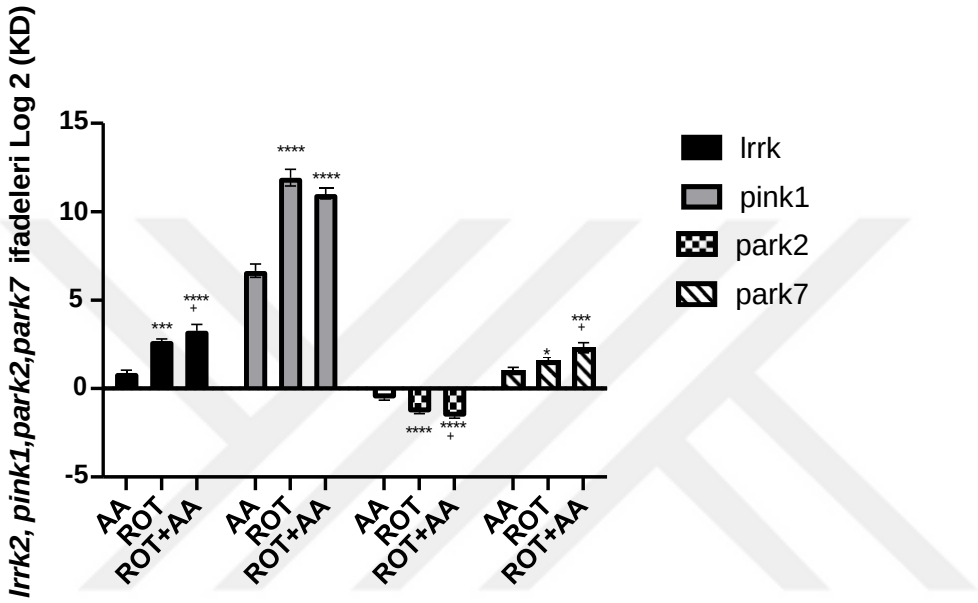
Grupların Asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) karşılaştırılması. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. *** p<0,001 K grubundan farklı; #### p<0,0001 AA grubundan farklı; ++++ p<0,0001 ROT grubundan farklı. K: Kontrol; AA: Asetik Asit; ROT: Rotenon; ROT+AA: Rotenon+Asetik Asit

4.3. RT-PCR Analiz Sonuçları

4.3.1. Parkinson ile İlişkili Genlerin RT-PCR Sonuçları

Zebra balıklarında maruziyet sonrası yapmış olduğumuz RT-PCR analizleri sonucunda parkinson ile ilişkili genlerin ekspresyonunda asetik asit ve rotenon maruziyetler sonrası değişimler gözlemledik. *lrrk, pink1* ve *park7* mRNA ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında AA, ROT ve ROT + AA gruplarında anlamlı

derecede artmıştır. *lrrk* ve *park7* mRNA ekspresyonları ROT grubunda AA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Bunun yanı sıra ROT+AA gruplarında *lrrk* ve *park7* mRNA ekspresyonları ROT grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. *park2* geni ise kontrol ile kıyaslandığında anlamlı derecede AA, ROT ve ROT+AA gruplarında azalmıştır. ROT grubundaki *park2* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla, ROT+AA grubundaki *park2* seviyesi de ROT grubuna kıyasla artmıştır (**Şekil 4-14**).

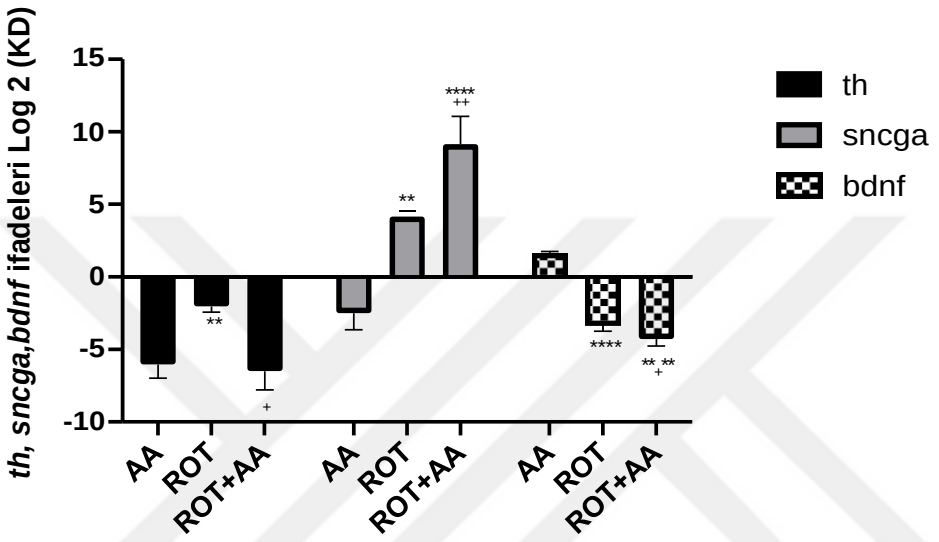


Şekil 4- 14: Parkinson ile ilişkili genlerin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri.
Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen *lrrk2, pink1, park2* ve *park7* kat değişiklikleri grafiği. Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. **** p<0,0001; ** p<0,01; * p<0,05 AA grubundan farklı; + p<0,05 ROT grubundan farklı; AA: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

Parkinson ile ilişkili olan *th, sncga* ve *bdnf* genleri ile yapılan RT-PCR analizlerinin sonuçları **Şekil 4-15'** te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *th* mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla AA, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. ROT grubunda AA grubuna kıyasla *th* mRNA ekspresyonunda anlamlı derecede artış vardır. ROT+AA grubunda ise *th* mRNA ekspresyonu AA ve ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır.

sncga geninin ekspresyonu kontrolle kıyaslandığında AA grubunda azalırken ROT ve ROT+AA grubunda anlamlı derecede artmıştır. ROT grubunda *sncga* mRNA

ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede artarken ROT+AA grubundaki *scnga* mRNA ekspresyonu ROT grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. *bdnf* mRNA ekspresyonu kontrol ile kıyaslandığında AA grubunda artarken ROT ve ROT+AA grubunda anlamlı derecede azalmıştır. ROT grubund *bdnf* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken ROT+AA grubundaki *bdnf* mRNA ekspresyonu AA ve ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır.



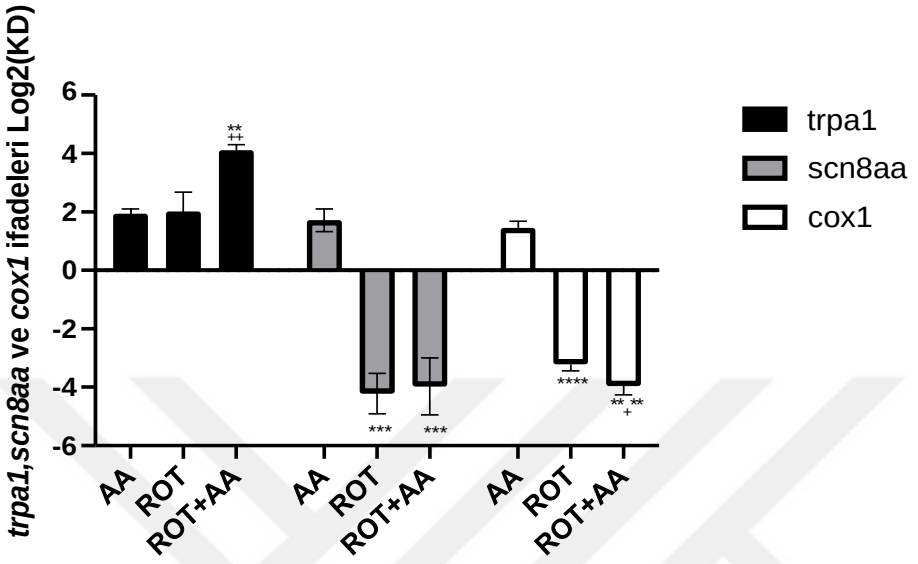
Şekil 4- 15: Parkinson ile ilişkili th, sncga, bdnf genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri.

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen *th, sncga ve bdnf* kat değişiklikleri grafiği. Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. **** p<0,0001; ** p<0,01 AA grubundan farklı; $^{++}$ p<0,01; $^{+}$ p<0,05 ROT grubundan farklı AA grubundan farklı, AA: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

4.3.2. Ağrı ile İlişkili Kanalların RT-PCR Sonuçları

Ağrı ile ilişkili genlerin ekspresyonuna baktığımız RT-PCR analizleri sonuçları **Şekil 4-16'** da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *trpa1* mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla AA, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede artmıştır. ROT+AA grubunda trpa1 mRNA ekspresyonu ise AA ve ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır. *scn8aa* mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla AA grubunda artarken, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. ROT ve ROT+AA gruplarındaki *scn8aa* mRNA ekpresyonları ise AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. *cox-1* mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla AA grubunda artarken, ROT ve ROT+AA

gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. ROT ve ROT+AA gruplarında *cox-1* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalma olmuştur.

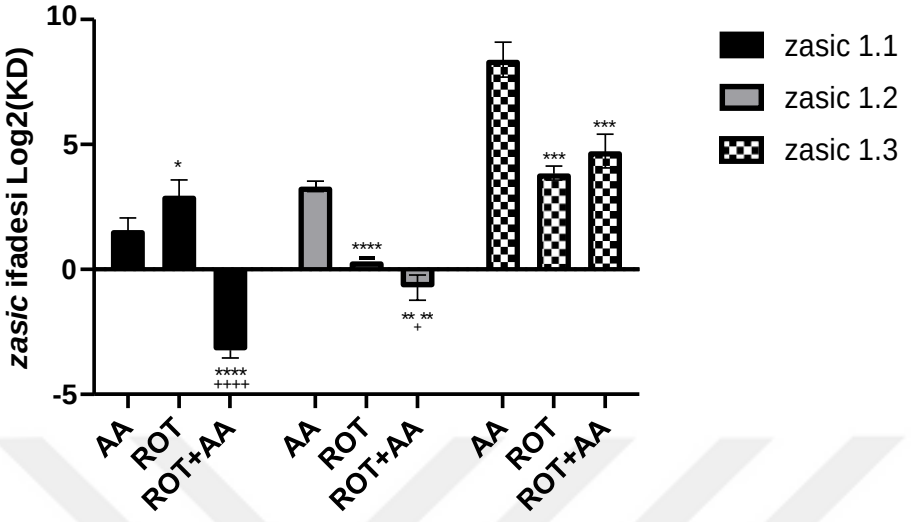


Şekil 4- 16: Ağrı ile ilişkili trpa1, scn8aa ve cox-1 genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen *trpa1* ve *scn8aa* ve *cox-1* kat değişiklikleri grafiği. Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. *** p<0,001; ** p<0,01 AA grubundan farklı; $^{++}$ p<0,01; $^{+}$ p<0,05 ROT grubundan farklı, AA:Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

Ağrı ile ilişkili zasic genlerinin ekspresyonlarına RT-PCR analizlerinin sonuçları **Şekil 4-17'** de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *zasic 1.1.* mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre AA ve ROT grubunda anlamlı derecede artarken, ROT+AA grubunda ise anlamlı derecede azalmıştır. ROT grubunda *zasic 1.1.* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede artarken, ROT+AA grubundaki *zasic 1.1.* mRNA ekspresyonu AA ve ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. *zasic 1.2* mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre AA ve ROT grubunda anlamlı derecede artarken, ROT+AA grubunda anlamlı derecede azaldı. ROT grubunda *zasic 1.2* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken ROT+AA grubundaki *zasic 1.2* mRNA ekspresyonu AA ve ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. *zasic 1.3.* mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre AA, ROT ve ROT+AA gruplarında

anlamlı derecede artarken, ROT ve ROT+AA gruplarındaki *zasic 1.3.* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır.

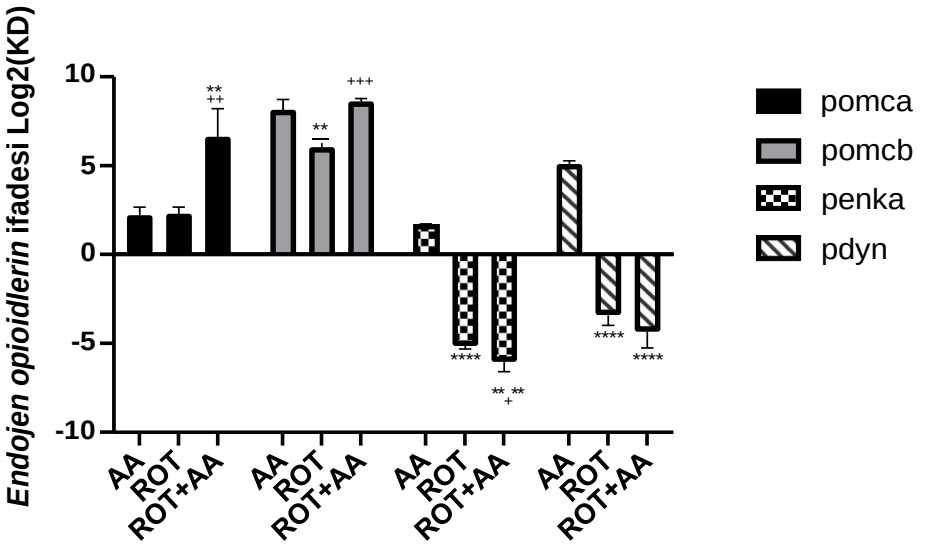


Şekil 4- 17: Ağrı ile ilişkili zasic1.1., zasic 1.2 ve zasic 1.3 genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen *zasic 1.1, zasic 1.2, zasic 1.3* kat değişiklikleri grafiği. Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. **** p<0,0001; *** p<0,001; * p<0,05 AA grubundan farklı; $^{+}$ p<0,05; $^{++++}$ p<0,0001 ROT grubundan farklı AA: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

4.3.3. Ağrı ile İlişkili ile Endojen Opioid Genlerinin RT-PCR Sonuçları

Ağrı ile ilişkili endojen opioid genlerinin RT-PCR analizleri sonucunda elde ettiğimiz veriler **Şekil 4-18'** de gösterilmiştir. Bu verilere göre kontrole kıyasla *pomca* ve *pomcb* mRNA ekspresyonları AA, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede artmıştır. ROT+AA grubunda *pomca* mRNA ekspresyonu AA ve ROT gruplarına kıyasla anlamlı derecede artmıştır. *pomcb* mRNA ekspresyonu ROT grubunda AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken, ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır. *penka* ve *pdyn* mRNA ekspresyonları ROT ve ROT+AA gruplarında kontrole kıyasla azalırken AA grubunda artmıştır. *penka* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla ROT grubunda anlamlı derecede azalırken, ROT+AA grubunda AA ve ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. *pdyn* mRNA ekspresyonu ise ROT ve ROT+AA gruplarında AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır.

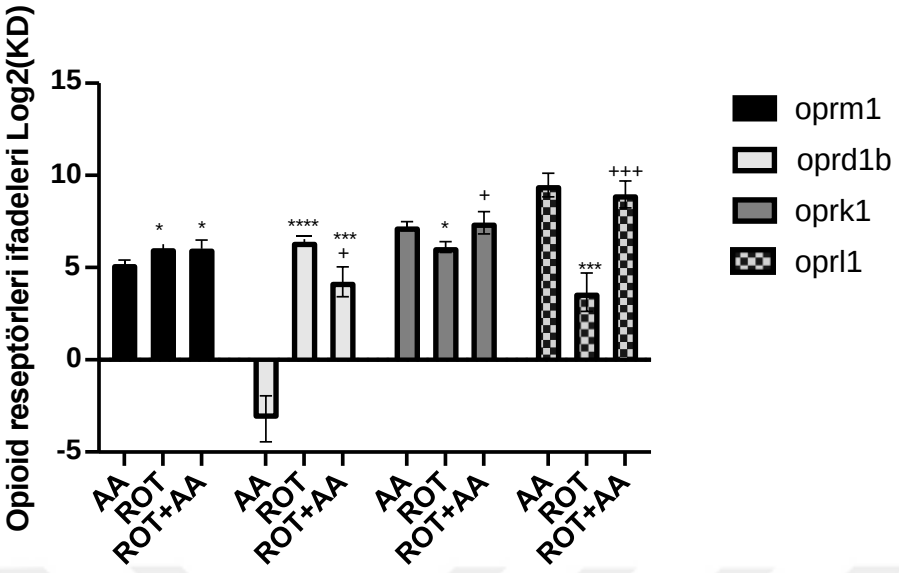


Şekil 4- 18: Ağrı ile ilişkili pomca, pomcb, penka, pdyn endojen opioid genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri.

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen *pomca, pomcb, penka* ve *pdyn* kat değişiklikleri grafiği. Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. **** p<0,0001; ** p<0,01; * p<0,05 AA grubundan farklı; $^{+}$ p<0,05; $^{++}$ p<0,01; $^{+++}$ p<0,001 ROT grubundan farklı; AA: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

4.3.4. Ağrı İle ilişkili Opioid Reseptör Genlerin RT-PCR Sonuçları

Ağrı ile ilişkili opioid reseptör genlerini RT-PCR ile analiz sonuçları **Şekil 4-19'** da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *oprm1, oprk1* ve *oprl1* mRNA ekspresyonları kontrole göre AA, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede artmıştır. *oprm1* mRNA ekspresyonu ROT ve ROT+AA gruplarında AA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır. *oprd1b* mRNA ekspresyonu kontrole göre AA grubunda anlamlı derecede azalırken, ROT ve ROT+AA grubunda artmıştır. ROT grubunda *oprd1b* mRNA ekspresyonu AA grubuna kıyasla anlamlı derecede artarken ROT+AA grubunda AA grubuna kıyasla artmış, ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. *oprk1* mRNA ekspresyonu ROT grubunda AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede arrtmıştır. *oprl1* mRNA ekspresyonu ROT grubunda AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalırken, ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır.



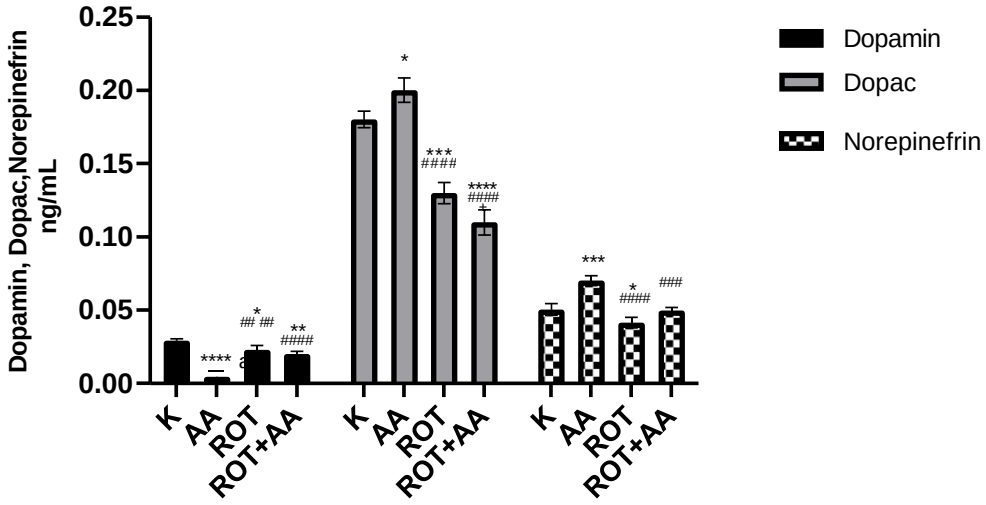
Şekil 4- 19: Ağrı ile ilişkili oprm1, oprd1b, oprk1, oprl1 genlerinin maruziyet sonrası ekspresyon seviyeleri

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen *oprm1, oprd1b, oprk1 ve oprl1* ifadeleri kat değişiklikleri grafiği. Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. **** p<0,0001; *** p<0,001; * p<0,05 AA grubundan farklı; $^{+}$ p<0,05; $^{+++}$ p<0,001 ROT grubundan farklı, AA: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

4.4. LC-MS/MS Analiz Sonuçları

4.4.1. Dopamin, Dopac ve Norepinefrin Analiz Sonuçları

Zebra balıklarında yaptığımız maruziyet sonrası elde ettiğimiz beyin homojenatları ile yapılan LC-MS/MS analizleri sonucuna göre kontrole göre AA, ROT ve ROT+AA gruplarında dopamin seviyeleri anlamlı derecede azalmıştır. Dopac seviyeleri kontrol grubuna göre AA grubunda artarken, ROT ve ROT+AA gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. ROT ve ROT+AA grubunda Dopac seviyeleri kontrol ve AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. AA grubunda Dopac seviyesi kontrole kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Norepinefrin seviyelerine bakıldığında AA grubu kontrole kıyasla anlamlı derecede artarken, ROT grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. asetik asit grubunda artış olurken ROT grubunda anlamlı derecde azalma görülmüştür. ROT ve ROT+AA gruplarında ise AA grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır.

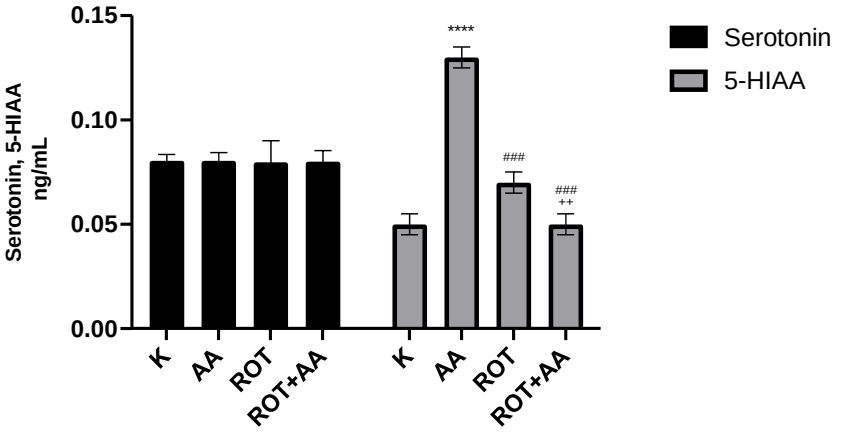


Şekil 4- 20: Maruziyet sonrası zebra balıklarının beyin dokularında Dopamin ve Dopac düzeyleri.

Grupların Dopamin, Dopac ve Norepinefrin düzeyleri **** p<0,0001; *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 K grubundan farklı; #### p<0,0001; ### p<0,001 AA grubundan farklı; AA: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

4.4.2. Serotonin ve 5-HIAA Analiz Sonuçları

LC-MS/MS analizleri sonucu zebra balıklarının beyin dokularında serotonin ve 5-HIAA seviyelerindeki değişimler **Şekil 4-21'** de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre serotonin seviyelerinde gruplar arasında anlamlı derecede bir fark görülmemiştir. 5-HIAA seviyeleri kontrole göre AA ve ROT gruplarında kontrole kıyasla anlamlı derecede artarken, ROT grubunda AA grubunda kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. ROT+AA grubunda 5-HIAA seviyeleri AA ve ROT gruplarına kıyasla anlamlı derecede azalmıştır.



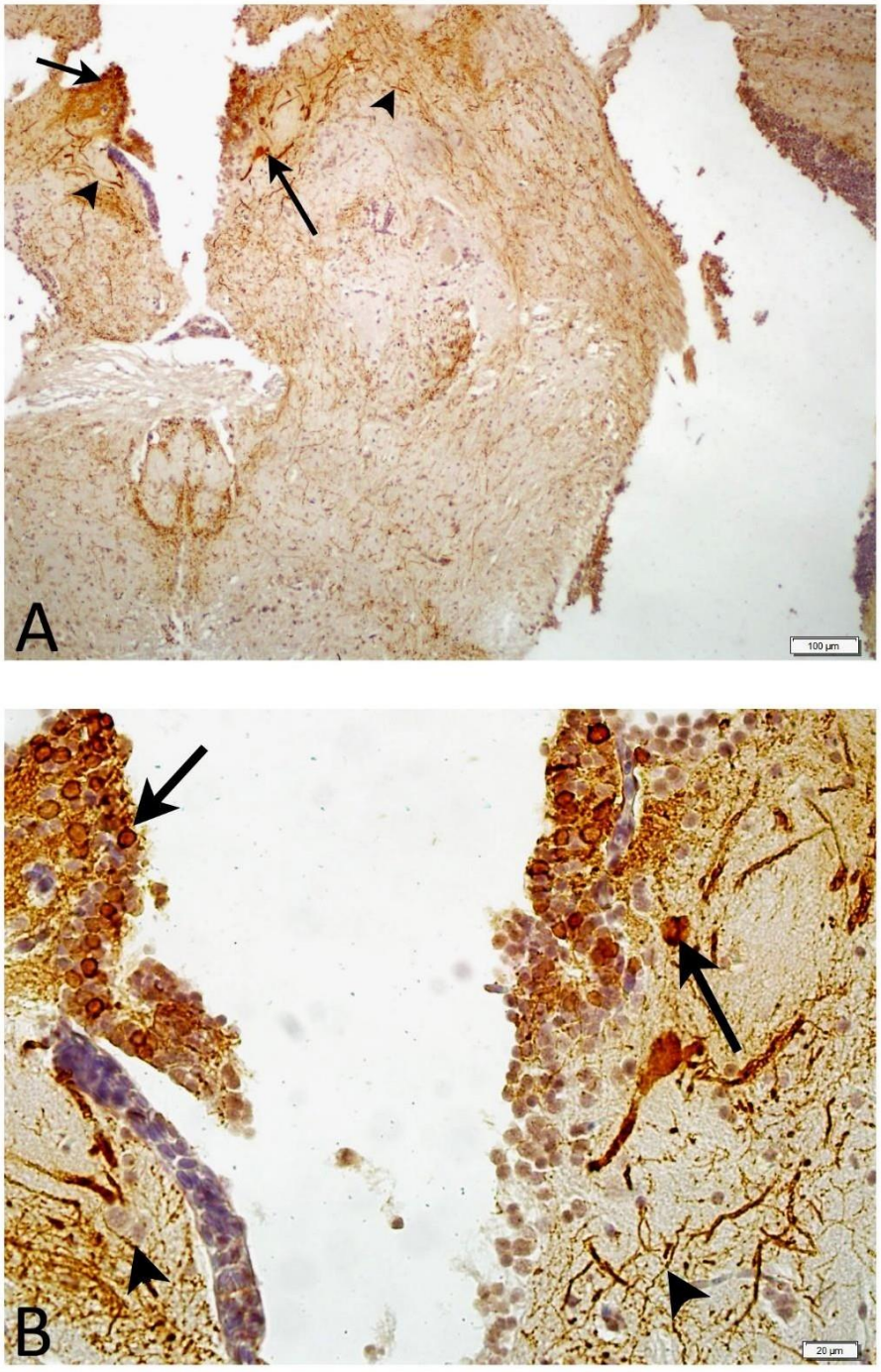
Şekil 4- 21: Maruziyet sonrası zebra balıklarının beyin dokularında Serotonin ve 5-HIAA düzeyleri.

Grupların Serotonin ve 5-HIAA düzeyleri. **** p<0,0001 K grubundan farklı; ### p<0,001 AA grubundan farklı; ++ p<0,01 ROT grubundan farklı. A5-HIAA: 5-hidroksiindolasetik asit; A: Asetik Asit Grubu; ROT: Rotenon grubu, ROT+AA: Asetik asit uygulanan Rotenon Grubu

4.5. İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları

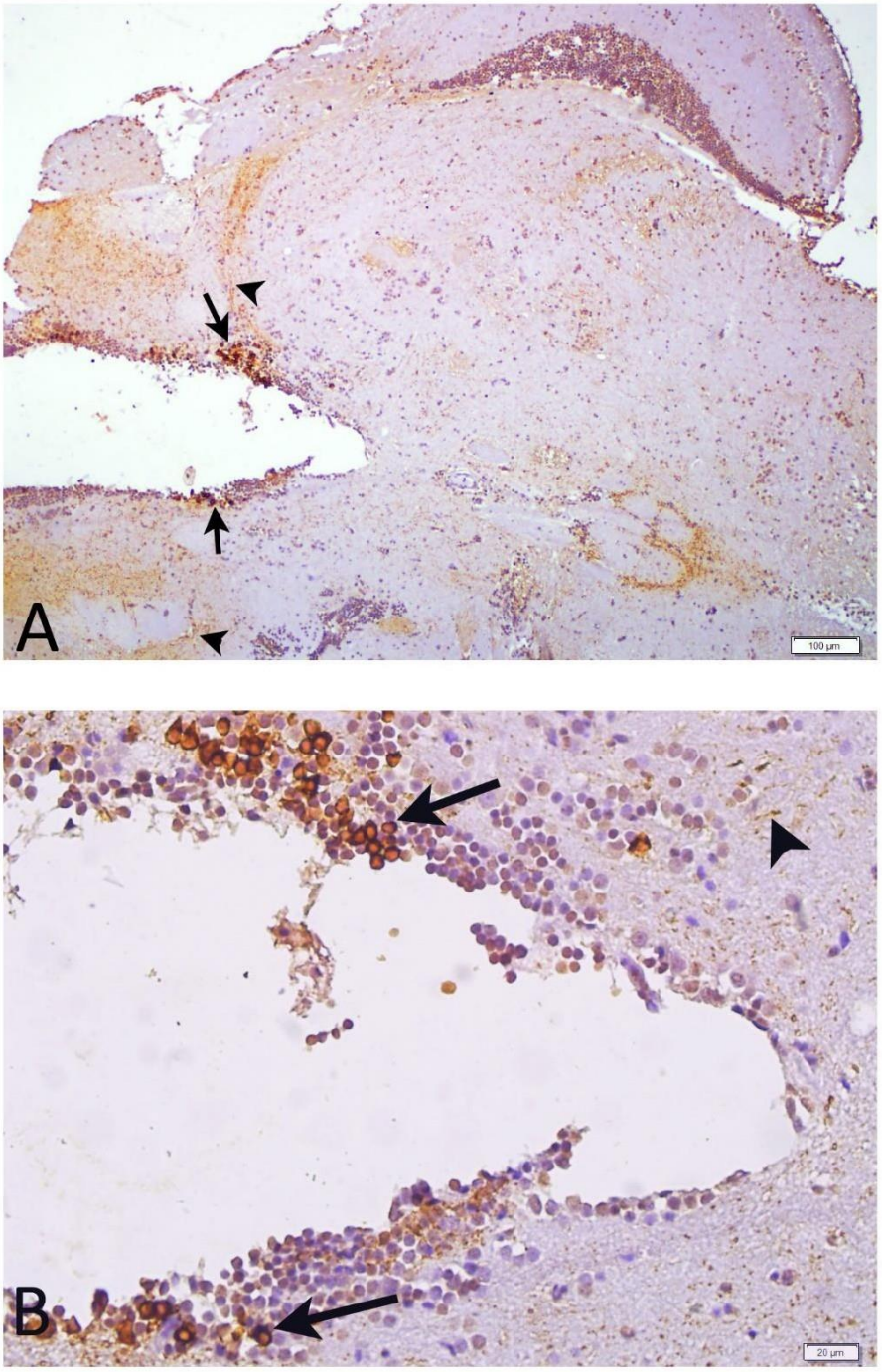
4.5.1. Tirozin Hidroksilaz Antikoru ile İmmünohistokimyasal Analizi Sonuçları

Deney gruplarına ait beyin doku örneklerinde tirozin hidroksilaz (TH) immünoreaktivitesi hem nöronların somalarında hem de uzantılarında kahverengi olarak izlendi (**Şekil 4- 22,23,24,25**). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir boyanma görülmedi (**Şekil 4-26**). Kontrol grubunda diensefalon bölgesinde TH- pozitif nöronlar ve uzantıları gözlenmiştir (**Şekil 4-22**). Asetik asit ve Rotenon grubunda diensefalon bölgesinde TH- pozitif nöronlarda hafif bir azalma ve TH- pozitif nöron uzantılarında ise belirgin bir azalma izlenmiştir (**Şekil 4-23, Şekil 4-24**). Rotenon ve Asetik asit grubunda ise diensefalon bölgesinde TH- pozitif nöronlarda ve uzantılarında belirgin bir azalma gözlenmiştir (**Şekil 4-25**).



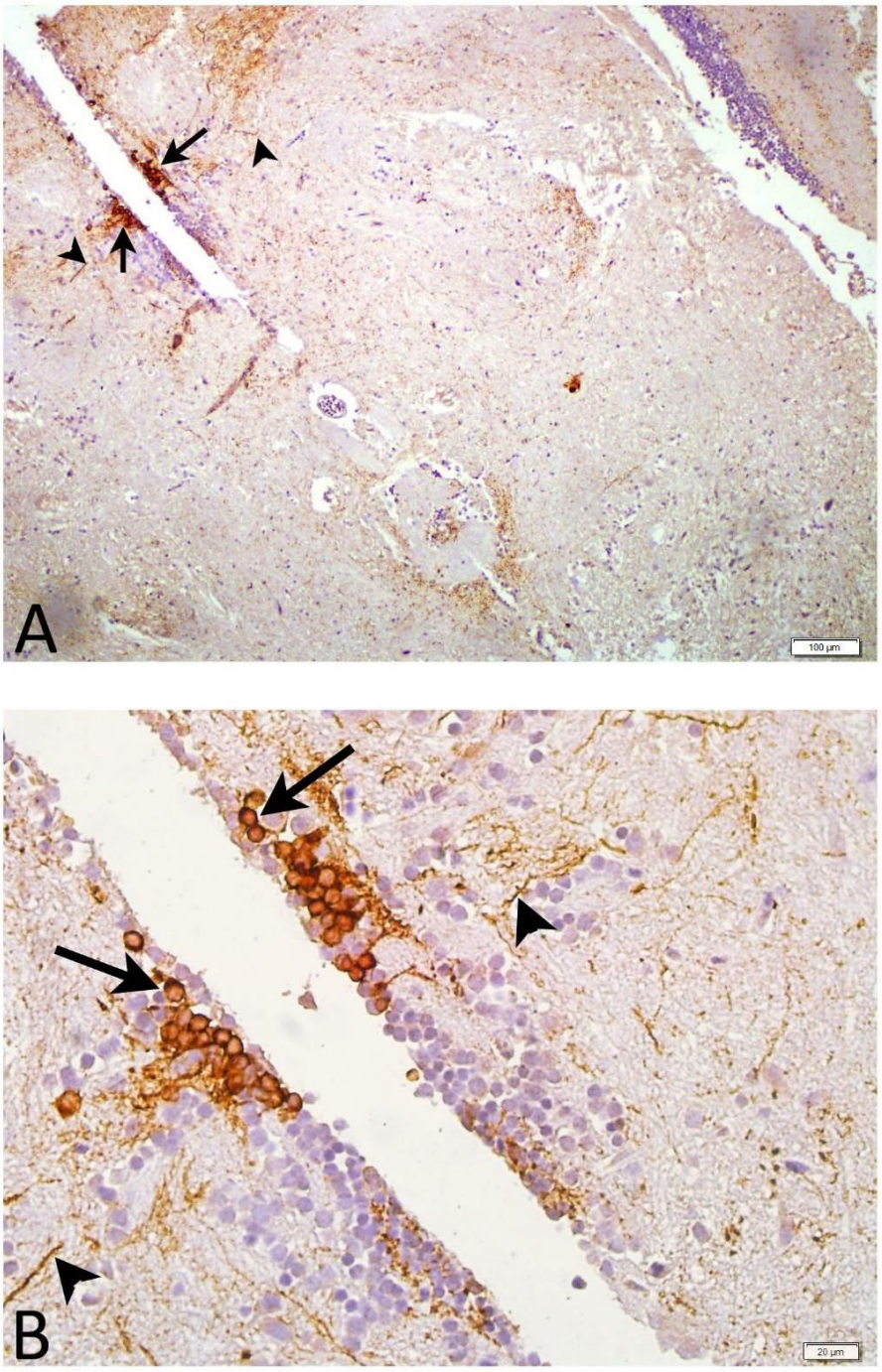
Şekil 4- 22: Kontrol grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması.

Kontrol grubunda (A ve B) diensefalon bölgesinde posteriyor tuberkulum ve çevresinde TH - pozitif boyanan nöron (oklar) ve uzantıları (ok başları).



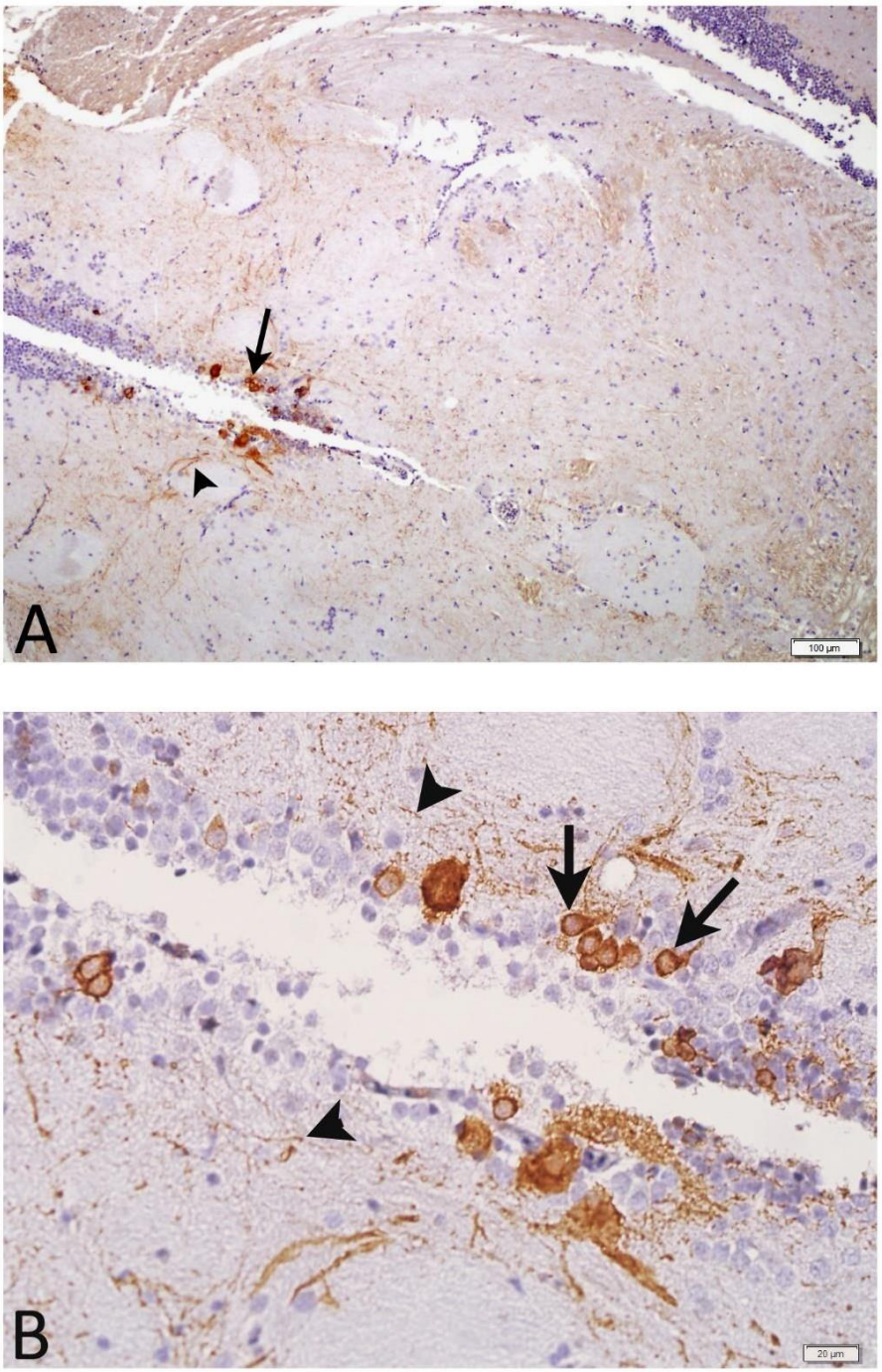
Şekil 4- 23: Asetik asit grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması.

Asetik asit grubunda diensefalon bölgesinde posteriyor tuberkulum ve çevresinde TH - pozitif boyanan nöronlarda hafif bir azalma (oklar) ve uzantılarında ise belirgin bir azalma (ok başları) gözlenmiştir.



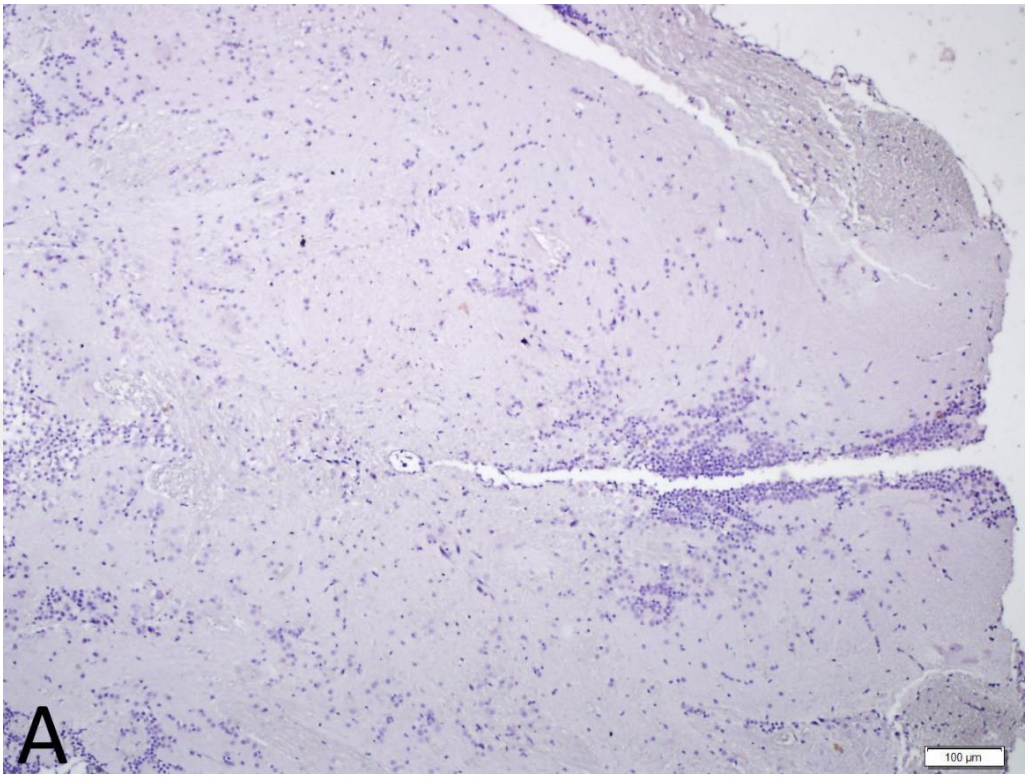
Şekil 4- 24: Rotenon grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması.

Rotenon grubunda diensefalon bölgesinde posteriyor tuberkulum ve çevresinde TH - pozitif boyanan nöronlarda hafif bir azalma (oklar) ve uzantılarında ise belirgin bir azalma (ok başları) izlenmiştir.



Şekil 4- 25: Rotenon+ Asetik asit grubu Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimya boyaması.

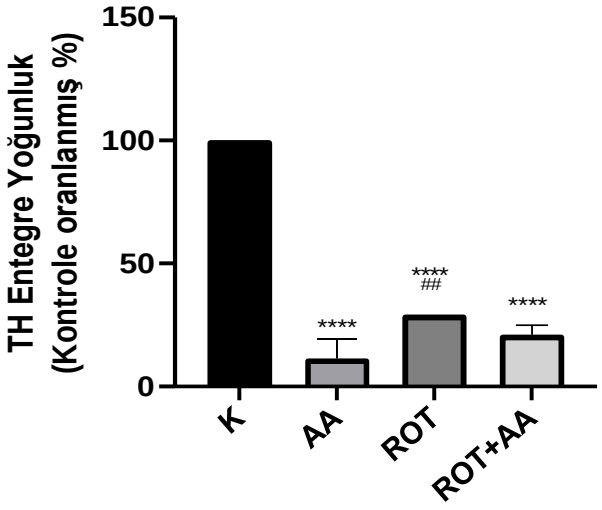
Asetik asit+Rotenon grubunda diensefalon bölgesinde posteriyor tuberkulum ve çevresinde TH - pozitif boyanan nöronlarda (oklar) ve uzantılarında (ok başları) belirgin bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 4- 26: Negatif Kontrol Tirozin Hidroksilaz (TH)

Tirozin hidroksilaz (TH)- pozitif boyanma izlenmedi.

Zebra balığı beyninde TH antikoru ile yaptığımız immünohistokimyasal analiz sonuçları **Şekil 4-27'** deki gibidir. Kontrol ile kıyaslandığında AA, ROT ve ROT+AA gruplarında zebra balığı beyninin diensefalon bölgesinde anlamlı bir azalma vardır ($p<0,0001$). ROT grubunda AA grubuna kıyasla TH ekpresyonunda anlamlı derecede artış vardır ($p<0,01$). ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir azalma vardır.



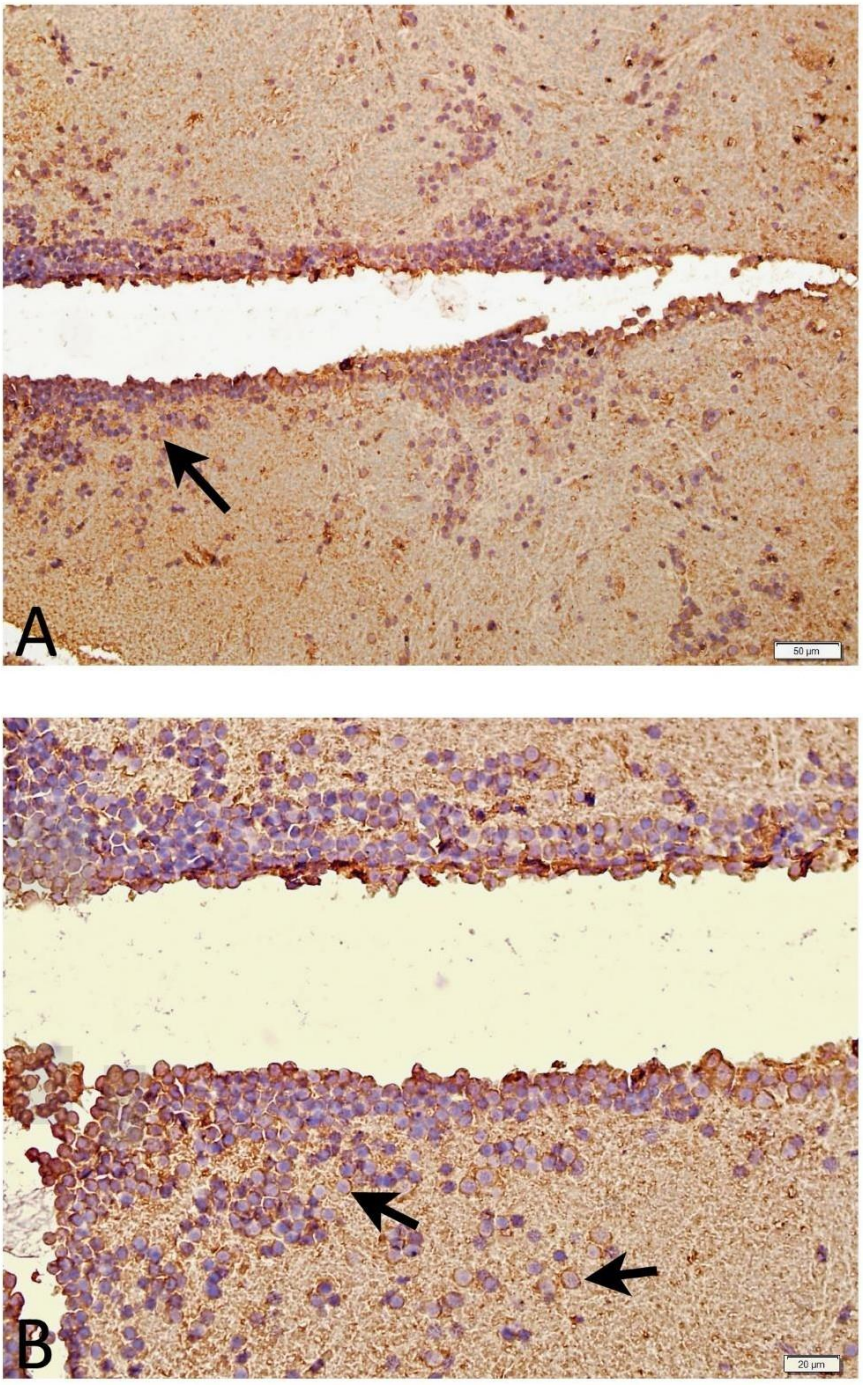
Şekil 4- 27: TH immunohistokimyasal analizi sonuçları

TH immunohistokimsayal analizi sonuçlarının kontrole göre oranlanmış entegre yoğunluk değerlerinin karşılaştırılması. Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi. **** $p<0,0001$ Kontrolden farklı; $^{\#\#}$ $p<0,01$ AA'dan farklı

4.5.2. Met- Enkefalin Antikoru ile İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları

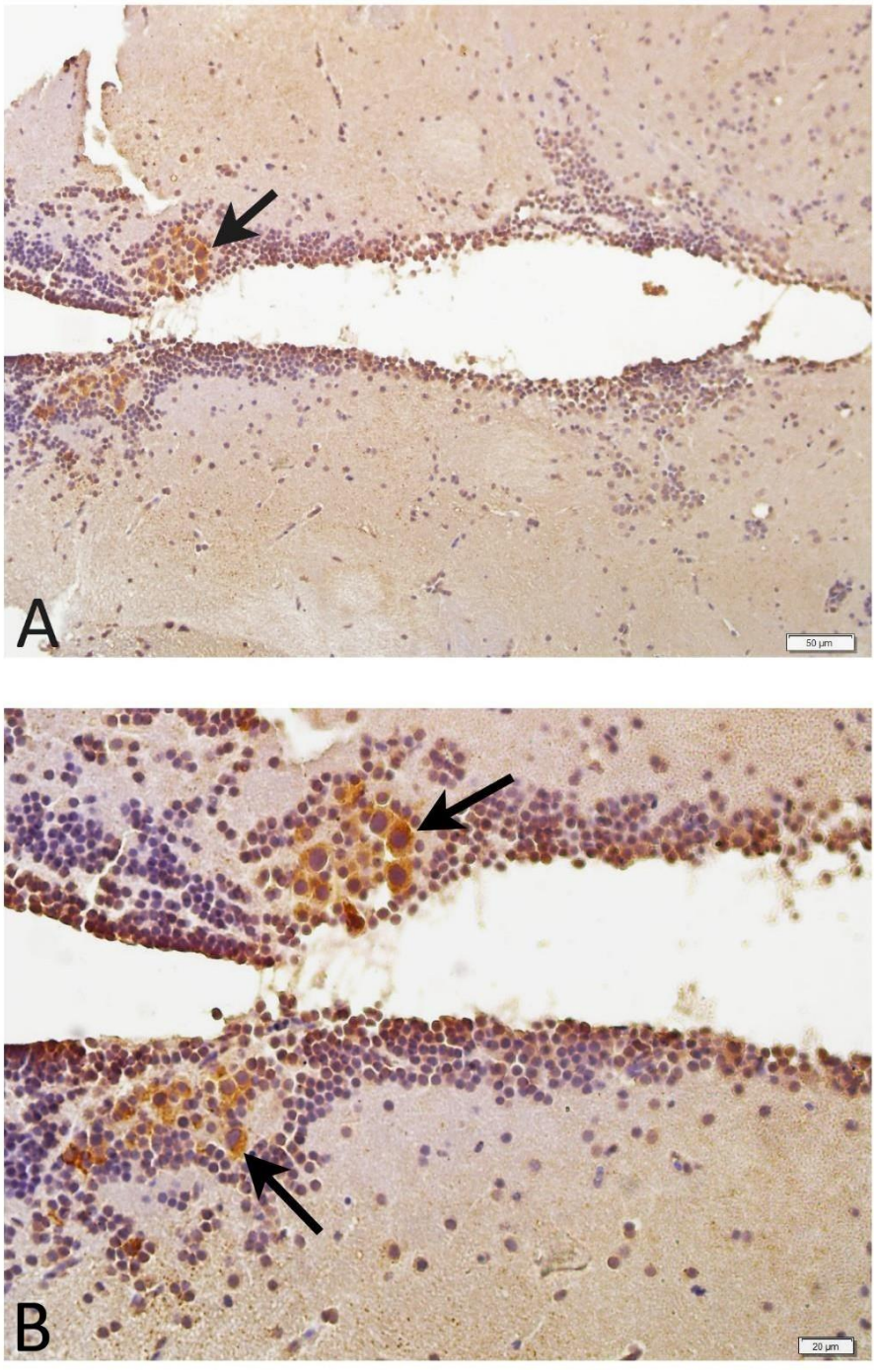
Deney gruplarına ait beyin doku örneklerinde enkefalin immünoreaktivitesi nöronların sitoplazmasında kahverengi olarak izlendi (**Şekil 4-28, 4-29, 4-30, 4-31**). Negatif kontrol dokusunda ise herhangi bir boyanma görülmedi (**Şekil 4-32**). Kontrol grubunda diensefalon bölgesinde nöronların sitoplazmasında hafif şiddette enkefalin immünoreaktivite gözlenmiştir (**Şekil 4-28**). Asetik asit, Rotenon gruplarında diensefalon bölgesindeki nöronların sitoplazmasında yoğun şiddette enkefalin immünoreaktivitesi izlenmiştir (**Şekil 4-29, 4-30**). Asetik asit + Rotenon grubunda diensefalon bölgesindeki nöronların sitoplazmasında orta şiddette enkefalin immünoreaktivitesi izlenmesinin yanı

sıra yer yer bazı nöronların sitoplazmasında yoğun şiddette enkefalin immünoreaktivitesi gözlenmiştir.



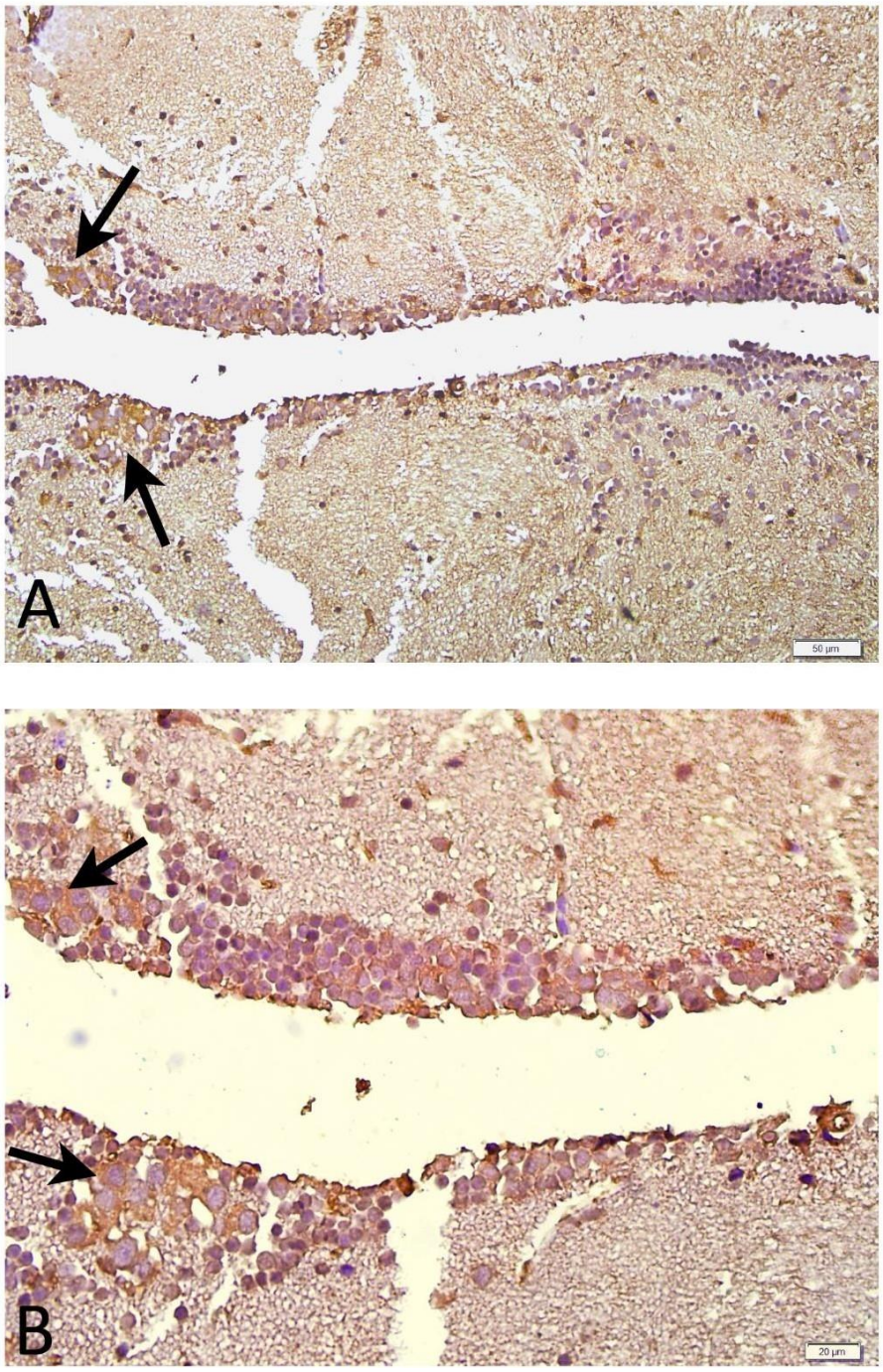
Şekil 4- 28: Kontrol grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması

Kontrol grubunda (A ve B) diensefalon bölgesinde preoptik alan ve çevresindeki nöronların sitoplazmasında hafif şiddette enkefalin immünoreaktivitesi (oklar).



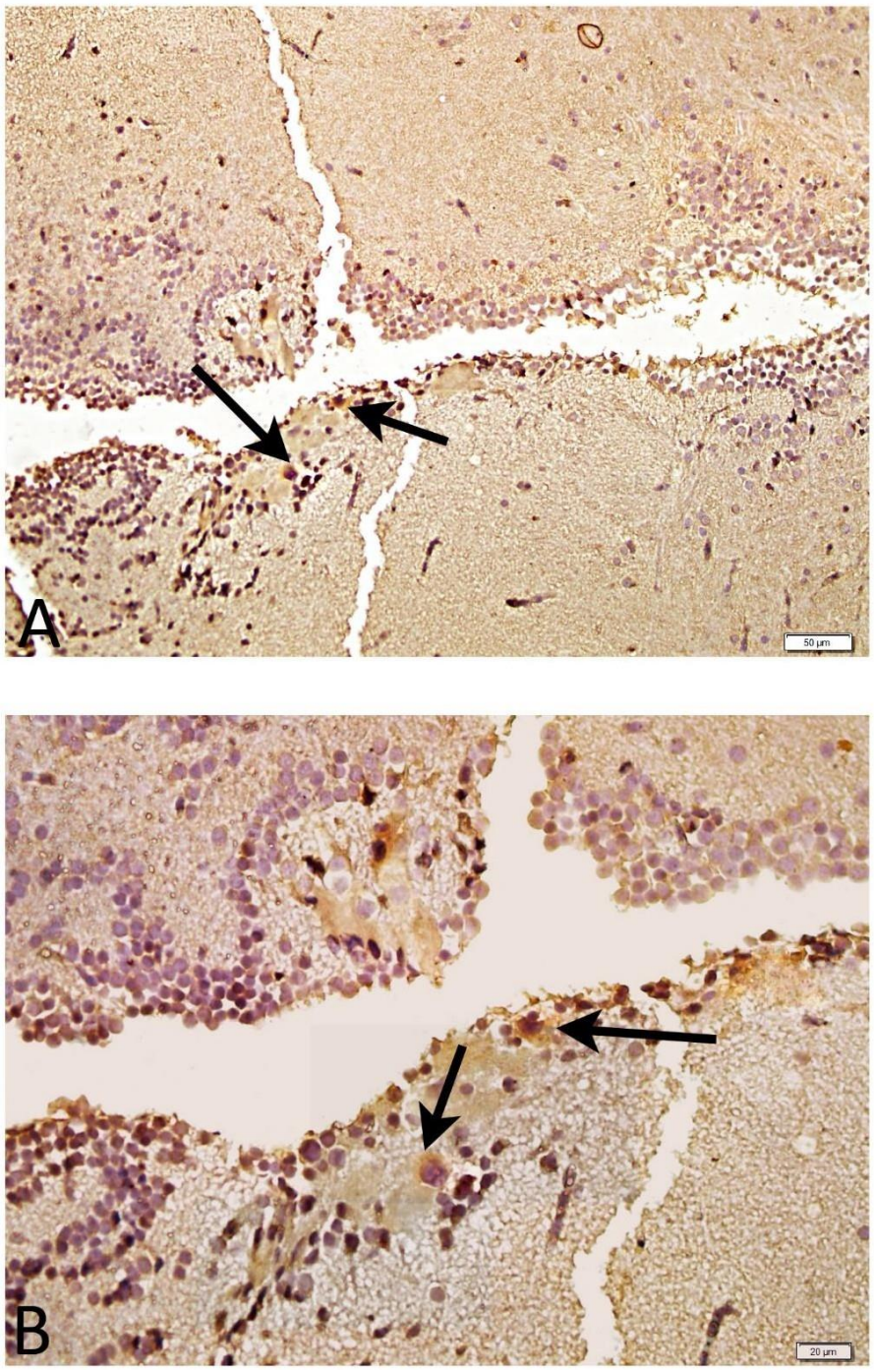
Şekil 4- 29: Asetik asit grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması.

Asetik asit grubunda (A ve B) diensefalon bölgesinde preoptik alan ve çevresindeki nöronların sitoplazmasında yoğun şiddette enkefalin immünoreaktivitesi (oklar).

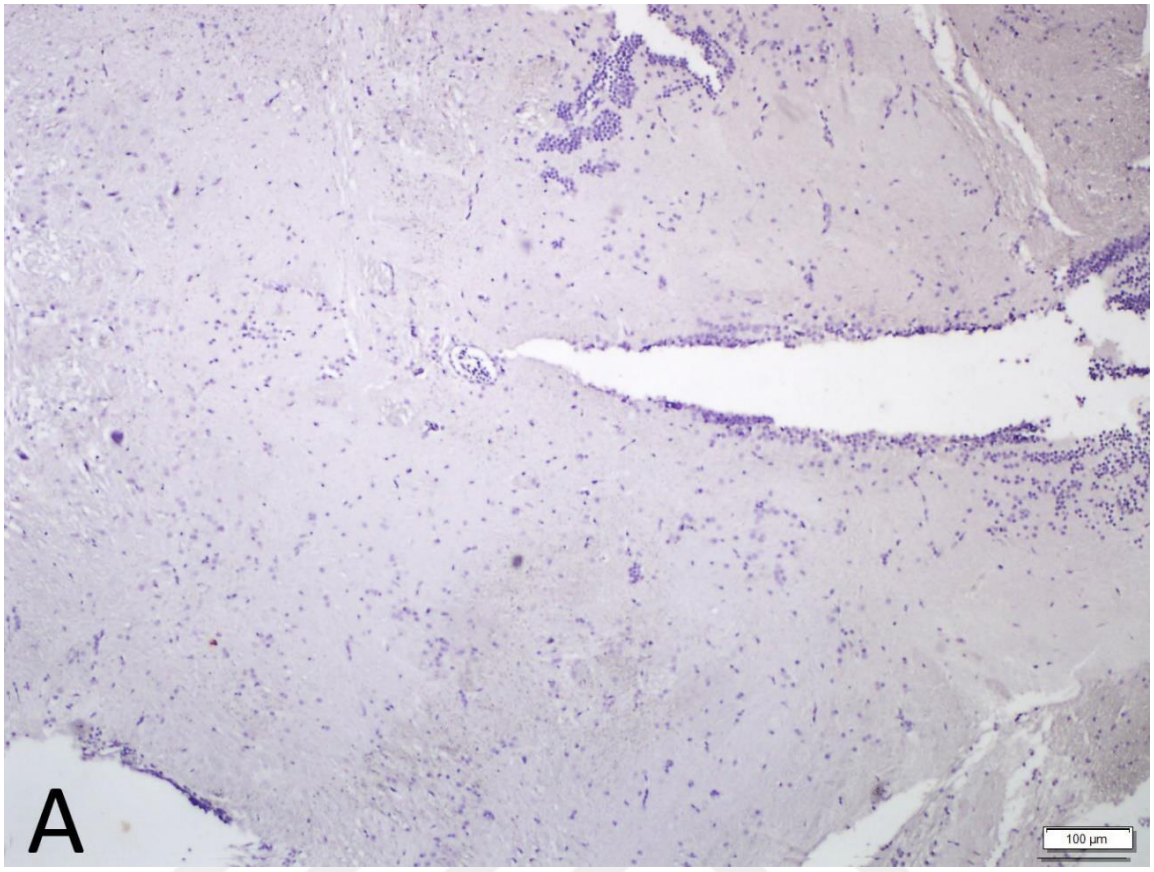


Şekil 4- 30: Rotenon grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması.

Rotenon grubunda (A ve B) diensefalon bölgesinde preoptik alan ve çevresindeki nöronların sitoplazmalarında yoğun şiddette enkefalin immünoreaktivitesi (oklar).



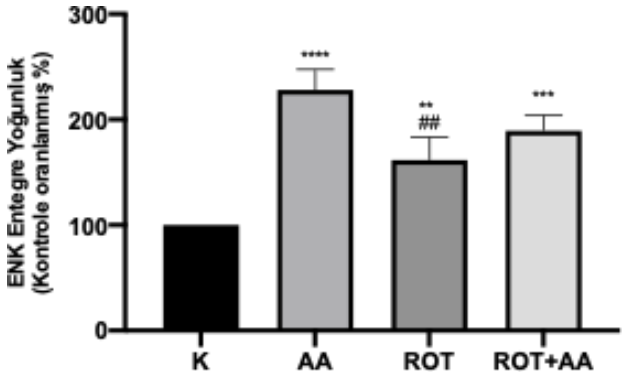
Şekil 4- 31: Rotenon+ Asetik asit grubu Met-Enkefalin immünohistokimya boyaması. Rotenon + Asetik asit grubunda (A ve B) diensefalon bölgesinde preoptik alan ve çevresindeki nöronların sitoplazmasında orta şiddette enkefalin immünoreaktivitesi (oklar).



Şekil 4- 32: Negatif kontrol Met-Enkefalin

Met- Enkefalin için yapılan negatif kontrolde pozitif boyanma izlenmedi.

Met-Enkefalin ile yapılan immünohistokimya boyamalarının istatistiksel sonucu **Şekil 4-33'** teki gibidir. Bu sonuçlara göre, kontrol ile kıyaslandığında asetik asit uygulanan grupta Met-Enkefalin' in entegre yoğunluk cinsinden ekspresyon seviyesi anlamlı derecede artmıştır ($p<0,0001$). ROT ve ROT+AA grupları kontrol ile kıyaslandığında Met-Enkefalin ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır ($p<0,01$, $p<0,001$). ROT grubunda AA grubuna kıyasla Met-Enkefalin ekspresyonları anlamlı derece azalmıştır ($p<0,0001$).



Şekil 4- 33: Met-Enkefalin immunohistokimsayal analizi sonuçları

ENK immunohistokimsayal analizi sonuçlarının kontrole göre oranlanmış entegre yoğunluk değerlerinin karşılaştırılması Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi. **** $p<0,0001$ Kontrolden farklı; *** $p<0,001$ Kontrolden farklı; ** $p<0,01$ Kontrolden farklı; ## $p<0,0001$ AA'dan farklı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda oluşturduğumuz zebra balıklarında rotenon ile indüklenen PH modelinde, katedilen mesafe, ortalama hız gibi davranışsal parametreler ile beyin dokusunda dopamin düzeyleri azalmış, oksidatif hasar göstergesi olarak LPO ve NO artarken antioksidan bir enzim olan SOD aktivitesi azalmıştır. Oksidatif strese yanıt olarak PH ile ilişkili genlerden *lrrk, pink1, park7* ifadelerinde artış, nitrozatif stres, dopaminerjik stres ve oksidatif stres nedeniyle inaktive olduğu bilinen *park2* ifadesinde ise azalma görülmüştür. **Bu bulgular çalışmamızda uygulanan rotenonun zebra balıklarında PH oluşturmak için uygun bir ajan olduğunu göstermiştir.**

PH'de ağrı ile ilgili mekanizmaları incelemek amacıyla asetik asit uyguladığımızda sadece asetik asit uygulanan gruptaki vücut eğriliği rotenon ve rotenon+asetik asit uygulanan gruplardan daha fazlaydı. Periferik ağrının algılanmasında rol oynayan asit algılayan iyon kanallarının ifadeleri (zasic 1.1, zasic 1.2) rotenon ile beraber asetik asit uygulanan grupta asetik asit ve rotenon gruplarına göre azalmıştı. PH'nin erken aşamasında artışının PH semptomlarını iyileştirebildiği bilinen *penka* ile ağrıya yanıt olarak artan *pdyn* ifadesi asetik asit grubunda artarken asetik asit uygulanan rotenon grubunda azalmıştı. **Bu bulgular ağrıya yanıt ile ilgili mekanizmaların rotenon ile beraber asetik asit uygulanması durumunda bozulduğunu işaret etmektedir. Buna paralel olarak rotenon grubu ile kıyaslandığında rotenon+asetik asit grubunda LPO değerlerinin artması, *cox-1* ifadesinin ise azalması proinflamatuvar mediyatörlerin salınımı ile nöropatik ağrı ilişkisinin bozulduğuna işaret etmektedir.**

Asetik asit kaynaklı kıvrılma (Writhing) testi, potansiyel analjezik maddeleri izlemek için yaygın olarak kullanılan bir visseral ağrı modelidir. Bu modelde ağrı, narkotik analjeziklere ve steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçlara duyarlı periferik nosiseptif nöronları uyaran bradikinin, serotonin, histamin, P maddesi ve prostaglandinler gibi endojen modülatörler aracılığıyla dolaylı olarak üretilir. Ayrıca, bu modülatörler vasküler geçirgenliği artırabilir, nosisepsiyon eşiğini azaltabilir ve nosiseptif liflerin sinir terminallerini uyarabilir. İntraperitoneal olarak enjekte edilen asetik asit, birincil afferent yollarda bulunan seçici olmayan katyon kanallarını da doğrudan aktive edebilir. Asetik asit kaynaklı kıvrılma testi spesifik olmayan bir modeldir. Yani antikolinerjik, trisiklik antidepresanlar, antihistaminikler ve diğer ajanlar bu testte aktivite gösterir (260).

Zebra balıklarında ağrı modeli çalışılırken yapılan davranış testlerinin sonuçları göstermiştir ki; intraperitonel olarak akut asetik aside maruz bırakılan zebra balıklarında maruziyet sonrası ilk 6 dakika boyunca vücut eğriliğinde maksimum artış olur ve yarım saatin sonunda balık eski pozisyonuna döner (253). Yapılan çalışmalarda zebra balıklarına farklı dozlarda akut intraperitonel asetik asit uygulanmış ve vücut eğriliğinin ve eğri alanın altında kalan alanın kontrol ile kıyaslandığında belirgin olarak ayırt edilebildiği doz % 5' lik asetik asit olarak tespit edilmiştir (233,241). Asetik asit ile oluşturulan ağrı modeli daha çok visseral ağrıya örnek gösterilmektedir.

Bizim çalışmamızda da bu bilgiyle uyumlu olarak zebra balıklarına akut olarak intraperitonel asetik asit maruziyeti sonucu vücut eğriliklerinde ve eğri alanın altında kalan alan kontrole kıyasla anlamlı bir artış olmuştur. Bunun yanı sıra eğri alanın altında kalan alan da literatürle uyumlu olarak kontrole oranla asetik asit uygulanan grupta artmıştır. PH' de en sık görülen non-motor semptomlardan biri olarak bilinen ağrı, hastalığında belirlenmesinde gölgeleyici bir faktör olarak görülmektedir. PH' li bireylerde ağrı semptomu motor semptomlardan çok önce ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle PH' nin teşhişinde ağrının önemli bir semptom olduğu düşünülmektedir (23,40,42).

Çalışmamızda sadece rotenon ve rotenon ile asetik asit uygulanan gruplarda da kontrole kıyasla anlamlı derecede artış vardır. Literatürde rotenon ile oluşturulan PH modelinde eğrilme testinin yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat ağrının PH' de belirgin bir semptom olduğunun bilinmesi ROT grubunda kontrole kıyasla eğri alanın altında kalan alanda bir artış olmasını destekler niteliktedir. ROT+AA grubunda ROT grubuna kıyasla anlamlı derecede artış olması PH' de ağrıya olan hassasiyetin artışıyla ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. ROT+AA grubunda AA grubuna kıyasla anlamlı olmayan hafif bir azalma tespit ettik.

Costa ve ark.(2019) ve Deakin ve ark. (2019)'nın yapmış olduğu çalışmalara göre intraperitonel olarak akut asetik aside maruz bırakılan teleositlerde kontrol grubuna kıyasla tank içersinde yüzeye doğru yüzme hareketi ve yüzeyde geçirdikleri zaman baskın olarak görülmüştür (241,253).

Bizim çalışmamızda da bu verilerle uyumlu olarak AA grubu pasif yüzme olarak da adlandırılan suyun yüzeyine yakın yüzme davranışı (261) **kaçma ve sudan**

çıkmaya çalışma tepkisini vermiştir. **Tankın sağ üst ve orta kısımlarında kırmızı-turuncu bölgeler balıkların hareketsiz kaldığı alanlardır. Bunun yanı sıra bu grupta asetik asit maruziyeti sonrası ilk saniyelerde hızlı kuyruk hareketleri ve hiperlokomasyon görüldü. Daha sonra yavaşlayan yüzme hareketi ve hareketsizlik gözlendi. ROT grubu tankın sağ alt köşesinde kırmızı-turuncu olarak görülen alanda kalarak strese girmeleri sonucunda akvaryumun dip köşesinde belli bir alanda yüzme ve bunun yanı sıra da hareketsiz kalma davranışı sergilemişlerdir. Bu olaya jeotaksi denmektedir. Kırmızı-turuncu alanlarda balıklar daha fazla vakit geçirmişlerdir. Bu durum balığa toksik ajanlar verildiğinde görülür** (261). **ROT+AA grubunda tankın yüzeyine yakın kısımda yüzme eğilimi nörolojik bozukluğu işaret eder. Rotenon maruziyeti uygulanıp bir ay sonunda asetik asit ile enjeksiyon yapılan balıklar tankın üst yüzeyinde sağ ve sol üst köşelerde daha fazla zaman geçirmişlerdir. Kontrolle kıyaslandığında tüm gruplarda nöromotor bozukluk belirtisi olan hipolokomasyon davranışı** (261–263) **gözlendi.**

Asetik asit ile ağrı modeli oluşturulan teleositlerde maruziyet sonrası balıkların bulundukları ortamdaki keşif oranları, katettikleri mesafe ve ortalama hızları incelenerek ağrı ile ilişkilendirilmektedir. Ağrı çeken teleositlerde keşif oranı, katedilen mesafe ve ortalama hızları düşer (233,241,253). Çalışmamızda da bu bilgi ile uyumlu olarak zebra balıklarında akut intraperitonel asetik asit maruziyeti sonrası kontrole kıyasla keşif oranı, katedilen mesafe ve ortalama hızda anlamlı bir azalma olmuştur. Bunun yanı sıra ROT grubunda kontrole kıyasla keşif oranında anlamlı olmayan bir artış ve ROT+AA grubunda ise kontrol ve ROT grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olmuştur. PH' de yapılan hayvan çalışmalarında olduğu gibi bizim çalışmamızda da hipolokomasyon gözlemlendi. ROT+AA grubunda ROT grubuna göre anlamlı azalma olması PH' de ağrıya olan hassasiyetin arttığının bir göstergesi olabilir.

Lokomotor aktivite katekolamin seviyesi ile ilişkili olarak değişim göstermektedir. PH patolojik olarak substantia nigra pars compacta'daki (SNPc) dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve striatal projeksiyonlarda motor bozukluğuna yol açan dopamin tükenmesi ile karakterize edilir (264–268). Ç**alışmamızda da LC-MS/MS ile yapılan analizler sonucu dopamin seviyelerinde kontrole kıyasla tüm gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür.**

Dopaminerjik sistem hem aşağı inen hem de yukarı çıkan beyin yolaklarında bulunmaktadır. Bu nedenle ağrının modülasyonunda ağrıyı artırıcı ve engelleyici olmak üzere iki farklı görevi olduğu düşünülmektedir. Arka hipotalamustaki A11 çekirdeği, hem beyin sapına hem de omuriliğe yansıyabilen önemli bir dopamin hücre grubudur. Ağrı modülasyonu için A11 çekirdeğinden spinal trigeminal nükleus kaudalis (Sp5C)' e veya spinal dorsal boynuza inen dopaminerjik yolaklarda, D1 benzeri reseptörler ağrı gelişimine ve sürdürülmesine katkıda bulunurken, D2 benzeri reseptörler bir anti-nosisepsiyon etkisi uygular. Bu durumun dopamin benzeri reseptörlerin birbirine zıt olarak çalıştığını göstergesi olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak dopaminerjik yolakların ağrı modülasyonundaki etkisinin sadece dopamin reseptör tiplerine değil aynı zamanda ağrı çeşidine de bağlı olarak değişim gösterdiği düşünülmektedir (269). Çalışmamızda dopamin seviyelerini visseral bir ağrı çeşidinin oluşturulduğu AA grubunda kontrole, ROT ve ROT+AA gruplarına kıyasla anlamlı derecede azaldı. ROT ve ROT+AA gruplarında ise AA grubuna kıyasla Dopamin seviyelerinde anlamlı derecde artış görüldü. Bunun sebebi AA grubundaki ağrı çeşidi (visseral ağrı) ile ROT (nöropatik, nosiseptif ve diğer ağrı şekilleri olabilir) ve ROT+AA (nöropatik, nosiseptif ağrı üzerine visseral ağrı oluşturulması) gruplarındaki ağrı çeşitlerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Serotonin seviyelerinin de lokomotor aktivitede etkili olduğunun belirtilmesine rağmen bizim LC-MS/MS ile yapılan analizlerde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Mendlin (1999) yaptığı çalışmada, sıçanlarda postsinaptik D2 reseptörlerini bloke ettikten sonra serotoninin salgılanmadığını gözlemledi. Serotonin, ağrının duyusal ve duygusal özelliklerinde önemli bir role sahip olduğundan, ön beyindeki serotonin salgılanması, sağlam lokal dopaminerjik nörotransmisyona bağlıdır (270)**. Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda dopamin seviyelerinde anlamlı derecede azalma görülmesi PH ve ağrıdan kaynaklı dopamin reseptörlerinde defekt meydana gelmesinden dolayı olabilir. Bu durum da serotonin seviyelerinde bir değişim olmamasına neden olmuş olabilir.**

Eşleşmemiş elektrona sahip moleküller ya da atomlar serbest radikaller olarak adlandırılırlar. Buna karşın hücreler reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bu moleküllerin neden olduğu hasarı önlemek adına çeşitli savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bu sistemler "antioksidan savunma

mekanizmaları" olarak adlandırılırlar. Ancak serbest radikaller hücredeki antioksidan savunmayı bertaraf ettiğinde konak hücreye hasar vermekte ve beraberinde hastalıklar gelişmektedir (271).

Hücredeki oksidatif stres iki yolla ölçülebilmektedir; bunlardan biri serbest radikal miktar tayini diğeri de antioksidan seviyelerinin hesaplanmasıdır. Bu moleküllerde oksidanlar lehine bir dengesizlik oksidatif stres ile sonuçlanır. Literatür bilgisi diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif rahatsızlıklar ve yaşlanma gibi çeşitli bozukluk ve hastalıklarda altta yatan bir mekanizma olarak in vivo oksidasyonun rol oynadığına işaret etmektedir. Son yıllarda yukarda bahsedilen hastalıkların arasında oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü büyük ilgi görmektedir (271–274).

Beyin, omurilik ve kraniyal sinirlerce MSS'yi kontrol eden, insan vücudundaki hemen hemen tüm işlevleri düzenleyen organdır. Beyin anatomik olarak üç bölüme ayrılır. Bunlar ön, orta ve art beyindir. Ön beyin bölgesinde çeşitli serebral korteks lobları yer alır. Art ve orta beyin ise çoğunlukla otonom ve bilinçdışı işlevlerle alakalıdır (Bailey). Parkinson hastalığının nedeni olarak gösterilen dopamin eksikliğinin en yoğun olduğu beyin bölgesi orta beyindeki Substantia nigradır (275). Vücutta serbest radikallere karşı çok sayıda savunma mekanizması gelişmiştir ancak beyin diğer organlara kıyasla ROS ve RNS'nin hastalık süreci boyunca giderek daha fazla zarar veren etkilerine maruz kalır. Yetişkin bir insanın beyni vücut ağırlığının % 2'sine karşılık gelse de tükettiği oksijen oranı vücut tarafından alınan toplam oksijen miktarının yaklaşık % 20' si kadardır. Beynin bu yüksek oksidatif metabolizması sonucunda da, serbest oksijen radikallerinin oluşma riski diğer organlara göre daha yüksektir (276,277).

Substantia nigra, kaudat çekirdek, putamen ve globus pallidus dahil olmak üzere birçok beyin bölgesi demir konsantrasyonu bakımından zengindir. Demir özellikle yaşlı popülasyonda beyinde birikmesinin yanı sıra serbest radikal reaksiyonlarının katalizine de katılmaktadır (271). Yapılan bir çalışmada nöronlardaki mitokondrilerde elektron transport sistemi (ETS) üzerinde bulunan komplekslerdeki defektlere bağlı olarak oluşan ve bir ROS olan hidrojen peroksit üretiminin bazı patolojik durumlarda iskelet kası mitokondrisine kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir (278). Beyin oksidatif hasara karşı ileri derecede hassas bir organdır. Yüksek oranda oksijen tüketir (271). Nöronlardaki

oksijen radikallerinin esas kaynağı mitokondriyal solunum zinciridir. Burada elektronlar solunum zincirindeki kompleksler üzerinde taşınır (273).

Rotenon yüzlerce pestisid ve pisisitin bileşenidir. 2000 yılında Betarbet ve ark. Parkinson hastalığının iki patolojik özelliğini, yani dopaminerjik nöronların kaybı ve dopaminerjik nöronlarda Lewy cisimlerin oluşumunu göstererek Parkinson'un motor kusurlarını deneysel modellerde kullanılmak üzere ortaya koymuşlardır (279). Bir nörotoksik ajan olan rotenonun mitokondri üzerine olan inhibe edici etkisi sonucunda Kompleks I'deki Fe-S merkezlerinden ubikinon'a transfer edilen elektron akışının yavaşlaması, NADH'ın oksidasyonunun düşmesi ve ATP üretiminin azalması gözlenir. Bununla birlikte Kompleks I'den sızan elektronlar, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olur. Çoğu deneysel modelde rotenon tarafından ROS üretiminin arttığı bildirilmiştir (280,281)**.** Rotenon toksisitesinin diğer nedenleri arasında hücre zarını herhangi bir taşıyıcıdan bağımsız olarak kolaylıkla geçmesini sağlayan lipofilik özelliği, α-sinüklein agregatlarını fosforile ederek Lewy cisimcikleri oluşturması ve SN'de demir birikimine yol açması sayılabilir. Bu etkilerin sonucunda dopaminerjik nöronlarda ölüm görülür. İn vivo çalışmalarda, rotenona sistemik maruziyetin α-sinüklein agregasyonuna neden olduğu göstermiştir. α-sinükleinin hatalı katlanması da artan ROS üretimi ile ilişkilidir. Sonuç olarak ROS, α-sinüklein agregasyonuna neden olmakta, bu durum da ROS'un üretimini arttırmaktadır. Bu döngü nörodejenerasyona yol açar (276,279,282) Betarbet ve arkadaşlarının çalışmasının ardından, araştırmacılar rotenonun kemirgenlerde iltihaplanma, apoptotik hücre ölümü, otofajik bozulma ve mikrotübül depolarizasyonu gibi bir dizi patolojik sürece neden olduğunu göstermişlerdir (279)**.**

Hücre içinde çeşitli organellerin membranlarında yer alan lipitler radikal hasarından kolaylıkla etkilenirler. Lipitlerle reaksiyona giren radikaller lipit peroksidasyonuna neden olarak hücre içi organel membranlarının ve plazma membranının geçirgenliğini bozarak toksik aldehitlerin oluşumuna neden olur. Lipit peroksidasyonu hücre lizisine yol açan hücre zarı hasarının başlıca nedenlerinden biridir (283). Nöron membranları dokosaheksaenoik asit, araşidonik asit ve eikosapentaenoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yapılardır. Çoklu doymamış yağ asitleri fazla sayıda çift bağa sahip olmalarından dolayı oksidan strese doğrudan maruz kalırlar. Bu sebeple beyindeki nöronların diğer hücre tiplerine kıyasla oksidatif hasara maruz

kalma ihtimalleri daha fazladır (284). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, rat beyinlerine rotenon enjeksiyonunu takiben lipit peroksidasyonunun arttığını bununla birlikte de glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzim konsantrasyonlarında azalmaların gözlendiği bildirilmektedir (285,286). Yazarlar rotenon uygulamasının dopaminerjik hücre ölümüne neden olduğunu ve sonuçta oksidatif strese sebebiyet verdiğini ve bu stresin büyük ölçüde E vitamini, C vitamini ve glutatyon öncüsü N-asetil-sistein tarafından düşürüldüğünü belirtmişlerdir (287,288).

Beyinde dopaminin en fazla üretildiği alan substantia nigradır. Dexter ve ark.(1992) Parkinsonlu hastalarda bu alandaki serbest radikal konsantrasyonunu ve lipit peroksidasyonunu artmış bulmuşlardır. Bununla birlikte nöronlarda sinaptik proteinlerden oluşan çok sayıdaki Lewy cisimciğinin varlığını göstermişlerdir (289). Buna koşut olarak bu hastalarının plazmalarında MDA düzeyleri de yükselmiştir (290–292). Parkinsonlu hastaların eritrositlerinde meydana gelen lipit peroksidasyonu ve beraberinde gelişen membran hasarı hemolize, bu hücrelerin şekil değiştirerek esneme yeteneklerini kaybetmelerine, kapiler damarlarda tıkanıklıklara, beraberinde de kan akışının bozulmasına neden olur (293,294). Jenner ve arkadaşları ratlarda bizim deneysel modelimizde kullandığımız rotenondan farklı bir nörotoksin olan MPTP'yi kullanarak Parkinson modeli oluşturmuşlardır. Sakrifikasyon sonrası beynin substantia nigrasında artmış lipit peroksit düzeyleri gösterilmiştir (295). Marzatico ve arkadaşları (1993) da postmortem insan kadavrasında yaptıkları bir çalışmada Parkinsonlu beyin dokularında kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 10 kata kadar artmış lipit hidroperoksit konsantrasyonu tespit etmişlerdir (296). Bu çalışmalarda, meydana gelen radikal hasarının öncelikli olarak süperoksit radikali ve nitrik oksit radikali menşeili olduğu ileri sürülmektedir (247). Gokce ve ark. (2017), Molina ve ark. (1992) çalışmalarında Parkinson hastaları ve kontrol grubu arasında birbirine çok yakın serum MDA konsantrasyonlarını bildirilmiştir (297,298). Bu iki çalışmada kontrol ve hasta grubu arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Diğer taraftan bizim çalışmamıza koşut olarak literatürde az sayıda da olsa Parkinsonlu hastaların MDA seviyelerinin azalmış bulunduğu çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalardan biri Dexter ve arkadaşlarının insanlarda post mortem beyindeki SN bölgesinde yaptığı çalışmadır (289). Buna göre Parkinson hastalarında lipit peroksidasyon seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu durumu

yazarlar SN bölgesinde tespit ettikleri çoklu doymamış yağ asitleri miktarının azlığına bağlamışlardır.

Yaptığımız çalışmada NO seviyelerini akvaryum içinde 1 ay boyunca rotenona maruz bırakılan sonra da akut intraperitoneal asetik asit uygulanan Rotenon+asetik asit grubunda kontrole göre anlamlı derecede artmış bulduk. LPO düzeyleri ise, Rotenon+Asetik Asit uygulamasıyla Parkinson modeli oluşturduğumuz grupta ise kontrol grubuna göre ise anlamlı derecede azalmıştır. Hogg ve Kalyanaraman 'ın (1999) hipotezine göre nitrik oksit, lipit peroksidasyonunu hem tetikleyebilmekte hem de inhibe edebilmektedir (247). Nitrik oksit kendi başına lipit peroksil radikallerini temizleyerek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunun güçlü bir inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca artan NO, lipit peroksidasyonunun birçok potansiyel aktivatörünü de beraberinde inhibe edebilmektedir. Bunlardan biri lipit peroksidasyonu ile ilişkili olan bazı enzimlerin yapısında bulunan ferril Hemi redükte ederek lipit peroksidasyonunu inhibe eder (299). Sonuç olarak da çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu neticesiyle oluşan MDA seviyelerinde azalma beklenebilir (247).

Bizim çalışmamızda da buna benzer bir etki söz konusu olabilir. Biz de NO seviyelerini zebra balıklarında Rotenon+asetik asit uygulanan grupta kontrole göre anlamlı derecede artmış olduğunu, ancak LPO düzeylerinin azaldığını tespit ettik. Zebra balıklarında beyin dokusundaki lipit peroksidasyonunun azalması nöroprotektif bir mekanizmanın işlediğini göstermektedir. Bunda NO'nun ferril Hem'i redükte etmesi ve asetik asidin anti-inflamatuvar etkisinin rol oynadığını düşünmekteyiz. Bu veriler Gorbunov ve ark'nın hipotezini destekler niteliktedir .

Literatürdeki bazı deneysel modellerde ağrı oluşturma amaçlı uygulanan asetik asit, öncelikli olarak potansiyel analjezik maddelerin etkinliğini izlemek maksadıyla kullanılmaktadır. Bu modelde ağrı, narkotik analjeziklere ve steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlara duyarlı olan, periferdeki nosiseptif nöronları uyaran bradikinin, serotonin, histamin, P maddesi ve prostaglandinler gibi medyatörlerce oluşturulur (260). Bu medyatörler vasküler geçirgenliği arttırabilmektedirler. Asetik asit ile oluşturulan ağrı modelindeki LPO seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız %5'lik asetik asit sirkede bulunan asetik asit konsantrasyonuyla eş değerdir. Ayrıca asetik asit insan vücudunda bulunan en kısa zincirli yağ asididir (244).

Son yıllarda kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) insan sağlığı üzerine olan faydalı etkileri literatürde geniş yer bulmaktadır (300). SCFA'lar, iki ila altı karbon zincir uzunluğuna sahip monokarboksilik asitlerdir. En yaygın bulunan SCFA'lar iki karbon atomuna sahip asetik asit, 3 karbonlu propiyonik asit ve 4 karbonlu butirik asittir. Bu yağ asitleri başlıca gastrointestinal sistem bakterileri tarafından üretilirler. Liflerin ve diyet polisakkaritlerinin fermantasyonu sonucu bağırsak bakterileri tarafından üretilen SCFA'lar, diyabetik nefropati gibi sistemik inflamatuar ve metabolik hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (301,302). Buna örnek olarak diyabet oluşturulan ve böbrek hasarı gelişmiş olan ratlarda nişasta ve liflerin fermentasyonu sonucu oluşan asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asidin diyabetik nefropati sonucu gelişen sistemik inflamasyon üzerine olan hafifletici etkileri verilebilir: Hu ve ark (2020), SCFA'ların pankreatik β-hücrelerinin metabolizması üzerine olumlu etkilerinin olduğunu ve diabet sonucu gelişen oksidatif stresi azaltabileceğini bildirmişlerdir (303).

SCFA TNF-α, IL-6 ve NO gibi proinflamatuar mediatörlerin üretimini baskılayarak anti-inflamatuvar etki gösterir. SCFA'lar, bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10' un salınımını da arttırır. Bu anti-inflamatuar etkilerin, SCFA'ların histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olarak işlevinin yanı sıra, G protein-bağlı reseptörler olan GPR41 ve GPR43'ün aktivasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir (304).

Bizim çalışmamızda da LPO düzeyleri, asetik asit ile ağrı modeli oluşturulan ve Rotenon+Asetik Asit uygulamasıyla ağrılı Parkinson modeli oluşturduğumuz gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Buna göre %5'lik asetik asidin 1 ay süre ile sadece rotenon verilen grup üzerine uygulanması lipit peroksidasyonu düzeylerini anlamlı derecede düşürmüştür. Bu verilere göre zebra balıklarına ağrı oluşturma amaçlı uygulanan % 5'lik asetik asit lipit peroksidasyonunu azaltıcı yönde etki göstermiştir. Yapılan çalışmalarda asetik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerinin stres koşullarını bertaraf etme yönünde etkili olabileceğini belirtmişlerdir (302,303). Ayrıca asetik asit gibi diğer kısa zincirli yağ asitlerinin de anti-inflamatuvar etkileri bulunmaktadır. Ayrıca LPO düzeyleri, Rotenon grubunda kontrol ve asetik asit uygulanan gruplara göre anlamlı derecede artmıştır. Bu veriler Parkinson hastalığında beyinde artmış lipit peroksidasyonu fikrini desteklemektedir (285,286,305,306).

Literatür taraması sonucunda PH' de LPO ile ilgili bazı çalışma sonuçlarının birbirini desteklediği ancak bazıları arasında da çelişkili sonuçların olduğunu gözledik.

Biz de oluşturduğumuz Parkinson modelinde tek başına lipit peroksidasyon ürünleri ölçümünün iyi bir biyobelirteç olamayacağı görüşünü savunmaktayız.

LPO membran akışkanlığını, geçirgenliğini ve membran protein aktivitesini bozarak hücre membran yapısının değişmesine sebep olur. Farelerde 6-OHDA ile intraserebroventrikülar olarak indüklenen PH modelinde kontrol grubuna göre striatum ve substantia nigrada MDA seviyelerinin anlamlı derecede arttığı, Western blotting ile analizi yapılan TH seviyeleri ve HPLC ile analizi yapılan DA seviyelerinde anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra dopaminerjik disfonksiyon sonucu lokomotor aktivitede de kontrole kıyasla 6-OHDA ile indüklenen grupta anlamlı derecede azalma görülmüştür. H-I Im ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada 6-OHDA ile farelerde uygulanan intraventriküler enjeksiyon sonucu HPLC analizi ile yapılan ölçüm sonucu strial DA ve DOPAC konsantrasyonlarında ve Western blotting ile analizi yapılan TH içeriğinde de kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede bir azalma olduğu bildirilmiştir (307).

Çalışmamızda rotenon ile oluşturduğumuz parkinson modelinde MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken DA, DOPAC konsantrasyonları ve *th* mRNA ekspresyonları ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu sonuçlara bakarak MDA artışı ile beraber dopaminerjik nöronlarda nörodejeneratif bir hasarın oluştuğunu ve bu nedenle nöronlarda DA, DOPAC ve *th* mRNA ekspresyon seviyelerinin rotenona maruz bırakılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını düşünmekteyiz.

Bunun yanı sıra dopaminerjik sistemle ilişkili olan lokomotor aktivitede (ortalama hız, katedilen mesafe) de kontrole kıyasla ROT grubunda anlamlı derecede bir azalma gördük. Asetik asit ile intraperitonel enjeksiyon sonucu AA grubunda kontrole ve ROT grubuna kıyasla LPO seviyelerinde, dopamin konsantrasyonunda ve lokomotor aktivitede anlamlı derecede azalma gördük. Asetik asidin intraperitonel enjeksiyonu sonucu akut olarak ağrı oluşmasını hedefledik. Oluşan bu ağrı aynı zamanda visseral ağrı sınıfına girmektedir. Bu ağrı ile lokomotor aktivitede düşüş olması beklenen bir sonuçtur. LPO seviyelerinde azalma ise asetik asidin anti-inflamatuvar etki gösteren kısa zincirli yağ asidi olmasından ve LPO seviyesini bu sebeple düşürmüş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu görüşü destekleyici olarak rotenon ile muamele sonrası asetik asit uyguladığımız ROT+AA grubunda LPO seviyesinin asetik asit uygulaması yapılmayan

kontrol ve ROT gruplarına kıyasla anlamlı derecede azalması gösterilebilir. Burada asetik asidin lipit peroksidasyonuna karşı iyileştirici etkisinden söz edilebilir.

NO nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar neticesinde oksijen ve arjinin amino asidinden ya nöronda sinir uyarısına cevap olarak ya da hücre membranındaki reseptöre bir uyarıcı molekülün bağlanmasıyla sentezlenir. NO farklı reaktif türlere kolaylıkla dönüşebilir ve radikal tepkimelerine katılır. NO vücutta düşük konsantrasyonlarda bulunur (271). Beyin dokusu örneklerinde ağırlıklı olarak nöronal NOS'u n(NOS) tespit edilmiştir. Daha az oranda ise endotelyal NOS'a e(NOS) rastlanır. Artan nNOS aktivitesi ve peroksinitrit üretimi, SN'de rotenon tarafından oluşturulan dopaminerjik hasarın indüklenmesinde nitrik oksidin önemini ortaya koymaktadır (308). NO sindirim sisteminin işleyişinde, kan basıncının regüle edilmesinde, immünitede ve hücre içinde çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynar. Ancak, aşırı NO üretimi hücre ölümüne yol açan biyokimyasal olayları tetikleyebilir (271,273).

Parkinson hastalığının patojenezinde nitrik oksit önemli bir role sahiptir. Nöronlarda NO üretimini arttıran bir diğer nörotoksik ajan da MPTP'dir. Beyin dokusunda hem nNOS hem de iNOS, MPTP nin neden olduğu dopaminerjik nöron ölümüyle ilişkilendirilmektedir (309–311).

Bu çalışmalar, nNOS veya iNOS konsantrasyonundaki azalmanın, SN'deki dopaminerjik nöronları MPTP toksisitesine karşı koruduğunu belirtmektedir. Bizim çalışmamızda da zebra balıklarının akvaryum içinde bir nörotoksin olan rotenona maruz bırakılması, bu balıklarının beyin dokularındaki NO düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırmıştır. Bu artışta özellikle nNOS'un etkili olduğu ileri sürülmektedir (309). Çalışmamızda NO konsantrasyonunun balıklarda rotenona maruz bırakılan grupların yanı sıra sadece asetik asit verilen ve ayrıca rotenona maruz bırakılıp bir süre sonra asetik asit enjeksiyonu yapılan gruplarda da kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözledik. Ancak biz bu NO artışının rotenon uygulamasının mitokondride solunum zincirini inhibe etmesinin yanı sıra asetik asitin zebra balığının periton bölgesine uygulanması sonucu tahriş edici etkisine bağlı olarak gelişen akut inflamasyon neticesinde ve dolayısıyla artacağını düşündüğümüz iNOS tarafından kaynaklandığını da düşünmekteyiz (279–281,312).

Çalışmamız SN'de rotenon kaynaklı nörotoksisitede nNOS aracılı NO artışını teyit etmektedir. Sonuçlarımız ayrıca NO sentezinin nöronların rotenona maruziyeti ile

indüklenebileceğini gösteren önceki çalışmalarla da tutarlılık göstermektedir (309–311,313). Literatürde NO ile birlikte diğer RNS'ler de rotenon kaynaklı nörotoksisite ile ilişkilendirilmektedir (313). Rotenon, substantia nigra ve striatumda hem iNOS (305) hem de nNOS (313) ekspresyonunu indüklemekle birlikte buna koşut olarak NO düzeylerini de arttırmıştır (285,314). NO'nun yüksek konsantrasyonları nöron hasarı yapar. NO·, mitokondride elektron transportu esnasında oksido-redüksiyon reaksiyonlarında görev alan FeS proteinlerinde demirin yerine bağlanarak Fenton tepkimelerine dahil olarak radikallerin üretimine katılır. NO, süperoksit veya moleküler oksijen ile reaksiyona girerek güçlü bir radikal olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna neden olur (271). Dolayısıyla ONOO−, NO toksisitesinin öncelikli sorumlularındandır. NO'nun stabil son ürünleri olan nitrat ve nitrite metabolize edilmesinin yanı sıra nöronlarda nitrojen dioksit ve dinitrojen trioksit (N_2O_3) gibi diğer RNS'ler de meydana gelebilir. Bu reaktif moleküller, proteinlerdeki tirozin kalıntılarının hem oksidasyonuna hem nitrolanmasına hem de tiyol gruplarının nitrosilasyonuna neden olur. Sonuçta nörodejenerasyon gelişir (315,316).

Literatür taraması sonucu elde ettiğimiz veriler, rotenonun SN'deki dopaminerjik toksisitesinin uygulanan doza, hayvanlara veriliş yoluna, maruziyet süresine ve çalışmalarda kullanılan hayvan türüne bağlı olarak farklı deneysel koşullar altında değişebileceğini açıkça göstermektedir. Çalışmamızda, SN'deki hasarı indüklemek adına balıkların akvaryum suyuna önceden belirlediğimiz 5 mikrogram/L lık rotenon eklenmiştir (317). Bunu takiben bir ay sonra balıkların beyin dopamin düzeylerinde belirgin bir azalma olduğunu tespit ettik. Bu değer bizden önce yapılmış olan çalışmalarda da mitokondriyal kompleks I aktivitesini etkin bir şekilde inhibe etmiştir (318). Çalışmamızdaki kronik rotenon uygulaması diğer çalışmalarla da uyumlu olarak NO seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırmıştır (279,319). Çalışmamızda rotenona maruz bırakılan zebra balıklarında NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Mitokondriyal kompleks I veya NADH-ubiquinone redüktaz inhibitörü olan rotenon, hücre içinde reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumunu arttırmakta, mitokondriyal fonksiyonu bozmakta ve apoptozu başlatan süperoksit radikali üretimine neden olmaktadır (320,321).

İntraperitoneal asetik aside maruz bırakılan zebra balıklarında NO seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Asetik asit enjeksiyonu ile uygulanan

Writhing testi özellikle analjezik veya anti-inflamatuar ajanları değerlendirme amacıyla yapılan bir testtir. Ağrı, asetik asit gibi tahriş edici maddelerin hayvanların periton boşluğuna enjeksiyonu ile indüklenir. Deney hayvanlarına intraperitoneal olarak asetik asit enjekte edildiğinde, periton bölgesinde ağrılı bir reaksiyon ve akut inflamasyon gelişir. Hayvanlar, bu teste yanıt olarak kıvrılma adı verilen karakteristik bir esneme davranışıyla tepki verirler. Verilen tepki kıvrılma, abdominal bölgede gerilme, arka bacakların uzaması, karın kaslarının kasılması veya gövdenin bükülmesi şeklinde olur (233). Zebra balıklarına asetik asit uygulanması sonucunda yukarıda belirttiğimiz kıvrılma, bükülme ve kasılma gibi tepkileri özellikle enjeksiyonun yapılmasını takiben ilk 6 dakika içinde bizlerde gözledik (312

,322). Literatürde inflamatuar, somatik ve viseral ağrının nitrik oksit ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (322,323). Gelişen inflamasyon ile ilişkili olarak hücreler tarafından inflamatuar yanıt verilirken, iNOS tarafından oluşturulan büyük miktarlardaki NO, genellikle nNOS veya eNOS tarafından yapılan fizyolojik NO miktarlarını aşar (324). Bizim çalışmamızda da periton bölgesine asetik asit verilen zebra balığı grubunun beyin dokularındaki NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir.

Vücut, toksik ajanlara karşı antioksidan vitaminler ve glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GP), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi koruyucu enzim sistemlerine sahiptir (271). Literatürdeki çok sayıda çalışma, düşük seviyedeki antioksidan enzim seviyeleri ile birlikte serbest radikallere maruz kalmanın nörodejenerasyona neden olabileceğini öne sürmektedir (325,326). Parkinson hastalığı dopaminerjik nöron kaybı ile karakterize multifaktöryel bir hastalıktır. Nörodejeneratif hastalıklarda ROS ve RNS'nin üretiminde farklı mekanizmalar rol oynayabilmekte ve bunlar arasındaki etkileşimler de nöronların dejenerasyon süreçlerinde önemli roller oynamaktadır (276). Orta beyin ve ona bitişik striatumdaki substantia nigra oksidatif hasardan en çok etkilenen bölgelerdir. Bununla birlikte, Parkinson hastalığındaki nörodejenerasyonun sadece dopaminerjik yolaklarla sınırlı olmadığı, aynı zamanda beynin diğer yolaklar ve yapılarındaki değişiklikleri içerdiği bildirilmektedir (327).

Parkinson hastalığında karakteristik olarak nigral hücrelerin dejenerasyonu gözlenir. SN'deki nöronlar oksidan strese karşı oldukça duyarlıdır. Bunun nedenlerinden

biri dopaminin oksidatif metabolizması sonucu serbest radikal üretebilme potansiyelleridir. Dopamin, monoamin oksidaz ile oksitlenebilmekte ya da otooksidasyon ile H_2O_2 oluşturabilir. Meydana gelen H_2O_2, demir iyonlarının varlığında hidroksil radikalini meydana getirmekte ve bunun neticesinde de nöronlar zarar görmektedir (328). Literatür taraması sonucu Parkinson hastalığında oksidatif stresle ilgili çalışma sonuçlarının homojen olmadığını gördük. Hücrelerce Parkinson hastalığına spesifik olarak hangi antioksidan enzimlerin kullanıldığını ve hangi oksidan stres belirteçlerinin tutarlı bir şekilde arttığını ortaya koyabilen çalışmalara rastlamadık (326,327,329). Bu durum bizim çalışmamız için de geçerlidir.

Glutatyon S-transferazlar, indirgenmiş glutatyonu ROS ve RNS'de dahil olmak üzere çeşitli substratlara konjuge etmede katalizör olarak işlev görür (330). Substantia nigradaki nöronlarda bulunan nöromelanin, demir birikimini ve demirin indirgenmesini sağlayarak lipit peroksidasyonuna ve bunun sonucunda hücre ölümüne neden olur. GSH H_2O_2'i glutatyon peroksidazın katalizlediği reaksiyonla detoksifiye edilmek suretiyle dopaminin normal şartlar altında turnover oranını arttırmakta ya da SN'deki GSH yetersizliği oksidatif hasarın gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenler göz önünde bulundurularak PH' nin moleküler düzeyde ilerlemesinin nedenlerinden birinin de SN'deki nöronlarda oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması olduğu düşünülmektedir (328). Glutatyon S-transferaz (GST), lineloik asit ve araşidonik asit hidroperoksitlerinin yanı sıra diğer lipit peroksitlerine karşı da GSH'ın toksik maddelere konjügasyonunu sağlamak suretiyle de antioksidan savunma sistemini destekler. GST bu görevinin yanı sıra hepatositlerde sitokrom P450 sistemi ile reaktif ürünlere dönüşebilen H_2O_2 gibi reaktif ürünlerin daha zararsız maddelere dönüşümünü sağlayarak oksidan strese karşı biyolojik membranları korur. Bunu fosfolipit hidroperoksitlerini redükte ederek gerçekleştirir (331).

Glutatyon S-transferazın PH' de nöronlar üzerine olan koruyucu etkisi, çeşitli modeller üzerinde incelenmiştir (332,333). Örneğin Drosofilalarda PARKIN geninin mutasyona uğratılması neticesinde protoserebral posterior lateral dopamin nöron kümesinde nöron kayıpları (332) oksidatif streste (333) artış ve tiyol transferaz aktivitesine sahip GSTO1 gen düzeylerinde kontrole göre anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Diğer taraftan, GSTS1 geninin ekspresyonunun indüklenmesi ise bu nörodejenerasyon üzerinde olumlu etkiler yapmıştır (332–334). GST' nin H_2O_2 ve süperoksit radikali ile

indüklenen oksidatif strese karşı korumadaki önemi, vücut hücrelerinin H_2O_2'e maruz kalmalarının ardından GST aktivitesinin arttığını ve in vivo ortamda GST'nin inhibisyonunu takiben LPO konsantrasyonunun yükseldiğini gösteren çalışmalarla da ortaya konmuştur (331,335).

Sudha ve arkadaşları (2003) Parkinsonlu hastaların eritrosit örneklerinde yaptıkları çalışmada antioksidan enzim düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlememişlerdir (328). Hasta grubunun SN'lerindeki CAT, GSHpx enzim aktivitelerinin ve redükte GSH konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak bu bulguları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ratlardaki çalışmalarında Parkinson modelini bizim uyguladığımız nörotoksinden farklı olarak MPTP ile oluşturmuşlardır. Elde ettikleri veriler post mortem beyinlerde yapılan diğer çalışmalarla desteklenmiştir (295,328).

Bizim çalışmamızda rotenonla oluşturulan Parkinson modelinde oluşturulan oksidatif hasar ETS'de H_20_2, süperoksit radikali ve beraberindeki NO artışı ile meydana gelmektedir. Yaptığımız çalışmada 1 ay süre ile rotenona maruz bırakılıp Parkinson modeli oluşturduğumuz grubun beyin dokularında NO konsantrasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk. Rotenona maruz bırakılan grubun GST düzeyleri Yang ve ark. (2001) ve Rao ve ark. (2000)' nın sonuçlarıyla uyumlu olacak şekilde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. GST eksprese eden hücreler rotenon aracılığı ile oluşan oksidatif hasarın önlenmesi adına ekspresyonlarını arttırmak suretiyle hücresel bir yanıt oluşturmuş ve GST konsantrasyonunun artmasına neden olmuşlardır (331,335). Bizim elde ettiğimiz veriler bu çalışmanın sonuçlarını destekler mahiyettedir.

Parkinson hastalığında özellikle substantia nigrada oksidan stresin arttığı bildirilmektedir. Hastalığın patolojisinin ortaya çıkarılması amacıyla beyin dokuları incelenmiş ve oksidatif değişiklikler gözlenmiştir (336). SOD süperoksit radikalinin ($O\cdot^-$) hidrojen H_2O_2 ve O_2'ye dönüşümünü katalizler. SOD aktivitesi, beyin gibi oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda artmaktadır (271). Beyin dokusunda ROS ve RNS'ler antioksidanlar aracılığı ile bertaraf edilerek hücreler oksidan stresten korunmaktadır. Beyin dokusunu oksidan stresten koruyan antioksidanlar öncelikli olarak SOD ve GSH'dır (337).

Literatürde Parkinson hastalarının plazma SOD düzeyleri ile ilgili yapılmış araştırmalara koşut olarak bizim çalışmamızda da beyin dokusu SOD düzeyleri anlamlı derecede azalmıştır (338–340). Bu azalma sadece balıkların rotenon uygulamasına tabi tutulduğu Parkinson modeli oluşturulan grup için geçerlidir. Buna karşılık Serra ve ark. (2001) ise eritrosit SOD düzeyinde anlamlı artış bildirmişlerdir (341). Zebra balıklarını 1 ay süre ile rotenonlu akvaryum suyuna maruz bırakıp daha sonra akut asetik asit uygulamasına tabi tuttuğumuz ve oluşturduğumuz ağrılı Parkinson modelindeki beyin dokularında ise SOD konsantrasyonları Serra ve arkadaşlarının çalışmalarındaki gibi kontrol grubuna göre artmış bulunmuştur (341).

Çalışmamızdaki kronik rotenon uygulaması diğer çalışmalarla da uyumlu olarak SOD düzeylerini anlamlı derecede düşürdü (338–340). Bunun yanı sıra lipit peroksidasyonunu ise anlamlı derecede arttırdı. Elde ettiğimiz bu veriler rotenonun SNdeki dopaminerjik toksisitesini doğruladı. Bu veriler literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur (342–344). Ojha ve ark. (2016), sıçanlara rotenon uygulamasının SOD ve CAT aktivitesini önemli ölçüde azalttığını bunun yanı sıra GSH konsantrasyonlarını düşürdüğünü bildirmiştir. ROS üretimindeki artış, antioksidan enzimlerin aktivitesindeki azalma, rotenon kaynaklı hasara aracılık eden süreç olan oksidatif strese yol açar (342).

Sinir hücreleri fizyolojik koşullar altında antioksidanlar tarafından ROS ve RNS'nin zararlı etkilerinden korunmaktadır. Ancak Parkinson hastalığı süresince hücrelerdeki antioksidan enzimlerin rezervlerinin düştüğü gözlenir. Çalışmamız neticesinde elde ettiğimiz verilere göre, Parkinson modeli oluşturduğumuz zebra balıklarının beyin dokularında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artan MDA düzeylerini tespit ettik. Bu durum oluşturduğumuz Parkinson hastalığı modelinde artan lipit peroksidasyonunun ve oksidatif stresin bir göstergesidir (345).

Ayrıca asetik asit ile ağrılı Parkinson modeli oluşturduğumuz balıkların beyin dokularında kontrol grubuna göre SOD enzim konsantrasyonunda anlamlı, GST enzim aktivitelerinde ise anlamsız hafif bir artış gözledik. SOD enzim düzeylerindeki artış nöron hasarına karşı etkin bir koruma sağlar (346). Bulgularımız bu hipotezi desteklemektedir. Çalışmamızda ağrısız Parkinson modeli oluşturduğumuz grupta ise SOD enzim düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu azalma Kaur ve arkadaşlarının (2008) bulgularıyla uyumludur (343). Bu durum beyin dokusundaki dopaminerjik nöronların oksidan hasara verdikleri yanıtın göstergesidir. Bu durumda oluşturduğumuz

modelde oksidan strese karşı verilen ilk yanıt beyin hücreleri tarafından SOD enziminin tüketilmesidir. Çalışmamızda antioksidan enzimler arasında aynı anda azalmalar, artmalar ya da anlamlılık düzeylerinde koşutluk saptanmamıştır. Bunun öncelikli nedeninin rotenonla indüklenen Parkinson modelinde oksidan stresin mitokondride süperoksit radikalinin oluşumu ile indüklenmesini takiben SOD enziminin süperoksit radikalini H_2O_2'ye dönüştürmesi, H_2O_2'nin de CAT enziminin katalizlediği reaksiyon ile su ve moleküler oksijene redüksiyonu sonucu SOD enziminin kullanılıp konsantrasyonunun azalması olduğu (271,347), GST'nin de sonraki aşamada kullanılacak olmasından dolayı GST enzim düzeylerinin ağrılı ve ağrısız Parkinson modelinde kontrole göre daha yüksek kaldığı tespit edilmiştir. GST'nin artışı ağrılı Parkinson modelinde kontrol grubuna göre anlamsız, ağrısız oluşturulan modelde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını tespit ettik.

Elde ettiğimiz verilerden, nörotoksik bir ajan olan rotenona maruz bırakılan balık gruplarında artmış olan lipit peroksidasyonuna yanıt olarak antioksidan sistemin uyarıldığını gözledik. Rotenona maruz bırakılan balık grubunda SOD enzim miktarı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken GST düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Biz bu artışın geçici olacağını düşünmekteyiz. Eğer deneyin uygulanma süresi uzatılacak olsaydı GST düzeylerinin bir süre sonra düşme eğilimine gireceğini düşünmekteyiz. Bunun nedeni Parkinson hastalığında gözlenen ve sürekli devam eden oksidatif stres sonucunda antioksidan savunma mekanizmalarının dışarıdan takviye edilmemesi durumunda tükenecek olmasıdır (343).

Çalışmamızda asetik asit verilip ağrı oluşturulan balık gruplarında lipit peroksidasyon düzeyleri ve GST enzim miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma, SOD enzim konsantrasyonunda ise anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Asetik asit 2 karbonlu kısa zincirli bir yağ asididir (348). Literatürde çok kısa zincirli yağ asitlerinin anti-inflamatuvar etkilerinden bahsedilmektedir. Bu etkiyi TNF-α, IL-6 ve NO gibi proinflamatuar mediatörlerin üretimini baskılayarak gösterir (302,348,349). Asetik asidin beyin hücreleri üzerine olan anti-inflamatuvar (348) etkisi gibi olumlu etkileri beyin dokularında SOD enzim düzeyini yüksek tutmuş olabilir.

Parkinson hastalığının altında yatan nedenler multifaktöryeldir. Hastalığın başlangıcının ve gelişiminin altında yatan mekanizma oksidan-antioksidan sistemlerle yakın ilişkilidir. Bu nedenle bu sistemlerin ve ilgili yolakların çok iyi açıklanması gerekir.

Ancak bu şekilde nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesi yavaşlatılacak ve iyileştirilebilmesi mümkün olabilecektir.

Asetilkolin beyin dokularında yaygın olarak bulunan kolinerjik sisteme dahil en önemli nörotransmitterlerden biridir. Lokomotor aktivitede önemli rol oynayan beynin striatum bölümünde dopamin ve kolinerjik sinyaller tersine hareket eder. Dopamin seviyesinin artışı asetilkolin salınımının durması ile aktive olur ve dopaminerjik sistem ile kolinerjik sistem arasında oran dengede tutularak normal lokomotor aktivitenin devamı sağlanır (350).

Harada ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, analjeziklerin intraperitonel asetik asit enjeksiyonu ile ortaya çıkan merkezi kolinerjik aktivitedeki artış ve kıvrılma tepkileri üzerindeki etkilerini araştırdı. Asetik asit enjeksiyonundan sonraki ilk 30 dakika içinde serebral korteksten ACh akışının önemli ölçüde arttığını ve ardından kontrol seviyelerine geri döndüğünü gördüler. Hipokampusta ise ACh akışında herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Merkezi olarak etkili analjezik morfin ve periferik olarak etkili analjezik indometasinin gelişmiş serebral kortikal ACh akışını ve kıvrılmayı tamamen ortadan kaldırırken, bir kas gevşetici olan diazepam seçici olarak sadece kıvranmayı baskıladığı görüldü. Bu sonuçlar, periferik nosiseptif stimülasyonun, hipokampusta değil, serebral kortekste kolinerjik aktiviteyi geçici olarak arttırdığını ve analjeziklerin hem artan ACh akışını hem de asetik asit tarafından indüklenen kıvrılmayı baskıladığını göstermektedir (351).

Striatumda dopamin ve asetilkolin sinyalleri arasında sıkı bir etkileşim vardır. Dopaminerjik nöronlar, M3 ve M5 muskarinik reseptörleri ve α4, α6 ve α2 alt birimi içeren nikotinik reseptörleri eksprese eder. Tersine, kolinerjik internöronlar dopamin reseptörleri D1 ve D5'i eksprese eder. Ek olarak, dopaminerjik nöronlar, D2 dopamin reseptörleri tarafından otomatik olarak inhibe edilir ve kolinerjik nöronlar, M2 ve M4 muskarinik reseptörler tarafından otomatik olarak inhibe edilir. Bu otoreseptörler, genel olarak, spesifik nörotransmiterlerin, yani sırasıyla dopamin veya asetilkolin salınımını inhibe eder. Striatumdaki tüm nöronlar, membran potansiyelindeki ritmik değişiklikleri ortaya çıkarır; bu nedenle hız ayarlayıcı (pacemaker) olarak kabul edilebilirler. Kolinerjik/dopaminerjik nöronlardan asetilkolin/dopamin salınımını etkileyen dopamin/asetilkolin reseptörlerinin varlığından çıkarılabileceği gibi, dopamin ve asetilkolin seviyelerinde fonksiyonel etkileşimler mevcuttur. Örneğin, asetilkolin

salınımı durdurularak dopamin salınımındaki bir artış aktive edilir. Kolinerjik internöronların ritmik ateşlemesi ve M4 muskarinik reseptörler tarafından asetilkolin salınımının otoinhibisyonunun kaybı, asetilkolinin düzensiz salınımına neden olur (350).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında ROT grubundaki AChE aktivitesinin anlamlı olarak arttığını gördük. Bununla beraber literatürle de uyumlu olarak dopamin seviyelerinde anlamlı derecede azalma gördük. Bu verilerin yanı sıra lokomotor aktivitesinde kontrole kıyasla anlamlı derecede azalma, AA ve ROT+AA grubunda ise dopamin seviyelerinde ve AChE aktivitesinde anlamlı derecede düşüş gözledik. Bununla birlikte lokomotor aktivitede kontrol ve ROT grubuna göre anlamlı derecede azalma gördük. **AChE aktivitesinde meydana gelen azalma asetilkolin salınımının artmasına neden olur** (350)**. Bu sonuçları değerlendirdiğimizde AA ve ROT+AA gruplarında asekilkolin salınımının arttığı görülmektedir. Literatürle uyumlu olarak asetik asit ile intraperitonel enjeksiyon sonucu asetilkolin salınımında artış görülmesi ağrının olışumunu işaret etmektedir. Kontrol ile kıyaslandığında AA ve ROT+AA gruplarında asetilkolin salınımının ağrı ile ilişkili olarak arttığını düşünmekteyiz. ROT grubunda ise kontrole kıyasla asetilkolin salınımının azalması PH oluşumu ile anlamlı olarak ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda PH modeli oluşturulan hayvanlarda asetilkolin salınımı ile birlikte dopamin seviyelerinin de azaldığı bildirilmektedir. Bununla beraber lokomotor aktivitenin de bozulduğu gözlenmiştir** (352)**.**

Noradrenalin (NA), α-adrenoseptörler yoluyla sinir aktivitesi nedeniyle asetilkolin salınımını inhibe eder. Sempatik bölümün postganglionik lifleri esas olarak norepinefrin salgılarken, postganglionik parasempatik lifler asetilkolin salgılar. Herman (1975) yapmış olduğu bir çalışmada ekzojen olarak iki farklı doz noradrenalin uygulanan farelerde düşük dozda lokomotor aktivitenin arttığı yüksek dozda ise hem lokomotor aktivitenin hem de keşfetme aktivitesinin azaldığını belirlemiştir. NA'nın bu iki doza bağımlı merkezi etkisi, farklı adrenoseptör bloke edici maddeler tarafından bastırılır veya tersine çevrilir. Bu sonuca dayanarak yüksek miktarda eksojen NA'nın neden olduğu davranışsal depresyonun B-adrenoseptör blokajından etkilenebileceği düşünülmüştür (353). Bizim çalışmamızda kontrol ile kıyaslandığında ROT grubunda NA miktarı, lokomotor aktivite ve keşfedilen alan anlamlı derecede azalırken asetilkolin esteraz aktivitesi artmıştır. Bu sonuç adrenerjik ve kolinerjik sistem arasındaki dengenin

literatürle de uyumlu olarak devam ettiğini göstermektedir. AA grubunda ise NA miktarı, lokomotor aktivite artarken asetilkolin esteraz aktivitesi azalmıştır. Buna neden olarak asetik asit maruziyetinden kaynaklanan b-adrenoreseptörlerinde bir blokajın meydana gelmesi düşünülebilir.

Tirozin hidroksilaz (TH), dopamin sentezinde önemli rol oynayan ve PH gelişimi ile ilişkili olabilen dopamin sentezi için hız sınırlayıcı bir enzimdir. Bazı çalışmalar, TH ekspresyonuna ve sentezine müdahale etmenin PH sıçanlarının nörolojik semptomlarını iyileştirebileceğini göstermiştir (354). PH, ciddi dopaminerjik nöron kaybı ve substantia nigrada dopamin tükenmesi ile karakterizedir. TH ekspresyonunun azalması, azalmış dopamin senteziyle sonuçlanır ve PH' ye yol açar; bu nedenle TH, PH patogenezinde önemlidir. Ayrıca, TH aktivitesinin düzensizliğinin PH' ye katkıda bulunacağı da gösterilmiştir (355). Örneğin, α-sinüklein, TH' yi yalnızca TH' nin Ser40' ında fosforilasyonu inhibe ederek değil, aynı zamanda dopamin sentezini azaltan ve parkinsonizme yol açan protein fosfataz 2A aktivitesini uyararak da bastırır. PH patogenezinde TH' nin bu çalışmalarına dayanarak, PH' de striatal TH ekspresyonunu iyileştirmeyi amaçlayan bir terapötik strateji geniş ilgi görmüştür (355).

TH periferik sempatik nöronlar ve ayrıca bağırsaktaki enterik nöronlar tarafından eksprese edilir. 30 yıldan fazla bir süre önce, TH beklenmedik bir şekilde gelişmekte olan ve yetişkin kemirgen kraniyal ve dorsal kök ganglion (DKG) nöronlarında keşfedildi. Yetişkin TH eksprese eden DKG nöronları, sıçan, kobay ve fare de dahil olmak üzere bazı türlerde de tespit edilmiştir. İnsanlarda, şimdiye kadar yalnızca embriyonik ekspresyon çalışılmıştır (356). Zebra balıklarında ise TH ekspresyonunun migratory DKG fenotipinin bir fonksiyonu olduğu öne sürülmüştür (357). DKG nöronları tarafından dopamin salımı, ağrıyı iki spesifik hedefte modüle eder: 1) Merkezi DKG sinir terminalleri ve 2) Lokal spinal internöronlar ve projeksiyon nöronları (358).

Sıçanda, siyatik sinir kronik daralma hasarının, L4-5 DKG' lerde azalmış TH mRNA içeriğine yol açtığı bildirimiştir (359). TH ekspresyonunun tipik olarak periferik sinir yaralanmasıyla azaldığı düşünülmektedir. Doku inflamasyonu gibi başka hasarlar da duyusal nöronlarda TH' nin ifadesinde değişikliklere neden olsa da hangi trofik faktör / lerin söz konusu olabileceği araştırmaya açık bir konudur (360).

Yukarıda belirtilen çalışmalara uygun olarak çalışmamızda da asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda *th* ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. *th* ifadesindeki azalma en fazla rotenon ile beraber asetik

asit uygulanan grupta, rotenon grubuna göre de azalmış olarak belirlenmiştir. Bu sonuçları destekleyici olarak histolojik analizlerimiz sonucunda kontrole kıyasla ROT grubunda TH ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığını gördük. AA ve ROT+AA grubunda da kontrole kıyasla TH ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. PH' de ağrı eşiğinin düşük olduğu ve nosiseptif yolaklarında aktivasyonun yüksek olduğu belirtilir. Bununla beraber Levodopa tedavisi ile ağrı kaynaklı nosiseptif yolaklardaki aktivasyonun azaldığı bildirilmiştir. Kontrole kıyasla AA, ROT ve ROT+AA gruplarında *th* mRNA ekspresyon seviyelerinin, dopamin seviyelerinin ve histolojik incelemelerdeki Tirozin hidroksilaz protein seviyelerindeki azalmalar bu verilerle uyumlu görünmektedir. Asetik asit ile intraperitoneal enjeksiyon sonucu oluşturulan ağrı modeli viseral ağrıya örnektir. Asetik asit ile muamele yapılan gruplarda *th* mRNA seviyeleri, katekolamin seviyelerindeki azalma asetik asit kaynaklı meydana gelen ağrının viseral olmasından kaynaklı olabilir. th ekspresyonu yapan DKG nöronlarında viseral olmayan ağrının etkisi açıklanırken *th* ekspresyonunun viseral ağrı üzerindeki etkisi netleşmemiştir (358)**. PH' de ağrı genel olarak motor semptomlarla yakından ilişkili nosiseptif ağrı ve anormal nosiseptif bilgi işlemeden kaynaklı nörapatik ağrı olarak tanımlanmaktadır. ROT gruplarında meydana gelen ağrı çeşidinden kaynaklı olarak asetik asit verilen gruplar arasında bu seviyelerdeki anlamlı farklılıklar gelişmiş olabilir.**

Mitokondriyal bozukluğun, herhangi bir nörodejenerasyon olmadan önce LRRK2' nin aktivasyonuna yol açabileceğini bildirilmiştir (72). Hem rotenon hem de yüksek α-sinükleinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu arttırıp LRRK2' yi aktive edebildiği öne sürülmüştür. LRRK2' nin insan PH'deki dopaminerjik nöronlarda aktive edildiğine dair bulgu, LRRK2 kinaz aktivitesinin çoğu PH vakasının patogenezinde merkezi bir rol oynayabileceği olasılığını artırmaktadır. Farelerin 5 gün süreyle rotenon uygulamasının nigrostriatal dopamin nöronlarında LRRK2' yi aktive ettiği gösterilmiştir (72).

Çalışmamızda *lrrk2* ifadesi asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Rotenon grubunda *lrrk2* ifadesi asetik asit grubuna göre; rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruptaki *lrrk2* ifadesi ise rotenon grubuna göre artmıştır. Rotenon

uygulanan gruplarda arttığını belirlediğimiz lipit peroksidasyon düzeyleri lrrk2'nin bu gruptaki artan ROS'a bağlı aktivasyonunun göstergesi olabilir.

LRRK2' nin hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların (ERK) spesifik aktivasyonu yoluyla SNCA transkripsiyonunu arttırabileceği bildirilmektedir (361). Lewy cisimcikleri (LC), PH'nin patolojik özelliğidir. LC' lerin ana protein bileşeni olan α-sinüklein, ailesel ve sporadik PH' de yer alan anahtar moleküllerden biridir. Anormal α-sinüklein birikimi, beynin yerleşik immün hücreleri olan mikrogliayı anormal şekilde aktive ederek hem nöronal disfonksiyonu hem de nöroinflamasyonu teşvik edebilir (362). Mikroglial aktivasyon, mikrogliaların lokal çevrelerindeki değişikliklere yanıt verdiği ve buna göre merkezi sinir sistemi işlevine katkılarını dinamik olarak değiştirdiği normal bir biyolojik süreçtir. Başka bir deyişle, LRRK2, ya α-sinükleine yanıt veren reseptör yollarının ortaklığına ya da çoklu mikroglial sinyal zincirlerinde potansiyel bir katılıma dayalı olarak α-sinüklein kaynaklı mikroglial aktivasyona aracılık edebilir (363). Bu, PH ile ilişkili genlerin, anormal bağışıklık tepkilerine katılarak inflamasyon aracılı nörodejenerasyonun ilerlemesini tetikleyebileceğini gösterir (364).

Çalışmamızda rotenon uygulanan gruplarda artan *lrrk* ile beraber artan *sncga* ifadesi LRRK ile sinükleinlerin paralel artışını ispatlar niteliktedir. Rotenon grubunda asetik asit uygulaması sncga ifadesinde rotenon grubuna kıyasla daha da fazla bir artışa neden olmuştur.

Mitokondriyal PTEN (fosfataz ve tensin homologu) ile indüklenen kinaz1 (PINK1, PARK6) mutasyonları, resesif PH' nin önemli nedenlerindendir. Fonksiyon kaybı ve aşırı ekspresyonla ilgili çalışmalar, PINK1' i apoptoz, anormal mitokondriyal morfoloji, bozulmuş dopamin salınımı ve motor bozukluklarını gösterir. Bununla birlikte, bu çeşitli fenotiplerin altında yatan temel mekanizma açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir. Meyve sineği ve fare modellerini kullanarak, PINK1 eksikliğinin veya klinik mutasyonların, mitokondriyal solunum zincirinin Kompleks I işlevini etkilediğini ve bunun, mitokondriyal depolarizasyona ve memeli hücrelerinde ve dokularında apoptotik strese karşı artan duyarlılığa neden olduğu gösterilmiştir (365).

PINK1 insan beyninin her yerinde bulunan bir mitokondriyal serin / treonin kinazı kodlar. Son kanıtlar, PINK1' in fizyolojik rolünün, hücresel strese yanıt olarak mitokondriyal proteinlerin fosforilasyonunu ve mitokondrinin çeşitli stresörlere karşı korunmasını içerdiğini göstermektedir (366).

Çalışmamızda ***pink1*** **ifadesi asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artmıştır. En fazla artış rotenon uygulanan grupta gözlenmiştir. Asetik asit grubunda gözlenen artışın rotenonlu gruplardan daha az olmasının nedeni bu grupta yüksek SOD aktivitesi ile düşük LPO ile belirlenen diğer gruplara göre nispeten daha düşük ROS düzeylerine bağlanabilir.**

Park2 geni tarafından kodlanan Parkin, bir ubikitin E3 ligazdır ve ubikitin aracılı proteazomal degradasyon yoluna katılır. Park2 geninin kodlama bölgelerindeki mutasyonlar, genellikle erken dönem PH'nin en yaygın nedeni olarak gösterilir ve bunu PINK1 gen varyantları izler. Parkin fonksiyonunun kaybına mitokondriyal bütünlüğün bozulmasına yol açabilmektedir (367).

Parkin mutasyonları sporadik PH' de rol oynayabilir. Ek olarak parkin, sporadik PH' de anahtar patojenik süreçler olan nitrozatif stres, dopaminerjik stres ve oksidatif stres nedeniyle inaktive olur (368). Hem PINK1 hem de Parkin'in PH' de hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Rotenon, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasıyla tutarlı olarak hem SH-SY5Y hücrelerinde hem de enjekte edilen farelerde α-sinüklein ve PINK1 ekspresyonunu artırırken TH ve Parkin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (369).

Çalışmamızda da ***park2*** **ifadesi asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. En fazla azalma asetik asitle beraber rotenon uygulanan grupta gözlenmiştir.**

Park7 tarafından kodlanan DJ-1 işlevinin kaybının PH ilişkili olduğu gösterilmiştir. Klinik olarak, DJ-1 mutasyonları olan PH hastaları, erken bir diskinezi, sertlik ve titreme başlangıcı sergiler, ardından daha sonra psikotik bozukluk, anksiyete ve bilişsel gerileme gibi psikiyatrik semptomlar gösterir.

DJ-1 oksidatif stresi algılayabilir. DJ-1, bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar tamamen açık olmasa da, oksidatif stresten korunmada rol oynar. DJ-1 aşırı ekspresyonu oksidatif hasarı bloke ederken, oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümü, hücre kültürü ve hayvan modellerinde DJ-1 yokluğunda artar. Bununla beraber DJ-1 işlevinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır (370).

Çalışmamızda *park7* ifadesi asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. En fazla artış asetik asitle beraber rotenon uygulanan grupta gözlenmiştir.

Nörotrofin ailesinin bir üyesi olan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nöronal uyarılabilirliğin ve sinaptik plastisitenin bir modülatörü olarak işlev görür (371). Nörotrofinler esas olarak MSS' de, fakat aynı zamanda T ve B lenfositleri, monositler, vasküler endotelyal ve düz ve iskelet kası hücreleri gibi nöronal olmayan periferik hücrelerde sentezlenir. BDNF ekspresyonu hipokampus, frontal korteks, orta beyin, amigdala, hipotalamus, striatum (ST), pons ve medulla oblongata'da doğrulandı. BDNF, hücre farklılaşması, nöronal gelişim, büyüme ve hayatta kalma, nörogenez, sinaptogenez ve sinaptik plastisiteyi etkileyerek sinir sisteminin gelişiminde anahtar rol oynar. Ayrıca, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıkların, BDNF' nin yetersiz nöronal beslenmesi ve diğer nörotrofik faktörlerle ilişkili sinaptik plastisitedeki kusurlardan kısmen kaynaklanabileceği gösterilmiştir (97).

Çalışmamızda *bdnf* ifadesi asetik asit grubunda kontrol grubuna göre artmıştır. Rotenon ve asetik asit uygulanan rotenon gruplarında ise *bdnf* ifadesinde anlamlı derecede azalma olmuştur. Asetik asit uygulanan rotenon grubundaki azalma rotenon grubuna göre daha fazla olarak belirlenmiştir.

Nosiseptörden türetilen BDNF' nin, spinal nöronların uyarılabilirliğini düzenlediğini ve iltihaplı ağrıda önemli bir rol oynadığı gösterilmişti (372). BDNF ifadesinin kronik ağrıdaki rolü bazı hiperaljezi çalışmalarında, migrende kalıcı ağrıya aracılık etmede ve akut inflamasyonu takiben gösterilmiştir (373,374). Bununla birlikte, tek başına duyu nöronlarından salınan BDNF' nin akut ağrıdan kronik ağrıya geçişe aracılık edip edemeyeceği hala bilinmemektedir. Duyu nöronlarında ifade edilen BDNF' nin akut mekanik ağrı için gerekli olmadığı, ancak iltihaplanma, nöropati ve hiperaljezik hazırlama modellerinde akuttan kronik ağrıya geçiş için kritik olduğu bildirilmiştir (371).

Çalışmamızda cox-1 ekspresyonu asetik asit grubunda artarken, rotenon ve asetik asit uygulanan rotenon gruplarında azalmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, inflamasyonun nörodejeneratif bir durum geliştirme riskini artırdığını göstermektedir (375). Buna uygun olarak, siklooksijenaz tip 2 (COX-2) enziminin artmış ekspresyonu ve yüksek prostaglandin E2 (PGE2) seviyeleri ile ilişkili inflamatuvar süreçler, çeşitli patolojik durumlarda nörodejenerasyona yol açan zararlı olaylar zincirinde rol oynamıştır. COX, araşidonik asidi PGE2' nin öncüsü olan PGH2' ye ve diğer bazı

prostanoidlere dönüştürür ve ökaryotik hücrelerde iki ana izoformda bulunur: COX-1, birçok hücre tipinde yapısal olarak eksprese edilir ve normalde çoğu hücrede bulunmayan ancak iltihaplı dokularda ekspresyonu kolaylıkla indüklenebilen COX-2' dir. Her iki izoform PGH2' yi sentezlese de, COX-1 esas olarak fizyolojik süreçlerle ilgili prostanoidlerin üretiminde yer alırken, COX-2 esas olarak patolojik olaylarla bağlantılı prostanoidlerin üretiminden sorumludur (376).

Prostaglandinlerin nöropatik ağrıda rolü oldukça tartışmalıdır ve kullanılan modele bağlıdır. Son zamanlarda COX-1' in omurilikte ekspresyonunda artış gözlendiği için önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. COX-1, omurilikteki mikroglial hücrelerde eksprese edilir. Bu hücreler periferik sinir hasarına yanıt olarak çoğalırlar. Gözlenen COX-1 "artan regülasyonu" bu nedenle muhtemelen proinflamatuvar mediyatörlerin salınmasıyla nöropatik ağrının gelişimine katkıda bulunan mikroglial hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu yansıtır (377). Ancak COX-1'in kesin rolü bilinmemektedir. Prostaglandin aracılı etkilere ek olarak, siklooksijenazlar, endojen kannabinoid, anandamidin oksidatif metabolizmasında rol oynarlar. Bu nedenle endojen ağrı savunma sistemini modifiye edebilir. COX-2 ise periferik sinir hasarına yanıt olarak omurilikte çok hafif artış göstermiştir, bu da nöropatik ağrıya katkısının daha az önemli olduğunu düşündürmektedir. Buna neden olarak, siklooksijenaz aktivitesi inhibitörlerinin (geleneksel NSAID'ler ve seçici COX-2 inhibitörleri), klinik uygulamada nöropatik ağrının azaltılmasında genellikle etkisiz olduğu gösterilebilir (378).

Beyindeki siklooksijenaz (COX) ekspresyonu, PH gibi nörodejeneratif süreçlerde etkili olan proinflamatuar aktivitelerle ilişkilidir. COX-1 ağırlıklı olarak mikrogliada lokalizedir ve glial inflamatuvar yanıtta başrol oynayabilir. Epidemiyolojik kanıtlar, hastalığın ilerlemesinin azalmasından ziyade seçici olmayan NSAID kullanımıyla PH gelişim riskinin azaldığına işaret edebilir. Bununla birlikte, COX-1 inhibisyonunun potansiyel koruyucu etkisinin yanı sıra PH' deki NSAID' nin COX' ten bağımsız etkilerinin daha fazla araştırılması gerekir (379).

COX-2' nin PH' nin patogenezinde rol oynadığını ve bu hastalıkta nöronal kaybın seçiciliği için potansiyel bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir. COX-2 inhibisyonundan farklı olarak, COX-1 inhibisyonunun MPTP' ye karşı herhangi bir koruma üretmede başarısız olduğu, bunun da COX-1'in değil ama COX-2 ekspresyonunun MPTP nörotoksisintesinde etkili olabildiği bildirilmiştir (380).

Çalışmamızda rotenon uygulanan zebra balıklarında *cox-1* mRNA ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlenmiştir. Bu bulgumuzu destekler nitelikte önceki yapılan çalışmalarda periferik dokulardaki COX-1 mRNA ve protein seviyesinin akut inflamasyon sırasında değişmediği bildirilmiştir (381,382). Liu ve ark. (1996) ise lipopolisakkaritlerin (LPS) sistemik uygulanmasının ardından sıçanların miyokardiyal ve plevral dokularında COX-1 mRNA seviyesinde 2 ila 5 kat azalma olduğu bildirilmiştir (383). Benzer bir çalışmada, LPS enjeksiyonundan bir saat sonra rodent böbrek medullasında COX-1 mRNA düzeyinde azalma bildirmiştir (384). İnsanlarda akut doku hasarı ve inflamasyonunun COX-2 mRNA düzeyinin artmasını uyarırken, LPS gibi bağışıklık uyaranlarına benzer şekilde COX-1 mRNA transkripsiyonunu geçici olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (383–385).

Asit algılayan iyon kanalları (ASIC' ler), hücre dışı H^+ için uyarıcı reseptörlerdir. Önemli işlevler arasında sinaptik iletim ve periferal ağrı algısı vardır. Bu işlevlerin fizyolojik önemine rağmen, ASIC' lerin kesin rolü henüz belirlenmemiştir. ASIC' ler, hücre dışı H^+ tarafından aktive edilen Na^+ kanallarıdır. Merkezi sinir sisteminde, sinaptik veziküller asidik olduğundan (pH 5,7), H^+ diğer vericilerle birlikte salınır. Bu nedenle, ASIC' ler uyarıcı reseptörler olarak hareket edebilir. İnflamasyon sırasında, hücre dışı H^+ konsantrasyonu da önemli ölçüde artabilir. ASIC' ler bu nedenle periferik sinir sistemindeki ağrılı uyaranların algılanmasına katkıda bulunabilir.

ASIC' ler, omurgalılarda duyusal bilgilerin işlenmesinde korunmuş bir role sahip olduğu görülmektedir. Trigeminal ganglion, kafadan somatosensoriyel bilgi taşıyan nöronları içerir. Yüksek omurgalıların reseptör türleri arasında kutanöz dokunma reseptörleri, kemoreseptörler ve nosiseptörler bulunur. Bu temel reseptör türlerinin varlığı, balıkların trigeminal ganglionlarında gösterilmiştir (236). Özellikle nosiseptörlerin kafa bölgesini innerve ettiği ve asit enjeksiyonunun balıklarda ağrı algısı ile tutarlı bir davranış ortaya çıkardığı gösterilmiştir (386). Memeli ASIC1' de olduğu gibi, *zasic1.1* de nosiseptörlerde ifade edilebilir ve ağrılı uyaranlar için bir reseptör görevi görebilir.

Çalışmamızda *zasic 1.1, zasic 1.2* ve *zasic 1.3* ifadeleri asetik asit ve rotenon uygulamaları ile artmıştır. En belirgin artış *zasic 1.3*'te gözlenmiştir. Rotenon ile beraber asetik asit uygunlandığında ise *zasic 1.1* ve *zasic 1.2* ifadelerinde asetik asit ve rotenon gruplarına göre azalma meydana gelmiştir. *zasic 1.3* ifadesi ise tüm gruplarda artmıştır.

Ekzojen asidik solüsyonlara maruz kalma ağrıya neden olur. Asidik bir ortam, birçok patofizyolojik ve ağrılı durumun ortak bir özelliğidir. Hücre dışı pH, fizyolojik koşullarda 7,4' ten, iltihaplanma, hematomlar, ödem, kırıklar, iskemi veya kanser gibi patofizyolojik durumlarda 6' ya kadar düşebilir. İnflamasyon sırasında doku asidozu, uyarılmış mast hücrelerinin ve göç eden lökositlerin asit degranülasyonundan veya asidik içeriklerini açığa çıkaran parçalanmış hücrelerden kaynaklanabilir. Ek olarak, kas, kalp veya beyin iskemisindeki doku asidozu, oksijen yokluğunda laktik asit üretiminden kaynaklanır. Düşük pH, nosiseptörlerde, ASIC' ler ve TRPV1 şeklinde iki tür iyon kanalını etkinleştirebilir. ASIC' ler hızla aktive olan sodyum akımlarına aracılık eder. TRPV1'in aktivasyonu için, ASIC1 ve 3' ten daha düşük pH (pH <6) gerektirir ve yavaşça aktive olan ve inaktive olan seçici olmayan katyon akımına yol açar. TRPV1 aracılı akımların kinetiğinin ASIC' lere göre asitle uyarılan ağrı fizyolojisi ile daha uyumlu görünmesine rağmen, her iki kanal türünün de asit kaynaklı nosisepsiyona katıldığı öne sürülmüştür (387). Asitle indüklenen nöronal ölüm inhibitörlerinin ROS oluşumunu da baskıladığı gösterilmiştir, bu da ROS' un asitle indüklenen nekroz üzerinde potansiyel bir pro-nekrotik etkisi olduğunu gösterir. ROS üretiminin asit kaynaklı hücre ölümü için gerekli olmadığı gösterilmiştir (388).

Çalışmamızda *trpa1* ifadesi asetik asit uygulaması hem asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulaması ile artmıştır. Katyon kanalı geçici reseptör potansiyeli ankirin 1 (TRPA1), TRP kanalların süper ailesinin bir üyesidir. Trigeminal, vagal ve dorsal kök gangliyonlarının primer duyu nöronlarının bir alt popülasyonunda lokalizedir. Nosiseptörlerin bu alt kümesi, nörojenik inflamatuvar tepkilere aracılık eden nöropeptid maddesi P (SP) ve kalsitonin geni ile ilişkili peptidi (CGRP) üretir ve salınımını sağlar. TRPA1, bitkisel kökenli moleküller, çevresel tahriş edici maddeler ve ilaçlar dahil olmak üzere bir dizi ekzojen bileşik tarafından aktive edilir. Bununla birlikte, TRPA1'in en belirgin özelliği, oksidatif ve nitratif stresin reaktif ürünlerine karşı çok belirgin hassasiyetidir (389).

İnflamasyon, nosiseptif duyusal nöron aktivasyonuna neden olarak, semptomların zayıflatılmasına dair refleksleri uyandırır. İnflamatuar sinyal yolakları, mitokondriyal işlevi modüle edebilir, bu da reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, mitokondriyal depolarizasyon ve kalsiyum salınımı ile sonuçlanır. TRPA1, ROS' a duyarlı olduğu ve TRPV1'in ROS tarafından etkinleştirildiği gösterilmiştir (390). TRPA1, potansiyel olarak tehlikeli maddelerin algılanmasında önemli bir rol oynar. TRPA1'nın tek başına

aktivasyonunun, daha önce ağrı oluşumunda rol oynadığı gösterilen diğer reseptörlerden bağımsız olarak, insanlarda ağrıyı ortaya çıkarmak için yeterli olduğunu göstermiştir.

TRPA1'in en belirgin özelliği, oksidatif ve nitratif stresin reaktif ürünlerine karşı çok belirgin hassasiyetidir (389). Çalışmamızda *trpa1* ekspresyonu ile beraber NO düzeyleri de tüm gruplarda artmıştır. TRPA1'nın tek başına aktivasyonunun, daha önce ağrı oluşumunda rol oynadığı gösterilen diğer reseptörlerden bağımsız olarak, insanlarda ağrıyı ortaya çıkarmak için yeterli olduğunu göstermiştir.

Hayvan çalışmalarında TRPA1'in, doku hasarı için çok önemli bir sensör görevi gördüğü ve böylece sinir sisteminin hayati bir işlevini temsil eden ağrı algısına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (391). Bunlar nöropatik ağrı ile beraber iltihaplı ağrıyı veya kolit ve pankreatit gibi iç organ iltihabını içerir. Ayrıca, iskemi sonrası ikincil inflamasyonda ve kemoterapiye bağlı periferik nöropatik ağrı veya diyabetik nöropatilerde rol oynar (392).

Nosiseptörler, aşırı sıcaklık, mekanik (yüksek basınç gibi) veya kimyasallar (düşük basınç gibi endojen aracılar olabilen) zararlı uyaranları tespit eden özelleşmiş birincil duyu nöronlarıdır. Bu nöronlar farklı uyaranları dönüştürmek için ligand kapılı iyon kanalları ve G proteinine bağlı reseptörlerin kompleks dizilerini içerir. Ek olarak, bu nöronlar voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC' ler) ifade ederler. VGSC' ler somatosensoriyel sinir sisteminin her seviyesinde önemlidir. Nav1.6, Scn8a geni tarafından kodlanır ve merkezi sinir sistemindeki ana voltaj kapılı sodyum kanallarından biridir. Nav1.6 proteini, aksiyon potansiyellerinin başlamasını düzenler ve aksonal başlangıç segmentindeki nöronlar içinde yoğunlaşmıştır.

Son zamanlarda, insan nöropatik ağrı bozukluğu olan trigeminal nevraljiyle ilişkili NaV1.6 işlev kazanımı mutasyonu bildirildirilmiştir bu da NaV1.6'nın ağrı yolundaki rolünün daha fazla araştırılması ihtiyacını vurgulamıştır (393). Bir dizi çalışmada da Nav1.6 nöropatik ağrı durumları ile ilişkilendirilmiştir. Nav1.6'nın duyusal nöronlar tarafından ekspresyonunun, ağrılı diyabetik nöropati geliştiren tip II diyabetli mutant fare modelinde de arttığı gösterilmiştir (394). **Çalışmamızda da *scn8a* ifadesi asetik asit grubunda artarken rotenon ve asetik asit uygulanan rotenon gruplarında azalmıştır.**

Zebra balığı embriyolarında nav1.6a'nın morfolino ile susturulmasının, kontrollere kıyasla 2, 3 ve 5 günlük morfant embriyoların dokunma hassasiyetini azalttığı bulunmuştur (395). **Çalışmamızda asetik asit uygulanan grupta *scn8a* ifadesindeki**

artış indüklenen ağrıya bağlıdır. Rotenon ve asetik uygulanan rotenon gruplarındaki *scn8a* ifadesindeki azalma ağrı hissini azaltmaya dair bir kontrol mekanizmasına bağlı olabilir.

Çeşitli çalışmalar, VGSC' nin mikroglianın morfolojik transformasyonu, göçü ve fagositozu gibi bir dizi hücresel işlevi düzenleyebileceğini göstermiştir. Bu aynı zamanda VGSC' nin potansiyel immünomodülatör özelliklerini de gösterir. 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) ile indüklenen PH sıçan modelinde, hipokampustaki Nav1.1, Nav1.3 ve Nav1.6 ifadelerinin dopamin tükenmesinden sonra farklı zaman noktalarında dinamik olarak arttığını bulunmuştur. Ayrıca, beyindeki VGSC' ler üzerinde inhibe edici etkilere sahip olan fenitoin (sodyum kanal bloker) ile bilişsel eksiklikler etkili bir şekilde iyileştirilmiştir (396).

Ağrı sinyalinin iletilebilmesi için Na kanalları depolarize olur ve aksiyon potansiyelinin artışıyla da ağrı sinyali iletilir, fakat Na kanalı alt ünitelerinde meydana gelen defektler ile ağrının iletimi bozulur. Bu da ağrıyı algılamada duyarsızlığa (hiposensisitive) neden olur. Cummins ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada spesifik bir voltaj kapılı Na kanalındaki tam işlev kaybı ağrıya duyarlılığın azalmasına neden olduğunu ifade etmeleri bu bilgiyi destekler niteliktedir (397). Nav1.6 proteini, aksiyon potansiyellerinin başlamasını düzenler ve aksonal başlangıç segmentindeki nöronlar içinde yoğunlaşmıştır. Burada ROT+AA grubunda scn8aa ekspresyonu azalmıştır. Zararlı bir uyaran MSS' e giden aksiyon potansiyellerini artırmak için Ca ve Na kanallarıyla güçlendirilmiş bir elektrik sinyaline dönüştürülür. Bu bize ağrının iletimi için gerekli olan aksiyon potansiyelinin başlatılamadığını işaret eder. Aksiyon potansiyeli başlatılamadıysa ağrının iletimi olmaz. AA grubunda *scn8aa* mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Buna karşılık ROT ve ROT+AA gruplarında *scn8aa* ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum rotenon ile PH modeli oluşturulan zebra balıklarında ağrıya duyarlığın azalması olarak düşünülebilir. ROT ve ROT+AA gruplarındaki *penk* ve *pdyn* mRNA ekspresyonlarının azalması sonuçları da bunu destekler niteliktedir. AA grubunda ise *scn8aa* eksperesyonu artmış ve asetik asit kaynaklı ağrı oluşumu davranış testleri ve vücut kıvrılması ile de gösterilmiştir.

POMC, MSH'lerin ve adrenokortikotrofinin (ACTH) yanı sıra β-endorfinin öncüsüdür. Zebra balıklarında Pomc genleri pomca ve pomcb olarak duplike olmuş haldedir. Endojen opioid peptidler, sırasıyla proopiomelanokortin (POMC), proenkefalin

(PENK) ve prodinorfin (PDYN) genleri tarafından kodlanan proopiomelanokortin, proenkefalin A ve prodinorfin (proenkefalin B) öncül proteinlerinden türetilir.

Çalışmamızda *pomca* ve *pomcb* ifadeleri tüm gruplarda kontrole göre artmıştır. *pomca* ifadesindeki en büyük artış asetik asit uygulanan rotenon grubunda gerçekleşmiştir. *pomcb* ifadesinde ise artış asetik asit uygulanan grupta rotenon grubuna göre daha belirgindi. Çalışmamızda artan *pomc* ifadesi POMC tarafından üretilen nörokoruyucu faktörlerin sentezlenmesine dair koruyucu bir mekanizma olarak düşünülmektedir. Örneğin pro-opiomelanokortinlerin (POMC) proteolitik bölünmeden elde edilen melanokortinler, alfa, beta ve gamma-melanosit uyarıcı homonları (MSH) ve adrenokortikotropini (ACTH) içerir ve melanokorinlerin antiinflamatuvar ve nöronkoruyucu etkileri bilinmektedir (166)**.**

Pro-enkefalin, met-enkefalinin başlıca biyolojik kaynağıdır ve aynı zamanda bir leu-enkefalin kaynağıdır. Met-enkefalin içeren peptidler, merkezi sinir sistemi, adrenal medulla, gastrointestinal sistem ve diğer birçok dokuda mevcuttur. Met-enkefalini sentezleyen nöronlar, merkezi sinir sistemi boyunca kapsamlı bir şekilde dağılmıştır bu da enkefalini beyinde en yaygın olarak dağıtılan opioid haline getirir (188,398,399).

Parkinson hastalığının altında yatan orta beyin dopaminerjik hücre ölümünün, nöronlarda pre-enkefalin (pENK) yukarı regülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile maymunlarda oluşturulan PH modelinde pENK mRNA'nın striatal ekspresyonunun artmasının, PH ile ilişkili motor semptomları hafifletmek için telafi edici bir mekanizma olabileceği bildirilmiştir. Hastalığın erken aşamasında artan pENK ekspresyonunun PH semptomlarını iyileştirebileceği öne sürülmüştür (400).

Çalışmamızda ise *penka* ifadesi asetik asit grubunda artarken rotenon ve asetik asit uygulanan rotenon gruplarında azalmıştır. *penka* ifadesindeki en büyük azalma ise asetik asit uygulanan rotenon grubunda görülmüştür. Çalışmamızın bulgularına benzer olarak insanlarda yapılan başka bir çalışmada ise hem pENK hem de pDYN mRNA seviyelerinin, genç kontrollere kıyasla yaşlı kontrollerin ve PH' den etkilenen yaşlı bireylerin putamenlerinde azaldığı gösterilmiştir (401).

Pro-dinorfin (DynA) (pro-enkefalin B olarak da anılır), hipotalamus, hipokampus, beyin sapı, amigdala ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminin pek çok yerinde bulunur. dynA, analjeziye neden olan iyi belgelenmiş opioid etkilere sahiptir. dynA'nın nöropatik ağrı ve inflamatuvar ağrı dahil olmak üzere stresörlere

yanıtta arttığı gösterilmiştir. Kronik artritik ağrı modelinde ön hipofizde, talamusta ve omurilikte dynA'da bir artış görülmüştür (402). Öte yandan Spinal sinir ligasyonu olan prodinorfin nakavt farelerde dynA'nın ağrının başlaması için gerekli olmadığı, bunun yerine ağrının sürdürülmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (403).

Çalışmamızda *pdyn* ifadesi asetik asit grubunda artarken rotenon ve asetik asit uygulanan rotenon gruplarında azalmıştır. K-opioid-reseptör aktivasyonunun analjezik özelliklerinden beklendiği gibi, Pdyn-knockout fareler, hot-plate ve tail-flick testlerinde artmış ağrı tepkisi göstermiştir. Bu veriler, dinorfinler tarafından aktive edilen κ-opioid reseptörlerinin antinosiseptif özellikleri teşvik ettiğini kanıtlamıştır (404).

Mylius ve ark. (2021) yaptıkları araştırmalara göre PH' de ağrıyı nosiseptif, nöropatik ve nöroplastik ağrı olarak üç sınıfa ayırıyorlar. Nosiseptif ağrıda, nosiseptörler, nöral olmayan dokulardaki gerçek veya potansiyel lezyonla ilgili mekanik, termal veya mekanik uyaranlarla aktive edilir. Osteoartrit gibi kas-iskelet sistemi (MSK) ağrı sendromlarının çoğunu ve doku lezyonu veya inflamasyonun baskın olduğu diğer inflamatuar durumları içerir. Nöropatik ağrı, spesifik özellikleri (karıncalanma, yanma veya elektrik çarpması benzeri duyumlar) ve yeri (nörolojik olarak makul) olan, periferik veya merkezi somatosensoriyel sistemin bir lezyonu veya hastalığı ile ilişkilidir. Nociplastik ağrı sendromları, gerçek veya potansiyel doku hasarına bağlı olarak somatosensör sistem lezyonu veya nosiseptörlerin periferal aktivasyonu kanıtı olmaksızın nosiseptif sistemin aşırı aktif olduğu durumları içerir (405). Zahra Reisi ve ark.' nın (2014) yaptıkları çalışmaya göre opioiderjik ve dopaminerjik sistemler arasında karşılıklı etkileşimin olduğu ileri sürülmüştür. Opioiderjik nöronlar ayrıca beynin CA1 (dorsal hipokampus) bölgesindeki dopaminerjik sistemin modülasyonu yoluyla antinosiseptif etkiler de sergilediler. Dopaminerjik sistem, kalıcı inflamatuar ağrıyı düzenler. Dopamin salınımı, VTA veya NAc'deki opioiderjik nöronların aktivitesi ile accumbens çekirdeğinde gerçekleşir (406). Tüm bu bilgiler doğrultusunda ROT ve ROT+AA gruplarında dopamin seviyeleri ile beraber *penk* ve *pdyn* mRNA ekspresyonlarının azalması dopaminerjik system ile opioiderjik system araındaki etkileşimin bozulduğunun göstergesi olabilir. Met-ENK proteini ile yaptığımız immünohistokimyasal boyamalar sonucu da kontrole kıyasla beynin diensefalon bölgesinde AA grubunda Met-ENK ekpsresyonu artarken, ROT ve ROT+AA gruplarında aynı bölgelerde Met-ENK ekspresyonu daha az artmıştır. Bu sonuçlar da bize PH durumunda ağrı ile ekzojen indükleme sonucu opioid sistemde bir defekt meydana geldiğini işaret etmektedir. Ağrı

oluşumunda beynin aşağı inen inhibitor yolağında opioid system devreye girerek ağrıyı inhibe etmeye ya da azaltmaya çalışır. Bizim çalışmamızda ROT ve ROT+AA gruplarında Met-ENK ekspresyonlarının AA grubuna göre anlamlı olarak azalmasının nedeninin opioid sistemin PH' de bozulmasına ve ağrıyı daha fazla hissetmesine neden olduğunu gösteriyor olabilir. Bu durum da PH' de ağrıya aşırı hassasiyetin opioiderjik yolak üzerinden etkisini açıklamak için anlamlı bir veri olduğunu düşünüyoruz.

Opioid reseptörleri insan vücudunda geniş çapta dağılmıştır ve çok sayıda fizyolojik süreçte hayati öneme sahiptir. Bunlar, merkezi ve periferik sinir sisteminde ağrı sinyali, üreme, büyüme, solunum ve immünolojik yanıtı içerir. Endojen opioid sistemi, hücre yüzeyi reseptörlerinden ve bunların endojen ligandlarından oluşur. Opioid reseptörleri üç ana türe ayrılmıştır: μ (mu, MOR), δ (delta, DOR) ve κ (kappa, KOR). MSS'de opioid reseptörleri, ağrı modüle edici yollarda eksprese edilir ve esas olarak ağrı sinyali verme ve antinosisepsiyonda rol oynar. Opioid reseptörlerinin aktivasyonu, inhibitör nörotransmiterlerin salınmasını ve nöronal uyarılabilirlikteki değişiklikleri içeren pre ve postsinaptik mekanizmalarla nöronal aktiviteyi zayıflatır (407). Delta tipi opioid reseptörü (OPRD1) endojen enkefalinler ve diğer opioidlerin bir alt kümesi için reseptör olarak işlev gören G-protein bağlı reseptördür. Ligandın bağlanması G proteinleri aracılığıyla sinyali tetikleyen ve adenilat siklaz gibi aşağı akış efektörlerinin aktivitesini modüle eden bir konformasyon değişikliğine neden olur. Sinyalizasyon adenilat siklaz aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. Kalsiyum iyon akımlarını azaltarak ve potasyum iyonu iletkenliğini artırarak nörotransmiter salınımını engeller. Ağrının algılanmasında ve opioid aracılı analjezide rol oynar (408). OPRL1 geni tarafından kodlanan protein, endojen, opioid ile ilişkili nöropeptid, nosiseptin / orfanin FQ için bir reseptör olarak işlev görür. Bu reseptör-ligand sistemi, stres tepkileri ve anksiyete davranışı, öğrenme ve hafıza, lokomotor aktivite ve iltihaplanma ve bağışıklık tepkileri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonları ve nörodavranışı modüle eder. Erkeklerde, yüksek OPRM1 mRNA ekspresyon seviyeleri, motorlu araç kazasını takiben altı hafta sonra artan kas ve kemik ağrısı şiddeti ile anlamlı şekilde ilişkili olarak bildirilmiştir (409).

Çalışmamızda *oprm1* ifadesi asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda kontrole göre artmıştır. Ayrıca rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda asetik asit grubuna göre de anlamlı derecede artış görülmüştür. Cormier-Dequaire ve ark. (2018) bulgumuza uygun olarak

OPRM1'in PH'deki uyarı kontrol bozuklukları ve ilgili davranışlarla ilişkili olabileceğini bildirmiştir (410).

Opioid peptid ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili olarak, opioid reseptör seviyeleri de PH' de değişebilmektedir. Dopamin tükenmesi opioid reseptör bağlanmalarında genel bir azalmaya neden olabildiği gösterilmiştir (411).

Çalışmamızda ise sadece asetik asit uygulanan grupta opioid reseptörlerden oprd1b'de azalma görülmüştür. Rotenon grubunda ise *oprd1b* ifadesinde artış olmuş, rotenon grubuna asetik asit uygulanması ile azalma meydana gelmiştir. Delta opioid sinyalizasyon sisteminin nörokorumada, nörogenezde ve nöronal farklılaşmada kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (412). Delta - opioid reseptörünün (DOR) aktivasyonu hipoksik / iskemik hasara karşı nöronları korur (413). Bu etki, hipoksik / iskemik hasar görmüş yaşlı bir beyinde DA nöron hasarının önlenmesi için faydalı olabilir. Daha yakın zamanlarda, DOR aktivasyonunun yararlı bir hücresel ve moleküler sinyal düzenlemesi ile antiparkinsonizm etkisi olduğunu gösteren in vitro PH modellerinden kanıtlar bildirilmiştir (414). Mabrouk ve arkadaşları (2014) ayrıca DOR aktivasyonunun semptomatik tedavi için yararlı bir hedef olabileceğini bulmuşlardır (415). İnsanlarda yapılan PH çalışmalarında ve diğer çalışmalardan elde edilen bu veriler, DOR sisteminin PH tedavisi için bir hedef olabileceğini kuvvetle düşündürmektedir (416).

***oprk1* ve *oprl1* ifadelerinde rotenon gruplarında artış olmuş ve bu artış asetik asit uygulaması ile beraber daha da şiddetli gözlenmiştir. Asetik asit uygulaması artan *pdyn* ifadesi ile beraber *oprk1* ifadesinin de artmasına neden olmuştur. *pdyn* geni tarafından kodlanan protein, opioid peptidleri beta-endorfin, dinorfin, leu-enkefalin oluşturmak için proteolitik olarak işlenen bir preproproteindir. Bu peptitler, kappa tipi opioid reseptörü için ligandlardır. Dolayısıyla artan pdyn ifadesi ile beraber *oprk1* ifadesinin de artması birbirine uyumlu bulgulardır.**

OPRM1 bağlanma seviyeleri, kronik L-DOPA uygulaması altındaki PH hastalarının hem kaudatında hem de putameninde azaldığı gösterilmiştir (417). Öte yandan, sıçan L-DOPA kaynaklı diskinezi modellerinin premotor ve motor korteksinde OPRM1 ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (399). Bu nedenle, PH ve L-DOPA kaynaklı diskinezide farklı beyin bölgelerinde opioid peptid ve reseptör ekspresyonunun farklı değişikliklerini araştırmak önemlidir.

Son bilgiler, supraspinal bölgelerdeki ağrı algısının ve doğal analjezinin modüle edilmesinde dopaminerjik nörotransmisyonun merkezi bir rolü olduğunu göstermiştir. Serotonin ve norepinefrinin ağrının inhibisyonuna katılımı iyi bilinirken, bu inhibisyonda dopaminin kritik bir rolü de gösterilmiştir. Azalan dopamin seviyeleri, Parkinson hastalığında sıklıkla ortaya çıkan ağrılı semptomlara muhtemelen katkıda bulunmaktadır. Dahası, dopaminerjik nörotransmisyondaki anormallikler, ağız yanması sendromu, fibromiyalji ve huzursuz bacak sendromu dahil ağrılı klinik durumlarda objektif olarak gösterilmiştir. Hayvan modellerinden elde edilen kanıtlar ve farmasötik çalışmalardan elde edilen dolaylı kanıtlar, kronik bölgesel ağrı sendromunda ve ağrılı diyabetik nöropatide dopaminin rolünü de ortaya koymaktadır (418).

Deneysel ve klinik çalışmalar, dopaminin analjezik etkiler yaratabileceğini göstermektedir. Dopaminin bu ağrı düzenleyici etkilerinin, artan nosiseptif sinyaller üzerindeki doğrudan ve / veya ağrının bilişsel ve duygusal yönleri üzerindeki dolaylı etkilerden kaynaklandığı hipotezi öne sürülmüştür (419). 5-hidroksitriptaminin (5-HT, serotonin), beyin ve nosiseptif iletimin spinal inhibisyonunda önemli rolü vardır. Davranışsal çalışmalar, 5-HT' nin, ya afferent fiber hiperpolarizasyonu ya da presinaptik eylem yoluyla nosisepsiyon üzerinde beynin uyguladığı kontrolde rol oynadığını ortaya koymuştur. Serotonerjik projeksiyonun yok edilmesi nosisepsiyonu etkiler. Serotonerjik eksiklik hem ruhsal depresyonda hem de kronik ağrıda ortak bir faktördür (420).

Literatürde kronik ağrısı olan hastalarda daha düşük D2-reseptör bağlanmasına ve striatumda istirahatte ve akut ağrı uyarısından sonra düşük presinaptik dopamin aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Hayvan çalışmalarında kronik ağrı, azalmış c-Fos aktivasyonuna ve genel dopamin seviyelerinde ve striatal D2 reseptörlerinde azalmaya neden olmuştur (421–423).

Buna uygun olarak çalışmamızda da asetik asit, rotenon ve rotenon ile beraber asetik asit uygulanan gruplarda beyin dopamin düzeyleri kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır. En dramatik azalma asetik asit uygulanan grupta görülmüştür. Asetik asit uygulanan rotenon grubunda dopamin düzeylerinde rotenon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber azalma meydana gelmiştir.

3,4-dihidroksifenilasetik asit (DOPAC) ve homovanillik asittir (HVA) dopaminerjik aktiviteyi gösterir; düşük DOPAC düzeyleri azalmış dopamin

metabolizmasının hızını yansıtır (424). Beyin omurilik sıvısında DOPAC değerlerinin, PH hastalığının şiddeti ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (425).

Çalışmamızda DOPAC düzeyleri asetik asit uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, rotenon ve asetik asit uygulanan rotenon gruplarında azalmıştır. Asetik asit uygulanan rotenon grubunda dopac düzeyleri rotenon grubuna göre anlamlı derecede artmıştır.

Sıçanda inflamatuvar ağrı modelinde beyinde dopamin ve metabolitlerinin (DOPAC ve HVA) salınımının yanı sıra dopamin D1 ve D2 reseptörlerinin mRNA ekspresyonunun ölçüldüğü çalışmada inflamasyondan sonra dopamin, Dopac ve HVA salınımında kademeli bir düşüş belirlenmiştir (426). Aynı çalışmada, iltihaplanma ile indüklenen dopamin seviyelerinin ağrı ile ilişkili davranış seviyesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda serotonin düzeyleri gruplar arasında değişiklik göstermemiştir. İnflamasyonda ve hücre hasarından sonra, salınan serotonin (5-HT) monoamin oksidaz (MAO) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) tarafından 5-hidroksiindolasetik aside (5-HIAA) dönüştürülür. Serotonerjik nöronal aktivitenin göstergeleri olarak 5-HIAA'nın beyin omurilik sıvısı seviyeleri kullanılmaktadır (427). **Çalışmamızda serotonin düzeyleri gruplar arasında değişmemekle beraber 5-HIAA düzeyleri asetik asit grubunda ve rotenon gruplarında kontrole göre artmıştır. Rotenon ile beraber asetik asit verilen grupta ise 5-HIAA düzeyleri rotenon grubuna göre azalmıştır.**

Norepinefrin düzeyleri asetik asit uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır; rotenon grubunda ise azalmıştır. Asetik asit uygulanan rotenon grubunda ise norepinefrin düzeyleri rotenon grubuna göre anlamlı derecede artış meydana gelmiştir.

Noradrenalin, α2-adrenerjik reseptörler aracılığıyla akut ağrıyı pre-sinaptik (nörotransmiter salınımını inhibe ederek) ve post-sinaptik (hiperpolarize hücre zarları) mekanizmalarla inhibe eder. Bununla birlikte, nöropatik ağrı durumlarında, kolinerjik internöronlardaki α2-adrenerjik reseptörler, sinir hasarından sonra artan beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) etkisiyle G-protein geçişi yoluyla (Gi'den Gs'ye) inhibitörden uyarıcıya değişir. Salgılanan asetilkolin muskarinik reseptörlere bağlanır ve bu sayede GABA salımı ile analjezi üretir (428).

Çalışmamızda da asetik asit uygulanan grupta hem norepinefrin düzeyleri hem de bdnf ifadesi artmış olarak bulunmuştur. PH, motor defektlere ek olarak, motor olmayan semptomlarla da karakterizedir. Beyindeki noradrenalinin kaybının, hem motor hem de motor dışı defektlerde rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır (429).

PH' de dopaminerjik nöronların ölümünün nöronlarda pENK mRNA seviyelerinin yukarı regülasyonu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Opioid reseptörlerine bağlanarak aktive olan Met-ENK' nin PH' de nöroprotektif olarak etki göstermek amacıyla arttığı belirtilmektedir (400). Çalışmamızda kontrole kıyasla dopamin seviyelerinin, *th* mRNA ekspresyonunun azaldığı ROT grubunda mRNA seviyesinde opioid reseptör genleri *oprm1*, *oprk1*, *oprl1* ve *oprd1*b' nin ekspresyonu artarken immunohistokimya sonuçlarımızda elde ettiğimiz met-ENK proteininin de ekspresyonunun ROT grubunda beynin diensefelon bölgesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını gördük. Elde ettiğimiz bu sonuçlar met-ENK' in PH' de nöroprotektif etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. AA grubunda kontrole kıyasla Met-ENK ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır. Asetik asit ile indüklenen ağrının oluşumu nedeniyle Met-ENK ekspresyonunun arttığını düşünüyoruz. Bu bulgumuzu destekleyici olarak opioid reseptör genlerinin ekspresyonunda da mRNA düzeyinde anlamlı derecede artış olmuştur. ROT+AA grubunda kontrole kıyasla Met-ENK seviyelerinde de anlamlı derecede artış gördük. ROT+AA grubunda RT-PCR ile analizi yapılan *penka* mRNA ekspresyonu kontrole kıyasla anlamlı derecede azalmıştır. Yaptığımız histolojik analizlerde zebra balığı beyninde diensefalon bölgesindeki preoptik alan ve çevresinde Met-ENK ekspresyonunda kontrole kıyasla anlamlı derecede artış gördük. RT-PCR analizi ise tüm beyin dokusundan elde edilen homojenat ile yapılan RNA izolasyonu ve mRNA eldesi sonucu penka geninin ekspresyonunu belirlemek için yapılan analizdir. Histolojik analiz ile RT-PCR analizlerindeki ROT+AA gruplarındaki farklılığın nedeninin bu olduğunu düşünüyoruz. Sonuç olarak kontrol ile kıyaslandığında Met-ENK seviyelerinde anlamlı derecede artış olması ağrıda ve PH' de Met-Enkefalinin analjezik ve nöroprotektif etkisi olduğunu düşündürmektedir.

PH substantia nigra pars compacta' daki dopaminerjik nöronların yaklaşık olarak % 70' inin, striatum' daki dopaminerjik nöronların büyük bir kısmının dejenere olmasının ardından intrasitoplazmik kalıntılar olarak bilinen Lewy cisimciklerinin (LC) oluşması sonucu meydana gelir (6). PH dopamin üreten hücrelerin hasara uğraması nedeniyle

yeterli miktarda dopamin üretilememesi sonucu gelişir. Tirozin hidroksilaz dopamin üretimi sağlayan reaksiyonu katalizleyen anahtar enzimdir. Çalışmamızda TH antikoru ile yaptığımız immünohistokimyasal boyamalar sonucu kontrol grubuna kıyasla AA, ROT ve ROT+AA gruplarında TH ekspresyonunun diensefelon bölgesindeki **posteriyer tuberkulum ve çevresinde** anlamlı derecede azaldığını gördük. ROT grubunda AA gruplarına kıyasla TH ekspresyonunda anlamlı derecede azaldığını gördük. ROT+AA grubunda ise ROT grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir azalma gördük. Rotenon uygulanarak PH modeli oluşturulan grupta TH ekpresyonunun düşmesi dopaminerjik nöronlarda dejenerasyon olduğunu işaret etmektedir.

Betarbet ve ark (2000) çalışmalarında, Rotenon ile PH modeli oluşturulduğunda elektron transport zincirindeki kompleks I'in inhibe olduğu ve bununla beraber dopaminerjik nöronlarda belirgin bir dejenerasyon meydana geldiğini belirtilmektedir (279). Çalışmamızda dopamin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olarak görev yapan tirozin hidroksilazın zebra balığı beyin dokusunda histolojik incelemesi sonucu diensefalon bölgesindeki posteriyer tuberkulum ve çevresinde kontrol grubu ile kıyaslandığında rotenon uygulanan grupta TH ekpresyonunun anlamlı derecede azaldığını gördük. Bu sonuç bize rotenon uygulanan grupta dopaminerjik nöronlarda dopamin sentezinin bozulduğunu göstermektedir. Asetik asit verdiğimiz grupta da kontrol grubu ile kıyaslandığında TH ekspresyonunda anlamlı derecede azalma gördük. Bu durum, ağrı oluşumu sonucu dopaminerjik nöronlarda dejenerasyon olduğunun göstergesi olabilir. Changsheng Li ve ark. (2019) göre dopaminerjik sistem hem aşağı inen hem de yukarı çıkan beyin yolaklarında bulunmaktadır. Bu nedenle dopaminerjik sistemin ağrının modülasyonunda ağrıyı hem tetikleyici hem de engelleyici olmak üzere iki farklı etkiye sahip olduğunu belirtmektedir (269). Thompson ve ark. (2017)'ın yaptıkları çalışmaya göre, dopaminerjik nörotransmisyonun azalması dopamin aracılığıyla ağrıyı önleyen beyinden aşağı inen yolakların aktivasyonunun azalması sonucu doğal analjeziyi bozabilir. Bu inen yolaklar omurilikte substantia nigrada' dan substantia gelatinosa' ya iner ve çıkan nosiseptif sinyallerin iletimini engeller (430). Sonuçlarımızda kontrole kıyasla ağrı oluşturmak için asetik asit verilen grupta TH ekspresyonun anlamlı derecede azalması dopaminerjik sistemin ağrıyı modüle etmeye çalıştığının bir göstergesi olabilir. LC-MS/MS sonuçlarımızda da kontrol ile kıyaslandığında dopamin seviyelerinde asetik asit uygulanan grupta anlamlı derecede azalma tespit ettik. Dopamin ve ağrı arasındaki ilişkiyi ortaya koymak adına elde ettiğimiz veriler birbiriyle tutarlılık göstermektedir. Bu

verilerimiz dopaminerjik sistem ve ağrı arasındaki ilişkiyi literatüre de uyumlu olarak yansıtnaktadır (269,430) .

Parkinson hastalığında ağrı ile ilişkili moleküler mekanizmaların ekzojen bir ajan olarak asetik asit ile indüklenen ağrı modelinde nasıl değiştiğini belirlemek için yaptığımız çalışmamızda literatürdeki diğer ilgili çalışmalara uygun olarak zebra balıklarının hem nörotoksinlerle oluşturulan PH modelinde hem de ağrı araştırmaları için uygun bir model bir olduğunu gösterdik. Çalışmamızda ilk defa rotenon ile oluşturulan PH modelinde ekzojen ağrı olarak asetik asit uygulamasının dopaminerjik ve kolinerjik yolaklarda meydana getirdiği değişiklikleri gösterdik. Bulgularımız rotenon ile oluşturulan PH modelinde asetik asit uygulamasının zebra balıklarında periferik ağrının algılanmasında rol oynayan asit algılayan iyon kanallarının, enkefalinler ile oksidatif hasar ve nöroinflamasyon ile ilgili parametreler üzerinden ağrıya yanıt ile ilgili mekanizmaların bozulduğunu işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior.Anesthesiology. 2011;115(6):1363–81.
2. Mistry C, Bawor M, Desai D, Marsh D, Samaan Z. Genetics of Opioid Dependence: A Review of the Genetic Contribution to Opioid Dependence. Curr Psychiatry Rev. 2014;10(2):156–67.
3. Smith ESJ, Lewin GR. Nociceptors: a phylogenetic view. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 2009;195(12):1089–106.
4. Lawson SN, Waddell PJ. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. J Physiol. 1991;435(1):41–63.
5. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. J Neural Transm. 2017;124(8):901–5.
6. Sarkar S, Raymick J, Imam S. Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: Recent perspectives. International Journal of Molecular Sciences. 2016;17(6): 904.
7. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D ve ark. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. Mov Disord. 2017;32(9):1264–310.
8. Jankovic J, Rousseaux MWC, Shulman JM. Progress toward an integrated understanding of Parkinson's disease. F1000Research. 2017;6:1121.
9. York GK. The history of James Parkinson and his disease. J Neurol Sci. 2017;381:35.
10. Draoui A, El Hiba O, Aimrane A, El Khiat A, Gamrani H. Parkinson's disease: From bench to bedside. Rev Neurol. 2020;176(7–8):543–59.
11. Deng H, Wang P, Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. Ageing Res Rev. 2018;42:72–85.
12. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. Clin Geriatr Med. 2020;36(1):1–12.
13. Fleury V, Brindel P, Nicastro N, Burkhard PR. Descriptive epidemiology of parkinsonism in the Canton of Geneva, Switzerland. Park Relat Disord. 2018;54:30–9.
14. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. Lancet Neurol. 2016;15(12):1257–72.
15. Okubadejo NU, Bower JH, Rocca WA, Maraganore DM. Parkinson's disease in Africa: A systematic review of epidemiologic and genetic studies. Mov Disord. 2006;21(12):2150–6.
16. Dotchin C, Msuya O, Kissima J, Massawe J, Mhina A, Moshy A, ve ark. The prevalence of Parkinson's disease in rural Tanzania. Mov Disord.

2008;23(11):1567–672.

17. Türk Nöroloji Derneği. Dünya Parkinson Günü. 2021 https://www.noroloji.org.tr/haber/989/dunya-parkinson-gunu

18. Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Influence of strict, intermediate, and broad diagnostic criteria on the age- and sex-specific incidence of Parkinson's disease. Mov Disord. 2000;15(5):819–25.

19. Bezard E, Fernagut PO. Premotor parkinsonism models. Park Relat Disord. 2014;20(1):17–9.

20. Blanchet PJ, Brefel-Courbon C. Chronic pain and pain processing in Parkinson's disease. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2018;87:200–6.

21. Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, Seppi K, Compta Y, Katzenschlager R, ve ark. The onset of nonmotor symptoms in parkinson's disease (the onset pd study). Mov Disord. 2015;30(2):229–37.

22. O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: A clinicopathological study. Mov Disord. 2008;23(1):101–6.

23. Nègre-Pagès L, Regragui W, Bouhassira D, Grandjean H, Rascol O. Chronic pain in Parkinson's disease: The cross-sectional French DoPaMiP survey. Mov Disord. 2008;23(10):1361–9.

24. Rieu I, Houeto JL, Pereira B, De Chazeron I, Bichon A, Chéreau I ve ark. Impact of Mood and Behavioral Disorders on Quality of Life in Parkinson's disease. J Parkinsons Dis. 2016;6(1):267–77.

25. Stern MB, Lang A, Poewe W. Toward a redefinition of Parkinson's disease. Mov Disord. 2012;27(1):54–60.

26. Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W. The concept of prodromal Parkinson's disease. J Parkinsons Dis. 2015;5(4):681–97.

27. Darweesh SKL, Verlinden VJA, Stricker BH, Hofman A, Koudstaal PJ, Ikram MA. Trajectories of prediagnostic functioning in Parkinson's disease. Brain. 2017;140(2):429–41.

28. Crowley EK, Nolan YM, Sullivan AM. Exercise as a therapeutic intervention for motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: Evidence from rodent models. Progress in Neurobiology. 2019;172: 2–22.

29. Aarsland D, Larsen JP, Tandberg E, Laake K. Predictors of nursing home placement in Parkinson's disease: A population-based, prospective study. J Am Geriatr Soc. 2000;48(8):938–42.

30. Findley L, Aujla M, Bain PG, Baker M, Beech C, Bowman C ve ark. Direct economic impact of Parkinson's disease: A research survey in the United Kingdom. Mov Disord. 2003;18(10):1139–45.

31. Ahlskog JE. Challenging conventional wisdom: The etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. Mov Disord. 2005;20(3):271–82.

32. Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP ve ark. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. Mov Disord [Internet]. 2009 Aug 15;24(11):1641–9.

33. Vichayanrat E, Low DA, Iodice V, Stuebner E, Hagen EM, Mathias CJ. Twenty-four-hour ambulatory blood pressure and heart rate profiles in diagnosing orthostatic hypotension in Parkinson's disease and multiple system atrophy. Eur J Neurol. 2017;24(1):90–7.

34. Umehara T, Nakahara A, Matsuno H, Toyoda C, Oka H. Body weight and dysautonomia in early Parkinson's disease. Acta Neurol Scand. 2017;135(5):560–7.

35. Rada D, Seco J, Echevarría E, Tijero B, Abecia LC, Gómez-Esteban JC. Dysautonomia Differentially Influences the Effect of Affective Pain Perception on Quality of Life in Parkinson's Disease Patients. Parkinsons Dis. 2016; 2016:3067426.

36. Pfeiffer RF. Gastrointestinal, urological, and sexual dysfunction in Parkinson's disease. Mov Disord. 2010;25(1):94–7.

37. Faivre F, Joshi A, Bezard E, Barrot M. The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2019;96:335–52.

38. Wasner G, Deuschl G. Pains in Parkinson disease-many syndromes under one umbrella. Nat Rev Neurol. 2012;8(5):284–94.

39. Allen NE, Wong CM, Canning CG, Moloney N. The association between Parkinson's disease motor impairments and pain. Pain Med. 2016;17(3):456–62.

40. Beiske AG, Loge JH, Rønningen A, Svensson E. Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. Pain. 2009;141(1–2):173–7.

41. Lee MA, Walker RW, Hildreth TJ, Prentice WM. A Survey of Pain in Idiopathic Parkinson's Disease. J Pain Symptom Manage. 2006;32(5):462–9.

42. Wasner G, Deuschl G. Pains in Parkinson disease-many syndromes under one umbrella. Nature Reviews Neurology. 2012;8:284–94.

43. Blanchet PJ, Brefel-Courbon C. Chronic pain and pain processing in Parkinson's disease. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2018;87:200–6.

44. Brefel-Courbon C, Payoux P, Thalamas C, Ory F, Quelven I, Chollet F ve ark. Effects of levodopa on pain threshold in Parkinson's disease: A clinical and positron emission tomography study. Mov Disord. 2005;20(12):1557–63.

45. Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. Vol. 18, Nature Reviews Neuroscience. Nature Publishing Group; 2017;18:435–50.

46. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience. 2012;211:39–50.

47. Carey RJ. Acute ipsilateral hyperalgesia and chronic contralateral hypoalgesia after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. Exp Neurol. 1986;91(2):277–84.

48. Chen CC V., Shih YYI, Chang C. Dopaminergic imaging of nonmotor manifestations in a rat model of Parkinson's disease by fMRI. Neurobiol Dis. 2013;49(1):99–106.

49. Cao L-F, Peng X-Y, Huang Y, Wang B, Zhou F-M, Cheng R-X ve ark. Restoring Spinal Noradrenergic Inhibitory Tone Attenuates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Parkinson's Disease. Neural Plast. 2016;2016:6383240.

50. Chudler EH, Lu Y. Nociceptive behavioral responses to chemical, thermal and mechanical stimulation after unilateral, intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine. Brain Res. 2008;1213:41–7.

51. Gee LE, Chen N, Ramirez-Zamora A, Shin DS, Pilitsis JG. The effects of subthalamic deep brain stimulation on mechanical and thermal thresholds in 6OHDA-lesioned rats. Eur J Neurosci. 2015;42(4):2061–9.

52. Gómez-Paz A, Drucker-Colín R, Milán-Aldaco D, Palomero-Rivero M, Ambriz-Tututi M. Intrastriatal Chromospheres' Transplant Reduces Nociception in Hemiparkinsonian Rats. Neuroscience. 2018;387:123–34.

53. Nascimento GC, Bariotto-dos-Santos K, Leite-Panissi CRA, Del-Bel EA, Bortolanza M. Nociceptive Response to l-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. Neurotox Res. 2018;34(4):799–807.

54. Park J, Lim CS, Seo H, Park CA, Zhuo M, Kaang BK ve ark. Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Mol Pain. 2015];11(1):28.

55. Rosemann M, Ivashkevich A, Favor J, Dalke C, Hölter SM, Becker L ve ark. Microphthalmia, parkinsonism, and enhanced nociception in Pitx3 416insG mice. Mamm Genome. 2010;21(1–2):13–27.

56. Saadé NE, Atweh SF, Bahuth NB, Jabbur SJ. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. Brain Res. 1997;751(1):1–12.

57. Takeda R, Ikeda T, Tsuda F, Abe H, Hashiguchi H, Ishida Y ve ark. Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation. Neurosci Res. 2005;52(1):31–6.

58. Wang Y, Liu W, Yang J, Wang F, Sima Y, Zhong Z min ve ark. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. Neurotoxicology. 2017;58:103–9.

59. Zengin-Toktas Y, Ferrier J, Durif F, Llorca PM, Authier N. Bilateral lesions of the nigrostriatal pathways are associated with chronic mechanical pain hypersensitivity in rats. Neurosci Res. 2013;76(4):261–4.

60. Pingale T, Gupta GL. Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2020;199:73060.

61. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The Role of Lipids in Parkinson's Disease. Cells. 2019;8(1):27.

62. Rouaud T, Corbillé AG, Leclair-Visonneau L, de Guilhem de Lataillade A, Lionnet A, Preterre C ve ark. Pathophysiology of Parkinson's disease: Mitochondria, alpha-synuclein and much more… Revue Neurologique. Elsevier Masson s.r.l.; 2021;177:260–71.

63. Finberg JPM. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. J Neural Transm. 2019;126(4):433–48.

64. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S ve ark. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science (80-). 2004;304(5674):1158–60.

65. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. Neuron. 2015;85(2):257–73.

66. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Lalongo T, Frontali M ve ark. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. Am J Hum Genet. 2001;68(4):895–900.

67. Valente EM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MMB ve ark. Park6-linked parkinsonism occurs in several european families. Ann Neurol. 2002;51(1):14–8.

68. Valente EM, Brancati F, Caputo V, Graham EA, Davis M B, Ferraris A ve ark. PARK6 is a common cause of familial parkinsonism. Neurol Sci. 2002;23(2):117-8

69. Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS. Identification of a novel Zn2+ -binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. J Biol Chem. 2009;284(22):14978–86.

70. Shimura H, Hattori N, Kubo SI, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S ve ark. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet. 2000;25(3):302–5.

71. Fett ME, Pilsl A, Paquet D, van Bebber F, Haass C, Tatzelt J ve ark. Parkin is protective against proteotoxic stress in a transgenic zebrafish model. PLoS One. 2010;5(7):e11783.

72. Di Maio R, Hoffman EK, Rocha EM, Keeney MT, Sanders LH, De Miranda BR ve ark. LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. Sci Transl Med. 2018;10(451).

73. Tsika E, Moore DJ. Mechanisms of LRRK2-mediated neurodegeneration. Curr Neurol Neurosci Rep. 2012;12(3):251–60.

74. Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, Van Der Brug M ve ark. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. Neuron. 2004;44(4):595–600.

75. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S ve ark. Mutations

in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. Neuron. 2004;44(4):601–7.

76. Agalliu I, San Luciano M, MirelmanMD A, Giladi N, Waro B, Aasly J ve ark. Higher frequency of certain cancers in LRRK2 G2019S mutation carriers with Parkinson disease a pooled analysis. JAMA Neurol. 2015;72(1):58–65.

77. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY ve ark. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. 2012;491(7422):119–24.

78. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M ve ark. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. Nat Genet. 2014;46(9):989–93.

79. Kalia L V., Lang AE, Hazrati LN, Fujioka S, Wszolek ZK, Dickson DW ve ark. Clinical correlations with lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease. JAMA Neurol. 2015;72(1):100–5.

80. Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications. Movement Disorders. Mov Disord; 2013;28:14–23.

81. Bonifati V. DJ-1 (PARK7) and Parkinson's Disease. In: Blue Books of Neurology. 2010;83–101.

82. Lucas JI, Marín I. A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1. Mol Biol Evol. 2007;24(2):551–61.

83. Alvarez-Castelao B, Muñoz C, Sánchez I, Goethals M, Vandekerckhove J, Castaño JG. Reduced protein stability of human DJ-1/PARK7 L166P, linked to autosomal recessive Parkinson disease, is due to direct endoproteolytic cleavage by the proteasome. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2012;1823(2):524–33.

84. Shinbo Y, Taira T, Niki T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. Int J Oncol. 2005;26(3):641–8.

85. Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. DJ-1 Positively Regulates the Androgen Receptor by Impairing the Binding of PIASxα to the Receptor. J Biol Chem. 2001;276(40):37556–63.

86. Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, Kim CY, Woldman I ve ark. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. Hum Mol Genet. 2005;14(9):1231–41.

87. Van Der Brug MP, Blackinton J, Chandran J, Hao LY, Lal A, Mazan-Mamczarz K ve ark. RNA binding activity of the recessive parkinsonism protein DJ-1 supports involvement in multiple cellular pathways. Proc Natl Acad Sci. 2008;105(29):10244–9.

88. Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C ve ark. Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. Cell Death Differ. 2006;13(1):96–108.

89. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. DJ-1 Is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits α-synuclein aggregate formation.

PLoS Biol. 2004;2(11):e362.

90. Deeg S, Gralle M, Sroka K, Bähr M, Wouters FS, Kermer P. BAG1 restores formation of functional DJ-1 L166P dimers and DJ-1 chaperone activity. J Cell Biol. 2010;188(4):505–13.

91. Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward α-synuclein. J Mol Biol. 2006;356(4):1036–48.

92. Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H, Mouradian MM. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(27):9691–6.

93. Aleyasin H, Rousseaux MWC, Marcogliese PC, Hewitt SJ, Irrcher I, Joselin AP, ve ark. DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. Proc Natl Acad Sci. 2010;107(7):3186–91.

94. Aleyasin H, Rousseaux MWC, Phillips M, Kim RH, Bland RJ, Callaghan S ve ark. The Parkinson's disease gene DJ-1 is also a key regulator of stroke-induced damage. Proc Natl Acad Sci. 2007;104(47):18748–53.

95. Blackinton J, Lakshminarasimhan M, Thomas KJ, Ahmad R, Greggio E, Raza AS, ve ark. Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1. J Biol Chem. 2009;284(10):6476–85.

96. Liu F, Nguyen JL, Hulleman JD, Li L, Rochet JC. Mechanisms of DJ-1 neuroprotection in a cellular model of Parkinson's disease. J Neurochem. 2008;105(6):2435–53.

97. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a promising therapeutic agent in parkinson's disease. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21:1170–93.

98. Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. Brain Res Rev. 2008;59(1):201–20.

99. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurol. 2009;5(6):311–22.

100. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. Cell Mol Neurobiol. 2018;38(3):579–93.

101. Tekin I, Roskoski R, Carkaci-Salli N, Vrana KE. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. J Neural Transm. 2014;121(12):1451–81.

102. Haycock JW. Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms. J Neurochem. 2002;81(5):947–53.

103. Shehadeh J, Double KL, Murphy KE, Bobrovskaya L, Reyes S, Dunkley PR ve ark. Expression of tyrosine hydroxylase isoforms and phosphorylation at serine 40 in the human nigrostriatal system in Parkinson's disease. Neurobiol Dis.

2019;130:104524.

104. Candy J, Collet C. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr. 2005;1727(1):35–44.

105. Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates. New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. Mol Cell Neurosci. 2010;43(4):394–402.

106. Ren G, Li S, Zhong H, Lin S. Zebrafish tyrosine hydroxylase 2 gene encodes tryptophan hydroxylase. J Biol Chem. 2013;288(31):22451–9.

107. Sun Z, Gitler AD. Discovery and characterization of three novel synuclein genes in zebrafish. Dev Dyn. 2008;237(9):2490–5.

108. Milanese C, Sager JJ, Bais Q, Farrells TC, Cannons JR, Greenamyre JT ve ark. Hypokinesia and reduced dopamine levels in zebrafish lacking β- and γ1-synucleins. J Biol Chem. 2012;287(5):2971–83.

109. Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. Front Neurol. 2018;9:347.

110. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. Nutrients. 2012;4(10):1399–440.

111. Yana MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radic Biol Med. 2013;62:90–101.

112. Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. Free Radic Biol Med. 2011;51(5):1014–26.

113. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in parkinson's disease. J Parkinsons Dis. 2013;3(4):461–91.

114. Liu X, Yamada N, Maruyama W, Osawa T. Formation of dopamine adducts derived from brain polyunsaturated fatty acids: Mechanism for Parkinson disease. J Biol Chem. 2008;283(50):34887–95.

115. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003;552(2):335–44.

116. Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). Annu Rev Biochem. 2006;75:69–92.

117. Gabrovska K, Marinov I, Godjevargova T, Portaccio M, Lepore M, Grano V ve ark. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. Int J Biol Macromol. 2008;43(4):339–45.

118. Zhang X, Lu L, Liu S, Ye W, Wu J, Zhang X. Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease. Int J Biochem Cell Biol. 2013;45(2):265–72.

119. Ünal İ, Emekli-Alturfan E. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. Journal of Clinical Neuroscience. Churchill Livingstone; 2019;62:1–6.

120. Ünal İ, Çalışkan-Ak E, Üstündağ Ü V., Ateş PS, Alturfan AA, Altinoz MA ve ark. Neuroprotective effects of mitoquinone and oleandrin on Parkinson's disease model in zebrafish. Int J Neurosci. 2019;130(6):574-582.

121. Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: Implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Neurosci Lett. 1985;62(3):389–94.

122. Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. Trends Pharmacol Sci. 2010;31(4):141–2.

123. Chernivec E, Cooper J, Naylor K. Exploring the Effect of Rotenone—A Known Inducer of Parkinson's Disease—On Mitochondrial Dynamics in Dictyostelium discoideum. Cells. 2018;7(11):201.

124. Sanders LH, Greenamyren JT. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. Free Radic Biol Med. 2013;62:111–20.

125. Ravenstijn PGM, Merlini M, Hameetman M, Murray TK, Ward MA, Lewis H ve ark. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;57(2):114–30.

126. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2009;34(2):279–90.

127. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain. 2008;137(3):473–7.

128. Sneddon L. Pain Perception in Fish: Evidence and Implications for the Use of Fish. Vet Sci Med Collect. 2011;18(9–10):209–29.

129. Lindbohm ML, Sallmen M, Anttila A, Taskinen H, Hemminki K. Paternal occupational lead exposure and spontaneous abortion. Scand J Work Environ Heal. 1991;17(2):95–103.

130. Wlassoff V. The Physiology and Psychology of Pain | Brain Blogger. 2015.

131. Eccleston C. Role of psychology in pain management. Br J Anaesth. 2001;87(1):144–52.

132. Merskey H and Bogduk IP. IASP Terminology - IASP. Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy. 1994; 209–14.

133. Woessner JW. Overview of Pain: Classification and Concepts. In: Weiner's Pain Management. CRC Press; 2013; 35–47.

134. Bennett DLH, Woods CG. Painful and painless channelopathies. Lancet Neurol. 2014;13(6):587–99.

135. Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K ve ark. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. Nature. 2006;444(7121):894–8.

136. Aydin ON. Ağri Ve Ağri Mekanizmalarina Güncel Bakiş. ADÜ Tıp Fakültesi. Aydın; 2002;3.

137. Paul-Murphy J, Ludders JW, Robertson SA, Gaynor JS, Hellyer PW, Wong PL. The need for a cross-species, approach to the study of pain in animals. Journal of the American Veterinary Medical Association. J Am Vet Med Assoc; 2004;224:692–7.

138. Cervero F, Laird JMA. Visceral pain. Lancet. 1999;353(9170):2145–8.

139. Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B. The Pharmacology of Visceral Pain. Adv Pharmacol. 2016;75:273–301.

140. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. Jt Bone Spine. 2005;72(5):359–71.

141. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation; 2010;120:3760–72.

142. Dubner R, Bennett GJ. Spinal and Trigeminal Mechanisms of Nociception. Annu Rev Neurosci. 1983;6(1):381–418.

143. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. Joint Bone Spine. 2005;72:359–71.

144. Handwerker HO. Nociceptors and Characteristics. In: Encyclopedia of Neuroscience. Springer Berlin Heidelberg. 2008;2876–9.

145. Neely GG, Hess A, Costigan M, Keene AC, Goulas S, Langeslag M ve ark. A Genome-wide Drosophila screen for heat nociception identifies α2δ3 as an evolutionarily conserved pain gene. Cell. 2010;143(4):628–38.

146. Seol Hee Im, Galko MJ. Model for the Biology of Nociception. 2012;241(1):16–26.

147. Wittenburg N, Baumeister R. Thermal avoidance in Caenorhabditis elegans: An approach to the study of nociception. Proc Natl Acad Sci. 1999;96(18):10477–82.

148. Lee KH, Chung K, Chung JM, Coggeshall RE. Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. J Comp Neurol. 1986;243(3):335–46.

149. Bateson P. Assessment of pain in animals. Anim Behav. 1991;42(5):827–39.

150. Bioscience. T. Principles of Pain and Nociception. News-Medical. 2020

151. Olesen AE, Andresen T, Staahl C, Drewes AM. Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. Pharmacol Rev. 2012;64(3):722–79.

152. Haines R, Blair A, Osborn M. The challenges of assessing outcome in chronic pain. Int J Health Care Qual Assur. 1997;10(4):149–52.

153. Fundytus ME. Glutamate receptors and nociception: Implications for the drug treatment of pain. CNS Drugs. 2001;15:29–58.

154. Harvey VL, Dickenson AH. Mechanisms of pain in nonmalignant disease. Curr Opin Support Palliat Care. 2008;2(2):133–9.

155. Jasmin L, Wu M V., Ohara PT. GABA puts a stop to pain. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2004;3(6):487–505.

156. Bannister K, Bee LA, Dickenson AH. Preclinical and Early Clinical Investigations Related to Monoaminergic Pain Modulation. Neurotherapeutics. 2009;6(4):703–12.

157. Woolf CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. Ann Intern Med. 2004;140(6):441–51.

158. Swieboda P, Filip R, Prystupa A, Drozd M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. Ann Agric Environ Med. 2013;1(20):2–7.

159. Ahmad AH, Ismail Z. c-fos and its Consequences in Pain. Malays J Med Sci. 2002;9(1):3–8.

160. Zhu X, Eisenach JC. Cyclooxygenase-1 in the Spinal Cord Is Altered after Peripheral Nerve Injury. Anesthesiology. 2003;99(5):1175–9.

161. M. P. Hefferana, Cartera P, Haleya M, Loomis CW. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. Neuromuscul Disord. 2003;13:133–42.

162. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. Neuron. 2007;55(3):353–64.

163. Besson JM. The neurobiology of pain. Lancet. 1999;353:1610–5.

164. Yaksh TL, Woller SA, Ramachandran R, Sorkin LS. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. F1000Prime Rep. 2015;7(56):1-27.

165. Van Loon Jpam, De Grauw Jc, Van Dierendonck M, L'ami Jj, Back W, Van Weeren Pr. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. Equine Vet J. 2010;42(5):412–9.

166. Iwaszkiewicz KS, Schneider JJ, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. Front Pharmacol. 2013;4:132.

167. Basbaum AI, Jessell T. The Perception of Pain. 2000; 472–91.

168. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology. 2011;115:1363–81.

169. Mistry C, Bawor M, Desai D, Marsh D, Samaan Z. Genetics of Opioid Dependence: A Review of the Genetic Contribution to Opioid Dependence. Curr Psychiatry Rev. 2014;10(2):156–67.

170. Machelska H, Celik M. Opioid Receptors in Immune and Glial Cells—Implications for Pain Control. Front Immunol. 2020;11:300.

171. Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout.

Progress in Neurobiology. 2002;66:285–306.

172. Clarke S, Zimmer A, Zimmer AM, Hill RG, Kitchen I. Region selective up-regulation of μ-, δ- and κ-opioid receptors but not opioid receptor-like 1 receptors in the brains of enkephalin and dynorphin knockout mice. Neuroscience. 2003;122(2):479–89.

173. Ganesh CB. The stress – Reproductive axis in fish: The involvement of functional neuroanatomical systems in the brain. J Chem Neuroanat. 2021;112:101904.

174. Herrero-Turrión MJ. Opioids and Opioid Receptors in Fishes ☆. In: Reference Module in Life Sciences. 2017.

175. Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the μ-opiate receptor. Nature. 1997;386(6624):499–502.

176. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature. 1975;258(5536):577–9.

177. Holden JE, Jeong Y, Forrest JM. The endogenous opioid system and clinical pain management. AACN clinical issues. 2005;16:291–301.

178. Romero-Sandoval EA, Fincham JE, Kolano AL, Sharpe BN, Alvarado-Vázquez PA. Cannabis for Chronic Pain: Challenges and Considerations. Pharmacotherapy. 2018;38(6):651–62.

179. Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: An integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. Pharmacol Rev. 2011;63(3):772–810.

180. Laycock H, Bantel C. Opioid mechanisms and opioid drugs. Anaesth Intensive Care Med. 2019;20(8):450–5.

181. Khalap A, Bagrosky B, Lecaude S, Youson J, Danielson P, Dores RM. Trends in the evolution of the proenkephalin and prodynorphin genes in gnathostomes. In: Annals of the New York Academy of Sciences. New York Academy of Sciences; 2005;1040:22-37.

182. Jordan BA, Cvejic S, Devi LA. Opioids and their complicated receptor complexes. Neuropsychopharmacology. 2000;23(4):S5–18.

183. Noda M, Teranishi Y, Takahashi H, Toyosato M, Notake M, Nakanishi S ve ark. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. Nature. 1982;297(5865):431–4.

184. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Inoue A, Nakamura M, Chang ACY ve ark. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-β- lipotropin precursor. Nature. 1979;278(5703):423–7.

185. Cone RD. The melanocortin receptors. Humana Press. 2000;12:197–205.

186. Friedman A, Nabong L. Opioids: Pharmacology, Physiology, and Clinical Implications in Pain Medicine. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2020;31(2):289–303.

187. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2012. Peptides. 2013;50:55–95.

188. Racz I, Schürmann B, Karpushova A, Reuter M, Cichon S, Montag C ve ark. The Opioid Peptides Enkephalin and β-Endorphin in Alcohol Dependence. Biol Psychiatry. 2008;64(11):989–97.

189. Sprouse-Blum AS, Smith G, Sugai D, Parsa FD. Understanding endorphins and their importance in pain management. Hawaii Med J. 2010;69(3):70–1.

190. Karkhanis AN, Al-Hasani R. Dynorphin and its role in alcohol use disorder. Brain Res. 2020;1735:146742. 2

191. Fallon JH, Leslie FM. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. J Comp Neurol. 1986;249(3):293–336.

192. Goldstein A, Ghazarossian VE. Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain (endorphin/neuropeptide/radioimmunoassay). Neurobiology. 1980;(10)77:6207-6210

193. Schwarzer C. 30 years of dynorphins - New insights on their functions in neuropsychiatric diseases.Pharmacology and Therapeutics. Europe PMC Funders; 2009;123:353–70.

194. Navratilova E, Ji G, Phelps C, Qu C, Hein M, Yakhnitsa V ve ark. Kappa opioid signaling in the central nucleus of the amygdala promotes disinhibition and aversiveness of chronic neuropathic pain. Pain. 2019;160(4):824–32.

195. Hackler L, Zadina JE, Ge LJ, Kastin AJ. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin- 2 from human brain cortex. Peptides. 1997;18(10):1635–9.

196. Gelman PL, González Herrera NE, Epifanía M, Ortega M, Romero LP, Santillán CT ve ark. Endomorphin peptides: pharmacological and functional implications in the brain of mammals Endomorphin peptides: pharmacological and functional implications of these opioid peptides in the brain of mammals. Part one. 2010;(2)33: 179-196

197. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P ve ark. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature. 1995;377:532–5.

198. Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR ve ark. Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. Science (80-). 1995;270(5237):792–4.

199. Tian JH, Zhang W, Fang Y, Xu W, Grandy DK, Han JS. Endogenous orphanin FQ: Evidence for a role in the modulation of electroacupuncture analgesia and the development of tolerance to analgesia produced by morphine and electroacupuncture. Br J Pharmacol. 1998;124(1):21–6.

200. Sandin J, Georgieva J, Schött PA, Ögren SO, Terenius L. Nociceptin/Orphanin FQ Microinjected into Hippocampus Impairs Spatial Learning in Rats. Eur J Neurosci. 1997;9(1):194–7.

201. Manabe T, Noda Y, Mamiya T, Katagiri H, Houtani T, Nishi M ve ark. Facilitation

of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. Nature. 1998;394(6693):577–81.

202. Mamiya T, Noda Y, Nishi M, Takeshima H, Nabeshima T. Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor- knockout mice. Brain Res. 1998;783(2):236–40.

203. Schröder W, Lambert DG, Ko MC, Koch T. Functional plasticity of the N/OFQ-NOP receptor system determines analgesic properties of NOP receptor agonists. British Journal of Pharmacology. 2014;171:3777–800.

204. Standifer KM, Pasternak GW. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. Cellular Signalling. 1997;9: 237–48.

205. Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW. Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human μ opioid receptor gene, OPRM. Neuroscience. 2005;133(1):209–20.

206. Chavkin C. The therapeutic potential of κ-opioids for treatment of pain and addiction. Neuropsychopharmacology. 2011;36:369–70.

207. Yakovlev AG, Krueger KE, Faden AI. Structure and expression of a rat κ opioid receptor gene. J Biol Chem. 1995;270(12):6421–4.

208. Yuferov V, Fussell D, LaForge KS, Nielsen DA, Gordon D, Ho A ve ark. Redefinition of the human kappa opioid receptor gene (OPRK1) structure and association of haplotypes with opiate addiction. Pharmacogenetics. 2004;14(12):793–804.

209. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J ve ark. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. Mol Cell Proteomics. 2014;13(2):397–406.

210. Klee EW, Schneider H, Clark KJ, Cousin MA, Ebbert JO, Hooten WM ve ark. Zebrafish: A model for the study of addiction genetics. Human Genetics. 2012;131:977–1008.

211. Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. The delta opioid receptor: An evolving target for the treatment of brain disorders. Trends in Pharmacological Sciences. 2011;32:581–90.

212. Bao W, Volgin AD, Alpyshov ET, Friend AJ, Strekalova T V., de Abreu MS ve ark. Opioid Neurobiology, Neurogenetics and Neuropharmacology in Zebrafish. Neuroscience. 2019;404:218–32.

213. Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Nuñez V, Fernandez de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG ve ark. Characterization of a new duplicate δ-opioid receptor from zebrafish. J Mol Endocrinol. 2006;37(3):391–403.

214. Pan ZZ, Hirakawa N, Fields HL. A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin. Neuron. 2000;26(2):515–22.

215. Julius D. TRP channels and pain. Annual Review of Cell and Developmental Biology. Annu Rev Cell Dev Biol; 2013;29: 355–84.

216. McDougall JJ. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2011;1812(4):459–67.

217. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. Pharmacol Rev. 2005;57(4):397–409.

218. Waxman SG. The neuron as a dynamic electrogenic machine: Modulation of sodium-channel expression as a basis for functional plasticity in neurons. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2000;355(1394):199–213.

219. Chen Y, Yu FH, Sharp EM, Beacham D, Scheuer T, Catterall WA. Functional properties and differential neuromodulation of Nav1.6 channels. Mol Cell Neurosci. 2008;38(4):607–15.

220. Paukert M, Sidi S, Russell C, Siba M, Wilson SW, Nicolson T ve ark. A family of acid-sensing ion channels from the zebrafish: Widespread expression in the central nervous system suggests a conserved role in neuronal communication. J Biol Chem. 2004;279(18):18783–91.

221. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M ve ark. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013;496(7446):498–503.

222. Demin KA, Meshalkina DA, Kysil E V., Antonova KA, Volgin AD, Yakovlev OA ve ark. Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2018;86:301–12.

223. Stewart AM, Kaluyeva AA, Poudel MK, Nguyen M, Song C, Kalueff A V. Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity. Zebrafish. 2015;12(5):339–48.

224. Sanchez-Simon FM, Rodriguez RE. Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. Neuroscience. 2008;151(1):129–37.

225. Dreborg S, Sundström G, Larsson TA, Larhammar D. Evolution of vertebrate opioid receptors. Proc Natl Acad Sci. 2008;105(40):15487–92.

226. Sundström G, Dreborg S, Larhammar D. Concomitant duplications of opioid peptide and receptor genes before the origin of jawed vertebrates. DeSalle R, editor. PLoS One. 2010;5(5):e10512.

227. González-Núñez V, Barrallo A, Traynor JR, Rodríguez RE. Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. J Pharmacol Exp Ther. 2006;316(2):900–4.

228. Rodriguez RE, Barrallo A, Garcia-Malvar F, McFadyen IJ, Gonzalez-Sarmiento R, Traynor JR. Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (Danio rerio). Neurosci Lett. 2000;288(3):207–10.

229. Alvarez FA, Rodriguez-Martin I, Gonzalez-Nuñez V, de Velasco EMF, Gonzalez Sarmiento R, Rodríguez RE. New kappa opioid receptor from zebrafish Danio rerio. Neurosci Lett. 2006;405(1–2):94–9.

230. Gonzalez-Nuñez V, Toth G, Rodríguez RE. Endogenous heptapeptide Met-

enkephalin-Gly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. Peptides. 2007;28(12):2340–7.

231. de Velasco EMF, Law PY, Rodríguez RE. Mu Opioid Receptor from the Zebrafish Exhibits Functional Characteristics as Those of Mammalian Mu Opioid Receptor. Zebrafish. 2009;6(3):259–68.

232. Gonzalez-Nunez V, Rodríguez RE. The zebrafish: A model to study the endogenous mechanisms of pain. ILAR J. 2009;50(4):373–86.

233. Costa F V, Canzian J, Stefanello F V, Kalueff A V, Rosemberg DB. Naloxone prolongs abdominal constriction writhing-like behavior in a zebrafish-based pain model. Neurosci Lett. 2019;708:134336.

234. Conlee KM, Stephens ML, Rowan AN, King LA. Carbon dioxide for euthanasia: Concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. Lab Anim. 2005;39(2):137–61.

235. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain. 1977;4(C):161–74.

236. Sneddon LU. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. Brain Res. 2003;972(1–2):44–52.

237. Sneddon L. Pain Perception in Fish. J Conscious Stud. 2011;18:209–29.

238. Mettam JJ, Oulton LJ, McCrohan CR, Sneddon LU. The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Appl Anim Behav Sci. 2011;133(3–4):265–74.

239. Maximino C. Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (Danio rerio) by environmental stressors. Psychol Neurosci. 2011;4(1):149–55.

240. Sneddon LU. Pain perception in fish: Indicators and endpoints. ILAR Journal. Oxford University Press; 2009;50: 338–42.

241. Deakin AG, Buckley J, AlZu'bi HS, Cossins AR, Spencer JW, Al'Nuaimy W, et al. Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures. Sci Rep. 2019;9(1):1–13.

242. Reilly SC, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU. Novel candidate genes identified in the brain during nociception in common carp (Cyprinus carpio) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Neurosci Lett. 2008;437(2):135–8.

243. Reilly SC, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU. Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. Appl Anim Behav Sci. 2008;114(1–2):248–59.

244. Murray R, Bender david A, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Lipids of Physiologic Significance Harper's Illustrated Biochemistry, 31e | AccessMedicine. 2015;e31:142.

245. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yildiz M, Öztürk A, Çetin M, Et Al. Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü-Süperoksit Dismutaz (Sod), Katalaz (Cat) Ve Glutatyon Peroksidaz (Gpx) Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp

Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye 2 Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, Türkiye. 2019;26(3):362–9.

246. Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Rolleri. Journal of Turgut Özal Medical Center. 1997;4(4):453-461

247. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 1999;1411(2–3):378–84.

248. Orhan H, Şahin G, Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD U, Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Abd D. Glutatyon S-Transferazların Klinik Ve Toksikolojik Önemi Clinical And Toxicological Importance Of Glutathione S-Transferases.Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. Turkiye Klinikleri; 1995;15.

249. Whittaker VP. The contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function. Trends Pharmacol Sci. 1990;11(1):8–13.

250. Huang X, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Amylin suppresses acetic acid-induced visceral pain and spinal c-fos expression in the mouse. Neuroscience. 2010;165(4):1429–38.

251. Mishra D, Ghosh G, Sudhir Kumar P, Kumar Panda P. An Experimental Study Of Analgesic Activity Of Selective Cox-2 Inhibitor With Conventional Nsaids. 2004.

252. Yang L, Li L, Chen L, Li Y, Chen H, Li Y, et al. Potential analgesic effects of a novel N-acylethanolamine acid amidase inhibitor F96 through PPAR-α. Sci Rep. 2015;5:13565.

253. Costa F V., Rosa L V., Quadros VA, Santos ARS, Kalueff A V., Rosemberg DB. Understanding nociception-related phenotypes in adult zebrafish: Behavioral and pharmacological characterization using a new acetic acid model. Behav Brain Res. 2019;359:570–8.

254. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Foliphenol reagent. The Journal of biologicn phenol reagenLowry, O. H., RosebroughL, N., A., F., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin al chemistry, J Biol Chem. 1951;193(1):265–75.

255. Ledwoz;yw A, Michalak J, Stępień A, Kądziołka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clin Chim Acta. 1986;155(3):275–83.

256. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide - Biol Chem. 2001;5(1):62–71.

257. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. Toxicol Appl Pharmacol. 1986;82(3):512–20.

258. Habig WH, Jakoby WB. Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases. Methods Enzymol. 1981;77(C):398–405.

259. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid

colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961;7(2):88–95.

260. Santa-Cecília F V., Freitas LAS, Vilela FC, Veloso CDC, Da Rocha CQ, Moreira MEC ve ark. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from Garcinia brasiliensis. Eur J Pharmacol. 2011 16;670(1):280–5.

261. Kalueff A V., Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS ve ark. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. Zebrafish. 2013;10:70–86.

262. Farrand AQ, Helke KL, Gregory RA, Gooz M, Hinson VK, Boger HA. Vagus nerve stimulation improves locomotion and neuronal populations in a model of Parkinson's disease. Brain Stimul. 2017;10(6):1045–54.

263. Aryal B, Lee Y. Disease model organism for Parkinson disease: Drosophila melanogaster. BMB Reports. The Biochemical Society of the Republic of Korea; 2019;52:250–8.

264. Cheesman AL, Barker RA, Lewis SJG, Robbins TW, Owen AM, Brooks DJ. Lateralisation of striatal function: Evidence from 18F-dopa PET in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005;76(9):1204–10.

265. Lewis SJG, Slabosz A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM. Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. Neuropsychologia. 2005;43(6):823–32.

266. Cools R. Mechanisms of cognitive set flexibility in Parkinson's disease. Brain. 2001;124(12):2503–12.

267. Mehler-Wex C, Riederer P, Gerlach M. Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: Implications for the pathophysiology of parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. Neurotox Res. 2006;10(3–4):167–79.

268. Kilpeläinen T, Julku UH, Svarcbahs R, Myöhänen TT. Behavioural and dopaminergic changes in double mutated human A30P*A53T alpha-synuclein transgenic mouse model of Parkinson´s disease. Sci Rep. 2019;9(1):1–13.

269. Li C, Liu S, Lu X, Tao F. Role of Descending Dopaminergic Pathways in Pain Modulation. Curr Neuropharmacol. 2019;17(12):1176–82.

270. Mendlin A, Martín FJ, Jacobs BL. Dopaminergic input is required for increases in serotonin output produced by behavioral activation: an in vivo microdialysis study in rat forebrain. Neuroscience. 1999;93(3):897–905.

271. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? J Neurochem. 2006;97(6):1634–58.

272. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997;82(2):291–5.

273. Shichiri M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. J Clin Biochem Nutr. 2014;54(3):151–60.

274. Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Radic Biol Med. 2011;51(7):1302–19.

275. Bailey R. Basic Parts of the Brain and Their Responsibilities. 2019

276. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in parkinson's disease. J Parkinsons Dis. 2013;3(4):461–91.

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

278. Malinska D, Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, Kunz WS. Quantification of Superoxide Production by Mouse Brain and Skeletal Muscle Mitochondria. Methods in Enzymology. 2009;456: 419–37.

279. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A V., Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat Neurosci. 2000;3(12):1301–6.

280. Schuler F, Casida JE. The insecticide target in the PSST subunit of complex I. Pest Manag Sci. 2001;57(10):932–40. /

281. Sherer TB, Trimmer PA, Borland K, Parks JK, Bennett JP, Tuttle JB. Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Brain Res. 2001;891(1–2):94–105.

282. Radad K, Al-Shraim M, Al-Emam A, Wang F, Kranner B, Rausch WD ve ark. Rotenone: From modelling to implication in Parkinson's disease. Folia Neuropathol. 2019;57(4):317–26.

283. Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest Radikaller Free Radicals. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Derg. 2016;4(1).

284. Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. Neurobiol Aging. 2002;23(5):843–53.

285. Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. Exp Neurol. 2004;186(2):235–41.

286. Liu C, Wang R, Ji T, Fan Y, Qin Z, Gao X. Effects of Ferulic Acid in Rotenone Induced Rat Model of Parkinson's Disease. Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research. 2016;2(2):55–59

287. Ali Ibrahim N. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Vitamin C in the Rotenone Induced Nigrostriatal Damage in Mice. Eur J Clin Biomed Sci. 2017;3(4):67.

288. Abdel-Salam OME, Sleem AA, Youness ER, Mohammed NA, Omara EA, Shabana ME. Neuroprotective Effects of the Glutathione Precursor N-Acetylcysteine against Rotenone-Induced Neurodegeneration. React Oxyg Species. 2019;8(22):231–244–231–244.

289. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A ve ark. Basal Lipid

Peroxidation in Substantia Nigra Is Increased in Parkinson's Disease. J Neurochem. 1989;52(2):381–9.

290. Sharma A, Kaur P, Kumar B, Prabhakar S, Gill KD. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. Park Relat Disord. 2008;14(1):52–7.

291. Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, et al. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2009;13(2):129–32.

292. de Farias CC, Maes M, Bonifácio KL, Bortolasci CC, de Souza Nogueira A, Brinholi FF ve ark. Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. Neurosci Lett. 2016;617:66–71.

293. Sudha K, Rao A V., Rao S, Rao A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. Neurol India. 2003;51(1):60–2.

294. Pretorius E, Swanepoel AC, Buys A V., Vermeulen N, Duim W, Kell DB. Eryptosis as a marker of Parkinson's disease. Aging. 2014;6(10):788–819.

295. Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AHV, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental lewy body disease. Ann Neurol. 1992;32(1 S):S82–7.

296. Marzatico F, Café C, Taborelli M, Benzi G. Experimental Parkinson's disease in monkeys. Effect of ergot alkaloid derivative on lipid peroxidation in different brain areas. Neurochem Res. 1993;18(10):1101–6.

297. Gökçe Çokal B, Yurtdaş M, Keskin Güler S, Güneş HN, Ataç Uçar C, Aytaç B ve ark. Serum glutathione peroxidase, xanthine oxidase, and superoxide dismutase activities and malondialdehyde levels in patients with Parkinson's disease. Neurol Sci. 2017;38(3):425–31.

298. Molina J, Jiménez-Jiménez FJ, Fernandez-Calle P, Lalinde L, Tenias J, Pondal M, ve ark. Serum lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1992 Mar 2;136(2):137–40.

299. Gorbunov N V., Elsayed NM, Osipov AN, Day BW, Zayas-Rivera B, Kagan VE, ve ark. Reduction of Ferrylmyoglobin and Ferrylhemoglobin by Nitric Oxide: A Protective Mechanism against Ferryl Hemoprotein-Induced Oxidations. Biochemistry. 1995;34(20):6689–99.

300. Tain Y-L, Chang SKC, Liao J-X, Chen Y-W, Huang H-T, Li Y-L ve ark. Synthesis of Short-Chain-Fatty-Acid Resveratrol Esters and Their Antioxidant Properties. Antioxidants. 2021;10(3):420.

301. Roelofsen H, Priebe MG, Vonk RJ. The interaction of short-chain fatty acids with adipose tissue: Relevance for prevention of type 2 diabetes. Benef Microbes. 2010;1(4):433–7.

302. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2007;13(20):2826–32.

303. Hu S, Kuwabara R, de Haan BJ, Smink AM, de Vos P. Acetate and butyrate improve β-cell metabolism and mitochondrial respiration under oxidative stress. Int J Mol Sci. 2020;21(4).

304. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. J Nutr Biochem. 2011;22(9):849–55.

305. Abdel-Salam OME, Omara EA, El-Shamarka MES, Hussein JS. Nigrostriatal damage after systemic rotenone and/or lipopolysaccharide and the effect of cannabis. Comp Clin Path. 2014;23(5):1343–58.

306. Fedorova TN, Logvinenko AA, Poleshchuk V V., Muzychuk OA, Shabalina AA, Illarioshkin SN. Lipid Peroxidation Products in the Blood Plasma of Patients with Parkinson's Disease as Possible Biomarkers of Different Stages of the Disease. Neurochem J. 2019;13(4):391–5.

307. Im HI, Joo WS, Nam E, Lee ES, Hwang YJ, Kim YS. Baicalein prevents 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic dysfunction and lipid peroxidation in mice. J Pharmacol Sci. 2005;98(2):185–9.

308. Johansson R, Kumar Pandita R, Poljakovic M, Garcia-Pascual A, De Vente J, Persson K. Activity and expression of nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth. J Urol. 2002;168(6):2689–94.

309. Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT ve ark. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. Nat Med. 1996;2(9):1017–21.

310. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, Mcauliffe WG ve ark. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nat Med. 1999;5(12):1403–9.

311. Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J, Schulz JB. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. J Neurochem. 2000;74(5):2213–6.

312. Srebro D, Vučković S, Prostran M. Inhibition of neuronal and inducible nitric oxide synthase does not affect the analgesic effects of NMDA antagonists in visceral inflammatory pain. 2016; 76(2):110-16.

313. He Y, Imam SZ, Dong Z, Jankovic J, Ali SF, Appel SH ve ark. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury. J Neurochem. 2003;86(6):1338–45.

314. Xiong N, Xiong J, Jia M, Liu L, Zhang X, Chen Z ve ark. The role of autophagy in Parkinson's disease: Rotenone-based modeling. Behav Brain Funct. 2013;9(1):1–12.

315. Wink DA, Feelisch M, Vodovotz Y, Fukuto J, Grisham MB. The chemical biology of nitric oxide. In: Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An InterdisciplinaryApproach. 1999;245–91.

316. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. Nitric Oxide - Biol Chem. 2010;23(3):153–65.

317. Khotimah H-, Sumitro S, Aris Widodo M. Epigenetic of Parkinson's on Zebrafish model Parkinson's View project The Role Of Astaxanthin Compared With Metformin In Preventing Glycated Human Serum Albumin From Possible Unfolding: A Molecular Dynamic Study View project. Article in International Journal of PharmTech Research. 2015; 10(4):698-708

318. Porter RHP, Greene JG, Higgins DS, Greenamyre JT. Polysynaptic regulation of glutamate receptors and mitochondrial enzyme activities in the basal ganglia of rats with unilateral dopamine depletion. J Neurosci. 1994;14(11 II):7192–9.

319. Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P ve ark. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. J Neurochem. 2003;84(3):491–502.

320. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA ve ark. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. J Biol Chem. 2003;278(10):8516–25.

321. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. Biochim Biophys Acta. 2006;1757(5–6):553–61.

322. Abaclolu N, Tunçtan B, Akbulut E, Çaklcl I. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/ cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. Life Sci. 2000;67(10):1127–37.

323. Zhuo M, Meller ST, Gebhart GF. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. Pain. 1993;54(1):71–8.

324. Xie QW, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: Role and regulation. In: Journal of Leukocyte Biology. Federation of American Societies for Experimental Biology; 1994;576–82.

325. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2008;1780:1362–7.

326. Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. Pathogenesis of Parkinson's disease: Oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. Neuroscience Bulletin. 2007;23:125–30.

327. Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. Ann N Y Acad Sci. 2008;1147:93–104.

328. Sudha K, Rao A V., Rao S, Rao A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. Neurol India. 2003;51(1):60–2.

329. Romuk EB, Szczurek W, Oles M, Gabrysiak A, Skowron M, Nowak P ve ark. The evaluation of the changes in enzymatic antioxidant reserves and lipid peroxidation in chosen parts of the brain in an animal model of Parkinson disease. Adv Clin Exp Med. 2017;26(6):953–9.

330. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:51–88.

331. Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S ve ark. Role of

glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation: Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. J Biol Chem. 2001;276(22):19220–30.

332. Whitworth AJ, Theodore DA, Greene JC, Beneš H, Wes PD, Pallanck LJ. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(22):8024–9.

333. Pesah Y, Pham T, Burgess H, Middlebrooks B, Verstreken P, Zhou Y ve ark. Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. Development. 2004;131(9):2183–94.

334. Kim K, Kim SH, Kim J, Kim H, Yim J. Glutathione S-transferase omega 1 activity is sufficient to suppress neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson disease. J Biol Chem. 2012;287(9):6628–41.

335. Rao AVSK, Shaha C. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. Free Radic Biol Med. 2000;29(10):1015–27.

336. Haytural H, Tüzün E. Parkinson Hastalığı'nın Hayvan Modelinde PI3K/Akt Yolağı ile Mitokondriyal, Oksidatif ve Apoptotik Parametrelerin İlişkisi. Deney Tıp Araştırma Enstitüsü Derg. 2014;4(7):28–37.

337. Steckert A V., Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. Neurochemical Research. Neurochem Res; 2010;35:1295–301.

338. Bostantjopoulou S, Kyriazis G, Katsarou Z, Kiosseoglou G, Kazis A, Mentenopoulos G. Superoxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's disease. Funct Neurol. 1997;12(2):63–8.

339. Ihara Y, Chuda D, Kuroda S, Hayabara T. Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: Relationship to clinical data. J Neurol Sci. 1999;170(2):90–5.

340. Tórsdóttir G, Kristinsson J, Sveinbjörnsdóttir S, Snaedal J, Jóhannesson T. Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. Pharmacol Toxicol. 1999;85(5):239–43.

341. Serra JA, Domínguez RO, De Lustig ES, Guareschi EM, Famulari AL, Bartolomé EL ve ark. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: Comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. J Neural Transm. 2001;108(10):1135–48.

342. Ojha S, Javed H, Azimullah S, Abul Khair SB, Haque ME. Glycyrrhizic acid Attenuates Neuroinflammation and Oxidative Stress in Rotenone Model of Parkinson's Disease. Neurotox Res. 2016;29(2):275–87.

343. Kaur H, Chauhan S, Sandhir R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. Neurochem Res. 2011;36(8):1435–43.

344. Radad K, Al-Shraim M, Al-Emam A, Wang F, Kranner B, Rausch WD ve ark. Rotenone: From modelling to implication in Parkinson's disease. Folia

Neuropathol. 2019;57(4):317–26.

345. Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Low activity of key phospholipid catabolic and anabolic enzymes in human substantia nigra: Possible implications for Parkinson's disease. Neuroscience. 1998;83(3):791–8.

346. Iglesias-González J, Sánchez-Iglesias S, Méndez-Álvarez E, Rose S, Hikima A, Jenner P ve ark. Differential toxicity of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and rat brain mitochondria: Protective role of catalase and superoxide dismutase. Neurochem Res. 2012;37(10):2150–60.

347. Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Pickett C, Li S, Jones J, Chen H ve ark. Compartmentalized oxidative stress in dopaminergic cell death induced by pesticides and complex i inhibitors: Distinct roles of superoxide anion and superoxide dismutases. Free Radic Biol Med. 2013;61:370–83.

348. Tain Y-L, Chang SKC, Liao J-X, Chen Y-W, Huang H-T, Li Y-L ve ark. Synthesis of Short-Chain-Fatty-Acid Resveratrol Esters and Their Antioxidant Properties. Antioxidants. 2021;10(3):420.

349. Roelofsen H, Priebe MG, Vonk RJ. The interaction of short-chain fatty acids with adipose tissue: Relevance for prevention of type 2 diabetes. Benef Microbes. 2010;1(4):433–7.

350. Myslivecek J. Two players in the field: Hierarchical model of interaction between the dopamine and acetylcholine signaling systems in the striatum. Biomedicines. 2021;9(1):1–19.

351. Harada H, Hosonuma K, Fujii T, Kawashima K. Enhancement of cerebral cortical acetylcholine release by intraperitoneal acetic acid and its suppression by analgesics in freely moving rats. Neurosci Lett. 2000;284(3):163–6.

352. Rizzi G, Tan KR. Dopamine and acetylcholine, a circuit point of view in Parkinson's disease. Front Neural Circuits. 2017;11:110.

353. Herman Zs. Behavioural Changes Induced In Conscious Mice By Intracerebroventricular Injection Of Catecholamines, Acetylcholine And 5-Hydroxytryptamine. In: British Journal of Pharmacology. 1975: 55(3):351-8

354. Chen Y, Lian Y, Ma Y, Wu C, Zheng Y, Xie N. The expression and significance of tyrosine hydroxylase in the brain tissue of Parkinson's disease rats. Exp Ther Med. 2017;14(5):4813–6.

355. Zhu Y, Zhang J, Zeng Y. Overview of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease. CNS Neurol Disord - Drug Targets. 2012;11(4):350–8.

356. Kiyokawa H, Katori Y, Cho KH, Murakami G, Kawase T, Cho BH. Reconsideration of the autonomic cranial ganglia: An immunohistochemical study of mid-term human fetuses. Anat Rec. 2012;295(1):141–9.

357. Wright MA, Mo W, Nicolson T, Ribera AB. In vivo evidence for transdifferentiation of peripheral neurons. Development. 2010;137(18):3047–56.

358. Brumovsky PR. Dorsal root ganglion neurons and tyrosine hydroxylase - An intriguing association with implications for sensation and pain. Pain.

2016;157(2):314–20.

359. Herradon G, Ezquerra L, Nguyen T, Wang C, Siso A, Franklin B ve ark. Noradrenergic and opioidergic alterations in neuropathy in different rat strains. Neurosci Lett. 2008;438(2):186–9.

360. Brumovsky PR. Dorsal root ganglion neurons and tyrosine hydroxylase - An intriguing association with implications for sensation and pain. Pain. 2016;157(2):314–20.

361. Carballo-Carbajal I, Weber-Endress S, Rovelli G, Chan D, Wolozin B, Klein CL, ve ark. Leucine-rich repeat kinase 2 induces α-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway. Cell Signal. 2010;22(5):821–7.

362. Daher JPL, Volpicelli-Daley LA, Blackburn JP, Moehle MS, West AB. Abrogation of α-synuclein -mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. Proc Natl Acad Sci. 2014;111(25):9289–94.

363. Austin SA, Floden AM, Murphy EJ, Combs CK. α-synuclein expression modulates microglial activation phenotype. J Neurosci. 2006;26(41):10558–63.

364. Rui Q, Ni H, Li D, Gao R, Chen G. The Role of LRRK2 in Neurodegeneration of Parkinson Disease. Curr Neuropharmacol. 2018;16(9):1348–57.

365. Morais VA, Verstreken P, Roethig A, Smet J, Snellinx A, Vanbrabant M ve ark. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. EMBO Mol Med. 2009;1(2):99–111.

366. Burbulla LF, Krüger R. Converging environmental and genetic pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease. Journal of the Neurological Sciences. 2011; 306(1-2):1-8.

367. Moura KCV, Campos Junior M, De Rosso ALZ, Nicaretta DH, Pereira JS, Silva DJ ve ark. Genetic analysis of PARK2 and PINK1 genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. Dis Markers. 2013;35(3):181–5.

368. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. Neuron. 2010;66(5):646–61.

369. Ramalingam M, Huh YJ, Lee Y Il. The Impairments of α-Synuclein and Mechanistic Target of Rapamycin in Rotenone-Induced SH-SY5Y Cells and Mice Model of Parkinson's Disease. Front Neurosci. 2019;13:1028.

370. Repici M, Giorgini F. DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and Therapeutic Perspectives. J Clin Med. 2019;8(9):1377.

371. Sikandar S, Minett MS, Millet Q, Santana-Varela S, Lau J, Wood JN ve ark. Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain. Brain. 2018;141(4):1028–39.

372. Zhao J, Seereeram A, Nassar MA, Levato A, Pezet S, Hathaway G ve ark. Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. Mol Cell Neurosci. 2006;31(3):539–48.

373. Melemedjian OK, Tillu D V., Asiedu MN, Mandell EK, Moy JK, Blute VM ve ark. BDNF regulates atypical PKC at spinal synapses to initiate and maintain a

centralized chronic pain state. Mol Pain. 2013;9(1):12.

374. Burgos-Vega CC, Quigley LD, Avona A, Price T, Dussor G. Dural stimulation in rats causes brain-derived neurotrophic factor-dependent priming to subthreshold stimuli including a migraine trigger. Pain. 2016;157(12):2722–30.

375. Wyss-Coray T, Mucke L. Ibuprofen, inflammation and Alzheimer disease. Nat Med. 2000;6(9):973–4.

376. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. Crit Rev Neurobiol. 1999;13(1):45–82.

377. Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: A big problem from molecules in "small" glia. Trends Neurosci. 2005;28(2):101–7.

378. Tegeder I. COX-1 and COX-2 in Pain. In: Encyclopedia of Pain. Springer Berlin Heidelberg; 2013;791–4.

379. Bartels A, Leenders K. Cyclooxygenase and Neuroinflammation in Parkinsons Disease Neurodegeneration. Curr Neuropharmacol. 2010;8(1):62–8.

380. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S ve ark. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(9):5473–8.

381. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Isakson P. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. Adv Exp Med Biol. 1997;400(A):167–70.

382. Tomlinson A, Appleton I, Moore AR, Gilroy DW, Willis D, Mitchell JA ve ark. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. Br J Pharmacol. 1994;113(3):693–8.

383. Liu SF, Newton R, Evans TW, Barnes PJ. Differential regulation of cyclo-oxygenase-I and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. Clin Sci. 1996;90(4):301–6.

384. Ichitani Y, Holmberg K, Maunsbach AB, Haeggström JZ, Samuelsson B, De Witt D ve ark. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rat kidney and adrenal gland after stimulation with systemic lipopolysaccharide: In situ hybridization and immunocytochemical studies. Cell Tissue Res. 2001;303(2):235–52.

385. Khan AA, Iadarola M, Yang HYT, Dionne RA. Expression of COX-1 and COX-2 in a Clinical Model of Acute Inflammation. J Pain. 2007;8(4):349–54.

386. Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. Proc R Soc B Biol Sci. 2003;270(1520):1115–21.

387. Paukert M, Sidi S, Russell C, Siba M, Wilson SW, Nicolson T ve ark. A family of acid-sensing ion channels from the zebrafish: Widespread expression in the central nervous system suggests a conserved role in neuronal communication. J Biol Chem. 2004;279(18):18783–91.

388. Wang YZ, Wang JJ, Huang Y, Liu F, Zeng WZ, Li Y ve ark. Tissue acidosis

induces neuronal necroptosis via ASIC1a channel independent of its ionic conduction. Elife. 2015; 4: e05682.

389. Nassini R, Materazzi S, Benemei S, Geppetti P. The TRPA1 channel in inflammatory and Neuropathic pain and migraine. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2014;167:1–44.

390. Stanford KR, Taylor-Clark TE. Mitochondrial modulation-induced activation of vagal sensory neuronal subsets by antimycin A, but not CCCP or rotenone, correlates with mitochondrial superoxide production. PLoS On. 2018;13(5):e0197106.

391. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y ve ark. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. J Clin Invest. 2005;115(9):2393–401.

392. Heber S, Gold-Binder M, Ciotu CI, Witek M, Ninidze N, Kress HG ve ark. A human trpa1-specific pain model. J Neurosci. 2019;39(20):3845–55.

393. Tanaka BS, Zhao P, Dib-Hajj FB, Morisset V, Tate S, Waxman SG ve ark. A gain-of-function mutation in Nav1.6 in a case of trigeminal neuralgia. Mol Med. 2016;22:338–48.

394. Ren YS, Qian NS, Tang Y, Liao YH, Yang YL, Dou KF ve ark. Sodium channel Nav1.6 is up-regulated in the dorsal root ganglia in a mouse model of type 2 diabetes. Brain Res Bull. 2012;87(2–3):244–9.

395. Pineda RH, Heiser RA, Ribera AB. Developmental, molecular, and genetic dissection of INa in vivo in embryonic zebrafish sensory neurons. J Neurophysiol. 2005;93(6):3582–93.

396. Yao Y, Wang X, Zhang S, Zhang Z, Wang W, Zhu Y ve ark. Targeting Neuroglial Sodium Channels in Neuroinflammatory Diseases. In: Neuroimaging - Neurobiology, Multimodal and Network Applications. IntechOpen; 2020

397. Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. Pain. 2007;131:243–57.

398. Bagley EE, Ingram SL. Endogenous opioid peptides in the descending pain modulatory circuit. Neuropharmacology. 2020;173:108131.

399. Johansson PA, Andersson M, Andersson KE, Cenci MA. Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. Neurobiol Dis. 2001;8(2):220–39.

400. Bissonnette S, Muratot S, Vernoux N, Bezeau F, Calon F, Hébert SS ve ark. The effect of striatal pre-enkephalin overexpression in the basal ganglia of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. Eur J Neurosci. 2014;40(2):2406–16.

401. Bäckman CM, Shan L, Zhang YJ, Hoffer BJ, Tomac AC. Alterations in prodynorphin, proenkephalin, and GAD67 mRNA levels in the aged human putamen: Correlation with Parkinson's disease. J Neurosci Res. 2007;85(4):798–804.

402. Millan MJ, Millan MH, Pilcher CWT, Colpaert FC, Herz A. Chronic pain in the rat: Selective alterations in CNS and pituitary pools of dynorphin as compared to vasopressin. Neuropeptides. 1985;5(4–6):423–4.

403. Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Brennan MB, Hochgeschwender U ve ark. Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. J Neurosci. 2001;21(5):1779–86.

404. Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. Prog Neurobiol. 2002;66(5):285–306.

405. Mylius V, Perez Lloret S, Cury RG, Teixeira MJ, Barbosa VR, Barbosa ER ve ark. The Parkinson disease pain classification system: results from an international mechanism-based classification approach. Pain. 2021;162(4):1201–10.

406. Al-Zahrani SSA, Ho M-Y, Velazquez Martinez DN, Cabrera ML, Bradshaw CM, Szabadi E. Effect of destruction of the 5-hydroxytryptaminergic pathways on behavioural timing and "switching" in a free-operant psychophysical procedure. Psychopharmacology (Berl). 1996;127(1–2):346–52.

407. Holzer P. Opioid antagonists for prevention and treatment of opioid-induced gastrointestinal effects. Curr Opin Anaesthesiol. 2010;23(5):616–22.

408. Sobczak M, Sałaga M, Storr MA, Fichna J. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: Current concepts and future perspectives. J Gastroenterol. 2014;49(1):24–45.

409. Linnstaedt S, Yu S, Pan Y, Datner E, Kurz M, Hendry P ve ark. OPRM1 gene expression differentially predicts posttraumatic chronic pain in women and men. J Pain. 2018;19(3):S99.

410. Cormier-Dequaire F, Bekadar S, Anheim M, Lebbah S, Pelissolo A, Krack P ve ark. Suggestive association between OPRM1 and impulse control disorders in Parkinson's disease. Mov Disord. 2018;33(12):1878–86.

411. Pan J, Cai H. Opioid system in L-DOPA-induced dyskinesia. Transl Neurodegener. 2017;6(1):1.

412. Sen D, Huchital M, Chen YL. Crosstalk between delta opioid receptor and nerve growth factor signaling modulates neuroprotection and differentiation in rodent cell models. Int J Mol Sci. 2013;14(10):21114–39.

413. Chao D, Xia Y. Ionic storm in hypoxic/ischemic stress: Can opioid receptors subside it? Progress in Neurobiology. 2010;90:439–70.

414. Chen T, Li J, Chao D, Sandhu HK, Liao X, Zhao J ve ark. δ-Opioid receptor activation reduces α-synuclein overexpression and oligomer formation induced by MPP+ and/or hypoxia. Exp Neurol. 2014;255:127–36.

415. Mabrouk OS, Viaro R, Volta M, Ledonne A, Mercuri N, Morari M. Stimulation of δ opioid receptor and blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor synergistically attenuate parkinsonism. J Neurosci. 2014;34(39):12953–62.

416. Huang JZ, Ren Y, Xu Y, Chen T, Xia TC, Li ZR ve ark. The delta-opioid receptor and Parkinson's disease. CNS Neurosci Ther. 2018;24(12):1089–99.

417. Fernandez A, de Ceballos ML, Jenner P, Marsden CD. Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of parkinson's disease patients. Neuroscience. 1994;61(1):73–9.

418. Wood PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. Expert Rev Neurother. 2008;8(5):781–97.

419. Jarcho JM, Mayer EA, Jiang ZK, Feier NA, London ED. Pain, affective symptoms, and cognitive deficits in patients with cerebral dopamine dysfunction. Pain. 2012;153(4):744–54.

420. Vogel C, Mössner R, Gerlach M, Heinemann T, Murphy DL, Riederer P ve ark. Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. J Neurosci. 2003;23(2):708–15.

421. Chang PC, Pollema-Mays SL, Centeno MV, Procissi D, Contini M, Baria AT ve ark. Role of nucleus accumbens in neuropathic pain: Linked multi-scale evidence in the rat transitioning to neuropathic pain. Pain. 2014;155(6):1128–39.

422. Taylor AMW, Murphy NP, Evans CJ, Cahill CM. Correlation between ventral striatal catecholamine content and nociceptive thresholds in neuropathic mice. J Pain. 2014;15(8):878–85. /

423. Taylor AMW, Becker S, Schweinhardt P, Cahill C. Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: Implications for motivation, analgesia, and addiction. Pain. 2016;157(6):1194–8.

424. Hashitani T, Mizukawa K, Kumazaki M, Nishino H. Dopamine metabolism in the striatum of hemiparkinsonian model rats with dopaminergic grafts. Neurosci Res. 1998;30(1):43–52.

425. Eldrup E, Mogensen P, Jacobsen J, Pakkenberg H, Christensen NJ. CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease. Acta Neurol Scand. 1995;92(2):116–21.

426. Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, de Gortari P, Simón-Arceo K, Jaimes O, Amaya MI ve ark. Inflammatory nociception diminishes dopamine release and increases dopamine D2 receptor mRNA in the rat's insular cortex. Mol Pain. 2010;6:75.

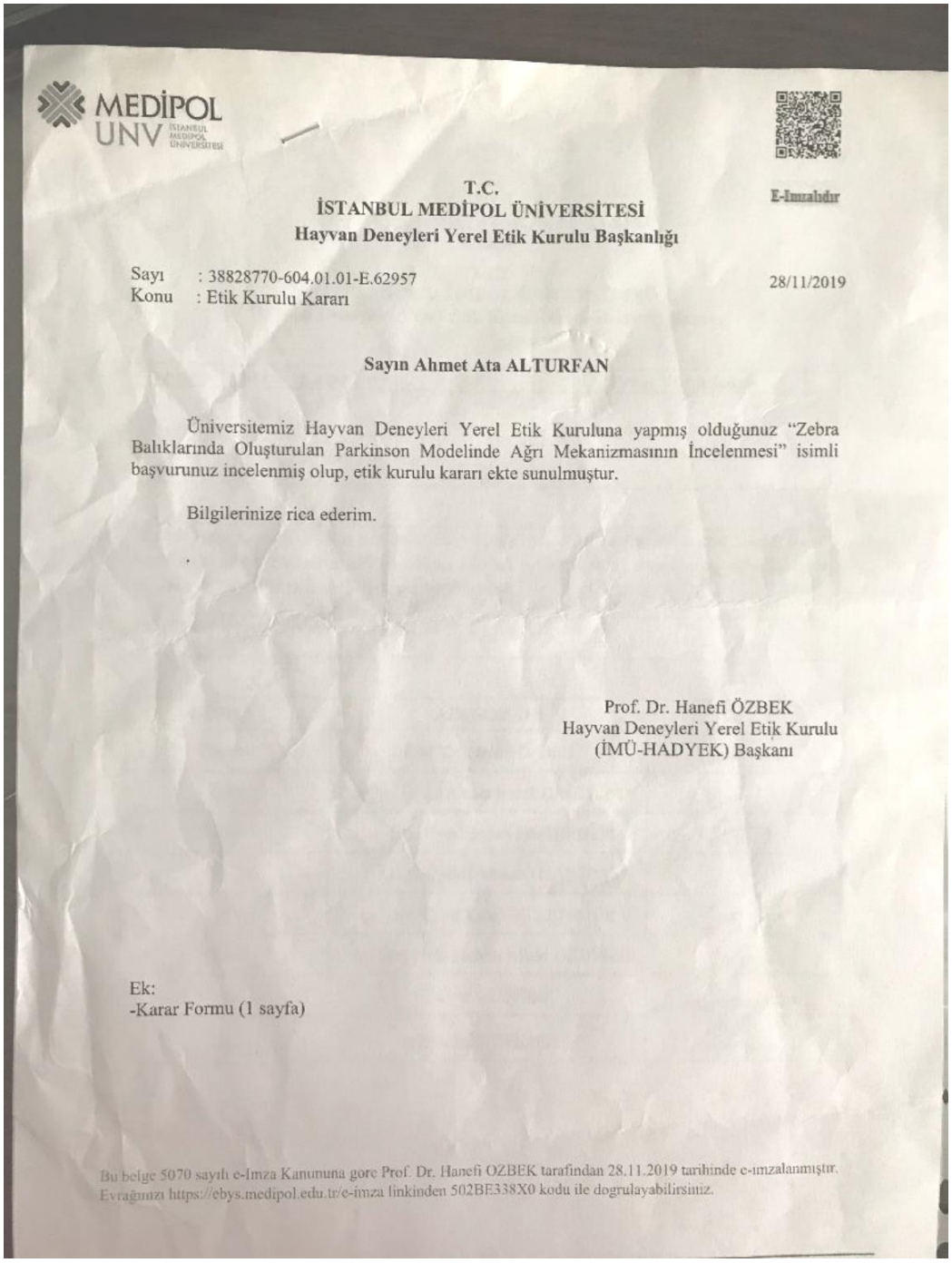
427. Matsumoto M, Togashi H, Yoshioka M, Hirokami M, Tochihara M, Ikeda T ve ark. Inhibitory effects of clonidine on serotonergic neuronal activity as measured by cerebrospinal fluid serotonin and its metabolite in anesthetized rats. Life Sci. 1993;53(8):615–20.

428. Obata H. Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain. Int J Mol Sci. 2017;18(11):2483–95.

429. Delaville C, de Deurwaerdère P, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease [Internet]. Vol. 5, Frontiers in Systems Neuroscience. Frontiers Media SA; 2011:7(31).

430. Thompson T, Gallop K, Correll CU, Carvalho AF, Veronese N, Wright E ve ark. Pain perception in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of experimental studies. Ageing Res Rev. 2017;35:74–86.

ETİK KURUL KARARI



MEDİPOL UNV İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

E-İmzalıdır

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 38828770-604.01.01-E.62957
Konu : Etik Kurulu Kararı

28/11/2019

Sayın Ahmet Ata ALTURFAN

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Zebra Balıklarında Oluşturulan Parkinson Modelinde Ağrı Mekanizmasının İncelenmesi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa gore Prof. Dr. Hanefi OZBEK tarafından 28.11.2019 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrağınızı https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza linkinden 502BE338X0 kodu ile dogrulayabilirsiniz.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ZEBRA BALIKLARINDA OLUŞTURULAN PARKİNSON MODELİNDE AĞRI MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%7	%3	%7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	%5
2	fizyoaktif.com.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
5	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	%1
6	www.thed.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Ondokuz Mayıs Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
9	cornerstonewadsworth.com İnternet Kaynağı	<%1

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SCI-Expanded)

1- Üstündağ FD, Ünal İ, **Cansız D**, Üstündağ ÜV, Subaşat HK, Alturfan AA, Tiber PM & Alturfan EE. 3-Pyridinylboronic acid normalizes the effects of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in zebrafish embryos. Drug Chem Toxicol. 2020 Jul 21:1-8. //doi.org/10.1080/01480545.2020.1795189.

2- **Cansız D,** Ustundag UV, Unal I, Alturfan AA, Emekli-Alturfan E. Morphine Attenuates Neurotoxıc Effects Of Mptp In Zebrafısh Embryos By Regulatıng Oxıdant/Antıoxıdant Balance And Acetylcholinesterase Activity. Drug Chem Toxicol.2021.Basım Aşamasında.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1- **Cansız D**, Emekli-Alturfan E, Alturfan AA. Endojen Opioidlerin Ağrı Mekanizması Üzerine Etkileri. Experimed 2021; 11(1): 1-9. DOI: 10.26650/experimed.2021.884254.

2- Tutanç L, **Cansız D**, Emekli-Alturfan E, Alturfan AA. Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Tekstil Alanında Kullanımları. Experimed 2021; 11(2): 1-9. DOI:10.26650/experimed.2021.880534.

Kitap Bölümleri

1- **Cansız D**. Alturfan AA, Sağlık Bilimleri İçin Temel Biyokimya/ Bölüm 3. Elektrolitler ve Eser Elementler. Ay EN (Ed.) 1. Baskı Ankara Nobel Tıp Kitabevi, Ankara. 2020: 23-47. ISBN: 978-625-7146-22-7.

2- **Cansız D**. Alturfan AA, Sağlık Bilimleri İçin Temel Biyokimya / Bölüm 8. Lipitler. Ay EN (Ed.) 1. Baskı Ankara Nobel Tıp Kitabevi, Ankara. 2020: 115-143 ISBN: 978-625-7146-22-7.