Türk Farmakoloji Derneği
XXIV. Eğitim Sempozyumu

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı işbirliğiyle

NÖROİNFLAMASYON ARAŞTIRMALARI

31 Mayıs 2024
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Hekim Sinan Toplantı Salonu,
KÜTAHYA

PROGRAM	31 Mayıs 2024	
09.15-09.45	**Açılış**	
09.45-10.30	MS Tedavilerinde Yenilikçi Adımlar: Yeni Bir Hayvan Modeliyle İlerleme	**Prof. Dr. M. Yıldırım SARA** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
10.30-10.45	**Soru/Katkı**	
10.45-11.00	**Kahve Arası**	
11.00-11.45	Nöroinflamasyonda Perinöral Netler ve Mikroglia	**Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY ÖZDEMİR** Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı
11.45-12.00	**Soru/Katkı**	
12.00-13.30	**Öğle Yemeği**	
13.30-14.15	Sisplatin Toksisitesi ve Nöroinflamasyon	**Prof. Dr. Kevser EROL** Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
14.15-14.30	**Soru/Katkı**	
14.30-14.45	**Kahve Arası**	
14.45-15.30	Deneysel Alzheimer Hayvan Modellerinde İlaç ve Aşı Uygulamaları	**Prof. Dr. Ahmet HACIMÜFTÜOĞLU** Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
15.30-15.45	**Soru/Katkı**	
15.45-16.30	Deneysel Parkinson Hastalığı Modelleri	**Doç. Dr. Banu Cahide TEL** Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı
16.30-16.45	**Soru/Katkı**	
16.45-17.00	**Kapanış**	

İÇİNDEKİLER

Program..... 3

Ms Tedavilerinde Yenilikçi Adımlar: Yeni Bir Hayvan Modeliyle İlerleme
Prof. Dr. M. Yıldırım SARA 5

Nöroinflamasyonda Perinöral Netler Ve Mikroglia
Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY ÖZDEMİR..... 13

Sisplatin Toksisitesi Ve Nöroinflamasyon
Prof. Dr. Kevser EROL..... 16

Deneysel Alzheimer Hayvan Modellerinde İlaç Ve Aşı Uygulamaları
Prof. Dr. Ahmet HACIMÜFTÜOĞLU.....24

Deneysel Parkinson Hastalığı Modelleri
Doç. Dr. Banu Cahide TEL 35

Gezi Rehberi:
Aizanoi Antik Kenti/Çavdarhisar-KÜTAHYA..... 49
Prof. Dr. F. Yasemin ÖZATİK

MS TEDAVİLERİNDE YENİLİKÇİ ADIMLAR: YENİ BİR HAYVAN MODELİYLE İLERLEME

Prof. Dr. M. Yıldırım SARA
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Demiyelinizan bozukluklar, normal miyelinli yapıların yıkımı veya hasarı ile karakterize, çoğunlukla beyaz cevher bozukluğu ile seyreden hastalıkların bir alt grubudur. Bu bozukluklar otoimmün, enfektif, iskemik veya toksik kökenli olabilir. Otoimmün demiyelinizan bozukluklarının ana grupları; multipl skleroz (**MS**), nöromiyelitis optika spektrum bozuklukları (**NMOSD**), akut dissemine ensefalomiyelit (**ADEM**), akut hemorajik lökoensefalit (Weston Hurst sendromu) ve miyelin oligodendrosit glikoprotein ilişkili hastalıklardır (**MOGAD**).

Santral sinir sisteminin (SSS) demiyelinizan bozukluklar içinde en sık görülen hastalığı Multipl sklerozdur (MS). Dünya çapında 2.5 milyondan fazla insanı etkiler. Başlangıç yaş aralığı genellikle 20 ile 40 yaşları arasındadır, ancak vakaların yaklaşık %20'sinde hastalık daha erken (<20 yaş) veya daha sonra (>40 yaş) başlar (1). MS olma riskinin genel popülasyonda %0.5, ailede ve kardeşte varsa %1 civarında olduğu bulunmuştur.

MS'in etiyolojisi hala bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı düşünülmektedir. Genetik risk faktörler içinde, kadın olmak (kadın:erkek insidansı 3:1), beyaz olmak ve bazı HLA-DR2 altgruplarına sahip olmak gösterilmektedir. Irklara göre MS olma riski en yüksek Beyazlarda bulunmaktadır, bunun yanında ise Afrikalılarda, Asyalılarda ve Güney Amerika yerlilerinde ise risk en düşüktür. Genetik risk faktörleri arasında, HLA *DRB1*1501* aleli beyazlarda MS ile en sık ilişkili bulunanıdır (2). Çevresel faktörler içinde ise MS riskini artıranlar, bazı enfeksiyonlar, düşük D vitamini düzeyi, obesite ve sigara olarak bulunmuştur. Obesitenin, sigara bağımlılığının ve D vitamini düzeylerinin, MS hastalığına yakalanma ve atakların daha ağır geçemesi ve hatta progresif hale dönüşme risklerinin artması ile ilişkili olduğu gösteren çalışmalar vardır. Bazı araştırmacılar, MS hastalığının başlamasının ve sonrasında lezyon gelişiminin, genetik olarak duyarlı bireylerde çevresel bir tetikleyici gerektirdiğini iddia etmektedirler, ancak lezyon indüksiyonundan sorumlu olabilecek biyolojik/çevresel ajan/lar henüz gösterilememiştir (3, 4). Epstein Barr Virüsü'nün (EBV) MS için çevresel bir tetikleyici olduğu (5), ve potansiyel olarak moleküler taklit yoluyla işlev gördüğü öne sürülmüştür (6). Ancak EBV açısından popülasyonun yaklaşık %95'i seropozitif iken göreceli olarak MS riskinin hala düşük olması EBV-MS iddiasını oldukça zayıflatmaktadır (7). MS için biyolojik/çevresel tetikleyiciler muhtemelen hastalığın başlangıcında bir kerede ortaya çıkmayıp, bunun yerine hastalığın seyri boyunca tekrar tekrar ortaya çıkıyor olabilirler.

Multipl skleroz, kronik inflamasyon ile karakterize ve SSS'nin miyelin kılıfını hedef alarak demiyelinizasyon, aksonal hasar ve kayıpla sonuçlanan bir hastalıktır. MS karekteristik lezyonları, plaklar, postkapiller venüller çevresinde yoğunlaşırlar. Zincirleme olarak kan-beyin bariyeri (KBB) işlevinin bozulması, miyelin otoreaktif lenfositlerin girişine yol açar, beyin içinde artan immünolojik aktivite lezyon gelişimine neden olur ve MS kliniği ortaya çıkar. Bu yaklaşıma göre kan-beyin bariyeri hasarını takiben aktive lökositlerin, makrofajların, T ve B hücrelerin beyine migrasyonu meydana gelmektedir. KBB hasarının nasıl geliştiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, glial ve endoteliyal hücrelerinin üretmiş olduğu sitokinlerin (TNF, IL-1β, IL-6 vb) ve immün hücrelerin direkt etkileri ile oligodendrosit kaybı, reaktif gliozis ve nöroaksonal dejenerasyon ile sonuçlanacak olan inflamasyon hasarının ve demiyelinizasyonun oluştuğu düşünülmektedir (8, 9, 10).

MS'nin dört temel alt türü vardır:

1) **Klinik olarak izole sendrom (CIS)** Inflamasyon ve demiyelinizasyonun neden olduğu nörolojik semptomların ilk bölümüdür. MS'li genç erişkinlerin %85'inde hastalık başlangıcı klinik

izole sendrom (KİS) şeklinde ortaya çıkar.

2) **Relapsing-remitting MS (RRMS)** En yaygın MS türüdür. MS'li kişilerin yaklaşık %85'ine başlangıçta RRMS tanısı konur. İlk belirtiler genellikle 20'li yaşlarda ortaya çıkar. Dönemsel semptom atakları (relaps) ve iyileşme dönemleri (remisyon) yaşanır. Yeni veya artan nörolojik semptomların ve ataklar ile karakterizedir. Kötüleşen hastalık aktivitesini (nüksler) kısmi veya tam iyileşme dönemleri (remisyonlar) takip eder. Remisyon dönemlerinde hastalıkta belirgin bir ilerleme olmaz.

3) **İkincil ilerleyici MS (Sekonder progresif MS: SPMS)** Başlangıçta RRMS olan bireylerin yaklaşık %40'ı zaman içinde (10-15 yıl) değişmiş bir hastalık paterni geliştirerek progresif evreye geçer. Semptomlar sürekli hale gelir. İyileşme dönemleri yoktur.

4) **Birincil ilerleyici MS (Primer progresif MS: PPMS)** MS'li kişilerin yaklaşık %12'si klinik olarak yavaş ilerleyen bir başlangıçla karakterize edilir ve biriken sakatlıklar ile seyir eder ve giderek kötüleşir. Ataklar ve iyileşme dönemleri yoktur.

MS tanısı radyolojik görüntülemelere, klinik kriterlere ve oligoklonal bantların varlığına dayanarak konur. RRMS'de ataklar genelikle haftalar içinde zirve yaparlar ve aylar içinde iyileşirler genellikle %80-100 düzelir. Tedavi alttiplerine göre düzenlenir ve tedavide steroidler, plazmaferez, plazma değişimi ve hastalığı modifiye eden ilaçlar kullanılır.

MS'in klinik olarak değerlendirilmesinde Genişletilmiş Dizabilite Durum Skalası (EDSS, Expanded Disability Status Scale)' kullanılır (11). Bu skalaya ait skor 0 ile 10 arasında bir nörolog tarafından yapılmaktadır. "EDSS 0" skoru tamamen normal muayeneyi "EDSS 10" skoru ise MS'in devam eden sürecinde meydana gelen ölümü belirtmektedir. Bu skor; piramidal, serebellar, beyin sapı, duyusal, GIS ve mesane fonksiyonu, vizüel fonksiyonlar, serebral fonksiyonlar ve diğer şeklindeki 8 alt kategoride fonksiyonel sistem değerlendirmesini içermektedir. EDSS skorlarında kabaca 1 - 4.5 arası herhangi bir yardım almadan yürüyebilen fakat 8 tane fonksiyonel sistemde çeşitli bulguları olan MS hastalarını; 5 - 9.5 arası puan ise yardım almadan yürüyemeyen MS hastalarını kapsamaktadır.

Zaman içinde bu süreçler manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile görüntülenebilen atrofi ile sonuçlanır. Beyin parankim fraksiyonu atrofisi ve tüm beyin gri cevher atrofisi hem relapsing-remitting MS (RRMS) hem de sekonder progresif MS'de (SPMS) belgelenmiştir. Bu nedenle, gri cevher altyapı atrofisi ve buradaki nörodejeneratif süreçler MS'teki engellilik ilerlemesiyle oldukça ilişkilidir.

Beyin omurilik sıvısında sık olarak IgG oligoklonal bantların bulunması, yüksek düzeyde immünoglobulin G (IgG) varlığı, SSS içinde antikor üretiminin olduğunu düşündürmektedir. İnflamasyon MS'te kritik bir role sahiptir. Klasik olarak MS ataklarında T hücrelerini ana rolü aldığı düşünülsede, artık B hücrelerinin, gliaların da süreçlerde oldukça önemli yeri olduğu gösterilmektedir (12). Periferik immün hücreler ile beraber SSS-yerleşik hücrelerin salıverdiği çeşitli mediyatörleri santral parankimde demiyelinizasyona ve inflamasyona sebep olduğu düşünülmektedir. Progresif tip MS için ise SSS'de devam eden inflamasyonun ayrı bir patoloji oluşturduğu düşünülmektedir. Ancak inflamasyonun nörodejenerasyona nasıl neden olduğu hala netleştirilememiştir. RRMS'de inflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal transeksiyon arasında açıkça nöropatolojik bir ilişki vardır. RRMS'deki kadar güçlü olmasa da, progresif MS'te de inflamasyon ile hem demiyelinizasyon hem de nörodejenerasyon arasında bir ilişki bulunmuştur (13). Antiinflamatuar hastalık modifiye edici tedaviler (DMT'ler) MS nükslerini azaltır, ancak SSS içindeki hücreleri hedef alan doğrudan nöroprotektif tedavilere hala büyük bir ihtiyaç vardır. Nörodejenerasyonu tetikleyen mekanizmaların anlaşılması, sakatlıkları durdurmak ve hatta onarmak için terapötik müdahalelere yönelik hedeflerin belirlenmesi için çok önemlidir.

MS'nin farklı yönlerini incelemek, yeni tedaviler geliştirmek için çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu hayvan modelleri, MS patogenezini anlama, potansiyel tedavileri test etme ve bu hastalık hakkındaki bilgimizi artırma konusunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu modeller iki

paradigmaya göre şekillendirilmiştir. Dıştan içe (outside-in) ve içten dışa (inside-out) olarak belirtilen bu iki paradigma, MS'in kökenine ilişkin tartışmalara temelinde yer almaktadır (14). Dıştan içe paradigması, MS'in temel nedeni olarak miyeline karşı periferik olarak tetiklenen bir otoimmün saldırıyı öne sürerken, içten dışa paradigması SSS içinde miyelin kalıntılarına karşı ikincil otoimmün reaksiyonları tetikleyen bir sitodejeneratif süreci ön planda görmektedir. MS hayvan modellerinin en yaygın olarak kullanılan kategorileri şunlardır:

1) Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE): DOE, MS için en yaygın kullanılan hayvan modelidir. Bu modelde, miyelin bileşenlerine karşı immün yanıt indüklenir ve nöroinflamasyon ile demiyelinizasyon gerçekleşir. MSS'yi infiltre eden miyelin reaktif T hücreleri tarafından başlatılan adaptif immün aracılı bir deneysel otoimmün ensefalomiyelit modelidir. Bu model, MS'deki immün yanıtları ve patolojik süreçleri anlamak için sıklıkla kullanılır. Bu modelde, hayvanların klinik durumları DOE skoru ile takip edilmektedir. DOE skorlaması MS hastalarının kliniğinde kullanılan EDSS sistemine denk gelmektedir. Bu modelde en çok kullanılan hayvan türleri; C57BL/6 fare (MOG35-55), Biozzi ABH Sıçanları (Omurilik homojenatı, SCH), Dark Agouti sıçanları (MOG1-125), Lewis sıçanlarıdır (MOG1-125). Genellikle fareler veya sıçanlar (çoğunlukla C57BL/6 veya Lewis sıçanları) miyelin proteinleriyle; **myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), miyelin bazik protein (MBP)** veya **proteolipid protein (PLP)** veya diğer ensefalitojenik epitoplar (nörofasin NF 155, geçici aksonal taşıyıcı protein 1 (*transient axonal glycoprotein-1*, TAG-1)), **adjuvanlar** (Freund adjuvanı) ile immünize edilirler. Yanıtın güçlendirilmesi için pertusis toksini enjeksiyonları da ilaveten kullanılabilmektedir. Ayrıca, bu model bir antijen ile aktif olarak yapılabildiği gibi, ensefalitojenik T hücrelerinin transferi ile pasif olarak da yapılabilmektedir. DOE "Outside-in" bir MS modelidir.

2) Toksinle indüklenen Demiyelinizasyon Modelleri (Kuprizon, Lizofosfatidil kolin (Lizolesitin), Etidium bromide):

Kuprizon modelinde farelere kuprizon verilerek ve otoimmün olmayan demiyelinizasyon indüklenir. Kuprizon oral uygulama ile oligodendrosit apoptozunu birkaç gün içinde tetikleyen bakır şelatlayıcı bir bileşiktir. Kısa süreli kuprizon tedavisi diyetinde, aksonal hasar olmaksızın demiyelinizasyonu tetikler ve normal diyete dönüşünden sonra tam remiyelinizasyon gerçekleşir. Kronik kuprizon tedavisi, kısmi remiyelinizasyon ile birlikte aksonal hasara neden olur ve bu kısmı MS'a daha benzerdir. Kuprizon modeli, sistemik otoimmüniteyi veya SSS bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu içermez. Bu, beyindeki doğal bağışıklık hücrelerinin aktive edilmesiyle ve belirli beyaz ve gri cevher içeren beyin bölgelerindeki demiyelinizasyon ile seyir eder.

Lizofosfatidil kolin modelinde de beyin içine enjekte edilerek deterjan etkisi ile fokal demiyelinizasyonlar oluşturulur. Her iki model de demiyelinizasyon, gliozis ve akson hasarı gösterir ve bu modeler özellikle remiyelinizasyon süreçlerini incelemek ve potansiyel remiyelinizasyon tedavilerini test etmek için kullanılırlar. Lizolesitin birincil toksisitesi, kuprizon modelinde olduğu gibi oligodendrositlerden daha çok miyelin kılıflarına hasara verir. Bu model de bağışıklık hücrelerinden bağımsızdır.

Etidium bromür, nöronlar veya epitelyal hücreler yerine glial hücrelerde (Astrosit ve oligodendrosit) DNA transkripsiyonunu tercihen engelleyerek etki eder. Etki etidyum bromür konsantrasyonu ile ilişkili olduğundan demiyelinizasyon nerede olacağı öngörülebilir ve lezyonun boyutu ayarlanabilir. Etidyum bromürün lokal enjeksiyonuyla indüklenen hipokampus lezyonları, bilişsel eksiklikleri incelemek için bir model olarak da kullanılmaktadır. Ancak gerçek dünyada MS etiyolojisinde hızlı oligodendrosit apoptozunu indükleyen çevresel bir toksin ile ilişkisi gösterilememiştir. Buna ilaveten toksinle indüklenen demiyelinizasyon modellerde, demiyelinize lezyonlarda lenfositler (T hücreleri ve B hücreleri) nadiren gözlenmesi bu modelin geçerliliğini düşürmektedir.

Bunların hepsi "inside-out" modellerdir.

3) Virüs Kaynaklı Kronik Demiyelinizasyon Modelleri (Theiler Virüsü Kaynaklı DOE (TMEV), fare Hepatit Virüsü (MHV), Semliki Forest Virüsü (SFV)):

Theiler Virüsü Kaynaklı DOE (TMEV) modeli, farelerde kronik demiyelinizasyonu taklit eder ve MS patolojisinin bazı yönlerini sergiler. TMEV intraserebral enjeksiyonu ile enfekte edilen farelerde nöroinflamasyon, demiyelinizasyon ve gliozis gelişir ve bu durum geri dönüşsüzdür. TMEV modelleri daha çok viral kaynaklı demiyelinizasyonun mekanizmalarını incelemek için kullanılırlar. TMEV sadece farelerde demiyelinizan hastalığa neden olabilir. Ancak bu modelin kliniği çok ağır geçmekte ve hızla ilerlemektedir. MS ve DOE'nin aksine "inside-out" model bir model olmasıdır.

4) Genetik Modeller:

Trembler-J farelerinde, periferik miyelin anormallikleri doğal olarak ortaya çıkar.

Shiverer farelerinde ise miyelin bazik protein eksikliği nedeniyle SSS'leri ciddi hipomiyelinizasyon görülür.

Bu modellerde temel patolojiler miyelin defektleri ve nörolojik bozukluklardır. Genetik modeller daha çok miyelinle ilgili belirli genlerin rolünü aydınlatmak için uygundur.

5) Diğer hayvan modelleri:

İnsan olmayan primatlar (Marmozetler ve Resus maymunları), insanlarla olan genetik ve fizyolojik benzerlikleri nedeniyle değerli bir translasyonel araştırma imkanı sunarlar. Hastalık mekanizmalarını incelemek, potansiyel tedavileri test etmek ve güvenlilik profillerini değerlendirmek için kullanılırlar. Etik sorunlar, maliyet ve erişilebilirlik nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Bağışıklık yanıtlarını, demiyelinizasyonu ve remiyelinizasyon süreçlerini incelemek için kullanılmaktadırlar.

Tavşanlarda daha az MS modeli bulunur ve bağışıklık sistemi insanlardan farklıdır.

Zebra Balığı Modelleri: Hızlı gelişimleri, şeffaf embriyoları ve kolay genetik manipülasyonları nedeniyle yeni bir hayvan modelleridir. MS'nin daha çok genetik ve gelişimsel yönlerini incelemek için kullanılırlar. Ancak yukarıdaki avantajlarına rağmen, zebra balığı modelleri insanlardaki MS'nin tam olarak taklit edemezler.

Kobaylar, koyunlar, köpekler çok daha az olasa da kullanılmıştırlar ve hastalık mekanizmaları ve tedavi müdahaleleri konusunda ek bakış açıları sağlarlar.

Henüz MS hastalığı için elimizde mükemmel bir MS modeli mevcut değildir. En uygun model, sorulan soruya bağlı olarak seçilerek kullanılanıdır. Deneysel otoimmün ensefalomiyelit (DOE), MS'deki immün çalışmalar için en yaygın kullanılan bir hayvan modelidir ve neredeyse tüm DMT'ler bu modelde test edilmiştir. MS nasıl RRMS, PPMS gibi farklı şekillerde ortaya çıkıyorsa DOE'lerin farklı görünümleri bulunmaktadır; **Monofazik hastalık** MBP peptidi Ac1-9 ile B10.PL farelerinde, **RRMS** PLP139–151 ile SJL farelerinde ve **Kronik Hastalık** MOG35-55, C57BL6 farelerinde oluşturulabilmektedir.

Yakın zamana kadar MS ve hayvan modeli deneysel otoimmün ensefalomiyelit (EAE), patojenik inflamatuar süreçlerin ana düzenleyicileri olarak T helper (Th)1 ve Th17 hücreleri kabul ediliyordu. Artık, B hücrelerinin de MS patogenezinde rol oynadığı anlaşılmıştır. MS hastalarının beyin omurilik sıvısında (BOS) oligoklonal bantlar halinde antikorların varlığı, MS tanısı için kullanılan ilk biyobelirteçlerden biridir. Ektopik lenfoid folikül benzeri yapılar, bazı EAE fare modellerinde olduğu gibi MS hastalarının SSS'lerinde de saptanmış ve alttaki kortikal lezyonlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (15, 16). Her ne kadar MS'te şimdiye kadar kesin bir otoantijen tanımlanamamış olsa da, antikorlar ve komplemanların genellikle aktif MS lezyonlarında biriktiği görülmüştür. Bazı MS hastalarınında plazmaferezden yararlanıyor olması, otoantikorların üretiminin MS'teki patolojiye katkıda bulunabileceğine delalet etmektedir (17, 18). DOE'de, B hücreleri tarafından antijen sunumu, esas olarak Th1 hücrelerinin ve aynı zamanda SSS'deki Th17 hücrelerinin reaktivasyonu yoluyla hastalığı indüklemek için yeterli bulunmuştur (19, 20). MS ve EAE bağlamında B hücreleri tarafından farklı sitokinlerin ifade edildiği bulunmuştur. MS hastalarının periferik kanlarından alınan B hücrelerinin, patojenik T hücrelerinin aktivasyonuna yol açan IL-6, TNFα ve lenfotoksini artan miktarlarda, bunun yanında antiinflamatuar IL-10'u daha düşük

seviyelerde üretikleri gösterilmiştir (21, 22). B hücreleri tarafından salgılananan IL-6'nın patojenik Th17 hücrelerinin farklılaşması ve EAE'de hastalık indüksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (23, 24). Son olarak anti-CD20 klinik çalışmaları, B hücrelerinin MS'te inflamatuar bir işlevi olduğuna dair sağlam kanıtlar sunmaktadır (25).

İmmün hücreler SSS'ye geçtiklerinde, MS ve DOE'de görülen klasik inflamatuar beyaz cevher lezyonlarına neden olurlar. Bu lezyonlar T hücreleri ve makrofajlarla birlikte yerel astrositlerin ve mikrogliyaların aktivasyonu ile karakterizedir. C57BL6 farelerinde oluşturulan kronik DOE modelinde, MS'te ki gibi, T2-ağırlıklı MRG ile beyaz cevher tutulumunu, difüzyon tensör görüntüleme (DTI) ile de aksonal hasarın saptanmıştır. İlaveten DOE'de beyaz cevher lezyonlarının dışında, özellikle korpus kallosum ve omurilikte normal görünen beyaz madde değişikliklerinin (NGBM; Normal-Appearing White Matter) mevcut olduğu görülmüştür. MS'de saptanan bu NGBM'ler, aktive astroitler ve mikrogliya ile ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular, DOE'nin MS'deki beyaz madde lezyonları ve akson kaybını incelemek için geçerli bir model olduğuna işaret etmektedir.

DOE modelinin olumlu yönleri şöyledir:

1) Çeşitli ensefalitojenik antijenler ile duyarlı türler/suşlar kullanılarak farklı klinik fenotipleri (RRMS, PPMS vb) araştırmak için bir olanak sağlar.
2) T ve B hücrelerinin MS'deki katkı ve rolleri incelenebilir.
3) MS'in cinsiyet ve yaşa bağlı değişimleri incelenebilir.
4) Farklı klinik fenotipleri üzerine ilaçların etkileri incelenebilir. Günümüzde kullanılan birçok RRMS ilacı bu model sayesinde geliştirilmiştir.

DOE Modelinin kısıtlılıkları ise şunlardır:

1) MS'in gelişim zamanlaması ile DOE'deki hastalık progresyonunun zamanlaması tam birbirlerine tutmamaktadır. DOE'de hastalık immünizasyon yoluyla suni olarak indüklenir ve belirtilerin başlangıcı immünizasyondan birkaç gün veya hafta sonra ortaya çıkar, halbuki MS yıllarca latent kalabilir ve belirgin belirtilerin başlangıcından sonra ancak keşfedilebilir.
2) Klasik DOE'de genellikle omurilik demiyelinizasyon belirgin iken, MS'de belirgin tutulumlar beyin ve beyincik korteksinde meydana gelir.
3) DOE lezyonları zamanlama ve lokalizasyon açısından ortaya çıkışını ayarlamak veya tahmin etmek çok zordur. Bu nedenlede remiyelinizasyonu da araştırmak zordur.
4) Gri cevher tutlumu özellikle hem PPMS ve SPMS'in çalışılabilmesi için gereklidir. Bir çalışmada MOG sonrası 4. haftada kortekse direkt sitokin enjeksiyonu sonucunda kortikal demiyelinizasyon elde edilmiştir (26). Ancak bu model de MS'in sadece kortikal demiyelinizasyonu sergilemekte diğer hiçbir klinik bulgularını göstermemektedir.
5) Günümüzdeki Progresif DOE Modelleri çok az sayıdadır. Mevcut EAE modelleri öncelikle RRMS'i taklit etmektedir. Progresif evrelere (sekonder progresif MS'e benzer) geçiş yapan modellerin geliştirilmesi, translasyonel uygunluğu artırılması için gereklidir. Bu modeller, hastalığın ilerlemesinin altında yatan mekanizmaların incelenmesine ve progresif MS tedavilerinin test edilmesine gereklidir.
6) Günümüzdeki var olan PPMS modellerinde ise progresyonun çok hızlıdır ve hastalık tablosu çok ağırdır (Örn. C57BL/6J, MOG). Hızla gelişen, geniş çaplı motor paralizisi ve ciddi sensoriyel sorunlar gösteren bu hayvanlar (C57BL/6J farelerde MOG ile) üzerinde davranış deneyleri yapılabilmesi çok zordur ve bu hayvanlarda nöropsikiyatrik (non-motor) semptomların çalışılabilmesi ve hatta yeni ilaç tedavilerinin klinik değerlendirmelerinin yapılabilmesi pek mümkün gözükmemektedir.
7) Wistar gibi kolay ve ucuz olarak bulunabilen sıçanlar MOG'a kısmen dirençli oldukları için DOE modelleri için uygun değillerdir. Bu araştırmalarda kullanılan sıçanlar MOG gibi

immünizasyonlara duyarlı özel suşlar olduğu için maliyetleri çok yüksektir ve erişilebilmeleri zordur. Bu da sıçanlarda MS araştırmaları kısıtlamaktadır.

8) DOE modellerinde KBB modülasyonu için genellikle pertusis toksini kullanılmaktadır. Ancak gerçek dünyada MS hastalarında bu geçerli bir durum değildir. Daha gerçekçi, hem temporal olarak hem de şiddet olarak kontrol edilebilir bir yaklaşıma ihtiyaç vardır.
9) Çoğu DOE modeline çevresel faktörleri dahil edilmemektedir. Viral enfeksiyonlar veya bağırsak mikrobiyotası gibi MS ile ilişkili çevresel tetikleyicileri göz önünde bulundurulması gereklidir.

DOE modelinin belirtiğimiz bu kısıtlılıklarını aşmak üzere gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın özeti aşağıda verilmiştir. Bu çalışmanın ayrıntıları sunumda verilecektir.

MS'in progresif süreci, kortikal demiyelinizasyon ve nöropsikiyatrik semptomlar (NPS) ile ilişkilidir. Lipopolisakkarit (LPS), Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) agonisti olup kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğini artırabilen bakteriyel bir endotoksindir. Bu çalışmada, Wistar albino dişi sıçanlarda miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ile immünizasyon sonrası LPS enjeksiyonu ile KBB geçirgenliğinin artırılıp, kortikal demiyelinizasyon ve NPS'ler ile karakterize kronik progresif MS modeli oluşturulması amaçlanmıştır. 4 mg/kg LPS'nin KBB geçirgenliğini artırdığı gösterilmiştir. MOG ile immünize sıçanlara 3. haftada LPS enjeksiyonu yapılmasıyla 70. güne kadar devam eden kronik progresif MS modeli elde edilmiştir. Oluşturulan modelde depresyon-benzeri ve anksiyete-benzeri duygudurum, kognitif disfonksiyon, motor disfonksiyon ve mekanik allodini saptanmıştır. Subpial korteks ve hipokampüste şiddetli olmak üzere yaygın gri cevher demiyelinizasyonu ve eşlik eden mikroglial aktivasyon belirlenmiştir. Modelimizin serum TNF-α seviyesinin yükseldiği ve periferik sinir elektrofizyolojisinde önce birleşik sinir aksiyon potansiyeli amplitüdlerin düştüğü ve latansların uzadığı kronik süreçte ise tekrar normale döndüğü bulunmuştur. Bu çalışma, bilinen DOE modeline 3. haftada LPS enjeksiyonunun eklenmesi sonucunda kortikal demiyelinizasyon ve NPS'ler ile seyreden kronik progresif MS modeli oluşturulabildiğini göstermiştir. Ek olarak bu bulgular, LPSnin, kan-beyin bariyerini bozarak ve MS'in karakteristik özelliği olan inflamasyonu başlatan tetikleyici olabileceğini düşündürmektedir.

Kaynaklar

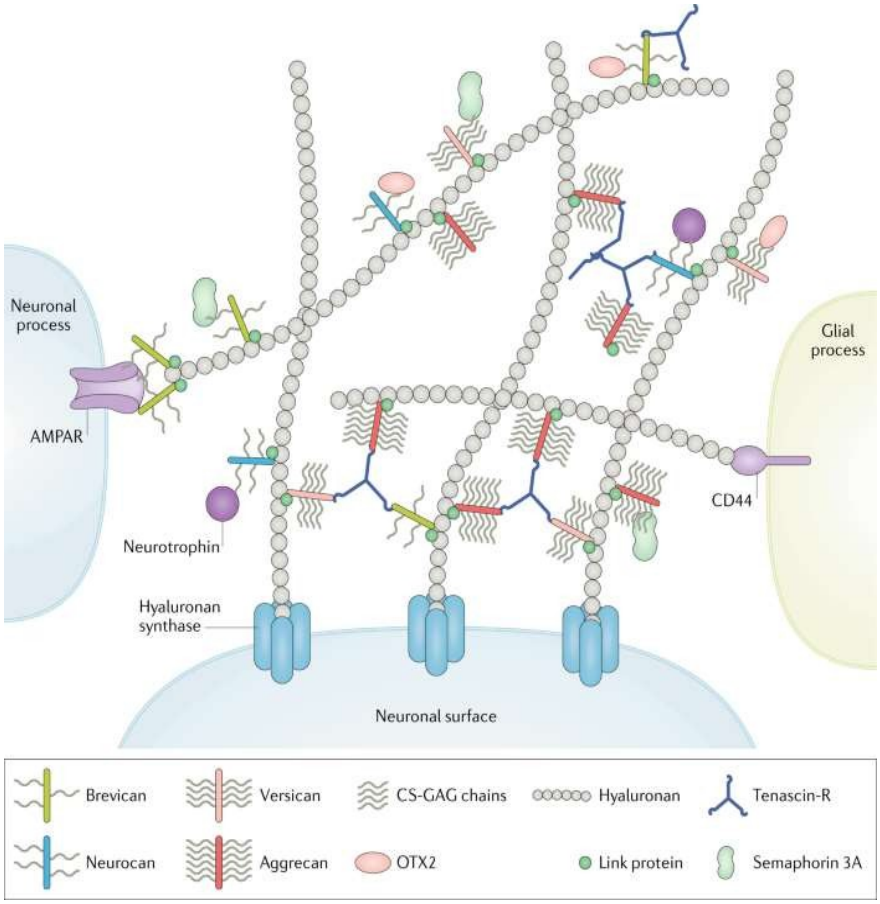
1) Zeydan B, Kantarci OH. Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. Neurol Clin.; 36(1):163-71, (2018)
2) Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. Lancet Neurol 14 (4):406–19. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70305-9, (2015)
3) Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*.;3(12):709–718, (2004)
4) Thompson AJ, et al. Multiple sclerosis. *Lancet*.;391(10130):1622–1636. (2018)
5) Bjornevik K, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. Science.;375(6578):296–301. (2022)
6) Lanz TV, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. Nature.;603(7900):321–327, (2022)
7) Bjornevik K, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*.375(6578):296–301, (2022)
8) Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas M, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, et al. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. Arch Med Res.45(8):687-97, (2014)
9) Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol.47(6):707-17, (2000)

10) Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med.354(9):942-55, (2006)
11) Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology.33(11):1444-52, (1983)
12) Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. Nat Immunol.19(7):696-707, (2018)
13) Frischer, J.M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain 132, 1175–1189 , (2009)
14) Stys, P. K., Zamponi, G. W., Van Minnen, J., and Geurts, J. J. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 507–514. doi: 10.1038/nrn3275, (2012)
15) R. Magliozzi *et al.*, Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 130, 1089–1104 (2007)
16) A. Peters *et al.*, Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity* 35, 986–996 (2011)
17) C. Lucchinetti et al., Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. Ann. Neurol. 47, 707–717 (2000)
18) M. Keegan et al., Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. Lancet 366, 579–582 (2005)
19) C. R. Parker Harp et al., B cell antigen presentation is sufficient to drive neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis. J. Immunol. 194, 5077–5084 (2015)
20) N. Molnarfi et al., MHC class II–dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. J. Exp. Med. 210, 2921–2937 (2013)
21) A. Bar- Or et al., Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? Ann. Neurol. 67, 452–461 (2010)
22) M. Duddy et al., Distinct effector cytokine profiles of memory and I human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. J. Immunol. 178, 6092–6099 (2007)
23) N. Molnarfi et al., MHC class II–dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. J. Exp. Med. 210, 2921–2937 (2013)
24) T. A. Barr et al., B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. J. Exp. Med. 209, 1001–1010 (2012)
25) Castillo-Trivino, T.; Braithwaite, D.; Bacchetti, P.; Waubant, E. Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: A systematic review. *PLoS ONE*, *8*, e66308, (2013)
26) Üçal M, Haindl MT, Adzemovic MZ, Strasser J, Theisl L, Zeitelhofer M, et al. Widespread cortical demyelination of both hemispheres can be induced by injection of pro-inflammatory cytokines via an implanted catheter in the cortex of MOG-immunized rats. Exp Neurol. 294:32-44, (2017)

NÖROİNFLAMASYONDA PERİNÖRAL NETLER VE MİKROGLİA

Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY ÖZDEMİR
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı

Perinöral netler (PNN) nöron soma ve dendritleri etrafında akson başlangına kadar uzanan kondense ekstrasellüler matriks elemanlarıdır. Beyinde PNN ile çevrelenen nöronlar büyük oranda inhibitor nöronlardır. Kortekste özellikle, parvalbumin ifade eden (PV+) GABAerjik internöronların etrafında yerleşirler. PNNler bir lektin olan Wisteria floribunda agglutinin (WFA) bağlayabilirler bu nedenle WFA PNN'leri işaretlemelte kullanılan bir araç olmuştur. Şekil'de şematik olarak PNN'I oluşturan moleküller görülmektedir.



Şekil 1: PNN şematik yapısı

PNN'lerin çoğu kondritin sülfat yapısındadır. Embriyonik dönemde 6-sülfatlı iken doğumda bu oran %18'e iner ve erişkin hayatta neredeyse hiç kalmaz ve 4 sülfatlı forma döner. Beyin gelişimi sırasında çok sayıda yeni sinapsın geliştiği dönemde beynin maturasyonu ve nöronların etrafının PNN ile sarılması ile tamamlanır. PNN, nöronlar arası bağlantıları stabilize eder ve nöronu nörotoksinler ve oksidatif strese karşı korur. Hayvan modellerinde, PNN kaybının yeni sinaps oluşumuna ve plastisiteye izin verirken, aynı zamanda nöronu hasarlara karşı savunmasız hale getirdiği gösterilmiştir.

Nöronlara kronik oksidatif strese karşı bir koruma kalkanı olan bu ağların Alzheimer hastalığı'nda da etkilenmiş olduğu gösterilmiştir. Ancak PNA kaybının hastalığın başlangıcı ya da gidişatı üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Ekibim ve ben inflamatuar bir demans sıçan modelinde, PNN kaybını göstermek, bu kaybın nörodejenerasyonda beklenen patolojik ve kognitif değişikliklerle temporal ilişkisini incelemek ve oksidatif hasarın bu patolojik yolaktaki

önemini göstermeyi amaçladık. Alzheimer benzeri nöroinflamasyonu tetiklemek amacı ile intrahippokampal LPS enjeksiyonu yaptıktan sonra oksidatif hasarlanmayı azaltan N-asetil sistein tedavisi uyguladık. Kontrol ve tedavi gruplarını 10 gün boyunca davranış deneyleri ile takip ettik. Böylece hafıza değişikliklerini izledik. Beyin dokularını da alarak orada Alzheimer için gösterge olan amiloid beta miktarını analiz ettik ve PNN'leri mikroskopik olarak inceledik.

Sonuç olarak, bu çalışma PNA kaybının, daha nörodejenerasyona bağlı kognitif belirtilerin ortaya çıkmadığı erken dönemde meydana geldiğine işaret etmektedir. Antioksidan tedavisinin PNN yapılarını stabilize ettiği gösterilmiş, dolayısıyla oksidatif hasar ile PNN kaybı arasındaki olası ilişki saptanmıştır. Hafıza ve öğrenme üzerinde de etkileri olan PNN'nın oksidatif hasardan korunması Alzheimer hastalığının erken dönemde kontrol altına alınması için umut verici bir hedef olabilir.

Mikroglia ve Nöroinflamasyon:

Mikroglial hücreler SSS'de glial hücrelerin %5-20'sini oluşturan innate immün hücrelerdir. TREM2 bir transmembran reseptördür ve esas olarak makrofajlar ve SSS'de mikroglialarda ifade edilirler. AH'da TREM2 seviyelerinin yükseldiği ve mikroglia aktivasyonunda rol aldığı bilinmektedir. Aktive mikrogliaların Aβ yayılımı ve toksistesini azaltmaya çalıştığı bu nedenle de artmış TREM2 seviyesinin daha az Aβ depolanması ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Ancak çalışmalar yetersizdir. CD33 ise mikroglialarda ifade edilen ve AH'na duyarlılıkla ilişkili olduğu bilinen bir moleküldür.

130 yaşlı ve AH olan grupta yapılan bir çalışmada mikroglia, Amiloid beta ve tau PET görüntülemeri analizi sonucunda mikroglia aktivasyonu ile Amiloid birlikteliğinin Tau yayılımını hızlandırıcı etkisi olduğu saptanmıştır. Yayılımın ise Baraak evrelemesi ile uyumlu olduğu ve mikrogliada ifade edilen TREM2 seviyesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Nature Medicine volume 27, pages1592–1599 (2021)).

Mikroglialar çok esnek hücreler olup hastalık, sağlık, yaşlılık ve gelim dönemlerinde farklı fenotipler sergilemektedir. Özellikle M0 istirahat, M1 aktivasyon olarak kabul edilmektedir. Ekibim ve ben Alzheimer benzeri inflamasyonda mikrogliaların etkisini incelemk istedik. İntrahippokampal LPS enjeksiyonu sonrası bir grupta daha önce hazırlanmış M0 mikroglia enjeksiyonu ve diğer bir grupta ise bir hemikanal blokörü karbenoksolon'u tedavi olarak kullandı. Amiloid beta, tau seviyeleri bakıldı. Davranış deneyleri çalışıldı.

Sonuç olarak LPS tek doz uygulaması hafıza bozuklukları ve kognitif bozukluklara 7 gün içinde neden olmakta ancak 3 haftada daha belirgin görülmektedir. Beyinde Amiloid Beta and Tau akümülasyonu, nöron hasarı ve astrosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Resting M0 mikroglia transferi ve hemi kanal inhibisyonu etkin bir tedavi olarak tespit edilmiştir.

SİSPLATİN TOKSİSİTESİ VE NÖROİNFLAMASYON

Prof. Dr. Kevser EROL
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Elektriksel alanda bakterilerin çoğalması araştırılırken platin elektroddan çıkan platinin üremeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Daha sonra sisplatinin (Cpt) farelerde antikanser etkileri gösterilmiş [1] ve FDA 1978'de kanser tedavisinde kullanılmasına onay vermiştir. Geniş bir antineoplastik spektrumu bulunan platin bileşikleri over, baş-boyun, mesane, özefagus, akciğer ve kolon kanserleri tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Platin bileşikleri önce dorsal kök gangliyonlarında birikip sonra beyne penetre olmaktadır. Hücre içine Cu+2 transporter CTR1 ile alınmakta hücre dışına ise bakır taşıyıcı proteinler olan ATP7A and ATP7B ile atılmaktadır. Hücre içinde platin bileşiklerinin klorür, sikloheksan veya oksalat ligandları su molekülleriyle yer değiştirerek pozitif yük kazanır. Sonra da alkilleyici ajanlar gibi DNA'nın nükleofilik yerlerine kovalent bağlanarak etki gösterirler. Kanser hücreleri üzerindeki biyoaktivitesi kalsiyum homeostazisinde bozulma, lipid peroksidasyonu ve apoptozu sağlayan DNA hasarıdır [2]. Nöronal kök hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder, nöronal ve mitokondriyal DNA'yı bozarak nörotoksisiteye yol açarlar. Hipokampusta nörogenezi de azalttıkları gösterilmiştir.

Tedavide kullanılan üç platin türevinin (sisplatin, oksaliplatin ve karboplatin) etki mekanizmaları benzese de kimyasal yapı, farmakokinetik, tolere edilebilirlik ve istenmeyen etkileri yönünden birbirinden biraz farklı olarak değerlendirilmektedir. Karboplatinin doz kısıtlayan toksisitesi myelosüpresyon, Cpt ve oksaliplatinin ise periferik nöropatidir. En önemli toksik etkileri ototoksisite, (işitme kaybı ve vestibüler disfonksiyon), nefrotoksisite, kardiyotoksisite, hepatotoksisite, geçici lökopeni, trombositopeni ile birlikte myelosüpresyon, anemi, santral ve periferik nörotoksisite olarak bilinmektedir. Hipogonadizm, metabolik hastalıklar, anksiyete, depresyon, letarji, bilişsel fonksiyonların ve mental sağlığın bozulması da bunlara eşlik etmektedir [3]. Cpt'nin TNF-α, interlökinler gibi proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini hızlandırması hipokampusta oksidatif stres, mitokondriyal ve nöronal hasar, nöronal apoptoz, nörotransmiterlerde düzensizleşme ve nörojenezin inhibisyonuna yol açmaktadır [4]. Hipokampustaki sinaps kaybı ve eksikliği gibi sinaptik disfonksiyonlar gibi yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle bazı nöropatolojik bozukluklardan dikkat, bellek ve öğrenme de etkilenmektedir [5].

Ayrıca tübüler hasara bağlı olarak hipomagnezemi, hipokalsemi, hipokalemi ve hipofosfatemi gibi elektrolit bozuklukları oluşur. Hiperürisemi, hemolitik anemi ve kardiyak bozukluklar daha seyrek ortaya çıkar. Hücre içi ve idrarda düşük Cl- konsantrasyonlarında Cpt çözünür haldedir, yüksek Cl- konsantrasyonlarında ise stabilize olur. O nedenle klorür diürezi nefrotoksisiteyi azaltmaktadır. Tiyofosfat türevi bir sitoprotektif ajan olan amifostin de nefrotoksisiteyi azaltmaktadır. Oysa tinnitus ve yüksek frekanslı ses kaybı ile belirgin olan ototoksisite diürezden etkilenmemektedir. Anaflaktik reaksiyonlar adrenalin ve kortikosteroidler veya antihistaminiklerle tedavi edilmektedir. Bulantı ve kusma 5HT3 antagonistleri, aprepitan gibi NK1 antagonistleri ve yüksek doz kortikosteroidlerle azaltılabilmektedir. Cpt tedavisinden sonraki dört yıl ve ilerisinde AML gelişebilmektedir.

Cpt'ye bağlı nörotoksisite doz-kısıtlayıcı ve sıklıkla da ilaç kesilmesini gerektirecek tarzda gelişmekte ve hastanın yaşam kalitesini ciddi olarak bozmaktadır. Periferik nöropatinin akut şekli üst ve alt ekstremiteler ağız ve boğazda dizestezi veya paresteziler şeklinde görülen ve soğukla tetiklenen motor nöropatidir. İkinci tipi ise ekstremitelerde uyuşukluk, dizestezi ve ataksi şeklinde gelişen ilerleyici duyusal nöropatidir [6]. Cpt uzun süre uygulandığında duyusal-motor koordinasyon bozukluğu, uyuşukluk ve parestezi ile karakterize eldiven-çorap tarzı sadece duyusal nöropati yapmaktadır. Oksaliplatin de hem akut hem de kronik nörotoksisiteye yol

açmaktadır. Akut etki uygulamadan sonra birkaç saat içinde hastaların %90'ında soğuğa karşı dizestezi ve parestezi şeklinde görülmektedir. Kronik toksisitesi ise Cpt'ye benzer [7]. Oksaliplatin çene ağrısı, artralji ve yürüme bozukluğu belirtileri göstermektedir.

Nöropatinin patofizyolojik mekanizmaları arasında nöronlardaki kalsiyum homeostazisnin bozulmasıi, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar olayların yer aldığı düşünülmektedir [8]. Platin bileşikleri proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin düzeyini artırıp, anti-inflamatuvar sitokinlerin düzeyini de azaltmaktadır.

Proinflamatuvar sitokinler mikroglial hücre aktivasyonuna ve böylece nöronal inflamasyona yol açmaktadır. Nörotoksisitenin mekanizmaları belirlenmiş olsa da aksonal hasar ve gangliyon hasarının nedenleri bilinmemektedir. Özellikle mitokondriyal hasar, aksonal transport bozukluğu, oksidatif stres ve ilaç transportörleri gibi mekanizmalar üzerinde durulmaktadır [9]. Cpt nörotoksisitesindeki serbest radikal hasarının nukleer faktor eritroid 2-ile ilişkili faktor 2 (Nrf2) düzensizliğinden olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu düzensizliği ortadan kaldıran glutatyone S-transferazlar ve hemeoksigenaz-1 (HO-1) serbest radikal hasarına karşı koruma sağlamaktadır. Cpt tedavisi sırasında IL-6, IL-8, IL1β, TNF-α, NF-κB, MDA düzeyinin arttığı, Nrf2/HO-1 yolağının etkinliğinin azaldığı bildirilmiştir [3]. NF-KB ve Nrf2/HO-1 yolakları arasındaki dengesizliğin düzeltilmesi de Cpt nörotoksisitesini düzeltebilmektedir. Cpt, NF-β aktivasyonuyla oksidatif stresi tetiklemektedir. Oksidatif stres de Nrf2/HO-1 yolağının aktive edilmesiyle azaltılabilmektedir. Çünkü bu yolağı aktive eden Koenzim Q10, edavaron, D-metionin, alfa-lipoik asid ve melatonin gibi antioksidan moleküllerin Cpt nörotoksisitesini azalttığı bildirilmektedir [3].

Oksaliplatin tedavisi sırasında nöropatinin erken dönemindeki ağrı duyarlılığı dolaşımdaki CD4+ ve CD8+ lenfositlerdeki artma IL-4+ splenositlerde artma ve inguinal lenf nodlarında regülatör T hücrelerinde azalmanın olduğu sistemik bir immünolojik cevapla açıklanmaktadır. Ağrı duyarlılığının pik yaptığı dönemde T hücreleri dışındaki değerler kontrol değerlere dönmektedir. Regülatör T lenfositlerdeki azalma da proinflamatuvar yanıtla ilişkilendirilmiştir [10]. Cpt ve oksaliplatin tedavisinden sonra TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin plazma düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [11, 12]. Cpt'ye bağlı nöropatik ağrı ve intraepidermal sinir lifi yoğunluğundaki azalma CD8+ T hücreleri aracılığıyla oluşan endojen bir aktif sürece bağlanmıştır [13].

Cpt nörotoksisitesinde dorsal kök gangliyonlarının nöronal ve inflamatuvar elementleri ile ilişkili gen ekspresyonlarının analizleri yapılmıştır. Sonuçta nöronal hasar ve immün sistemi kapsayan biyolojik süreç karma bir nöroimmün patolojiyi desteklemiştir [14]. Oksaliplatinin yaptığı mekanik hiperaljezi ve epidermal sinir lifi kaybı minosiklinle önlenmiştir [15]. Minosiklinin makrofaj/monosit ve mikroglia inhibisyonu yaptığı bilinmektedir. Bu bulgular nöropatik ağrının kalıcı hale gelmesinde proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ve epidermal denervasyonun önemli olduğunu düşündürmektedir [16]. Oksaliplatinle IL-6, IL-8, IL1 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokin düzey artışının da nosiseptörlerin duyarlılılaşmasına yol açtığı bildirilmiştir [17]. Oksaliplatinin prostaglandin H2'nin prostaglandin D2'ye dönüşümünü sağlayan prostaglandin-H2 izomeraz genlerinde upregülasyon yaptığı gösterilmiştir [14]. Bu olayın da serbest radikal üretimini artırdığı bilinmektedir.

Sitokin salıverilmesinde toll-like reseptör (TLR) aktivasyonunun rolü olduğu gösterilmiştir. Patojenlerin tanınmasında görevi olan TLR'ler aktive olduklarında MAPK, PI3K, NF-kB ve ATF3 gibi birçok molekülün aktivasyonunu sağlamaktadır. ATF3'ün hem TLR aktivasyonuyla intraselüler kaskadın başlamasını sağladığı, hem de sinir hasarı için bir marker olduğu düşünülmektedir [18, 19]. Cpt'nin yaptığı nöropatik ağrıda TLR3 ve TLR4'ün önemli katkıları olduğu gösterilmiştir. Hem immün hücreler hem de glia ve nöronlar tarafından salıverilen sitokinler küçük moleküllerdir ve immün yanıtta önem taşırlar. Doğrudan ya da dolaylı olarak DRG ve spinal kordda primer afferent lifleri etkileyerek ağrı duyarlılığına yol açmaktadır.

Oksaliplatin ve Cpt tedavisi sırasında özellikle IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi sitokinlerdeki bu artış kemokin ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir [20]. Kemoatraktan sitokinlerden olan kemokinler nöropatik ağrının başlamasında, glial hücreler ve makrofajların infiltrasyon ve aktivasyonunda önemli rol oynar. Platin bileşiklerinin nörotoksisitesinde de kemokinlerin katkısı olduğu gösterilmiştir [21].

Cpt'nin glial hücrelerin PGE2 salıverilmesini artırdığı bildirilmiştir. Gangliyonlardaki nöron membranlarında bulunan PGE reseptörlerin uyarılması, TRPV1 ve ikincil haberci kaskadının aktivasyonu ile nöronal aktiviteyi ve böylece duyusal nöronların duyarlılaşmasını modüle etmektedir. Çünkü DRG, spinal kord, trigeminal gangliyon ve ayak derisinde de TRPV1 ekspresyonunun artması periferik nöropati semptomlarıyla ilişkilendirilmektedir [22]. Platin nörotoksisitesinin asıl hedefi DRG olsa da nöroinflamasyonun başlamasında Satellit glial hücreler (SGC) ve Schwann hücreleri de önemlidir. SGC periferik sinir gangliyonlarında duyusal nöronları sarar. Periferik sinir hasarı veya inflamasyon sonrası bu hücreler aktive olur ve ağrının başlamasında anahtar rol oynayan moleküller özellikle de proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi artar.

TNF-α ekspresyonunun artmasıyla birlikte periferik sinirlerde histopatolojik olarak aksonal dejenerasyon ve miyelinli lifi kaybıyla aksonal hasar ve apoptotik değişiklikler oluşmaktadır [23]. İntraepidermal sinir lifi kaybı IL-8 düzeyinde artış, epidermiste IL-8 birikmesi ve aşağı yolakların aktivasyonu epidermal denervasyondan sorumlu olabilir. Ayrıca dermis plantar cilt subkutanoz dokularında mast hücrelerinde artış da bildirilmiştir [24]. Intraepidermal sinir lifi kaybı ve nöropatik ağrı semptomları sıçan ayak tabanı homojenatlarında TNF-α IL-1β ve PGE2 ekspresyonu artışıyla birlikte olduğu saptanmıştır.

Cpt'ye bağlı taktil ve termal hipersensitivitenin erken dönemlerinde hem astrosit hem de mikroglia aktivasyonu olduğu, geç dönemlerde ise sadece astrositlerde bu reaktif durumun kalıcı hale geçtiği gösterilmiştir [19, 25]. Hem astrosit ve hem de mikroglialarda TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuvar sitokin salıverilmesinin arttığı da bildirilmiştir [19]. Astrosit hiperaktivitesinin TNF-α ve IL-1β salıverilmesinin artması ve IL-10 ve IL-4 salıverilmesinin azalması ile birlikte olduğu gözlenmiştir.

Cpt tedavisi sırasında CGRP düzeyi de yüksek bulunmuştur. Hasarlı nöronlarda bol bulunan CGRP, vazodilatör etkisi yanında periferik ağrı duyarlılığı ve inflamasyonu etkileyerek nörojenik inflamasyon ve ağrının yayılmasında öncü rol üstlenmektedir [26]. Spesifik antikoruyla da nöroinflamasyonun ve nöropatinin azaltıldığı bildirilmiştir.

Cpt nörotoksisitesinde nöronal hücre ölümünün glutamat eksitotoksisitesi ile ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar da bulunmaktadır. Cpt kalsiyum homeostazını etkilemekte ve hücre içi Ca+2 konsantrasyonunu artırmaktadır. Özellikle voltaj kapılı kalsiyum kanallarının nörotoksisitede rol oynadığı bildirilmektedir [27]. Biz de Cpt'ye bağlı nörotoksisitede kalsiyum ve potasyum iyonlarının olası rolünü değerlendirmek üzere sıçan serebellar granül hücrelerinde in vitro olarak hücre kültürü çalışmaları planlamıştık. Beş günlük Sprague Dawley sıçan yavrularından elde edilen primer hücre kültürü çalışmaları ile nimodipin (L-tipi kalsiyum kanallarını blokörü) ve glibenklamid (KATP kanal blokörü) kullanılarak MTT testi ile değerlendirmeler yapılmıştır. Ancak kullanılan konsantrasyonlarda nimodipin (1,10 ve 50 μM) Cpt (200 μM) toksisitesini azaltmak için yeterli olmamıştır. Glibenklamid ile benzer sonuçlar alınmıştır [28].

Cpt nörotoksisitesinde kalsiyumun rolü ve kalsiyum homeostazisinin önemi ayrıca sıçan DRG hücrelerinde in vitro olarak araştırılmıştır. Nimodipin (L tipi voltaja duyarlı kanal blokörü) MK-801 (NMDA antagonisti) ve tapsigargin (intraselüler depolardan kalsiyum çıkış inhibitörü), Ca+2 ve Mg+2 kullanılarak bir günlük sıçanlardan hazırlanan DRG hücrelerinde MTT testiyle değerlendirmeler yapılmıştır. Bu testlerde sadece 1 μM nimodipin 200 μM Cpt toksisitesini azaltmıştır. Diğer ajanlar inhibisyonu daha da artırmıştır. Bu sonuç kalsiyum homeostazisinin

Cpt toksisitesinde kritik rol oynadığını ve nörotoksisite açısından önemli olan kalsiyum iyonunun hücrelerin gelişimi açısından da önemli olduğunu düşündürmüştür [29].

Daha sonra kannabinoidler ve agmatinin ağrı modülasyonunda oynadıkları rol göz önüne alınarak Cpt'nin yaptığı periferik nöropatide olası terapötik potansiyelleri araştırılmıştır. Nöropatinin kompleks mekanizmaları göz önüne alınarak Cpt nörotoksisitesinde bu ajanların yarar sağlayabilecek potansiyellere sahip olduğu düşünülmüştür [30]. DRG üzerinde yapılan in vitro testlerde anandamid ve Win55,212-2 ile çok anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Bunun üzerine Cpt nöropatisinde agmatinin olası koruyucu etkileri ve bu etkilerde NO'nun rolü in vitro olarak primer sıçan dorsal kök gangliyonları üzerinde ve in vivo olarak da mekanik allodini, termal hiperaljezi ve tail clip testleriyle değerlendirildi. Bu sıçanlarda siyatik sinir ve DRG hücrelerindeki dejenerasyonlar histopatolojik olarak değerlendirildi [30]. In vitro testler için bir günlük sıçanlardan DRG toplanarak flasklara ekildi ve 8-10 gün sonra toplanan bu hücreler 96 kuyucuklu plaklara (5 x 103 hücre/kuyucuk) Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri (DMEM) içinde aktarılıp ve bir gece inkübe edildikten sonra ilaç uygulamaları yapıldı. 24 saat sonra da MTT değerlendirilmesi yapıldı. Agmatin hücrelerin canlılığı üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. In vivo çalışmalarda erişkin Sprague Dawley sıçanlara nöropati oluşturmak içi 3 mg/kg Cpt haftada bir 5 hafta süreyle i.p. olarak verildi. Agmatin (100 mg/kg) ve LNAME (10 mg/kg) de eş zamanlı olarak uygulandı. 5 hafta sonra tedaviler kesildi ve bundan sonra mekanik, termal hiperaljezi ve tail clip testleri uygulandı. Sadece termal hiperaljezi testinde agmatin pençe çekme latensini anlamlı olarak artırdı. Bundan iki hafta sonra da anestezi altında sodium fosfat tamponu içinde (pH 7.4), 4% paraformaldehid çözeltisiyle intrakardiyak perfüzyon yapılarak hayvanlar sakrifiye edildi. DRG'ler toplandı ve siyatik sinirler çıkarıldı. Burada yapısal bozukluklar histopatolojik olarak değerlendirildi. DRG'de soma alanları Image **J** yazılımı ile saptanarak yapılan karşılaştırmada 201-400 ve 401-600μm^2 alanlarında Cpt'nin yaptığı artışı agmatin azaltmıştır. 601-800 μm2 alanlarında da Cpt'nin yaptığı azalmayı da artırmıştır. Daha büyük soma alanı olan nöronlar mekanoreseptif ve proprioseptif nöronlar olarak bilinmektedir.

Daha sonra antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinin de olduğu gösterilen polifenolik bir bileşik olan klorojenik asid Cpt toksisitesinde benzer yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. In vivo çalışmalarda klorojenik asit 100 mg/kg dozda i.p. Cpt ile eşzamanlı uygulanmıştır. Klorojenik asitle birlikte L-NAME ve L-arginin de (10mg/kg) verilerek NO'nun rolünün de değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada son değerlendirmeler için soğuk allodini, ayak izi analizi, aktivitemetre ve rotarod testleri de eklenerek motor aktivitenin de değerlendirilmesi amaçlanmıştır. In vitro çalışmalarda klorojenik asit 1mM konsantrasyonda Cpt toksisitesini anlamlı olarak azaltmıştır. L-NAME de benzer etkiler göstermiştir. Klorojenik asit mekanik allodini ve soğuk allodini testlerinde anlamlı bir koruyucu etki gösterirken termal uyarıda belirgin aktivite elde edilememiştir. Motor aktivite, rotarod ve ayak izi değerlendirmelerinde de klorojenik asit koruyucu etki göstermiştir. Ancak kilo kaybı konusunda yararı olmamıştır. Klorojenik asit nöronal soma alanları açısından 0-400 μm2 alanlarında Cpt'nin yaptığı artışı azaltmış, 801-1200 μm2 alanlarında Cpt'nin yaptığı azalmayı da artırmıştır. Siyatik sinir dejenere/normal akson oranlarında Cpt'nin yaptığı artışı klorojenik asit azaltmıştır. Serum TNF-α düzeylerini de Cpt artırmış, klorojenik asit ise azaltmıştır [31]. Bu çalışmada klorojenik asitin Cpt nörotoksisitesi üzerine koruyucu etkisinin olduğu ve toksisitede NO'nun da modülatör rol oynayabildiği görülmüştür.

Son olarak da bor bileşiklerinin oksidatif stres ve serbest radikallere bağlı doku hasarına karşı koruyucu etkilerinin öne sürülmesine dayanarak 2-Aminoetoksidifenil boratın (2-APB), Cpt nörotoksisitesi üzerine etkileri benzer yöntemler kullanılarak test edilmiştir. 2-APB'nin inozitol trifosfata bağlı Ca+2 salıverilmesini ve TRP grubu katyon kanalları, potasyum kanalları ve hacim düzenleyen anyon kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir [31, 32]. Erkek Sprague Dawley sıçanlarda yapılan bu çalışmada in vitro olarak 2-APB konsantrasyon bağımlı olarak Cpt

nörotoksisitesini azaltmıştır. Mekanik allodini, soğuk allodini ve tail clip testlerinde de (2,4 ve 8 mg/kg) özellikle 4 mg/kg dozda kullanılan 2-APB belirgin koruyucu etki gösterdiği halde termal hiperaljezide etki görülmemiştir. Aynı dozun etkisi lokomotor aktivite ve rotarod testleri ve kilo kaybı üzerinde de gözlenmiştir. DRG histopatolojik değerlendirmelerinde Cpt'nin 401-600 μm2 alanlarında yaptığı artmayı belirgin olarak azaltmış, 1001-1200 μm2 alanlarında yaptığı azalmayı da özellikle 4 mg/kg doz 2-APB artırmıştır. Siyatik sinir dejenere/normal akson oranlarında Cpt'nin yaptığı artışı bütün dozlarda azaltmış, en belirgin erki 4 mg/kg dozda saptanmıştır. NGF ve BDNF düzeylerinde belirgin değişim saptanmamış, oysa TNFα, MDA, GSH ve LDH düzeylerinde Cpt'nin yaptığı değişiklikler aynı doz 2-APB ile anlamlı olarak düzeltilmiştir. 2-APB'in Cpt nörotoksistesi üzerinde koruyucu etkisi bifazik olarak gözlenmiştir. Bu sonucun da antioksidan etkisiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak Cpt nörotoksisitesini etkileyen çok farklı faktörlerin rol oynayabileceği görülmüştür [33].

Sonuç olarak sisplatinin oluşturduğu nörotoksisite hem santral hem de periferik sistemi etkilemekte ve mekanizması da oldukça komplekstir. Patofizyolojik mekanizmaları arasında nöronlardaki kalsiyum homeostazisi, mitokondriyal disfonksiyon, inflamatuvar olaylar ve oksidatif hasar, glial ve mikroglial hücre aktivasyonu gibi birçok faktörün rol oynayabileceği bilinmektedir. Bu sistemler üzerinde etkili olan ajanların da Cpt toksisitesine karşı koruyucu etkilerinin olabileceği düşünülebilir. Ancak bu konuda yapılabilecek oldukça ayrıntılı çalışmalarla ilacın etkinliğini azaltmadan nörotoksisiteyi azaltan ajanların geliştirilebilmesi oldukça fazla bir hasta popülasyonuna yarar sağlayacaktır.

Kaynaklar

1) Rosenberg, B., et al., Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. Nature, 1969. 222(5191): p. 385-6.

2) Erfani Majd, N., et al., Protective effects of Aloe vera gel on cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and neurons structure in rat hippocampus. Vet Res Forum, 2022. 13(1): p. 111-119.

3) Gupta, P., et al., Role of inflammation and oxidative stress in chemotherapy-induced neurotoxicity. Immunol Res, 2022. 70(6): p. 725-741.

4) Fung, C., et al., Toxicities Associated with Cisplatin-Based Chemotherapy and Radiotherapy in Long-Term Testicular Cancer Survivors. Adv Urol, 2018. 2018: p. 8671832.

5) Park, S.H., J.R. Ko, and J. Han, Exercise alleviates cisplatin-induced toxicity in the hippocampus of mice by inhibiting neuroinflammation and improving synaptic plasticity. Korean J Physiol Pharmacol, 2024. 28(2): p. 145-152.

6) Wellstein, A. and E.A. Sausville, Cytotoxics and Antimetabolites, in Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 14th Edition, L.L. Brunton and B.C. Knollmann, Editors. 2023, McGraw-Hill Education: New York, NY.

7) Calls, A., et al., Pathogenesis of platinum-induced peripheral neurotoxicity: Insights from preclinical studies. Exp Neurol, 2020. 325: p. 113141.

8) Coronel, M.F., et al., Temporal changes in the expression of the translocator protein TSPO and the steroidogenic enzyme 5alpha-reductase in the dorsal spinal cord of animals with neuropathic pain: Effects of progesterone administration. Neurosci Lett, 2016. 624: p. 23-8.

9) Starobova, H. and I. Vetter, Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Front Mol Neurosci, 2017. 10: p. 174.

10) Li, D., et al., Preventive Effects of Bee Venom Derived Phospholipase A(2) on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. Toxins (Basel), 2016. 8(1).

11) Cerles, O., et al., Niclosamide Inhibits Oxaliplatin Neurotoxicity while Improving Colorectal Cancer Therapeutic Response. Mol Cancer Ther, 2017. 16(2): p. 300-311.

12) Cerles, O., et al., Preventive action of benztropine on platinum-induced peripheral

neuropathies and tumor growth. Acta Neuropathol Commun, 2019. 7(1): p. 9.
13) Ma, J., et al., Cell-specific role of histone deacetylase 6 in chemotherapy-induced mechanical allodynia and loss of intraepidermal nerve fibers. Pain, 2019. 160(12): p. 2877-2890.
14) Starobova, H., et al., Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice. J Pain, 2020. 21(1-2): p. 182-194.
15) Boyette-Davis, J. and P.M. Dougherty, Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. Exp Neurol, 2011. 229(2): p. 353-7.
16) Liu, C.C., et al., Prevention of paclitaxel-induced allodynia by minocycline: Effect on loss of peripheral nerve fibers and infiltration of macrophages in rats. Mol Pain, 2010. 6: p. 76.
17) Makker, P.G., et al., Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. PLoS One, 2017. 12(1): p. e0170814.
18) Park, H.J., et al., Persistent hyperalgesia in the cisplatin-treated mouse as defined by threshold measures, the conditioned place preference paradigm, and changes in dorsal root ganglia activated transcription factor 3: the effects of gabapentin, ketorolac, and etanercept. Anesth Analg, 2013. 116(1): p. 224-31.
19) Di Cesare Mannelli, L., et al., Morphologic features and glial activation in rat oxaliplatin-dependent neuropathic pain. J Pain, 2013. 14(12): p. 1585-600.
20) Duan, Z., et al., Involvement of pro-inflammation signal pathway in inhibitory effects of rapamycin on oxaliplatin-induced neuropathic pain. Mol Pain, 2018. 14: p. 1744806918769426.
21) Illias, A.M., et al., Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. Pain, 2018. 159(7): p. 1308-1316.
22) Kuai, C.P., et al., Corydalis saxicola Alkaloids Attenuate Cisplatin-Induced Neuropathic Pain by Reducing Loss of IENF and Blocking TRPV1 Activation. Am J Chin Med, 2020. 48(2): p. 407-428.
23) Sharawy, N., L. Rashed, and M.F. Youakim, Evaluation of multi-neuroprotective effects of erythropoietin using cisplatin induced peripheral neurotoxicity model. Exp Toxicol Pathol, 2015. 67(4): p. 315-22.
24) Andoh, T., A. Sakamoto, and Y. Kuraishi, 5-HT1A receptor agonists, xaliproden and tandospirone, inhibit the increase in the number of cutaneous mast cells involved in the exacerbation of mechanical allodynia in oxaliplatin-treated mice. J Pharmacol Sci, 2016. 131(4): p. 284-7.
25) Micheli, L., et al., Effect of Vitis vinifera hydroalcoholic extract against oxaliplatin neurotoxicity: in vitro and in vivo evidence. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 14364.
26) Xie, S., et al., Monoclonal Antibody Targeting CGRP Relieves Cisplatin-Induced Neuropathic Pain by Attenuating Neuroinflammation. Neurotox Res, 2024. 42(1): p. 8.
27) Tomaszewski, A. and D. Busselberg, Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. Neurotoxicology, 2007. 28(1): p. 49-58.
28) Unel, C.C. and K. Erol, The Role of Ionic Homeostasis in Cisplatin-Induced Neurotoxicity: A Preliminary Study. Eurasian J Med, 2018. 50(2): p. 81-85.
29) Erol, K., et al., Evaluation of Cisplatin Neurotoxicity in Cultured Rat Dorsal Root Ganglia via Cytosolic Calcium Accumulation. Balkan Med J, 2016. 33(2): p. 144-51.
30) Donertas, B., C.C. Unel, and K. Erol, Cannabinoids and agmatine as potential therapeutic alternatives for cisplatin-induced peripheral neuropathy. J Exp Pharmacol, 2018. 10: p. 19-28.
31) Unel, C.C., et al., Chlorogenic acid co-administration alleviates cisplatin-induced peripheral

neuropathy in rats. Fundam Clin Pharmacol, 2024. 38(3): p. 523-537.
32) Chokshi, R., P. Fruasaha, and J.A. Kozak, 2-aminoethyl diphenyl borinate (2-APB) inhibits TRPM7 channels through an intracellular acidification mechanism. Channels (Austin), 2012. 6(5): p. 362-9.
33) Eroglu, E., et al., 2-Aminoethoxydiphenyl borate ameliorates functional and structural abnormalities in cisplatin-induced peripheral neuropathy. J Trace Elem Med Biol, 2022. 70: p. 126909.

DENEYSEL ALZHEİMER HAYVAN MODELLERİNDE İLAÇ VE AŞI UYGULAMALARI

Prof. Dr. Ahmet HACIMÜFTÜOĞLU
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Atatürk Üniversitesi Aşı Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü

1. Giriş

Küresel nüfusun yaşının artmasıyla birlikte yaşlanma ve buna bağlı hastalıklar dünya çapında giderek daha fazla fazla ilgi odağı haline gelmektedir. Yaşlanma bir hastalık olmamasına rağmen duygulanım bozukluğu, demans ve genel hastalık duyarlılığı açısından önemli risk faktörlerinin başında gelmektedir (Zhao ve ark., 2024; Gasiorowska ve ark., 2021). Alzheimer hastalığı (AH) demansın ilerleyen ve geri dönüşümsüz olan bir formudur. Alzheimer hastalığı hafıza kaybı ile kendini gösteren, ilerleyen dönemlerde ise beyinde ciddi işlev kayıplarına neden olan nörodejenaratif bir hastalıktır (Lecanu ve Papadopoulos, 2013). 65 yaş ve üstü kişilerde görülme sıklığı artar. Yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası vardır ve bu sayının 2050'de 3 katına çıkacağı tahmin edilmektedir. Alzheimer hastalığının günümüzde radikal bir tedavisi yoktur ancak erken teşhis ve tedavi bu yıkıcı hastalığın semptomlarını iyileştirebilir. Uygulanan tedaviler hastalığın semptomlarını gidermeye ve ilerleyişini durdurmaya yönelik tedavilerdir (Elçioğlu ve ark., 2018). Fakat mevcut ilaçlar beklenen iyileşmeyi sağlayamamıştır.

2. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

Alzheimer hastalığında beyinde üç temel yapısal dönüşümden bahsedilmektedir. Bu patofizyolojik süreçler; nöron sayısında azalma, amiloid beta veya senil plakların oluşması ve hiperfosforilasyona uğrayan tau proteinin birikimi sonucu nörofibriler yumakların (NFT) oluşmasıdır. Bu plakların ve yumakların oluşumunun altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamasa da genetik, inflamasyon ve oksidatif stres gibi faktörlerin bunların gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Gholami ve ark., 2023; Scheltens ve ark., 2016). AH hastalarından alınan BOS, kan ve beyin örneklerinde Aβ 1-40 ve Aβ 1-42 ve çözünür Aβ'nın diğer fibriler olmayan formları dahil olmak üzere çeşitli Aβ formları bulunmaktadır (Li ve ark., 2020). Ek olarak aktif mikroglia ve reaktif astrositler tarafından gerçekleştirilen nöroinflamasyon süreci ve buna yol açan inflamatuar sitokinlerin yüksek beyin konsantrasyonları AD ile ilişkilendirilmektedir (Sawikr ve ark., 2017). Genetik faktörlerin de önemli olduğu Alzheimer hastalığında iki önemli risk geninden bahsedilmektedir; APOE ve TREM2 bu cevabın önemli parçalarıdır (Scheltens ve ark., 2021). APP, Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2) genlerindeki mutasyonlar erken başlangıçlı ailesel AH'ye neden olmaktadır. Bahsi geçen bu mutasyonlar, Aβ42 peptidinin aşırı üretimine yol açarak plak oluşumunu ve hastalığın ilerlemesini hızlandırmaktadır (Gao ve ark., 2019).

Alzheimer hastalarınının ayrıca asetilkolin seviyelerinde belirgin bir düşüş ve beyinlerinde kolinerjik sinir hücrelerinde önemli bir kayıp olduğu gözlemine dayanarak kolinerjik nörotransmisyondaki fonksiyon bozukluğunu Alzheimer Hastalığı patogenezinde önemli olabilir. Üst düzey davranış ve öğrenme ve hatırlama yeteneği dahil olmak üzere çok sayıda yöntem fonksiyonunda asetilkolin görev alır. Bazal ön beyin kolinerjik nöronlar (BFCN'ler) özellikle hafıza ve stratejik tedaviler için hayati öneme sahiptir. BFCN'lerin dejenerasyonu demansın ciddiyeti ile ilişkilidir ve bu süreç hafıza bozukluğuna neden olur.(Nasb ve ark., 2024)

3. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelleri

Alzheimer Hastalığı deneysel modelleri Alzheimer Hastalığının patogenizinin anlaşılması ve klinik öncesi testlerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Hastalığın deneysel modelleri arasında zebra balığı gibi omurgalılar, Caenorhabditis ve Drosophila gibi omurgasız canlılar kullanılabilse de rat ve farelerde yapılan modeller ve bunların

hücre kültürü ile yapılan çalışmaları daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Drummond ve Wisniewsk, 2017).

3.1. In Vivo Alzheimer Hastalığı Modelleri

Ratlarda ve farelerde mevcutta kullanılan modeller amiloid plakların ekspresyonu ve nörofibriler yumak oluşumuna odaklanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile çeşitli yolaklar tespit edilmiş olsa da hayvan modellerinde amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumu yıllar boyunca kendini ispatlamış güvenilir modellerdir (Puzzo ve ark., 2015). İlk olarak 1995 yılında yapılan transgenik Alzheimer hastalığı hayvan modelleri büyük miktarlarda amiloid plak oluşumu göstermiş sonraki yıllarda bu modeller farklılaşarak yaygınlığı artmıştır (Games ve ark., 1995; Puzzo ve ark., 2015). Ratlarda ve farelerde yapılan bu modeller özellikle insanlara benzerlik göstermesi sebebiyle ön plana çıkmaktadır. Transgenik farelerden elde edilen amiloid öncü proteinler insanlarla %97 sekans homolojisine sahiptir (Tanzi ve ark., 1987). Ancak, ilk geliştirilen transgenik modeller sekans homolojisi göstermiş olsa da zaman içerisinde bu modellerin tam bir Alzheimer Hastalığı patofizyolojisi modellemesi yapamadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple çoklu transgenik suşlar ve FAD ile ilişkili mutasyonları amiloid öncü proteinler ile birlikte gösteren çeşitli modeller geliştirilmiş bu modeller nöropatoloji ve ilgili bilişsel bozuklukları çok daha net bir şekilde göstermişlerdir (Drummond ve Wisniewsk, 2017). Ancak transgenik hayvan modellerinin oluşturulmasındaki genetik modifikasyon tekniklerindeki zorluklar, masraflı olmaları ve zaman alıcı olmaları gibi sebepler nedeni ile araştırmacılar toksin kaynaklı Alzheimer Hastalığı modellerini tercih etmektedirler (Platt ve ark., 2013).

Toksin kaynaklı Alzheimer Hastalığı modelleri insanlardan etik olarak elde edilemeyen bilgilere yönelik araştırma imkanı sağlaması sebebiyle transgenik modellerin iyi bir tamamlayıcısıdır. Bu modelleri oluşturmak için kullanılan en yaygın kimyasallar streptozotosin, skopolamin, lipopolisakkarit, ağır metallar, Aβ peptitleri ve kombinasyonları şeklinde sıralanabilir. Bu bileşikler Aβ birikimi, asetilkolinesteraz aktivitesi ve nöroinflamasyonu artırmada avantajlıdır (Wan ve ark., 2023). Toksinler arasında streptozotosinin intracerebroventriküler enjeksiyonu net bir nöroinflamatuar ve oksidan etki, serebral amiloid anjiyopatisi ve kolinerjik eksiklik göstermesi nedenleriyle tercih sebebidir (Barai ve ark., 2018; Chen ve ark., 2013; Hira ve ark., 2019; Salkovic-Petrisic ve ark., 2011).

3.2 In Vitro Alzheimer Hastalığı Modelleri

Alzheimer Hastalığının modellenmesinde kullanılan önemli bir çalışma alanı da hücre kültürü çalışmalarıdır. Özellikle insan hücrelerinin kullanıldığı çalışmalar tür farklılığına bağlı etkileri azaltmaları ve insana özgü proteinleri içermeleri sebebiyle ön plana çıkmaktadır. Ancak, insan hücrelerinin elde edilmesi için kaliteli ve taze bir doku gerekmektedir. İnsanlardan bu şekilde doku elde etmenin zorluğu sebebiyle indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC)'ler geliştirilmiştir (Takahashi ve ark., 2007). Geliştirilen bu kök hücreler hem ailesel Alzheimer Hastalığı hem de geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığını modelleyen çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. iPSC'ler Aβ, ve tau hiperfosforilasyonunu net bir şekilde göstermeleri sebebiyle ön plana çıkmaktadır. Ayrıca bu kök hücreler GSK3β, endozom ve intranöronal Aβ oligomerleri gibi ek patolojileri de göstermeleriyle önem taşımaktadır (Israel ve ark., 2012).

Her ne kadar birçok olumlu yönü olsa da kök hücrelerin kullanımı protokollerdeki eksiklikler, üretilen kök hücrelerde farklı modifikasyonların görülebilmesi ve tam bir modelleme için bu hücrelerin yaşlanmasının gerekliliği gibi çeşitli sebeplerle sınırlamalara sahiptir (Drummond ve Wisniewsk, 2017). İnsan hücresi bulunmasındaki zorlukla birlikte kök hücrelerde gözlenen bu sıkıntılar araştırmacıları primer rat nöron hücrelerinin kullanılmasına teşvik etmiştir. Özellikle tek hücre hattına bağlı çalışmalar sadece bir hücre tipi üzerindeki etkiyi göstermesi sebebiyle zayıf kalabilmektedir. Embriyonik ratlardan elde edilen primer nöron hücreleri ise çeşitli hücre biyolojileri ile birlikte büyüme faktörleri, nörotrofinler, sitokinler ve nörotransmitterler içermeleri ile iyi bir model oluşumunu teşvik etmektedir (Jiao ve ark., 2017).

3.3. Alzheimer Hastalığında Davranış Testleri

Alzheimer Hastalığı çalışılan deney hayvanlarında hafıza ve bilişsel gerilemeyi kantitatif değerlendirmek semptomatik olarak oldukça zordur. Bu sebeplerle çeşitli davranış testleri bu hafıza ve bilişsel gerilemeyi değerlendirmek için ön plana çıkmaktadır. Ayrıca Alzheimer hastalarında anksiyete ve depresyon gibi nöropsikiyatrik semptomlar hafıza kaybından önce ortaya çıkmaktadır (Pentkowski ve ark., 2021). Davranışların değerlendirilmesi amacıyla Morris water maze, pasif sakınma ve lokomotor aktive testleri sıklıkla kullanılabilmektedir.

Morris Water Maze Testi

Bu test düzeneği ile hayvanların önemli bir hafıza türü olan uzamsal hafızası ölçülmektedir. Uzamsal hafıza ile hayvanlar zeka ve ortamdaki şekilleri zihinsel boyutta düzenlemektedir. Bu duruma bağlı olarak ise hayvanların öğrenme ve hafıza yetenekleri ölçülebilmektedir. Bu sebeple morris water maze test düzeneği deney hayvanlarının sudan kaçma içgüdülerini test düzeneğinin etrafına yerleştirilen şekillerle test etmektedir. Morris water maze testi 6 gün boyunca sürmektedir ve test düzeneğinde suyun altında, gözle görülemeyen ancak hayvanların üzerine çıkmasına imkan sağlayan bir platform mevcuttur. Deneyin ilk gününde hayvanların platformsuz şekilde yüzmeleri sağlanarak suya alışmaları beklenir. Deneyin ikinci gününden itibaren ise ölçüm günüdür. İkinci günde hayvanlar güney yönünden başlanılarak sırasıyla doğu kuzey ve batı yönlerinden havuza bırakılırlar. Havuzdaki hayvanların 90 saniye boyunca platformu bulmaları beklenir. Deney hayvanları ilk iki yön olan güney ve doğu yönlerinde çoğunlukla platformu bulamamaktadır. Bu yönlerden yapılan ölçümlerde sadece ilk günde olmak üzere hayvanlara platformun yeri öğretilir. Deneyin üçüncü, dördüncü ve beşinci günlerinde sadece ölçüm alınan yönlerin sırası değişmektedir. Üçüncü günde ölçüm doğu yönünden başlarken, dördüncü günde kuzey, beşinci günde batı yönünden başlamaktadır ve bu ölçümleri sırasıyla diğer tüm yönler izlemektedir. Bu şekilde deney hayvanlarının her gün dört farklı yönden platformu bulmaları beklenmektedir. Altıncı günde ise test düzeneğinden platform çıkartılır. Bu ölçüm gününde hayvanların platformun bulunduğu çeyreklik dilime ve platform alanına giriş-çıkış sayıları, bu alanlarda ne kadar vakit geçirdikleri ve bu alanlarda ne kadar mesafe yüzdükleri gibi bilgiler kaydedilir. Her gün farklı yönden ölçüm alınması, platformsuz ölçüm alınması ve hayvanların platformu görememeleri sebebiyle hayvanların platformu tamamen çevredeki şekillerin konumundan buldukları düşünülmektedir. Alzheimer Hastalığı gibi hafızayı doğrudan etkileyen hastalıklarda deney hayvanlarının platformu bulma süresi sağlıklı hayvanlara göre daha uzundur (Yörük ve ark., 2022).

Pasif Sakınma Testi

Pasif sakınma testi, kaygıya verilen koşullu tepkiler ve kaygıya bağlı davranış, öğrenme ve hafıza parametrelerine ilişkin veriler sunar. Bu testte genellik rat ve fare gibi nokturnal hayvanlar kullanılmaktadır. Rat ve farelerin davranışları gündüzleri uyuyup geceleri aktivite sergilemek üzeredir. Rat ve fareler geceleri aktif olmaları sebebiyle aydınlık ortamlardan rahatsız olmaktadır. Bu sebeple bu test düzeneği aydınlık ve karanlık odalardan oluşur. Aydınlık odada yüksek lumenli ışık uygulayabilen lambalar mevcuttur. Deney yapılan hayvanlar ilk olarak aydınlık odaya bırakılır ve 10 saniyelik bir alışma periyodu uygulanır. Bu odada karanlık odaya açılan bir kapı mevcuttur. Işık uygulamasıyla birlikte karanlık odaya geçişi sağlayan kapı açılır. Deney hayvanları yüksek ışıktan rahatsız oldukları için karanlık odaya geçerler ve geçmeleri sonucunda kapı düzeneği kapanır. Karanlık ortama geçen deney hayvanlarına ise test düzeneği tarafından elektrik akımı uygulanır. Bu durum sonucunda deney hayvanları karanlık ortama geçmenin olumsuz bir sonucu olacağını öğrenirler. İki gün şeklinde gerçekleştirilen bu testte ikinci günde deney hayvanları yüksek ışık şiddetinden rahatsız olsa da karanlık bölgeye geçme eğilimini kaybederler ve 5 veya 10 dakikalık ölçüm periyodunda aydınlık ortamda kalma eğilimindedirler. Alzheimer hastalığı gelişen hayvanlarda ise bu durum tersi şekilde; hafıza zayıflığı ve karanlık ortama geçmeleri şeklinde gerçekleşir (Yörük ve ark., 2022).

Lokomotor Aktivite Testi

Bu test motor fonksiyonlardaki bozulma ve anksiyetinin ölçümünde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testte koşullu veya koşulsuz durumlara bağlı hafıza ya da anksiyeteden ziyade nörodejeneratif bozuklukların lokomotor fonksiyonlar üzerindeki etkileri incelenir. Deney hayvanları otomatik olarak hareketlerini inceleyen kare şekilli kafeslere alınır. Test düzeneği 10 dakika boyunca hayvanların dinlenme, gezinme, stereotipik, ambulatuvar ve horizontal hareketlerini kayıt altına alır (Yörük ve ark., 2022). Mevcut tecrübemiz sağlıklı hayvanlarda tutarlı bir lokomotor aktivite gözlendiğini ancak Alzheimer hastalarında lokomotor aktivite üzerinde tutarsız semptomlar oluştuğunu göstermektedir.

4. Alzheimer Hastalığı Tedavisi ve Güncel Yaklaşımlar

Alzheimer hastalığı için güncel tedaviler arasında Kolinesteraz inhibitörleri (donepezil, rivastigmin, galantamin) ve NMDA reseptör antagonisti (memantin) gibi ilaçlar bulunmaktadır. Ancak bu tedaviler semptomatik rahatlama sağlarken hastalığın ilerlemesi üzerine bir etkisi yoktur. AH'da kolinerjik iletimi arttırma ve eksitotoksisiteyi azaltmaya yönelik tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyaç devam etmektedir (Lopez ve ark., 2019 ; Agatonovic-Kustrin ve ark., 2018) Alzheimer hastalığına yönelik yeni gelişen terapiler arasında özellikle Aβ ve tau'yu hedef alan tedaviler odaklanılmaktadır. Aβ'ya (örn. aducanumab) ve tau'ya karşı monoklonal antikorlar dahil olmak üzere immünoterapiler, bu patolojik proteinlerin birikimini ve yayılmasını azaltmasında önemli olduğu düşünülmektedir. Son yıl içinde Lecanemab ilaç tedavisi Alzheimer hastalığının tedavilerinden biri olarak FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından resmi şekilde onaylanmıştır. Bu tedavi de beyinde amiloid plaklarını hedef alır, amiloid fibrillerine bağlanarak beyinden temizlenmesini sağlayan amiloid karşıtı bir antikordur. Bizim de katkı verdiğimiz diğer yaklaşımlar arasında ise beta-sekretaz ve gama-sekretaz inhibitörlerinin yanı sıra tau agregasyonunu önleyebilecek küçük moleküller yer alabilmektedir (Tozlu ÖÖ ve ark., 2022; Turkez H ve ark., 2021; Karran ve ark., 2011 ; Decourt ve ark., 2021 ; Imbimbo ve ark., 2022).

Kombine metabolik aktivatörlerin, sitozolden mitokondriyal yağ asidi alımını teşvik edip, mitokondride yağ asidi oksidasyonunu kolaylaştırarak oksidatif stresi azaltarak etki eden AH Faz 2 çalışmasına ulaşan bir başka çalışmamız da bulunmaktadır (Yuluğ B ve ark., 2023).

Sadece NMDA değil glutamat hipotezi üzerinden devam eden yeni küçük moleküllerin keşif çalışmaları da dünya ölçeğinde devam etmektedir (Hacımüftüoğlu ve ark., 2016). Bu alanda bizim grubumuzun sahip olduğu 6 Uluslararası Tescilli Patent ve çok sayıda başvuru bulunmaktadır.

Alzheimer hastalığı immünoterapisi için yapılan klinik çalışmalar Aβ, Tau proteini veya hem Tau proteini hem de Aβ'yı aynı anda etkileyen mekanizmaları hedef almıştır.(Nguyen ve ark., 2023)

Aβ'yı Hedef Alan İmmünoterapötik Ajanlar

AH aşısı için ilk insan faz I klinik denemesi 2005 yılında yayınlanmış ve bu çalışmada AN1792'nin (insanda toplanmış Aβ42) Aβ plaklarında azalma, bilişsel ve hafıza ölçümlerinde iyileşme ve tau proteininde azalma meydana getirdiği bildirilmiştir.(Bayer ve ark., 2005; Conti Filho ve ark., 2023) AN1972' nin faz IIa denemesi, aşılanmış hastaların %6'sında görülen meningoensefalit olguları nedeniyle yarıda bırakılmış ve bu advers etkiye sitotoksik T hücresi inflamatuar cevabının indüklenmesinin sebebiyet verdiği düşünülmüştür. Bunun sonucunda B hücresi aktivasyonunu ve antikor üretimini uyarmak için tasarlanmış Aß'yi hedef alan ikinci nesil aşıların geliştirilmesine yol açmıştır.(Conti Filho ve ark., 2023; Thakur ve ark., 2023) Bu doğrultuda tasarlanan ilk yeni nesil aşı Aβ peptid fragmanına (Aβ 1-6) karşı antikor oluşumunu uyarmak için tasarlanan CAD106 olmuştur.(Winblad ve ark., 2012) CAD 106 ile 3 klinik çalışma (faz I ve faz II) yapılmış ve CAD106'nın adjuvanlı ve adjuvansız güvenlik ve tolere edilebilirlik profili değerlendirilmiş ve gelecekteki klinik çalışmalar için en uygun doz miktarı belirlenmiştir.(Vandenberghe ve ark., 2016) Daha sonra bir taşıyıcı proteine konjuge edilmiş N-terminal (Aβ1-7) peptidlerinden oluşan Vanutide Cridificar (ACC-001) tasarlanmış ve AC-001'in etkinliği ve güvenilirliği dört faz II plasebo kontrollü randomize çalışma ve biri girişimsel tek kollu

uzun vadeli uzatma çalışması olmak üzere 5 çalışmada açıklanmıştır.(Arai ve ark., 2015; Hull ve ark., 2017; Ketter ve ark., 2016; Pasquier ve ark., 2016; van Dyck ve ark., 2016) Yeni bir amiloid β (Aβ) sentetik peptid aşısı (UB-311), diğer aşılar gibi hafif-orta şiddette Alzheimer hastalığı olan hastalarla yapılan faz I denemesinde değerlendirilmiş ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir.(Wang ve ark., 2017) Aβ1−42 oligomerlerini içeren ALZ-101, diğer aşılardan farklı olarak AβCC peptit teknolojisi kullanılarak Aβ'nın yanlış katlanmasını önlemek amacıyla tasarlanmış ve bu aşı ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir.(Nguyen ve ark., 2023) AV 1959, Lu AF20513 immünoterapileri için de klinik çalışmalar halen devam etmektedir.

2023 yılında yayınlanan in vivo çalışma transgenik ilerleyici bir amiloidoz fare modeli olan APPPS1'de ACI-24 aşısını uygulayarak Aβ'yı hedeflemenin etkinliği ölçülmüş ve bu aşının klinik öncesi etkinliği belirlenmiştir (Rudan Njavro ve ark., 2023).

Tau Proteinini Hedef Alan İmmünoterapötik Ajanlar

Güçlü adjuvanlarla birlikte tam uzunlukta rekombinant Tau'nun kullanıldığı ilk in vivo fare çalışmalarında zararlı etkiler gözlenmiştir. Alzheimer hastalarında denenen Tau aşısı AADvac1, faz I ve faz II klinik çalışmalarda etkinliği değerlendirilmiş ve bu çalışmalarda viral enfeksiyon ve epileptik nöbet gibi iki ciddi yan etki gözlemlenmiştir.(Novak ve ark., 2017, 2018, 2021) Daha sonra lipozom bazlı bir aşı olan ve p-tau 396/404 antijenini hedef alan ACI-35 tasarlanmış fakat bu aşıdan hareketle geliştirilen yeni nesil aşı ACI-35.030'in daha iyi bir immünojeniteye sahip olduğu ve üretilen antikorların spesifik olarak p-tau'ya bağlandığı açıklanmıştır (Congdon ve ark., 2023).

Hem Tau Proteinin Hem de Aβ'yı Hedef Alan İmmünoterapötik Ajanlar

2023 yılında yayınlanan çalışmada insan APP'i eksprese eden ve agresif olarak yüksek Aβ patolojisine sahip transgenik bir fare modelinde klinik öncesi PRX123'ün in vivo etkinliği değerlendirilmiştir. Klinik öncesi çalışmalarda güçlü immünojenik cevaplar ürettiği ispatlanmış olan PRX123, ikili bir Aβ/tau peptid aşısıdır. Alzheimer hastalığında önemli mekanizmalar olan patolojik süreçlerin her ikisini de aynı anda etkilediği için diğer immünoterapötiklere göre daha güçlü bir etki oluşturmuştur.(Tourino ve ark., 2023)

Ek olarak BCG ve Tdap (tetanoz, difteri, boğmaca) aşılarının Alzheimer hastalığındaki etkisinin anlaşılması için klinik çalışmalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda adjuvan madde kullanılmasının etkiyi güçlendirdiği gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda adjuvan olarak QS21, şap, alüminyum hidroksit gibi adjuvan maddeler kullanılmıştır.(Thakur ve ark., 2023) Klinik çalışmalarda Alzheimer hastalarının immünoterapötik tedavisi, Aβ ve tau proteinlerinin temizlenmesi olarak görülmüşse de Alzheimer hastalığının tedavisi içi umut verici bir altrnatif, bağışıklık tepkisini ve nöroinflamasyonu tehlikeye sokan sitokinleri ve diğer faktörleri hedef alarak beyindeki mikroglial ve T hücresi aktivasyonunun modülasyonu olabilir.(Nguyen ve ark., 2023) Alzheimer hastalığına karşı yapılmış olan faz I ve faz II aşı çalışmaları umut verici sonuçlar ortaya çıkarmasına rağmen terapötik etkinlikleri faz 3 çalışmalarda kesin olarak araştırılmalıdır.(Novak ve ark., 2017)

Mevcut yaklaşımların yanısıra AH patolojisinin heterojenliği kişiye özel tedavi yaklaşımlarını da önemli kılmaktadır (Karran ve ark., 2011 ; Decourt ve ark., 2021 ; Imbimbo ve ark., 2022).

5. Sonuç

AH'ya karşı yaşla birlikte doğal bağışıklığın azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Asuni, A. ve ark. 2007; Britschgi M. Ve ark 2009). Sağlıklı, yaşlı donörlerden izole edilen bir anti-amiloid-β (Aβ) IgG1'in Alzheimer'lı hastalardan farklı değerlerde olması ve monoklonal antikor (mAb) aducanumab çalışmasında bu değerlerin kontrole yaklaşması Alzheimer hastalığının beta amiloid antikor ilişkisini güçlü bir şekilde göstermiştir (Jeffrey S., 2015; Keller D. M. Ve ark., 2015). Bu nedenle, aşılama veya aktif bağışıklama ile önlenen diğer birçok hastalıkta olduğu gibi, bulgular, bağışıklık yaşlanmasının bir sonucu olarak yaşla birlikte azalan koruyucu bağışıklığı indüklemenin, güçlendirmenin ve sürdürmenin bir yolu olarak immünojenler içeren aşıların

kullanılmasının faydalı olacağını göstermektedir. Yine de, doğal olarak oluşan otoantikorların (nAb'ler) önleyici bir modda etkili olmalarına rağmen, terapötik ajanlar olarak kullanıldıklarında önemli ölçüde daha az etkili oldukları görülmüştür. Açıkça görülüyor ki, aşılama, özellikle bazı az gelişmiş ülkelerin ekonomik durumu göz önüne alındığında, artan AH küresel salgınını kontrol etmek için uygun maliyetli, pratik bir tıbbi çözüm olacaktır (Rizzi L ve ark., 2014). Beyinde Amiloid-β plakalarının hücre dışında birikimi de çeşitli yolaklarda metabolik düzensizliklere sebep olmaktadır ve AH'nın başlamasına yol açan nörodejenerasyona yol açması mümkündür (Suzanne M ve ark.,2014). Bu sırada hücre içinde de Tau proteini toplanır ve AH'li bireylerin nöronlarında nörofibril yumaklar oluşur. Sonuçta hücresel metabolit taşıma sistemi bozularak nöronlarda enerji açığı olur ve yeni sinapslar üretilmez (Rhonda P.,2019). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda Tau veya β-Amyloid proteinin farklı dizilerinden türetilen peptitler Alzheimer hastalığına karşı aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Tau proteinin 395–406 ve 193–211 (Bi ve ark., 2015; Strang ve ark., 2017) aminoasit dizilerine, β-Amyloid proteinin ise β1-6, β1-7, β1- 12, β1-15, β1-40, β1-42 ve β33-40 (ABVac40) dizilerine karşılık gelen peptitler Alzheimer hastalığında aşı olarak test edilmişlerdir (Mantile and Prisco, 2020). Ancak, yapılan klinik çalışmalarda bu peptitlerden sadece ABVac40' ın başarılı olduğu açıklanmıştır.

Mevcut YÖK destekli Araştırma Üniversitesi Projemizde, tau ve β-Amyloid proteinlerinin literatürde çalışılmayan antijenik farklı dizilerinin in siliko değerlendirmeler sonrası yeni/özgün mRNA aşı adayları oluşturulmuş, nanoteknolojik adjuvanlarla geliştirilmiş ve aşı olma potansiyelleri test edilmiştir.

Ayrıca yine farklı projelerimizle AH'na karşı küçük moleküllü yeni kimyasal maddelerin üretilmesi ve preklinik safhalarının tamamlanması ve patent tescil aşamaları gerçekleştirilmiştir (Hacımüftüoglu A 2023 I ve II, Hacımüftüoğlu A 2022 I ve II).

Teşekkür

Bu çalışmanın oluşmasında emeği geçen değerli genç araştırmacılar Araştırma Görevlisi Mehmet Ali Yörük, Burak Çınar, Öznur Altunlu, Dilanur Ateş, Dr. Fatma Yeşilyurt ve Doç.Dr. Ufuk Okkay'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

1) Agatonovic-Kustrin S, Kettle C, Morton DW. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. Biomed Pharmacother. 2018 Oct;106:553-565.

2) Arai, H., Suzuki, H., & Yoshiyama, T. (2015). Vanutide cridificar and the QS-21 adjuvant in Japanese subjects with mild to moderate Alzheimer's disease: results from two phase 2 studies. Current Alzheimer Research, 12(3), 242–254.

3) Asuni, A. ve ark. 2007. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements." The Journal of Neuroscience, 27(34):9115–9129.

4) Barai, P., Raval, N., Acharya, S., & Acharya, N. (2018). Bergenia ciliata ameliorates streptozotocin-induced spatial memory deficits through dual cholinesterase inhibition and attenuation of oxidative stress in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy, 102, 966-980.

5) Bayer, A. J., Bullock, R., Jones, R. W., Wilkinson, D., Paterson, K. R., Jenkins, L., Millais, S. B., & Donoghue, S. (2005). Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Aβ42 (AN1792) in patients with AD. Neurology, 64(1), 94–101.

6) Britschgi M., Olin C. E., Johns H. T. ve ark. (2009) Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. Proc. Natl Acad. Sci. USA 106, 12145–12150.

7) Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., Dai, C. L., Sun, S., Lee, M. H., ... & Gong, C. X. (2013). A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). Molecular neurobiology, 47, 711-725.

8) Congdon, E. E., Ji, C., Tetlow, A. M., Jiang, Y., & Sigurdsson, E. M. (2023). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease: current status and future directions. Nature Reviews Neurology 2023 19:12, 19(12), 715–736.
9) Conti Filho, C. E., Loss, L. B., Marcolongo-Pereira, C., Rossoni Junior, J. V., Barcelos, R. M., Chiarelli-Neto, O., Silva, B. S. da, Passamani Ambrosio, R., Castro, F. C. de A. Q., Teixeira, S. F., & Mezzomo, N. J. (2023). Advances in Alzheimer's disease's pharmacological treatment. Frontiers in Pharmacology, 14.
10) Decourt B, Boumelhem F, Pope ED 3rd, Shi J, Mari Z, Sabbagh MN. Critical Appraisal of Amyloid Lowering Agents in AD. Curr Neurol Neurosci Rep. 2021 Jun 10;21(8):39.
Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. Acta neuropathologica, 133, 155-175.
11) Elçioğlu, H. K., Yılmaz, G., İlhan, B., & Karan, M. A. (2018). Alzheimer Hastalığında Deneysel Hayvan Modelleri. Relation, 25, 34.
Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Borthelette, P., Blackwell, C., ... & Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. Nature, 373(6514), 523-527.
12) Gao Y, Ren RJ, Zhong ZL, Dammer E, Zhao QH, Shan S, Zhou Z, Li X, Zhang YQ, Cui HL, Hu YB, Chen SD, Chen JJ, Guo QH, Wang G. Mutation profile of APP, PSEN1, and PSEN2 in Chinese familial Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2019 May;77:154-157.
13) Gasiorowska, A., Wydrych, M., Drapich, P., Zadrozny, M., Steczkowska, M., Niewiadomski, W., & Niewiadomska, G. (2021). The Biology and Pathobiology of Glutamatergic, Cholinergic, and Dopaminergic Signaling in the Aging Brain. Frontiers in Aging Neuroscience, 13. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.654931
14) Gholami A. Alzheimer's disease: The role of proteins in formation, mechanisms, and new therapeutic approaches. Neurosci Lett. 2023 Nov 20;817:137532.
15) Turkez H, Cacciatore I, Marinelli L, Fornasari E, Aslan ME, Cadirci K, Kahraman CY, Caglar O, Tatar A, Di Biase G, Hacimuftuoglu A, Di Stefano A, Mardinoglu A. Glycyl-L-Prolyl-L-Glutamate Pseudotripeptides for Treatment of Alzheimer's Disease. Biomolecules. 2021 Jan 19;11(1):126.
16) Hacimuftuoglu A, Tatar A, Cetin D, Taspinar N, Saruhan F, Okkay U, Turkez H, Unal D, Stephens RL Jr, Suleyman H. Astrocyte/neuron ratio and its importance on glutamate toxicity: an in vitro voltammetric study. Cytotechnology. 2016 Aug;68(4):1425-33.
17) Hacımüftüoğlu A., Okkay U., Sağsöz M.E., Taşpınar N. Deneysel Alzheimer Modelinde Hipokampüste Glutamat Geri Alınım Parametrelerinin Değerlendirilmesi, Nöropsikiyatriye ve ağrıya multidisipliner yaklaşım, Ülker Atılan Fedaġ ,Editör, Iksadpublishig House,Ankara, Ss.3-2021.
18) Hacımüftüoğlu A., Araşidonik Asit Türevlerinin Hücre Kültürü ve Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Alzheimer Modelerinde Etkilerinin Araştırılması ve Moleküler Modeleme, Doktora, F.YEŞİLYURT,2023.
19) Hacımüftüoğlu A., Sıçanlarda Oluşturulan Alzheimer Hastalığı Modelinde Gentisik Asit ve Erusik Asit'in Tedavi Edici Etkilerinin İncelenmesi, Doktora, İ.GECİLİ, 2023
HacımüftüoğluA., Deneysel Alzheimer modeli oluşturulmuş serbest hareket edebilen sıçanlarda ampisilin ve memantin tedavilerinin nörotransmiter değişimleri üzerindeki etkileri, Doktora, M. Sait Ertuğrul, 2022
20) HacımüftüoğluA., Deneysel Alzheimer Modeli Oluşturulan ve Serbest Hareket Edebilen Sıçanlarda Glutamat Geri Alınım Sürelerinin İn Vivo Voltametri Tekniği ile Değerlendirilmesi, Doktora, C.BAYRAM,2022 Hira, S., Saleem, U., Anwar, F., Sohail, M. F., Raza, Z., & Ahmad, B. (2019). β-Carotene: a natural compound improves cognitive impairment and oxidative stress in a mouse model of streptozotocin-induced Alzheimer's disease. Biomolecules, 9(9), 441.
21) Hull, M., Sadowsky, C., Arai, H., Leterme, G. L. P., Holstein, A., Booth, K., Peng, Y.,

Yoshiyama, T., Suzuki, H., Ketter, N., Liu, E., & Ryan, J. M. (2017). Long-Term Extensions of Randomized Vaccination Trials of ACC-001 and QS-21 in Mild to Moderate Alzheimer's Disease. Current Alzheimer Research, 14(7).

22) Imbimbo BP, Ippati S, Watling M, Balducci C. A critical appraisal of tau-targeting therapies for primary and secondary tauopathies. Alzheimers Dement. 2022 May;18(5):1008-1037.

Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., ... & Goldstein, L. S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. Nature, 482(7384), 216-220.

23) Jeffrey S. (2015) More positive data on aducanumab in Alzheimer's. Medscape. Available at http://www.medscape.com/viewarticle/844502 [accessed May 11, 2015].

24) Jiao, Q., Li, X., An, J., Zhang, Z., Chen, X., Tan, J., ... & Liu, Y. (2017). Cell-cell connection enhances proliferation and neuronal differentiation of rat embryonic neural stem/progenitor cells. Frontiers in cellular neuroscience, 11, 200.

25) Karran, E., Mercken, M. and De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an assessment towards the development of therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery, 10 (9), 698-712.

26) Keller D. M. (2015) Finally, a big win for a monoclonal in Alzheimer's. Medscape. http://www.medscape.com/viewarticle/841856 [accessed March 23, 2015].

27) Ketter, N., Liu, E., Di, J., Honig, L. S., Lu, M., Novak, G., Werth, J., LePrince Leterme, G., Shadman, A., & Brashear, H. R. (2016). A Randomized, Double-Blind, Phase 2 Study of the Effects of the Vaccine Vanutide Cridificar with QS-21 Adjuvant on Immunogenicity, Safety and Amyloid Imaging in Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease. The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease, 3(4), 1–10.

28) Lecanu, L., & Papadopoulos, V. (2013). Modeling Alzheimer's disease with non-transgenic rat models. Alzheimer's research & therapy, 5, 1-9..

29) Li S, Selkoe DJ. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble Aβ oligomers from Alzheimer's brain. J Neurochem. 2020 Sep;154(6):583-597. doi: 10.1111/jnc.15007. Epub 2020 Apr 5. PMID: 32180217; PMCID: PMC7487043.

Lopez, J. A. S., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. Handbook of clinical neurology, 167, 231-255.

30) Nasb, M., Tao, W., & Chen, N. (2024). Alzheimer's Disease Puzzle: Delving into Pathogenesis Hypotheses. Aging and Disease, 15(1), 43.

31) Nguyen, T. D., Dang, L. N., Jang, J. H., & Park, S. (2023). Recent advances in Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutics from an immune perspective. In Journal of Pharmaceutical Investigation (Vol. 53, Issue 5, pp. 667–684). Springer.

32) Novak, P., Kovacech, B., Katina, S., Schmidt, R., Scheltens, P., Kontsekova, E., Ropele, S., Fialova, L., Kramberger, M., Paulenka-Ivanovova, N., Smisek, M., Hanes, J., Stevens, E., Kovac, A., Sutovsky, S., Parrak, V., Koson, P., Prcina, M., Galba, J., … Zilka, N. (2021). ADAMANT: a placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. Nature Aging, 1(6), 521–534.

33) Novak, P., Schmidt, R., Kontsekova, E., Kovacech, B., Smolek, T., Katina, S., Fialova, L., Prcina, M., Parrak, V., Dal-Bianco, P., Brunner, M., Staffen, W., Rainer, M., Ondrus, M., Ropele, S., Smisek, M., Sivak, R., Zilka, N., Winblad, B., & Novak, M. (2018). FUNDAMANT: an interventional 72-week phase 1 follow-up study of AADvac1, an active immunotherapy against tau protein pathology in Alzheimer's disease. Alzheimer's Research & Therapy, 10(1).

34) Novak, P., Schmidt, R., Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Skrabana, R., Vince-Kazmerova, Z., Katina, S., Fialova, L., Prcina, M., Parrak, V., Dal-Bianco, P., Brunner, M., Staffen, W., Rainer, M., Ondrus, M., Ropele, S., Smisek, M., Sivak, R., … Novak, M. (2017). Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease: a randomised,

double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. The Lancet. Neurology, 16(2), 123–134.
35) Tozlu ÖÖ, Türkez H, Okkay U, Ceylan O, Bayram C, Hacımüftüoğlu A, Mardinoğlu A. Assessment of the neuroprotective potential of d-cycloserine and l-serine in aluminum chloride-induced experimental models of Alzheimer's disease: In vivo and in vitro studies. Front Nutr. 2022 Sep 8;9:981889.
36) Pasquier, F., Sadowsky, C., Holstein, A., Leterme, G. L. P., Peng, Y., Jackson, N., Fox, N. C., Ketter, N., Liu, E., & Ryan, J. M. (2016). Two Phase 2 Multiple Ascending-Dose Studies of Vanutide Cridificar (ACC-001) and QS-21 Adjuvant in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease : JAD, 51(4), 1131–1143.
37) Pentkowski, N. S., Rogge-Obando, K. K., Donaldson, T. N., Bouquin, S. J., & Clark, B. J. (2021). Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 127, 647-658.
38) Platt, T. L., Reeves, V. L., & Murphy, M. P. (2013). Transgenic models of Alzheimer's disease: better utilization of existing models through viral transgenesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1832(9), 1437-1448.
39) Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. Expert opinion on drug discovery, 10(7), 703-711.
40) Rhonda P. Patrick. Role of phosphatidylcholine-DHA in preventing APOE4-associated Alzheimer's disease. FASEB J. 2019 Feb; 33(2): 1554–1564. doi: 10.1096/fj.201801412R
41) Rizzi L., Rosset I. and Roriz-Cruz M. (2014) Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types. Biomed. Res. Int. 2014, 908915. doi:10.1155/2014/908915.
42) Rudan Njavro, J., Vukicevic, M., Fiorini, E., Dinkel, L., Müller, S. A., Berghofer, A., Bordier, C., Kozlov, S., Halle, A., Buschmann, K., Capell, A., Giudici, C., Willem, M., Feederle, R., Lichtenthaler, S. F., Babolin, C., Montanari, P., Pfeifer, A., Kosco-Vilbois, M., & Tahirovic, S. (2023). Beneficial Effect of ACI-24 Vaccination on Aβ Plaque Pathology and Microglial Phenotypes in an Amyloidosis Mouse Model. Cells, 12(1), 79.
43) Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic-Barilar, J., Brückner, M. K., Hoyer, S., Arendt, T., & Riederer, P. (2011). Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. Journal of neural transmission, 118, 765-772.
44) Sawikr Y, Yarla NS, Peluso I, Kamal MA, Aliev G, Bishayee A. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals. Adv Protein Chem Struct Biol. 2017;108:33-57.
45) Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M., De Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. The Lancet, 388(10043), 505-517.
Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., ... & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. The Lancet, 397(10284), 1577-1590.
46) Suzanne M de la Monte, Ming Tong. Biochem Pharmacol. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. 2014 Apr 15;88(4):548-59. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.012.
47) Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nature protocols, 2(12), 3081-3089.
48) Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., ... & Neve, R. L. (1987). Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science, 235(4791), 880-884.
49) Thakur, A., Bogati, S., & Pandey, S. (2023). Attempts to Develop Vaccines Against Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Ongoing and Completed Vaccination Trials in Humans.
50) Tourino, C., Trumble, A., Louie, L., Barbour, R. M., Kinney, G. G., Campbell, B., & Zago, W. M. (2023). Immunological response to dual Aβ/Tau vaccine PRX123 surrogate and effects on brain amyloid plaques in rapidly depositing transgenic animal model. Alzheimer's & Dementia,

19(S24), e082687.
51) van Dyck, C. H., Sadowsky, C., Le Prince Leterme, G., Booth, K., Peng, Y., Marek, K., Ketter, N., Liu, E., Wyman, B. T., Jackson, N., Slomkowski, M., & Ryan, J. M. (2016). Vanutide Cridificar (ACC-001) and QS-21 Adjuvant in Individuals with Early Alzheimer's Disease: Amyloid Imaging Positron Emission Tomography and Safety Results from a Phase 2 Study. The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease, 3(2), 1–10.
52) Vandenberghe, R., Riviere, M. E., Caputo, A., Sovago, J., Maguire, R. P., Farlow, M., Marotta, G., Sanchez-Valle, R., Scheltens, P., Ryan, J. M., & Graf, A. (2016). Active Aβ immunotherapy CAD106 in Alzheimer's disease: A phase 2b study. Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.), 3(1), 10–22.
53) Wan Chik, M., Ramli, N. A., Mohamad Nor Hazalin, N. A., & Surindar Singh, G. K. (2023). Streptozotocin mechanisms and its role in rodent models for Alzheimer's disease. Toxin Reviews, 42(1), 491-502.
54) Wang, C. Y., Wang, P. N., Chiu, M. J., Finstad, C. L., Lin, F., Lynn, S., Tai, Y. H., De Fang, X., Zhao, K., Hung, C. H., Tseng, Y., Peng, W. J., Wang, J., Yu, C. C., Kuo, B. S., & Frohna, P. A. (2017). UB-311, a novel UBITh® amyloid β peptide vaccine for mild Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions, 3(2), 262.
55) Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., Maguire, R. P., Blennow, K., Lundmark, J., Staufenbiel, M., Orgogozo, J. M., & Graf, A. (2012). Safety, tolerability, and antibody response of active Aβ immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. The Lancet Neurology, 11(7), 597–604.
56) Yulug B, Altay O, Li X, Hanoglu L, Cankaya S, Lam S, Velioglu HA, Yang H, Coskun E, Idil E, Nogaylar R, Ozsimsek A, Bayram C, Bolat I, Oner S, Tozlu OO, Arslan ME, Hacimuftuoglu A, Yildirim S, Arif M, Shoaie S, Zhang C, Nielsen J, Turkez H, Borén J, Uhlén M, Mardinoglu A. Combined metabolic activators improve cognitive functions in Alzheimer's disease patients: a randomised, double-blinded, placebo-controlled phase-II trial. Transl Neurodegener. 2023 Jan 26;12(1):4.
57) Yörük, M. A., Okkay, U., Savaş, A. B., Bayram, C., Sezen, S., Ertuğrul, M. S., & Hacımüftüoğlu, A. (2022). Behavioral Tests Used in Experimental Animal Models. Anatolian Journal of Biology, 3(2), 14-22.
58) Zhao, J., Han, Z., Ding, L., Wang, P., He, X., & Lin, L. (2024). The molecular mechanism of aging and the role in neurodegenerative diseases. Heliyon, 10(2).

DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELLERİ

Doç. Dr. Banu C. TEL
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

Elif Çınar[1,2], Sevgi Uğur Mutluay[2], Cevşen Yazıcı[2], Banu Cahide Tel[2]
[1]İstanbul Cerrahpaşa Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı
[2]Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Parkinson hastalığı (PH) ilk defa 1817'de, James Parkinson tarafından tanımlanmıştır. James Parkinson yayımladığı monografta tremor, rijidite ve postural instabilite gibi motorbozuklukların yanı sıra uyku ve gastrointestinal sistemle ile ilişkili motor dışı bulgulara da değinmiştir. Daha sonraki yıllarda; hastalığın substantia nigra patolojisi ve Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan intranöronal inklüzyon cisimcikleri ile ilişki olabileceği öne sürülmüş, dopaminin sadece noradrenalin prekürsörü olarak işlev görmediği, tek başına bir nörotransmitter olduğu, Parkinson hastalarının striatumunda dopaminin dramatik bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca dopaminin substantia nigra pars compacta'sında (SNpc) yoğun olarak bulunduğu ve buradaki nöronların aksonlarının striatuma projekte olduğu gösterilmiştir. 1997'de Lewy cisimciklerinde alfa-sinüklein varlığının gösterilmesi ve alfa-sinüklein proteinini kodlayan gendeki mutasyonların PH ile ilişkili olduğunun keşfedilmesiyle bu proteinin hastalığın patolojisinde rolü olduğu bildirilmiştir. Klinik olarak tanımlanmasından bu yana geçen 200 yılda, PH'nin etyopatogenizine ilişkin elde edilen önemli bilgi birikimine rağmen hastalığın patolofizyolojisi ve altta yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Hastalığın genel prevalansı % 0,1-0,2 civarındadır ve bu oran 60 yaş üstünde %1'e, 80 yaş üstünde %4'e kadar ulaşmaktadır. Olguların çoğu 65-70 yaşları arasında, idiyopatik başlangıçlı olup kalıtsal formları tüm olguların %5-10'u kadarını oluşturur ve daha erken yaşlarda görülebilir. Mevcut tedavi yöntemleri hastalığın semptomlarını gidermeye yöneliktir ve hastalığın ilerleyici seyrini engelleyecek, ayrıca hastaların yaşam kalitesini artıracak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır. İdiyopatik PH etiyolojisinin anlaşılabilmesi, tedavi mekanizmalarının daha detaylı incelenebilmesi ve geliştirilebilmesi, semptomların azaltılması ya da yok edilmesi için yeni tedavi yaklaşımlarının test edilebilmesi ve hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılabilmesi ya da durdurulabilmesi için PH'yi tüm yönleriyle taklit edebilecek hayvan modellerine gereksinimi vardır. Bu derlemede in vivo Parkinson hastalığı modelleri üzerinde durulmuştur. Hayvan modelleri genel olarak nörotoksin/farmakolojik hayvan modelleri (Tablo 1), alfa-sinüklein patolojisi geliştirebilen modeller ve genetik ya da transgenik hayvan modelleri olmak üzere gruplanabilir.

Tablo 1. PH'nin toksin ve genetik hayvan modelleri

Model	Mekanizma	Uygulama Şekli	Nigrostriatal Hasar	ilerleyiciliği	LC Benzeri İnklüzyon
6-OHDA	Kompleks 1 inhibisyonu	i.c. enjeksiyon	+++	+/-	-
MPTP	Kompleks 1 inhibisyonu	Sistemaitik enjeksiyon	++	+	-
Parakuat	Kompleks 1 inhibisyonu, ROS	Sistemaitik enjeksiyon	++	+	+
Rotenon	Kompleks 1 inhibisyonu, ROS	Sistemaitik veya i.c. enjeksiyon	++	+	+
Maneb	Glutamat ve DA alım yetersizliği	Sistematik enjeksiyon	+	+	-
A-sin	LC benzeri agregat	Aşırı ifade	+	+	++
Parkin	Ubikutin E3 ligaz aktivite	*Knock-out*	+/-	+/-	+/-
PİNK1	Mitokondriyal yetersizlik	*Knock-out*	+/-	+/-	+/-
LRRK2	Ezmatik aktivite	*Knock-out*	+/-	+/-	+/-

6-OHDA: 6-hidroksidopamin, i.c. İntracerebral, MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin; ROS: serbest oksijen radikalleri, a-sin: alfa-sinüklein, LC: Lewy cisimcikleri, PİNK: PTEN ile indüklenmiş kinaz, LRRK: Lösin zengin tekrarlayan kinaz kısaltma olrak kullanılmıştır.

1. Nörotoksin/Farmakolojik Parkinson Hayvan Modelleri

6-OHDA (6-hidroksidopamin): 6-OHDA katekolaminlerin yapısal analoğudur ve 1960'lardan beri özellikle de sıçanlarda en sık kullanılan PH modelidir ve kan beyin engelini geçemediği için streotaksik olarak SNpc, orta ön-beyin demeti (medial forebrain bundle; MFB) ya da striatuma enjeksiyon yapmak gerekmektedir. 6-OHDA; dopamin ve noradrenalin membran taşıyıcısı aracılığıyla katekolaminerjik nöronların içinde birikir ve daha sonrasında mitokondriyal kompleks I inhibisyonu yapar [1]. 6-OHDA, SNpc ya da MFB'a unilateral enjeksiyon yapıldığı zaman hem çok yoğun hem de çok hızlı dopaminerjik nöron hasarı yapar. Böylece unilateral motor bozukluğa neden olur ve bu bozukluk davranışsal olarak farmakolojik ajanlarla (amfetamin, apomorfin vs) test edilebilir [2]. 6-OHDA'nın bilateral enjeksiyonu ile anksiyete, depresyon ve görme bozukluğu gibi motor-dışı semptomlarda görülebilmekte ve değerlendirilebilmektedir [3]. 6-OHDA enjeksiyonuna bağlı kısmi ya da yoğun striatal dopaminerjik hasara bağlı kortikostriatal sinaptik plastisitenin değiştiği ve bazal gangliyada glutamaterjik iletimin arttığı gözlenmiştir [3]. MFB'a 6-OHDA enjeksiyonunun noradrenalin, seratonin ve dopaminerjik nöron kaybına neden olarak anksiyete ve depresyon benzeri davranış ile anhedoniyi oldukça artırdığı gözlenmiştir [4]. Ancak, 6-OHDA modelinin çeşitli kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Bunlar; Lewy cisimleri oluşumu gözlenmez ve bir anda nöron ölümüne neden olarak hastalığın ilerleyici nitelikteki doğal seyrini taklit etmez [3]. Bu modelde tramor da oluşmaz.

MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin): MPTP'nin toksik etkisi ilk olarak 1980'lerde keşfedilmiştir. MPTP ile kontamine olmuş sentetik eroini kullanan bir grup bağımlıda aniden Parkinson benzeri semptomların görülmesi üzerine keşfedilmiştir [5]. MPTP sistemik uygulandığında da lipofilik özelliği sayesinde kan beyin bariyerini geçerek, mitokondriyal kompleks I inhibisyonu yapar. MPTP'nin kendisi toksik olmamasına rağmen metabolizasyon ürünleri; 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridiniyum (MPDP+) ve özellikle de 1-metil-4-fenilpiridiniyum

(MPP+) oldukça toksiktir. MPP+'i dopamin taşıyıcısı (DAT), dopaminerjik nöronlara taşıyarak sitoplazma içinde, veziküler monoamin taşıyıcısı (VMAT) ise sinaptik veziküllere taşıyarak veziküllerde birikmesine neden olur. MPP+ daha sonra mitokondriyal membran potansiyeli aracılığıyla organelin içine girerek kompleks I inhibisyonuna neden olur [6]. MPTP toksisitesi; mitokondriyal hasar ve buna bağlı down-stream yolağı etkileyerek apoptotik düzeleyici Bax ve Jun-N-terminal (JNK) kinaz up-regülasyonunu, sitokrom c salıverilmesini, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu kapsayan apoptotik nörodejeneratif süreci ve aynı zamanda N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü aracılı eksitotoksisite ve nöroinflamasyonu da içeren bir süreçtir [7]. MPTP, PH'nin motor semptomlarını maymunlarda ve farelerde oldukça gerçeğe yakın taklit edebilmektedir ki bu durum, MPTP modelinin avantajlarını oluşturmaktadır. Ancak, aynı başarı sıçanlarda görülmemiştir. Bu durum sıçanların bu toksine daha dirençli olduğunu göstermektedir [8]. 6-OHDA modelinde olduğu gibi Lewy cisimcikleri oluşturmaz, nörodejeneratif süreci teaklit edemez ve tremor oluşturmaz.

Rotenon: Rotenoid nörotoksin ailesine ait herbisit, pestisit ve pisisittir. Pachyrhizus erosus gibi bazı tropik bitki türlerinde doğal olarak bulunabilir. Lipifilik özellikte olduğu için kan beyin engelini aşabilir ve nöronların içine girdikten sonra mitokondriyal kompleks I'i bloke eder, ROS artışına sebep olur, proteazom aktivitesini inhibe eder, dopamin ve glutatyon seviyelerini azaltarak oksidatif hasara neden olur [3]. Rotenon modeli, SNpc dopaminerjik nöron kaybı, nigrostriatal dopaminerjik hasar, davranışsal değişiklikler, inflamasyon, alfa-sinüklein ve ubikutin içeren Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyon, oksidatif stres ve mide-barsak sistemi rahatsızlıkları gibi PH'de görülen semptomların hemen hemen hepsini taklit edebilir [9]. Ancak rotenon, deney hayvanlarında yüksek oranda ölüme sebep olmaktadır. Sonuçların tekrar edilmesi oldukça zordur ve dopaminerjik hasarın boyutu deneyler arasında değişkenlik göstermektedir [3].

Parakuat: MPP+'nin yapısal analoğu olan 1,1-dimetil-4,4'-bipiridiniyum diklorit içeren bir pestisit ve herbisittir. Kan beyin engelini geçerek hücre içine girer ve mitokondri kompleks 1 inhibisyonu yapar. Ayrıca, yüksek doz parakuat, dopaminerjik nöronlarda DAT aracılıyla birikir [10]. Parakuatın indirgenmiş hali O2 ile reaksiyona girerek ROS türlerini oluşturur ve glutatyonun geri dönüşümünü bozar böylece nöronal hasar ve ölüme neden olan oksidatif stresi başlatır [3]. Ayrıca; JNK, c-Jun gibi enzimlerin fosforilasyonu, kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptoza neden olur [7]. Kronik, sistemik Parakuat uygulanması, SNpc'de yavaş ilerleyen hasara neden olarak, PH'nin erken –presemptomatik- dönem dopaminerjik iletim hasarını taklit eder [11].

Maneb: Mn-etilen-1,2-bisditiyokarbamat içeren bir fungisittir. Lipofilik yapısı sayesinde kan beyin engelini geçerek glutamat taşıyıcısını inhibe eder ve dopamin alımını ve salıverilmesini bozar [12]. Kronik, sistemik Maneb uygulanması, SNpc nöron hasarına ve striatal dopaminerjik deafferentasyona neden olurken, dopamin salıverilmesi görece korunur [3, 13].

Parakuat ya da Maneb ile oluşturulan PH modelinin bir avantajı alfa-sinüklein içeren Lewy cisimcikleri benzeri inklüzyonlara sebep olmalarıdır. Ancak, bu modellerin tekrar edilebilirliği düşüktür ve dopaminerjik hücre ölüm, striatal dopaminerjik kayıp ve davranış konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır [14].

PH modeli oluşturmak için kullanılan toksin modelleri dışında bir de farmakolojik ajan modelleri vardır.

Haloperidol: Haloperidol, indirekt ve direkt yolakları oluşturan orta boy dikensi çıkıntılı nöronlardaki dopamin D2 ve daha az oranda da D1 reseptörünü antagonize ederek etki gösterir. Haloperidol enjeksiyonundan kısa bir süre sonra striatal dopaminerjik reseptör blokajına bağlı kaslarda rijidite ve katalepsi gibi semptomların görülmesi ile sonuçlanır. Haloperidol modeli, mGlu4, mGLu7 agonistleri, Adenozin A2A/A1 antagonistleri gibi yeni non-dopaminerjik ajanların potansiyel semptomatik etkisini değerlendirmek için iyi bir model olsa da, haloperidolün etkisinin geçici ve zayıf olması, uzun süreli kullanılamaması, PH ile ilişkili karakteristik patolojiyi oluşturamaması modelin kısıtlılıklarıdır [15].

Rezerpin: Veziküler monoamin transporter 2 (VMAT2)'nin irreversible inhibitörüdür. Dopaminin veziküler alımının inhibe edilmesi, nörotoksik dopamin oksidasyon ürünlerinin birikimi ile sonuçlanır. Monoamin oksidaz aracılı dopaminin enzimatik yıkım ürünleri reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olur ve artan ROS miktarı oksidatif hasar meydana getirir [16]. Rezerpinin motor aktivite için gerekli olan monoaminlerden dopamin miktarında azalmaya neden olması, PH için uygun bir farmakolojik hayvan modeli oluşturmaktadır.
0.1mg/kg gibi düşük dozlarda tekrar eden rezerpin uygulanması, sinir terminallerinde hücre içi veziküler monoamin depolanmasını engelleyerek; lokomotor aktivitede azalma, rijidite gibi motor bulguların görülmesine neden olur [16]. Her ne kadar rezerpin modeli SNpc'de ve striatumda dopamin miktarını azaltma gibi PH'nin temel biyokimasal bileşenlerini taklit etse ve hastalığın klinik bulgularından akinezi, rijiditeyi indüklese de nigral dopaminerjik nöron hasarına neden olmaması, modelin kısıtlılıklarındandır [15].

2. Genetik Parkinson Hayvan Modelleri

İdiyopatik Parkinson hastalığı ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalık olmasına rağmen ancak çok küçük bir kısmı (%10) otozomal dominant ya da çekinik genetik mutasyona bağlı olarak görülmektedir [17]. 15 adet gen ve 25 adet genetik risk faktörü, "PARK" ve "non-PARK" olarak tanımlanmıştır. En yaygın olanları; SNCA (alfa-sinüklein, PARK1 ve 4), PRKN (parkin RBR E3 ubikutin protein ligaz, PARK2), PINK1 (PTEN tarafından indüklenmiş kinaz 1, PARK6), DJ-1 (PARK7) ve LRRK2 (lösin açısından zengin tekrar kinaz 2, PARK8)'dir.

Parkin: Bir ubikutin E3 ligazdır ve enzimatik aktivite kaybının hem ailesel hem de sporadik PH'de rol oynadığı düşünülmektedir. İlk olarak PRKN gen mutasyonu, Japon PH hastalarında keşfedilmiştir [18]. Otozomal çekinik ve erken başlangıçlı-PH genel olarak ekzon 2, 3 ve 8'de silinme; ekzon 2-4 ve 9'da dublikasyon olarak görülür [19]. Ekzon 3 olmadığında striatal glutamat seviyesinin arttığı, hafif mitokondriyal bozukluğun görüldüğü, antioksidan seviyesinin azaldığı ve oksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir [3]. Bakteriyel yapay kromozom (BAC) aracılı dopaminerjik nöronlarda C-terminali kesilmiş insan mutant parkin ifade ederek SNpc dopaminerjik nöron hasarı ve striatal dopaminerjik terminallerde azalmaya neden olan, geç başlangıçlı ve ilerleyici motor hasar görülen, bir transgenik fare modeli geliştirilmiştir [20].

PINK1: Parkin ile etkileşime girerek mitokondriyal depolarizasyon sonucu otofaji indüksiyonu yapar ve böylece, hücreleri mitokondriyal bozukluktan korur [21]. PINK1 gen mutasyonu ilk olarak erken başlangıçlı, otozomal çekinik PH hastası olan İtalyan ailelerde tanımlanmıştır [22]. PINK1 modelleri, nigrostriatal dopaminerjik nöronlarda fonksiyonel bozulmaya neden olmamaktadır [3].

DJ1: DJ1 geninin transkripsiyonel düzenleyici, oksidatif stres sensörü, proteaz ve mitokondriyal düzenleyici gibi pek çok fonksiyonu vardır [23]. Missense DJ1 mutasyonunun erken başlangıçlı, otozomal çekinik PH ile ilişkili olduğu ilk olarak Alman ve İtalyan ailelerde bulunmuştur [24]. DJ1 fareler SNpc dopaminerjik nöron kaybı göstermezken, striatal dopamin salıverilmesinde azalma, D2 otoreseptör uyarılmasına cevapsızlık, lokomotor aktivitede azalma ve kortikostriatal sinaptik plastisite de değişiklik görülür [25].

LRRK2: LRRK2 proteini; bir kinaz, bir RAS ve bir GTPaz olmak üzere pek çok bölgeye ve fonksiyona sahiptir. Otozomal dominant ve geç başlangıçlı PH'de, LRRK2 geninde missense ve nokta mutasyon bulunmuştur [3]. Ayrıca, idiyopatik PH'de de etkili olduğu düşünülmektedir [26]. En yaygın görülen mutasyon kinaz (G2019S) veya GTPaz (R1441C/G) bölgelerinde görülür ve bazen hafif dopaminerjik hasara, dopamin salıverilmesinde ve geri alımında değişikliğe neden olur [26, 27]. Mutant LRRK2 ifade eden BAC transgenik fare modeli geliştirilmiştir ve bu modelde yaşa bağlı, ilerleyici motor bozukluk ve striatumda hafif dopamin salıverilmesinde azalma gözlenirken, nigrostriatal hasar gözlenmemiştir. LRRK2 fare modeli, PH ile ilgili yalnızca hafif dopaminerjik eksiklik ya da diğer patolojik belirtileri gösterir [3].

Sonik hedgehog (shh), çekirdek reseptörü ilişkili protein-1 (Nurr1), hipofiz homeobox 3 (Pitx3), engrailed 1 (EN) gibi transkripsiyon faktörlerinin eksikliğinin de dopaminerjik nöronların hayatta kalmasında ve gelişmesinde rolü olduğu, bu nedenle bu faktörlerin eksikliği ile PH modeli oluşturulabileceği gösterilmiştir [28-30].

Genetik PH modelleri hastalığın patolojisini aydınlatmaya dair mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, agregat oluşumu, gliozis gibi birtakım bilgiler veriyor olsa da dopaminerjik nöron hasarına neden olmaması ve modellerin temelinin insanda gerçekleşmeyen bir şekilde gen aşırı ifadesine ya da knock out olmasına dayanması transgenik hayvan modellerinin kısıtlılıklarındandır.

3. Alfa-sinüklein ile Oluşturulan Parkinson Hayvan Modelleri

Alfa-sinüklein (a-sin) ilk olarak Torpedo Californica türünün elektrik organından elde edilen kolinerjik veziküler sinapslarının saflaştırılarak sinüklein kodlayan cDNA'nın izole edilmesi ile keşfedilmiştir [31]. A-sin 14.46 kDa moleküler ağırlığında, beyinde yüksek oranda özellikle de presinaptik olarak ifade edilen nöronal bir proteindir [32]. Alzheimer hastalarından alınan korteks dokularında yapılan bir çalışmada amiloid β (Aβ) yanında, plakların içinde 2 peptid daha keşfedilmiştir ve 140 amino asitlik proteine Alzheimer hastalığının (AH)'nın non-Aβ bileşeni anlamında (NAC) ve prekürsörüne de NACP adı verilmiştir [33]. 140 amino asitlik proteinin Torpedo'dan izole edilen sinüklein ile oldukça yüksek oranda homolog olduğu ve 134 amino asitlik proteinin de, sığır fosfonöroprotein 14'ün insan homoloğu olduğu keşfedilmiştir [32]. Bu proteinler, sinüklein ailesine ait proteinler olarak alfa (α) ve beta (β)-sinüklein olarak adlandırılmışlardır [32]. A-sin sadece nöron hücrelerinde değil, T hücresi, B hücresi, doğal öldürücü hücreler ve monositler gibi hematopoetik hücrelerde, iskelet kasında, kalpte, pankreasta, böbrekte, akciğerde, plasentada ve periferal eritrositlerde de ifade edildiği gösterilmiştir [34-36].

A-sin tersiyer yapısı oldukça çözünür bir proteindir ve doğal olarak α-helikal yapısında monomer şeklinde bulunur [37]. Sinüklein ailesi; a-, β-, γ- ve retinaya özel paralog sinoretin'den oluşur. α-, β- ve γ-sinüklein genleri, beyinde oldukça yüksek oranda sentez edilir [38].

A-sin 3 bölümden oluşmaktadır. 1. N-terminal bölgesi, 2. Plakların non-amiloid bileşen (NAC) bölgesi ve C-terminal bölgesi:

N-terminal bölgesi: A-sin'in pozitif yüklü, lipid bağlanma bölgesidir [39]. A-sin'in lipid tabakası ile etkileşimini sağlayan içerdiği 11 aminoasitli tekrar eden KTKEGV hekzamerik apolipoproteinin a-helikal motifitir. KTKEGV motifi a-sin içerisinde 7 bölgede tekrar etmektedir [40].

NAC bölgesi: A-sin'in merkezi hidrofobik bölgesidir ve ilk olarak Alzheimer hastalarının senil plaklarından izole edilmiştir [33]. Hidrofobik NAC bölgesi oldukça amiloidojenik yapıdadır ve agregat oluşumu için gereklidir [41].

C-terminal bölgesi: Esas olarak asidik pH'lı amino asitleri içerir, negatif yüklüdür [42]. C-terminali kesilmiş a-sin'in daha fazla agregat oluşturmasından dolayı; bu bölgenin NAC bölgesini engelleyerek, agregasyonu inhibe ettiği öne sürülmüştür [43].

A-sin'in fizyolojik fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak, sinaptik veziküllerin oluşunda, veziküler homeostazisinde veziküler havuzda, vezikül boyutunun ayarlanmasında ve böylece de sinaptik iletimde rolü olduğu ve bunun dışında a-sin'in dopaminin salıverilmesinde ve depolanmasında da görev aldığı düşünülmektedir [44-46].

A-sin'in fizyolojik ve patofizyolojik özelliklerini anlamak için pek çok model geliştirilmiş olsa da bunların çok azı knock-out (KO) modellerdir ve büyük çoğunluğu da aşırı ifade ile sağlanan modellerdir. Geliştirilmiş olan bir KO fare modelinde; ekzon 1 ve 2 ya da ekzon 4 ve 5 silinmiştir. Ancak, bu modellerde fareler normal bir beyin organizasyonu ve normal bir yaşam sürmüşlerdir. Bu da a-sin'in hayati bir fonksiyonu olmadığını düşündürmekle birlikte bu modelde amfetamin ile lokomotor aktivitenin, açık alanda arka ayakları üzerinde durma "rearing" ve striatumda

dopamin seviyesinin azaldığı gözlenmiştir [47, 48]. Ayrıca; a-sin'in dinlenme ya da depo durumundaki vezikül havuzunu kontrol ederek presinaptik düzenleyici fonksiyonuna sahip olduğu ve ayrıca; dopamin salıverilmesinde de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [36, 48].

A-sin ile birlikte β- ve γ-sinüklein knockout fareler; sinaptik yapıda ve iletimde, yaşa bağlı olarak nöronal fonksiyonda ve survivalda değişiklik göstermişlerdir. Bu değişiklikler, reseptöre bağlanmış çözünebilir N-etilmaleimid duyarlı faktör (SNARE) proteininin organizasyon bozukluğundan kaynaklı olabilir [49]. Yapılan bir çalışmada SNARE fonksiyonunda bozukluk olduğunda nörodejenerasyon ve erken ölüm görülmüştür [50].

A-sin, kalsiyum aracılı vezikül birleşmesinin etkililiğini ya da kinetiğini değiştirmeden veziküllerin kümelenmesini artırarak sinaptik iletimi etkiler ki bu etki sadece a-sin membrana bağlanıp multimerik hale geldiği zaman olur [45, 51].

Sitozolik a-sin'in monomerik durumu sadece membran proteinleri ile etkileşime geçip hücresel fonksiyonu için gerekli olan multimerik forma gelene kadar gerekli, geçici bir durum olabilir. PH ilişkili mutasyonların lipid bağlanma bölgesinde olduğu bilinmektedir. Belki de membran-protein bağlanması için gerekli olan dengedeki değişiklikler ve sırasıyla çoklu katlanmalar a-sin'in fizyolojik fonksiyonunu bozduğunu düşündürmektedir [45].

A-sin aynı zamanda çekirdekte de bulunmuştur fakat rolü henüz tam bilinmemektedir [52]. A-sin'in çekirdekte translokasyonla, ailesel mutasyonlarla ve oksidatif stres ile çekirdek yerleşiminin artabileceği düşünülmektedir [50]. A-sin bir defa çekirdek içerisine girdikten sonra transkripsiyonun düzenlenmesinde, direkt DNA ile etkileşime girerek ya da transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek, rol oynuyor olabilir [50]. A-sin önemli mitokondriyal transkripsiyon faktörlerinden biri olan GC1 alfa promoter'a bağlanarak, mitokondriyal homeostaz üzerinde negatif etki gösterebilir [53].

A-sin, özellikle dopaminerjik sinapslarda, dopamin biyosentezi ve geri alımı ile ilişkili proteinlerle etkileşime girerek, tirozin hidroksilaz (TH) ile etkileşerek ya da direkt TH fosforilasyonunu azaltıp, TH defosforilasyonu düzenleyen temel fosfataz olan protein fpsfataz 2A (PP2A) aktivitesini artırıp, TH'yi inhibe ederek önemli rol oynar [54].

A-sin diğer proteinler ile etkileşime girebildiği gibi, kendi kendisi ile de etkileşime girerek multimerik bir yapı oluşturabilir ki fizyolojik a-sin'in tetramer yapıda olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır [55]. Genetik mutasyon, yüksek konsantrasyonda makro molekül varlığına bağlı moleküler yük artışı, a-sin protein seviyesini artışı, translasyon sonrası değişiklikler ve oksidatif koşullar nedeniyle kendi kendine β-plak formu oluşturan a-sin çözünemeyen a-sin agregatlarına dönüşebilir [56, 57]. A-sin'in agregat oluşturması için gerekli koşullar belirlenmiş olsa da altta yatan mekanizma tam olarak bilinememektedir. A-sin'in katlanmamış ya da kısmen katlanmış halden agregat haline geçişi için basit bir yapı değişikliği yeterli olabilmektedir [57].

Lewy cisimciğinin temel bileşeni olan a-sin genine ait 5 adet nokta mutasyonu A30P [58], E46K [59], H50Q [60], G51D [61] ve A53T [62] tanımlanmıştır ve her biri ailesel PH ile ilişkilidir. A-sin genindeki kromozomal triplikasyonlar ve dublikasyonlar da erken başlangıçlı PH ile ilişkili bulunmuştur [63]. A-sin geninin promoter bölgesinde meydana gelen polimorfizmler, protein ifadesinde artışa ve PH geliştirmede daha yüksek duyarlılığa sebep olmaktadır [64]. Yüksek miktarda a-sin proteini agregat oluşumunu başlatarak PH'i tetikleyen faktör olabilir [36].

PH patolojik belirteci olan LC ve içeriğinin a-sin olduğunun keşfinden sonra, a-sin agregatları üzerinde detaylı çalışmalar yapılmıştır. Bunun sonucunda; hastalık süresinde, a-sin agregatlarından etkilenen nöronal bölgelerin kaudalden rostrale ve beyin sapından kortekse doğru olmak üzere belirli bir streotipik yol izlediği gösterilmiştir [65]. Böylece; hastalığın ilerleyişi ile nöroanatomik çekirdeklerde a-sin agregatları gösterilerek, hastalığın şiddetini gösteren şemalar oluşturulmuştur [66]. A-sin agregatları ilk olarak beyin sapındaki vagusun dorsal motor çekirdeğinde ve olfaktör bulbus'ta gösterilmiştir [66]. Hastalığın ilerleyişi ile a-sin tegmentum pontis, amigdala ve SNpc'de agregat oluşturur ve en son temporal korteks ile neokortekse ulaşır

[65]. A-sin agregatları sadece SSS'de değil aynı zamanda PSS'de de görülür. A-sin'in bazal ganglia dışındaki hücrelerde de bulunmuş olması PH'nin motor dışı semptomlarının altında yatan sebep olabilir [67]. Bu semptomlardan en önemlilerinden biri gastro-intestinal semptomlardır ve motor semptomlardan yıllar önce ortaya çıkar [68, 69]. PH hastalarının özefagustan rektuma kadar tüm enterik sinir siteminde a-sin agregatlarının bulunması bu hipotezi desteklemektedir [68, 69].

A-sin oligomerleri, Lewy cisimciği patolojisinin temel bileşeni olduğu için oldukça dikkat çekmektedir. Aşırı ifade edilmiş a-sin fibrilleşmekten ziyade genellikle oligomerleşme eğilimi göstermektedir. Bu durum oligomerik türlerin, a-sin'in en toksik türü olduğunu düşündürmektedir [70]. Ancak; patolojik olarak oligomerlerin yanında fibriller de bulunmaktadır. Bu nedenle pek çok grup; tampon bileşenleri, agregat koşulları ve genetik mutasyonlar gibi dış etkenlerin a-sin'in fibriller yapısına nasıl etki ettiğini araştırmıştır [50]. Oligomerik türlerin toksisitesi dikkat çekse de, a-sin'in çözünmeyen formlarının ve yanlış katlanmış halinin prion benzeri yayılımı, fibriller ve olgun a-sin türlerinin toksik etkisine dikkat çekmektedir [71]. Ekzojen fibrillerin uygulanması ile birlikte; sadece olgun agregat içeren belli hücrelerin ölüp, komşu hücrelerin ölmemesi ile a-sin agregatları ile hücre ölümü arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur [72].

4. Viral Vektör Aracılı Parkinson Hayvan Modelleri

Rekombinant viral vektörlerin geliştirilmesi ile in vivo olarak değiştirilmiş genler transfer ederek SSS hastalıklarını modellemenin yeni bir yolu açılmıştır. Özellikle de adeno-ilişkili viral vektör (AAV) ve lentiviral vektör (LV) aracılığıyla beyin içerisinde uzun süreli ifade sağlayan etkili gen transfer araçları geliştirilmiş olmuştur [36, 73]. AAV, daha yüksek verimde vektör taşıma kapasitesine sahiptir, beyin içerisinde daha geniş bir alanı etkiler ve özellikle de yüksek seçicilikte nigral dopaminerjik nöronlara uzun süreli, sürekli ifadeyi sağlar. [74]. AAV-aracılı nigral nöronlarda insan a-sin aşırı ifadesi sağlandığında; SN'de nörodejenerasyona, striatumda dopaminerjik terminallerin kaybına ve dokuda dopamin içeriğinin azalmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu nöropatolojik değişiklikler a-sin proteininin hücre gövdesinde ve etkilenmiş hücrelerin terminallerinde anormal birikime ve Parkinson'lu hastaların beyinlerinde görülen Lewy nöritlerine benzer yapıların oluşmasına bağlıdır. Hücre ve terminallerde akut lezyon oluşumuna neden olan toksin modellerinin tersine, bu model de lezyon oluşumu haftalar sürmektedir [75, 76].

Viral aracılı a-sin aşırı ifadesi genellikle oldukça aktif olan tavuk β-aktin promoter (CBA) ile ya da daha az aktif olan sitomegalovirus (CMV) promoter'ı aracılı sağlanır. Bunun dışında nöron özel sinapsin promoter'ı da kullanılmaktadır. Ancak transgen aşırı ifadesi sadece promoter'a bağlı değil fakat aynı zamanda enjekte edilen viral partikül miktarına da bağlıdır [77].

AAV en sık kullanılan viral vektör sistemidir. İlk olarak AAV'nin serotip-2 kullanılmıştır [75]. Patolojinin hafifçe ilerlediği ve SNpc'de %30-80 TH+ nöron kaybı, %50 striatal terminal ve dopamin kaybı gözlenmiştir [75]. Viral aracılı a-sin aşırı ifadesi ile PH patolojisini en iyi taklit eden model AAV2 ve 6 aracılı yabanıl tip a-sin aşırı ifadesinin nörona özel sinapsin promoter'ı ile sağlanmıştır [78]. AAV aracılı a-sin aşırı ifadesi ile sağlanan PH modeli sadece rodentlerde değil yetişkin marmosetlerde de çalışılmıştır ve hem TH kaybı hem de davranışsal değişiklikler gözlenmiştir [79].

Sadece fare değil diğer yabanıl tip hayvanları da kullanılabilmek, yetişkinlerde ve hedef hücrede istenilen genin transfer edilmesi ile aşırı ifadesinin sağlanabiliyor olması, karşı tarafı iç kontrol olarak kullanabileceği, tek taraflı olarak transgenin ifadesini sağlamaya olanak vermesi ve böylece motor bozuklukları apomorfin, amfetamin gibi farmakolojik ajanlarla değerlendirebilmek viral vektör kullanıyor olmanın en temel avantajlarıdır [73].

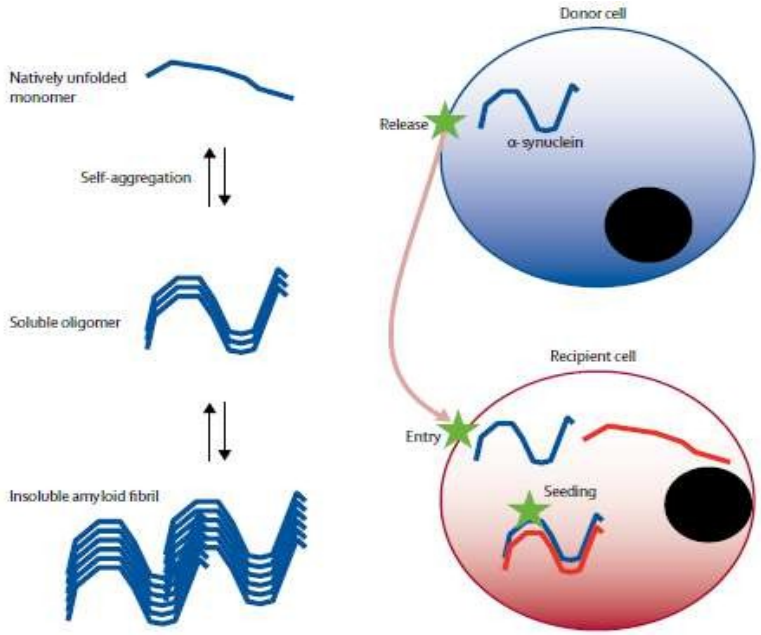
Viral vektör aracılı yabanıl tip insan a-sin geninin aşırı ifadesi; a-sin agregat oluşumu, SNpc'de TH nöronlarının kaybı ve nigrostriatal yolakta terminal kaybı ile dopamin

konsantrasyonunun azalması ile sonuçlanır. Ancak; bu modelin ne kadar ilerleyici olduğu viral aracılı a-sin lezyonlarının görece kısa bir süre sonra plato yapması ve hatta bazen düzelme görülmesi nedeniyle tartışma konusudur [75, 78, 80, 81]. Viral vektör aracılı yüksek oranda transgen üretimi enjeksiyon sonrası sağlansa da bu ifade nigrostriatal sistem ile kısıtlıdır ve oldukça katı ve yoğun nigrostriatal hasar gözlenir [75, 78, 79, 81]. Pek çok viral vektör aracılı aşırı ifade modelinde motor davranış bozukluğu ya değişkendir ya da kısmi nigrostriatal sistem lezyonuna bağlı olarak çok görülmez [75, 80, 81].

Alfa-sinüklein Fibril Modelleri

Alfa-sinükleinin fibrillere oligomerizasyonu sırasında, a-sin'in yapısı toksik etkilerinin altında yatan önemli değişikliklere uğrar. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda gözlemlenen kanıtlar, a-sin oligomerlerinin ve muhtemelen protofibrillerin hücre ölümüne neden olan toksik türler olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, a-sin yapısının ve oligomerizasyon sırasındaki değişikliklerin daha iyi anlaşılması, sinükleinopatilerin patogenezine ilişkin temel bilgiler verebilir. A-sin doğal olarak hücrede katlanmamış (unfolded) halde bulunmaktadır, ancak enzimlerle fosforilasyon ya da bazı protein etkileşmeleri sonucunda agrege olarak çözünür oligomerler haline gelir ve nihayetinde tipik bir amiloid yapısına sahip çözünmeyen fibril agregatları oluşturur (Şekil 1) [82].

A53T-mutant insan a-sin'i aşırı eksprese eden transgenik farelerde yapılan ilk çalışmalar, genç fareleri a-sin agregatları veya önceden oluşturulmuş (pre-formed) rekombinant a-sin fibrilleri içeren beyin ekstraktları ile intraserebral aşılamanın, hayvanlarda progresif ve nihayetinde ölümcül sinükleinopati oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır [83].



Şekil 1. Alfa-sinükleinin fibril oluşturma ve prion benzeri yayılımın varsayılan mekanizmalar

Yapılan bir çalışmada, PH hastası bir bireyin beynine sağlıklı nöronal grefler yerleştirilmesinin sonrasında sağlıklı dokuda Lewy cisimcikleri görülmesi, patolojik a-sin'in prion benzeri bir yayılma mekanizması gösterdiğini düşündürmüştür [82,84]. İnsan a-sin'in fareye enjekte edilmesi sonrası nöronlar arası geçiş yaparak striatuma nakledilen naive (hiçbir ilaca ya da işleme maruz bırakılmamış) nöron greftlerinde insan a-sin'i bulunmuştur [84]. Biriken kanıtlar, 'prion benzeri' hücreden hücreye iletimin ve a-sin agregatlarının yayılmasının, sinükleinopatilerde gözlenen protein birikimlerinin ve hastalık ilerlemesinin altında yatan neden

olduğunu göstermektedir [83].

Başka bir çalışmada, Lewy cicimcikleri/ Lewy nöritleri patolojisinin yanlış katlanmış a-sin tarafından indüklenebileceği ve nöronlara yayılabileceği gösterilmiştir. Buna göre küçük miktarlarda a-sin preformed fibrillerinin (PFF) intraserebral olarak fareye verildiğinde nöronlar boyunca yayılır, Lewy cicimcikleri/ Lewy nöritleri benzeri inklüzyonlar olarak biriken patolojik agregatlar oluşturmak için doğrudan endojen a-sin'i indükler ve beyin sapı gibi inokülasyon bölgesinin çok uzaklarında a-sin agregatları oluşturur. Bu sonuçlar sporadik PH ve diğer nörodejeneratif hastalıkların başlangıcını, ilerlemesini ve etyopatogenezini anlamak için önemlidir. Alfa-sinüklein agregatlarının periferden merkezi sinir sistemine geçip geçmediğini anlamak PH patolojisinde hayati önem taşır çünkü PH'nin erken evredeki belirtilerinden bazıları beyin dışındaki patolojisi ile ilgili olabilir [83,84].

Kaynaklar

1) Blum, D., et al., Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Prog Neurobiol, 2001. 65(2): p. 135-72.
2) Ungerstedt, U. and G.W. Arbuthnott, Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. Brain Res, 1970. 24(3): p. 485-93.
3) Gubellini, P. and P. Kachidian, Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. Rev Neurol (Paris), 2015. 171(11): p. 750-61.
4) Delaville, C., et al., Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. Neurobiol Dis, 2012. 45(2): p. 763-73.
5) Langston, J.W., P. Ballard, J.W. Tetrud, and I. Irwin, Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science, 1983. 219(4587): p. 979-80.
6) Ramsay, R.R. and T.P. Singer, Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. J Biol Chem, 1986. 261(17): p. 7585-7.
7) Gubellini, P., B. Picconi, M. Di Filippo, and P. Calabresi, Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: from experimental models to neurodegenerative diseases. Biochim Biophys Acta, 2010. 1802(1): p. 151-61.
8) Jackson-Lewis, V., J. Blesa, and S. Przedborski, Animal models of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, 2012. 18 Suppl 1: p. S183-5.
9) Cicchetti, F., J. Drouin-Ouellet, and R.E. Gross, Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? Trends Pharmacol Sci, 2009. 30(9): p. 475-83.
10) Rappold, P.M., et al., Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(51): p. 20766-71.
11) Ossowska, K., et al., A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? Eur J Neurosci, 2005. 22(6): p. 1294-304.
12) Vaccari, A., et al., Disulfiram and diethyldithiocarbamate intoxication affects the storage and release of striatal dopamine. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. 139(1): p. 102-8.
13) Thiruchelvam, M., et al., Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. Eur J Neurosci, 2003. 18(3): p. 589-600.
14) Miller, G.W., Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. Toxicol Sci, 2007. 100(1): p. 1-2.
15) Duty, S. and P. Jenner, Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments

and clues to the cause of the disease. Br J Pharmacol, 2011. 164(4): p. 1357-91.
16) Fernandes, V.S., et al., Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. Behav Brain Res, 2012. 231(1): p. 154-63.
17) Klein, C. and A. Westenberger, Genetics of Parkinson's disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. 2(1): p. a008888.
18) Kitada, T., et al., Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature, 1998. 392(6676): p. 605-8.
19) Verstraeten, A., J. Theuns, and C. Van Broeckhoven, Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. Trends Genet, 2015. 31(3): p. 140-9.
20) Lu, X.H., et al., Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. J Neurosci, 2009. 29(7): p. 1962-76.
21) Lazarou, M., et al., PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. J Cell Biol, 2013. 200(2): p. 163-72.
22) Valente, E.M., et al., PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. Ann Neurol, 2004. 56(3): p. 336-41.
23) Ariga, H., et al., Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. Oxid Med Cell Longev, 2013. 2013: p. 683920.
24) Bonifati, V., et al., Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science, 2003. 299(5604): p. 256-9.
25) Goldberg, M.S., et al., Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. Neuron, 2005. 45(4): p. 489-96.
26) Ramonet, D., et al., Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. PLoS One, 2011. 6(4): p. e18568.
27) Tong, Y., et al., R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(34): p. 14622-7.
28) Gonzalez-Reyes, L.E., et al., Sonic hedgehog maintains cellular and neurochemical homeostasis in the adult nigrostriatal circuit. Neuron, 2012. 75(2): p. 306-19.
29) Kadkhodaei, B., et al., Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. J Neurosci, 2009. 29(50): p. 15923-32.
30) Haubenberger, D., et al., Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. Neurobiol Aging, 2011. 32(2): p. 302-7.
31) Maroteaux, L., J.T. Campanelli, and R.H. Scheller, Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. J Neurosci, 1988. 8(8): p. 2804-15.
32) Jakes, R., M.G. Spillantini, and M. Goedert, Identification of two distinct synucleins from human brain. FEBS Lett, 1994. 345(1): p. 27-32.
33) Ueda, K., et al., Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): p. 11282-6.
34) Nakai, M., et al., Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 358(1): p. 104-10.
35) Ueda, K., T. Saitoh, and H. Mori, Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 205(2): p. 1366-72.
36) Eschbach, J. and K.M. Danzer, alpha-Synuclein in Parkinson's disease: pathogenic function and translation into animal models. Neurodegener Dis, 2014. 14(1): p. 1-17.
37) Bartels, T., J.G. Choi, and D.J. Selkoe, alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically

folded tetramer that resists aggregation. Nature, 2011. 477(7362): p. 107-10.
38) Lavedan, C., The synuclein family. Genome Res, 1998. 8(9): p. 871-80.
39) Emamzadeh, F.N., Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. J Res Med Sci, 2016. 21: p. 29.
40) Sode, K., S. Ochiai, N. Kobayashi, and E. Usuzaka, Effect of reparation of repeat sequences in the human alpha-synuclein on fibrillation ability. International Journal of Biological Sciences, 2007. 3(1): p. 1-7.
41) Giasson, B.I., I.V. Murray, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee, A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. J Biol Chem, 2001. 276(4): p. 2380-6.
42) George, J.M., The synucleins. Genome Biol, 2002. 3(1): p. REVIEWS3002.
43) Crowther, R.A., R. Jakes, M.G. Spillantini, and M. Goedert, Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. FEBS Lett, 1998. 436(3): p. 309-12.
44) Scott, D. and S. Roy, alpha-Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. Journal of Neuroscience, 2012. 32(30): p. 10129-10135.
45) Diao, J., et al., Native alpha-synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. Elife, 2013. 2: p. e00592.
46) Gaugler, M.N., et al., Nigrostriatal overabundance of alpha-synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. Acta Neuropathol, 2012. 123(5): p. 653-69.
47) Abeliovich, A., et al., Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. Neuron, 2000. 25(1): p. 239-52.
48) Cabin, D.E., et al., Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. J Neurosci, 2002. 22(20): p. 8797-807.
49) Greten-Harrison, B., et al., alphabetagamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(45): p. 19573-8.
50) Villar-Pique, A., T. Lopes da Fonseca, and T.F. Outeiro, Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. J Neurochem, 2016. 139 Suppl 1: p. 240-255.
51) Burre, J., M. Sharma, and T.C. Sudhof, alpha-Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(40): p. E4274-83.
52) Goers, J., et al., Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. Biochemistry, 2003. 42(28): p. 8465-71.
53) Siddiqui, A., et al., Selective binding of nuclear alpha-synuclein to the PGC1alpha promoter under conditions of oxidative stress may contribute to losses in mitochondrial function: implications for Parkinson's disease. Free Radic Biol Med, 2012. 53(4): p. 993-1003.
54) Peng, X., et al., Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 15): p. 3523-30.
55) Dettmer, U., et al., KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal alpha-synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(31): p. 9596-601.
56) Narhi, L., et al., Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. J Biol Chem, 1999. 274(14): p. 9843-6.
57) Uversky, V.N., Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. J Neurochem, 2007. 103(1): p. 17-37.
58) Kruger, R., et al., Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet, 1998. 18(2): p. 106-8.

59) Zarranz, J.J., et al., The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Ann Neurol, 2004. 55(2): p. 164-73.
60) Appel-Cresswell, S., et al., Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. Mov Disord, 2013. 28(6): p. 811-3.
61) Kiely, A.P., et al., alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? Acta Neuropathol, 2013. 125(5): p. 753-69.
62) Polymeropoulos, M.H., et al., Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science, 1997. 276(5321): p. 2045-7.
63) Ibanez, P., et al., Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. Lancet, 2004. 364(9440): p. 1169-71.
64) Maraganore, D.M., et al., Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. JAMA, 2006. 296(6): p. 661-70.
65) Braak, H., U. Rub, W.P. Gai, and K. Del Tredici, Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. J Neural Transm, 2003. 110(5): p. 517-36.
66) Braak, H., et al., Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging, 2003. 24(2): p. 197-211.
67) Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, A.H. Schapira, and E. National Institute for Clinical, Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. Lancet Neurol, 2006. 5(3): p. 235-45.
68) Wakabayashi, K., et al., Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. Acta Neuropathol, 1988. 76(3): p. 217-221.
69) Braak, H., R.A. de Vos, J. Bohl, and K. Del Tredici, Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. Neurosci Lett, 2006. 396(1): p. 67-72.
70) Rockenstein, E., et al., Accumulation of oligomer-prone alpha-synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration in vivo. Brain, 2014. 137(Pt 5): p. 1496-513.
71) Luk, K.C., et al., Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. J Exp Med, 2012. 209(5): p. 975-86.
72) Osterberg, V.R., et al., Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. Cell Rep, 2015. 10(8): p. 1252-60.
73) Bezard, E., Z. Yue, D. Kirik, and M.G. Spillantini, Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. Mov Disord, 2013. 28(1): p. 61-70.
74) Bjorklund, A., et al., Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. Brain Res, 2000. 886(1-2): p. 82-98.
75) Kirik, D., et al., Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. J Neurosci, 2002. 22(7): p. 2780-91.
76) Ulusoy, A., M. Decressac, D. Kirik, and A. Bjorklund, Viral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. Prog Brain Res, 2010. 184: p. 89-111.
77) Gombash, S.E., et al., Morphological and behavioral impact of AAV2/5-mediated overexpression of human wildtype alpha-synuclein in the rat nigrostriatal system. PLoS One, 2013. 8(11): p. e81426.
78) Decressac, M., et al., Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. Neurobiol Dis,

2012. 45(3): p. 939-53.
79) Kirik, D., et al., Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5): p. 2884-9.
80) Lo Bianco, C., et al., alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(16): p. 10813-8.
81) Yamada, M., T. Iwatsubo, Y. Mizuno, and H. Mochizuki, Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. J Neurochem, 2004. 91(2): p. 451-61.
82) Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? Lancet Neurol. 2010 Nov;9(11):1128-38. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70213-1. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20846907.
83) Visanji NP, Brotchie JM, Kalia LV, Koprich JB, Tandon A, Watts JC, Lang AE. α-Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. Trends Neurosci. 2016 Nov;39(11):750-762. doi: 10.1016/j.tins.2016.09.003. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27776749.
84) Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM. Exogenous α-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. Neuron. 2011 Oct 6;72(1):57-71. doi: 10.1016/j.neuron.2011.08.033. PMID: 21982369; PMCID: PMC3204802.
85) Angot E, Steiner JA, Lema Tomé CM, Ekström P, Mattsson B, Björklund A, Brundin P. Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. PLoS One. 2012;7(6):e39465. doi: 10.1371/journal.pone.0039465. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22737239; PMCID: PMC3380846.

Gezi Rehberi:

Aizanoi Antik Kenti/Çavdarhisar-KÜTAHYA

Prof. Dr. F. Yasemin ÖZATİK
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı



Aizanoi Antik Kenti Kütahya Çavdarhisar ilçe merkezinde, Kütahya'ya 50 kilometre uzaklıktadır. Penkalas (Kocaçay) Irmağı'nın yukarı kesiminde tanrıça Meter Steunene'nin kutsal mağarası civarında yaşayan Frigyalılar'ın öncüsü olarak antik kaynaklarda geçen **Azan** adlı mitoloji kahramanının, **Su Perisi Erato** ile efsanevi **Kral Arkas**'ın birleşmesinden Aizanoi şehrinin ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Aizanoi kenti, antik Frigya'ya bağlı olarak yaşayan Aizanitis'lerin ana yerleşim merkeziydi. Kentin yüksek platosu üzerinde bulunan Zeus Tapınağı'nın çevresinde yapılan kazılarda, MÖ 3 bin yıllarına ait yerleşim izlerinin ortaya çıktığı görülmüştür. **Helenistik Dönem**'de bu bölge değişimli olarak **Bergama**'ya ve **Bithynia**'ya bağlı iken MÖ 133'de **Roma** egemenliğine girmiştir. Roma imparatorluk döneminde tahıl ekimi, şarap ve yün üretimi sayesinde zenginleşmiş ve ünü bölge sınırlarını aşmış olan Aizanoi'de kesin kentleşme bulgularına ancak MÖ 1'nci yüzyıl sonlarına doğru rastlanmaktadır. Yine ilk sikkelerin bu dönemde basıldığı bilinmektedir.

Aizanoi antik kenti en parlak dönemini MS 2 yüzyılda yaşamış, büyük imar faaliyetleri görmüş ve bu dönemde birçok yapı inşa edilmiştir. **Erken Bizans Dönemi**'nde piskoposluk merkezi iken, 7'nci yüzyıldan itibaren bu önemini yitirmiştir. Tapınak düzlüğü **Orta Çağ**'da bir hisara dönüştürülmüştür. **Selçuklular Dönemi**'nde **Çavdar Tatarları** tarafından üs olarak kullanılmasından dolayı buraya **Çavdarhisar** adı verilmiştir.

Kalıntılar arasında **Anadolu'daki en iyi korunmuş Zeus Tapınağı**, 15 bin kişi kapasiteli tiyatro ve tiyatroya bitişik nizamda yapılmış 13 bin 500 kişilik stadyum, iki hamam, **dünyanın ilk ticaret borsa binası**, sütunlu cadde, Kocaçay üzerinde ikisi ayakta kalmış beş köprü, iki agora, gymnasium, Meter Steunene kutsal alanı, nekropoller, antik bir bent, suyolları, kapı yapıları bulunmaktadır. Aizanoi antik kenti Efes, Bergama, Side gibi kentlerle çağdaştır.

Zeus Tapınağı

Irmağın batı kıyısına 200 metre uzaklıkta etrafı sütunlu galerilerle çevrili 130,5x112 metre boyutlarındaki alanın ortasında, bir podyum üzerine kuruludur.

8x15 ölçülerinde 120 adet **İon** ve 4 adet **Korint** üslubunda sütunlarla dipteras planlı olarak inşa edilmiştir. **Frig Tanrıçası Meter Steunene**'ye adanmış olan yer altı cellasına inen ve çatıya ulaşan bir merdiveni bulunmaktadır. Anadolu'daki en iyi korunagelmiş İon düzenindeki tapınaklardan biri olan yapının bezemelerinden özellikle akroterleri ilgi çekicidir. Batı alınlığında orta akroter akant dalları ve yaprakları arasında **Tanrıça Kybele**'nin büstüyle bezenmiştir. Doğu alınlık akroterindeyse Zeus büstü bulunmaktadır. Dört sütunlu avlusu ve agorasıyla M.S. 117-138 yılları arasında yapılmış tapınağın ön galeri duvarlarında; **İmparotor Hadrian**'i ve Aizanoi için önemli hizmetler görmüş **Apuleius**'u öven yazıtlar yer almaktadır. Aizanoi Antik Kenti'nin keşfi 19. yüzyılın başlarında Küçük Asya'ya askerî, diplomatik ya da keşif amaçlarıyla gelen seyyahlar tarafından gerçekleştirilmiştir. Kenti ilk keşfeden kişinin Asburnham'ın 3. kontu George Ashburnham olduğu söylenmektedir. Daha sonra sırasıyla, 1824'te St. Asaph, 1827 yılında Kont Alexander de Laborde, Dr. Hall ve Mr. Becker ve Leon de Laborde, 1829 yılında George Thomas Keppel, 1830 yılında ise Haçlı Seferleri tarihçisi Joseph-François Michaud¸ 1834 ve 1847 yıllarında Charles Félix Marie Texier, İngiliz jeolog J. William Hamilton kente gelmişler ve yayınlandıkları makale ve kitaplarda Aizanoi'daki yapılardan bahsetmişlerdir.

Aizanoi Antik Kenti'ndeki ilk kazı çalışmaları 1926 yılında Alman Arkeoloji Enstitüsü tarafından D. Krencker ve M. Schede yönetiminde başlamış ve 1928 yılına kadar aynı ekip tarafından Zeus Tapınağı ve çevresinde yürütülmüştür.

İkinci dönem kazı çalışmaları 1970-1982 yılları arasında R. Naumann (1910-1992) başkanlığında yapılmıştır. Bu dönem çalışmaları kentteki hamam yapılarında yoğunlaşmıştır.

Üçüncü dönem kazı çalışmaları, 1982-1990 yılları arasında A. Hoffmann tarafından Tiyatro-Stadion kompleksinde yapılmıştır.

Dördüncü dönem kazılarının başkanlığını 1990 yılından 2007 yılına kadar K. Rheidt üstlenmiştir. K. Rheidt, A. Hoffmann ile tapınak, stadion ve Roma köprüleri üzerine çalışmalar gerçekleştirmiştir. K. Rheidt dönemi çalışmaları, Roma köprüleri, Penkalas nehri sel/taşkın koruma duvarları, tapınak restorasyonu ile Aizanoi topografyası üzerine yoğunlaşmıştır.

Beşinci dönem kazıları ise 2008-2009 yıllarında R.V.D. Hoff başkanlığında sürdürülmüştür. Bu dönemde kentin özellikle Hellenistik, Roma ve Bizans Dönemleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Altıncı dönem kazıları 2011 ile 2020 yılları arasında Prof. Dr. Elif Özer başkanlığında yürütülmüştür. Zeus Tapınağı çevresi, Hamam-Palaestra, Bouleterion/Odeon, Penkalas, Güney ve Kuzey nekropolislerde, Tiyatro ve Stadion alanlarında kazı çalışmaları yapılmıştır.

Aizanoi'da 2021 yılında Kütahya Müzesi başkanlığında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gökhan Coşkun'un bilimsel danışmanlığında kazı yeniden başlamıştır. 2022 yılında ise Cumhurbaşkanlığı kararıyla Aizanoi Kazı Başkanlığı'nı Prof. Dr. Gökhan Coşkun üstlenmiştir. Agora, Proyplon, Tiyatro ve Penkalas Çayı'nda kazı çalışmaları devam etmektedir.