

Parkinson Hastalığı'nın Hayvan Modelinde PI3K/Akt Yolağı ile Mitokondriyal, Oksidatif ve Apoptotik Parametrelerin İlişkisi

The Relationship Between Mitochondrial, Oxidative, Apoptotic Parameters and PI3K/Akt Pathway in Animal Model of Parkinson's Disease.

Hazal Haytural, Erdem Tüzün
İstanbul Üniversitesi, DETAE, Sinirbilim AD

ÖZET

Parkinson hastalığı (PH) dopaminerjik nöronlarda ilerleyici yıkımla seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır. PH'nin toksik maddelerle oluşturulan hayvan modelleri, klinik ve patolojik bulgularıyla PH'yi taklit etmektedir. PH'de nörokoruyucu etkiye sahip yeni terapötik stratejiler ve prognozu belirleyecek biyobelirteçler büyük ilgi odağıdır. Bu bağlamda fosfoinositidil-3-kinaz (PI3K)/Akt yolağı PH'de dikkat çeken sağkalım yollarından biridir. Bu çalışmada PH'nin klinik seyrinde PI3K/Akt yolağında ortaya çıkan değişimlerin ortaya konulması ve klinik bulgularla olan ilişkisinin araştırılması planlandı. Bu amaçla, C57BL/6 farelerinde oksidatif stres arttırdığı bilinen rotenon ile hayvan modeli oluşturuldu ve PI3K/Akt yolağında yer alan ve Akt tarafından regüle edilen kaspaz-9, kaspaz-3 ve Bcl-2 ile Akt'yi kontrol eden mTOR, DJ-1 ve PTEN genlerinin ekspresyon düzeyleri ardışık haftalarda elde edilen beyin dokularında incelendi. Rotenon uygulanan farelerde rijidite, bradikinezi ve postür değişikliği saptandı. Substantia nigra'da bulunan tirozin hidroksilaz pozitif hücrelerin azaldığı ve serebral apoptotik nöronların arttığı gözlemlendi ($p<0,05$). Ekspresyon düzeyleri incelenen genlerden sadece Bcl-2'nin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı, diğer genlerden Akt-1'de hafif azalma ve mTOR'da hafif artış olduğu kaspaz-3, kaspaz-9, PTEN ve DJ-1 genlerinde ise düzey değişikliği olmadığı saptandı. Kaspaz-3, mTOR ve Bcl-2 ile klinik parametreler arasında zayıf korelasyon belirlendi. Sadece Bcl-2 ekspresyonunda belirgin azalma görülmesi rotenonun PI3K/Akt yolağı dışındaki faktörlerle etki edebileceğini düşündürmüştür. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonlarının değişmemesi PH'de kaspazdan bağımsız apoptoz yollarının rol oynadığını düşündürmektedir. Özellikle ağır klinik bulguları olan farelerde ekspresyon düzeyinin düşük olması, Bcl-2'nin, PH olgularında prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, hayvan modeli, rotenon, apoptoz, Bcl-2

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder, characterized with progressive loss of dopamine-generating neurons. Neurotoxin-induced animal models of PD mimic clinical and pathological findings of PD. Lately researchers have started focusing on the novel therapeutical strategies that have neuroprotective effects and prognostic biomarkers. Thus, the PI3K/Akt signaling pathway, which regulates cell survival, is attracting increasing amounts of attention. Investigation of molecular alterations related with this pathway might aid in improvisation of novel treatment methods and biomarkers for PD. However, it is not possible to determine molecular changes in brain tissues of PD cases in different stages of the disease. In this study, we aimed to examine the changes in the expression of PI3K/Akt factors during the course of PD and their association with clinical features. Thus, we established a C57BL/6 mouse model of PD by administrating rotenone, which has been shown to increase oxidative stress. Gene expression levels of mTOR, DJ-1 and PTEN that regulate Akt-1, and caspase-3, caspase-9 and Bcl-2 that are regulated by Akt-1 were examined in brain tissues obtained in consecutive weeks.

Rigidity, bradikinesia and postural changes were observed in rotenone-treated mice. Moreover tyrosine hydroxylase positive neurons were decreased in substantia nigra, whereas cerebral apoptotic neurons were increased. Levels of Bcl-2 significantly decreased in rotenone-treated mice as compared to the control group ($p<0,05$). On the other hand Akt-1 was found to decrease slightly and mTOR was found to increase slightly, whereas there were no changes in caspase-3, caspase-9, DJ-1 and PTEN expression levels. There was a weak correlation between caspase-3, mTOR, Bcl-2 levels and clinical parameters. The sole occurrence of significant expression change in Bcl-2 suggests that rotenone induces PH through non-PI3K/Akt mechanisms. The absence of alteration in caspase-3 and caspase-9 expression levels implies that caspase-independent apoptosis is involved in PD pathogenesis. Mice with severe clinical symptoms showed down-regulated Bcl-2 expression suggesting that Bcl-2 might be used as a prognostic biomarker in PD cases.

Key Words: Parkinson's disease, animal model, rotenone, apoptosis, Bcl-2

GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH) günümüzde en sık görülen nörodegeneratif hastalıklardan biridir. 65 yaş üzeri populasyonun %1-2'sini etkilemekte ve yaşlılıkla birlikte insidansı artmaktadır (1,2). Substantia nigra pars compacta (SNpc)'da bulunan dopaminerjik nöronların ölümü ile karakterize edilen dejeneratif bir hastalıktır (3). PH'nin kesin sebebi bilinmemekle beraber SN'da gözlenen nöronal yıkımda apoptoz, mitokondrial işlev bozukluğu, artmış oksidatif stres, lizozomal ve proteazomal işlev bozukluğu gibi patolojik süreçlerin rol oynadığı bilinmektedir (4). Nöron ölümüne sebep olabilecek bu farklı patojenik faktörler arasında fosfoinositidil-3-kinaz (PI3K)/Akt yolağı, başlıca sağkalım yollarından birini oluşturması (5,6), ailevi PH olgularında mutasyonu saptanan bazı proteinlerle (PINK1, DJ1, parkin, α -sinüklein) yakın ilişki içinde olması (7-9), apoptoz, otofaji, mitokondrial işlevler gibi çok farklı sağkalım-ölüm mekanizmalarının merkezinde yer alması (7) ve PH olgularının SN dokularında Akt ekspresyonunun azalması (10,11) gibi sebeplerle özellikle dikkati çekmiş ve üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (12-16).

PH'nin patogenezinin aydınlatılması ve olası tedavi yöntemlerinin denenmesi amacıyla çeşitli genetik ve toksik hayvan modelleri geliştirilmiştir (17,18). PH'nin çeşitli toksik maddelerle oluşturulan hayvan modelleri, klinik bulguları ve nigrostriyatal yolaktaki dopaminerjik nöronlarda dejenerasyon ve inklüzyon cisimciklerinin varlığı gibi birçok yönü ile PH'yi

aslına oldukça yakın bir şekilde temsil etmektedir. Bu nedenle hayvan modeli kullanımı patogenezin aydınlatılmasında önemli bir yere sahiptir. Metil fenil tetra-hidropiridin (MPTP) ve hidroksidopamin (6-OHDA) ile oluşturulan hücre soyu ve hayvan modellerinde ve rotenon ile oluşturulan hücre soyu modellerinde Akt-1 ve Akt-1 tarafından aktive edilen proteinlerin ekspresyonunda azalma görüldüğünü ve dopaminerjik nöron kaybında bu azalmanın rol oynayabileceğini ileri süren yayınlar bulunmaktadır (10). 6-OHDA, MPTP ve rotenon gibi nörotoksik ajanların gerek primer dopaminerjik hücre soylarında gerekse SH-SY5Y hücrelerinde Akt-1 yolağını baskıladığı gösterilmiştir (19-23). 6-OHDA ve MPTP modellerinde de beyin örneklerinde Akt-1 yolağına ait faktörlerin ekspresyonunda azalma görülmüş, bu azalmayı geriye döndüren kimyasallar (örneğin kafein, anjiogenin) deney hayvanlarında geliştirilen PH'nin hem patolojik hem de klinik bulgularında belirgin düzelme sağlamışlardır (24,25).

PH olgularının beyin dokularında mitokondriyal enzimlerde işlev bozukluğu ve buna bağlı oksidatif değişiklikler olduğu bilinmektedir. Ancak olguların hastalık öncesi erken dönemlerde beyin dokularında gerçekleşen biyokimyasal ve moleküler değişikliklerin bilinmesi mümkün değildir. Ayrıca tanısı konmuş PH olguları ilaç tedavisi altında olduğundan, hastalığın doğal seyrinin sözkonusu biyokimyasal değişiklikler üzerine etkisini kesin bir şekilde belirlemek mümkün olmayabilir.

Bu çalışmada, nörotoksin ile indüklenmiş PH modelinde,

farelerin beyin örneklerinde gözlenen nöronal mitokondriyal, oksidatif ve apoptotik faktörlerin PH'nin farklı evrelerindeki değişimlerinin ortaya konulması ve hastalık seyrinde meydana gelen nöronal moleküler değişikliklerin klinik bulgulara paralel olarak gözlenmesi planlanmıştır. Bu amaçla, C57BL/6 (B6) farelerinde oksidatif stresi arttırdığı bilinen rotenon ile bir hayvan modeli oluşturulmuş ve bu modelde PI3K/Akt yolağında yer alan ve Akt tarafından regüle edilen kaspaz-9, kaspaz-3 ve Bcl-2 ile Akt'yi kontrol eden mTOR, DJ-1 ve PTEN genlerinin ekspresyon düzeyleri elde edilen beyin dokularında incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Hayvan Modeli

Parkinson modeli, 40 adet 7-8 haftalık dişi B6 farelerde gavaj yöntemi ile oral uygulanmıştır. Bu amaçla rotenon, fare başına 30mg/kg olacak şekilde her gün tartılmıştır. Rotenon, Tween-20 ve %0.5 karboksimetil selüloz sodyum tuzu (CMC) içinde süspanse edilip süspansiyondan 100ml her gün gavaj ile oral yoldan uygulanmıştır. Kontrol grubu farelere ise her gün sadece Tween-20 içinde çözünen %0.5'lik CMC süspansiyonundan 100ml gavaj ile uygulanmıştır (26). Deney boyunca haftada bir kez olmak üzere farelere açık alan testi uygulanmış, 5 dakika boyunca hareket mesafesi ve hareket yüzdesi ölçülmüştür. Rotenon uygulamasına bağlı olarak gerçekleşen mitokondriyal disfonksiyonun hücre ölümü üzerindeki etkilerini görmek için 3, 5 ve 7. haftalarda sırasıyla birinci, ikinci, üçüncü deney grupları ve 7. haftada kontrol grubu servikal dislokasyon metodu ile sakrifiye edilmiş ve beyin dokuları elde edilmiştir. Bu şekilde hastalığın farklı evrelerindeki oksidatif, mitokondriyal ve apoptotik değişikliklerin izlenmesi mümkün olmuştur.

Hayvan Modelinin Teyidi

İmmünohistokimya ile PH'nin patolojik biyobelirteci olan dopaminerjik nöronların kaybı incelenmiştir. Parafine gömülen beyin kesitleri deparafinize edilerek preparatlar protokolüne uygun olarak sırasıyla %0.3'lük H₂O₂ içeren PBS'te ve %5'lik keçi serumu ile inkübe edilmiştir. Sonrasında kesitlerin üzerine tirozin hidroksilaz (1:500, Millipore, Billerica, MA, tavşan anti-fare) antikoru eklenerek gece boyunca +40C'de inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak HRP-konjuge (1:2000, Santa Cruz, CA, ABD, anti-tavşan antikoru) antikor kullanılmıştır. Diaminobenzidin ile anitokorlar gözlenebilir hale geldikten sonra hematoksilin ile zıt boyama yapıp preparatlar sırasıyla %70 etanol, %90 etanol, %100 etanol ve ksilolle yıkanmış ve kapatma solüsyonu ile lameller kapatılmıştır.

DNA zincirindeki kırıkların etiketlenmesine (Trevigen Tunel kiti) dayanan bu teknik ile de toksisitenin neden olacağı apoptoz tek hücre düzeyinde araştırılmıştır.

Bir diğer doğrulama yöntemi DNA zincirindeki kırıkların etiketlenmesine (TUNEL teknolojisi) dayanmaktadır ve bu

şekilde tek hücre düzeyindeki apoptozun belirlenmesi mümkün olmaktadır. Protokolüne uygun gerçekleştirilen TUNEL metodunda (Trevigen) öncelikle parafin kesitler deparafinize edilmiş ve preparatlar %3.7'lik formaldehitte oda ısısında fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası kesitler sırasıyla kitin içindeki cytonin, TdT labeling tamponu, TdT Stop tamponu ile yıkanmıştır. Son olarak Strep-Florür solüsyonuyla inkübe edilen kesitlerin üzerine DAPI damlatılarak preparatlar lamelle kapatılmıştır.

Real-time PCR

Farelerden elde edilen her bir hemisferden trizol yöntemi ile RNA izole edildikten sonra cDNA sentezi (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA sentez kiti) yapılmıştır. Sentezlenen cDNA örnekleri öncelikle kalitelerinin kontrolü için housekeeping bir gen olan gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılarak çoğaltılmıştır. Light Cycler 480 II cihazı ve Light Cycler 480 SYBR Green kit kullanılarak PI3K/Akt sinyal yolağına ait araştırılacak genler uygun primerlerle çoğaltılmıştır. PI3K/Akt yolağında yer alan ve Akt tarafından regüle edilen kaspaz-9, kaspaz-3 ve Bcl-2 ile Akt'yi kontrol eden mTOR, DJ-1 ve PTEN genlerinin ekspresyon düzeyleri "AbsQuant/2nd DerivativeMax", "Tm Calling" programlarında analiz edilerek örneklerin ekspresyona başladıkları sikluslar (Cp değerleri) not edilmiştir.

İstatistik

Ağırlık, hareket yüzdesi ve hareket mesafesi rotenon (27 fare) ve CMC (9 fare) grupları arasında Student t-test ile, gen ekspresyon değerleri 3. (7 fare), 5. (10 fare), ve 7. (10 fare) haftalarda sakrifiye edilen rotenon grupları ile 7. haftada sakrifiye edilen CMC (9 fare) grubu arasında "one way-ANOVA" ve "post-hoc Tukey" testi ile karşılaştırılmıştır. Farklı haftalarda sakrifiye edilen farelere ait ekspresyon değerleri ile klinik parametreler arasındaki korelasyon Pearson korelasyon testi ile değerlendirilmiş ve korelasyon kat sayıları (R) hesaplanmıştır. Ardından Bonferroni düzeltmesi yapılarak p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçların güvenilirliğinin pekiştirilmesi amacıyla Spearman korelasyon testi de uygulanmıştır.

genomdaki kopya sayısı değişiklikleri hem BAF hem de LRR birlikte değerlendirilerek incelenmektedir (8).

SNP array verisi ile allel frekans dağılımının belirlenebilmesi sayesinde bireylerin her bir SNP pozisyonu için genotipleri tespit edilebilmektedir (6). Bu sayede genomdaki kayıp ve kazanç bölgeleri için ve anne veya baba kaynaklı bir anomali olması durumunda genotip verilerinden faydalanılarak bu anomalinin ebeveyn etkisi belirlenebilir. Bu çalışmamızda Trizomi 21 örneği üzerinden geliştirdiğimiz yöntem ile tüm trizomilerde ebeveyn etkisinin araştırılabilmesi için kullanılacak hızlı ve etkili bir algoritmayı sunmaktayız.

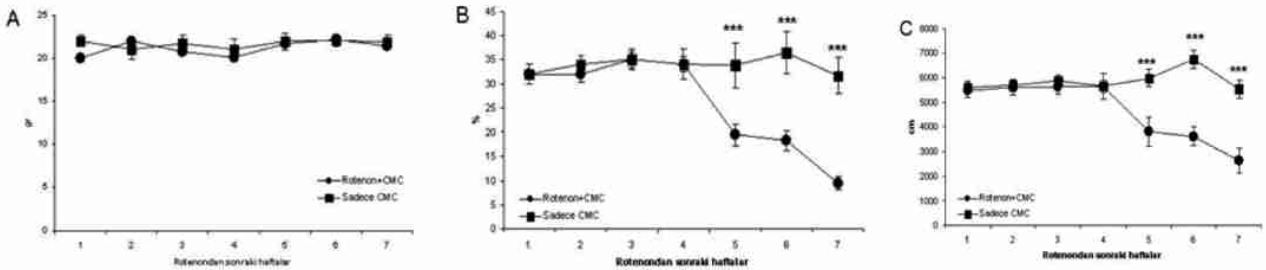
Sonuçlar

Klinik Bulgular

Rotenon uygulanan farelerde (27 fare) 5. haftadan itibaren rijidite ve bradikinezi bulguları gözlenirken (Şekil 1A,B) sadece CMC uygulanan farelerde (9 fare) nörolojik bulgu saptanmadı (Şekil 1C). Rotenon grupları ile CMC grubu arasında ağırlık açısından değişiklik görülmedi (Şekil 2A). Motor aktivite testinde ölçülen hareket yüzdesi ve hareket mesafesi değerleri rotenon grubunda zamana bağlı olarak giderek azalırken, CMC grubunda belirgin değişiklik gözlenmedi (Şekil 2B ve Şekil 2C). İki grup arasındaki farklar 5-7. haftalarda anlamlılığa ulaştı (tümü $p<0,001$). Bu bulgular, motor işlevlerin malabsorpsiyona bağlı olmadan haftalar içinde giderek kötüleştiğini düşündürmüştür.



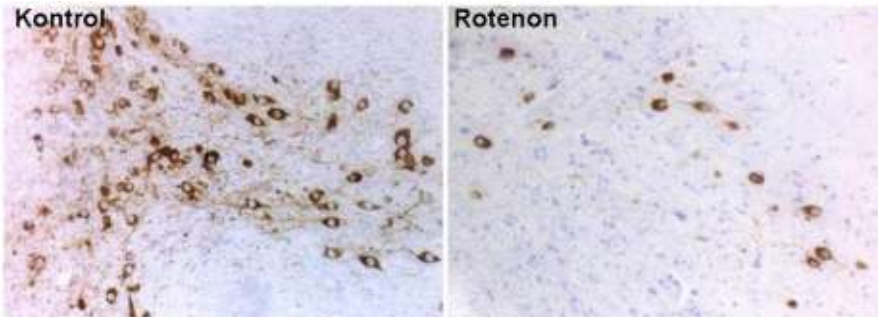
Şekil 1: Rotenon uygulanan farelerde ortaya çıkan rijidite (A) ve postür (B) değişiklikleri. CMC uygulanan farelerde nörolojik bulgu saptanmadı (C).



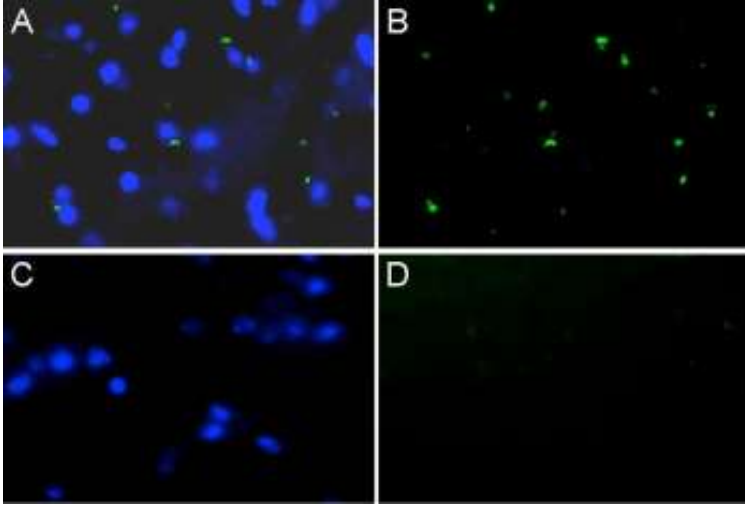
Şekil 2: Rotenon ve CMC uygulanan farelerde ağırlık (A), hareket yüzdesi (B) ve hareket mesafesi (C) değerlerinin karşılaştırılması. ***, $p<0,001$.

İmmünohistokimya ve TUNEL Boyama İle Dopaminerjik Nöron Kaybının Gösterilmesi

Rotenon modelinin doğrulanması amacıyla dopaminerjik nöronların dejenerasyonu immünohistokimya ile, nöronal apoptoz artışı ise TUNEL boyama yöntemi ile gösterildi. Rotenon uygulanan farelerde CMC uygulanan farelere göre TH pozitif nöronların SNpc bölgesinde belirgin derecede azaldığı görüldü (Şekil 3). TUNEL boyama yöntemiyle de rotenon uygulanan farelerde CMC uygulanan farelere göre apoptotik nöronların sayısında artış görüldü (Şekil 4).



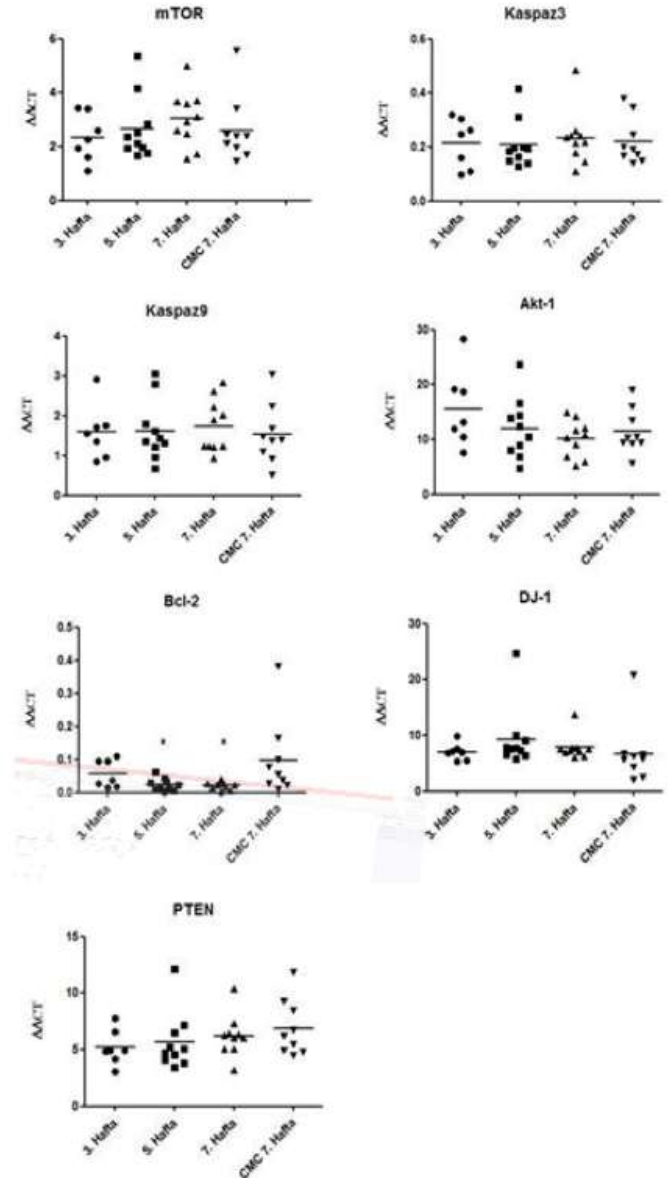
Şekil 3: SNpc'de TH pozitif hücreleri gösteren immünohistokimya çalışmasına ait temsili resim. Her fareden 20 kesit çalışılmıştır.



Şekil 4: Apoptotik nöronların rotenon uygulanan (A,B) ve CMC uygulanan (C,D) farelerin beyin kesitlerinde TUNEL boyama yöntemi ile gösterilmesi, mavi; DAPI ile zıt boyama, yeşil; apoptotik nükleuslar. Her fareden alınan 20 kesit üzerinde yapılan çalışmalara ait temsili resimler.

PI3K/Akt Sinyal Yolağı İlişkili Genlerin Ekspresyonu

Rotenon uygulanan farelerde Bcl-2'nin ekspresyonu zamana bağlı olarak giderek azalmıştır ($p < 0,01$). Gruplar arası karşılaştırmada Tukey post-hoc analizi 5. ve 7. haftalarda sakrifiye edilen farelerle CMC uygulanan farelerin Bcl-2 ekspresyonu arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Rotenon uygulamasının ilk haftalarında deney grubunda Akt-1'in ekspresyonu sağlıklı kontrollerden daha fazlayken ilerleyen haftalarda Akt-1 ekspresyonu giderek azalmıştır. PTEN ve mTOR'un ekspresyonlarında ise zamana bağlı artış görülmüştür. Kaspaz-3, kaspaz-9 ve DJ-1'in ekspresyonlarında ise önemli bir değişiklik görülmedi. Bu değişiklikler arasında sadece Bcl-2 ekspresyonu azalması istatistiksel olarak anlamlı idi (Şekil 5).



Şekil 5: Ekspresyonu çalışılan genlerin $\Delta\Delta CT$ değerlerinin haftalar içindeki değişimi, * $p < 0,05$; yatay çizgiler ortalama değerleri göstermektedir.

Klinik Parametrelerle Ekspresyon Parametreleri Arasında Korelasyon

PI3K/Akt yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyleri klinik parametrelerle karşılaştırıldığında mTOR ve kaspaz-3'ün genel olarak rotenon uygulamasının başlangıcında, Bcl-2 ekspresyonunun ise rotenon uygulamasının sonlarına doğru klinik parametrelerle korele olduğu bulundu. Ancak Bonferroni düzeltmesinden ($p < 0,0006$ anlamlı kabul edildi) sonra bu bulgular anlamlılığını kaybetmiştir.

Ekspresyon Parametrelerinin Birbiriyle Korelasyonu

Kaspaz-3, kaspaz-9, DJ-1, PTEN ve Akt-1'in gen ekspresyonları arasında doğru korelasyon varken, Bcl-2'nin hiçbir genle korelasyon göstermediği bulundu. Bu bulgu Bcl-2'nin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinde yer almaması ile ilişkilendirildi. Bonferroni düzeltmesinden ($p < 0,002$ anlamlı kabul edildi) kPTEN'nin DJ-1, kaspaz 9, kaspaz 3 ve mTOR ile, DJ-1'in Akt-1, kaspaz 3, mTOR ile, kaspaz 9'un kaspaz 3 ve mTOR ile ve son olarak kaspaz 3'ün mTOR ile korelasyonu anlamlılığını korumuştur (Tablo 1). Spearman korelasyon testi ile de benzer sonuçlar elde edildi (veriler gösterilmiyor).

Genler	p Değeri	R Değeri
Kaspaz-3 – mTOR	$1,09 \times 10^{-13}$	0,842
Kaspaz-9 – mTOR	$2,37 \times 10^{-07}$	0,664
Kaspaz-9 - Kaspaz-3	$1,55 \times 10^{-07}$	0,672
Akt-1- mTOR	0,005	0,374
Akt-1 – Kaspaz-3	0,013	0,327
Akt-1 – Kaspaz-9	0,009	0,344
DJ-1 – mTOR	$4,5 \times 10^{-10}$	0,760
DJ-1 - Kaspaz-3	$5,57 \times 10^{-08}$	0,690
DJ-1 – Kaspaz-9	0,0002	0,497
DJ-1 – Akt-1	$5,67 \times 10^{-05}$	0,538
PTEN – mTOR	$4,45 \times 10^{-09}$	0,729
PTEN – Kaspaz-3	$2,57 \times 10^{-10}$	0,766
PTEN – Kaspaz-9	$1,53 \times 10^{-08}$	0,711
PTEN – Akt-1	0,002	0,412
PTEN – Bcl-2	0,012	0,329
PTEN – DJ-1	$5,04 \times 10^{-09}$	0,727

Tablo 1: Ekspresyon parametrelerinin birbiriyle korelasyonu sonucunda elde edilen p ve R değerleri. Sadece Bonferroni düzeltmesi öncesinde p değeri 0,05'in altında olan karşılaştırmalar gösterilmektedir, Bonferroni düzeltmesinden sonra $p < 0,002$ olan değerler daha koyu gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Rotenon ile oluşturulan toksik hayvan modelinin, PH'nin klinik (rijidite, bradikinezi) ve patolojik (Lewy cisimi birikimi, alfa-sinüklein artışı vb) bulgularını diğer modellere oranla daha yakından taklit ettiği bildirilmiştir (27). Ayrıca önceki çalışmalarda ekspresyon düzeyleri araştırılan faktörlerle PH'nin klinik bulgularının ağırlığı arasında korelasyon olup olmadığı incelenmemiştir. Bu sebeple çalışmamızda PI3K/Akt yolağını regüle eden faktörlerin (PTEN, DJ1), Akt-1'in ve Akt-1'in aktive ettiği faktörlerin (Bcl-2, mTOR, kaspaz-3, kaspaz-9) ekspresyon düzeyleri farklı sürelerle (3, 5 ve 7 hafta) rotenona maruz bırakılan farelerin beyinlerinde araştırılmış ve farelerin klinik parametreleri ile ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir.

Rotenon uygulanan farelerde ağır rijidite, lokomotor aktivitede azalma ve bradikinezi gözlenmiş ve immünohistokimya ile TH düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar çalışmamızda PH modelinin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca, farelerin ağırlık değerlerinde azalma olmamasına rağmen motor aktivite parametrelerinin giderek kötüleşmesi gelişen nörolojik bulguların rotenona bağlı gelişebilecek gastrointestinal toksisite ile ilişkili olmadığını göstermektedir (28).

Çalışmamızda rotenon ile PH oluşturulan farelerde, kontrol farelerine oranla, Akt-1 ve Bcl-2 düzeylerinde zamana bağlı bir azalma gözlenirken, mTOR düzeylerinde zamana bağlı bir artış saptanmış ve diğer faktörlerin ekspresyon düzeylerinde

değişme görülmemiştir. Bu sonuçlar, PH olguları ve PH modelleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların rotenonun fare modeli için de geçerli olduğunu göstermektedir. PH olgularında, nörotoksik fare modeline benzer şekilde, ilerleyici dopaminerjik nöron kaybı sonucunda açığa çıkan reaktif oksidatif stres moleküllerinin ve mikroglial aktivasyon sonucunda ortaya çıkan toksik maddelerin birikmesi ile mitokondriyal solunum zincirinin baskılanması ve bunun da PI3K/Akt yolağının ekspresyonunda azalmaya yol açması mümkündür. Sağkalımdan sorumlu PI3K/Akt yolağının etkisiz hale gelmesi sonucunda dopaminerjik nöronlarda otofaji ve apoptoz mekanizmalarının harekete geçmesi ve bu şekilde nöron kaybının hızlanarak artması ve klinik bulguların ilerlemesi de beklenen bulgular arasındadır. Bu varsayımsal olaylar zincirinde, PH olgularında saptanan Akt-1 işlev eksikliğinin, yaygın nöron ölümüyle tetiklenme olasılığı yanında doğuştan gelen bir ekspresyon bozukluğuna bağlı olarak da gelişmesi mümkündür. PH olgularında Akt-1 geninde polimorfizm olduğunu gösteren bir çalışma ikinci görüşü destekler niteliktedir (29,30).

Akt-1 düzeylerinin farklı sürelerle rotenona maruz bırakılan farelerde ölçülmesi sonucunda, Akt-1 ekspresyonunun erken dönemde muhtemelen oluşan nörotoksisiteyi kompanse etmek amacıyla hafif yükseldiği ve izleyen haftalarda giderek azalarak kontrol farelerin düzeyinin altına indiği saptanmıştır. Bir PH hayvan modelinde ilk defa saptanan bu bulgunun PH olgularında da saptanması durumunda periferik kan hücrelerinde yapılacak Akt-1 ölçümlerinin hastalığın evresinin belirlenmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılması mümkündür.

Çalışmamızın rotenon hayvan modelinde ekspresyon değişimini gösterdiği diğer bir faktör de memeli hedef rapamisin (mTOR)'dir. Hücre çoğalması, proliferasyonu, motilitesi ve sağkalımında görev alan mTOR bir serin/treonine protein kinazdır (31). IGF reseptöründen gelen sinyalleri düzenleme ve entegre etme görevi bulunan mTOR'un diabetes mellitus, depresyon ve çeşitli kanser türlerinde ekspresyon değişikliğine uğradığı bilinmektedir (32). mTOR'un artmış ekspresyonunun nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı) otofajide azalmaya bağlı azalmış protein temizlenmesinden, proteinlerin yanlış katlanmasından ve dolayısıyla inklüzyon cisimlerinin birikiminden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmamızda mitokondriyal solunum zinciri kompleks I inhibitörü olan rotenonun uygulanmasının ardından mTOR'un zamana bağlı olarak ekspresyon artışı

göstermesi, bu proteinin üretiminin de artmış oksidatif stresle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. α -sinüklein mutasyonlu farelerde kurkuminin α -sinüklein birikimini ve PH'nin klinik bulgularını mTOR'u baskılayarak geriletmesi bu görüşü desteklemektedir (33). Çalışmamızda mTOR ekspresyonunun klinik bulguların belirmeye başladığı 3 ve 5. haftalarda kontrollerinki ile aynı olduğu ve 7. haftada kontrol değerlerinin üzerine çıktığı saptanmıştır. Bu da mTOR'un PH patogenezinin başlangıcında değil ilerleyen evrelerinde patogeneze rol oynamaya başladığını düşündürmektedir.

Başta apoptoz olmak üzere çeşitli programlı hücre ölümü mekanizmalarının PH patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Apoptotik hücre ölümünü düzenleyen intrinsek (mitokondriyal) ve ekstrinsek (reseptör aracılı) mekanizmalardan ikisinin de PH gelişiminde görev aldığı bilinmektedir (34). PH'da ekstrinsek yol Bcl-2, Bax ve Bcl-x1 gibi mitokondri ilişkili apoptotik proteinlerin ekspresyonunu etkileyerek, intrinsek yol ise Fas ve TNF reseptörü aracılığı ile kaspaz-3 ve 9'u etkinleştirmekte ve kaspazlar da kaspaz-aktive Dnaz (CAD) ve Poli-ADP riboz polimeraz (PARP) gibi nükleer faktörleri aktive ederek DNA fragmentasyonuna sebep olmaktadır (34). Bunların dışında mitokondri membranından nukleusa geçerek DNA fragmentasyonunu başlatan proteinlerin düzenlediği kaspazdan bağımsız apoptoz yolu da bulunmaktadır (35).

Çalışmamızın ilginç bir sonucu PI3K/Akt yolağı ile aktive olan apoptoz ilişkili kaspaz-3, kaspaz-9, mTOR ve Bcl-2 faktörlerinin ekspresyon düzeylerinin klinik parametrelerle korelasyon göstermesidir. PH gelişiminde apoptotik nöron ölümünün önemli rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. PH olguları ve PH modellerinde yapılan çalışmalarda olduğu gibi oluşturduğumuz rotenon hayvan modelinde de farelerin beyin örneklerinde apoptoz gelişiminin arttığı saptandı. Apoptoz parametreleri olan kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bcl-2 ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasında korelasyon olması apoptozun klinik progresyonda önemli yeri olduğunu göstermektedir.

PH'nin çeşitli toksik hayvan ve hücre soyu modellerinde Bcl-2 ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu azalmanın rotenon ile muamele edilen SH-SY5Y hücre soylarında oksitosin tedavisi ile, fare veya sıçan soylarında pramipeksol ve rasajilin gibi nörokoruyucu etkili dopaminerjik ajanlarla önlenmesi ve buna paralel olarak PH'nin biyokimyasal,

patolojik veya klinik bulgularının gerilemesi Bcl-2 aracılı mekanizmaların önemini göstermektedir (26,36,37). Özellikle rotenon uygulamasının ileri dönemlerinde Bcl-2 ekspresyonundaki azalma ile klinik kötüleşmenin paralel seyretmesi bu anti-apoptotik proteinin PH gelişimini önleme veya geciktirmedeki önemini doğrulamakta ve ayrıca bu proteinin PH'de bir prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu varsayımın PH olguları ile yapılacak çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Akt-1'in ve Akt-1'i regüle eden PTEN ve DJ-1'in düzeyleri ile klinik parametreler arasında korelasyon olmaması da önemlidir. Kaspazlar ve Bcl-2 gibi apoptoz faktörlerinin üretimi PI3K/Akt yolağı dışında çok farklı etkenlerle artıp azalabilmektedir. Akt-1 ekspresyonu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon bulunmaması ve Akt-1 ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonları arasında da göreceli olarak zayıf bir korelasyonun bulunması rotenon modelinde apoptoz gelişiminin Akt-1 yolağı dışındaki faktörlerin etkisi altında geliştiğini düşündürmektedir. Ayrıca kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerinin de klinik kötüleşmeye paralel olarak artış göstermemesi, rotenon modelinde, kaspaz dışı apoptotik yolların rol oynadığını gündeme getirebilir. Kaspaz dışı apoptoz faktörlerinden apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G-proteinlerinin, oksidatif stresin artması durumunda, mitokondriden nukleusa geçerek sitoplazmada kaspaz kaskadını aktive etmeden doğrudan etkiyle DNA fragmentasyonuna sebep oldukları gösterilmiştir (38,39). Her iki faktörün de PH'da patojenik öneme sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Deneylerimizin önemli bir özelliği SN veya mezensefalon örnekleri yerine tüm beyin örneklerinin kullanılmış olmasıdır. Saptanan ekspresyon değişikliklerinin mezensefalon ile sınırlı olmaması ve tüm beyinde yaygın olarak bulunması PH olgularında da benzer şekilde sağkalım yollarının aktivitesindeki değişikliklerin genel bir nöronal işlev bozukluğu yapabileceğini düşündürmektedir. PH olgularında sıkça rastlanan ve motor sistem tutulumuyla açıklanamayacak duysal yakınmaların, uyku sorunlarının, davranış değişikliklerinin ve sfinkter kusurunun santral sinir sistemini yaygın olarak etkileyen oksidatif stres artışı, mitokondriyal işlev bozukluğu, apoptoz ve sağkalım yollarının azalmış aktivitesi ile açıklanması mümkündür.

Çalışmamızın bir limitasyonu incelenen gen düzeyindeki ekspresyon değişikliklerinin western blot veya immünohistokimya ile konfirmasyonunun yapılmamış olmasıdır. Akt-1'in aktif fosforillenmiş formunun (p-Akt-1) ekspresyonunun western blot ile saptanması nöronal sağkalım çalışmalarında sıkça kullanılan bir yöntemdir. Özellikle p-Akt-1'in ve ayrıca rotenon uygulanan farelerde anlamlı ekspresyon değişikliği saptadığımız Bcl-2'nin protein düzeyindeki ekspresyonlarının ileriki çalışmalarda gösterilmesi sonuçlarımızın doğrulanmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda rotenon ile oluşturulan fare PH modelinde sağkalımla ilişkili proteinlerin ekspresyonları, diğer hayvan ve hücre modellerine benzer artma veya azalma paternleri göstermiştir. İncelenen parametreler arasında kontrol grubu ile en belirgin fark gösteren Bcl-2 düzeylerindeki azalmadır. Bu parametrenin rotenona maruz kalınan haftalar içinde motor aktivitedeki kötüleşmeye paralel bir şekilde azalması hem PH patogenezindeki rolünü desteklemekte hem de PH olgularında bir prognoz biyobelirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Apoptoz ile ilişkili diğer parametrelerden özellikle kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ekspresyon düzeylerinde kontrol ve rotenon uygulanan gruplar arasında fark bulunmamıştır. Ayrıca Bcl-2 ile diğer parametrelerin düzeyleri arasında korelasyon bulunmaması rotenon aracılı apoptozun altında kaspazdan bağımsız apoptoz faktörlerinin yattığını düşündürmektedir. Klinik parametreler ile korelasyon saptanan Bcl-2, mTOR, kaspaz-3 ve kaspaz-9'un PH olgularının doku örneklerindeki ekspresyonlarının çalışılması ile PH için yeni prognoz biyobelirteçlerinin bulunması mümkündür.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: 31109

KAYNAKLAR:

1. de Rijk, M. d., Tzourio C., ve ark. (1997). "Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 62(1): 10-15.
2. Van Den Eeden, S. K., Tanner C. M., ve ark. (2003). "Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity." *American Journal of Epidemiology* 157(11): 1015-1022.
3. Hirsch, E., Graybiel A. M., ve ark. (1988). "Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease." *Nature* 334(6180): 345-348.
4. Dias, V., Junn E., ve ark. (2013). "The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease." *Journal of Parkinson's disease*.
5. Cheng, C. M., Reinhardt R. R., ve ark. (2000). "Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(18): 10236-10241.
6. Huang, T.-J., Verkhatsky A., ve ark. (2005). "Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons." *Molecular and Cellular Neuroscience* 28(1): 42-54.
7. Kim, R. H., Smith P. D., ve ark. (2005). "Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(14): 5215-5220.
8. Yang, Y., Gehrke S., ve ark. (2005). "Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(38): 13670-13675.
9. Fallon, L., Bélanger C. M., ve ark. (2006). "A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling." *Nature cell biology* 8(8): 834-842.
10. Malagelada, C., Jin Z. H., ve ark. (2008). "RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation." *The Journal of Neuroscience* 28(53): 14363-14371.
11. Timmons, S., Coakley M. F., ve ark. (2009). "Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease." *Neuroscience letters* 467(1): 30-35.
12. Namikawa, K., Honma M., ve ark. (2000). "Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration." *The Journal of Neuroscience* 20(8): 2875-2886.
13. D'Astous, M., Mendez P., ve ark. (2006). "Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mice." *Molecular pharmacology* 69(4): 1492-1498.
14. Ruan, H., Yang Y., ve ark. (2009). "Neuroprotective effects of (±)-catechin against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity in mice." *Neuroscience letters* 450(2): 152-157.
15. Fukui, M., Choi H. J., ve ark. (2010). "Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death." *Free Radical Biology and Medicine* 49(5): 800-813.
16. Qin, R., Li X., ve ark. (2011). "Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against neurotoxicity induced by MPP+: The involvement of PI3K/Akt pathway activation." *Toxicology letters* 202(1): 1-7.
17. Dauer, W. ve Przedborski S. (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* 39(6): 889-909.
18. Tieu, K. (2011). "A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1(1).
19. Leung, K., Yung K., ve ark. (2007). "Neuroprotective effects of ginsenoside-Rg1 in primary nigral neurons against rotenone

toxicity." *Neuropharmacology* 52(3): 827-835.

20. Nakaso, K., Ito S., ve ark. (2008). "Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells." *Neuroscience letters* 432(2): 146-150.

21. Takeuchi, H., Yanagida T., ve ark. (2009). "Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models." *Journal of neuroscience research* 87(2): 576-585.

22. Steidinger, T. U., Standaert D. G., ve ark. (2011). "A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease." *Journal of neurochemistry* 116(3): 334-341.

23. Steidinger, T. U., Slone S. R., ve ark. (2013). "Angiogenin in Parkinson Disease Models: Role of Akt Phosphorylation and Evaluation of AAV-Mediated Angiogenin Expression in MPTP Treated Mice." *PloS one* 8(2): e56092.

24. Tönges, L., Frank T., ve ark. (2012). "Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease." *Brain* 135(11): 3355-3370.

25. Bao, X.Q., Kong X.C., et al. (2013). "Squamosamide derivative FLZ protected dopaminergic neuron by activating Akt signaling pathway in 6-OHDA-induced in vivo and in vitro Parkinson's disease models." *Brain research*.

26. Inden, M., Kitamura Y., ve ark. (2009). "Neuroprotective effect of the antiparkinsonian drug pramipexole against nigrostriatal dopaminergic degeneration in rotenone-treated mice." *Neurochemistry international* 55(8): 760-767.

27. Cannon, J. R., Tapias V., ve ark. (2009). "A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease." *Neurobiology of disease* 34(2): 279-290.

28. Lapointe, N., St-Hilaire M., ve ark. (2004). "Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity." *The FASEB journal* 18(6): 717-719.

29. Xiromerisiou, G., Hadjigeorgiou G. M., ve ark. (2008). "Association between AKT1 gene and Parkinson's disease: A

protective haplotype." *Neuroscience letters* 436(2): 232-234.

30. Ran, C., Westerlund M., ve ark. (2011). "Genetic studies of the protein kinase AKT1 in Parkinson's disease." *Neuroscience letters* 501(1): 41-44.

31. Brown, E. J., Beal, P. A., Keith, C. T., Chen, J., Shin, T. B., ve Schreiber, S. L. (1995). "Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo." *Nature* 377: 441-446.

32. Düvel, K., Yecies J. L., Menon S., Raman P., Lipovsky A. I., Souza A. L., ve ark. (2010). "Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1." *Molecular Cell* 39:171-83.

33. Jiang, H., Guo W., ve ark. (2005). "Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators." *Cell* 120(1): 123-135.

34. Alves da Costa, C. ve Checler F. (2011). "Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism?" *Cellular Signalling* 23(6): 963-968.

35. Chu, C. T., Zhu J. H., ve ark. (2005). "Apoptosis inducing factor mediates caspase-independent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in dopaminergic cells." *Journal of neurochemistry* 94(6): 1685-1695.

36. Fernández, M., Negro S., ve ark. (2011). "An effective novel delivery strategy of rasagiline for Parkinson's disease." *International journal of pharmaceutics* 419(1): 271-280.

37. Erbaş, O., Oltulu F., ve ark. (2012). "Amelioration of rotenone-induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment." *Peptides*.

38. Sevrioukova, I. F. (2011). "Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation." *Antioxidants and Redox Signaling* 14: 2545-2579.

39. Polster, B. M. (2013). "AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a "complex" problem." *Neurochemistry International* 62: 695-702.