



T.C.  
ACIBADEM  
MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞINDA NÖRONAL-LİPİT PROFİLİ  
DEĞİŞİMİ**

ELİF KADIOĞLU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2018

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji  
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı  
Tez Başlığı: Parkinson Hastalığında Nöronal-Lipit Profili Değişimi  
Öğrencinin Adı-Soyadı: Elif Kadioğlu  
Savunma Sınavı Tarihi: 16 / 08 / 2018

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Güldal Süyen

İmza

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar  
Üniversitesi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İmza

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar  
Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Çimen

İmza

Yeditepe Üniversitesi

Üye

Ünvanı, Adı-Soyadı

İmza

Kurumu

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez yukarıdaki jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Uğur Özbek

Enstitü Müdürü





T.C.  
ACIBADEM  
MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞINDA NÖRONAL-LİPİT PROFİLİ  
DEĞİŞİMİ**

ELİF KADIOĞLU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2018

## TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü : Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( x )  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Proje Sahibi : Elif Kadioğlu  
Proje Başlığı : Parkinson Hastalığında Nöronal-Lipit Profili Değişimi

Dönem Projesi tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Dönem Bitirme Projesi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	(a) Kurumu	İmza
Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Sağlık Bilimleri	

Yukarıdaki danışman kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../.....  
tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Uğur ÖZBEK

**i) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## BEYAN

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

31.07.2018

ELİF KADIOĞLU

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bilim dünyasında gün geçtikçe artan oranda görülen nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson Hastalığının araştırmaları artmaktadır. Çalışmada daha önce yapılmamış olan transgenik Parkinson, fare beyinlerinde erken dönemde görülen yağ asit değişim profili incelenmiştir.

Bu araştırma Jackson Laboratory'den alınan transgenik suş Parkin- Q311X line A'dan alınan transgenik deneklerle gerçekleştirilmiştir. Bu alışma Acıbadem Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda hayata geçirilmiştir. Laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı tüm çalışma arkadaşlarıma,

Örneklerimin toplanmasında katkıda bulunan Acıbadem Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı alışanlarına,

Tecrübesi, bilgi birikimi ve iş disiplini ile bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli tez danışmanım Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a,

İstatistiki çalışmalarda ve analiz süresince çok değerli desteğinden dolayı Prof. Dr. Muhittin Serdar'a,

Eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi her zaman destek olan, aldığım kararlara saygı duyup daima yanımda olan aileme ve beni motive eden arkadaşlarıma en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMA VE SİMGELER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	1
SUMMARY .....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Alfa Sinüklein .....	5
2.1.1. Anormal Alfa-Sinükleik Mekanizmaları.....	8
2.1.2. PH ve lewy cisimleri .....	8
2.1.3. Lewy cisimcikleri.....	9
2.1.4. Zar lipitleri ve lewy cisimcikleri ilişkisi .....	10
2.1.5. Lipid metabolizması ve PH.....	11
2.1.6. Lewy cisimcikleri ve lipidler .....	13
2.2. Parkin-Q311X .....	14
2.2.1. Gaz Kromatografisi.....	14
2.2.2. Gaz kromatografisi bölümleri .....	15
2.2.3. Gaz kromatografisinden elde edilen yararlar .....	16
2.3. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) .....	18
2.4. GC Kolunu Seçimi .....	18
2.4.1. Kolon I.D .....	19
2.4.2. Film kalınlığı.....	19
2.4.3. Kolon uzunluğu.....	20
2.4.4. SP®-2560 Kapiler GC kolonu .....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1. Üretim Kafeslerinin Oluşurulması: .....	21
3.2. Genotipleme .....	21
3.3. Doku Örneklerinin Toplanması.....	21

3.4. DNA İzolasyonu.....	22
3.5. PCR .....	22
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....	24
3.7. Hayvanların Davranış Testleri: .....	25
3.7.1. Açık alan testi (Open-Field) protokolü .....	25
3.7.2. Rota-rod protokolü .....	26
3.8. Hayvanların Anestezisi, Kardiyak Perfüzyonu ve Beyin Dokusunun Çıkarılması: .....	27
3.9. Lipid Ekstrasyonu için Hazırlanan Solüsyonlar.....	28
3.10. Lipid Ekstraksiyonu .....	28
3.11. Supelco 37 FAME Mix Hazırlanması.....	29
3.12. Yağ Asitlerinin Metillenme Protokolü.....	30
3.13. GC/FID Protokolü.....	30
4.BULGULAR .....	31
4.1. Davranış Testleri .....	31
4.2. GC-FID Analiz Sonuçları .....	35
5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....	47
KAYNAKLAR .....	56
EKLER.....	68
ÖZGEÇMİŞ .....	70

## KISALTMA ve SİMGELER

<b>PH</b>	: Parkinson Hastalığı
<b>LC</b>	: Lewy Cisimcikleri
<b><i>αsyn</i></b>	: Alfa Sinüklein
<b>rPH</b>	: Rastlantısal Parkinson Hastalığı
<b>LCD</b>	: Lewy Cisimcikleri ile Demans
<b>GC</b>	: Gase Chromotography
<b>GC-FID</b>	: Gase Chromotography and Flame Ionization Detector



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. $\alpha$ -sinüklein yapısı .....	8
Şekil 2.2: Nöronal hücre ve lipid kompozisyonunun $\alpha$ syn ve LC ile olan etkileşimi	11
Şekil 2.3. Lipid moleküllerinin temsili yapıları in-vitro ve <i>in vivo</i> $\alpha$ syn agregasyonunu etkileri .....	12
Şekil:2.4. GC cihazı görüntüsü .....	17
Şekil 3.4. Açık alan testi düzeneği .....	26
Şekil 4.1. Open field test sonucu.....	32
Şekil 4.2. Parkinson hastalığı fare modeli, açık alan testi sonuçlarına göre oluşturulan grafikler .....	33
Şekil 4.3. Parkinson hastalığı fare modeli Rota-rod davranış testi sonuçları.....	35
Şekil 4.4. 1 aylık plm ve park korteks fame değişimi.....	38
Şekil 4.5. 1 aylık plm ve park serebellum fame değişimi .....	39
Şekil 4.6. 3 aylık plm ve park korteks fame değişimi.....	40
Şekil 4.7. 3 aylık plm ve park serebellum fame değişimi .....	41
Şekil 4.8. 6 aylık plm ve park korteks fame değişimi.....	41
Şekil 4.9. 6 aylık plm ve park serebellum fame değişimi .....	42
Şekil 4.10. 12 aylık plm ve park korteks fame değişimi.....	43
Şekil 4.11. 12 aylık plm ve park serebellum fame değişimi .....	44
Şekil 4.12. cis-10 pentadekenoik asit hasta ve sağlıklı fare korteks değişimi .....	44
Şekil 4.13. cis-10 heptadekenoik asit fare korteks değişim .....	45
Şekil 4.14. methyl palmiotealate fare korteks fame değişimi .....	46
Şekil 4.15. methyl palmitate fare korteks fame değişimi.....	46

## TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Parkinson hastalığı modeli deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan primer dizileri.....	23
Tablo 3.2. Parkinson hastalığı modeli hayvan DNA'larının PCR reaksiyon bileşenleri .....	24
Tablo 3.3. PCR reaksiyon aşamaları .....	24
Tablo 3.4. Deney grupları ve sayıları.....	28
Tablo 4.1. Rota-rot testi sonucu .....	34
Tablo 4.2. Supelco 37 FAME mix kompozisyonu ve pik alanları.....	35



## ÖZET

Parkinson hastalığı, dopaminerjik nöronların dramatik kaybı ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Parkinson hastalığının tremor ve hareket bozuklukları gibi ana belirtileri, substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonunun sonucudur. Parkinson hastalığı nöropatolojisinin altında yatan yaygın kabul gören alt hücrel faktör, toplanmış  $\alpha$ -sinüklein karakteristik eklemeleri olan Lewy cisimlerinin varlığıdır. Bu küçük çözümlü protein, fosfolipit zarları ve serbest yağ asitleri ile bir dizi etkileşimde rol oynadığı gösterilmiştir. Beyin lipidlerinin  $\alpha$ -sinüklein ile etkileşimi, Parkinson hastalığının patogeneğinde önemli bir rol oynayabilir. Bu amaçla daha önce denenmemiş olan parkin-Q311X transgenik suş 1,3,6 ve 12 aylık deneklerin beyin bölgesinin korteks ve cerebellum bölgelerinde ki yağ asit profili incelenmiştir. Davranış testlerinde park farelerin kontrol plm farelerine göre hareket ve koordinasyon becerilerinde düşüşler görülmüştür. Her örnekten (n=3) lipid ekstraksiyonu yapılarak kullanılan Supelco 37 FAME mix standardıyla karşılaştırma sonucunda yağ asit profillerine yağ asitlerinin metil esterlerine dönüştürülerek belirlenmiştir. Tüm analizler yağ asidi deneylerinde sıkça kullanılan GC-FID cihazıyla yapılmıştır. Çalışma sonucunda 1 aylık farelerde çok önemli değişimler olmamasına rağmen 3, 6 ve 12 aylık farelerin yağ asit profilinde önemli değişimler görülmüştür. Özellikle cis-10 heptadekenoik ve cis-10 pentdekenoik asit değişimlerinde de kontrole göre önemli farklılıklar görülmüştür. Kontrole göre transgenik deneklerde bu yağ asitlerinin seviyesinde azalma görülmektedir. Ayrıca anti-enflamatuar etkisi olduğu bilinen metil palmitatın kontrole göre oldukça düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Metil palmitoleatenin sitoprotektif etkisiyle park farelerde büyük bir ivme gösterdiği görülmüştür. Parkinson farelerde enflamatuar sürecinde belli moleküller tarafından bu inhibisyonun engellendiği söylenebilir.

Parkinson hastalığının transgenik farelerde belirtilerinin 24üncü ayda başladığı göz önüne alınırsa bu çalışmamız Parkinson hastalığında erken evrelerde teşhisin konulabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** GC- FID, Parkin-Q311X, yağ asiti metil esterleri

## SUMMARY

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease characterized by dramatic loss of dopaminergic neurons. The main indication of Parkinson's disease, such as tremor and movement disorders, is the result of degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. The commonly accepted subcellular factor underlying Parkinson's disease neuropathology is the presence of Lewy bodies, which are aggregated  $\alpha$ -synuclein characteristic joints. This small soluble protein has been shown to play a role in a number of interactions with phospholipid membranes and free fatty acids. Interaction of brain lipids with  $\alpha$ -synuclein may play an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease. For this purpose, the fatty acid profile of the cortex and cerebellum regions of the brain region of parkin-Q311X transgenic strain 1, 3, 6 and 12 months old subjects, which had not been previously tested, was examined. Behavioral tests showed that park mice had decreased movement and coordination skills compared to control mice. The Supelco 37 FAME mix standard used for lipid extractions from each sample ( $n = 3$ ) was determined by converting fatty acids to methyl esters into fatty acid profiles as a result of the comparison. All assays were performed with the GC-FID instrument commonly used in fatty acid assays. The study showed significant changes in the fatty acid profile of the 3, 6 and 12 month old mice, although there were no significant changes in the 1 month old mice. Significant differences were also observed in cis-10 heptadecenoic acid and cis-10 pentdenoenoic acid changes compared to the control. There is a decrease in the levels of these fatty acids in transgenic subjects compared to controls. In addition, methyl palmitate, known to be anti-inflammatory effect, has been found to be at a significantly lower level than the control. The cytoprotective effect of methyl palmitoleate has shown a great acceleration in park mice. It can be said that this inhibition is inhibited by certain molecules in the inflammatory process in Parkinson's mice.

Given that symptoms of Parkinson's disease in transgenic mice begin at the 24th month, our study suggests that early diagnosis of Parkinson's disease can be made.

**Key Words:** GC-FID, Parkin-Q311X, fatty acid methyl esters

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından (AH) sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır ve 65 yaşındaki dünya nüfusunun % 1'den fazlasını etkiler. PH, orta beyindeki substantia nigra pars compacta'da dopaminerjik nöronların progresif olarak kaybedilmesi ile karakterizedir (1).

Hastalığın nöropatolojik açıdan belirgin özelliği, beyinde yaygın olarak ifade edilen küçük bir protein olan  $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ syn), içeren Lewy (body) cisimleri (LC) ve Lewy nevitleri (LN) olarak adlandırılan intrasitoplazmik inklüzyonların varlığıdır (2). LC'lerin ana bileşeni,  $\alpha$ syn, beyinde yaygın olarak ifade edilen küçük bir proteindir.  $\alpha$ syn geni SNCA, kromozom 4q22.1 üzerinde bulunur; SNCA'ya bağlı PH, nispeten erken başlangıçlı bir otozomal dominant kalıtım paterni gösterir ve genellikle hızlı bir şekilde ilerlemektedir (2).

Patolojik olarak PH, nöronlarda nigral hücre kaybı ve Lewy patolojisi ile karakterizedir. LC yuvarlak, eozinofilik, intrasitoplazmik nöronal inklüzyonlardır. LC ana bileşimi  $\alpha$ syn yapılarıdır.  $\alpha$ syn ise, oldukça korunmuş 140 amino asitli bir nöronal proteindir.  $\alpha$ syn genindeki nokta mutasyonlar, nadir görülen otozomal dominant ailesel PH formlarına neden olur. *In vitro* deneyler membran lipid kompozisyonunun  $\alpha$ syn konformasyonunu etkilediğini göstermektedir.  $\alpha$ syn'in konformasyonel değişikliği Lewy patolojisinde kritik olduğu düşünülmüştür (1). Bu nedenle nöronal mebranların lipid kompozisyonundaki değişiklikler PH patogenezinde önemli olabilir (2).

LC mekanizması halen bilinmemekle birlikte,  $\alpha$ syn davranışındaki değişikliklerin bu süreçte kritik olduğu görülmektedir.  $\alpha$ syn, etkileştiği membranlardaki lipid kompozisyonuna bağlı olarak farklı davranır; bu nedenle nöronal zarların değiştirilmiş lipid kompozisyonunun Lewy patolojisine yol açabileceğini varsayılabilir (3).

Hücrel membranlardaki lipid kompozisyonu, Parkinson hastalarının beyinlerinde sürekli olarak değişir ve Lewy patolojisi, enzimlerdeki mutasyonlarla birlikte birçok

insan lipidozunun ortak bir özelliğidir (4). Fabelo ve ark 2011 yılında PH ve rastlantısal Parkinson (rPH) hastalığı insan deneklerinde normal, erken motor aşamalardan insan frontal korteksindeki lipid sallarını artırmış ve lipit kompozisyonlarını analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda PH ve rPH kortekslerinde ki lipid sallarının, n-3 ve n-6 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin, bilhassa dokosaheksaenoik asit (DHA) ve araşidonik asit( AA) içeriklerinde dramatik düşüşler sergilediği gözlemlenmiştir (5). Farmer ve ark. (2) ise, sıçan PH'nın erken evre modeline 6-OHDA tabi tutulmuş sıçanların substantia nigra bölgesinde görülen lipid profillerini analiz etmişlerdir. Buna ilaveten HPLC-ESI-MS / MS kullanılarak PC, lizoPC ve SP'nin göreceli miktar ve yapısını karşılaştırmışlardır. Marin R ve ark'nın 2016 senesinde yaptığı son analizde Lewy cisimcikleri ile demans (LCD)'nin frontal korteksindeki lipid sallarında lipit kompozisyonu ve protein dağılımının değerlendirilmesi yapılmış ve LCD, PH ve AH'daki gözlemleri karşılaştıran bir meta-analiz gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak LCD'dan gelen lipid sallarının, n-3 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (esas olarak dokosaheksaenoik asit), plazmalojenler ve kolesterolün düşük seviyeleri ve peroksidabilite indeksleri dahil olmak üzere anormal lipid profilleri sergilediğini ortaya koymuşlardır (6).

Parkinson hastalarının beyinlerindeki nöronal membranlardaki lipid kompozisyonu değişmektedir. Nöronal membranlardaki lipid kompozisyonundaki değişiklikler, muhtemelen LC oluşumuna neden olabilir (7). Membran lipidleri, LC oluşumunu önlemek için terapötik hedefler olabilir. Bu çalışmada Parkinson hastalığı modeli olan Parkin-Q311X fare modelinde erken evre Parkinson hastalarındaki serebellum ve korteks bölgesinde ki membran-lipid profili değişimi daha önce literatürde yapılmamış yöntem olan GC/FID yöntemi ile incelenerek hastalığın tedavisine yardımcı olmak istenmektedir (8).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alfa Sinüklein

$\alpha$ syn , genetik ve nöropatolojik olarak PH'na bağılı presinaptik nöronal bir proteindir.  $\alpha$ syn ilk olarak 1990'lı yılların başında Alzheimer hastalarında amiloid plaklarının ultrastrüktürel çalışması sırasında insan beyin dokusunda tespit edilmiştir (9). SNCA geni, sulu solüsyonlarda tanımlanmış bir yapıya sahip olmayan 140 amino asitlik bir proteini kodlar; dolayısıyla "doğal olarak açılmış protein" terimi bu gen için kullanılır.

Bununla birlikte  $\alpha$ syn , hücrel membranlarda bulunan fosfolipidler gibi negatif yüklü lipidlere bağlanma üzerine  $\alpha$ -heliks yapılar oluşturur ve uzun süre inkübasyon süresince  $\beta$  –tabakası bakımından zengin yapılar oluşturur. Protein üç ayrı bölgeden oluşur:

1. Membran bağlanmasında  $\alpha$ -helikonik yapılar oluşturma eğiliminde olan amfifilik helisler oluşturacağı tahmin edilen, apolipoprotein lipit bağlama motifleri içeren bir amino terminüsü (artıklar 1 - 60 kalıntıları)
2.  $\beta$ -tabakası potansiyelini sağlayan NAC adı verilen merkezi bir hidrofobik bölge (61-95)
3. Son derece negatif yüklü olan ve yapılandırılmamış olma eğiliminde olan bir karboksil terminüsü (10).

Sinükleinler alfa-, beta- ve gama sinükleini içerir ve esasen nöronlarda eksprese edilen küçük çözümlür proteinlerden oluşan bir ailenin yanı sıra diğler dokulardaki daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar.  $\alpha$ syn ilk olarak 1990'lı yılların başında Alzheimer hastalarında amiloid plaklarının ultrastrüktürel çalışması sırasında insan beyin dokusunda tespit edildi. Bir amiloid preparatında amino asit dizisinin ayrıntılı analizi, zaten bilinen amiloid- $\beta$  protein parçasına ilaveten ikinci bir bileşen ortaya koymuştur. Buna alfa-beta dışı bileşen (NAC) adı verilmiştir (10).  $\alpha$ syn, SNCA

geninin alternatif olarak eklenmesinin bir sonucu olarak birkaç izoforma sahiptir. *αsyn* 140, tüm transkripti temsil eder ve ana varyanttır (11).

N-terminal helezonu, membranlara *αsyn* bağlayan ve lipoprotein kompleksleri oluşturan lipid affinitesi ile karakterize edilirken, hidrofobik orta bölge, çözünmeyen *αsyn* monomerlerinin çözünmez oligomerler ve polimerlere agregasyonunu teşvik edebilecek moleküllerarası etkileşime yatkındır (şekil 1) (12). Bu bölgenin silinmesi veya bozulması bu anormal toplanmayı bloke eder. C-terminal yükü, *αsyn* agregasyon kinetiğini niteliksel olarak etkiler. Negatif amino asit kalıntılarındaki içeriği ne kadar fazla olursa, *αsyn* agregasyon hızı o kadar düşük olur ki bu da orta bölgenin proagregasyon potansiyeline karşı koyar (13).

Parkinson hastalığında ilerleyici dopaminerjik nöron kaybına, nöronal somata (Lewy cisimleri) ve dendritlerde (Lewy nevitleri) bulunan filamentöz inklüzyonlara sitoplazmik protein *αsyn* 'in polimerizasyonu eşlik eder (14). Birçok rapor *αsyn* 'nin lipidlerle etkileşebileceğini göstermektedir (14,15) *αsyn* proteinini, çözünmeyen,  $\beta$ -tabakaya zengin filamentli toplanmalara dönüştürerek, bu grup bozuklukların sitopatolojik özelliklerinden olan LC'ne ve LN'ne intranöronal depolanmasına neden olur (15).

Biyofizik çalışmalar, *αsyn* 'nin "doğal olarak açılmış" olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, *in vitro* asidik fosfolipid veziküllere bağlandığı zaman, bir *αsyn*, önemli bir konformasyonel değişikliğe uğrar ve bir sarmal yapıya neden olur (16). *αsyn* 'nin fosfolipidlerle olan etkileşimleri, sınıf A2 apo-lipoproteinlerinin amfipatik, lipid bağlayıcı  $\alpha$ -helikslerine dizilim homolojileri içeren N-terminal bölgesi tarafından sağlanır (16,17). Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ile olan etkileşimleri, oligomerleşmesini ve daha da toplanmasını hızla ve dinamik olarak etkileyebilir (18, 19). Birincil yapısı, membranlara subselüler dağılımı ve lipid bağlanmasında yapısal değişiklik göz önüne alındığında, *αsyn*, hala tanımlanmamış fizyolojik fonksiyonunun bir parçası olarak lipidlerle etkileşime girer gibi görünmektedir (20). Örneğin, *αsyn* membran lipid regülasyonunda ve zar ticaretinde bazı araştırmalarla ilişkilendirilmiştir (21).

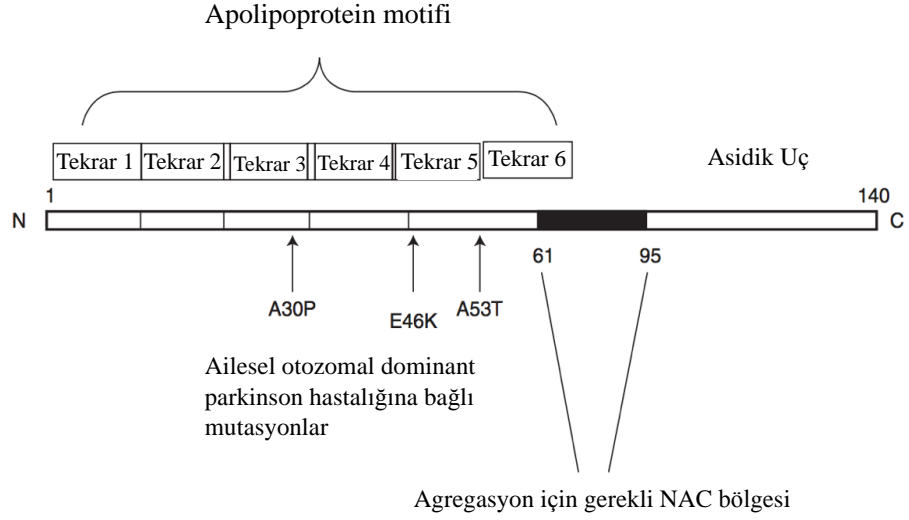
Birçok çalışma, *αsyn* ekspresyonunun yağ asidi (YA) alımını ve metabolizmasını etkilediğini yakın zamanda göstermiştir (22, 24). Spesifik olarak, belirli PUFA'lardaki azalmalar ve belirli doymuş yağ asidi (DYA) düzeylerindeki

artışlar, *asyn*<sup>-/-</sup> fare beyinlerinin fosfolipidlerinde tespit edildi. Dahası, nötr lipitlerin kararlı durum kütlesi, *asyn*<sup>-/-</sup> farelerin beyinlerinde artar (24). YA regülasyonunda *asyn* için bir rolü olduğuna dair kanıtlara ek olarak, *asyn* geninin, sıçanlarda PUFA bakımından zengin diyetlere tepki olarak düzenlendiği bildirilmiştir (25). *asyn* gen duplikasyonu veya triplikasyonu ve sonuçta *asyn* aşırı ekspresyonunun ailevi PH'ye neden olduğu gerçeği bağlamında, PUFA'lardaki nitel veya niceliksel değişikliklerin *asyn* ekspresyonu ve / veya agregasyon üzerindeki etkisiyle PH için risk faktörleri olabileceği düşünülmektedir (26).

Bazı çözünür oligomerler ve çözünmez agregatlar dahil olmak üzere yüksek moleküler ağırlıklı gruplarda *asyn* birikimi beyin PUFA bileşiminde değişikliklerle birlikte görülürken tekli doymamış yağ asidi (MUFA) veya doymuş yağ asidi (SFA)'da değişiklik yapılmadığı öne sürülmüştür (14). Değişik PUFA bileşiminin PH veya demanslı hastaların beyinlerinde, *asyn* ekspresyonu ve yüksek moleküler ağırlıklı birikimler olarak birikimi olan LC ile ilişkilendirilmesi için yapılan bir girişimde, *asyn* 'i ifade eden mesencefalik dopaminerjik hücrelerdeki YA profillerini incelemiş ve *asyn* aşırı ekspresyonunda membran fraksiyonlarında olduğu gibi yüksek hızlı sitoplazmalarda PUFA birikimlerini bulmuşlardır (14). Burada sunulan gözlemlerle ilgili çözümlenmemiş bir soru, *asyn* 'nin fosfolipidler gibi daha karmaşık lipidler içerisinde bir araya getirilen serbest YA veya YA ile etkileşim etkileşmediğidir. Hücrelerde, YA'ler fosfolipid membranlara ve YA-bağlayıcı proteinlere (FABP'ler) bağlıdır (27).

Serbest sitozolik YA konsantrasyonları genellikle düşük, yani nmol/L aralığındadır. Onları düşük tutan ana bir kuvvet, bir YA'nın bir hücreye girmesinden birkaç dakika sonra YA karboksil grubu ile koenzim A'nın tiyol grubu (yağlı asil-KoA üreten) arasında bir tiyoester bağının oluşumudur (28). Esterlenmiş YA'ler, daha sonra, mitokondri ve peroksizomlar ile enerji üretiminde tüketilir veya başka şekilde lipidlerin sentezi için kullanılır. YA'lerin hücre zarlarını belirli protein taşıyıcıları vasıtasıyla aktif olarak veya YA membranından flipflop yoluyla sürekli olarak geçtiği varsayılır (29). FABPs benzer şekilde, *asyn* hücrel YA alımı ve metabolizmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür. Spesifik olarak, C14:0, C16: 0 ile infüze edilen farelerde değişmiş YA alım ve metabolizması gözlemlenmiş ve azaltılmış n-6 PUFA'lar ile karakterize edilen değiştirilmiş açıl yan zincir

kompozisyonu ve artmış SFA kompozisyonu, bazı S<sup>-/-</sup> farelerin fosfolipidlerinde gözlenmiştir (24, 30). Bu bağlamda, *αsyn*, klasik FABP'lerle benzer fakat benzer olmayan şekilde YA'lerle ilgilidir, ancak genel olarak ve özellikle YA'li lipidler ile *αsyn* etkileşimlerinin doğasını anlamak için çok daha ileri biyokimyasal çalışma gerekmektedir. (30)



Şekil 2.1. *αsyn* yapısı (30)

### 2.1.1. Anormal alfa-sinükleik mekanizmaları

*αsyn*, esas olarak bozulmuş protein sınıfına aittir. Çevresel ajanlar (örn., nörotoksinler) ve genetik mutasyonlar,  $\alpha$  – *syn* yanlış katlanmasına neden olur (31). *αsyn*'ni kodlayan SNCA geninin alternatif birleştirme, farklı agregasyon potansiyeli olan bu proteinin farklı izoformlarının oluşumuyla sonuçlanır. mRNA translasyonu sonrasında daha fazla protein modifikasyonu fosforilasyon, ubiquitinasyon, nitrasyon ve translasyon ile gerçekleşebilir. Bütün bu değişiklikler, oligomer oluşumu ve birikimiyle sonuçlanabilir (32).

### 2.1.2. PH ve lewy cisimleri

Toplanmış *αsyn* LC'lerin başlıca bileşeni, PH nöropatolojik özelliğidir (33, 34). Orta beyinde bulunan substantia nigra'nın yanı sıra, LC de vagusun sırt motoru çekirdeği, Meynert çekirdeği bazalis, locus coeruleus ve PH'nin sonraki evrelerinde

beyinde daha diffüz olarak diğer beyin bölgelerinde bulunur. LC 5-25 mikron çapında ve çevreleyen bir haloya sahip yoğun bir eozinofilik çekirdeğe sahiptir (28). LN, LC'ne cisimciklerine benzer filamentler içerirler. SNCA genindeki nokta mutasyonlar ve çarpımlar otozomallığa neden olur (33).

### 2.1.3. Lewy cisimcikleri

PH'nin patolojik belirteçleri, striatumda dopamin eksikliğine neden olan substantia nigra pars compactada dopaminerjik nöronların kaybedilmesi ve kalan nöronlarda Lewy cisimleri olarak bilinen intrasitoplazmik eozinofilik inklüzyonların varlığıdır. LC ve LN esas olarak *αsyn*'den oluşan fibriller içerir (34). *αsyn*'in konformasyonel değişimi, LC oluşumunda kritik olay olarak düşünülür (35). *In vitro* çalışmaları membranların lipit kompozisyonunun *αsyn* konformasyonunu etkilediğini göstermektedir (34). Membranlardaki lipit kompozisyonu PH beyinlerinde değişir.

LC yuvarlaklaşmış, eozinofilik, intrasitoplazmik nöronal kapanımlardır ve ilk olarak 1912'de FH Lewy tarafından tanımlanmıştır (36). Ultrastrüktürel olarak, klasik beyin sapı tipi LC, yoğun paketlenmiş bir çekirdekte granül elektron yoğun materyal ve vesiküler yapılarla ilişkili radyal olarak düzenlenmiş 7-20 nm ara filamentlerden oluşan granülofilamentöz yapılardır ve veziküler yapıları yoğun paketlenmiş bir çekirdekte ve radyal olarak düzenlenmiş 10 nm filamentlerden oluşan bir halo ile çevrelenmiştir (36, 37).

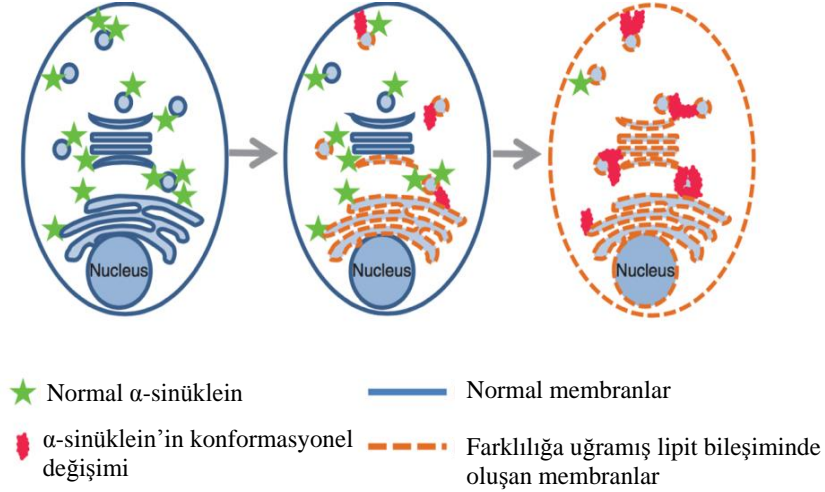
Kortikal tip LC zayıf ultrastrüktürel organizasyona sahiptir ve merkezi çekirdeksiz 7 - 27 nm filamentlerden oluşur (38,39). Konvansiyonel boyama ile tespit edilen LC daha sonra ubiquitin için immün boyama ile daha fazla hassasiyetle tespit edilmiştir (39). Bu bağlamda, LC ve / veya LN belirten bir terim Lewy patolojisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Lewy patolojisinin, parkinsonizme ek olarak PH'nin nonmotor belirtilerine katkıda bulunduğu önerilmiştir (40, 43). Bununla birlikte, Lewy patolojisi ile nöronal hücre kaybı arasındaki ilişkinin belirsizliğini dikkati çekmektedir. LC formasyonu yoğunluğu ile nöronal hücre kaybı arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (44). Bu kavram üzerinde tartışmalar olmasına rağmen, LC oluşumunun hastalığın vazgeçilmez bir patolojik süreci olduğu değişmez bir gerçektir.

Nöronal membranlardaki lipid kompozisyonundaki değişiklikler, muhtemelen LC oluşumuna neden olabilir. LC oluşumunu önlemek için membran lipidleri terapötik hedef olabilir. PH, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve otofajik stres gibi birtakım toksik bileşenlerin eş zamanlı eyleminin bir sonucu olarak gelişir (37).

#### **2.1.4. Zar lipidleri ve lewy cisimcikleri ilişkisi**

Yukarıda tarif edildiği gibi, *in vitro* deneyler zarların lipid kompozisyonunun *asyn* konformasyonunu etkilediğini göstermektedir. *asyn*'in konformasyonel değişimi, Lewy patolojisinde kritik olay olarak düşünülmüştür (45, 46). Bu nedenle nöronal zarların lipid kompozisyonundaki değişiklikler PH patogenezinde önemli bir adım olabilir. Fabelo ve ark. (46) otopsi yapılan PH beyinlerini araştırmış ve deterjana dirençli membranların (DRM'ler), sfingolipidler ve kolesterol açısından zenginleştirilmiş biyokimyasal olarak tanımlanmış lipid sallarının lipid kompozisyonundaki değişiklikler olduğunu bildirmiştir. DRM'leri insan frontal korteksinden arıtop lipid kompozisyonlarını analiz etmişlerdir.

N-3 ve n-6 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), özellikle de DHA (22:6n-3) ve AA (20:4n-6) içeriğinde dramatik düşüşler olduğunu tespit edilmiştir (47), ve PH'da kontrollerle karşılaştırılmıştır. Ayrıca, doymuş yağ asitleri (16:0 ve 18:0), kontrol beyinlerinden çok daha yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. PH'da fosfatidilserin ve fosfatidilinositol artarken, serebrosid, sülfatlanmış glikolipidler ve plazmalojen seviyeleri azaldığı görülmüştür (47). Özellikle, DRM lipid kompozisyonundaki değişiklikler, frontal kortekste, hatta Lewy patolojisi saptanmayan tesadüfen LBD'de de meydana gelmiştir. Bu, membranların değiştirilmiş lipid kompozisyonunun öncülüğünü ve *asyn* in konformasyonel değişimine neden olma ihtimalini artırır (şekil 2.2).

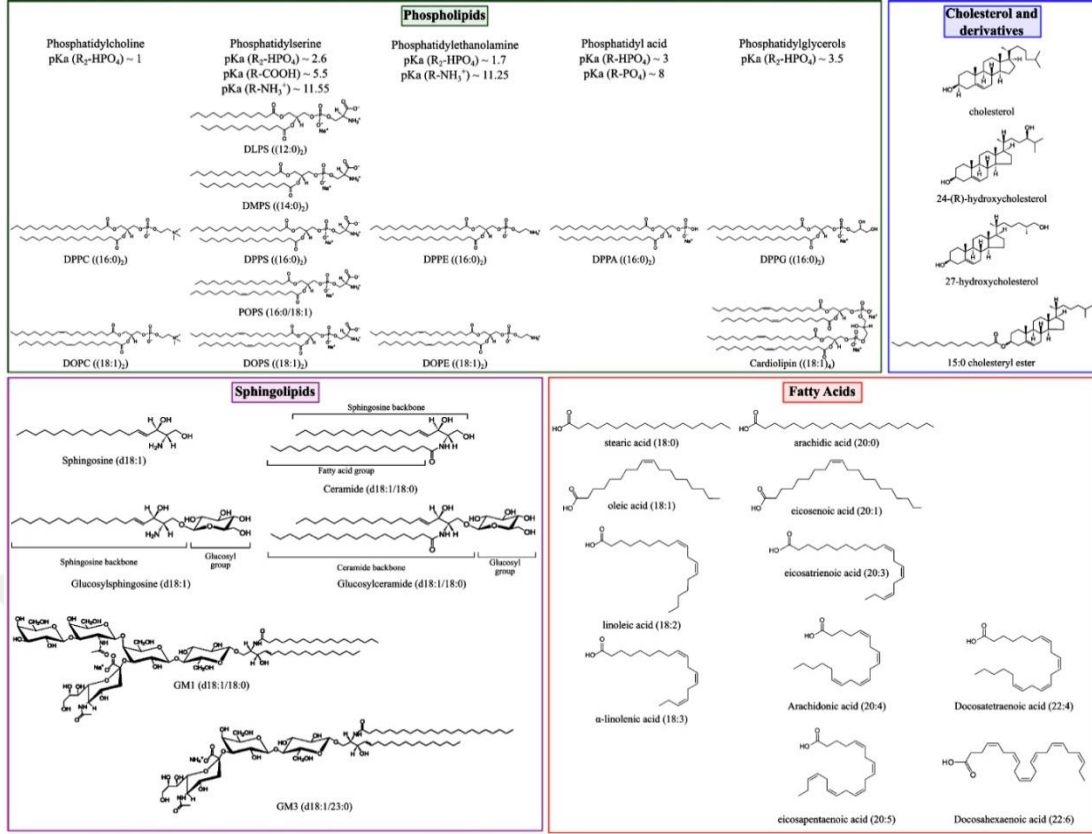


şekil 2.2. Nöronal hücre ve lipid kompozisyonunun  $\alpha$ syn ve LC ile olan etkileşimi (2)

Bir başka raporda PH'li hastaların ön singulat korteksinde seramid / sfingomiyelin düzeylerinde ve ail zincir uzunluklarında bir azalma olduğu belgelenmiştir (48).

### 2.1.5. Lipid metabolizması ve PH

$\alpha$ syn, esas olarak pre-sinaptik terminallerde bulunan ve birikimi, Parkinson hastalığı ve Lewy cisimcikli demans gibi bir dizi nörodejeneratif bozuklukla ilişkilendirilmiş, dağınık küçük bir proteindir (48).  $\alpha$ syn tam fonksiyonu henüz tanımlanmamış olmasına rağmen, proteinin biyolojik membranlar ve membran proteinleri ile etkileşime girmesi ve sinaptik plastisite ve nörotransmitter salınımında rol oynadığı düşünölmektedir (49). Özellikle, bir  $\alpha$ syn sinaptik yüzeyindeki veziköller bir multimeri oluşumu aracılığıyla *in vivo* ve *in vitro* olarak, SNARE kompleksinin düzeneğini teşvik ettiği bulunmuştur (50). Bu veziköller, yaklaşık 40 nm'lik bir çapa sahip küçük organellerdir (51). Sinaptik veziköllerin temelini oluşturan lipitler kolesterol, fosfolipitler (fosfatidilkolin (%32), fosfatidilserin (% 12), fosfatidiletanolamin (% 54), fosfatidilinositol (% 2)) ve sfingomiyelinlerdir (52). Biyolojik membranların lipid bileşimi bir organelden diğerine değişir ve oluşan lipit moleköllerini, hidrofobik hidrokarbon zincirlerinin doğasında esas olarak değişir.



Şekil 2.3. Lipid moleküllerinin temsili yapıları in-vitro ve *in vivo asyn* agregasyonunu etkileri (53)

Membranın fiziksel, kimyasal ve termotropik özelliklerinin, bir *asyn*'in bağlanmasının kuvvetini etkilediği ve proteinin, tercihen, negatif yüklü lipitlerden oluşan ve / veya lipit paketleme kusurları içeren ve/veya sıvı fazda membranlara bağlandığı gösterilmiştir (54, 55). Ek olarak, iyonik kuvvetteki bir değişikliğin veya zarın yüzeyindeki iyonik yoğunluğun azalmasının, *asyn* lipit bağlanmasının kuvvetinde bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (56, 57). Dahası, kationik moleküllerin veya diğer lipit bağlanma proteinlerinin katılması (58), vesiküllerin yüzeyindeki bağlanma yerleri için rekabet yoluyla *asyn* zarlara bağlanmasına yol açabilir (59).

Çeşitli amino asitler (örneğin, triptofan, histidin, tirozin), 5 ila 22 karbon atomlu yağ asitleri ve redoks metabolitleri seviyeleri PH hastalarının kanında bulunmuştur (60). Lipid veziküllerin *asyn* agregasyonunu hem *in vivo* hem de *in vitro* etkilediği mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Son yirmi yılda, bir *asyn* ile lipitlerin etkileşiminin doğası ve proteinin agregatın eğilimi arasındaki ilişkiyi açıklığa kavuşturmak için geniş çapta biyolojik ve biyofiziksel çalışmalar yapılmıştır

(60, 63). Gerçekten de, yağ asitleri, sfingolipidler, kolesterol türevleri dahil olmak üzere spesifik lipit seviyelerindeki değişiklikler, PH'nın farklı hücrel ve hayvan modellerinde ve ilişkili bozukluklarda artan çözünebilir ve birikmiş *αsyn* seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (64,65). Lipitlerin *αsyn* agregasyonunu etkilediği büyüklük, *αsyn*'in lipitlere ve genellikle iki parametreye bağlanmasının kuvvetiyle ilişkili bulunmuştur: lipitten protein oranı (L: P oranı) ve lipitlerin kimyasal özellikleri (66,67). L:P oranı kritik bir belirleyici faktör olarak gözükmemektedir: düşük lipit konsantrasyonları agregasyonu zorlarken, yüksek konsantrasyonlarda lipit agregasyonu engellemektedir (68).

Amiloidojenik *αsyn* proteini ve lipit membranları, PH'da anahtar bir patolojik mekanizmayı temsil edebilir. (69). Böyle bir etkileşimin iki önemli sonucu vardır. İlk olarak, biyomembran arayüzü *αsyn* 'nin agregasyonunu ve iki boyutlu membran yüzeyi üzerinde patojenik ara oligomerik türlerin oluşmasını desteklemektedir.

İkincisi, çözünür *αsyn* oligomerlerinin membranlarla etkileşimi, permeabilizasyon için çeşitli modelleri çağırır; bunlar arasında, genel bir membran incilmesi ve membran geriliminde artış, oligomerik amiloid gözeneklerin sokulması veya lipidik toroidal gözeneklerin oluşumu ve lipit ekstraksiyonu ile oluşan sızıntı yer alır (70).

### 2.1.6. Lewy cisimcikleri ve lipidler

PH'da nöronlar birkaç beyin bölgesinde ilerlerler. En çok etkilenenlerden biri substantia nigra, ve dejenerasyonu muhtemelen PH'nın motor semptomlarının çoğunun altındadır. Bu nöronlar, esas olarak *αsyn* içeren protein agregatları olan LC'ler olarak adlandırılan karakteristik eklemeleri içerir, ancak lipitler de mevcuttur (71,72).

*αsyn in vivo* normal fonksiyonu yeterince anlaşılmasa da, sinaptik vezikül geri dönüşümünü düzenlemede bir rol oynar gibi görünmektedir (73). Proteinin N-terminal kısmının protein – lipit etkileşiminden sorumlu olduğu öne sürülmektedir. Bu, aynı zamanda lipitleri tersinir şekilde bağlayan diğer proteinlerde bulunan kusurlu bir tekrar içerdiği için sekans tarafından da desteklenir (74).

Son yıllarda, *αsyn* ve lipit membranlar arasındaki etkileşim yoğun olarak incelenmiştir. İlginç bir şekilde, erken başlangıçlı mutasyonlara sahip

*αsyn* varyantları farklı membran bağlanma afinitesine sahiptir (75, 76). “Prion benzeri” hipoteze göre, yanlış katlanmış *αsyn*, alıcı hücrelerde nöronlar ve çekirdek agregasyonu arasında aktarabilir (77). *αsyn*'erin hücreler arası transferinin, küçük olan eksozomlara bağlandığında en etkili olduğu önerilmiştir (78, 79).

*αsyn* ve lipitler arasındaki etkileşimler, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak, amiloid fibrillerden, oligomerik türlerden (toksik ve toksik olmayandan hücrelere) ve karışık protein-lipid parçacıklarından oluşan çeşitli düzeneklerin oluşumuna yol açmaktadır (79,80). Esas olarak üç lipit sınıfı, yağ asitleri, steroller ve sfingolipidlerle patolojik etkileşimler ile ilişkili bulunmuştur (81). Bu sebeple bu çalışmada erken dönem Parkinson fare beyinlerinde ki korteks ve serebellum bölgelerindeki yağ asit profil değişimine bakmak hedeflenmiştir (82).

## **2.2. Parkin-Q311X**

Bu transgenik suş, değiştirilmiş bir Slc6a3-parkin-Q311X (bir FLAG etiketli mutant insan parkin geni) BAC taşır. Bu fareler, Parkinson hastalığının patogenezi ve nörodejenerasyonunu incelemek için kullanışlıdır (83).

Bu Parkinson hastalığının transjenik modeli, dopaminerjik nöronlarda mutant parkinin fizyolojik seviyelerine yakın olduğunu ifade eder. Q311X mutasyonu, sadece 155 amino asit uzunluğunda C-terminali kesilmiş parkin üreten bir nonesense mutasyondur. Özellikle, yaşlandıkça, hemizyöz fareler dopaminerjik nöronları kaybederler ve motor davranışlarında ilerleyici değişiklikler geliştirirler, bunlara düşük aktivite seviyeleri dahildir (83). Parkin-Q311X fareleri LC benzer inklüzyonlar geliştirmese de, orta beyinde cytoplasmic  $\alpha$ -synuklein birikir (84).

### **2.2.1. Gaz Kromatografisi**

Gaz kromatografisi, örneklerin bileşenlerini zamanında ayırmak, tanımlamak ve ölçmek için yaygın olarak uygulanır. Kromatografik yöntemde, maddeler iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan biri hareketli faz diğeri sabit faz olarak isimlendirilir. Karışımdaki her maddenin hareket hızı dağılma katsayısı ile belirlenir (85). Hareketli fazda daha çok dağılıma uğrayan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit fazda dağılımı yüksek olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Sabit faz, kolon olarak adlandırılan birbirine yakın gözenekli partiküllerdir. Hareketli faz ise bu partiküller

arasındaki boşluğu doldurur (85,86). Hareketli faz kolon boyunca maddeleri sürükler. Kolondan çıkan her maddenin konsantrasyonu pik olarak görülür, piklerin oluşturduğu tabloyada kromatogram adı verilir (87). Gaz kromatografisinde hareketli faz olarak gaz, sabit faz olarak da sıvı kullanılır (85,87). Gaz kromatografisi kimya alanında gazların ve uçucu maddelerin analizleri ve ayrılmasında uygun bir metod olarak yaygın kullanıma sahiptir. Kromatografinin en yaygın kullanım alanı kantitatif analizlerdir (88). Kromatografik pik altındaki alan mevcut madde miktarına karşılık gelmektedir ve pik alanları genellikle bir elektronik bilgisayar veri sistemi ile ölçülür. Kalitatif analiz de ise maddelerin bilinen alıkonma zamanları ile karşılaştırma yapılarak ölçülür (89- 91).

İlk olarak 1950'lerde kurulan gaz kromatografisi, birçok yerleşik uygulama ile olgun bir analitik tekniktir (91, 93). Bir gaz kromatogramındaki bileşenlerin tanımlanması, alıkonma süreleri, hacimleri veya oranları bir standart ile karşılaştırarak yapılır. Bununla birlikte, bu alıkonma özellikleri, deneysel koşullara, örneğin sütun sıcaklığındaki değişikliklere göre değişir (94).

Çeşitli örnek kaynaklarından türetilen yağ asitleri, uzun yıllardır yağ asidi metil esterlerine (FAME'ler) dönüştürüldükten sonra GC ile analiz edilmiştir. Günümüzde ayırma genellikle orta ila yüksek kutuplu kılcal sütunlarda sıcaklık programlı GC ile yapılır (93). Birçok uygulama için yağ asitlerinin analizi için kutupsal sütunların kullanılması, pozisyonel ve geometrik izomerlerin ayrılması için vazgeçilmezdir ve bu kolonların seçiciliklerini tanımlayan çok sayıda yayın bulunmaktadır. Sabit faz seçicilikleri saklama endeksleri ile tanımlanabilir ve FAME için en yaygın saklama endeksi sistemi eşdeğer zincir uzunluklarıdır (94).

### **2.2.2. Gaz kromatografisi bölümleri**

Inlets; Inlets (girişler), numunelerin GC'ye enjekte edildiği yerlerdir. Seçilen giriş tipi, yapılan analiz tipine, analiz edilen numunenin tipine ve kullanılan sütuna dayanır. Numuneler bir şırınga veya otomatik örnekleme cihazı kullanılarak enjekte edilebilir (95, 97).

GC kolonu ve fırını; GC kolonları, sıcaklık kontrollü bir fırının içinde bulunur. Genel olarak, kolonun bir ucu girişe bağlanırken, diğer uç detektöre bağlanır. Kolonlar uzunluk, çap ve iç kaplama olarak değişir. Her sütun farklı bileşiklerle

kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Kolonun ve fırının amacı, enjekte edilen numuneyi kolondan geçerken ayrı ayrı bileşiklere ayırmaktır. Bu işleme yardımcı olmak için GC fırını, numune akışını kolondan hızlandırmak üzere programlanabilir (96).

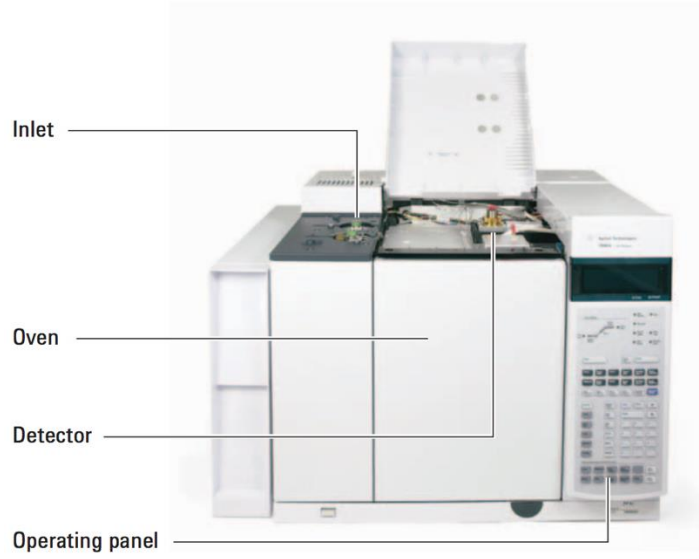
Dedektör; Dedektörler, kolondan çıkan bileşiklerin varlığını tanımlar. Her bir bileşik detektöre girdikçe, tespit edilen bileşik miktarına orantılı bir elektrik sinyali üretilir (97). Bu sinyal genellikle bir kromatogramda bir tepe noktası olarak gösterdiği bir veri analiz sistemine gönderilir. Tam bir dedektör seçimi (FID, TCD, NPD, FPD,  $\mu$ ECD, MSD, Üçlü Quadrupole MS ve ICP-MS) mevcuttur. Seçilen dedektör tipi, gerekli analiz tipine dayanır (98).

Ayrılmanın kesin olarak aynı şekilde tekrarlanabilmesi için üç kısmın sıcaklığının ayrı ayrı kontrol edilmesi gereklidir. Bunlar;

- Enjeksiyon kısmının sıcaklığı,
- Kolon sıcaklığı,
- Dedektör sıcaklığı (97)

### **2.2.3. Gaz kromatografisinden elde edilen yararlar**

Verilen numuneden elde edilen her pik ayrı bir maddeyi gösterir. Bu kromatografinin en önemli yönlerinden biridir. Bir maddenin saf olup olmadığının araştırılması; saflığı kontrol edilen madde birden fazla pik vermişse safsızlık var demektir. Piklerin altında kalan alanların birbirilerine oranı, madde ve yabancı maddenin karışıma oranı kadardır (99-101).



Şekil:2.4. GC cihazı görüntüsü (102)

Flame İyonizasyon Dedektörü (FID), gaz kromatografisinde (GC) en çok kullanılan dedektörlerden biridir. FID'de bir numune, bir hidrojen / sentetik hava akışında bir yanmaya maruz kalır (102). Ateşte iyonlar ve serbest elektronlar oluşur. Yüklü parçacıklar, dedektördeki iki elektrod arasındaki boşluğa ölçülebilir bir akım akışı üretir. Ortaya çıkan akım, saf taşıyıcı gaz ve tek başına yakıt gazı alevi tarafından üretilen sinyalden daha güçlüdür. Bu sinyal farklılığı, numune hakkında bilgi sağlar (103).

Flame iyonlaştırma dedektörleri son derece hassas ve geniş doğrusallık aralığına sahiptir. Parkinson hastalarının beyinlerindeki nöronal membranlardaki lipid kompozisyonu değişmektedir.

Nöronal membranlardaki lipid kompozisyonundaki değişiklikler, muhtemelen LC oluşumuna neden olabilir. Membran lipidleri, LC oluşumunu önlemek için terapötik hedefler olabilir. Bu çalışmada Parkinson hastalığı modeli olan Parkin-Q311X fare modelinde erken evre Parkinson hastalarındaki serebellum ve korteks bölgesinde ki membran-lipid profili değişimi daha önce literatürde yapılmamış yöntem olan GC/FID yöntemi ile incelenerek hastalığın tedavisine yardımcı olmak istenmektedir.

### 2.3. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME)

Bir dokunun yağlı asit kompozisyonunun belirlenmesi zor olabilir. Çünkü dokular, her biri çeşitli karbon zinciri uzunluklarına sahip, doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerinin karmaşık bir karışımını içerebilir. GC sütunları ve kimyasal standartlar gibi birçok özel ürün, yağ asitlerinin kantitatif tanımlanmasında kullanılmak üzere özel olarak mevcuttur (104).

GC, yağ asitlerini ya serbest yağ asitleri ya da yağ asidi metil esterleri olarak analiz etmek için kullanılabilir. Kısa zincirli, daha uçucu yağ asitleri tipik olarak serbest formda özel sütunlar kullanılarak analiz edilir (105). Yağ asitleri ayrıca yağlı asit metil esterleri olarak da analiz edilebilir. Ana nedenleri şunlardır:

- Serbest, türevlenmemiş formunda, yağ asitlerinin analiz edilmesi zor olabilir çünkü bu yüksek polariteli bileşikler, adsorpsiyon sorunlarına yol açan hidrojen bağları oluşturma eğilimindedir. Polaritelerini azaltmak onları analiz için daha uygun hale getirebilir.
- Doymamış yağ asitleri tarafından sergilenen çok küçük farklılıklar arasında ayırım yapmak için, polar karboksil fonksiyonel grupların önce nötralize edilmesi gerekir. Bu daha sonra kolon kimyası ile kaynama noktası elüsyonu ve aynı zamanda derecenin, pozisyonun ve hatta doymamışlığın cis vs trans konfigürasyonu ile ayırma gerçekleştirir (106).

### 2.4. GC Kolunu Seçimi

Optimize edilmiş bir kromatografik ayırma, sütunla başlar. Herhangi bir uygulama için uygun kılcal kolonun seçimi, dört önemli faktöre dayanmalıdır: sabit faz, kolon I.D. film kalınlığı ve kolon uzunluğu. Sabit bir fazın seçilmesi, bir sütunun seçilmesindeki en önemli adımdır, çünkü seçiciliği dikte eder veya kolonun örnek bileşenleri ayırma yeteneğini etkiler (107). Sabit bir faz, bir kılcal kolonun iç duvarına kimyasal olarak bağlanan veya kaplanan filmidir ve gerçekleştirilecek uygulamaya göre seçilmelidir. Enjekte edilen organik bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinde ve sabit faz ile etkileşimleri arasındaki farklar ayırma işleminin temelini oluşturur (108). Analit-faz etkileşimlerinin gücü iki bileşik için önemli ölçüde farklılık gösterirse, biri diğerinden daha uzun süre korunur. Sütunda

ne kadar süre tutuldukları (tutma süresi) bu analit fazı etkileşimlerinin bir ölçütüdür (109).

Non-polar kolonların tutma mekanizmaları esas olarak dağıntıdır, yani Van der Waals kuvvetleri tarafından yönetilir. Bunlar, bileşiğin büyüklüğü ile birlikte artan moleküller arası alandır. Böylece, daha yüksek kaynama noktalarına sahip daha büyük bileşikler daha uzun tutulmaya sahiptir (110).

Ara kutuplu kolonların ve polar kolonların tutma mekanizmaları kuvvetli bir şekilde dağılır (111). Orta miktarda hidrojen bağı ve temel etkileşimler de mümkündür.

Yüksek kutupsal kolonlar ve son derece kutuplu kolonların tutma mekanizmaları güçlü bir şekilde dispersiftir, çok kuvvetli dipol-dipol ve çok güçlü dipol kaynaklı dipollerdir. Orta derecede temel etkileşimler de mümkündür. Ayrımlar, bu mekanizmaların genel etkileri arasındaki farklarla belirlenir (112).

#### **2.4.1. Kolon I.D.**

Ticari olarak temin edilebilen kılcal kolon iç çaplarının mevcut aralığı, iki faktörün dengelenmesini mümkün kılar: verimlilik (teorik plaka sayısı) ve numune kapasitesi (istenen aşırı yüke aşırı yüklenmeden sütuna uygulanabilen herhangi bir numune bileşeninin miktarı) (113).

Örnek kapasitesi: Geniş delikli kolonlar, bir örnekte her bir analitin daha büyük bir kütesini dar delikli kılcal kolonlardan daha fazla barındırabilir. Bir sütunun numune kapasitesini aşmak, çarpık piklere ve azalan çözünürlüğe neden olur. Bu nedenle, analiz edilecek numuneler yüksek konsantrasyonlarda bileşikler içeriyorsa veya geniş bir konsantrasyon aralığını temsil ediyorsa, geniş bir delikli sütun düşünülmelidir (114).

#### **2.4.2. Film kalınlığı**

Film kalınlığının azaltılmasının yararları daha keskin pikler (çözünürlüğü artırabilir) ve azaltılmış kolon kanamasıdır. Her iki fayda da sinyal-gürültü düzeyini artırır. Ek olarak, kolonun maksimum çalışma sıcaklığı artacaktır. Azalmış film kalınlığı ayrıca analitlerin, uygulamaya bağlı olarak arzu edilen veya arzu edilmeyen,

daha kısa tutulma süreleriyle ve daha düşük sıcaklıklarda elüte edilmesine de olanak tanır (102, 115).

Film kalınlığının artırılmasının avantajları analit tüpü etkileşimi ve artan numune kapasitesidir. Dezavantajlar, artan pik genişlikleri (bu, çözünürlüğü azaltabilir), artan kolon boşluğu ve kolon için azaltılmış maksimum çalışma sıcaklığıdır. Artan film kalınlığı da artmış analitin tutulmasına yol açar ve artan elüsyon sıcaklığına neden olur (116).

### **2.4.3. Kolon uzunluğu**

Daha uzun sütunlar daha fazla çözünürlük sağlar, ancak geri basıncı artırır. İki katına çıkan sütun uzunluğunun iki kat çözünürlüğe sahip olmayacağı vurgulanmalıdır (çözünürlük sadece kolon uzunluğunun kareköküne göre artar). Kritik bir çift arasındaki çözünürlük 1'den küçükse, iki katına çıkan sütun uzunluğu onu taban çizgisine getirmeyecektir (113).

Tarama amaçları veya bileşenleri kimyasal yapıya benzemeyen basit örnekler gibi büyük çözünürlük gerekmediğinde daha kısa kolonlar önerilir (113, 116).

### **2.4.4. SP<sup>®</sup>-2560 kapiler GC kolonu**

Bu yüksek polar bisikloropil kolonu, özellikle yağ asidi metil esterlerinin (FAME) geometrik olarak (cis / trans) izomerlerinin ayrılması için tasarlanmıştır. FAME izomer uygulamaları için son derece etkilidir (116).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Deneyde kullanılacak olan tüm hayvan modelleri Jackson Laboratuvarı'ndan (Bar Harbor, USA) temin edilip, çoğaltım, beslenme, barınma ve gerekli genetik analizleri Acıbadem Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından yapılmıştır.

#### **3.1. Üretim Kafeslerinin Oluşurulması:**

Parkinson Hastalığı'nın temel özelliklerini taşıyan transgenik PARK-Q311X fareler (Parkin-Q311X line A:FVB/NJ-Tg(Slc6a3-PARK2\*Q311X)AXwy/J), yeni transgenik farelerin üretilmesi amacıyla, hibrid FVB fareleri (FVB/NJ) ile çiftleştirildi. Her bir PARK-Q311X erkek fare, 3-4 adet dişi FVB fare ile; dişi PARK-Q311X fareler de, erkek FVB fareler ile üreme kafesine bırakıldı. Tek batında hem heterozigot transgenik (PARK-Q311X) hem de transgenik olmayan (LM-Littermate) yavruların olması nedeniyle, yavruardan doku örneği alınarak genotiplenmesi yapıldı.

#### **3.2. Genotiplenme**

Gerekli hayvan sayısına ulaşmak için fazla sayıda üretim kafesi oluşturularak, yeni doğanlardan alınan doku örneğinden genotiplenme yoluyla transgenik ve transgenik olmayan kardeşler ayırt edildi.

Fare yavruları doğduktan sonra, vücut sıcaklıklarını koruyabilmek ve anne sütü ihtiyaçlarını karşılayabilmek için yaklaşık 3 hafta anneye bağımlı yaşarlar. Bu sebeple genotiplenme incelemesi, doğdukları tarihten 20-21 gün sonra yapıldı.

#### **3.3. Doku Örneklerinin Toplanması**

Fare yavruları üretim kafeslerinden ayrılarak, daha sonra ayırt edilebilmek üzere paslanmaz metal kulak küpesi (Harvard Apparatus, USA) ile işaretlendi. Hayvanlar, isoflurane kullanılarak anestezi edildi. Anestezi altındaki hayvanların, sağ kulak kepçesinden Harris Micro-Punch (Sigma-Aldrich) yardımıyla çapı yaklaşık 2 mm olan dokular kesilerek tüplere alındı.

### Genotiplemede Kullanılan Solusyonlar:

1. 40 mM Tris/HCl: 4,85 gr Tris, 700 ml dH<sub>2</sub>O'da çözünerek, 1M HCl ile pH 5.5'e ayarlanır. dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanır.
2. 25 mM NaOH/ 0,2 mM EDTA (250mM-10X): 20 gr NaOH ve 0,58 gr EDTA, 1 litre suda çözünür. Kullanım öncesi dH<sub>2</sub>O ile 10 kat dilue (1X) edilir.
3. TAE çözültisi (10X): 48,4 gr Tris ve 3,7 gr EDTA, 800 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülerek 11,4 ul glacial acetic acid eklenir. dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanır. Kullanım öncesi dH<sub>2</sub>O ile 10 kat dilue (1X) edilir.

### **3.4. DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu için, genel olarak genotipleme de kullanılan "kirli" DNA izolasyonu yöntemi kullanıldı. Bunun için;

- Tüplere alınıp işaretlenen doku örnekleri üzerine 75 ul 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA eklendi.
- PCR cihazı içerisinde 1 saat boyunca 98 °C'de inkübe edildi.
- Örnekler 15 °C'ye soğutuldu.
- İnkübasyon sonrası, nötralizasyon amacıyla tüplere 75 ul 40 mM Tris/HCl (pH=5.5) eklendi.
- 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilen örneklerin supernatantından 4 ul alınarak, PCR analizinde template DNA olarak kullanıldı.

### **3.5. PCR**

İzole edilen total DNA'larda hedef genlerin amplifikasyonu için standart PCR yöntemi kullanıldı. PCR için kullanılan primerler hastalıklara göre aşağıda belirtilmiştir.

**Tablo 3.1.** Parkinson hastalığı modeli deney hayvanlarının genotiplemesinde kullanılan primer dizileri

<b>Primer Adı</b>	<b>Baz Dizisi (5' -&gt; 3')</b>	<b>Baz Sayısı</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Beklenen Baz Sayısı</b>
<b>Kontrol-Forward</b>	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	24	59.3	324 bp
<b>Kontrol-Reverse</b>	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	25	61.3	324 bp
<b>PARK-Forward</b>	ATG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG	27	63.4	200 bp

Primerlerin PCR Uygulaması İçin Hazırlanması:

Liyofilize halde gelen primerler, sentezleme yapan firma tarafından gönderilen moleküler ağırlıklarına göre, gerekli miktarda ddH<sub>2</sub>O ile çözüldü ve 100 mM stok solüsyonlar elde edildi. PCR reaksiyonu öncesinde, son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde dilue edildi. PCR reaksiyon karışımı, her bir doku örneği için *Taq* PCR Kit (NEB, E5000S) yardımıyla hazırlandı.

Tablo 3.2. Parkinson hastalığı modeli hayvan DNA'larının PCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Negatif Kontrol	Test Grubu (1 örnek için)
ddH <sub>2</sub> O	12,5	12,4
10x Reaction Buffer	2,4	2,4
dNTP	0,5	0,5
Kontrol-Forward	1,2	1,2
Kontrol-Reverse	1,2	1,2
PARK-Forward	1,6	1,6
PARK-Reverse	1,6	1,6
Template	4	4
Taq DNA polimeraz	-	0,125
<b>Toplam</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

Tablo 3.3. PCR reaksiyon aşamaları

Derece (°C)	Süre (dk)	Döngü
94	3	1
94	00:30	35
57,3	1	
72	1	
72	2	1
10	∞	-

### 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla kullanılacak olan her bir jel için %3'lük agaroz jel hazırlandı.

#### Agaroz Jel Hazırlama:

- 3 gr agaroz, 100 ml TAE tampon çözeltisi içerine karıştırıldı.
- Mikrodalga fırında 5 dk kaynatıldı.
- Nükleik asitleri UV ışık altında görünür hale gelebilmesi için 5ul boya (Safeview, ABM) eklendi ve boyanın jel içerisinde homojen dağılması sağlandı.
- Jel yürütme kasetine dökülerek, polimerize olması beklenildi.

Jelin polimerize olması beklenirken, PCR ürünleri, yükleme boyası ile (6X Gel Loading Dye, NEB B7021-S) ile 1:5 oranında karıştırılarak jele yüklenmeye hazır hale getirildi.

Polimerize olan jele sırasıyla, DNA ladder (Quickload 2-log, NEB N0496), kontrol ve test edilecek örneklerden 10 ul yüklendi.

Elektroforez 80V'da 45 dk'da gerçekleştirildi. ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (BioRad) kullanılarak jel görüntülemesi yapıldı. Tek bantın olduğu kuyularda yürütülen örnekler transgenik olmayan (LM) hayvanlara aitken, 2 bant gözlemlenen örnekler Parkinson transgenik hayvanlarına (Tg) aittir.

### **3.7. Hayvanların Davranış Testleri:**

Projede yer alan PH modeli ve kontrol farelerin hastalık kaynaklı nörodejeneratif özelliklerinin motor beceri, hafıza yeteneği ve endişe hissi üzerine etkilerini gözlemlenmek için hastalığa özgü belirli aralıklarla davranış testleri yapılmıştır. Yapılan testler; açık alan testi (open field test), rotarod testidir.

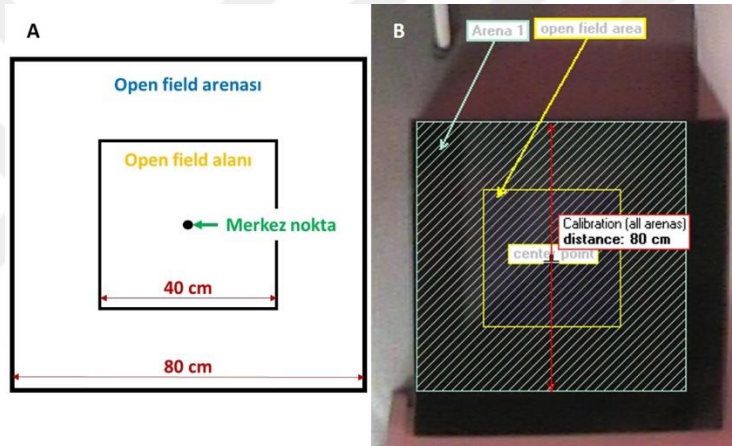
#### **3.7.1. Açık alan testi (Open-Field) protokolü**

Açık alan testi, anksiyete, spontan lokomotor aktivitesi ve büyüme aktivitesini araştırmak için kullanılan bir test olduğundan, PH fare modellerinin değerlendirilmesinde kullanılır. Yapılan deneylerde, test hayvanının açık alan merkez alanında (40x40) ve düzenek kenarlarında geçirdiği süreler tespit edildi.

Ayrıca lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için; farenin ne kadar süre hareketli ve hareketsiz kaldığı ya da aşırı hareketli olduğu gibi parametreler göz önünde bulundurularak değerlendirme yapıldı.

Deneye başlamadan önce fareler, deney düzeneğinin bulunduğu odaya 30 dk önce getirilerek buldukları ortama uyumları sağlandı ve hayvanlar rutin olarak, gece/gündüz döngüsündeki gece fazının ilk yarısında test edildiler.

Açık alan testi düzeneği, 80x80x40 cm boyutunda siyah Plexiglastan yapılıdır. Deney protokolüne göre, kullanılan bilgisayar yazılımında (EthoVision XT 9, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) platform zemininde bir dış alan (open field arena), bir open field alanı (40x40) ve bir de merkez noktası oluşturulur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Açık alan testi düzeneği (55)

Test edilecek fare, kuyruğundan tutularak platformun ortasına yerleştirildi. Farenin hareketleri, platformun 230 cm yukarısında, yazılıma bağlı kamera ile kaydedildi. Her bir fare için, 10 dk takip yapıldı ve belirlenen parametrelere göre fare hareketleri ve hareket süreleri kaydedildi. Fareler arası geçişte platform önce %70 etanol, sonra dH<sub>2</sub>O ile silindi ve kurutululdu.

### 3.8. Rota-Rod Protokolü

Rotarod testi, otomatize olduğundan ve testin uygulanması için özel eğitim gerektirmediğinden, rodentlerde en sık kullanılan motor koordinasyon ve denge testidir. Bu sebeple PH modeli farelerinde Ratarod testi uygulanır. Test alıştırma fazı ve motor koordinasyon fazı olmak üzere, iki aşamada gerçekleştirilir.

Deneye başlamadan önce fareler, deney düzeneğinin bulunduğu odaya 30 dk önce getirilerek buldukları ortama uyumları sağlandı ve deneylere yaklaşık olarak günün aynı saatinde başlandı.

Deney protokolüne göre; alıştırma fazında fareler sadece 300sn içinde 4rpm'den 40rpm'e çıkan rod üstüne alınarak bir kez yürütüldü. Mekanizmada test edilen fare alındıktan sonra diğer fare düzeneğe yerleştirilmeden önce %70 etanol, sonra dH<sub>2</sub>O ile silindi ve sistem kurulandı. Diğer faza geçmeden önce, fareler 3 gün boyunca kendi ortamlarına alınarak bekletildi.

Motor koordinasyonun ölçüldüğü aşamada ise fareler 300sn içinde 4rpm'den 40rpm'e çıkan rod üstüne alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde yürütüldü. Farelerin rod üzerine koyuldukları ve düştükleri zamanlar not edildi. Her bir fare için tekrarlar arasında, fare 30dk dinlenmeye alındı.

### **3.9. Hayvanların Anestezisi, Kardiyak Perfüzyonu ve Beyin Dokusunun Çıkarılması:**

Transgenik ve kontrol fareler ketamine (100mg/kg) ve xylazine (10mg/kg) kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile derin anestezide alındı. Fareler karın kısmı yukarıya gelecek şekilde zemine sabitlendi. Anestezinin etkisi, vücut reflekslerine bakılarak kontrol edildikten sonra, göğüs kafesi açıldı. Kalp atımının olup olmadığı kontrol edildikten sonra perfüzyon için hayvanın kalp atımına dikkat edildi. Hayvanın kalbi, forceps yardımı ile sabitlenip, sağ kulakçık kesilerek kanın boşalması beklendi. Sol karıncık enjeksiyon için ön plana çıkartılıp, önce serum fizyolojik dolu enjektör ile perfüzyon yapıldı. Sağ kulakçıktan kan yerine serum fizyolojik çıkışı gözlemlendikten sonra, 4% PFA dolu enjektöre geçildi. Perfüzyonun tamamlanması, hayvanın el, ayak ve kuyruğundaki beyaz renge dönüşme ve kasılmalardan takip edildi. Perfüzyon sonrası, beyin disekte edilip ve hasar vermeden, hemen kuru buz üzerine alınıp donması beklendi. Analizlerde kullanılmak üzere -80'de depolandı. Bu cerrahi işlem sırasında hayvan anestezisi altında dekapitasyona uğramış olur.

Tablo 3.4. Deney grupları ve sayıları

<b>Deney ve kontrol grupları</b>	<b>Grup başına hayvan adedi</b>
Fare (Parkinson Disease) (1,3,6,12 aylar.n=12)	12
Fare- Kontrol (Parkinson Disease) (1,3,6,12 aylar.n=12)	12
<b>Kullanılan toplam hayvan sayısı:</b>	24

### 3.10. Lipid Ekstrasyonu İçin Hazırlanan Solüsyonlar

Heptadekanoik asit internal standart olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 50 mg Heptadekanoik asit (C17:0) tartılıp 10 ml kloroformda çözüldü. Daha sonra dahili standart olarak kullanmak üzere stok solüsyonunda son konsantrasyonu 500µg/ml olacak şekilde dilüe edildi.

3N Metanolik HCl çeker ocak altında metilasyon solüsyonu hazırlanmak için; damla damla 3mL %37 HCl 9mL metanole eklenerek metilasyon solüsyonu hazırlandı.

Butil hidroksi tolüen (BHT) içeren eppendorf tüpler: 1 g BHT 100 ml etanol içinde çözüldü ve koyu renkli bir şişede 4° C'de saklandı. 2 mL'lik eppendorf tüplere 100'er µL solüsyondan konarak 37°C'de kurutuldu. Beyin dokusu örnekleri bu BHT'li tüplerde -80°C derecede saklandı (117).

### 3.11. Lipid Ekstraksiyonu

Beyin dokusu alınarak petri ve steril bistüri ile korteks ve cerebellum bölümlerine ayrıldı. Her bölünen doku önceden numaralandırılmış BHT içeren tüplere alındı. Buz üzerine alındıktan sonra stok dokulardan yine BHT'li eppendorf tüplere alınmak üzere 10'ar mg doku alındı. Bead-bead homojenleştirici kullanarak % 0.01 bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) içeren tüplerde içinde doku tartıldı ve

homojenize edildi. Her tüpe 1500 µL metanol: kloroform (1: 2 v / v) ve 100 µL internal standart eklenerek homojenize doku tüpten toplandı ve cam viallere alındı. Vortekslendi ve test tüpü rotatöründe gece boyunca 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün tüplerin üzerlerine 0.15 M amonyum asetat eklendi ve en az 15 saniye vorteks uygulandı. Daha sonra +4 °C de 2.000 × g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Dipte lipidleri içeren kloroformlu iki faz bulunmalıdır. Proteinler su / metanol fazında veya arayüzde yüzer. Az miktarda kloroform ile cam bir pipet aspire edildi. Cam pipet nazikçe tüpün alt kısmına yerleştirildi ve su/metanol fazı veya proteinlerden herhangi birini çıkarmadan kloroform alındı. Kloroform / lipid karışımını yeni bir test tüpüne aktarıldı. Orijinal homojenat tüpüne aynı şekilde kloroform:metanol:0.15M amonyum asetat 8:4:3 eklendi en az 15 saniye vorteks uygulandı. Takiben +4 °C de 2.000 × g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Bir cam pipet az miktarda kloroform ile aspire edildi. Cam pipet nazikçe tüpün alt kısmına yerleştirildi ve kloroform herhangi bir su/metanol fazını veya proteinlerini bulaşmadan çıkarıldı, ilk kloroform ekstraktı ile birleştirildi. Tüpler 37 °C'de azot altında kurutuldu. Saklanmak üzere -80 °C'de cam vialde saklandı (118).

### **3.12. Supelco 37 FAME Mix Hazırlanması**

Dondurulmuş halde 1ml'lik tüpte alınan Supelco 37 FAME mix 100'er µl olmak üzere 10 ayrı eppendorf tüpüne ayrıldı. İçlerinden bir 100 µl'lik FAME mix içeren tüp alınarak üzerine 1:1 oranında hekzan eklendi ve vortekslendi. Ayrı bir FAME mix içeren tüp alınarak içine 100 µl internal standart ve 1:1 oranında hekzan eklendi. Ayrı bir tüpe 100 µl internal standart ve 100 µl hekzan eklendi. Her üç tüp 37°C'de nitrojen altında kurutuldu. Bir cam GC vialine 100 µl hekzan eklenerek hazırlandı. Sadece Supelco 37 FAME mix içeren tüpe 150 µl hekzan eklenerek çözündürüldü ve cam GC vialine alındı. Supelco 37 FAME mix ve internal standart içeren tüpe ise 150 µl hekzan eklenerek çözündürüldü ve cam GC vialine alındı. Sadece internal standart içeren tüpe ise 100 µl hekzan eklenerek çözündürüldü ve cam GC vialine alındı. GC-FID cihazının autosampler bölmesine sırasıyla sadece hekzan içeren vial, sadece Supelco 37 FAME mix içeren vial, supelco 37 FAME mix + internal standart içeren vial ve sadece internal standart içeren vial konuldu ve analiz başlatıldı. Gerekli normalizasyonlar yapılarak pikler incelendi.

### **3.13. Yağ Asitlerinin Metillenme Protokolü**

Doku örnekleri çalışmadan bir gece önce 4 °C derecede eritildi. Tüplere 1 ml 3N metanolik HCl eklenerek vortekslendi ve lipidlerin çözünmesi sağlandı. Bu sırada internal standart working solüsyonunu da içeren 100µL örnek kalın ve vidalı kapaklı 5 ml'lik cam tüplere sırasıyla kondu. Tüpler vidalı kapakla kapatıldı ve transmetilasyonun 90 °C'de 4 saat süreyle ilerlemesine izin verildi. Tüplerin oda sıcaklığında soğutulmasının ardından, 2 mL hekzan eklendi ve tüp tekrar kapatılarak 10 sn süre ile vortekslendi. Üst (hekzan) tabakası bir cam tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında hafif bir nitrojen akışı ile hekzan dikkatle buharlaştırıldı ve sonunda kalıntı (residue) 100 µl heksanda çözüldü ve örnek vidalı kapaklı GC enjeksiyon şişesine transfer edildi (117).

### **3.14. GC/FID Protokolü**

Heksan, metanol ile karışmaz ve kolon ömrünü kısaltmamak için kullanılır. 1µl örnek bölme modunda, 100:1 bölünme oranı ile 250 °C'de enjekte edilir. Giriş basıncı 250 kPa olan taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı. Make up ve akış hızı olarak 30ml/dk nitrojen gazı kullanıldı. Sıcaklık programı 100° C'de başlatıldı ve 5 dakika süreyle tutuldu, ardından 4 °C / dk hızla 240 °C'ye yükseltildi. Sıcaklığı bu seviyede 20 dk tutuldu. Böylece, tüm yüksek kaynama noktalı maddelerin, kolesterolün ayrılmasına izin verildi. Toplam analiz süresi 73 dk kadar sürdü (117, 118).

## 4. BULGULAR

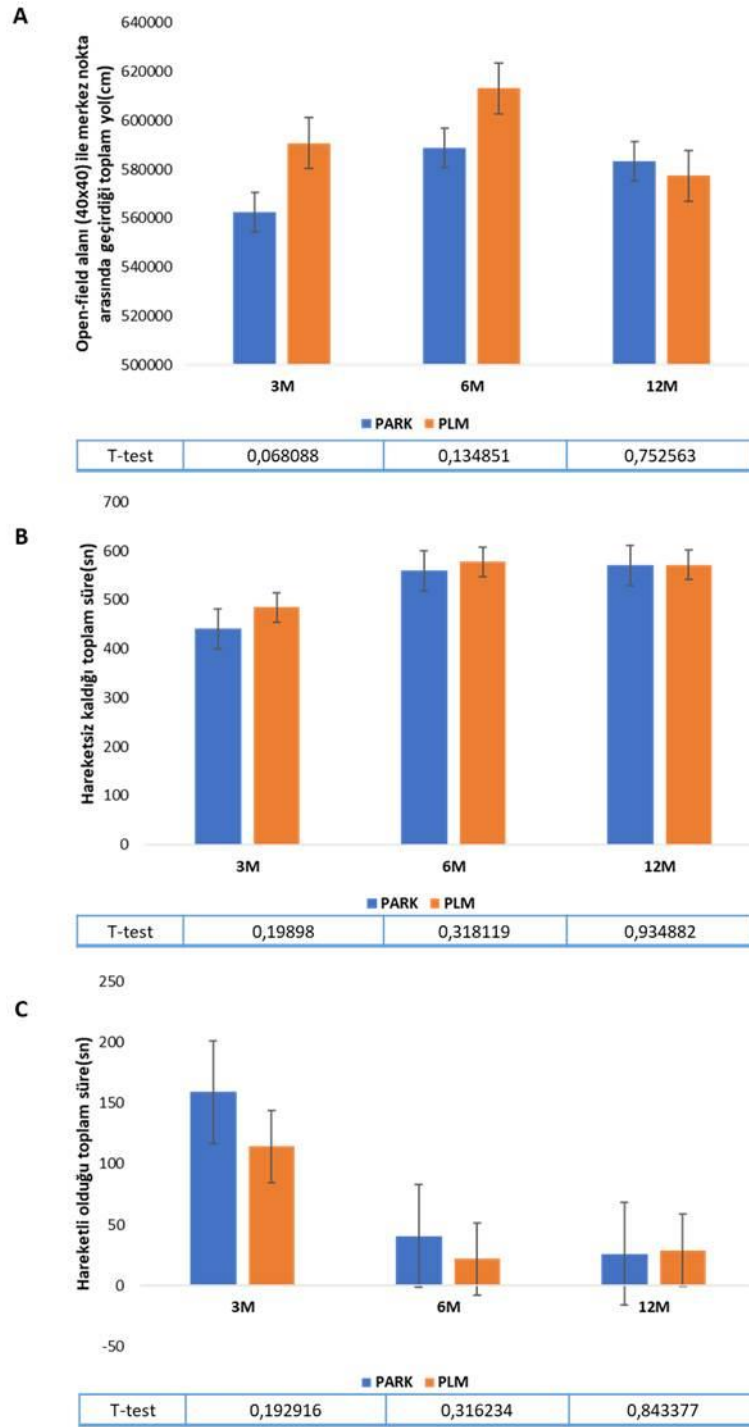
### 4.1. Davranış Testleri

Parkinson fare modeli kontrolü için yapılan davranışsal testlerin değerlendirmesinde açık alan testleri için t-test ve Rota-rod testleri içinse t-testi yapıldı.

PH fare modeli gruplarında yapılan açık alan testi sonuçları Şekil 4.1'de gösterildi. Gruplar arası karşılaştırma yapılan parametreler; Open-field alanı (40x40) ile merkez nokta arasında geçirdiği toplam yol (cm), hareketsiz kaldığı toplam süre (sn) ve hareketli olduğu toplam süre(sn) şeklindedir. Yapılan deneylere göre transgenik ve kontrol fareleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir.

Transgenik Parkinson ve kontrol grupları open field testi sonucu şekil 4.2'de gösterilmektedir.





Şekil 4.2. Parkinson hastalığı fare modeli, açık alan testi sonuçlarına göre oluşturulan grafikler

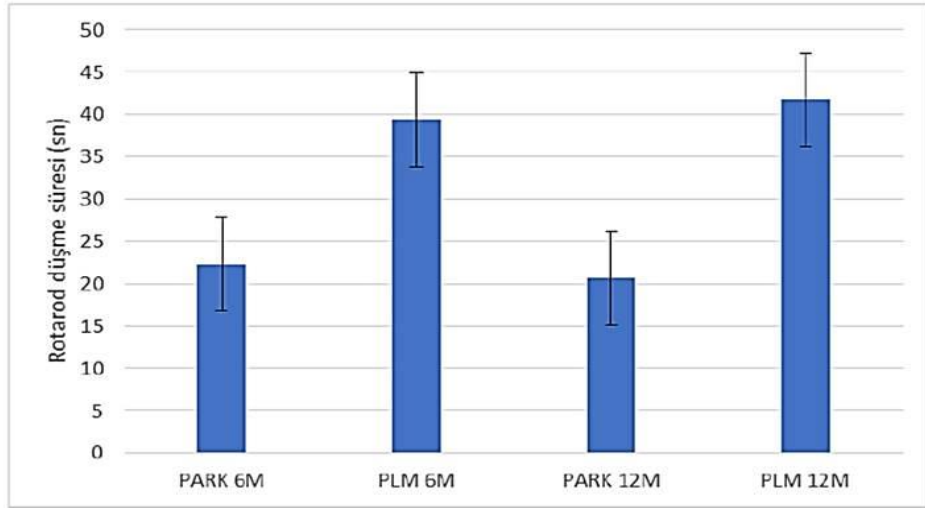
(PARK: Transgenik, PLM: Kontrol).

Transgenik Parkinson ve kontrol grubu 1, 3, 6 ve 12 aylık farelerin rota-rod testi sonucu tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Rota-rot testi sonucu

Exp. Code	Cinsiyet	PARK	PLM	Süre (Trial 1)	Süre (Trial 2)	Süre (Trial 3)
EA_PARK_40	D	x		130	101	87
EA_PARK_45	D	x		27	13	10
EA_PARK_47	E	x		22	22	25
EA_PARK_48	E	x		33	20	27
EA_PARK_57	D		x	25	29	47
EA_PARK_58	D		x	33	18	42
EA_PARK_60	E		x	38	67	90
EA_PARK_83	D	x		48	51	61
EA_PARK_85	D	x		25	10	37
EA_PARK_89	D		x	30	34	36
EA_PARK_91	D		x	60	58	22
EA_PARK_102	E		x	27	40	40
EA_PARK_104	D	x		66	108	106
EA_PARK_107	D		x	50	36	48

Parkinson hastalığı modeli fareleri açık alan testlerine göre belirgin farklılık göstermeseler de, Parkinson fare modeli için motor becerilerin kontrolü için belirleyici yöntem olan Rota-rod testi sonucunda her grup içinde yapılan t-test sonuçları  $p < 0.05$  olarak seçilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Parkinson hastalığı fare modeli Rota-rod davranış testi sonuçları (PARK: Transgenik, PLM: Kontrol)

#### 4.2. GC-FID analiz sonuçları

Tablo 4.2. Supelco 37 FAME mix kompozisyonu ve pik alanları

COMPOUND	AREA
HEXANE	116938,12
METHYL BUTYRATE	1,43
METHYL HEXANOATE	5,40
METHYL OCTANOATE	8,93
METHYL DECANOATE	10,3
METHYL UNDECANOATE	5,11
METHYL LAURATE	10,86
METHYL TRIDECATONE	4,71

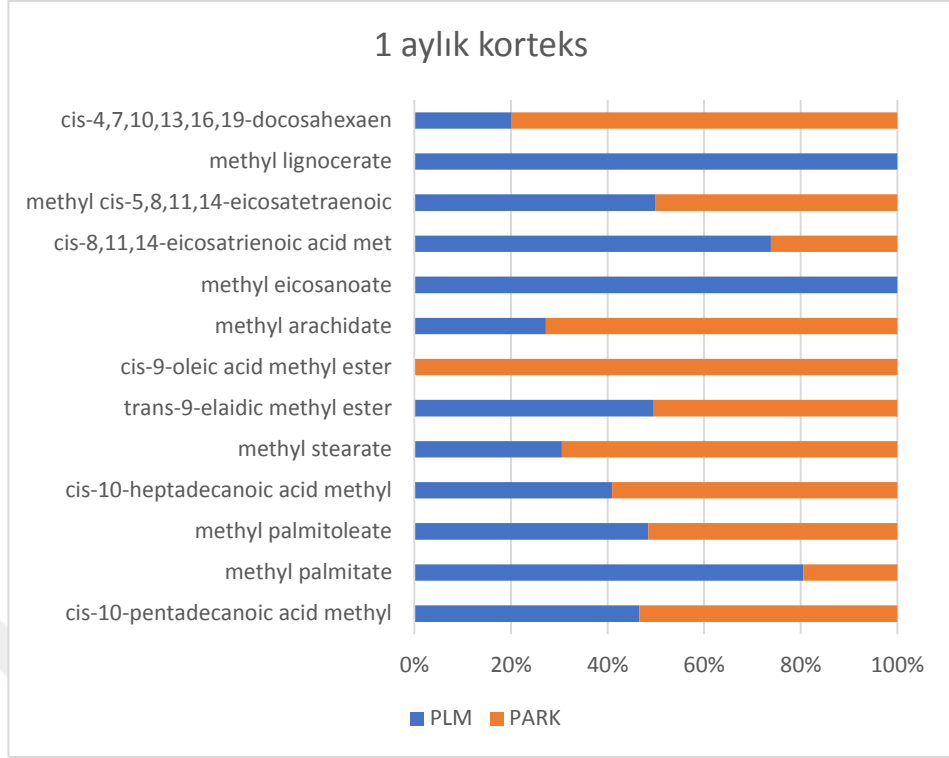
Tablo 4.2. Supelco 37 FAME mix kompozisyonu ve pik alanları (devamı)

METHYL MYRISTATE	9,42
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER	5,34
METHYL PENTADECANOATE	4,43
CIS-10-PENTADECANOIC ACID METHYL ESTER	4,49
METHYL PALMITATE	13,87
METHYL PALMITOLEATE	4,40
METHYL HEPTADECANOATE	3,65
CIS-10-HEPTADECANOIC ACID METHYL ESTER	4,03
METHYL STEARATE	6,67
TRANS-9-ELAIDIC ACID METHYL ESTER	3,74
CIS-9-OLEIC ACID METHYL ESTER	7,51
LINOLEALIDIC ACID METHYL ESTER	3,53
METHYL LINOLEATE	3,97
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ESTER	6,08
METHYL EICOSANOATE	4,38

Tablo 4.2. Supelco 37 FAME mix kompozisyonu ve pik alanları (devamı)

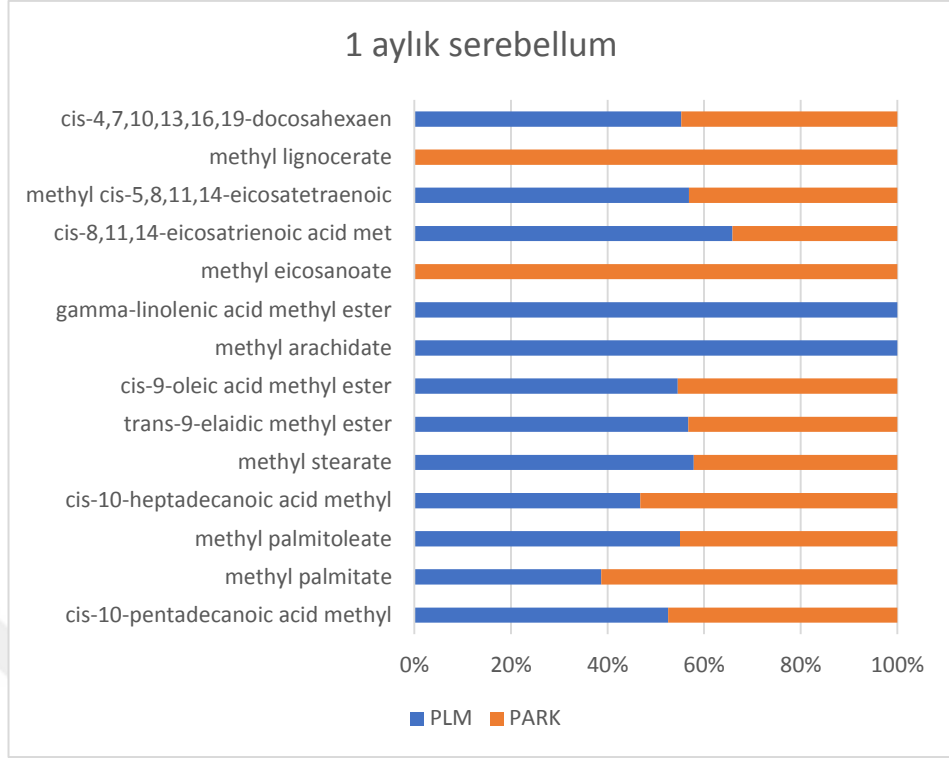
METHYL LINOLENATE	3,53
METHYL HENEICOSANOATE	3,31
CIS-11,14-EICOSADIENOIC ACID METHYL ESTER	2,61
METHYL BEHENATE	2,91
CIS-8,11,14-EICOSATRIENOIC ACID METHYL ESTER	4,22
METHYL ERUCATE	3,38
CIS-11,14,17-EICOTRIENOIC ACID METHYL ESTER	2,98
METHYL CIS-5,8,11,14-EICOSATETRAENOIC ACID METHYL ESTER	4,93
METHYL TRICOSANOATE	2,14
CIS-13,16-DOCOSADIENOIC ACID METHYL ESTER	2,33
METHYL LIGNOCERATE	2,70
METHYL CIS-5,8,11,14,17-EICOSAPENTAENOATE	3,52
METHYL NERVONATE	1,87
CIS-4,7,10,13,16,19-DOCOSAHEXAENOIC ACID METHYL ESTER	3,48

Fare beyin dokusundan alınan örnekler GC-FID aygıtına verilerek FAME analizi yapılmıştır. Buna göre hasta ve hasta olmayan farelerin korteks ve cerebellum bölgelerinde ki yağ asit değişimi Tablo 4.2’de gösterilmektedir.



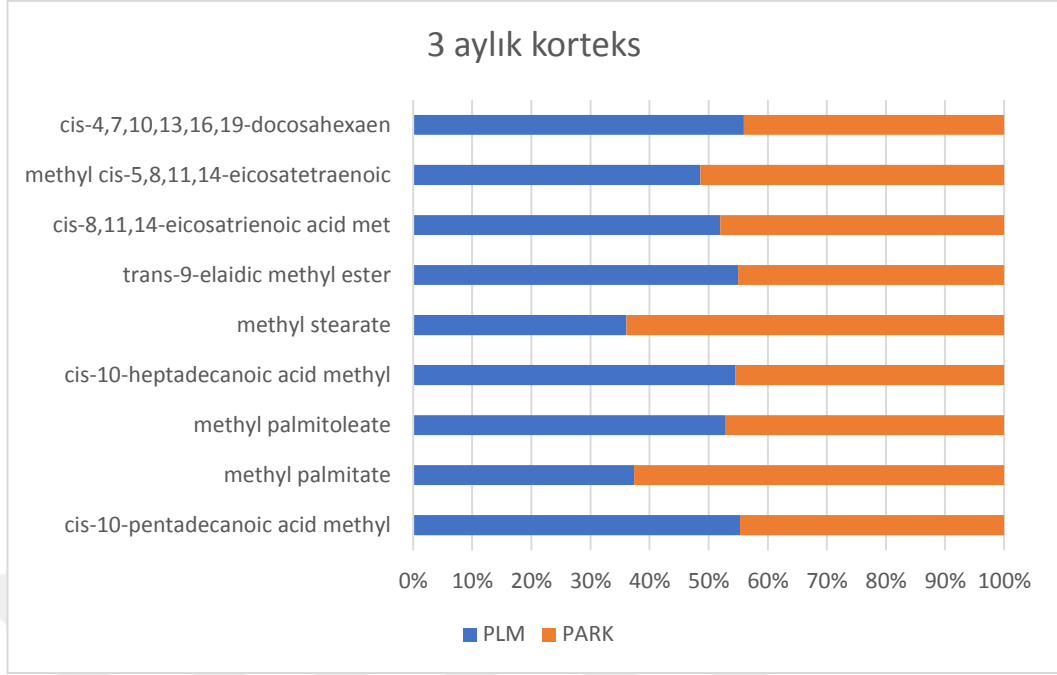
Şekil 4.4. 1 aylık plm ve park korteks fame değişimi

Buna göre, cis 4,7,10,13,16,19 docosahexaen park farelerde kontrol farelerine göre yüzde 80 artmış görünmektedir. Methyl lignocerate park farelerde hiç gözükmezken, cis 9-oleidic acid methyl ester ise kontrol farelerde hiç gözükmemektedir. Methyl palmitate kontrol farelere göre park farelerde miktarı %20 oranında artmış görünmektedir.



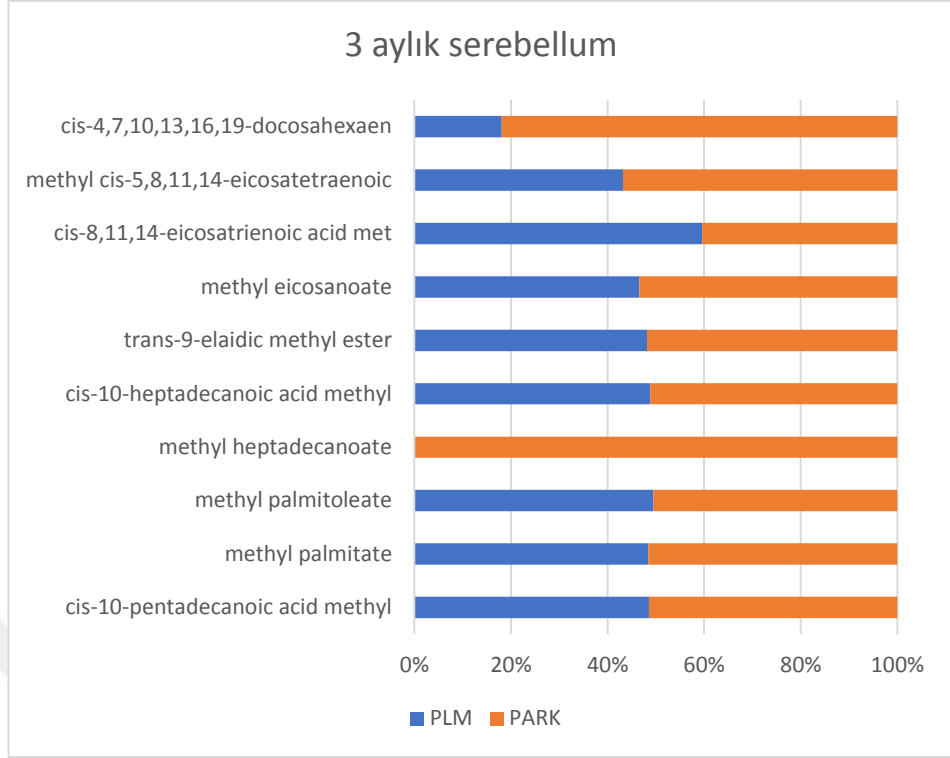
Şekil 4.5. 1 aylık plm ve park serebellum fame değişimi

Serebellum bölgesinde ise, methyl lignocerate kontrol farelerde hiç çıkmazken, gamma linolenic acid methyl ester park farelerde görülmemektedir. Methyl palmitate kontrol farelere göre park farelerde eşit miktarda görülmektedir.

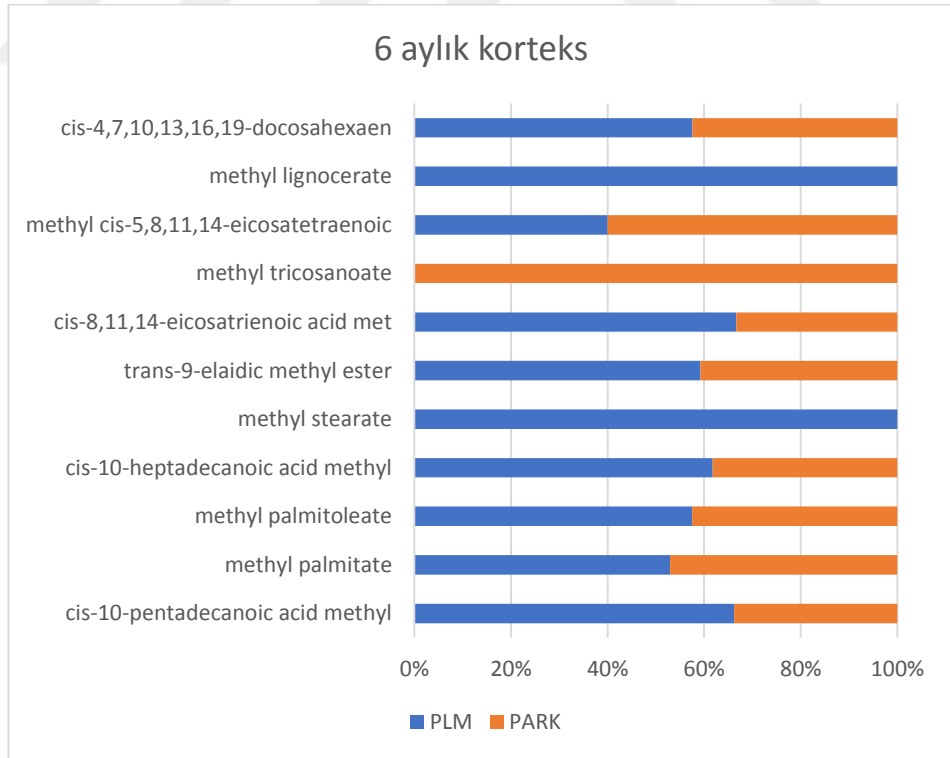


Şekil 4.6. 3 aylık plm ve park korteks fame değişimi

Şekil 4.6'ya göre methyl palmitate kontrol farelere göre park farelerde yüzde altmış daha fazla görülürken, methyl palmitoleate ise park farelerde kontrole göre yaklaşık %40 oranında artmıştır.

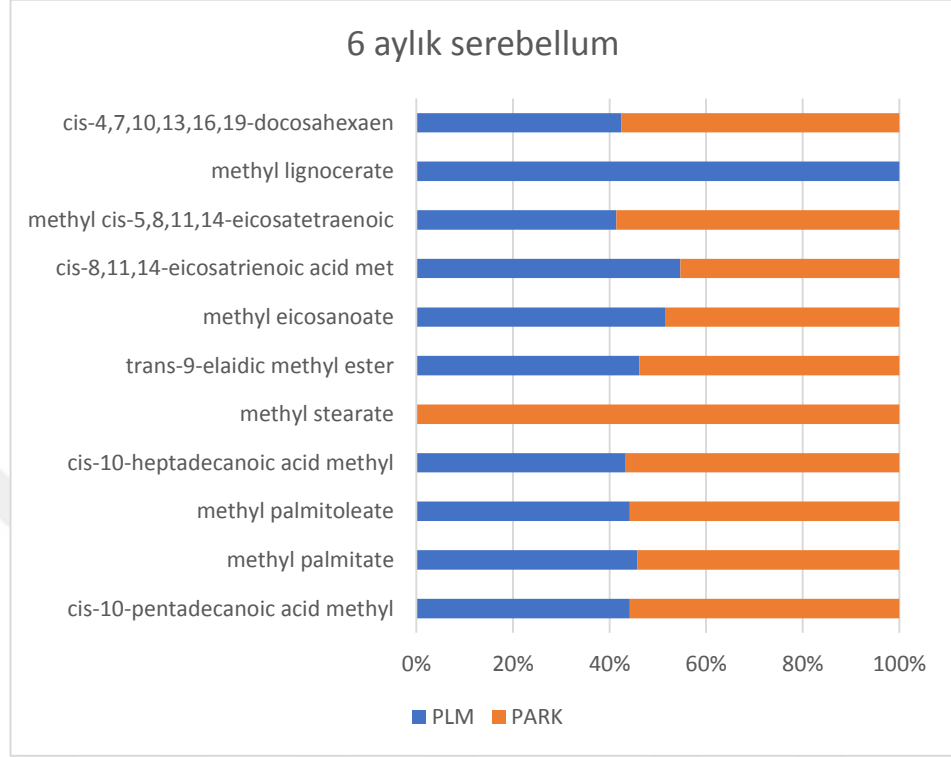


Şekil 4.7. 3 aylık plm ve park serebellum fame değişimi



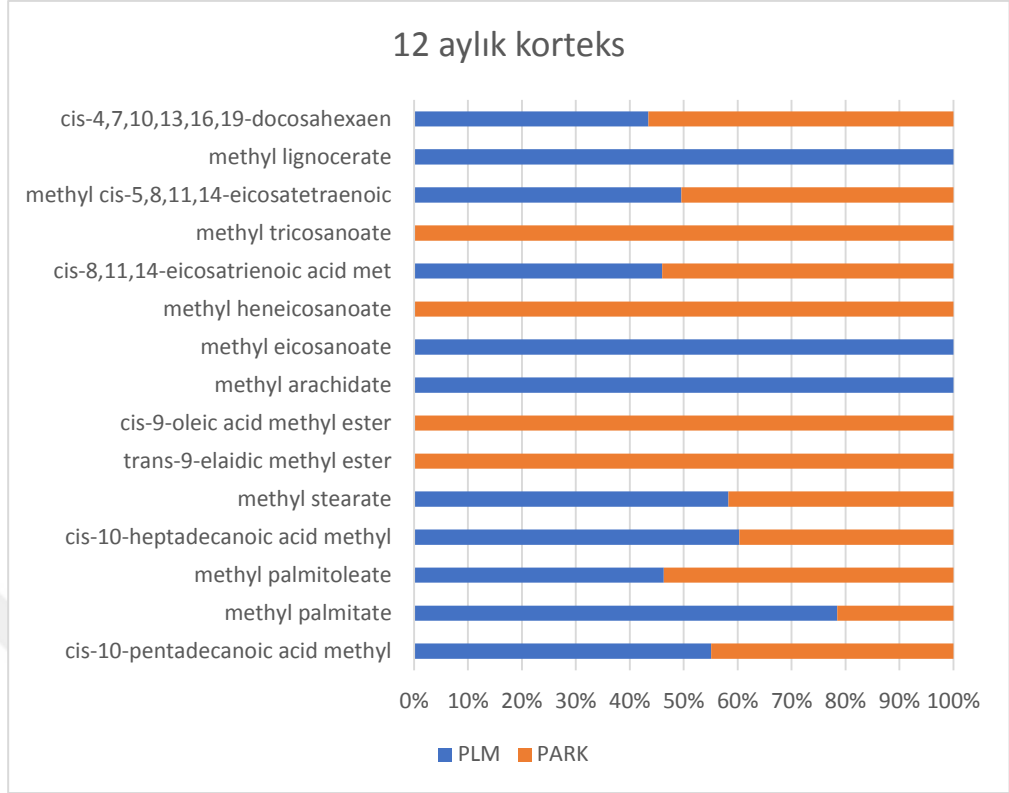
Şekil 4.8. 6 aylık plm ve park korteks fame değişimi

Buna göre methyl tricosanoate kontrol farelerde hiç görülmezken, methyl stearate park farelerde hiç görülmemiştir.



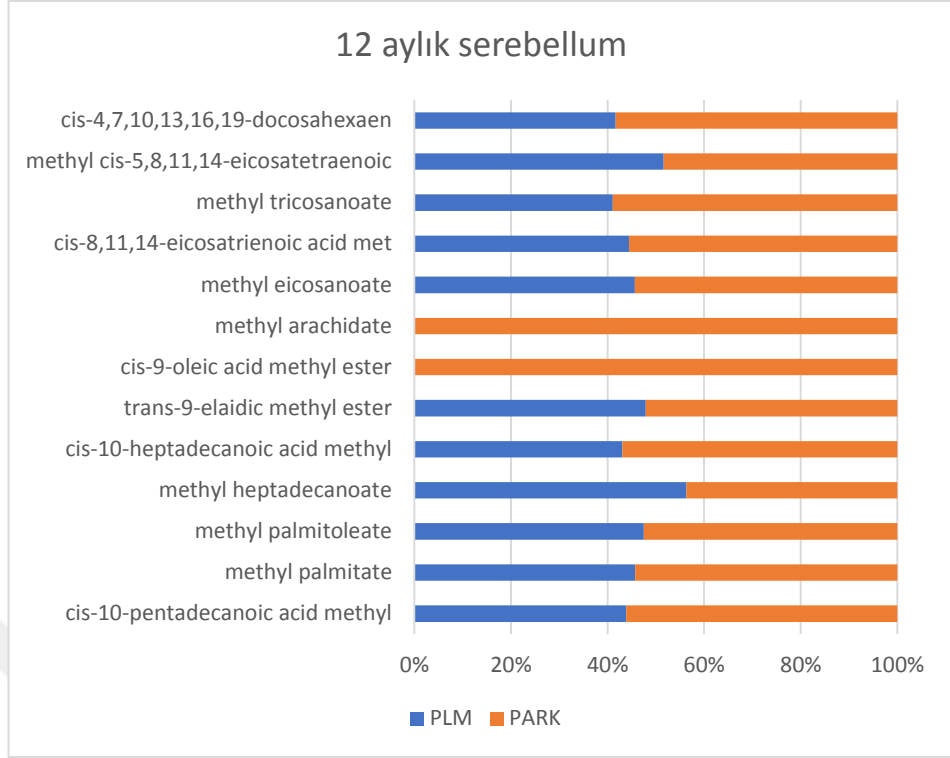
Şekil 4.9. 6 aylık plm ve park serebellum fame değişimi

Serebellum bölgesinde methyl stearate kontrol farelerde görülmezken, methyl lignocerate ise park farelerde görülmemiştir. Methyl palmitoelate ve methyl palmitate ise park farelerde konrole göre artış olduğu görülmektedir.



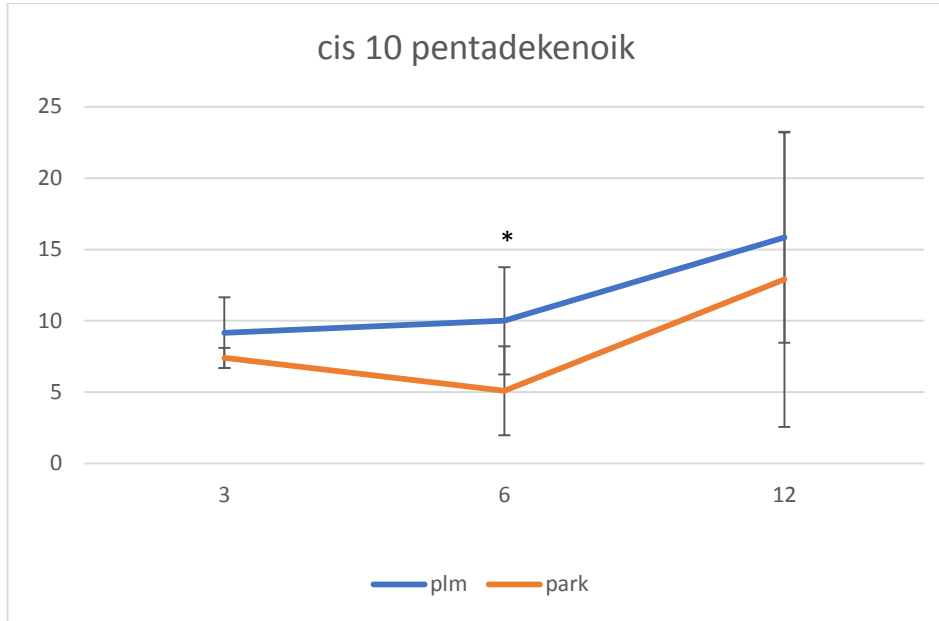
Şekil 4.10. 12 aylık plm ve park korteks fame değişimi

Methy palmitate 12 aylık farelerde kontrole göre bir düşüş göstermiş ve methyl palmioeate ise artış gösterdiği görülmüştür.



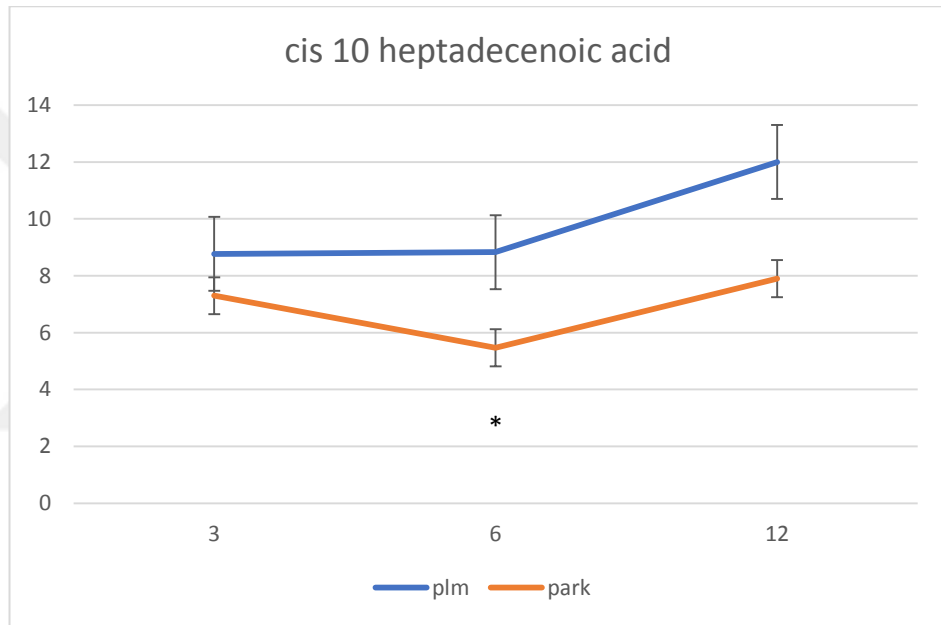
Şekil 4.11. 12 aylık plm ve park serebellum fame değişimi

İstatiksel olarak anlamlı bulunan yağ asitleri 3,6 ve 12'inci ay değişimleri daha ayrıntılı olarak incelendi.



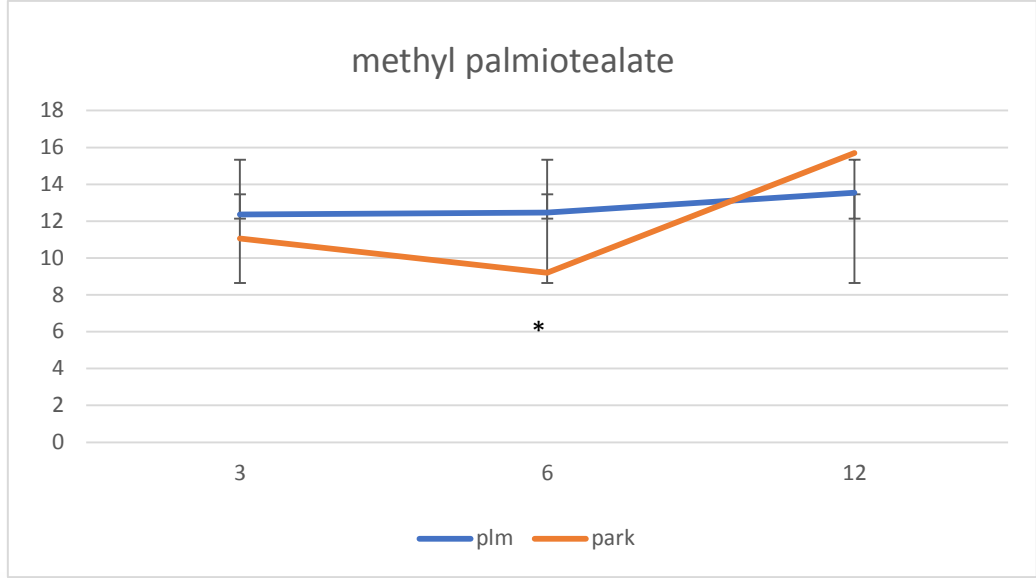
Şekil 4.12. cis 10 pentadekenoik asit hasta ve sağlıklı fare korteks değişimi (\*= $p < 0.05$ )

Cis 10 pentadekenoik asit 3üncü ayda park farelerde düşüŖle başlayıp 6ıncı aya kadar düşmesi devam ederken, 12inci ayda bir artma söz konusu olduğu görölmektedir.



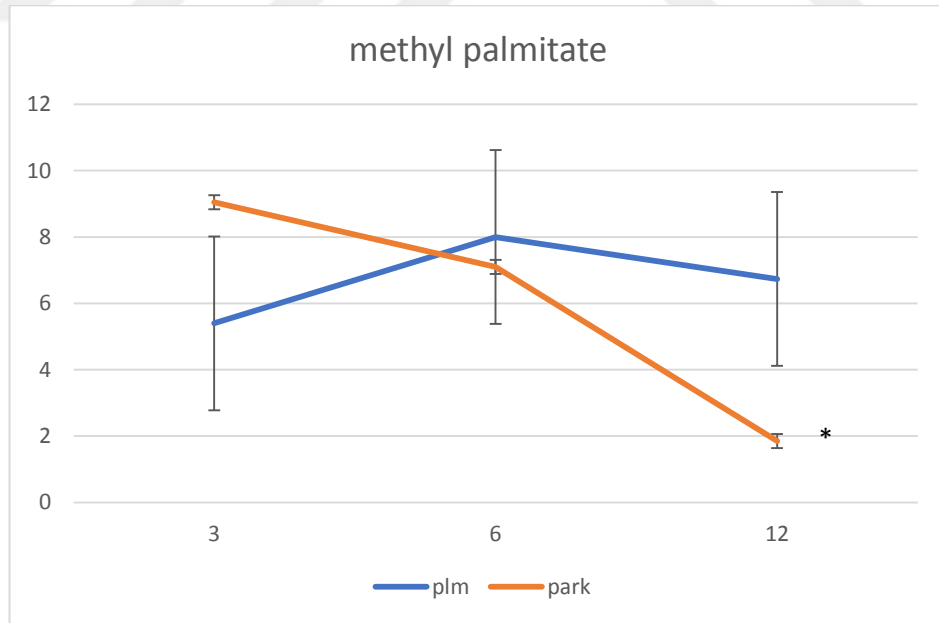
Ŗekil 4.13. cis-10 heptadekenoik asit fare kortek deđiŖim (\*=p<0.05)

Cis 10 heptadekenoik asit ise kontrole göre düşük seviyelerde görölmektedir (\*=p<0.05)



Şekil 4.14. methyl palmitate fare korteks fame değişimi (\*= $p < 0.05$ )

Methyl palmitate park farelerde 3üncü ayda düşük seviye gösterirken, 12inci ayda büyük bir ivme yaptığı görülmektedir.



Şekil 4.15. methyl palmitate fare korteks fame değişimi (\*= $p < 0.05$ )

Methyl palmitate 3üncü ayda kontrole göre oldukça yüksek seviyelerde görülürken 6ıncı aydan itibaren büyük bir ivmeyle düşüş göstermiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

PH, dünya genelinde insanların yakalandığı bir nörolojik bir rahatsızlıktır. Kadın ve erkeklerde yaşanma durumu dengededir. 65 yaşın üzerindeki her 100 kişiden birisinin Parkinson hastası olduğu görülür. Parkinson seri ilerlemeyen bir rahatsızlıktır (119). Günlük yaşamı etkiler ancak hayati tehlikesi yoktur. Genel olarak Parkinson; beyinde dopaminin ürettiği sinir hücrelerinin yok olmasıyla meydana gelen bir durumdur (120).

Son zamanlarda, Parkinson ve benzeri beyin hastalıkları ile ilgili araştırmalar, özellikle de moleküler biyoloji ve genetik anlamındaki çalışmalar hız kazanmıştır (121). Çalışmaların başında parkinsona neden olan mutasyonlar ve transgenik Parkinson beyinlerindeki sistemin moleküler ifadesi yer alır (122).

Franceschi ve ark (123), yaptıkları bir çalışmada beyin lipitlerinin etkileşiminde  $\alpha$ syn'in Parkinson hastalığının patogeneğinde önemli rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir. DHA'in nöronal membranlarında bol miktarda yağ asidi vardır ve DHA beyin bölgelerinde yüksek seviyelerde bulunur. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmada, beyindeki DHA içeriğinin bir artışını *in vivo*  $\alpha$ syn oligomer oluşumu indüklediği görülmektedir. Bununla birlikte, bu oligomerik türlerin post-mortem PH beyinlerinin LC bulunan büyük agregatların öncüleri olup olmadığı bilgisi henüz netlik kazanmamıştır. Giorgia ve ark (123) amiloid oluşumunda yağ asitlerinin rolünü anlamak için agreasyon süresini incelemişlerdir ve bu süreçte DHA 'nın varlığının  $\alpha$ syn kolayca desteklediğini gözlemlemişlerdir.  $\alpha$ syn agreasyon sürecinde agregatların morfolojisi, protein seviyeleri, DHA oranlarının önemli olduğu bildirilmiştir.

Protein oranı ve DHA varlığı 1: 10'luk bir molar oranında, amiloid benzeri fibriller meydana gelmiştir. Bu fibril sari, morfolojik olarak oluşarlardan farklı bir yapıya sahip olduğunu ve  $\alpha$ syn tek başına ve paketlenmiş yapısı olduğunu saptamışlardır (123). Asıl protein ve DHA molar oranının 1:50, olduğu durumda sodyum sülfonatların oluşumunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bu deneme araştırmacılara, kimyasal modifikasyonlar, metionin oksidasyonları ve protein lipit

eklenti oluşumları, artan DHA konsantrasyonları tarafından indüklendiğini ve bu değişikliklerin kapsamı, agregaların yapısını ve kararlılığını tanımladığını göstermiştir.  $\alpha$ syn oligomeri, dopamin ergin neuronal hücrelerinde DHA varlığında üretilirse daha toksiktir ve bu türlerin PH ile ilişkili nörode üretken süreçte önemli olabileceğini düşündürmektedir (123).

Yağ asidinin indüklediği bu çalışmada, moleküler mekanizmayı ve lipid peroksidasyonuna bağlı ürünlerin yapısal organizasyonunu tanımlamayı araştıran denemeler günümüzde devam etmektedir. Bu çalışma sonucunda,  $\alpha$ syn moleküllerinin DHA'nın toplanmasında önemli bir rol oynadığını gözlenmiştir

Liu ve ark (124), bir denemesinde, PH mekanizmasında, beyinde polidoymamış yağ asitlerinden elde edilen dopamin katkı maddelerinin rolünü araştırmışlardır. Oksidatif stresin, PH'de dopaminerjik sistemlerin nörodejenerasyonunun patogeneğinde doğrudan rol oynadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, beyinde majör çoklu doymamış yağ asitleri olarak bilinen DHA ve AA'den türetilen dört dopamin modifikasyonu türetilmiştir. Dopaminin, yağ asidi hidroperoksitleri ile inkübasyonu ve sıçan beyin dokusunu kullanan bir *in vivo* deneyde, dört dopamin eklentisinin tümü tespit edilmiştir. Ayrıca, bir AA türevi eklenti olan heksanoil dopamin (HED), insan dopaminerjik nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde ciddi sitotoksositeye neden olurken, diğer eklentiler sadece biraz etkilenmiştir. HED ile indüklenen hücre ölümünün, aynı zamanda reaktif oksijen türü oluşumu ve mitokondriyal anormalliğin aracılık ettiği görülen apoptozu içerdiği bulunmuştur (124).

Ek olarak, monoamin taşıyıcısından yoksun olan monoamin taşıyıcı inhibitörü ve fare embriyonik fibroblast NIH-3T3 hücrelerini kullanan deneyler, HED-kaynaklı sitotoksitenin nöronal hücrelerde özel olarak meydana gelebileceğini göstermiştir. Bu veriler, nöronal hücrelerin selektif sitotoksitesine yol açan araşidonik asit-türevi dopamin modifikasyon eklentisi olan *in vivo* ve *in vitro* dokosaheksanoik asit ve araşidonik asit türevli dopamin katkısının oluşmasının, yeni bir mekanizmaya işaret edebileceğini düşündürmektedir (124).

Özet olarak, DHA ve AA'dan türetilen dört dopamin eklentisini sentezlenmiş ve lipid hidroperoksitlerin dopamin ile reaksiyonu sırasında *in vivo* oluşumunu ortaya çıkarılmıştır. İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde ROS oluşumu ve apoptozun önemli indüksiyonuna dayanan güçlü bir nörotoksin olarak AA-türevli bir

dopamin eklentisi olan HED'i gözlemlemişlerdir. HED ile indüklenen apoptozisin mekanizması tam olarak bu çalışmada saptanmamıştır; Bununla birlikte, ROS üretimi, mitokondriyal anormallikler ve monoamin taşıyıcısı tarafından aracılık edilmektedir. HED ile indüklenen sitotoksosite, bu çalışmada bir *in vitro* deney sistemi ile teyit edilmiştir ve insan deneklerin varlığını ve sitotoksitesini gösteren daha ileri çalışmalar gereklidir (124).

Assayag ve ark (125), PH'de ilerleyici dopaminerjik nöron kaybı, sitoplazmik protein  $\alpha$ syn'nin, nöronal somata (Lewy cisimcikleri) ve dendritlerde (Lewy neurites) bulunan filamentöz inklüzyonlara polimerizasyonu olduğu bilgisine dayanarak çalışmada, çoklu doymamış yağ asitlerinin  $\alpha$ syn üzerindeki patojenik değişikliklerini incelemişlerdir. Daha önce, doymamış yağ asitleri ile muamele edilmezken, PUFA'lar ile  $\alpha$ syn eksprese eden dopaminerjik hücrelerin tedavi edilmesinin, çözünür, sodyum dodesil sülfat-kararlı oligomerlerin oluşumunu indüklediğini bulmuşlardır.

Bu çalışmada,  $\alpha$ syn-PUFA etkileşimlerinin Parkinson hastalığı benzeri sitopatolojinin gelişimiyle olan ilişkisini incelenmiştir. Bir PUFA'nın fizyolojik seviyelerine  $\alpha$ syn aşırı ifade eden dopaminerjik veya nöronal hücre çizgilerinin maruz kalması, sitoplazmada proteinli inklüzyonların oluşumunu indüklemiştir. Önemli olarak,  $\alpha$ syn oligomerlerinin sito-toksosite ile ilişkili olduğunu bulmuşlar, buna karşın Lewy benzeri inklüzyonların gelişmesi koruyucu görünmektedir. PUFA düzeylerindeki değişikliklerin,  $\alpha$ syn'nin agregasyonuna ve sonradan dopaminerjik hücrelerdeki inklüzyonlardan önce gelen potansiyel sitotoksik oligomere birikmesine yol açabileceği sonucuna ulaşmışlardır (125).

Saflaştırılmış  $\alpha$ syn ve spesifik Fas yüksek molekül ağırlıklı komplekslerin oluşumu, *in vitro* saflaştırılmış bileşenler kullanılarak bu çalışma ile tespit edilmiştir. FABP'lere benzer şekilde,  $\alpha$ syn nin hücrel YA alımı ve metabolizmasında rol oynadığı öne sürülmüştür. Spesifik olarak, değiştirilmiş YA alımı ve metabolizma ile aşılabilir  $\alpha$ syn olmayan farelerde gözlenmiştir (125). Bununla birlikte, titrasyon mikrokolorimetri kullanılarak  $\alpha$ syn 'nin 16:0 veya 18:1'e sabit bağlanması saptanmamıştır. Bu noktada,  $\alpha$ syn 'nin, klasik FABP'lere benzer fakat benzer olmayan yollarla YA'ler ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır, fakat genel olarak lipitler

ve özellikle YA ile *asyn* etkileşimlerinin doğasını anlamak için daha fazla biyokimyasal çalışma gereklidir (125).

Bousquet ve ark (126), yaptıkları bir çalışmada, transgenik PH'nin fare modelinde omega-6'nın omega-3 yağ asitlerine transgenik dönüşümünü incelemişlerdir. PH'nin toksin kaynaklı fare modelinde, omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri (n-3 PUFA) için nöroprotektif bir rolleri incelemiştir.

Deneyler sonucunda elde ettikleri bu gözlemler sonucu, düşük n-3 PUFA alımının PH için değiştirilebilir bir çevresel risk faktörü olduğunu düşündürmüştür. Bu klinik öncesi bulguları klinik çalışmaların ön koşulu olarak güçlendirmek için, n-3 PUFA'ları n -3'e dönüştüren bir n -3 yağ asiti desaturazı ifade eden transjenik bir model olan Fat-1 farelerinde n-3 PUFA'ların nöroprotektif fonksiyonları araştırılmıştır. PUFAlar. Burada, yağ-1 transgeninin ekspresyonunun kortikal n -3: n -6 PUFA oranını (+% 28) artırdığını, ancak diyet desteğinden (% 92) daha az bir oranda artırdığını saptamışlardır (126).

Deneyler esnasında, Fat-1 faresinde n-3 PUFA'ların böyle sınırlı bir endojen üretimi, dopamin seviyeleri, tirozin hidroksilaz (TH) ile değerlendirildiği üzere 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin nörotoksitesine karşı nöroproteksiyon sağlamaya yetersiz olduğu için, nigral *Nurr1* ve dopamin taşıyıcı (DAT) mRNA ekspresyonunun yanı sıra pozitif nöronlar ve lifler göz önüne alınmıştır. Bununla birlikte, daha yüksek kortikal DHA konsantrasyonları, *Nurr1* ve DAT mRNA seviyelerine ek olarak TH-pozitif hücre sayısı gibi nigral dopaminerjik nöronların belirteçleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu çağrışımlar, bir fare PH modelinde DHA'nın koruyucu rolü ile tutarlılık göstermiştir (126).

Bu veriler önceden oluşturulmuş bir DHA takviyesinin diyet alımının beyine ulaşmada ve bir PH modelinde nöro-koruma sağlamasında daha etkili olduğunu göstermektedir. Sonuçta bu denemede, yağ-1 transgeninin n-3 PUFA üretme kapasitesini doğruladığı ve böylece beyin n-3: n-6 PUFA oranını arttırdığı görülmüştür.

Doris ve ark (127), çalışmasında ile *asyn* PH'nin patogeneze katkıda bulunduğunu, ancak bozukluğun ve normal fonksiyonunun kesin rolü hala yeterince bilinmediği için lipidlerin ile *asyn*'lerde sinaptik lokasyonları ile ilgili deneme yapmışlardır. Nörotransmitter salınımında ve PH'nin distrofik nevitlerinde belirgin

birikiminde varsayılan rol ile tutarlı olan  $\alpha$ syn neredeyse sadece sinir terminaline lokalize olmaktadır. Bununla birlikte, beyin ekstrelerinde,  $\alpha$ syn, çözünür, monomerik bir protein olarak davranır.  $\alpha$ syn ile hücre zarları arasındaki ilişkiyi karakterize etmek için bir bağlanma tahlilini kullanarak,  $\alpha$ syn'in, lipid sallarının bileşenleri için çift etiketli karakteristik hücre içi yapılara yüksek bir afinite ile ve doyurucu bir şekilde bağlandığını gözlemlemiştir.

Biyokimyasal analizler,  $\alpha$ syn ile deterjan dirençli membranların etkileşimini göstermiştir ve sal ilişkili proteinin elektroforetik mobilitesinde bir değişimi ortaya çıkarmıştır. Ek olarak, PH ile ilişkili A30P mutasyonu,  $\alpha$ syn ile lipid sallar arasındaki etkileşimi bozar. Dahası, hem A30P mutasyonunun hem de sallantının bozulmasının  $\alpha$ syn ünitesini sinapslardan uzatarak,  $\alpha$ syn normal fonksiyonunda ve PH'nin patogenezindeki rolünün önemli bir rol oynadığını göstermiştir (127).

PH, orta beyin dopaminerjik nöronların progresif kaybı ile karakterizedir ve motor disfonksiyonları ile sonuçlanır. Çoğu PH doğası gereği sporadik iken, önemli bir alt grup otozomal dominant veya resesif mutasyonlara bağlanabilir. E3 ubiquitin ligazını kodlayan PARK2 , parkin, otozomal resesif erken başlangıçlı PH'da en sık mutasyona uğramış genidir. Yakın zamanda, PINK1,  $\alpha$ syn, LRRK2 ve DJ-1 gibi PH ile ilişkili gen ürünlerinin yanı sıra lipid sallar ile birlikte parkin ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ve bu proteinlerin lipid raflarında işlev bozukluğunun nedensel bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgilere dayanarak Seon ve ark (128), Parkinson, lipid sallar ile ilişkili proteinler ve parkin arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Birçok nörodejeneratif hastalıkta lipid sallarında değişiklik olduğunu göstermektedir. Lipit kompozisyonundaki değişiklikler AH ve PH insan beyin korteksinden lipid sallarında saptanmıştır. AH ve amiyotrofik lateral skleroz fare modellerinde lipid sallar proteinlerindeki değişiklikler de gözlenmiştir. Bu gözlemlere ve çeşitli çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, değişmiş lipid sallar organizasyonu, birçok nörodejeneratif hastalığın ortak nedensel faktörü olduğu öne sürülmüştür (128) .

Bu çalışmada, cav-1'i parkinin yeni bir substratı olarak tanımlanmıştır. Cav-1, lipid sallarının bir alt kümesi olan caveolae'nin ana yapısal protein bileşenidir. Lipid sallarının ana yapısal protein bileşenleri arasında, cav-1'in parkin ekspresyonunu baskılayan parkin KO MEF hücrelerinde ve birincil nöronlarda spesifik olarak

biriktiğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, WT parkinin degradasyonu için cav-1 ubiquitinated olduğunu gösterdik. Cav-1'in N-terminal bölgesinin sadece ubiquitinli olduğu bildirilmiştir bu da parkinin cav-1'in N-terminal lizin kalıntılarından herhangi birini ubiquitinate olabileceğini düşündürmektedir (128).

Yağ asitleri, daha kompleks lipidlerin temel yapı taşlarıdır ve farklı lipid türlerindeki bileşimleri, lipid metabolizmasında hastalık ve fizyolojik pertürbasyonları incelerken sıklıkla lipid sınıfında karşılaştırma için bir araç olarak kullanılır. Doymuş yağ asitlerinin, koroner kalp hastalığı, ateroskleroz, yağlı karaciğer hastalığı, enflamatuvar hastalıklar ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklar için artan bağıl risklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (129).

Metil palmitat, endojen doğal olarak oluşan bir yağ asidi metil esterdir (130). Bu bileşiğin, TNF- $\alpha$  ve NO salgılanmasını inhibe ederek enflamatuvar sürecin düzenlenmesinde önemli rol oynayan karaciğerin makrofajları olan Kupffer hücrelerini inhibe etme kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir (131-132). Metil palmitatın, çoklu pathway yoluyla güçlü anti-enflamatuvar ve anti-fibrotik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (133).

Bunun haricinde obezite, yağsız dokularda lipid birikimi ile sonuçlanan yüksek seviyelerde serbest yağ asitleri (sYA) ile ilişkilidir. Endoplazmik retikulum (ER) stresinin indüklenmesi lipid toksisitesi için önerilen bir mekanizmadır. ER protein ve lipid biyosentezlerinde rol oynayan önemli bir hücre organelidir. Çalışmalar, eklem dokusu ve sinoviyal sıvının serbest yağ asitleri ile osteoartrit şiddeti düzeyleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (134). J. Haywood ve R.R. Yammani (135) çalışmasında menisküs hücrelerinin palmitat tedavisi, ER stresinin pro-apoptotik bir molekülü ve markörü olan CHOP ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Palmitat aynı zamanda JNK'yi aktive ettiği görülmüş ve Ire1 $\alpha$  sinyali ile kaspaz-3'ün indüklü ekspresyonunu aktive ettiği göstermişlerdir.

Cai P ve ark. (136) metil palmitatın (MP) Kupffer hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiğini gösterilmiştir. MP ümit verici bir I $\kappa$ B fosforilasyon inhibitörüdür ve Kupffer hücre fonksiyonunu baskıladığı göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmalarında ise MP'nin peritoneal makrofajları inhibe edebildiğini ve bu nedenle genel olarak makrofajları inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir (137). Bizim çalışmamızda ise plm farelerde 3 aylıkta normal seviyelerde iken 6ncı ayda bir ivme

gösterip 12inci ayda tekrar 3 aylık değerine yakın değerlere düştüğü görülmektedir. PARK farelerde ise 3üncü ayda oldukça yüksek seviyelerde görülüp 6ıncı ve 12nci ayda hızlı bir düşüş göstermektedir. Literatürde gösterilen MP'nin anti-enflamatuar ve anti fibrotik etkilerini düşündüğümüzde parkinson farelerde 3üncü ayda büyük bir anti enflamatuar etki gösterdiği ancak hastalığın ana etkilerinin ortaya çıktığı 12nci aya bu etkinin azaldığını söyleyebiliriz. Kupffer hücrelerinde yaptığı gibi TNF- $\alpha$  ve NO salgılanmasını inhibe ederek enflamatuar sürecinde rol oynadığı göz önüne alınırsa parkinson farelerde enflamatuar sürecinde belli moleküller tarafından bu inhibisyonun engellendiği söylenebilir. Buna ek olarak Sharawy ve ark (138) yaptıkları çalışmada MP silika kaynaklı akciğer fibrozu üzerindeki etkilerini ve olası mekanizmalarını ortaya çıkarmışlardır. Sonuç olarak MP'nin antioksidan ve güçlü antiinflamatuar ve anti-fibrotik etkileri olduğunu tekrar desteklemişlerdir (139).

Yağ asidi metabolizmasına yönelik araştırmaların çoğunluğu, insanlarda toplam yağ asidi plazma konsantrasyonunun >% 99'unu temsil ettiğinden, esas olarak zincir yağ asitleri 2–26 karbon zinciri uzunluğu üzerinde gerçekleştirilmiştir [140]. Bununla birlikte, insan dokusunda saptanabilir miktarda tek zincirli yağ asitleri de vardır. Düşük konsantrasyonun bir sonucu olarak, sadece dört önemli ölçüde ölçülebilir tek zincirli yağlı asitler vardır, C15: 0, C17: 0, C17: 1 ve C23: 0.

Örneğin Holman ve ark. [141], hem C15: 0 hem de C17: 0'in multiple skleroz gelişimi için azaltılmış risk ile ilişkili olduğunu ve bunun da yağ asitlerinin membranların akışkanlığını polidoymamış yağ asitleri ile benzer derecede arttırdığını düşündüklerini belirtmişlerdir.

Şu anda AH'da iki temel role sahip oldukları bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) rolüne giren büyük miktarda araştırma vardır (142-144); ilk olarak nörotransmisyon ve prostaglandin oluşumu ve ikinci olarak membran akışkanlığının geliştirilmesidir.

Fonteh ve ark. (145), bir kontrol grubuna kıyasla, AH'nda tekli doymuş yağ asidi doku düzeylerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Tekli doymuş yağ asitlerini membran akışkanlığını PUFA'dan daha fazla arttırdığının fark edilmesiyle, Alzheimer hastalığı için bir tedavi şekli olarak tekli doymuş yağ asitlerin uygulanması bir olasılık olabilir savını sunmuşlardır.

Buna ek olarak Gozzo ve ark. (146) tekli doymuş yağ asitlerinin plasenta bariyerini geçerek emziren memelilerin sütüne geçebildiğini göstermiştir. Bu yağ asitlerinin ayrıca serebral endoteli (kan-beyin bariyerini) geçme ve gestasyonel ve erken postnatal beyin gelişimini etkileme olasılığı vardır.

Bizim çalışmamızda tekli doymuş yağ asitlerinin C15 ve C17'nin cis bağlarında değişiklik görülmüştür. C15:1'de yani cis 10 pentadekenoik asit seviyesinde ve C17:1 yani cis 10 heptadekenoik asit park farelerde plm farelere kıyasla daha düşük seviyelerde olduğu gösterilmektedir. Fonteh ve ark (145) AH'da yaptığı çalışmaya benzer olarak PH'de da bu yağ asitlerinin düşük seviyelerde olduğu görülmektedir.

Diakogiannaki ve ark. (147) 2007 yılında yaptığı pankreatik  $\beta$  hücrelerinde ki çalışmaya göre uzun zincirli doymuş yağlı asit palmitatın,  $\beta$ -hücresi apoptozunu kolayca desteklediğini gösterirken, tekli doymamış palmitoleat, potansiyel olarak sitoprotektiftir.

Nötr lipit sentezinde (özellikle triaçilgliserol (TAG) formasyonunda) değişikliklerin, doymuş ve doymamış yağ asitlerine olan farklı tepkilere aracılık edebileceği ve bu önermeyi ileri sürmüşlerdir. Palmitat ve palmitoleate hem  $\beta$ -hücre fosfolipid yeniden modellemesini hem de artmış TAG oluşumu teşvik etmişlerdir.

Buna karşılık, metil-palmitoleat TAG seviyelerini veya palmitata maruz kalan  $\beta$ -hücrelerindeki yağlı asit kompozisyonunu etkilemede başarısız olmuştur. Sonuçlar, tekli doymamış yağ asitlerinin, metabolizma gerektirmeyen ve TAG oluşumundaki değişikliklerden bağımsız bir mekanizma ile hücre canlılığını ve mitojenezini destekleyebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmadaki sonuçlara göre ise literatüre destek verecek şekilde metil palmitoleatın park farelerde miktarının arttığı görülmektedir.

Bu çalışmada, literatür çalışmalarına ek olarak, transgenik Parkinson fare beyinlerindeki lipit değişimleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında deney hayvanları kullanılmış ve hayvanların üretim kafesleri oluşturulup, davranış analizleri yapılmıştır. Open Field Testi baz alınarak açık alan testleri yapılmıştır. Açık alan testleri için t test ve rota-rot testleri kullanılmıştır. Analiz sonucunda, PH modeli fareleri açık alan testlerine göre belirgin farklılık göstermeseler de, Parkinson fare modeli için motor becerilerin kontrolü için belirleyici yöntem olan Rota-rod testi sonucunda her grup içinde yapılan t-test sonuçları  $p < 0.05$  olarak belirlenmiştir. 1

aylık hasta farelerin corteks bölgesinde cis-4,7,10,13,16,19-docosaheenoik acid methyl ester kontrole göre 4 kat arttığı gözlenmiştir. Hastalığın ana belirtilerinin 24'üncü aydan itibaren görüldüğü düşünüldüğünde buna rağmen 12 aylık farelerdeki yağ asit değişiminin önemli olduğu görülmektedir.

Çalışmanın temel sonucu olarak, istatikselsel olarak anlamlı yağ asidi metil esterlerinden MP'nin anti-inflamatuar etkisi göz önüne alınarak miktarının 12'inci ayda büyük bir ivme gösterdiği, metil palmitoleatenin sitoprotektif etkisiyle park farelerde 12'inci ayda ivme gösterdiği ve cis 10 pentadekenoik ve cis 10 heptadekenoik asit miktarında park farelerde azalma olduğu görülmüştür.

Bu çalışma, PH patolojisinde gözlemlenen lipid profili değişimlerinin, transgenik PH modellerinde henüz çalışılmadığı için özgündür ve asyn ile ilişkili literatüre kaynaklık edecektir. Bu çalışma ile yağ asidi profillerinin PH'nda ne gibi değişiklikler gösterdiği saptanmıştır ve elde edilen sonuçlarPH patogenezi ve yağ asitleri arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik diğer çalışmalara öncülük edecek önemli veriler sunmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Bendor, J., Logan, T. & Edwards, R.H., 2013. The Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Neuron*, 79(6), pp.1–43.
2. Farmer, K. et al., 2015. Major Alterations of Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine Lipids in the Substantia Nigra Using an Early Stage Model of Parkinson's Disease. , pp.18865–18877.
3. Xiao-Hong Lu, Sheila M. Fleming, Bernhard Meurers, Larry C. Ackerson, Farzad Mortazavi, Victor Lo, Daniela Hernandez, David Sulzer, George R. Jackson, Nigel T. Maidment, Marie-Francoise Chesselet, and X. William Yang, BAC Transgenic Mice Expressing a Truncated Mutant Parkin Exhibit Age dependent Hypokinetic Motor Deficits, Dopaminergic Neuron Degeneration, and Accumulation of Proteinase KResistant Alpha-Synuclein.. *NIH Public Access*. 2010, 29(7), pp.1962–1976.
4. Kubo, S. & Kubo, S., 2015. Expert Opinion on Therapeutic Targets Membrane lipids as therapeutic targets for Parkinson's disease : a possible link between Lewy pathology and membrane lipids. , *Expert opin. Ther. Targets* September 2015.
5. Noemí Fabelo, Virginia Martín, Gabriel Santpere, Raquel Marín, Laia Torrent, Isidre Ferrer, and Mario Díaz.,2011. Severe Alterations in Lipid Composition of Frontal Cortex Lipid Rafts from Parkinson's Disease and Incidental Parkinson's s. , 7(12).124
6. Raquel Marin, Noemí Fabelo, Virginia Martín, Paula Garcia-Esparcia, Isidre Ferrer, David Quinto-Alemaný , Mario Díaz., 2017. Anomalies occurring in lipid profiles and protein distribution in frontal cortex lipid rafts in dementia with Lewy bodies disclose neurochemical traits partially shared by Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurobiology of Aging* 49 (2017) 52-59
7. Tamara Pringsheim, Nathalie Jette, Alexandra Frolkis, and Thomas D.L. Steeves, 2014. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13), pp.1583–1590.

8. Rappley, I., Myers, D.S., Milne, S.B., Ivanova, P.T., Matthew, J., Brown, H.A. & Selkoe, D.J., 2010. Lipidomic Profiling in Mouse Brain Reveals Differences Between Ages and Genders, with Smaller Changes Associated with  $\alpha$ -Synuclein Genotype. NIH Public Access. , 111(1), pp.15–25.
9. Burré J, Sharma M, & Sudhof TC (2015) Definition of a molecular pathway mediating  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity. *J Neurosci*, 35, 5221-5232.
10. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 90: 11282 – 11286.
11. Beyer K, Ariza A., 2013. Alpha-synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 2013;47:509.
12. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 2007;103:17–37
13. Levithan K, Chereau D, Cohen SI et al. Conserved Cterminal charge exerts a profound influence on the aggregation rate of alphasynuclein. *J Mol Biol* 2011;411:329– 33.
14. Castagnet PI, Golovko MY, Barcelo-Coblijn GC, Nussbaum RL, Murphy EJ: Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *J Neurochem* 2005, 94:839–849
15. Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A: Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 2006, 60:389 –398.
16. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM: Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998, 273:9443–9449
17. Maroteaux L, Scheller RH: The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res* 1991, 11:335–343.
18. Sharon R, Bar-Joseph I, Frosch MP, Walsh DM, Hamilton JA, Selkoe DJ: The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 2003, 37:583–595.
19. Lucke C, Gantz DL, Klimtchuk E, Hamilton JA: Interactions between fatty acids and alpha-synuclein. *J Lipid Res* 2006, 47:1714–1724.
20. Cole NB, Murphy DD, Grider T, Rueter S, Brasaemle D, Nussbaum RL: Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002, 277:6344 – 6352.
21. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD,

- Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S: Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models *Science* 2006, 313:324–328.
22. Castagnet PI, Golovko MY, Barcelo-Coblijn GC, Nussbaum RL, Murphy EJ: Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *J Neurochem* 2005, 94:839–849.
23. Murphy EJ: Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry* 2005, 44:8251–8259.
24. Barcelo-Coblijn G, Golovko MY, Weinhofer I, Berger J, Murphy EJ: Brain neutral lipids mass is increased in alpha-synuclein gene-ablated mice. *J Neurochem* 101:134–142.
25. Barcelo-Coblijn G, Kitajka K, Puskas LG, Hogyes E, Zvara A, Hackler Jr L, Farkas T: Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1632:72–79.
26. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K: Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003, 302:841.
27. Hamilton JA, Kamp F: How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 1999, 48:2255–2269.
28. Nelson D, Cox M: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2000, Chapter 17, pp 599–622. New York, Worth Publishers.
29. Hamilton JA: Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999, 60:291–297.
30. Ellis CE, Murphy EJ, Mitchell DC, Golovko MY, Scaglia F, Barcelo-Coblijn GC, Nussbaum RL: Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Mol Cell Biol* 2005, 25:10190–10201.
31. Breydo L, Wu JW, Uversky VN. Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:261–85.
32. Mclean PJ, Hyman BT. An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation. *Neurosci Lett* 2002;323:219–23.
33. Jellinger KA. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord* 2012;27:8–30.
34. Uversky VN, Eliezer D. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of alpha-synuclein. *Curr Protein Pept Sci* 2009;10:483–99.

35. Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, et al. Clinical and quantitative pathologic correlates of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 1999;53(6):1284-9.
36. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP (2010) The genetics of parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:228–242.
37. Gasser T (2010) Identifying PD-causing genes and genetic susceptibility factors: current approaches and future prospects. *Prog Brain Res* 183:3–20.
38. Gasser T (2009) Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med* 11:E22.
39. Braak H, Del Tredici K, Ru'b U,. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24(2):197-211.
40. Braak H, Sastre M, Bohl JR, et al. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 2007;113(4):421-9.
41. Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, et al. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(Suppl 3):S1-5
42. Jellinger KA. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J Neurol Sci* 2011;310(1-2):107-11.
43. Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, et al. Clinical and quantitative pathologic correlates of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 1999;53(6):1284-9.
44. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron* 2013;79(6):1044-66.
45. Lee SJ, Masliah E. Neurodegeneration: aggregates feel the strain. *Nature* 2015;522(7556):296-7.
46. Fabelo NV, Martin G, Santpere R. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* 2011;17:1107-18.
47. Abbott SK, Li H, Mun'oz SS. Altered ceramide acyl chain length and ceramide synthase gene expression in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014;29(4):518-26.
48. Burr'e J (2015) The synaptic function of  $\alpha$ -synuclein. *J Parkinsons Dis*, 5, 699-713.
49. Burr'e J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, & S'udhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329, 1663-1667.
50. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønberg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Br'ugger B, Ringler P, M'uller SA, Rammner B, Gr'ater F, Hub JS, De Groot

- BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, & Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127, 831-846.
51. Ruiperez V, Darios F, Davletov B (2010) Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res* 49: 420-428. doi: 10.1016/j.plipres.2010.05.004 PMID: 20580911
52. Ouberai MM, Wang J, Swann MJ, Galvagnion C, Guilliams T, Dobson CM, & Welland ME (2013)  $\alpha$ -Synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling. *J Biol Chem*, 288, 20883-20895.
53. C. Galvagnion / The Role of Lipids Interacting with  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 7 (2017) 433–450 DOI 10.3233/JPD-171103
54. Garten M, Prévost C, Cadart C, Gautier R, Bousset L, Melki R, Bassereau P, & Vanni S (2015) Methyl-branched lipids promote the membrane adsorption of  $\alpha$ -synuclein by enhancing shallow lipid-packing defects. *Phys Chem Chem Phys*, 17, 15589-15597.
55. Rhoades E, Ramlall TF, Webb WW, & Eliezer D (2006) Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, 90, 4692-4700.
56. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, & George JM (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, 273, 9443- 9449.
57. Perni M, Galvagnion C, Maltsev A, Meisl G, Müller MB, Challa PK, Kirkegaard JB, Flagmeier P, Cohen SI, Cascella R, Chen SW, Limboker R, Sormanni P, Heller GT, Aprile FA, Cremades N, Cecchi C, Chiti F, Nollen EA, Knowles TP, Vendruscolo M, Bax A, Zaslhoff M, & Dobson CM (2017). A natural product inhibits the initiation of  $\alpha$ -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E1009-E1017.
58. Brown JW, Buell AK, Michaels TC, Meisl G, Carozza J, Flagmeier P, Vendruscolo M, Knowles TP, Dobson CM, & Galvagnion C (2016)  $\alpha$ -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of  $\alpha$ -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Sci Rep*, 6, 36010.
59. Zhu M, Li J, & Fink AL (2003) The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *J Biol Chem*, 278, 40186- 40197.
60. Galvagnion C, Brown JW, Ouberai MM, Flagmeier P, Vendruscolo M, Buell AK, Sparr E, & Dobson CM (2016) Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 7065-7070.

61. GreyM, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, & Linse S (2015) Acceleration of  $\alpha$ -synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem*, 290, 2969-2982.
62. Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, & Schapira AH (2016). Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: Relevance to Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 25, 3432-3445
63. Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P Jr, Lerner RA, & Kelly JW (2006) Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrillization. *Nat Chem Biol*, 2, 249-253
64. Sharon R, Bar-Joseph I, Mirick GE, Serhan CN, & Selkoe DJ (2003) Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem*, 278, 49874- 49888
65. Galvagnion C, Buell AK, Meisl G, Michaels TC, Vendruscolo M, Knowles TP, & Dobson CM (2015). Lipid vesicles trigger  $\alpha$ -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat Chem Biol*, 11, 229-234.
66. GreyM, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, & Linse S (2015) Acceleration of  $\alpha$ -synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem*, 290, 2969-2982.
67. Martinez Z, Zhu M, Han S, & Fink AL (2007) GM1 specifically interacts with alpha-synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemistry*, 46, 1868-1877.
68. De Franceschi G, Frare E, Pivato M, Relini A, Penco A, Greggio E, Bubacco L, Fontana A, & de Laureto PP (2011) Structural and morphological characterization of aggregated species of  $\alpha$ -synuclein induced by docosahexaenoic acid. *J Biol Chem*, 286, 22262-22274.
69. Halliday, G. M., Ophof, A., Broe, M., Jensen, P. H., Kettle, E., Fedorow, H., Cartwright, M. I., Griffiths, F. M., Shepherd, C. E., and Double, K. L. (2005)  $\alpha$ -Synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain* 128, 2654– 2664.
70. Relini A, Marano N, Gliozzi A. Probing the interplay between amyloidogenic proteins and membranes using lipid monolayers and bilayers. *Advances in colloid and interface science*. 2014;207:81-92.
71. Ghio Stephanie, Kamp Frits, Cauchi Ruben, Giese Armin, Vassallo Neville, Interaction of  $\alpha$ -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease – role of cardiolipin, *Prog Lipid Res*. 2016 Jan;61:73-82.
72. Schulz-Schaeffer, W.J., 2010. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol*. 120,

131-143.

73. Halliday, G. M., Holton, J. L., Revesz, T., and Dickson, D. W. (2011) Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 122, 187–204.

74. Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2000) Synucleins are developmentally expressed, and  $\alpha$ -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20, 3214–3220.

75. Bussell, R., Jr., and Eliezer, D. (2003) A structural and functional role for 11-mer repeats in  $\alpha$ -synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 329, 763–778.

76. Bussell, R., Jr., and Eliezer, D. (2004) Effects of Parkinson's disease-linked mutations on the structure of lipid-associated  $\alpha$ -synuclein. *Biochemistry* 43, 4810–4818.

77. Bodner, C. R., Maltsev, A. S., Dobson, C. M., and Bax, A. (2010) Differential phospholipid binding of  $\alpha$ -synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. *Biochemistry* 49, 862–871.

78. Dunning, C. J., Reyes, J. F., Steiner, J. A., and Brundin, P. (2012) Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Prog. Neurobiol.* 97, 205–219.

79. Danzer, K. M., Kranich, L. R., Ruf, W. P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A. R., Zhu, L., Vanderburg, C. R., and McLean, P. J. (2012) Exosomal cell-to-cell transmission of  $\alpha$ -synuclein oligomers. *Mol. Neurodegener.* 7, 42.

80. Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., and Hill, A. F. (2012) Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* 3, 124.

81. C. Galvagnion / The Role of Lipids Interacting with  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease

82. Zhu M, Fink AL. Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278:16873-7.

83. Lu XH, Fleming SM, Meurers B, Ackerson LC, Mortazavi F, Lo V, Hernandez D, Sulzer D, Jackson GR, Maidment NT, Chesselet MF, Yang XW. 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 Feb 18;29(7):1962-76.

84. <https://www.jax.org/strain/9090>. Erişim tarihi: 01.07.2018

85. E.U. Ehrmann, H.P. Dharmasena, K. Carney, E.B. Overton, J. Chromatogr. Sci. 34 (1996) 533.

86. M. van Deursen, J. Beens, C.A. Cramers, H. Janssen, J. High Resolut. Chromatogr. 22 (1999) 509.
87. T.A. Williams, M. Riddle, S.L. Morgan, W.E. Brewer, J. Chromatogr. Sci. 37 (1999) 210
88. T. Skov, d.B.F. van, G. Tomasi, R. Bro, J. Chemom. 20 (2007) 484.
89. M. van Lieshout, R. Derks, H. Janssen, C.A. Cramers, J. High Resolut. Chromatogr. 21 (1998) 583.
90. J. Luong, H. Cai, R. Gras, J. Curvers, J. Chromatogr. Sci. 50 (2012) 245.
91. J. Luong, R. Gras, H.J. Cortes, R.A. Shellie, J. Chromatogr. A 1261 (2012) 136.
92. A. Spietelun, A. Kloskowski, W. Chrzanowski, J. Namiesnik, Chem. Rev. 113 (2013) 1667.
93. A.B. Fialkov, M. Moragn, A. Amirav, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 9375.
94. Miwa, T. K., Mikolajczak, K. L., Earle, F. R., Wolff, I. A., Gas chromatographic characterization of fatty acids. Anal. Chem. 1960, 32, 1739–1742.
95. Henly, R.S., Royer, D.J.; Preparative gas chromatography; Methods in Enzymology, (1969); 14: 450–464.
96. Bai, P., Shao, X.X., Yi, B.Z.; Study on separating process of gas liquid chromatography using wire mesh as carrier; Science & Technology in Chemical Industry, (2007); 15: 29–31.
97. Ball, G.I., Xu, L., McNichol, A.P., Aluwihare, L.I.; A two-dimensional, heart-cutting preparative gas chromatograph facilitates highly-resolved single-compound isolations with utility towards compound-specific natural abundance radiocarbon (<sup>14</sup>C) analyses; Journal of Chromatography A, (2012); 1220: 122–131.
98. Wang A., Tolley HD., Lee ML. Gas chromatography using resistive heating technology. 2012 Journal Chrom. A 1261
99. Zlatkis, A. (ed.). Preparative gas chromatography. Wiley- Interscience, New York, NY, (1971).
100. Mandalakis, M., Gustafsson, O. ; Optimization of a preparative capillary gas chromatography-mass spectrometry system for the isolation and harvesting of individual polycyclic aromatic hydrocarbons; Journal of Chromatography A, (2003); 996: 163–172
101. Title: Ionization-Based Detectors for Gas Chromatography Author: Colin F. Poole
102. D.J. David, Gas Chromatography Detectors, Wiley-Interscience, New York, 1974
103. Halasz I and Schneider W, 1961. Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Hydrocarbons with Capillary Column and Flame Ionization Detector., pp 978-982

104. Supelco GC Column Selection Guide Order: 800-325-3010 (U.S.) 814-359-3441 (Global). Sigma Aldrich
105. M. Dressler, *Selective Gas Chromatographic Detectors*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
106. Harold McNair and James Miller, *"Basic Gas Chromatography"* (1997), Wiley, ISBN 0-471-17261-8.
107. D.G. McMinn, H.H. Hill, *Detectors for Capillary Gas Chromatography*, Wiley, New York, 1992.
108. P. Larson, *Detectors for Quantitative Gas Chromatography*, in *Gas Chromatographic Techniques and Applications*, A.J. Handley, E.R. Adlard, Eds., Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 2001, p. 122-139
109. Dean Rood, *"A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems"* (1991), ISBN 3-7785-1898-4.
110. K. Schofield. The enigmatic mechanism of the flame ionization detector: Its overlooked implications for fossil fuel combustion modeling. *Prog. Energy & Combust. Sci.* 34 (2008) 330-350.
111. A.D. Jorgensen, K.C. Picel, V.C. Stamoudis. Prediction of gas chromatography flame ionization detector response factors from molecular structures. *Anal. Chem.* 62 (1990) 683-689.
112. Konrad Grob, *"Split and Splitless Injection in Capillary GC"* (1993), ISBN 3-7785-2151-9.
113. Konrad Grob, *"On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography"* (1991), Hüthig, ISBN 3-7785-2055-5.
114. Marvin McMaster and Christopher McMaster, *"GC/MS: A Practical User's Guide"* (1998), Wiley-VCH, ISBN 0-471-24826-6.
115. Konrad Grob, *"On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography"* (1991), Hüthig, ISBN 3-7785-2055-5.
116. William McFadden, *"Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis"* (1988), Robert E. Krieger Publishing Company, ISBN 0-89464-280-4.
117. Sertoğlu E, Kurt İ, Tapan S, Uyanık M, Serdar MA, Kayadibi H, Fawaeir S. "Comparison of plasma and erythrocyte membrane fatty acid compositions in patients with end-stage renal disease and type 2 diabetes mellitus" (2014), *Chemistry and Physics of Lipids* 178 (2014) 11–17.
118. Fahn S (2003) Description of Parkinson's disease as a Clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 1-14.

119. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, & Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 16, 653-661.
120. Violeta Ruipérez, Frédéric Darios I, Bazbek Davletov: Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Progress in Lipid Research* 49 (2010) 420–428.
121. Przedborski, S., Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005. 11 Suppl 1: p. S3-7.
122. Kuopio, A.M., et al., Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology*, 1999. 52(2): p. 302-8.
123. Franceschi G, Frare E, Pivato M, Reliniš A, Penco A, Greggio E, Bubacco L, Fontana A, and Laureto PP. Structural and Morphological Characterization of Aggregated Species of alpha-Synuclein Induced by Docosahexaenoic Acid, Published, *JBC Papers in Press*, April 28, 2011
124. Liu X, Yamada N, Maruyama W, and Osawa T. Formation of Dopamine Adducts Derived from Brain Polyunsaturated Fatty Acids July 24, 2008, Published, *JBC Papers in Press*
125. Karen Assayag, Evgenia Yakunin, Virginie Loeb, Dennis J. Selkoe, and Ronit Sharon. Polyunsaturated Fatty Acids Induce Synuclein Related Pathogenic Changes in Neuronal Cells *The American Journal of Pathology*, Vol. 171, No. 6, December 2007 American Society for Investigative Pathology DOI: 10.2353/ajpath.2007.070373.
126. Melanie Bousquet, Karl Gue, Vincent Emond, Pierre Julien, Jing X. Kang, Francesca Cicchetti, and Frederic Calon. Transgenic conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids in a mouse model of Parkinson's disease. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc *Journal of Lipid Research* Volume 52, 2011.
127. Doris L. Fortin, Matthew D. Troyer, Ken Nakamura, Shin-ichiro Kubo, Malcolm D. Anthony and Robert H. Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of  $\alpha$ -Synuclein. *Edwards Journal of Neuroscience* 28 July 2004, 24 (30) 6715-6723; DOI: .1594-04.2004.263.
128. Seon-Heui Cha, Yu Ree Choi, Cheol-Ho Heo, Seo-Jun Kang, Eun-Hye Joe, Ilo Jou, Hwan-Myung Kim, and Sang Myun. Loss of parkin promotes lipid rafts-dependent endocytosis through accumulating caveolin-1: implications for Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 63.
129. DeWitt DC, Rhoades E. alpha-Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry*. 2013; 52:2385–2387.
130. Maha H. Sharawy, Dina S. El-Agamy, Asem A. Shalaby, El-Sayed M. Ammar: Protective effects of methyl palmitate against silica-induced pulmonary

- fibrosis in rats. *International Immunopharmacology* 16 (2013) 191–198
131. Cai P, Kaphalia BS, Ansari GAS. Methyl palmitate: inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells. *Toxicology* 2005;210:197–204.
132. Sarkar S, Khan MF, Kaphalia BS, Ansari GA. Methyl palmitat inhibits lipopolysaccharide-stimulated phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *J Biochem Mol Toxicol* 2006;20:302–8
133. El-Demerdash E. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of methyl palmitate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;254:238–44.
134. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism* 1991;40:571-6
135. J. Haywood, R.R. Yammani. Free fatty acid palmitate activates unfolded protein response pathway and promotes apoptosis in meniscus cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 24 (2016) 942e945
136. Cai P, Kaphalia BS, Ansari GAS. Methyl palmitate: Inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells. *Toxicology* 2005;210:197–204.
137. Swapna Sarkar, M. Firoze Khan, Bhupendra S. Kaphalia, and G. A. S. Ansari: Methyl Palmitate Inhibits Lipopolysaccharide-Stimulated Phagocytic Activity of Rat Peritoneal Macrophages. *J Biochem Molecular Toxicology* Volume 20, Number 6, 2006
138. Maha H. Sharawy, Dina S. El-Agamy, Asem A. Shalaby, El-Sayed M. Ammar: Protective effects of methyl palmitate against silica-induced pulmonary fibrosis in rats. *International Immunopharmacology* 16 (2013) 191–198
139. Ulbricht, T.L.V.; Southgate, D.A.T. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* 1991, 338, 985–992.
140. Hodson, L.; Skeaff, C.M.; Fielding, B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid Res.* 2008, 47, 348–380.
141. Holman, R.T.; Johnson, S.B.; Kokmen, E. Deficiencies of polyunsaturated fatty acids and replacement by nonessential fatty acids in plasma lipids in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 4720–4724.
142. Bazinet, R.P.; Layé, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014, doi:10.1038/nrn3820.
143. Tan, Z.S.; Harris, W.S.; Beiser, A.S.; Au, R.; Himali, J.J.; Debette, S.; Pikula, A.; DeCarli, C.; Wolf, P.A.; Vasan, R.S.; et al. Red blood cell omega-3 fatty acid levels and markers of accelerated brain aging. *Neurology* 2012, 78, 658–664.

144. Torres, M.; Price, S.L.; Fiol-deRoque, M.A.; Marcilla-Etxenike, A.; Ahyayauch, H.; Barceló-Coblijn, G.; Terés, S.; Katsouri, L.; Ordinas, M.; López, D.J.; et al. Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosaehaenoic acid on Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* 2014, 1838, 1680–1692.
145. Fonteh, A.N.; Cipolla, M.; Chiang, J.; Arakaki, X.; Harrington, M.G. Human cerebrospinal fluid fatty acid levels differ between supernatant fluid and brain-derived nanoparticle fractions, and are altered in Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014, 9, e100519.
146. Gozzo, S.; Oliverio, A.; Salvati, S.; Serlupi-Crescenzi, G.; Tagliamonte, B.; Tomassi, G: Effects of dietary phospholipids and odd-chain fatty acids on the behavioural maturation of mice. *Food Chem. Toxicol.* 1982, 20, 153–157.
147. Eleftheria Diakogiannaki; Shalinee Dhayal; Caroline E Childs; Philip C Calder; Hannah J Welters and Noel G Morgan: Mechanisms involved in the cytotoxic and cytoprotective actions of saturated versus monounsaturated long-chain fatty acids in Pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Endocrinology* (2007) 194, 283–291

## **EK - DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU BELGESİ**



SAYI: HDK-2017/9  
KONU: ACU-HADYEK 2017/9 sayılı başvurunuz



15.02.2017

Sn. Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL

ACU-HADYEK 2017/9 sayılı "**Parkinson Hastalığında Nöronal Membran - Lipid Profili Değişimi**" isimli projeniz Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu'nun **13.02.2017** tarihli **32.** toplantısında incelenmiş ve etik olarak uygun bulunmuştur.

ACU-HADYEK 2017/9 sayılı karar ektedir.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Güldal Süyen".

Prof. Dr. Güldal SÜYEN

Acıbadem Üniversitesi  
Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu Başkanı



**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
KARAR FORMU**

<b>BAŞVURU TARİHİ:</b> 13.02.2017	<b>KARAR TARİHİ:</b> 13.02.2017		
<b>BAŞVURU SAYISI:</b> 2017/9	<b>KARAR SAYISI:</b> 2017/9		
<p>Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL'ın yürütücüsü olduğu "Parkinson Hastalığında Nöronal Membran - Lipid Profili Değişimi" isimli proje başvurusu Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun "13.02.2017" tarih ve "32" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Uygun   <input type="checkbox"/> Düzeltilmesi Gerekir   <input type="checkbox"/> Koşullu Olarak Uygun   <input type="checkbox"/> Uygun Değil</p> <p>olarak değerlendirilmiştir.</p>			
<b>Kurul Üyesi</b>	<b>İmza</b>	<b>Karara Katılıyorum</b>	<b>Karara Katılmıyorum</b>
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan)		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Figen Demir		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabiha Turgut Genç		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vet. Hek. Samed Özer (Sekreter)		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	ELİF	<b>Soyadı</b>	Kadioğlu
<b>Doğum Yeri</b>		<b>Doğum Tarihi</b>	27.02.1989
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Telefon</b>	5321380686
<b>E-mail</b>	kadioglu.elif@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
Yüksek Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
Lisans	Haliç Üniversitesi	2014
Lise	Orhan Cemal Fersoy Lisesi	2007

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi

Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

<b>Yabancı Dil Sınav Notu</b>									
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	DiĞER
		6.0							

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
ALES	64,32	65,25	63,71

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Microsoft Office	Çok iyi

