

Deneysel Parkinson Hastalığı Modelleri / *Animal Models of Parkinson's Disease*

Prof. Dr. İ. Tayfun Uzbay

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Etlik 06018 ANKARA

Parkinson disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease. It is the second most common neurodegenerative disease in humans over 55. PD is characterized for its four symptoms: Bradykinesia, akinesia, rigidity, and tremor (especially during breaks). Mental problems are also accompanied with other four symptoms. Lewy-bodies, which indicate neuronal death, may be seen in striatal dopaminergic neurons of patients. PD is directly associated with the dopaminergic neuronal damage in the nigrostriatal pathway, the largest dopaminergic pathway in brain. Dopamine, together with acetylcholine, is important in motor coordination.

Although there is not a certain etiological factor for PD, some centrally active toxins, such as CO, ethanol, methanol, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and also some agricultural chemicals, such as rotenone, maneb and paraquate produce PD-like symptoms.

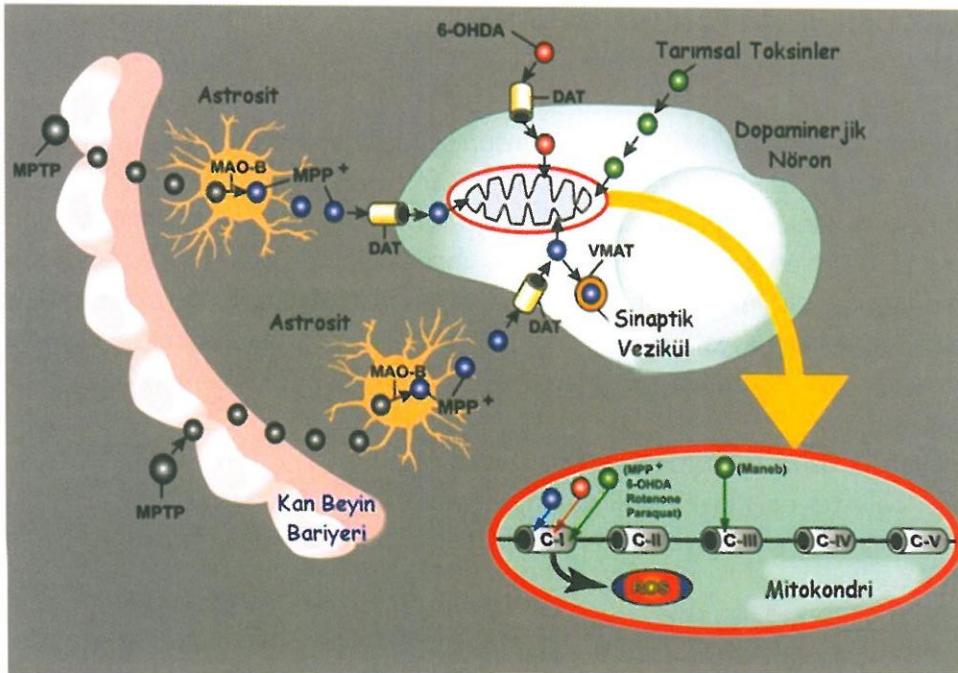
MPTP, 6-OHDA and rotenone selectively degenerate nigrostriatal dopaminergic neurons, and they are commonly used in order to produce PD models in experimental animals: MPTP-induced PD model is accepted as gold standard for PD researches. But MPTP is a highly toxic chemical also for the experimenters, and induces PD-like symptoms in primates much better than rodents. However 6-OHDA can produce a PD model in rodents. It is stereotaxically given into left of right medial forebrain bundle or substantia nigra. After 2 or 3 days, contralateral turning behaviors are counted. Although, Lewy bodies are not present in MPTP and 6-OHDA models, rotenone can induce production of them.

In the present workshop, it has been aimed to detailed investigation of experimental animal models of PD. Specific advantages and disadvantages of these models have also been discussed.

Parkinson hastalığı (PH) 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından tanımlanmış progressif nitelikli nörodejeneratif bir hastalıktır. Total populasyonda görülme sıklığı 1/1000 kadardır ve yaşlandıkça hastalığa yakalanma riski artar. PH,55 yaş üzerindeki insanlarda ikinci en sık rastlanan nörodejeneratif problemdir. Hastalık iradesel hareketlerde azalma (bradikinezi) veya bu hareketlerin yapılamaması (akinezi), kas katılığı (rijidite), özellikle istirahat halinde ortaya çıkan tremor ve postüral insitabilite ile birlikte ortaya çıkan yürüme güçlüğü gibi dört temel klinik belirti ile karakterizedir. Salya artışı, düşünme yeteneğinde azalma ve depresyon da sıklıkla bu belirtilere eşlik eder (1-4). Bazı PH'larında striatal dopaminerjik bölgedeki nöronlarda Lewy cisimciği adı verilen oluşumlar gözlenir ve bu hastalığı teşhisi için kullanılır. Bununla beraber Lewy cisimciği tüm Parkinson hastalarında her zaman gözlenen bir oluşum değildir. Lewy cisimciğinin oluşmasının nöron ölümüne bağlı olduğu kesindir ancak PH'nın teşhisindeki önemi tartışmalıdır (5).

PH beyinde tanımlanmış dopaminerjik yolların en büyüğü olan nigrostriatal yolda oluşan nöronal hasarlar ile doğrudan ilişkilidir. Bu yolak Substantia nigra'nın zona compacta bölgesindeki nöronların aksonlarından orijin alır, diensefalonda medyal ön beyin demeti içine girer ve Korpus striatumda sonlanır. Korpus striatumdaki uçları beyindeki total dopaminin yaklaşık %75'ini içerir. Yolaktaki nöronlarda oluşan dejenerasyona bağlı olarak yeterince dopamin üretilmemesi ve dopaminerjik etkinliğin azalması hastalığın başlıca nedenidir (2,3). Dopamin santral sinir sisteminde bir çok önemli görevinin yanısıra motor davranışlardan ve santral sinir sisteminde asetilkolin ile birlikte motor eşgüdümün sağlanmasından da sorumlu katekolamin yapısında önemli bir nörotransmitterdir. Özellikle beyin striatum bölgesinde dopaminerjik etkinliğin aşırı artması Kore ve Tourette sendromu gibi hiperkinezilere neden olurken, bu bölgedeki azalmış dopaminerjik etkinlik çeşitli distonilere ve PH'na neden olmaktadır (3).

Hastalığın etiyojisi henüz net olarak belirlenebilmiş değildir. Bununla beraber, karbon monoksit, manganez, cıva, siyanür, metanol, etanol, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) santral toksinler ile rotenon başta olmak üzere maneb ve paraquat gibi tarımda koruyucu olarak kullanılan kimyasal maddelerle intoksikasyonun PH'na neden olabileceği yolunda bilimsel kanıtlar mevcuttur (4,6). Genetik nedenlerin de hastalığın ortaya çıkmasında katkısı olabilir. Son zamanlarda gerçekleştirilen



Şekil 1. Mitochondriyal elektron transfer zincirinde inhibisyon ile etkili olan nörotoksinler ve oluş mekanizması (MPP+= 1-metil-4-fenilpiridinyum; MAO-B= Monoamin oksidaz B; DAT= Dopamin taşıyıcı; VMAT= Veziküler monoamin transporter; ROS= Reaktif oksijen türleri; C-I – C-V= Kompleks I – Kompleks V) (4).

birçok klinik araştırma Parkinson hastalığında çevresel faktörlerin yanısıra kalıtsal özelliklerin de önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir (7-9). Sıçanlar üzerinde yakın tarihlerde gerçekleştirilen bir çalışmanın sonuçları da PH'nda gen terapisinin başarılı olabileceğini düşündürmektedir (10).

PH'nı ilaçla kökten tedavi etmek henüz mümkün değildir. İlaçla tedavi tamamen semptomatiktir ve PH sürekli ilaç kullanımını gerektirmektedir. Mevcut ilaçların zamanla etkilerinin kaybolması, bazılarının ilaç kesmeyi gerektirecek şiddette yan etkilere sahip olması ve Parkinson'luların yaşlı bir popülasyon olması PH tedavisinde daha etkin, daha az yan etkiye sahip ve Parkinson'un kökten tedavisine olanak sağlayabilecek yeni ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. İnsanlarda Parkinson modeli oluşturmak ve Parkinson hastalarında bazı klinik çalışmaları yapmak etik olarak mümkün olamamaktadır. Bu durumda deney hayvanlarında Parkinson semptomlarının taklit edilmesi ve ilaçların anti-Parkinson etkilerinin bu modeller üzerinde test edilebilmesi önem kazanmaktadır (11).

Deney hayvanlarında PH'nın belirtilerini taklit eden modeller oluşturmak mümkündür. Bu amaçla en fazla dopaminerjik sistemi ve özgül olarak nigrostriatal yolağı dejenere eden toksinlerden yararlanılır. Bu amaçla en çok kullanılan toksinler MPTP, 6-OHDA ve rotenon gibi tarımsal kimyasallardır (4). Bu toksinleri kullanarak primatlarda veya rodentlerde deneysel PH modelleri oluşturmak mümkündür. Her üç toksin de özgül olarak dopaminerjik nöronlarda çekirdeğin mitokondrisi içine girerek mitokondrial elektron transfer zincirinin ilk halkası olan kompleks 1'in (C-I) güçlü şekilde inhibisyonuna neden olur. Maneb gibi tarımsal toksinler farklı olarak inhibitör etkilerini kompleks 3 (C-III) seviyesinde oluşturur. Elektron transfer zincirindeki bu güçlü inhibisyon ile mitokondriyal faaliyetlerin sağlıklı bir şekilde yürütülememesi dopaminerjik nöronda ciddi dejenerasyona neden olur (Şekil 1).

Dopaminerjik nöronlarda ve özellikle nigrostriatal yolaktaki mitokondrial kompleks inhibisyonları PH belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur.

Her üç nörotoksin modeli ile ilişkili daha ayrıntılı bilgi aşağıda sunulmuştur.

MPTP İLE NİGROSTRIATAL YOLAK DEJENERASYONUNA DAYANAN DENEYSEL PARKİNSON MODELİ

MPTP narkotik bir ajan olan meperidinin analogudur. MPTP'nin Parkinson sendromuna neden olduğu Amerika Birleşik Devletleri'nin Kaliforniya eyaletinde tesadüfen farkedilmiştir. Kaliforniya'da, 1982 yılında, bir grup genç eroin bağımlısında sentetik bir eroin olan 1-metil-4-fenil-propion oksipiperidinin (MPP) intravenöz yoldan alınması sonrası ani olarak Parkinson belirtileri ortaya çıkmıştır. Olay incelendiğinde bunların kullandıkları sentetik eroin türevinin MPTP ile kontamine olduğu ve buna bağlı olarak Parkinson hastalığına yakalandıkları anlaşılmıştır (11-14). Bu gözlem MPTP ile deney hayvanlarında Parkinson modeli oluşturulmasının esin kaynağı olmuştur. Bugün MPTP PH oluşturmak için kullanılan en önemli toksindir. Diğer toksinlere göre başlıca avantajları şöyle sıralanabilir (4,15):

1. Dopaminerjik yollarda doğrudan ve özgül bir intoksikasyona neden olur.
2. İnsandaki PH belirtilerine benzer belirtiler oluşturur (özellikle primatlarda).
3. Yüksek oranda lipofiliktir. Kan-beyin engelini kolayca geçer.

MPTP'nin dezavantajları ise şöyle sıralanabilir (12,16-18);

1. Aşırı toksik olması ve bilinçli kullanmayanlarda PH'na neden olabilmesi.

2. Parkinson hastalarında beyinin mikroskopik olarak incelenmesi sırasında gözlenen eozinofilik Lewy cisminin ne MPTP'ye maruz kalan insanlarda ne de PH belirtilerini oldukça iyi taklit eden hiçbir deney hayvanlarında görülememesi.
3. PH'nin aksine MPTP modelinde lokus seruleus gibi diğer monoaminerjik beyin bölgelerinde hasar oluşturmaması.
4. Primatların pahalı olması ve bunlar üzerinde araştırma yapmanın özel etik kurallara, özel donanımlı laboratuvarlara ve eğitilmiş araştırmacılara gereksinim göstermesi ve primatların bakımlarının pahalı ve zor olması.

MPTP özgül olarak nigrostriatal yolakta yer alan dopaminerjik nöronlarda geri dönüşümsüz yıkımlara neden olarak şiddetli bir dopamin eksikliği ortaya çıkarır. Maddenin primatlara verilmesi Parkinson benzeri klinik bir tablo oluşturur (15). MPTP Kan beyin engelini geçtikten sonra astrositler tarafından alınır ve MAO-B enziminin katalizlediği bir reaksiyonla toksik metaboliti olan MPP+'ya dönüşür (Şekil 1). MPP+ dopamin transport sistemi tarafından alınır ve spesifik olarak dopaminerjik nöronlarda mitokondrial oksidasyon reaksiyonunu inhibe ederek bu nöronlarda hasara neden olur (4,19).

MPTP deney hayvanlarına sistemik olarak subkutan, intravenöz, intraperitoneal veya intramüsküler yoldan verilebilir. Primatlarda daha çok intraperitoneal veya intramüsküler yol tercih edilir. Intravenöz yoldan primatlara karotid arter içine enjekte edilmek suretiyle verilir (4). MPTP PH oluşturmak amacıyla primatlara 0.05 mg/kg dozda sistemik olarak (intraperitoneal veya intramüsküler) haftada 2-3 kez birkaç ay süre ile uygulanır (20). Eskiden çok daha yüksek dozlar bir seferde verilerek PH belirtileri oluşturulmaya çalışılıyordu. Ancak daha sonra gerçekleştirilen çalışmalar düşük veya daha ılımlı dozların zamana yayılarak verilmesinin primatlarda daha iyi PH belirtileri oluşturduğuna işaret etmiştir (21-24). Primatlarda kronik MPTP uygulaması PH'nin tedavisine yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesinin yanısıra nöroprotektif stratejilerin geliştirilmesi ve araştırılması için de kullanılabilir (20).

MPTP ile oluşturulan nigrostriatal yolak lezyonu daha çok primatlarda uygulanır ve primat modeli insandakine en yakın PH modelidir. MPTP modeli PH araştırmaları için "gold standart" kabul edilir (25,26). Bununla beraber, sıçanlarda ve farelerde de MPTP çalışmaları yapılmaktadır. Bu üç deney hayvanı grubu MPTP'nin toksisitesine duyarlılık bakımından değerlendirildiğinde en duyarlı deney hayvanının primatlar olduğu, farelerin de sıçanlara göre MPTP'ye daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Farelerde ve özellikle sıçanlarda PH belirtileri oluştuktan bir süre sonra tamamen ortadan kalkarken primatlardaki belirtiler daha kalıcı olmaktadır (4,20). Fare türleri içinde C57 black 6 fare zinciri MPTP'nin sistemik olarak verilmesine diğer fare türlerine göre daha duyarlıdır (27).

Farelerde kullanılabilen 4 farklı Parkinson modeli tanımlanmıştır (22,23,27-29):

Preseptomatik PH Modeli: Bu model için MPTP farelere akut olarak 10-20 mg/kg gibi nispeten düşük dozda ve bir kez verilir. Bu model hastalık veya tedavisi için telafi edici mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar için uygundur.

Hızlı PH Oluşturulması İçin Model: İki saatlik aralarla 20 mg/kg gibi orta dozda MPTP dört kez ve sadece bir gün verilerek oluşturulur. Bu uygulama hücre ölümü ile karakterize hızlı bir dopaminerjik dejenerasyona ve Parkinson belirtilerine neden olur.

Subkronik PH Oluşturmak İçin Model: MPTP farelere en az beş günlük bir süreç boyunca 20-30 mg/kg gibi yüksek dozlarda günde 1-2 kez enjekte edilir. İlk iki modele zıt olarak bu yöntem S. nigra'nın pars kompaktasında lokalize olmuş dopaminerjik nöronlarda güçlü bir apoptozis ile geç dejenerasyona ve Parkinson belirtilerine neden olur.

Progressif Kronik PH Modeli: Bu modelin oluşturulabilmesi için MPTP farelere 20 gün boyunca günde bir kez 4 mg/kg gibi düşük dozda verilir. Bu yöntem PH'na daha yakın bir model olarak kabul edilir. Özellikle nöroprotektif ve telafi edici mekanizmaların incelenmesi için uygundur. Fare modeli ile ilişkili temel sorunlar ise şunlardır:

MPTP verilen rodentlerde Lewy cisimi oluşmaması, dopaminerjik sistem dışında da nörodejenerasyon gelişmesi; hipersalivasyon, konvülsiyonlar, piloereksiyon ve hipokinzezi gibi davranışsal belirtilerin oluştuktan sonra 24-48 saat içinde tekrar geri dönmesi ve son olarak farelerde yukarıdaki yöntemlerle PH hastalığı modeli günler veya haftalar içinde oluşurken insanda on yıllar gibi uzun bir süreç sonunda PH belirtilerinin ortaya çıkması fare modelinin dezavantajları arasında sayılabilir (27,30).

Sıçanlarda MPTP'nin Parkinson modeli oluşturmak üzere kullanılışı yaygın değildir ve sonuçlar oldukça çelişkilidir. MPTP ile sıçanlarda ancak 30-60 mg/kg gibi oldukça yüksek dozlarda dopaminerjik nörodejenerasyon gözlenir. Farelere enjekte edilen ve dopaminerjik hasara neden olan dozlar sıçanlarda etkisizdir. Bu sıçanlara ayrıca periferik katekolamin saliverilmesi ve buna bağlı mortalitenin önlenmesi için guanetidin de verilmesi gerekir (31,32). Sıçanlarda dopaminerjik hasar oluşsa bile ortaya çıkan belirtilerin PH'na benzerliği ve şiddeti de diğer iki tür kadar belirgin değildir ve sıçanlarda elde edilen sonuçlar çelişkilidir (4,33). MPTP toksisitesine sıçanlarda görülen bu dikkat çekici direncin nedeninin MPTP'nin toksik metagbolit olan MPP+'ya dönüşümü ile ilişkili olabileceği, sıçanlarda bu dönüşümün yeterli olmadığı ileri sürülmüştür (27).

Nörotoksin ile genetik teknolojinin birlikte kullanılması ile daha etkili bir fare PH modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Yakın tarihlerde bazı Parkinson hastalarının a-sinüklein geninde mutasyon olduğu görülmüş ve bu geni mutasyona uğratılmış fareler oluşturulmuştur. MPTP verilen a-sinüklein transjenik farelerde mitokondriyal hasarın S. nigra ve ventral tegmental alanda daha iyi olduğu, hippokampus ve neokortekste ise fazla bir hasar oluşmadığı gözlenmiştir. Bu modelin diğer fare modellerine göre daha iyi bir PH modeli olabileceği düşünülmektedir (4).

HİDROKSİDOPAMİN (6-OHDA) İLE İNDÜKLENMİŞ KONTRALATERAL DÖNÜŞ DAVRANIŞINA DAYANAN DENEYSEL PARKİNSON MODELİ

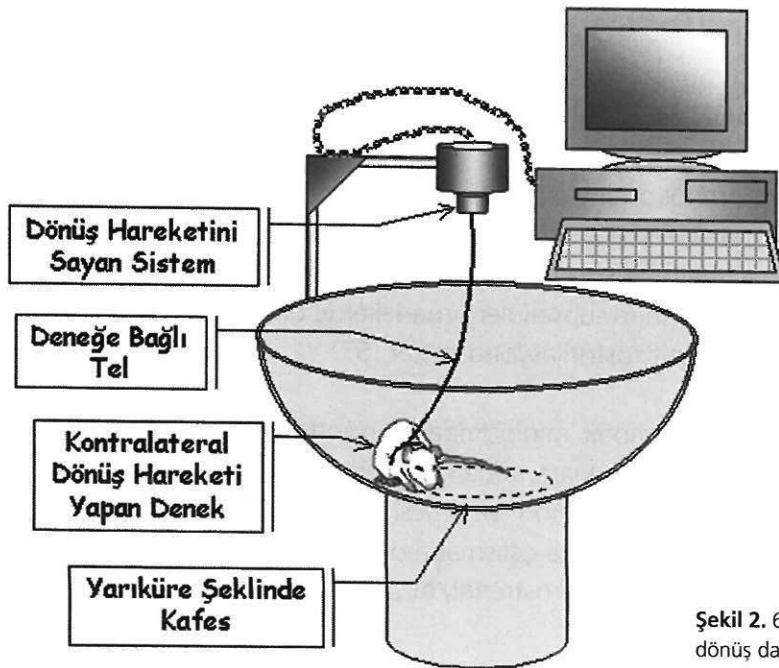
6-OHDA dopaminin hidroksilasyona uğramış analogudur. Katekolaminerjik sinir uçlarında harabiyete neden olarak dopamin sentez ve saliverilmesini ve buna bağlı olarak santral dopaminerjik aktiviteyi azaltan bir nörotoksindir (34). İlk olarak 1959 yılında izole edilmiştir. Biyolojik etkileri ilk olarak 1963 yılında Porter ve arkadaşları (35) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada 6-OHDA'nın sempatik sinirlerde uzun süreli noradrenalin deplesyonu yaptığı gözlenmiştir (4). 6-OHDA şekil 1'de de görüldüğü gibi dopaminerjik nöronlarda C-I inhibisyonu yaparak etkili olur. PH'larında endojen olarak 6-OHDA biriktiği saptanmıştır (36).

6-OHDA sistemik olarak verildiğinde MPTP'nin aksine kan-beyin engelini geçemez. Bu nedenle stereotaksik düzenek ile özellikle S. nigra, mediyal ön beyin demeti ve striatum gibi dopaminerjik etkinliğin yoğun olduğu bölgelere enjekte edilir (37). Özellikle S. nigra ve medyal ön beyin demetine 6-OHDA enjeksiyonunu izleyen

12 saat içinde dopaminerjik nöronlarda dejenerasyon başlar. Enjeksiyonu izleyen 2. veya 3. günde tüm striatal dopamin içeriği boşalır (38). İlginç olarak 6-OHDA'nın doğrudan striatum içine verilmesi S. nigra –ventral tegmental alan kompleksi içine verilmesinden daha çabuk ve daha ilerleyici şekilde nöron ölümüne neden olur (37,39,40). 6-OHDA'nın striatum içine enjekte edilmesiyle oluşturulan model nöroprotektif çalışmalar için daha uygun iken S. nigra– ventral tegmental alan kompleksine 6-OHDA enjeksiyonu ile elde edilen model daha çok yeni farmakolojik veya hücre replasmanı tedavilerinin test edilmesi için kullanılır (30).

6-OHDA sıçan, fare, kedi ve primatlarda dopaminerjik nöronlara özgül yüksek etkili bir toksindir (41). Bununla beraber daha çok sıçanlarda PH modeli olarak kullanılır. Sıçanlarda 6-OHDA verilmesi sonrası akinezi, rijidite ve tremor gibi belirtiler olduğu tanımlanmıştır (42). Ancak bu belirtilerin şiddeti ve sürekliliği PH'nı çok iyi taklit etmez. Dopaminerjik nöronlarda 6-OHDA ile indüklenen lezyonun tamamlanmasından sonra deney hayvanına apomorfin gibi dopaminerjik agonistlerin verilmesi lezyon olan hemisferdeki dopaminerjik aşırımın çalışmamasına bağlı olarak lezyon olan yönün ters tarafına kontralateral dönüş hareketine neden olur. Aynı etki amfetamin enjeksiyonunda gözlenir (4). Lezyon sonrası dopaminerjik agonist verilmesi ile uyarılan kontralateral dönüş hareketi özellikle sıçanlarda PH'nın tedavisine yönelik yeni ilaçlar geliştirilmesine yönelik olarak kullanılan bir modeldir.

Sıçanlarda 6-OHDA enjeksiyonu ile dopaminerjik nigrostriatal yollarda oluşturulan lezyona dayalı bir Parkinson modeli tanımlanmıştır (43,44). Bu modeli oluşturmak için sıçan 400 mg/kg ip kloralhidrat ile anesteziye edildikten sonra bir stereotaksik çerçeve (frame) üzerinde sabitlenir. Daha sonra striatal bir lezyon oluşturmak için sol medial önbeyin bölgesinde Pellegrino atlasına göre (45) A (anterior= ön) –2.2; L (lateral) + 1.5; V (vertikal)–7.9 koordinatlarına mikroenjeksiyon tekniği ve hassas bir infüzyon pompası yardımı ile %0.05 askorbik asit içeren 4 mL salin içinde 8 mL 6-OHDA HCl dakikada 1 mL'lik bir hızla enjekte edilir (46,47). Enjeksiyondan sonra lezyonun gelişmesi için en az 2 hafta beklemek gerekir. İki haftalık sürenin sonunda 6-OHDA enjekte edilerek nigrostriatal yolakta lezyon oluşturulmuş sıçanlara dopaminerjik replasman tedavisi uygulanırsa lezyon oluşturulan tarafın ters yönüne doğru 360°'lik yineleyen dönüş hareketleri gözlenir.



Şekil 2. 6-OHDA ile lezyon yapılmış sıçanlarda kontralateral dönüş davranışını ölçmeye yarayan düzenek (18).

Dopaminerjik replasman tedavisi olarak 100 mg/kg dozda L-DOPA (48) veya daha sıklıkla 50 mg/kg dozda L-DOPA'nın 30 mg/kg benserazid ile kombinasyonu (46,49-51) ip yoldan verilir. Replasman tedavisini izleyerek sıçanlar 50 cm çapında hemisferik pleksiglas ölçüm kaplarına alınırlar ve bellerine yapacakları dönüş hareketlerini hassas bir şekilde bilgisayarlı sisteme aktaracak olan metalik teller bağlanır (Şekil 2). Burada sıçanın dopaminerjik replasman tedavisini izleyerek lezyon yapılan bölgenin ters tarafına doğru yineleyerek yaptığı dönüş hareketleri kaydedilir. İlk dopaminerjik agonist enjeksiyonunu izleyen her saatte ortalama 100 adet tam dönüş hareketi yapılması modelin başarılı olduğunu gösterir (50,52). Model üzerinde denenen herhangi bir ilacın bu ölçütleri yakalaması en az L-DOPA ve benserazid kombinasyonu kadar antiparkinsonian etkinliğe sahip olduğuna işaret eder. Daha yüksek dönüş hareketleri ise daha etkin bir aktiviteyi gösterir. Dopaminerjik agonist enjeksiyonunu izleyen 2 saat boyunca 30 tam dönüş hareketinin altında dönüş yapan sıçanlarda lezyon çalışmasının başarısız olduğu kabul edilir ve bu sıçanların test çalışmalarında kullanılmaması gerekir (48).

6-OHDA ile indüklenmiş kontralateral dönüş davranışı MPTP yöntemine göre daha ucuz olması, her laboratuvarında uygulanabilmesi ve hepsinden önemlisi uygulayanlar için MPTP gibi toksik olmaması gibi avantajlara sahiptir ve son zamanlarda Parkinson hastalığının davranışsal düzeyde değerlendirilmesinde daha çok kullanılmaktadır. Bununla beraber bu yöntemin de bazı dezavantajları ve kısıtlılıkları vardır:

1. 6-OHDA modeli PH'nın insandaki tüm patolojik ve klinik özelliklerini taklit etmez. PH'nın davranışsal belirtileri güç güçlü ve sürekli olarak gözlenemez. Lewy cisimciği gibi sitoplazmik oluşumlar MPTP'de olduğu gibi bu modelde de gözlenmez (4).
2. Kan-beyin engelini geçmediğinden sistemik olarak verilmesi mümkün değildir. Dopaminerjik dejenerasyon oluşturulmak istenen bölgeye doğrudan enjekte edilmek zorundadır ve bunun için stereotaksik çerçeve gibi özel ekipmana gereksinim duyulur.
3. PH ile ilişkili olduğu bilinen anterior olfaktör yapılar, aşağı beyin sapı bölgeleri veya lokus seruleus gibi diğer santral yapılarda dejenerasyona neden olmaz (53,54). Yaptığı dejenerasyon dopaminerjik nöronlarla ve verildiği bölge ile sınırlıdır.
4. Bu model yavaş ilerleyici bir patolojisi olan insan PH'na benzer bir özelliğe sahip değildir. Akut olarak verilen nörotoksinin dopaminerjik bölgelerde ani olarak oluşturduğu harabiyet sonrasını incelemeye olanak verir.

ROTENON İLE İNDÜKLENEN PARKİNSON MODELİ

Rotenon daha önce de belirtildiği gibi mitokondriyal bir nörotoksindir. Nöron mitokondrisinde güçlü bir şekilde C-I inhibisyonu yaparak (Şekil 1) dejenerasyona ve bunu izleyen dönemde PH belirtilerine neden olur. Bu özelliği nedeni ile deneysel PH modeli oluşturmak için kullanılmaktadır (55,56). Rotenon sistemik verildiğinde kan-beyin engelini geçer. Nöron içinde subsellüler organellerde birikir. Elektron transport zincirinin C-I basamağında yaptığı inhibisyon ile oksidatif fosforilasyonu bozar (57).

Betarbet ve diğ. (58) beş hafta süre ile bir osmotik minipompa ile günde 2-3 mg/kg rotenon verilmesinin sıçanlarda PH'na benzer motor ve postural bozukluklara neden olduğunu göstermiştir. Erkek Lewis sıçanlara intrajügüler veya subkutan yoldan 2-3 mg/kg rotenon verilmesi 28-56 gün içinde özgül dopaminerjik nörodejenerasyona neden olmaktadır (58,59). Bir başka çalışmada da yine Lewis sıçanlara 28 gün süre ile 2.5 mg/kg rotenonun femoral arterden verilmesinin nigrostriatal dopaminerjik dejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (60).

Mikroglialar beynin immün fonksiyonlarını da düzenleyen önemli bir hücre grubudur. PH'nda nigrostriatal bölgede önemli ölçüde mikroglial aktivasyon gözlenir (61). Sherer ve diğ. (59) de yakın tarihlerde gerçekleştirdikleri bir çalışmada rotenon verilen Lewis türü sıçanlarda özellikle striatum ve S. nigra'da mikroglial hücre aktivasyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada rotenon sıçanlara 2-3 mg/kg günlük dozda dört hafta süre ile cilt altına yerleştirilen ozmotik bir minipompa ile verilmiştir. Dört haftalık süreç sonunda sıçanlarda belirgin nigrostriatal dejenerasyon ile birlikte belirgin bir ağırlık kaybı ve akinezi gözlenmiştir. Ayrıca striatal bölge ve S. nigra'da belirgin bir mikroglial aktivasyon olduğu gösterilmiştir.

Alam ve Schmidt (55) sıçanlarda gerçekleştirdikleri bir çalışmada rotenonun 1.5 mg/kg gibi düşük ve 2.5 mg/kg gibi orta dozlarını iki ay süre ile her gün intraperitoneal yoldan enjekte ederek daha sonra bu deneklerdeki PH belirtilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada PH ile ilişkili davranışsal belirtilerin değerlendirilmesi için katalepsi testi ve lokomotor aktivite ölçümleri kullanılmıştır. Katalepsi dikey tel testi (62) ile değerlendirilirken, lokomotor aktivite ölçümlerinde deneklerin ölçümün yapıldığı alandaki yer değiştirme ve dikilme hareketleri sayılmıştır. Ayrıca striatal bölge ve prefrontal korteks dopaminerjik etkinliği yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ile değerlendirilmiştir. Alam ve Schmidt (55) rotenon verilen deneklerde striatal bölgede ve prefrontal kortekste dopamin içeriğinde doza bağımlı azalmalar saptamışlardır. Ayrıca deneklerin yine verilen dozuna bağlı olarak lokomotor aktivitelerinde anlamlı ölçüde azalma ve katalepsi süresinde anlamlı ölçüde uzama gözlemişlerdir. Bu çalışmada lokomotor aktivitedeki azalma ile katalepsi süresindeki uzama PH'nın özellikle akinezi belirtisi ile ilişkilendirilmiştir.

6-OHDA ve MPTP gibi toksinlerde Lewy cisimciği görülmemesine karşın rotenon verilen deneklerde Lewy cisimciği görülmesi ve rotenonun MPTP gibi rahatlıkla sistemik dolaşıma verilmesi ve kan-beyin engelini kolayca geçmesi bu toksinin PH için model oluşturmadaki başlıca avantajları olarak ifade edilebilir (56).

Bununla beraber rotenon modelinin de birçok kısıtlılıkları söz konusudur. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Her ne kadar rotenon verilen deney hayvanlarında dopaminerjik nörodejenerasyona paralel olarak Lewy cisimciği görülse de bu oluşum klinikte tüm Parkinson hastalarında gözlenememektedir ve Lewy cisimciğinin PH teşhisindeki önemi ve katkısı tartışmalıdır (56,63).
2. L-DOPA ve diğer dopamin agonistleri ile rotenon verilmesine bağlı olarak gözlenen Parkinson benzeri belirtiler düzeltilememektedir. Dahası rotenon verilen bazı sıçanlarda nigrostriatal dopaminerjik hasar olmaksızın Parkinson hastalığındakine benzer motor bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (56,64).
3. Rotenon ile gözlenen motor bozukluklar net olmakla beraber bunların PH ile ilişkilendirilmesi iki nedenle güç olmaktadır: Birincisi nigrostriatal bölgede lezyon oluşmayan deneklerde de bu belirtilerin gelişmesi, ikincisi ise ortaya çıkan belirtilerin antiparkinson ilaçlar ile her zaman giderilememesidir (56).

Yukarıdaki kısıtlılıklar da göz önüne alındığında rotenon modelinin PH çalışmaları için diğer iki toksine göre daha değersiz olduğu düşünülebilir. Bununla beraber, bu model Lewy cisimciğinin oluşumu ile ilişkili moleküler temelin anlaşılması ve bununla nigrostriatal dopaminerjik hücre ölümü arasındaki ilişkinin incelenmesi için yararlı bir model olabilir.

KAYNAKLAR

1. Evarts EV. Brain mechanism in movement. *Sci Am* 229: 96-103, 1973.
2. Thompson FR. *The Brain an Introduction to Neuroscience*. WH Freeman and Company, New York, 1985, s. 117-127 ve 235-237.
3. Carvey PM. *Drug Action in the Central Nervous System*. Oxford University Press, New York, 1998.
4. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318: 215-224,
5. Gibb WR, Less AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 745-752, 1988.
6. Kayaalp SO, Dalkara T. Parkinson hastalığının ve diğer hareket bozukluklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar. In: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Kayaalp SO (Ed.), 2. Cilt, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 2000, s. 1094-1107.
7. Payami H, Zarepari S, James D, Nutt J. Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease. *Arch Neurol* 59: 848-850, 2002.
8. Zorzon M, Capus L, Pellegrino A, Cazzato G, Zivadinov R. Familial and environmental risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in north-east Italy. *Acta Neurol Scand* 105: 77-82, 2002.
9. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51: 296-301, 2002.
10. Xu Q, Tian J, Yang H, Zheng S, Liu Y. An experimental study on rat model of Parkinsonizm by gene therapy. *Chin Med J* 111: 154-159, 2002.
11. Uzbay IT. Parkinson hastalığı, farmakolojik tedavisi ve ilaç geliştirmeye yönelik deneysel Parkinson modelleri. In: *Beyin ve Nöropsikoloji: Temel ve Klinik Bilimler*, Karakaş S, Irkeç C, Yüksel N (Eds.), Çizgi Tıp Yayınevi, Ankara, 2003, s. 145-159.
12. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonizm in human due to a product of meperidine –analog synthesis. *Science* 219: 979-980, 1983.
13. Langston WJ. MPTP and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 8: 79-83, 1985.
14. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999, s. 483-538.
15. Przedborski S, Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci*, 991: 189-198, 2003.
16. Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonizm and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60: 600-608, 1993.
17. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909, 2003.
18. Uzbay IT. *Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Teknikler*. Çizgi Tıp Kitapevi, Ankara, 2004.
19. Tripton KF, Singer TP. Advances in our understanding of the mechanisms of neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 61: 1961-1206, 1993.
20. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jacowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M. The Parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 76: 1265-1274, 2001.
21. Schneider JS, Roeltgen DP. Delayed matching –to-sample, object retrieval, and discrimination reversal deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Brain Res* 615: 351-354, 1993.
22. Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE. A chronic MPTOP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res* 766: 107-112, 1997.
23. Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross CE. Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci Lett* 234: 47-50, 1997.
24. Schneider JS, Tinker JP, Van Velson M, Menzaghi F, Lloyd GK. Nicotinic acetylcholine receptor antagonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 731-739, 1999.
25. Bedard PJ, Di Paolo T, Falardeau P, Boucher R. Chronic treatment with L-DOPA, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP-parkinsonian monkeys. Correlation with [3H] spiperone binding. *Brain Res* 379: 294-299, 1986.
26. Shiosaki K, Asin KE, Bedard P, Britton DR, Jenner P, Lin CW, Michaelides M, Williams M. Efficacy of dopamine D1 receptor agonists A-86929 and ABT-431 in animal models of Parkinson's disease. In: *Biomedical and Health Research*, Jenner P, Demirdamar R (Eds.), vol 19, Amsterdam, 1998, s. 84-97.
27. Schmidt N, Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 108: 1263-1282, 2001.
28. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4: 257-269, 1995.
29. Tatton NA, Kish SJ. In situ detection of apoptic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77: 1037-1048, 1997.
30. Tatton NA, Kish SJ. In situ detection of apoptic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77: 1037-1048, 1997.
31. Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1. Systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 1000-1007, 1994.
32. Giovanni A, Sonsalla PK, Heikkila RE. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,2,6-tetrahydropyridine. Part 2. Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 1008-1014, 1994.
33. Kopin IJ, Markey SP. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 11: 81-96, 1988.
34. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65: 135-172, 2001.
35. Porter CC, Tutaro JA, Stone CA. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 140: 308-316, 1963.
36. Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Venlong H, Petty RK. The determination of hydroxydopamines and other traceamines in the urine

-
- of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res* 18: 1175-1177, 1993.
37. Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67: 631-647, 1995.
 38. Faull RL, Lavery R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp Neurol* 23: 332-340, 1969.
 39. Berger K, Przedborski S, Cadet JL. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injections in rats. *Brain Res Bull* 26: 301-307, 1991.
 40. Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59: 401-415, 1994.
 41. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2: 325-334, 2001.
 42. Lindner M, Cai CK, Plone MA, Frydel BR, Balaney TJ, Emerich DF, Hoane MR. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav Brain Res* 102: 1-16, 1999.
 43. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24: 485-493, 1970.
 44. Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand (Suppl. 367)*: 69-93, 1971.
 45. Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. Plenum Press, New York, 1979.
 46. Pinna A, Wardas J, Cristalli G, Morelli M. Adenosine A2A receptor agonists increase Fos-like immunoreactivity in mesolimbic areas. *Brain Res* 759: 41-49, 1997.
 47. Fenu S, Morelli M. Motor stimulant effects of caffeine in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are dependent on previous stimulation of dopamine receptors: a different role of D1 and D2 receptors. *Eur J Neurosci* 10: 1878-1884, 1998.
 48. Henry B, Crossman AR, Brotchie M. Characterization of enhanced behavioral responses to L-DOPA following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 151: 334-342, 1998.
 49. Morelli M, Pinna A, Wardas J, Di Chiara G. Adenosine A2 receptors stimulate c-fos expression in striatal neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 67: 49-55, 1995.
 50. Pinna A, Di Chiara G, Wardas J, Morelli M. Blockade of A2A adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats. *Eur J Neurosci* 8: 1176-1181, 1996.
 51. Fenu S, Pinna A, Ongini E, Morelli M. Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behaviour and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 321: 143-147, 1997.
 52. Morelli M, Fenu S. Role of dopamine receptors in the induction and expression of rotational behavior induced by caffeine 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Drug Dev Res* 45: 373-378, 1998.
 53. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioassays* 24: 308-318, 2002.
 54. Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Breakey H. Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 413-426, 2002.
 55. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 136: 317-324, 2002.
 56. Perier C, Bové J, Vila M, Przedborski S. The rotenone model of Parkinson's disease. *TINS* 26: 345-346, 2003.
 57. Schuler F, Casida JE. Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochim Biophys Acta* 1506: 79-87, 2001.
 58. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301-1306, 2000.
 59. Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 341: 87-90, 2003.
 60. Hoglinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombes A, Ruberg M, Friguet B, Hirsch EC. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 86:1297-307, 2003.
 61. Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95: 425-432, 2000.
 62. Uzbay IT. L-NAME precipitates catatonia during ethanol withdrawal in rats. *Behav Brain Res* 119: 71-76, 2001.
 63. Gibb WR, Less AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 745-752, 1988.
 64. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179 : 9-16, 2003.
-