



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE BAZI TRP
KANALLARININ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahmi ÖZ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ömer ÇELİK

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-7449 nolu proje ile ve Öğretim
Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü tarafından ÖYP06164-DR-16 nolu
proje ile desteklenmektedir.**

ISPARTA – 2021

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/02/2021

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD

Üye : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD

Üye : Prof. Dr. Nurhan GÜMRAL
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD

Üye : Prof. Dr. Leman YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik AD

Üye : Prof. Dr. Derviş ÖZÇELİK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Biyofizik AD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Deneyisel Parkinson Hastalığı Modelinde Bazı TRP Kanallarının Rollerinin Araştırılması” adlı Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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.

Tezi Hazırlayan

Ahmi ÖZ

İmza

Danışman

Doç. Dr. Ömer ÇELİK

İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bana yol gösteren ve ilham veren yönlendirmeleri ile destek olan tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e, tezimin hazırlanmasına kıymetli fikirleriyle katkıda bulunan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında bana zaman ayıran ve yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşım Ramazan ÇINAR'a ve çalışma arkadaşım Muhammet ŞAHİN'e teşekkür borçluyum.

Eğitim hayatıma başladığım ilk günden bu tezin sunulduğu güne kadar manevi desteklerini yüreğimde hissettiğim ağabeyime, kardeşime ve kıymetli eşime teşekkür ederim. Bu günlere gelmemde en çok emeği olan ve hayatta haklarını asla ödeyemeceğim muhterem Annem ve merhum Babama minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğüne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince bana BİDEB 2211/A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a ayrıca teşekkür ederim.

ÖZET

Deneysel Parkinson Hastalığı Modelinde Bazı TRP Kanallarının Rollerinin Araştırılması

Dünya genelinde 65 yaş üstü nüfusta prevalansı %1 olan Parkinson hastalığı, beyinde substansiya nigra bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronların hasarıyla karakterize ve başlıca klinik belirtileri istirahat tremoru, bradikinezi, rijidite ve postüral refleks bozukluğu olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın patogeneğinde hücrel oksidatif hasara bağlı olarak gelişen mitokondriyal disfonksiyonun ve anormal yapılı alfa-sinüklein agregasyonunun önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir.

TRP kanalları, çoğunlukla hücre içi kalsiyum sinyalinin düzenlenmesinden sorumlu olan bir katyon kanal ailesidir. TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanalları bu kanal ailesinin birer üyesidir. Parkinson hastalığının *in vitro* modellenmesinde, retinoik asitle farklılaştırılarak dopaminerjik karakter kazandırılan ve aynı zamanda TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanallarının doğal olarak ifadelendiği SH-SY5Y hücre hattı sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında güncel biyoteknolojik yöntemlerden biri de hedeflenen proteini kodlayan genlerin post-transkripsiyonel olarak susturulması prensibine dayanan siRNA transfeksiyon yöntemidir. *In vitro* Parkinson hastalığı modeli oluşturma yöntemlerinden biri de mitokondriyal elektron transport zincirini bozarak etki eden MPP⁺ uygulamasıdır. TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanallarının Parkinson hastalığının patogeneğinde rol alıp almadığı veya hastalığın tedavisine yönelik olarak rollerinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasının amacı; yukarıda belirtilen kanalların Parkinson hastalığının patogeneğinde üstlendiği rolün ortaya konması ve hastalığın tedavisine yönelik moleküler mekanizmaların aydınlatılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinde MPP⁺ ile Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuş ve aynı zamanda retinoik asit inkübasyonu ile hücrelerin dopaminerjik karakter edinmeleri sağlanmıştır. Ayrıca, siRNA transfeksiyonu ile TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanallarının ifadenme düzeyleri kontrol altına alınmaya çalışılarak Parkinson hastalığının patogenezindeki rolleri araştırılmıştır. Tez çalışmasının belirlenen hedefleri doğrultusunda; TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanalları aracılı kalsiyum sinyali, hücrel canlılık, apoptoz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri, reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondriyal membran depolarizasyonu, mono amin oksidaz A ve B enzim aktiviteleri, dopamin ve alfa-sinüklein seviyelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak; özellikle TRPM7 ve TRPV1 katyon kanallarının Parkinson hastalığı patolojisinde MPP⁺ uygulamasının ortaya çıkardığı hasara aracılık ettiği, bu kanalların ifadenme düzeylerinin azalmasının ise nöronal hücre canlılığı üzerine olumlu etkilerinin olabileceği belirlenmiştir. TRPM7 ve TRPV1 katyon kanallarını hedef alan spesifik antagonistlerin Parkinson hastalığı modellerinde yeni tedavi seçenekleri oluşturmada alternatif olabileceği ve hastalığın tedavisine yeni bir perspektif kazandırabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, TRPM7, TRPM8, TRPV1, SH-SY5Y

ABSTRACT

Investigation of the role of some TRP channels in experimental Parkinson's Disease model

Parkinson's disease has a prevalence of 1% population over the age of 65 in worldwide, is a neurodegenerative disease that characterized with the damage of dopaminergic neurons in substantia nigra region of brain and major clinical symptoms are resting tremor, bradykinesia, rigidity and postural reflex disorder. Mitochondrial dysfunction due to cellular oxidative damage and abnormal alpha-synuclein aggregation are thought to play important roles in the pathogenesis of the disease.

TRP channels are a family of cation channels that are mostly responsible for regulating intracellular calcium signaling. TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels are members of this channel family. In the *in vitro* modeling of Parkinson's disease, the SH-SY5Y cell line is widely used, which is differentiated by retinoic acid to enhance dopaminergic character, and also TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels are naturally expressed in the cell line. One of the current biotechnological methods in cell culture studies is the siRNA transfection method, that is based on the principle of post-transcriptionally silencing the genes encoding the target protein. One of the methods of inducing an *in vitro* Parkinson's disease model is MPP⁺ administration, which acts by disrupting the mitochondrial electron transport chain. How, TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels are involved in the pathogenesis of Parkinson's disease or whether they have roles in the treatment of the disease is not yet known.

The main purpose of this thesis is to reveal the role of the channels mentioned above in the pathogenesis of Parkinson's disease and to elucidate the molecular mechanisms for the treatment of the disease. For this aim, in our study, a Parkinson's disease model was induced by MPP⁺ administration in SH-SY5Y cells and also the cells were provided with dopaminergic character by incubation of retinoic acid. Moreover, by trying to control the expression levels of TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels by siRNA transfection, their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease were investigated. According to the main goals of the thesis study; experiments have been carried out to determine the levels of calcium signalling mediated by TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels, cellular viability, apoptosis, caspase 3 and caspase 9 enzyme activities, production of reactive oxygen species, mitochondrial membrane depolarization, mono amine oxidase A and B enzyme activities, dopamine and alpha-synuclein levels.

As a consequence, it was determined that especially TRPM7 and TRPV1 cation channels mediated the damage caused by MPP⁺ administration in the pathology of Parkinson's disease, and decreased expression levels of these channels may have positive effects on neuronal cell viability. It was concluded that specific antagonists targeting the TRPM7 and TRPV1 cation channels could be an alternative in forming new treatment options in Parkinson's disease models and could provide a new perspective to the treatment of the disease.

Keywords: Parkinson's Disease, TRPM7, TRPM8, TRPV1, SH-SY5Y

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Nöronal Dejenerasyon Süreçleri	4
2.2. Bazal Gangliyonlar ve İşlevleri	8
2.3. Parkinson Hastalığında Etyopatogenez	10
2.4. Parkinson Hastalığının Hücresel Modelleri.....	14
2.5. TRP Katyon Kanalları	17
2.5.1. TRPM7 Katyon Kanalları	18
2.5.2. TRPM8 Katyon Kanalları	19
2.5.3. TRPV1 Katyon Kanalları.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç.....	22
3.1.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler.....	22
3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyoteknolojik Maddeler	24
3.2. Yöntem	26
3.2.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü.....	26
3.2.2. Deney Prosedürü ve Grupların Oluşturulması.....	29
3.2.3. siRNA Transfeksiyon Çalışmaları	30
3.2.4. Hücre Canlılığı Tayini	36
3.2.5. Apoptoz Testi.....	37
3.2.6. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Aktiviteleri Tayini	37
3.2.7. Hücresel Reaktif Oksijen Türleri Üretimi Tayini	38

3.2.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Tayini	38
3.2.9. Western Blotlama.....	39
3.2.10. Kalsiyum Sinyali Analizi.....	39
3.2.11. Alfa-sinüklein Seviyelerinin Belirlenmesi.....	40
3.2.12. Dopamin Seviyelerinin Belirlenmesi.....	40
3.2.13. Mono Amin Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	40
3.2.14. İstatistiksel Analiz.....	41
4. BULGULAR	42
4.1. Farklılaştırma Aşamalarına Ait Bulgular	42
4.2. siRNA Transfeksiyon İşleminin Optimizasyonu.....	49
4.3. Hücre Canlılığı Tayini Sonuçları.....	50
4.4. Apoptoz Bulguları	53
4.5. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Aktivite Sonuçları	56
4.6. Hücresel ROT Üretimi Tayini Sonuçları.....	60
4.7. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Tayini Bulguları.....	62
4.8. Western Blot Sonuçları.....	64
4.9. Kalsiyum Sinyali Analizi Sonuçları	73
4.10. Alfa-sinüklein Seviyeleri	85
4.11. Dopamin Seviyeleri	88
4.12. MAO Enzim Aktivite Bulguları	91
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR.....	108
ÖZGEÇMİŞ.....	129

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Nörotoksin ile başlatılan hücresel Parkinson hastalığı modelleri.	16
Tablo 3.1. siRNA transfeksiyonları sonrasında çalışmanın dört ana grubundan detaylanan alt gruplar.	35
Tablo 3.2. TRPM7 siRNA havuzuna ait üç farklı çiftli RNA'nın dizileri.	36
Tablo 3.3. TRPM8 siRNA havuzuna ait üç farklı çiftli RNA'nın dizileri.	36
Tablo 3.4. TRPV1 siRNA havuzuna ait üç farklı çiftli RNA'nın dizileri.	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DSÖ verilerine göre dünya genelindeki ilk on ölüm sebebi (6).	5
Şekil 2.2. Nörodejeneratif hastalıklar ve mutant protein birikimlerinin gösterimi (12).	7
Şekil 2.3. Tirozin'den dopamin sentezi ve aracılık eden enzimlerin gösterimi.	8
Şekil 2.4. Bazal gangliyonların anatomik gösterimi.	8
Şekil 2.5. Normal fizyolojik durumda ve Parkinson hastalığı patolojisinde bazal gangliyonlardaki direk ve indirek yolların görünümü.	10
Şekil 2.6. Parkinson hastalığı modelinde en yaygın kullanılan 3 nörotoksin ve mitokondri üzerinde etkileşim merkezleri.	11
Şekil 2.7. Dopamin metabolizmasından sorumlu emzimlerin gösterimi.	12
Şekil 2.8. MPTP'nin MAO enzim aktivitesiyle yıkımıyla MPP ⁺ nörotoksini oluşur.	15
Şekil 2.9. Nörotoksinler mitokondriyal elektron taşıma zincirini hedef alır.	16
Şekil 3.1. Farklılaştırma işleminin özet gösterimi.	30
Şekil 3.2. siRNA uygulamasının moleküler prensibi (105).	32

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 4.1.** Retinoik asit ve düşük FBS içeren farklılaştırma medyumunu ile 1 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder. 43
- Resim 4.2.** Farklılaştırma medyumunu ile 2 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder. 44
- Resim 4.3.** Farklılaştırma medyumunu ile 3 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder. 45
- Resim 4.4.** Farklılaştırma medyumunu ile 4 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder. 46
- Resim 4.5.** Farklılaştırma medyumunu ile 5 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder. 47
- Resim 4.6.** Farklılaştırma medyumunu ile 6 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder. 48
- Resim 4.7.** Normal büyütme medyumundaki SH-SY5Y hücreleri. A) 20 x büyütme ile alandaki hücrelerin detaylı, B) 10x büyütme ile hücrelerin genel görüntüsü. 49
- Resim 4.8.** Transfekte SH-SY5Y hücreleri. A) 20 x büyütme ile aydınlık alandaki hücrelerin, B) aynı hücre grubunun floresan ışık altında görüntüsü. 50
- Resim 4.9.** Ana gruplara göre TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanal ekspresyonlarının değişimi. 65
- Resim 4.10.** siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM7 kanal ekspresyonlarının değişimi. 67
- Resim 4.11.** siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM8 kanal ekspresyonlarının değişimi. 68
- Resim 4.12.** siRNA transfekte normal gruplara ait TRPV1 kanal ekspresyonlarının değişimi. 69
- Resim 4.13.** siRNA transfekte farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 kanal ekspresyonlarının değişimi. 70

Resim 4.14. siRNA transfekte farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 kanal ekspresyonlarının değişimi.....	71
Resim 4.15. siRNA transfekte farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 kanal ekspresyonlarının değişimi.....	72



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1. Ana gruplara ait hücre canlılığı (MTT testi) tayini bulguları.	51
Grafik 4.2. siRNA transfekte normal gruplara ait hücre canlılığı tayini bulguları. ..	52
Grafik 4.3. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait hücre canlılığı tayini bulguları.	53
Grafik 4.4. Ana gruplara ait apoptoz tayini bulguları.	54
Grafik 4.5. siRNA transfekte normal gruplara ait apoptoz tayini bulguları.	54
Grafik 4.6. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait apoptoz tayini bulguları.	55
Grafik 4.7. Ana gruplara ait kaspaz 3 enzimi aktivitesi bulguları.	56
Grafik 4.8. Ana gruplara ait kaspaz 9 enzimi aktivitesi bulguları.	57
Grafik 4.9. siRNA transfekte normal gruplara ait kaspaz 3 tayini bulguları.	58
Grafik 4.10. siRNA transfekte normal gruplara ait kaspaz 9 tayini bulguları.	58
Grafik 4.11. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait kaspaz 3 tayini bulguları.....	59
Grafik 4.12. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait kaspaz 9 tayini bulguları.....	60
Grafik 4.13. Ana gruplara ait hücrel ROT üretimi tayini bulguları.....	61
Grafik 4.14. siRNA transfekte normal gruplara ait hücrel ROT üretimi tayini bulguları.....	62
Grafik 4.15. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait hücrel ROT üretimi tayini bulguları.....	62
Grafik 4.16. Ana gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini bulguları.....	63
Grafik 4.17. siRNA transfekte normal gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini bulguları.	63
Grafik 4.18. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini bulguları.	64
Grafik 4.19. Ana gruplara ait TRPM7 kanal proteini ekspresyon bulguları.....	65
Grafik 4.20. Ana gruplara ait TRPM8 kanal proteini ekspresyon bulguları.....	66
Grafik 4.21. Ana gruplara ait TRPV1 kanal proteini ekspresyon bulguları.	67
Grafik 4.22. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM7 kanal proteini ekspresyon bulguları.....	67
Grafik 4.23. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM8 kanal proteini ekspresyon bulguları.....	68
Grafik 4.24. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPV1 kanal proteini ekspresyon bulguları.....	70

Grafik 4.25. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 kanal proteini ekspresyon bulguları.	71
Grafik 4.26. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 kanal proteini ekspresyon bulguları.	72
Grafik 4.27. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 kanal proteini ekspresyon bulguları.	73
Grafik 4.28. Ana gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	74
Grafik 4.29. Ana gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	74
Grafik 4.30. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	75
Grafik 4.31. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	76
Grafik 4.32. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	76
Grafik 4.33. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	77
Grafik 4.34. Ana gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	78
Grafik 4.35. Ana gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	78
Grafik 4.36. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum.....	79
Grafik 4.37. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi	80
Grafik 4.38. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	80
Grafik 4.39. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	81
Grafik 4.40. Ana gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	82
Grafik 4.41. Ana gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	82
Grafik 4.42. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	83
Grafik 4.43. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	84
Grafik 4.44. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi.	84

Grafik 4.45. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları.....	85
Grafik 4.46. Ana gruplara ait alfa-sinüklein seviyelerinin ELISA tayini bulguları..	86
Grafik 4.47. siRNA transfekste normal gruplara ait alfa-sinüklein seviyelerinin ELISA tayini bulguları.	87
Grafik 4.48. siRNA transfekste edilip farklılaştırılmış gruplara ait alfa-sinüklein seviyelerinin ELISA tayini bulguları.	87
Grafik 4.49. Ana gruplara ait dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları.....	89
Grafik 4.50. siRNA transfekste normal gruplara ait dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları.	89
Grafik 4.51. siRNA transfekste edilip farklılaştırılmış gruplara dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları.	90
Grafik 4.52. Ana gruplara ait MAO-A aktivitesi tayini bulguları	91
Grafik 4.53. Ana gruplara ait MAO-B aktivitesi tayini bulguları.....	92
Grafik 4.54. siRNA transfekste normal gruplara ait MAO-A aktivitesi tayini bulguları.....	92
Grafik 4.55. siRNA transfekste normal gruplara ait MAO-B aktivitesi tayini bulguları.....	93
Grafik 4.56. siRNA transfekste edilip farklılaştırılmış gruplara ait MAO-A aktivitesi tayini bulguları.	94
Grafik 4.57. siRNA transfekste edilip farklılaştırılmış gruplara ait MAO-B aktivitesi tayini bulguları.	95

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
ACA	: Anthranilic acid (antranilik asit)
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
CAP	: Kapsaisin
CAR	: Karvakrol
Caspase (Kaspaz)	: Cysteine-aspartic proteases
COMT	: Katekol-o-metiltransferaz
CPZ	: Kapsazepin
DAT	: Dopamin taşıyıcı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DRG	: Arka kök gangliyonu
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
GABA	: Gama aminobütirik asit
MAO	: Mono amin oksidaz
Mg⁺²	: Magnezyum iyonu
MPP⁺	: 1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NMDA	: N-metil-D-aspartat
Orai1	: Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein1
PBS	: Phosphate buffered saline
RISC	: RNA-induced silencing complex
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNAi	: RNA interference
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
siRNA	: Small interfering ribonucleic acid
SMA	: Spinal müsküler atrofi
SOCE	: Depoya duyarlı kalsiyum girişi
SOD	: Superoxide dismutase

SSA	: Spinoserebellar ataksi
STIM1	: Stromal Interaction Molecule 1
TDP-43	: Transactive response DNA-binding ribonucleoprotein 43
TG	: Trigeminal gangliyon
TRP	: Transient Receptor Potential
TRPA	: Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	: Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	: Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	: Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPP	: Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	: Transient Receptor Potential Vanilloid

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar genellikle ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan, progresif nöron hasarı, nihayetinde nöron yapısının bozulması ve hücrel apoptoz süreçlerinin başlamasıyla karakterizedir. Nörodejeneratif hastalıkları nörolojik hastalıklarından ayıran ana fark nörodejenerasyondur. Temel olarak protein mimarisinde bozulma veya kromozomdaki genetik bir kusurun sonucu olarak ortaya çıkan nörodejenerasyon nöronal apoptozla sonuçlanır. Kitlesel anlamda nöronal apoptoz beynin ilgili bölgesinde nörodejenerasyonun hızlanmasıyla fonksiyonel kayıplara yol açarak çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasını hızlandırır. En yaygın dört nörodejeneratif hastalık; Alzheimer hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (ALS) , Huntington hastalığı ve Parkinson hastalığı olarak sayılmaktadır. Bunların dışında; prion hastalıkları, spinal kaslar atrofi (SMA) ve spinoserebellar ataksi (SSA) de nörodejeneratif hastalık olarak tanımlanmakta ve bu ana grup altında sınıflandırılmaktadır. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) 2016 yılı verilerine göre Alzheimer hastalığı ve ilişkili komplikasyonlar, en yaygın on ölüm nedeninin beşinci sırasındadır. Birçok nörodejeneratif hastalık tipinin günümüzde kesin tedavisi mümkün olmadığı için nörodejenerasyonun hücrel ve moleküler temellerini anlamak yeni tedavi stratejileri geliştirmek için oldukça önemlidir. Hücrel modeller, *in vitro* koşullar altında sistemik bozuklukların temel, sürdürülebilir, ekonomik ve mümkün olduğunca optimize edilmiş çıktılarına sağlamaktadır. Ayrıca *in vitro* model yaklaşımları, kardiyovasküler sistem ve solunum bozuklukları, çeşitli kanserler, iskemi, viral ve bakteriyel hastalıklar ve nörolojik hastalıklar gibi birçok patoloji için kullanılmaktadır ve hücrel anomalilerin moleküler düzeyleri için vazgeçilmez çözümler sunmaktadır. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıkları *in vitro* ortam koşullarında modelleyen yeni yaklaşımlar devamlı araştırılmaktadır. Hücre kültürü araştırmaları sadece ileriki aşamalarda yapılacak hayvan ve insan faz çalışmalarına katkıda bulunmakla kalmayarak aynı zamanda kendi başına yeni veriler de ortaya koymaktadır. Parkinson hastalığı günümüzde en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Bazal gangliyonlardan özellikle substansiya nigra'yı etkileyen nörodejenerasyon ile ilgili yapılan çalışmalar hastalığın progresyonundan anormal alfa-sinüklein agregasyonunu sorumlu tutmaktadır. Lewy cisimciklerinin dejenerasyona uğrayan nöronlarda birikimi de Parkinson hastalarından post-mortem alınan numunelerden anlaşılmıştır. Diğer

nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi oksidatif hasarın nöronal yozlaşma süreçlerine neden-sonuç olarak katkı yapabileceği farklı çalışmalarla gösterilmiştir.

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı (ATCC-CRL-2266) nöronal karakter, hızlı çoğalma ve üretim kolaylığı gibi nedenlerden dolayı deneysel çalışmalarda özellikle nörodejeneratif hastalıklara *in vitro* model arayışında ilk tercih edilen hücre hatlarından biridir. SH-SY5Y nöronal hücreleri adrenerjik ve dopaminerjik nöronlara benzer kimyasal ve morfolojik özelliklere sahiptir. Bu yapıları nedeniyle nörodejeneratif hastalıkları *in vitro* modellemede de sıklıkla kullanılmaktadır. Hücrelerin farklılaştırılması ile normal nöronal morfolojiye benzer yapı değişimleri morfoloji çalışmaları için de uygundur. SH-SY5Y hücre hattı gen transfeksiyonu, nörotoksin ve çeşitli kimyasal uygulamaları ile en yaygın dört nörodejeneratif hastalıktan ALS harici üçünün *in vitro* modelini yapmak amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Transient Receptor Potential (TRP) katyon kanalları üst ailesi insanda birbirinden moleküler yapı ve dizi bakımından farklılaşan altı alt aileden oluşur. Bu alt aileler; TRPA (Ankyrin: 1 üye), TRPC (Canonical: 7 üye), TRPM (Melastatin: 8 üye), TRPML (Mucolipin: 3 üye), TRPP (Polycystin: 3 üye) ve TRPV (Vanilloid: 6 üye) olmak üzere 28 kanal alt tipini içermektedir. Ancak TRPC2 katyon kanalları insanda psödogen olduğundan fonksiyonel değildir. TRP kanallarının geneli kalsiyum iyonunu (Ca^{+2}) geçirmekte, duyuşal nöronlar ile merkezi sinir sistemi komponentlerinde ifadenlenmekte ve ağrı, sıcak-soğuk duyularının algılanması, mekanik uyarım ve çevresel iritan maddelere duyarlılık gibi fizyolojik olaylarla ilişkilendirilmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı deneysel Parkinson hastalığı modelinde *in vitro* koşullarda bazı TRP katyon kanal proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri izlemek, bunun sonucunda belirlenen kanalların small interfering RNA (siRNA) transfeksiyonuyla post-transkripsiyonel olarak susturulmasıyla hücrelerin patolojik durumlarındaki olası değişimleri araştırmaktır. Böylelikle SH-SY5Y hücrelerinde doğal olarak ifade edilen TRP kanallarından hangisi veya hangileri deneysel Parkinson hastalığı patolojisinde ekspresyon değişimine uğradığı ve post-transkripsiyonel susturma sonucu hücresel canlılığa etki düzeyleri sorgulanmış olacaktır. Diğer bir bakış açısıyla da bu çalışma kapsamındaki TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon

kanallarından hangisinin hücrel apoptoza daha çok katkı yaptığını ve patolojik parametreleri artırdığını belirlemek amaçlanmıştır. Sonuçta deneysel Parkinson hastalığı modelinde TRP kanalları vasıtasıyla hastalığın boyutları belirlenerek patolojik süreçleri yavaşlatmadaki rolleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çalışmamız Parkinson hastalığı tedavisine TRP kanalları üzerinden yeni bir bakış açısı kazandırmayı amaçlamaktadır.

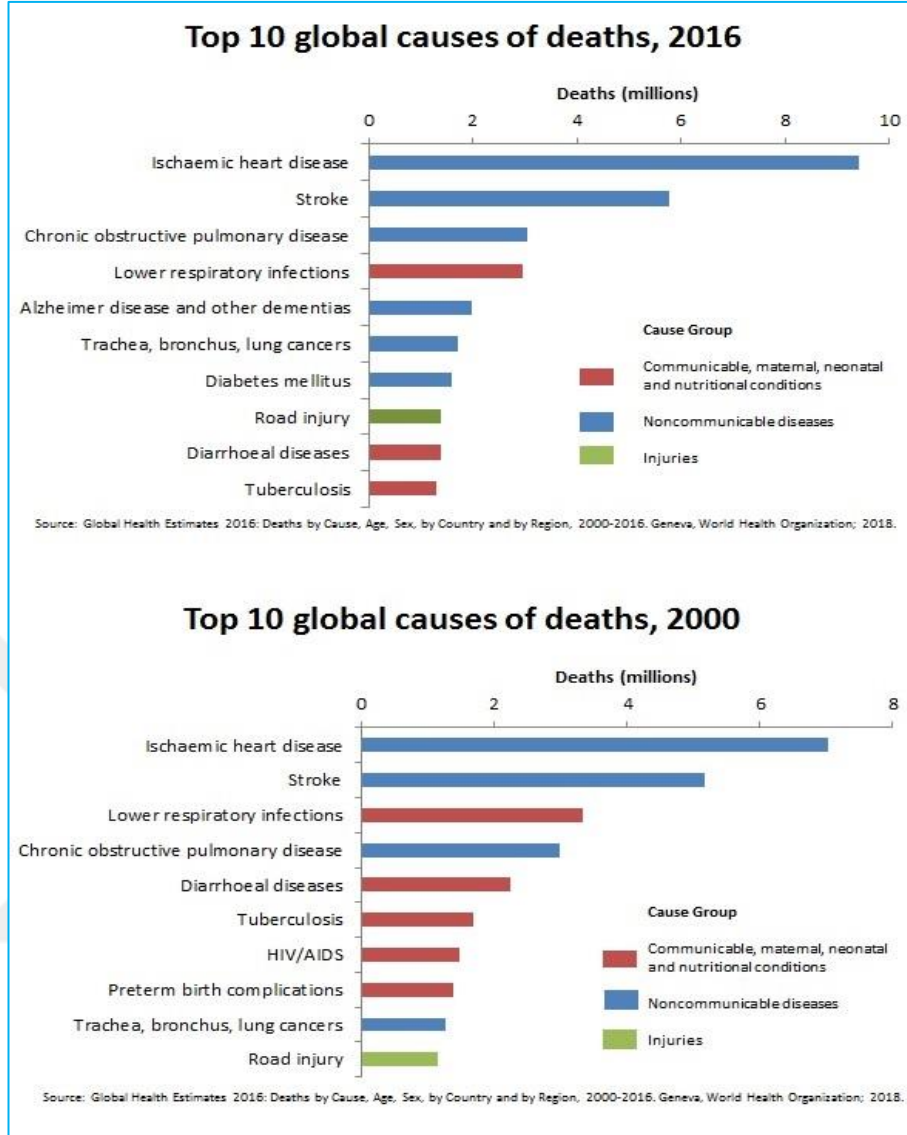
Mevcut literatüre göre konu ve yönteme ilişkin SH-SY5Y nöronal hücrelerinde deneysel Parkinson hastalığı modelinde henüz çalışılmamış olan TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanallarının tarafımızdan ilk defa araştırmaya konu edilmiş olması bu tez çalışmasının özgünlüğünü yansıtmaktadır. Günümüzde kullanılan kalsiyum kanal blokörlerinin TRP kanallarında etkili olamaması bu kanallara özgü aktivatör ve inhibitörlerin keşfini gerekli kılmaktadır. Geçmiş çalışmalarda nöroblastoma hücrelerinde doğal olarak ifadelenen TRPC1 kanallarının Parkinson hastalığı patolojisini azaltmada etkili olabileceği araştırılmıştır (1). Yine bu hücrelerde mevcut olmayıp transfeksiyon yöntemiyle ifadenmesi indüklenen TRPM2 kanallarının da Parkinson hastalığı patolojisine katkı yaptığı benzer bir model çalışmasıyla gösterilmiştir (2). Ancak günümüze kadar yapılan deneysel model çalışmaları tarandığında SH-SY5Y hücre hattıyla ilgili TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanallarının Parkinson hastalığı modelindeki rolüne ilişkin veriler yetersizdir. Bu çalışmada anılan TRP kanallarının deneysel Parkinson hastalığı modelinde potansiyel etkilerini ortaya koyabilecek sonuçlar sunulmuştur ve Parkinson hastalığı ile mücadelede TRP kanallarına özgü farmakolojik ajanların kullanımı ile hastalığa tedavi yaklaşımlarına yeni katkılar önerilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Nöronal Dejenerasyon Süreçleri

Nörolojik hastalıklar dünya genelindeki önemli ölüm nedenleri arasında sayılmakta ve 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre toplam ölümlerin % 11.84'ünü oluşturmaktadır ve 2030 yılına kadar bu oranın %12.22'ye kadar çıkacağı tahmin edilmektedir (3). Nörodejeneratif hastalıklar, nörolojik hastalıklar içerisinde sayılan, yaşa bağlı olarak ilerleyen, nöronal hücre hasarı ve ölümü süreçlerini kapsayan Alzheimer hastalığı, ALS, Huntington hastalığı ve Parkinson hastalığı olarak dört ana grupta toplanır. Bu hastalıklar arasında sadece Alzheimer hastalığı ve bağlı komplikasyonların prevalansı son 15 yılda (2000-2015) iki kattan fazla artarak dünya çapında en çok görülen beşinci ölüm sebebi olarak kayıtlara geçmiştir (Şekil 2.1). Günümüze kadar geliştirilen terapötik yaklaşımlar bireylerde hastalığın ilerleyişini baskılayabilse de prevalansı azaltmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, nöronlarda ortaya çıkan dejenerasyon süreçlerinin hücresel ve moleküler mekanizmalarının nasıl geliştiğini anlamaya ihtiyaç vardır.

Nörodejeneratif hastalıklar genellikle yaşlanma, ilerleyici nöronal hasar, nöron yapısı ve fonksiyonunun bozulması ve sonunda apoptozla karakterizedir. Nörodejeneratif hastalıkların sistemik etkileri ise düşük yaşam kalitesi, kişinin bakıma ihtiyacı mental ve motor fonksiyonların kaybedilmesi, koma ve ölüm olarak sıralanabilir. Nörodejeneratif hastalıkların sebepleri arasında alkolizm, genetik faktörler, inme, kimyasallar ve toksinler gibi geniş yelpazede etkenler sıralanmaktadır (4). Bazı olgularda hastalığın sebebi yeterince açık bir nedene dayandırılmamaktadır. Nörodejeneratif hastalıkları diğer nörolojik hastalıklardan ayıran en önemli fark nörodejenerasyondur. Nörodejenerasyon temelde bir kromozomdaki genetik bozukluğun varlığı veya protein mimarisinin değişmesiyle ortaya çıkmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar dört ana grupta toplansa da prion hastalıkları, SMA ve SSA gibi nadir olgular da nörodejeneratif hastalık olarak sayılmaktadır (5). Birçok nörodejeneratif hastalığın kesin tedavisinin halen olmaması nedeniyle hücresel ve moleküler temelde nörodejenerasyonu anlamak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir.



Şekil 2.1. DSÖ verilerine göre dünya genelindeki ilk on ölüm sebebi (6).

Hücre kültürleri temel, sürdürülebilir, ekonomik ve bir o kadar da optimize çıktılar alınması sebebiyle *in vitro* koşullarda sistemik hastalıkların modellenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Dahası *in vitro* model yaklaşımları hücresel ve moleküler seviyelerde nörolojik hastalıklar yanında kardiyovasküler ve solunum sistemi hastalıkları, değişik tipteki kanserler, iskemi, viral ve bakteriyel hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin araştırılmasında yadsınamaz çözümler sunduğundan sıklıkla başvurulan yöntemler arasındadır. Günden güne artan sayıda araştırmacı yeni *in vitro* modeller geliştirilmekte ve nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* koşullarda taklidini yapmakta ve nöral dejenerasyon süreçlerini daha iyi anlamaya çalışmaktadır. Bu

alışmalar sadece hayvan ve faz çalışmalarına geçişe katkı sağlamakla kalmamakta aynı zamanda kendileri de sonraki çalışmalara yeni veriler olarak öncülük etmektedir.

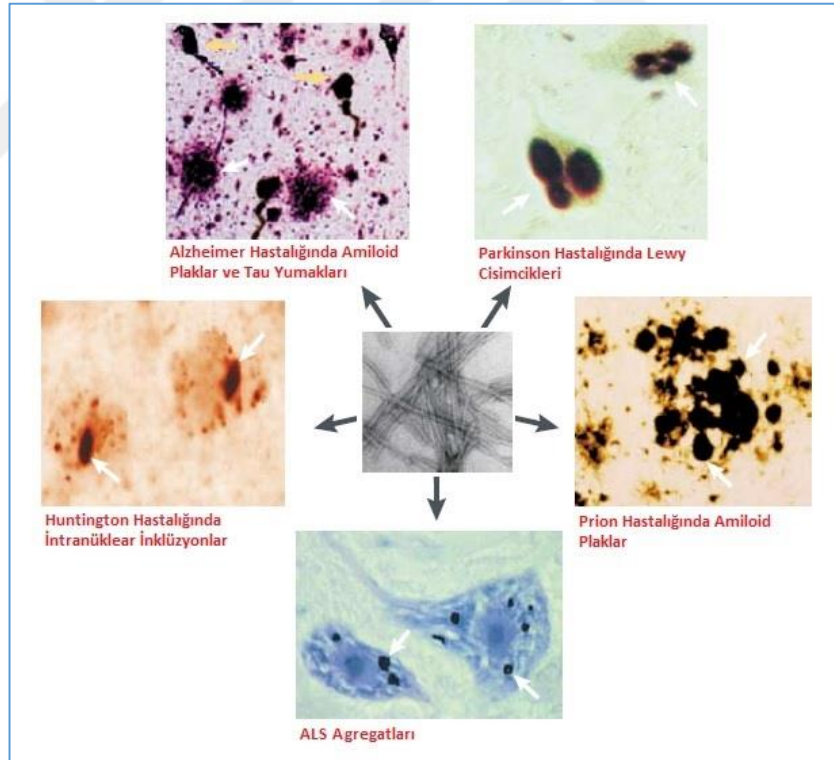
Bir şemsiye terim olarak nörodejenerasyon sinir sistemindeki nöron fonksiyonlarının yaş, kimyasallar, beklenmedik protein ekspresyonları, genetik bozukluklar gibi doğrudan veya doğrudan olmayan yollarla etkilenmesidir. Bundan dolayı, sinir sistemini etkileyen multiple sklerozis, hipoksi ve metabolik faktörler gibi diğer nedenler nörodejenerasyon çatısı içerisine dâhil edilmemektedir. Nörodejeneratif hastalıklar beynin serebral korteks, bazal gangliyonlar ve spinal kord merkezli çeşitli bölgelerinde meydana geldiklerinden bu bölgeler altında sınıflandırılırlar. Günümüzde bir kısmı nadir hastalık kapsamında olmak üzere yüzden fazla farklı nörodejeneratif hastalık teşhis edilip tanımlanmasına rağmen terapötik araştırmalar daha çok en yaygın olan dördü üzerine yoğunlaşmaktadır. Örneğin; serebral korteksi etkileyen nörodejeneratif hastalıklar demans gözlenen (Alzheimer hastalığı) ve demans gözlenmeyen şeklinde iki gruba daha ayrılır. Bazal gangliyonlardan substansiya nigra, talamik ve beyin sapı nükleuslarındaki nörodejenerasyonlar hipokinetik (Parkinson hastalığı) ve hiperkinetik (Huntington hastalığı) hareket bozukluklarıyla karakterizedir. Spinal kord kökenli nörodejenerasyonlar ise başka bir gruptur. Bunlara amiyotrofik lateral sklerozis ile spinal kas atrofisi örnek olarak sayılabilir (7).

Son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışmanın sonucunda apoptoz, kalsiyum sinyali, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının nörodejenerasyonun hücrese seviyelerinde rolü olabileceğine vurgu yapılmaktadır (8–10). Bunun da ötesinde nörodejenerasyon olgularının yaklaşık %10'unun kalıtsal faktörlerle ilişkili olabileceğine de dikkat çekilmiştir (11–13). Nörodejenerasyonun bir başka sebebi de protein fonksiyon kaybı ve aşırı agregasyon olarak sayılmaktadır. Nöronal bazı proteinlerin yanlış sentezi, bazı enzimlerin protein işlemede hataları, genetik yapıdaki kalıcı bozukluklar mutant proteinlerin oluşmasına ve birikmesine sebep olmakta ve bu mutant proteinler de nöronları tahrip etmektedir (şekil 2.2). Hücre dışı amiloid-β birikmesi ve hücre içi tau protein fosforilasyonu Alzheimer hastalığının hücre altı seviyede patolojik temellerini oluşturduğuna inanılmaktadır (14,15).

Amiyotrofik lateral sklerozis hastalığının biyokimyasal belirtici olarak üst ve alt motor nöronların sitozollerinde yapısı değişmiş ve agrege olmuş proteinler sayılır. Transactive response DNA-binding ribonucleoprotein 43 (TDP-43) ve copper/zinc-binding superoxide dismutase (SOD1)'in sitozolik birikimi amiyotrofik lateral sklerozis'in işaretçisi olduğu düşünülmektedir (16,17).

Huntington hastalığı ise otozomal dominant karakterli nörodejeneratif bir hastalıktır. HTT genindeki üç nükleotidin (CAG) çoklu tekrarı poli-glutamin zincirlerinin sentezini ve mutant huntingtin (mHtt) proteininin oluşmasına neden olur. Bu mHtt proteininin sitozolik birikimi sinaptik sinyalleri bozar ve mitokondri fonksiyonlarını olumsuz etkiler (18).

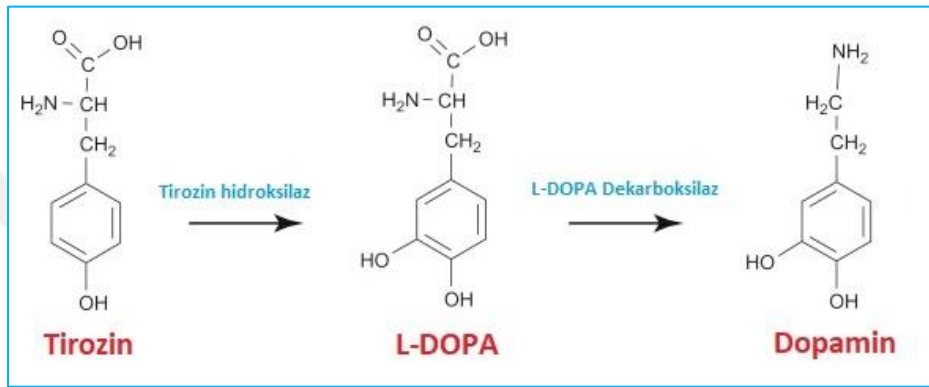
Parkinson hastalığı etiyolojisinde ise alfa-sinüklein (Lewy cisimcikleri) bazal gangliyonlardan substansiya nigra da dopaminerjik nöronların hasarına sebep olur (19,20).



Şekil 2.2. Nörodejeneratif hastalıklar ve mutant protein birikimlerinin gösterimi (12).

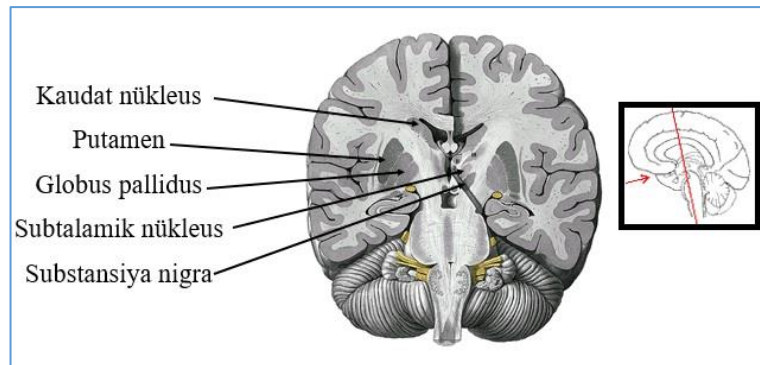
2.2. Bazal Gangliyonlar ve İşlevleri

Bazal gangliyonlar fonksiyonel olarak, striatum (kaudat nükleus ve putamen), globus pallidus (interna ve eksterna), substansiya nigra (pars kompakta ve pars retikularis) ve subtalamik nükleus şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bazal gangliyonlardan substansiya nigra pars kompakta nöronlarının dopamin sentezi ve monosinaps yaptığı striatum nöronlarında sentezlenen dopaminin D1 veya D2 reseptörlerine bağlanması motor hareketlerin başlatılması ve bilişsel kontrolünde önemli rol oynar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Tirozin'den dopamin sentezi ve aracılık eden enzimlerin gösterimi.

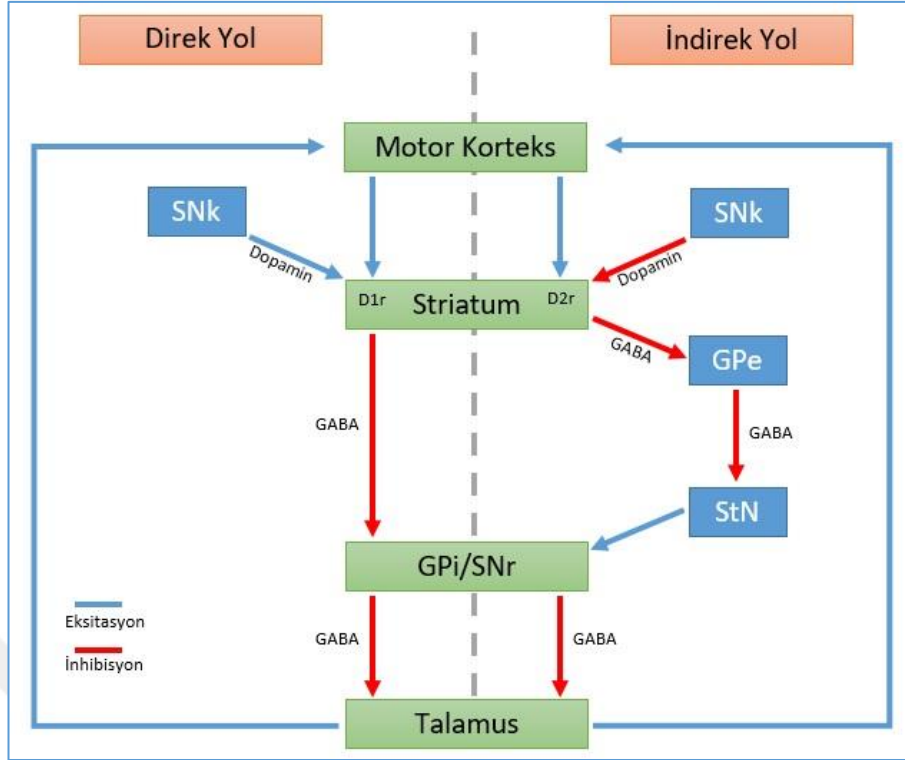
Omurilik ve beyin sapından bilgi alış-verişi olmayan bazal gangliyonlara striatum'dan bilgi girişi olurken bilgi çıkışı globus pallidus ile substansiya nigra vasıtasıyla gerçekleştirilir. Karmaşık motor aktivite gerektiren hareketlerin ortaya çıkışından, ardışık motor hareketlerin bilişsel kontrolünden, motor hareketlerin hızının ayarlanmasından sorumludurlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Bazal gangliyonların anatomik gösterimi.

Bazal gangliyonların aralarında ve korteksle olan bağlantılarında dopaminerjik, GABAerjik ve kolinerjik yollar mevcuttur. Dopaminerjik yollar, substansiya nigra pars kompaktadan striatum nöronlarına giden inhibitör ve eksitator etkili iki yolu kapsar. Substansiya nigra pars kompakta nöronlarından salınan dopamin, striatum nöronlarında direk yolu D1 reseptörlerine bağlanarak aktive ederek striatumdan monosinaptik yolla globus pallidus interna ve substansiya nigra pars retikularise ulaşan uyarım gama aminobütirik asit (GABA) salınımını modüle eder. Talamus üzerindeki inhibisyon azalarak motor alanlara eksitator girdiler ulaşır ve motor hareket kolaylaştırılır.

Eğer substansiya nigra pars kompakta nöronlarından salınan dopamin, striatum nöronlarında indirek yolu D2 reseptörlerine bağlanarak inhibe ederse striatumdan globus pallidus eksterna, oradan subtalamik nükleus, oradan da globus pallidus interna ve substansiya nigra pars retikularise ulaşan projeksiyonlar ile bu nöronların ateşleme frekansını artırarak talamus aracılığıyla korteks nöronlarının inhibisyonuna sebep olursa talamusun motor korteks üzerindeki eksitator etkisi azalır ve motor hareketin gerçekleştirilmesi zorlaşır (Şekil 2.5). Normal şartlarda direk yol indirek yola baskındır. Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronlardaki hasar nedeniyle dopamin salınımı zamanla azaldığından direk yolun baskınlığı azalırken indirek yol daha baskın hale gelir ve sonuçta talamusun korteks üzerine yaptığı eksitasyon azalacağından motor hareketlerin yapılması zorlaşır (21).

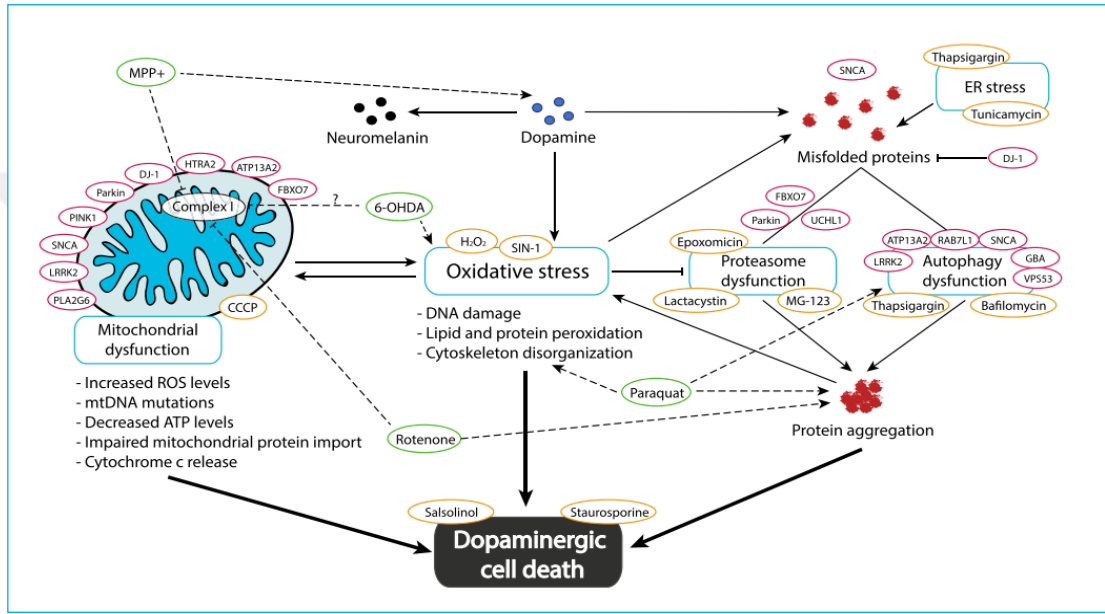


Şekil 2.5. Normal fizyolojik durumda ve Parkinson hastalığı patolojisinde bazal gangliyonlardaki direk ve indirek yolların görünümü. SNk: substansiya nigra pars kompakta, D1r: D1 reseptörleri, D2r: D2 reseptörleri, GPe: globus pallidus eksterna, StN: subtalamik nükleus, GPi: globus pallidus interna, SNr: substansiya nigra pars retikülaris.

2.3. Parkinson Hastalığında Etyopatogenez

Parkinson hastalığı, Alzheimer'dan sonra en yüksek ikinci prevalansa sahip olan, bazal gangliyon nöronlarında dopamin seviyelerinin azalmasıyla karakterize, özellikle substansiya nigra pars kompakta nöronlarındaki dejenerasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.3). Parkinson hastalığı 60 yaş üstü popülasyonun %1'inde görülmektedir (22,23). Hastalığın başlıca klinik belirtileri istirahat tremoru, bradikinezi, rijidite ve postüral refleks bozukluğudur. Hastalığın ilk klinik belirtilerinin ortaya çıkmasından 4-6 yıl önce substansiya nigradaki dopaminerjik nöronların yaklaşık %60'ının dejenerasyonla kaybedildiği uzun zamandır bilinmektedir (24). Parkinson hastalarının büyük çoğunluğu hastalığı kalıtsal olmayan yollarla kazanır (idiyopatik veya sporadik) ve Lewy cisimleri oluşumu, oksidatif stresin etkileri, mitokondri depolarizasyonu gibi çok faktörlü nedenlerle nöronal apoptoz sonucu ortaya çıkar. Hastaların %5'i gibi küçük bir grubu ancak ailesel tipte

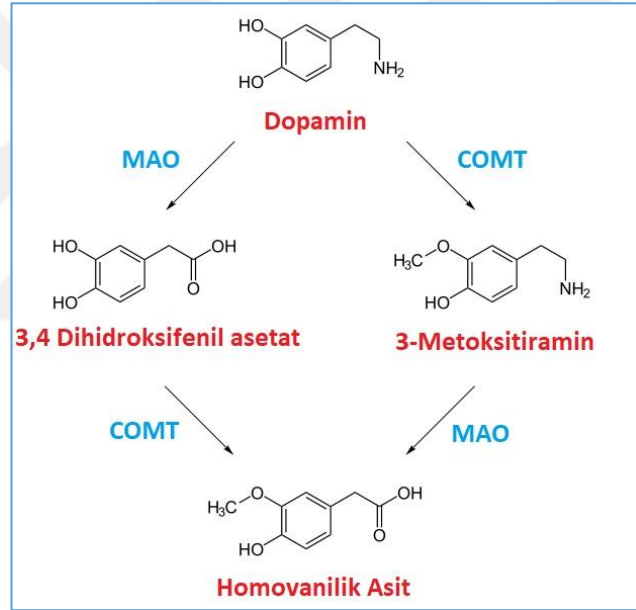
gruplandırılır. Bazı gen mutasyonları ailesel tipteki Parkinson'dan sorumlu tutulmaktadır. Nörodejenerasyondan sorumlu gen mutasyonları alfa-sinüklein (SNCA), parkin (PARK2), Parkinson hastalığı protein 7 (DJ-1), PTEN ile başlatılan kalıcı kinaz 1 (PINK1), dardarin (LRRK2) ve ATP13A2 (PARK9) olarak sayılmaktadır (25,26). Günümüzde genetik değişikliğe uğratılan hayvan deneyi çalışmaları ile moleküler genetik yaklaşımlar hastalıkla ilişkili yeni genler veya proteinlerin varlığını araştırmaya devam etmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Parkinson hastalığı modelinde en yaygın kullanılan 3 nörotoksin ve mitokondri üzerinde etkileşim merkezleri. Nörotoksinler mitokondrideki elektron taşıma sisteminde 1 numaralı kompleksi etkileyerek ROT üretimi ve mitokondri depolarizasyonunu artırarak hücreyi apoptoza götüren süreçleri başlatır (27).

Parkinson hastalığında nörodejenerasyon sonucu zamanla ortaya çıkan dopamin yetersizliği dopamin metabolizmasında rol oynayan iki enzim tarafından tablonun kötüleşmesini tetikler (Şekil 2.7). Bu nedenle Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlardan bir grubu da dopamin yıkımını katalizleyen enzimlerden mono amin oksidaz (MAO) enzim inhibitörleri (Ör: selejilin ve rasajilin) ve katekol-o-metiltransferaz (COMT) enzim inhibitörleridir (Ör: entakapon ve tolkapon). Böylelikle az da olsa sentezlenen dopaminden de fayda sağlama yolu aranmaktadır. Dopamin, kan beyin bariyerini geçemediğinden ve sistemik yan etkileri nedeniyle tedavide doğrudan kullanılamamaktadır. Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan

yöntemlerinden biri olan dopamin agonistleri (Ör: bromokriptin), striatum nöronlarında D1 ve D2 reseptörlerine bağlanan ve bu yolla dopamin benzeri etkileri uyaran ilaç grubudur. Diğer bir grup ilaç da sentezi gittikçe azalan dopamini günlük alımla takviye etmeyi amaçlayan dopamin prekürsörleridir. L-Dopa kan beyin bariyerini geçebilen bir dopamin prekürsörüdür ve dopaminerjik nöronlarda L-dopa dekarboksilaz enzim aktivitesiyle dopamine dönüştürülür (Şekil 2.3). Ancak periferik dokularda da L-Dopa dekarboksilaz enzimi bulunduğundan periferde oluşacak dopaminin yan etkilerini önlemek ve alınan dozdan maksimum fayda sağlamak amacıyla L-Dopa tedavisine ek olarak yine kan beyin bariyerini geçemeyen L-Dopa dekarboksilaz enzim inhibitörleri (Ör: karbidopa) de L-Dopa ile birlikte verilmektedir (28).



Şekil 2.7. Dopamin metabolizmasından sorumlu enzimlerin gösterimi.

Hastalığın altında yatan pek çok olası mekanizma tanımlanmasına rağmen halen alfa-sinüklein agregasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon nörodejenerasyon süreçlerini anlamada en temel iki başlık olarak ortaya çıkmaktadır (29,30). Alfa-sinüklein agregasyonu Parkinson hastalığının patolojik belirteçlerindendir. Hem Lewy cisimcikleri denilen sitoplazmik inklüzyonların hem de nöron uzantılarında iplik/iğsi şekilde bulunan Lewy nöritlerinin yapısını oluşturur. Alfa-sinüklein proteini normalde sinaptik terminale yakın bölgelerde bulunduğundan sinaptik vezikül formasyonunda görevli olduğu düşünülen bir proteindir (31). Lewy cisimciklerinde ise normalde 140

aminoasitlik bu proteinin 129. pozisyonundaki Serin'den fosforillenme ve ubikitinlenmeyle çözünemeyen fibriler yapı kazanmasını sağlayarak fibriler alfa-sinüklein monomerlerinden oligomerik protofibrillere ve bunların da agregasyonu ile ortaya çıkan fibrillerin Lewy cisimciklerinin içinde biriktiği düşünülmektedir (32). Ancak Lewy cisimcikleri içerisinde çok sayıda farklı molekül de ihtiva etmektedir. Parkinson hastalığının evreleri ilerledikçe alfa-sinükleine bağlı olarak ortaya çıkan Lewy cisimcikleri ile nöritlerinin birikimi substansia nigra pars kompakta ile sınırlı kalmayıp bazal gangliyonların diğer bölümlerini de içerecek şekilde yayılmaktadır (33). Mutant alfa-sinüklein agregatlarının küresel veya halkasal morfolojilerinin hücre içi yaşamsal işlevleri bozduğu düşünülmektedir. Bu agregatların, hücre içi sinyal trafiğinin düzensizleşmesinde, transkripsiyon faktörlerine müdahil olmada, protein degradasyonunun bozulmasında, organel membranlarında por oluşturarak fonksiyon kaybında rolü olabileceği bildirilmiştir (34,35).

Nörodejeneratif hastalıkların çoğunda oksidatif stresin tetiklediği apoptoz mekanizmaları bulunmaktadır. Yağ asitleri bakımından zengin, oksijen tüketimi fazla, demir ve nöromelanin pigmenti bakımından fazla olan beyin dokusu, nöronları oksidatif hasara karşı hassas kılmaktadır (36). Glial hücre sitokinleri ve oksidasyon ürünleri de dopaminerjik nöronları hassaslaştırmaktadır ve bundan dolayı Parkinson hastalığında nöroinflamasyonun da ayrı bir yeri olduğu düşünülmektedir (37). Ayrıca dopaminin katabolizması sırasında MAO aktivitesiyle reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde belirgin bir artış olmaktadır. Bu nedenle oksidatif stresin nörodejenerasyon süreçlerinde merkezi bir yeri vardır (38,39).

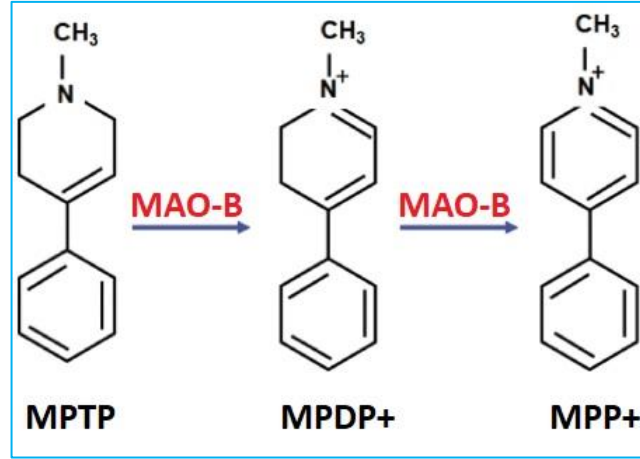
Oksidatif stres, ROT'un hücrenin biyokimyasal bileşenlerinden proteinler, lipidler ve nükleik asitler üzerinde yaptığı tahribatı ifade etmektedir. Hücrede oksidatif strese neden olan ROT'un kaynağı olarak başlıca mitokondriler karşımıza çıkmaktadır. Mitokondri fonksiyonlarından en önemlisi elektron taşıma zincirinin kusursuz sürdürülmesiyle üretilen biyokimyasal enerji olan ATP üretimidir. Elektron taşıma zincirinin işleyişi esnasında son elektron alıcısı olan moleküler oksijene elektron aktarımının yapılmasıyla ROT açığa çıkmaktadır. Ancak normal koşullarda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar vasıtasıyla nötrale edilebilen ROT, patolojik koşullarda antioksidan sistemin zayıflamasıyla birikmekte ve oksidatif strese neden olmaktadır. Normal şartlarda indirgeyici moleküllerin (NADH veya FADH₂)

katılımıyla elektron aktarımı esnasında açığa çıkan protonlar da membranlar arası alana taşınmakta ve iç membrana karşı elektrokimyasal gradient oluşmaktadır. Proton yoğunluğunca oluşan transmembran potansiyel ise protonların ATP sentaz aktivitesi ile içeri alınırken aynı zamanda ATP sentezine olanak sağlar (40). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$) normal fizyolojik sınırları aştığında mitokondri membranlarının Ca^{+2} geçirgenliği arttığından mitokondriyal depolarizasyon gerçekleşmekte ve mitokondri fonksiyonlarını yerine getirmede bir tehdit haline gelmektedir. Buna bağlı olarak ROT üretimi artmakta aynı zamanda hücrel apoptoz süreçleri kaspaz enzimleri aracılığıyla tetiklenmektedir. Hücreyi sonuçta apoptoza götüren bu yolda Ca^{+2} geçiren iyon kanallarının başat rolü bulunur. Kalsiyum geçiren iyon kanallarının patolojik koşullarda farklı açılma-kapanma davranışı gösterdiği iyi bilinmektedir. Sonuç olarak hücrel kalsiyum sinyallerinin düzensizliği, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve ROT üretimi ile apoptoz arasındaki geri besleme mekanizması antioksidan savunmanın da yetersiz kaldığı durumlarda patolojik koşulları hızlandırmaktadır. Bu pozitif geri bildirim mekanizmaları ile nöronal hücreler zamanla apoptoza yenik düşmektedir. Parkinson hastalığı patolojisinde alfa-sinüklein oligomerlerinin halkasal yapıda membrana gömülerek hücreye kalsiyum girişini tetikledikleri ve buna bağlı olarak eksitabiliteleri etkileyebileceği de gösterilmiştir (41).

2.4. Parkinson Hastalığının Hücrel Modelleri

Parkinson hastalığı *in vitro* modelleri sekonder hücre hatları, kök hücreler veya primer kültüre alınmış hücreler üzerindeki uygulamaları kapsamaktadır. Parkinson hastalığı indüklemeye en yaygın olarak hücre hatları kullanılmaktadır. Hücre kültürlerinde kimyasal ajanlarla inkübe edilen hücreler farklılaştırma uygulanarak veya doğrudan nörokimyasal muamelesi sonrasındaki değişimleri izlenmektedir (42).

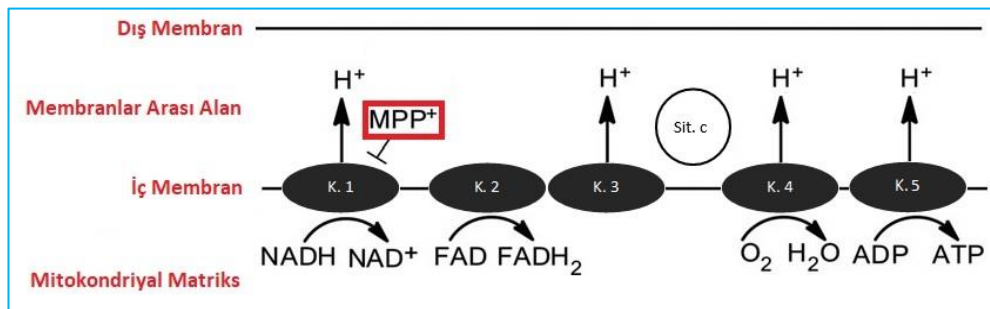
Parkinson modelleri için kimyasal maddeler de kullanılmaktadır. Bunlar başlıca 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ve rotenon'dur. Çok sayıda çalışmada farklılaştırılmış veya farklılaştırılmamış hücrelerde bu kimyasalların etkisi ile modelleme yapılmıştır (27).



Şekil 2.8. MPTP'nin MAO enzim aktivitesiyle yıkımıyla MPP⁺ nörotoksini oluşur.

MPP⁺, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)'nin toksik bir metabolitidir ve mono amin oksidaz B (MAO-B) enzimi aktivitesiyle ortaya çıkar ve seçici olarak substansiya nigra dopaminerjik nöronlarının ölümüne sebep olur. MPP⁺, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin birinci halkası olan NADH redüktaz enzim aktivitesini ve ATP sentezi aşamasını bozarak iş görür. Bu da reaktif oksijen türlerinin üretimine ve nöronal apoptozun başlamasına sebep olur (43). MPP⁺ ile başlatılan nörodejenerasyonda hücre içine iki değerlikli katyonik akışta ve hücre içi magnezyum birikiminde artış gözlenmektedir. Bunlar toksik kimyasala karşı hücre metabolik fonksiyonlarını korumaya yönelik alınan önlemler arasındadır (44). Bundan dolayı MPP⁺, deneysel MPTP Parkinson modelinin hücre kültürü modeli olarak SH-SY5Y ve PC-12 (rat adrenal feokromasitoma, ATCC-CRL-1721) hücrelerinde oldukça iyi şekilde araştırılmıştır (45).

Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde yer alan enzim komplekslerini hedef alan kimyasal ajanlarla Parkinson hastalığı modelleri literatürde geniş yer almaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Nörotoksinler mitokondriyal elektron taşıma zincirini hedef alır.

Aşağıdaki tabloda hücre hatları ve mitokondri hedefli ajanlar ile indüklenen yaygın Parkinson hastalığı modelleri SH-SY5Y hücreleri bağlamında sunulmuştur (Tablo1.1).

Tablo 2.1. Nörotoksin ile başlatılan hücresel Parkinson hastalığı modelleri.

Parkinson Hastalığı	SH-SY5Y	6-OHDA	15 µM	24 saat	(46)
			20 µM	24 saat	(47)
			50 µM	24 saat	(48,49)
			100 µM	24 saat	(50–53)
		MPP+	50 µM	48 saat	(54)
			100 µM	96 saat	(37)
			200 µM	48 saat	(55)
			300 µM	48 saat	(56)
			500 µM	24 saat	(57–60)
			1 mM	48 saat	(52,61,62)
			1.5 mM	48 saat	(63)
			3 mM	18 saat	(64)
			5 mM	24 saat	(65,66)
		Rotenon	200 nM	24 saat	(67)
			500 nM	24 saat	(68,69)
			2.5 µM	12 saat	(70)
			3 µM	24 saat	(71)
			5 µM	24 saat	(72,73)
			10 µM	24 saat	(74)
			20 µM	24 saat	(75)
			60 µM	24 saat	(76)
			100 µM	24 saat	(77)

Benzer model çalışmaları PC-12 hücreleriyle de yapılmaktadır. Ancak SH-SY5Y hücrelerinin insan kökenli oluşu, nöronal kimyasal karakteri iyi yansıtabilmesi,

farklılaştırma prosedürlerine uygunluğu gibi özellikleri nedeniyle Alzheimer ve Parkinson hastalığı modellerinde sık kullanılır hale gelmiştir. Bu nedenle çalışmamız için bu hücre hattı seçilmiştir.

6-hidroksidopamin (6-OHDA), dopaminerjik nöronları seçici olarak tahrip etmede kullanılan bir nörotoksindir. Hücre kültürlerinde dozaj uygulaması kolay olmasına rağmen, kan beyin bariyerini geçemediğinden hayvan çalışmalarında beynin substansiya nigra veya striatum nöronlarına infüzyon uygulanırken stereotaksi gibi özel nitelikli gereçlere ihtiyaç duyulmaktadır (78). Literatüre bakıldığında 6-OHDA için SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan dozlar değişkenlik gösterebilirken inkübasyon süresi genellikle 24 saat olarak seçilmiştir (Tablo 2.1).

Rotenon ise insektisit olarak kullanılırken deneysel çalışmalarla Parkinson modeli için kullanılabileceği gösterilen bir izoflavondur. Mitokondri elektron taşıma zincirinin birinci kompleksinin kuvvetli inhibitörüdür. Bu etkisiyle nöronal hasara sebep olmaktadır. Mevcut literatür tarandığında rotenon için SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan dozlar çok fazla değişkenlik göstermektedir (Tablo 2.1).

MPP⁺ uygulamalarında da doz değişkenliği dikkat çekmesine rağmen literatürde bulunan kayıt sayısı diğer nörotoksin uygulamalarına nazaran daha fazladır. Aynı zamanda çalışmalarda araştırmacıların 500 µM doz ve 24 saat sürede MPP⁺ inkübasyonuna yoğunlaştığı da dikkat çekmektedir (Tablo 2.1).

2.5. TRP Katyon Kanalları

TRP katyon kanalları üst ailesi, üyeleri *Drosophila* cinsi sirke sineklerinin fotoreseptör hücrelerinde tespit edilmiş, çoğu Ca⁺²'a geçirgen transmembran yapıdaki iyon kanallarından oluşmaktadır (79). Ekstraselüler ortam (1.2-3 mM) intraselüler ortama (80-100 nM) kıyasla yaklaşık 20.000 misli daha fazla Ca⁺² içerdiği bilinmektedir. Sitozoldeki Ca⁺² konsantrasyonuna [Ca⁺²]i bağımlı olarak aktivasyon veya inaktivasyon gösteren bu kanallar aracılı katyonik akışın, hücrenin yaşamsal işlevlerini yerine getirmede önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca TRP kanallarının sadece plazma membranında değil hücresel organel membranlarında da yer aldığı bilinmektedir (80). TRP katyon kanal üst ailesi, insanlarda spesifik bağlanma bölgelerine göre toplamda 28 alt tip ihtiva eden, altı alt aileye ayrılır. Bunlar; Ankyrin

(TRPA), Canonical (TRPC), Melastatin (TRPM), Mucolipin (TRPML), Polycystin (TRPP) ve Vanilloid (TRPV) alt aileleridir (81).

Alt aileler, protein mimarisinin spesifik tanımlayıcı bölgelerine göre belirlenmiş üyelerden oluşur. TRPA alt ailesinin bir, TRPC alt ailesinin yedi, TRPM alt ailesinin sekiz, TRPML alt ailesinin üç, TRPP alt ailesinin üç, TRPV alt ailesinin şimdiye kadar altı üyesi keşfedilmiştir (82). Son yıllarda yapılan çalışmalarla TRP katyon kanallarının nörodejeneratif hastalıklarla da bağlantısı olabileceği bildirilmiştir (83). Bu da TRP katyon kanal araştırmalarına ilgiyi artırmıştır.

2.5.1. TRPM7 Katyon Kanalları

Bu araştırmanın konu kapsamı içerisinde yer alan TRPM7 ve TRPM8 katyon kanalları TRPM alt ailesinde yer almakta ve bu aile sekiz alt tipe ve dört gruba ayrılmaktadır. Gruplar, kanal mimarisini oluşturan aminoasit dizilerinin birbirine benzerliklerine göre oluşturulmuştur.

1. Grup; TRPM1 ve TRPM3'ten oluşur. TRPM1'i aktive eden faktörler tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen cilt ve retinal hücrelerin pigmentasyonundan sorumlu olabileceği, TRPM3'ün yüksek sıcaklık ve Ca^{+2} ile aktive olabildiği, nosisepsiyon ve ağrı iletimi ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (84,85).

2. Grup; TRPM6 ve TRPM7'den oluşur. TRPM6 ve TRPM7'nin karboksi terminalinden serin/treonin vasıtasıyla aktive edildiği, iki kanalın da benzer kanal-kinaz yapısında olduğu ve magnezyum homeostazisinde rolü olduğu bildirilmiştir (86).

3. Grup; TRPM4 ve TRPM5'ten oluşur. TRPM4 ve TRPM5'in Ca^{+2} ile bağlantılı aktivasyonu olmasına rağmen Ca^{+2} 'a geçirgen olmadığı, tat reseptörlerinin fonksiyonlarında rolü olabileceği gösterilmiştir (87,88).

4. Grup; TRPM2 ve TRPM8'den oluşur. TRPM2'nin oksidatif stresle ilişkili olduğu, NUDT9-H terminalinin ADP-Riboz pirofosfataz aktivitesiyle ADP-Riboz ve oksidatif stres (H_2O_2) ile birbirinden bağımsız olarak aktive olduğu iyi anlaşılmıştır. TRPM8'in ise düşük sıcaklıklar ve mentol ile aktive olduğu, nosisepsiyon ve ağrı iletiminde rolü olduğu üzerinde durulmaktadır (89,90).

TRPM7 kanalları TRPM2'ye benzer olarak yapısında kinaz domaini içeren benzersiz tipte bir kanaldır. Ancak kanalın aktivasyonu için kinaz bölgesinin konformasyonel değişimine ihtiyaç yoktur. TRPM7 kanalları hücre yaşamı için elzem kanallardandır ve genetik olarak silinen hücrelerde canlılığın kaybedildiği ve apoptozun arttığı gözlenmiştir (91). TRPM7 kanallarının hücre içi Ca^{+2} sinyalinin ayarlanmasından çok magnezyum iyonu (Mg^{+2}) dengesinin korunmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Kanalın aktivasyonunda rolü bilinen kimyasallar kolesterol ve naltriben metanosülfat iken düşük pH gibi fiziksel faktörlerin de aktivasyona sebep olabileceği bildirilmiştir (92). Kanal inhibisyonu için karvakrol yeterli olmaktadır. Hücre çoğalmasında da önemli bir role sahip olan TRPM7 kanalları nöronal dokularda, kanser hücrelerinde ve atriyal miyositlerde ifadenmektedir (93). TRPM7 katyon kanal inhibitörü karvakrol inkübasyonu ile glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını baskılayabileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (94,95).

2.5.2. TRPM8 Katyon Kanalları

TRPM8 katyon kanalları TRPM alt ailesinin son üyesidir. Cilt, mukoza, miyositler ve ürogenital sistemin primer nosiseptif liflerinde ifadenmektedir. TRPM8 kanalları ılık sıcaklıklarda ($T < 26^{\circ}C$) aktive olabilirken mentol, ökaliptol, geraniyol, isilin gibi kimyasallar ile de aktive olabilmektedir. TRPM8 kanallarında katyonik akış ACA, kapsazepin, klotrimazol, ekonazol, AMG2850 ve N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) piperazine-1-carboxamide (BCTC) ile baskılanabilir. Kapsazepin ve BCTC ilk olarak TRPV1 kanal inhibitörü olarak keşfedilse de TRPM8 ile yapılan çalışmalarda bu kanala olan etkisi de gösterilmiştir (96). Son yıllarda yapılan çalışmalarda TRPM2'nin spesifik aktivatörü olarak bilinen ADP-Riboz'un da TRPM8 katyon kanallarını bağımsız şekilde aktive edebileceği öne sürülmüştür (90). Nörolojik hastalıkların yanı sıra TRPM8 katyon kanalları ağrı ile ilişkilendirilmekte ve ağrı iletim yollarında rolü olabileceği düşünülmektedir (97).

2.5.3. TRPV1 Katyon Kanalları

TRPV1 katyon kanallarının yer aldığı aile ise TRPV alt ailesidir. TRPV alt ailesinin 1'den 6'ya kadar olmak üzere 6 alt tipi mevcuttur. TRPV1 kanalları yaygın olarak trigeminal gangliyon (TG), arka kök gangliyonu (DRG), hipotalamus,

serebellum, serebral korteks, talamus, substansiya nigra ve peptiderjik nöronlarda ifadelenir. Bu yapıların, duyuların algılanması ve ağrı iletim ağlarında yer aldığı iyi bilinmektedir. TRPV1 katyon kanalları yapısında ankyrin tekrarları içermektedir. Sistein aminoasidinden zengin tekrar dizileri kanalın oksidatif strese duyarlılığının göstergesidir. Oksidatif stresin yanı sıra TRPV1 kanallarının bir diğer özelliği de aşırı sıcaklıkla ($T > 43^{\circ}\text{C}$) aktive olabilmesidir (98,99). Kapsaisin, anandamid, reziniferatoksin gibi kimyasallarla ve çevresel iritan maddelerden kamfor ve alisin ile de aktivasyon gösterebilmektedir. TRPV1 kanalları üzerinde en etkili antagonistler ise kapsazepin, 5'-iyodoreziniferatoksin, rutenyum kırmızısı ve çeşitli antioksidanlar sayılabilir (100). Son yıllarda yapılan çalışmalarda TRPV1 katyon kanalları nörolojik hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (101).

Bu genel bilgiler ışığında, çalışma sırasında yapılacak analizlerin aşağıda belirlenen problem durumu sorularına cevap olması veya çıkarımlara kapı açması amaçlanmıştır.

a) SH-SY5Y hücrelerinde doğal ifadelenen TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanal ekspresyon seviyeleri ne düzeydedir? Böylelikle hücrelere yeni nöronal karakter kazandıran farklılaştırma işleminin TRP kanal ekspresyonlarında bir değişikliğe yol açıp açmadığı netleşmiş olacaktır.

b) Deneysel Parkinson hastalığının TRP kanal aktivasyonu veya inhibisyonu ile bağlantısının ortaya çıkarılabilmesi için siRNA uygulamasıyla protein ekspresyonlarında sessizleştirme yapılmıştır. Deneysel modelin TRP kanal ekspresyonlarındaki olası değişimin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğuna patolojik süreçlerin ilerleyip ilerlemediğine bakılarak yeni bir anlayış ortaya koyulmaya çalışılacaktır.

c) Patolojik süreçlere bağlı nöronal hücre ölümünde muhtemel yolak bileşenleri olan, mitokondriyal depolarizasyon ve diğer oksidatif belirteçlerin kanallar ile bağlantısı detaylı olarak irdelenmiş olacaktır.

Önceki çalışmalarda belirtildiği gibi SH-SY5Y hücrelerinde doğal ifadelenen TRPC1 kanalının Parkinson modelinde nöroprotektif etkilerinin varlığı belirlendiği gibi TRP kanal ailesinden bu hücrede doğal olarak ifadelenen diğer üç kanalın da etki düzeyleri araştırılmış olacaktır. Bu öncü yönüyle çalışmamız sonraki çalışmalara da

kaynak niteliğinde olup knock-out hayvan modelleri ile de tekrarlanması kayda değer farmakolojik sonuçlar ortaya koyacağına dair inancımız tamdır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Invert mikroskop, Zeiss, Primo Vert (Almanya)

Laminar akım kabini, Cryste (Güney Kore)

Otomatik pipetler, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf (Almanya)

Şarjlı pipet pompası, Witeg (Almanya) ve Accu-jet pro (ABD)

Serolojik pipetler, 5 ml ve 10 ml hacimlerde, ISOLAB (Almanya)

Spektrofotometre, UV 160, Shimadzu (Japonya)

Floresan spektrofluorometre, Cary Eclipse, Varian (Avustralya)

Plate reader, Tecan, Infinite M200 Pro (Avusturya)

Jel görüntüleme cihazı, G:Box, Syngene (İngiltere)

Soğutmalı santrifüj, Kubota 2800 (Japonya)

Derin dondurucu, -30 °C, Sanyo (Japonya)

Derin dondurucu, -86 °C, Daihan (Güney Kore)

Hassas terazi, SPB 32, Scaltec (İsviçre)

Vorteks, NM 100, Nüve (Türkiye)

pH metre, Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı, Nüve (Türkiye)

CO₂ inkübatörü, Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)

Çalkalamalı su banyosu, Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Çalkalama cihazı, PSU-10-İ, Biosan (Türkiye)

Ultrasonik parçalayıcı, HD 2070, Bandelin Electronic (Almanya)

Kültür flaskları, hücre kültürü şişe 25 cm², 120.01.025, ISOLAB (Almanya)

Kültür flaskları, hücre kültürü şişe 75 cm², 120.01.075, ISOLAB (Almanya)

Santrifüj tüpleri, 15 ml hacimde, 078.02.007, ISOLAB (Almanya)

Santrifüj tüpleri, 50 ml hacimde, 078.02.008, ISOLAB (Almanya)

Cryo tüpler, 2 ml hacimde, CL2ARBEPSTS, Biosigma (İtalya)

Küvetler, 4 ml hacimde, 67.754, Sarstedt (Almanya)

Steril petri kutuları, 081.01.100, ISOLAB (Almanya)

UV-C Lamba, 120 cm, TUV, 36W/G36 T8, Philips (Hollanda)



3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyoteknolojik Maddeler

DMEM/F-12 Bazal Medyum, D8437, Sigma Aldrich, ABD

Fetal Bovine Serum, F7524, Sigma Aldrich, ABD

Penicillin-Streptomycin, P0781, Sigma Aldrich, ABD

Trypsin-EDTA (%0.25), T4049, Sigma Aldrich, ABD

Dimetil Sülfoksit (DMSO), D2650, Sigma Aldrich, ABD

Phosphate Buffered Saline (PBS), L1835, Merck Millipore, ABD

TRPM7 Primer Antikor, BT-AP09233, BT Lab, Çin

TRPM8 Primer Antikor, BT-AP09234, BT Lab, Çin

TRPV1 Primer Antikor, YID5127, YL Biont, Çin

β -Aktin Primer Antikor, 12262S, Cell Signaling Technology, ABD

Sekonder Antikor, NA934; GE Healthcare, Amersham, İngiltere

Kontrol siRNA, sc-36869, Santa Cruz, ABD

TRPM7 siRNA, sc-42662, Santa Cruz, ABD

TRPM8 siRNA, sc-95009, Santa Cruz, ABD

TRPV1 siRNA, sc-36826, Santa Cruz, ABD

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, 31985070, Thermo Fisher, ABD

siRNA Transfection Reagent, FP 310, ABP Biosciences, ABD

MPP⁺ iodide, D048, Sigma Aldrich, ABD

Retinoik asit, R2625, Sigma Aldrich, ABD

Fura-2 AM, F1221, Thermo Fisher, ABD

Capsaicin (kapsaisin), M2028, Sigma Aldrich, ABD

Capsazepine (kapsazepin), sc-201098A, Santa Cruz, ABD

Cholesterol (kolesterol), C8667, Sigma Aldrich, ABD

Carvacrol (karvakrol), 282197, Sigma Aldrich, ABD

Menthol (mentol), A5322, AppliChem, Almanya

Antranilik asit (ACA), sc-200734, Santa Cruz, ABD

Dihydrorhodamine 123 (DHR-123), D1054, Sigma Aldrich, ABD

JC-1, T4069, Sigma Aldrich, ABD

MTT boyası, M2128, Sigma Aldrich, ABD

Kaspaz 3 substratı, Ac-DEVD-AFC, sc-311274A, Santa Cruz, ABD

Kaspaz 9 substratı, Ac-LEHD-AFC, sc-311277A, Santa Cruz, ABD

Apoptoz kiti, Apoptosis Assay Cell-APOPercentage™, Biocolor, K. İrlanda

General Dopamin ELISA Kit, EA0041Hu, BT Lab, Çin

Mono Amin Oksidaz Test Kiti, MAK136, Sigma Aldrich, ABD

Alfa-sinüklein ELISA Kiti, E1313Hu, BT Lab, Çin

3.2. Yöntem

3.2.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü

SH-SY5Y nöronal hücrelerinin ekim ve pasajlama işlemleri steril laminar akım kabini (laminar flow) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ekim ve pasajlama işlemlerinin öncesinde laminar akım kabininin kültür kaplarının alt yüzeyleri ile temas edecek çalışma alanı, 15 dk boyunca ultraviyole (UV-C Lamba, 120 cm, TUV, 36W/G36 T8, Philips, Hollanda) ışığa maruz bırakılmak suretiyle sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Hücrelerin ekim işlemine geçmeden önce laminar akım kabinin çalışma yüzeyi, invert mikroskopun tablası ve kullanacağımız diğer tek kullanımlık olmayan malzemeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Daha önceden dondurma işlemi uygulanmış SH-SY5Y hücreleri sıvı azot tankı içerisinde bulunan 2 ml'lik cryo tüplerde muhafaza edilmektedir. Hücrelerin çözündürme işleminin çok hızlı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Aksi takdirde hücre membranları hızlı bir şekilde parçalanarak hücrelerde morfolojik bozulmalara ve ölümlere sebep olmaktadır. Bu nedenle işlemlerin hızlıca yürütülebilmesi için hücreler laminar akım kabinine alınmadan önce medyumlar hazırlanarak hücre kültürü kaplarına (flask ve santrifüj tüpü) yeterli miktarda önceden koyulmuştur.

Büyütme Medyumu Hazırlama

SH-SY5Y hücrelerinin ilk ekimi ve flask bakımından sayıca yeterli çokluğa ulaşana kadar pasajlamada HAM'S F12 ve DMEM bazal medyumlarının 1:1 oranlarında birleşimiyle elde edilmiş ve ticari olarak satılan miks medyumlar (D8437, Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri için büyütme medyumu %89 bazal medyum, %10 Fetal Bovine Serum (F7524, Sigma Aldrich, ABD) ve %1'i penicillin-streptomycin (P0781, Sigma Aldrich, ABD) antibiyotik kombinasyonu olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu karışım terminolojik olarak 'büyütme medyumu' olarak adlandırılrsa da ilerleyen bölümlerde sadece 'medyum' şeklinde anılmıştır.

Çözdürme

Hücreler için hazırlanan medyumdan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla 75 cm²'lik zemin alanına ve 250 ml'lik hacme sahip olan flasklara (ISOLAB,

Almanya) 10'ar ml hacimlerde aktarıldı. Flaskların kapakları kapatılarak hazır bir şekilde bekletildi. Bunun yanı sıra 15 ml'lik bir falkon tüp (ISOLAB, Almanya) içerisine medyumdan 9 ml koyuldu. SH-SY5Y hücrelerini ihtiva eden cryo tüpler sıvı nitrojen tankı içerisinden alınarak önceden sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda yarı sıvı-yarı buz haline gelinceye kadar ısıtıldı (yaklaşık 1-2 dk). Cryo tüp içeriği yarı sıvı-yarı buz hale gelince ısıtma işlemi sonlandırılarak cryo tüpün etrafı %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilip peçete ile silinip laminar akım kabini içerisine yerleştirildi. Henüz yarı sıvı-yarı buz haldeyken cryo tüp içeriğinin tamamı daha önceden hazırlanan ve içerisinde 9 ml büyütme medyumunu bulunan 15 ml'lik falkon tüpe döküldü. Falkon tüp 1200 RPM devirde 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan cryo tüp yine alkolle dezenfeksiyondan sonra silinip laminar akım kabinine alındı. Üstte kalan süpernatant hassas bir şekilde dezenfekte bir atık toplama kabına dökülerek uzaklaştırıldı. Dipte kalan pelette hücreler olduğundan üzerine 4-5 ml medyum eklenip 10-15 kez nazik bir şekilde pipetaj işlemi uygulanarak peletin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Pipetaj işlemi bittikten sonra tüp içerisindeki karışımdan (hücre-medyum süspansiyonu) içerisine daha önceden 10'ar ml medyum koyduğumuz flasklara 1'er ml koyuldu. Flask içindeki homojen dağılım için flask birkaç kez çalkalanıp inkübatöre alındı. Böylece hücrelerin çözündürme ve ekim işlemlerini tamamlanmış oldu. İnkübatörde 24-48 saat süreyle inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edilen hücreler çalışmaya başlamak için yeterli sayıya ulaşana dek pasajlanarak çalışmaya hazır hale getirildi.

Pasajlama

Laminar kabinde büyütme medyumundan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla flasklara 10'ar ml koyuldu. Flaskların kapakları kapatılarak hazır bir şekilde bekletildi. SH-SY5Y hücreleri bulundukları kültür kaplarının zeminine tutunma/yapışma özelliği gösterdiğinden deneysel çalışmaların yapılabilmesi için flask zemininden kaldırılmaları gerekmektedir. Steril çalışma zinciri bozulmadan flasklar inkübatörden alınarak önce invert mikroskopla hücrelerin üreme yoğunluğu (konfluens) ve kontaminasyon durumu kontrol edilerek laminar akım kabinine alındı. İnkübatörde 24-48 saat süreyle bekletilen SH-SY5Y hücrelerinin flask taban alanını kaplama durumları invert mikroskop yardımıyla tespit edilerek en az %80 çoğalma konfluensine sahip olan flasklar çalışmaya dâhil edildi. Hücrelerin üzerinde bulunan

medyum atık toplama kabına boşaltıldı. Her flaskın üzerine yaklaşık 1 kat seyreltik (1x) 10 ml hacimde Phosphate Buffered Saline (PBS, L1835, Merck Millipore, ABD) koyularak yavaş hareketlerle flask öne-arkaya ve sağa-sola hareket ettirilip hücrelerin yıkanması sağlandı. Flask içerisindeki PBS pipet yardımıyla hücrelerin bulunduğu flasktan uzaklaştırıldı. Ancak SH-SY5Y hücreleri flask tabanına tutunduğu için flask içerisinde kaldı. Böylece ölü hücre artıkları ve ekstraselüler ortamda bulunan toksik metabolitler ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine %0,25'lik Tripsin-EDTA (T4049, Sigma Aldrich, ABD) solüsyonundan flask zeminini kaplayacak miktarda (yaklaşık olarak 3-5 ml) koyuldu. Flasklar inkübatöre alınmadan laminar kabin içinde nazikçe çalkalanarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmalari sağlandı. Invert mikroskop ile tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları teyit edildi. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları tespit edilince flasklar tekrar laminar akım kabinine alındı ve üzerlerine 10 ml medyum eklendi. Hassas bir şekilde 10-15 kez pipetaj işlemi uygulandı. Pipetaj işlemi bitince hücreler boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alındı. Tüpler 5 dk boyunca 1200 RPM devirde santrifüj edildi. Sonrasında laminar akım kabinine alınan tüplerden üstte kalan süpernatant dezenfekte atık toplama şişesine döküldü. Böylece hücreler proteaz aktivitesi olan Tripsin-EDTA solüsyonundan arındırılmış oldu. Falkon tüpün dip kısmına pelet şeklinde çöken SH-SY5Y hücre topluluğu üzerine yaklaşık 5 ml medyum eklendi ve tek kullanımlık steril bir pipetle hassas bir şekilde pipetaj işlemi yapıldı. Daha önceden hazırladığımız ve içerisinde 10 ml medyum bulunan flaskların içerisine falkon tüpünde bulunan SH-SY5Y hücre topluluğu-medyum süspansiyonundan 1'er ml aktarıldı. Flaskın kapağı kapatıldıktan sonra bulunduğu zemin üzerinde öne-arkaya ve sağa-sola doğru çok yavaş hareket ettirilerek hücrelerin flask içerisindeki medyumda homojen bir biçimde yayılması sağlandı.

Pasajlama işlemi tamamlanan hücreler invert mikroskopta son kez kontrol edilerek tekrar inkübatöre alınarak ve 24-48 saat boyunca inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edildi. Süre sonunda hücrelerin %80'den fazla konfluense ulaşması durumunda 'Hücrelerin Pasajlanması' başlığı altında belirtilen aşamalar takip edilerek yeniden pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi her 48-72 saate bir tekrarlandı (102).

3.2.2. Deney Prosedürü ve Grupların Oluşturulması

Bu tez çalışması 4 farklı ana gruptan ve iki aşamadan oluşmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında 4 ana gruba dair analizler yapılmışken ikinci aşamada siRNA uygulamalarıyla 4 farklı siRNA transfeksiyonu 4 ana gruba da yapılmıştır. Hücrelere uygulanan işlemler ve yapılan analizler hakkında detaylı bilgiler aşağıda grup başlıkları altında belirtilmiştir.

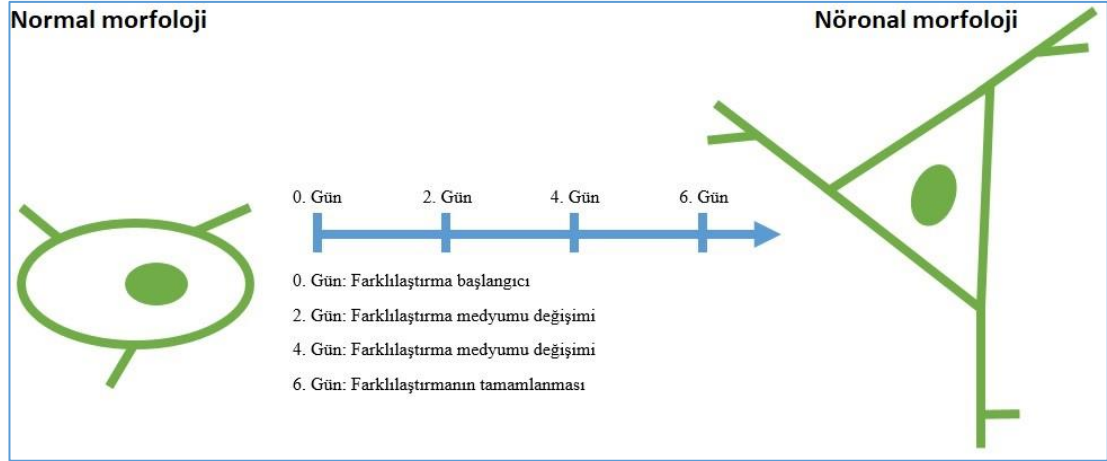
Kontrol grubu: Herhangi bir kimyasal uygulama yapılmayan gruptur.

RA grubu: Hücreleri 10 μ M retinoik asit (R2625, Sigma Aldrich, ABD) ve %1 FBS içeren medyumla 6 gün süreyle inkübe edilen gruptur. Retinoik asitli medyum her iki günde bir değiştirilmiştir (103).

MPP grubu: Hücreleri 500 μ M 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺, MPP idodie, D048, Sigma Aldrich, ABD) içeren medyum ile 24 saat süreyle inkübe edilen gruptur (57,58).

RA+MPP grubu: Hücreleri farklılaştırma yapıldıktan sonra 500 μ M MPP⁺ içeren medyum ile 24 saat süreyle inkübe edilen gruptur.

Anılan gruplarda belirtilen inkübasyonlar sonrasında Western Blot ve kalsiyum sinyali analizleri uygulandı. Böylelikle kanal ekspresyonları ile kalsiyum mobilizasyonundaki değişimlerin izlenmesi amaçlandı. Buna göre normal, farklılaşma ve patolojik koşullarda (MPP⁺ etkisiyle) TRP kanal ekspresyonlarının değişimi ve muhtemel sonuçları yorumlanabilecekti. Özellikle MPP⁺ uygulanan gruplarda patolojinin başlamasıyla kanal ekspresyonlarının değişimi hücreyi apoptoza götüren veya ondan koruyan süreçlerin aktifleşmesi için önemli olduğu değerlendirildi.



Şekil 3.1. Farklılaştırma işleminin özet gösterimi.

İnsan Protein Atlası (<https://www.proteinatlas.org>), çeşitli organ, doku ve hücre hatlarına ait protein, mRNA veya gen ekspresyon düzeylerinin açık erişime sunulduğu bir veri bankasıdır. Banka verilerine göre SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde TRP kanal ailesinden yalnızca TRPC1, TRPC3, TRPM4, TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanalları doğal olarak ifadelendiği bilinmektedir (erişim tarihi: 10.01.2019).

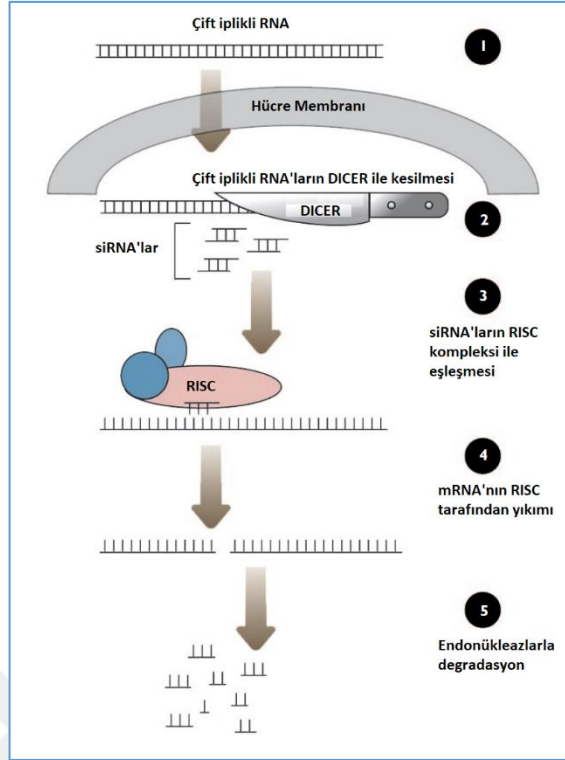
Atlas verileri daha çok polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmalarına dayanmaktadır ve hücrelerde bazı proteinlerin ekspresyonları immünofloresan boyamalarla da gösterilmektedir. Çalışmamızda ise SH-SY5Y TRP katyon kanal proteinlerinin fonksiyonel olup olmadığı da kalsiyum sinyali analiziyle belirlenmesi düşünüldü. Böylelikle hedef kanalların (TRPM7, TRPM8 ve TRPV1) ekspresyon düzeyleri normal ve farklılaşmış hücrelerde nasıl değiştiği ayrıca hem normal hem de farklılaşmış hücrelerin MPP^+ ile muamelesinden sonra Parkinson hastalığı patolojisinin gelişmesiyle kanal ekspresyonlarındaki değişimlerin aydınlatılması amaçlandı. Kanal ekspresyonlarındaki farklılıklar ve MPP^+ ile başlatılan Parkinson modelinin ilişkilendirilebilmesi amacıyla Parkinson indikatörlerinden alfa-sinüklein agregasyonlarının ve dopamin sentezini de ne derece etkilendiğini göstermek amacıyla ilgili gruplara ELISA çalışmaları da yapıldı.

3.2.3. siRNA Transfeksiyon Çalışmaları

Genetik kod dışarıdan müdahalelerle değiştirilebilir. Bu çeşitli altyapı ve teknikler kullanarak yapılabilen transfeksiyon ya da transformasyon çalışmalarıyla

mümkündür. Değişikliğe uğratılan nükleik asit dizisi hücrel transkripsiyon süreçleriyle ribozomlarda rekombinat protein moleküllerine dönüştürülür. Bu işlemin tersine, bir genetik materyal olan RNA'nın transfeksiyonu ile genetik kodu değiştirmeden doğal mRNA'ların ribozomlarda proteine dönüştürülmesini engelleyen yöntem small interfering RNA (siRNA) transfeksiyonu veya RNA interference (RNAi) yöntemidir. siRNA transfeksiyon işleminin amacı hedef genetik kodun (DNA) transkripsiyon sonrasında (mRNA) henüz ribozomal transkripsiyona uğramadan ve protein ürününe dönmeden post-transkripsiyonel olarak susturulmasıdır. Böylece hücrelerde doğal olarak ifadelenen genin, ilgili siRNA transfeksiyonu sonrasında protein ürününe dönüşmesi (ekspresyon) engellenmektedir. Hücrede doğal olarak ifadelenen proteinin ekspresyonu baskılanarak o proteinin işlevi hakkında fikir sahibi olunabilir. Bu nedenle siRNA çalışmaları sıklıkla bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. RNAi, normal şartlarda hücrel genomu viral genomik tehditlerden veya transpozon adı verilen hareketli genetik dizilerden koruyucu doğal bir mekanizmadır. Biyoteknolojik gelişmeler ve nükleik asitlerin tamamlayıcı dizileriyle eşleşme kabiliyeti hücredeki bu doğal mekanizmanın kullanılmasıyla transkripsiyon sonrası gen susturma yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Susturulması hedeflenen mRNA molekülünün komplementer dizilerini içeren çift iplikli RNA molekülleri hücreye alındığında Dicer isimli RNA'ya özel endonükleaz aktivite gösteren bir enzim tarafından 21-23 nükleotid uzunluğunda RNA parçalarına bölünürler. siRNA parçaları RNA-induced silencing complex (RISC) adı verilen bir protein kompleksiyle etkileşir ve bu mRNA komplementeri içeren siRNA dizisinin mRNA ile bağ kurmasında rol oynar. mRNA'nın hedef dizisiyle eşleşen siRNA'lar ile artık yeniden çift iplikli bir RNA molekülü ortaya çıkmış olur ve bu da endonükleazlar tarafından kesilerek parçalanır. Sonuç olarak mRNA transkripsiyona uğramadan hedef noktalarından kesilerek parçalanmakta ve hedef proteinin sentezi baskılanmaktadır (104).



Şekil 3.2. siRNA uygulamasının moleküler prensibi (105).

SH-SY5Y hücrelerinin transfeksiyonu LipoFectMax™ Transfection Reagent (FP 310, ABP Biosciences, ABD) kullanım kılavuzunda önerildiği şekilde yapılmıştır. Ön transfeksiyon çalışmalarıyla transfeksiyon aşamalarının ve transfeksiyonda kullanılan kimyasalların konsantrasyonları optimize edilerek çalışmadaki tüm transfeksiyon işlemleri aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işlemi için TRPM7 (sc-42662, Santa Cruz, ABD), TRPM8 (sc-95009, Santa Cruz, ABD) ve TRPV1 siRNA'ları (sc-36826, Santa Cruz, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan siRNA'lar birbirinden farklı 3 RNA çiftli dizisinin toplanmış havuzudur. Böylelikle aynı genin susturma olasılığını artırmak ve gen ekspresyonunu modüle etmek için tek bir noktadan değil üç farklı noktadan hedefleme yapılmaktadır. Ayrıca siRNA transfeksiyon işleminin de hücre üzerindeki olası etkisini belirlemek amacıyla kontrol siRNA'ları (sc-36869, Santa Cruz, ABD) kullanılarak transfeksiyon işlem aşamalarının da olası etkisi sınanmıştır (106,107). Çalışmamızda yer alan dört ana grubun (Kontrol, MPP, RA ve RA+MPP) transfeksiyonu dört siRNA ile aşağıdaki prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Transfeksiyon uygulamaları ana gruplarda deneylere başlamadan önce yapılarak hücrelerin normal, farklılaştırılmış, MPP⁺ uygulamasıyla Parkinson hastalığı başlatılmış veya farklılaştırıldıktan sonra Parkinson

hastalığı yapılmış durumlarında kanal ekspresyonlarının azaltılmasının patolojik süreçler üzerindeki etkisi deneysel olarak modellenmiştir.

Transfeksiyon işlemi kısaca aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapılmıştır.

1- Transfeksiyondan bir gün önce hücreler taze büyüme medyumunu ile pasajlandı. %30-50 konfluens olan flasklar ertesi gün transfeksiyona alındı.

2- Her transfeksiyon için LipoFectMax™ oligomer kompleksleri aşağıdaki şekilde hazırlandı,

a. İstenen son konsantrasyona göre stoktan alınan siRNA transfekte edilecek hücrelerin bulunduğu kaptaki yüzey alanına göre belirlenmiş miktardaki Opti-MEM medyumunu ile seyreltildi ve nazıkçe karıştırıldı.

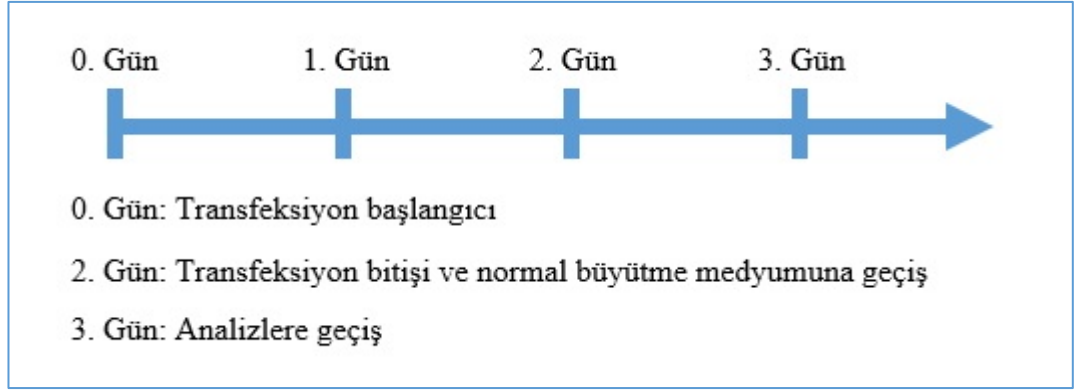
b. LipoFectMax™ stoğu kullanılmadan önce vortekslendi ve transfekte edilecek hücrelerin bulunduğu kaptaki yüzey alanına göre belirlenmiş miktardaki Opti-MEM medyumunu ile seyreltildi ve nazıkçe karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dk süreyle bekletildi.

c. Bekleme süresi sonunda a ve b de hazırlanan solüsyonlar karıştırılarak oligomer-LipoFectMax™ karışımı elde edildi. Karışım 20 dk süreyle oda sıcaklığında bekletildi.

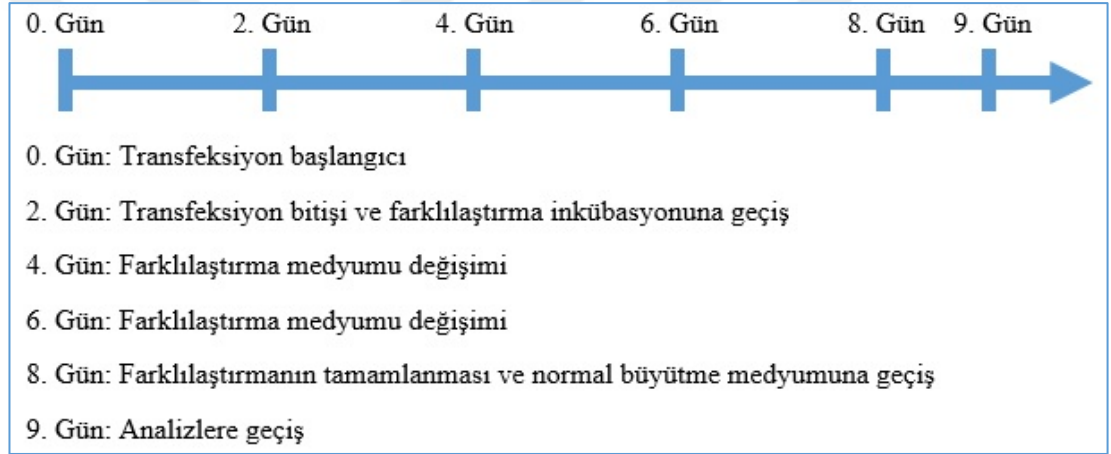
3- Oligomer-LipoFectMax™ karışımı hücreleri ve büyüme medyumunu içeren kültür kaplarına aktarıldı. Kaplar ileri geri sallanarak karışımın hücrelere teması kolaylaştırıldı. Hücreler 4-6 saat süreyle karışımla inkübe edildikten sonra taze büyüme medyumuna alındı ve toplam inkübasyon süresi 48 saate tamamlandı.

Deneysel aşamaların planlaması önceki literatüre uygun şekilde yapılmıştır (108,109). Bunun için transfeksiyon yapılacak gruplar transfeksiyondan sonra MPP⁺ uygulaması ile Parkinson modeli uygulanmıştır. Deneysel prosedürün işleyişi aşağıdaki şekillerde özetlenmiştir.

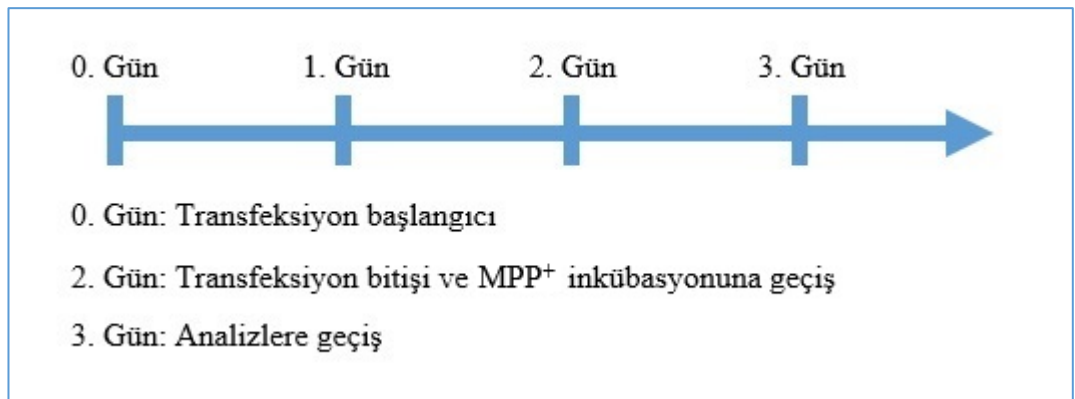
Kontrol grubu: transfekte edilen flasklar transfeksiyonun tamamlanmasının ardından normal büyüme medyumuna alındı ve 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra analizlere geçildi.



RA grubu: transfeksiyon tamamlandıktan sonra 6 gün boyunca %1 FBS ve 10 μ M retinoik asit içeren medyum ile farklılaştırıldı ve süre sonunda normal büyüme medyumuna alındı ve 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra analizlere geçildi.



MPP grubu: transfekte edilen flasklar transfeksiyonun tamamlanmasının ardından 24 saat boyunca 500 μ M MPP⁺ ile inkübe edildikten sonra analizlere alındı.



RA+MPP grubu: transfeksiyon tamamlandıktan sonra 6 gün boyunca %1 FBS ve 10 μ M retinoik asit içeren medyum ile farklılaştırıldı ve süre sonunda 24 saat boyunca 500 μ M MPP⁺ ile inkübe edildikten sonra analizlere alındı.



Transfeksiyon aşamalarından sonra çalışma grupları Tablo 3.1’de belirtildiği üzere toplamda 16 grup halinde şekillenmiştir. Böylece ana grupların hepsi de dört siRNA ile transfektedir çalışılmıştır.

Tablo 3.1. siRNA transfeksiyonları sonrasında çalışmanın dört ana grubundan detaylanan alt gruplar.

Kontrol Grubu	RA Grubu	MPP Grubu	RA+MPP Grubu
Kontrol siRNA	Kontrol siRNA	Kontrol siRNA	Kontrol siRNA
TRPM7 siRNA	TRPM7 siRNA	TRPM7 siRNA	TRPM7 siRNA
TRPM8 siRNA	TRPM8 siRNA	TRPM8 siRNA	TRPM8 siRNA
TRPV1 siRNA	TRPV1 siRNA	TRPV1 siRNA	TRPV1 siRNA

Firmadan sağlanan TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA’larına ait 5’-3’ yönündeki çiftli RNA dizileri Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.2. TRPM7 siRNA havuzuna ait üç farklı çiftli RNA'nın dizileri.

siRNA Dizisi	Sense	Antisense
A	GAGAUGUGGUUGCUCCUUAtt	UAAGGAGCAACCACAUCUCtt
B	CCAUAUUGGGUCAGAUAAtt	UUCAUCUGACCCAAUAUGGtt
C	GCAUUAGUUGCCUGUAAGAtt	UCUUACAGGCAACUAAUGCtt

Tablo 3.3. TRPM8 siRNA havuzuna ait üç farklı çiftli RNA'nın dizileri.

siRNA Dizisi	Sense	Antisense
A	GGAAUCAGCUAGAGAAGUAtt	UACUUCUCUAGCUGAUUCtt
B	CGAAUGUUCUCACCUAUUAtt	UAAUAGGUGAGAACAUUCGtt
C	GUGAGACAGUGGUACGUAAtt	UUACGUACCACUGUCUCAtt

Tablo 3.4. TRPV1 siRNA havuzuna ait üç farklı çiftli RNA'nın dizileri.

siRNA Dizisi	Sense	Antisense
A	GAAGACCUGUCUGUGAAAtt	UUUCAGCAGACAGGUCUUCtt
B	CGAGCAUGUACAAUGAGAUtt	AUCUCAUUGUACAUGCUCGtt
C	CGCAUCUUCUACUUAACUtt	AGUUGAAGUAGAAGAUGCgtt

3.2.4. Hücre Canlılığı Tayini

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Yöntemin temel prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır. İnkübasyon süresi tamamlanan hücreler flasklardan kaldırıldı. Santrifüj edildi. Pelet PBS ile dilüe edildi. 1 ml 1x PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si ise MTT testi için ayrılıp hücre süspansiyonu her bir

ependorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerine 950 µl 1x PBS koyulup pipetaj yaptıktan sonra her bir ependorf tüpüne 15 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edildi. MTT boyası ilavesinden sonra bütün ependorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 90 dk boyunca yavaş çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında tüm ependorflar 500 g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp her bir ependorfa 400'er µl dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi, sonra her bir kuyucuğa 250 µl bu örnekten konuldu. Plate Reader cihazında 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs490 nm – Abs650 nm). Gerekli hesaplama yapılarak hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla yüzde (%) olarak ifade edildi (110).

3.2.5. Apoptoz Testi

1 ml 1x PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si ise apoptoz testi için ayrılıp hücre süspansiyonu her bir ependorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerine 950 µl 1x PBS koyulup pipetaj yaptıktan sonra 3-5µl apoptoz boyasından (APOPercentage, Biocolor, Kuzey İrlanda) ilave edildi. Ependorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosuna bırakılıp sonrasında 3500 RPM deevirde 5 dk santrifüj edilip ve süpernatant atıldı. Pelet üzerine 1x PBS eklenip yıkanarak ve 200 µl APOpercentage Dye Release'den ilave edildikten sonra santrifüj yapıldı. Süpernatant alındıktan sonra kuyucuklara aktarılıp 550 nm dalga boyunda Plate Reader cihazında okundu. Elde edilen değerler kontrole kıyasla hesaplandı (111).

3.2.6. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 deney tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponu ham solüsyonlarından ayrı ayrı 15 ml'lik falkon tüplerine koyuldu. Her 2 tüpe de 2,5 µl NP-40 kimyasalından ilave edilip vortekslendi ve floresan kaspaz DTT boyasından 12,5 µl koyulup tekrar vortekste karıştırıldı. 1 ml 1x PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si kaspaz 3, 150 µl'si kaspaz 9 analizi için ayrıldı. Her iki analiz için de 150 µl hücre süspansiyonu her bir ependorfta 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde koyulup üzerlerine öncesinde hazırlanan kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50'şer µl eklendi. Ortaya çıkan enzimatik aktivite Plate

Reader cihazında 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında okunarak ölçülüp elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (112).

3.2.7. Hücresel Reaktif Oksijen Türleri Üretimi Tayini

İnkübasyon sonrasında kaldırılan her flasktaki hücreler 1 ml 1x PBS ile dilüe edilip 150 µl'si ROT üretim tayini analizi için ayrılıp hücre süspansiyonu her bir ependorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl 1x PBS eklenip 15-20 kez pipetaj yapıldı. Üzerine 1 µl Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Aldrich, ABD) ROT boyasından koyulup tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı ve ependorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 3500 RPM devirde 5 dk boyunca santrifüj edilip süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1x PBS eklenip pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölünüp Plate Reader cihazında (Infinite 200 Pro, Avusturya) 488 nm eksitasyon (uyarım) ve 530 ve 590 nm emisyon dalga boylarında okunup aradaki fark değer olarak belirlendi. Veriler kontrol grubuna kıyasla nispi artış şeklinde grafiklendirildi (113).

3.2.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Tayini

İnkübasyon sonrasında kaldırılan her flasktaki hücreler 1 ml 1x PBS ile dilüe edilip 150 µl'si ise mitokondriyal membran depolarizasyonu analizi için ayrılıp hücre süspansiyonu her bir ependorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl 1x PBS eklenip 15-20 kez pipetaj yapıldı. Bunun üzerine 1µl 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) mitokondriyal membran depolarizasyon boyasından koyulup tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı ve ependorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 3500 RPM devirde 5 dk boyunca santrifüj edilip süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1x PBS eklenip pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölünüp Plate Reader cihazında 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 emisyon oranıyla sonuçlar hesaplandı. Veriler kontrol grubuna kıyasla nispi artış şeklinde grafiklendirildi (114).

3.2.9. Western Blotlama

Western Blot analizleri standart protokol izlenerek gerçekleştirildi. Gruplara ait flasklar rutin olarak kaldırılıp santrifüjden sonra süpernatantlar uzaklaştırıldı. Hücreler lizis tamponu içerisinde çözündürülüp 1600 g'de 20 dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatant alındı. Total protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlendi. İmmünoablottlama için %6-13 arasında değişen konsantrasyonlarda Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-Page) hazırlandı ve jellere eşdeğer protein (her örnekten 30 µg) yüklemesi yapıldı. Elektroforez işlemi ardından jeller nitroselüloz membranlara transfer edilip oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye) ve %1 Tween 20 içeren Tris Buffered Saline (TBST) ile bekletilip ve 3 defa 5 dk süreyle TBST tamponu ile yıkandı. Membranlar primer antikolar; TRPM7, TRPM8, TRPV1 ve β-aktin antikoru ile inkübe edildi. Sekonder antikor (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab, İngiltere) ile inkübe edilip işlem sonunda kanal ekspresyonlarıyla birlikte β-aktin'e ait bantlar hassas jel görüntüleme cihazı (Syngene G:Box, İngiltere) kullanılarak görüntülendi (115).

3.2.10. Kalsiyum Sinyali Analizi

Gruplara ait flastaktaki hücreler rutin şekilde kaldırılıp, santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırıldı. 37 °C'de 45 dk çalkalamalı su banyosunda 4 µM Fura-2 pentakis (acetoxymethyl) ester (Fura-2 AM, LifeTechnologies, ABD) floresan boyası ile taze medyum içerisinde boyandı. Boyama işleminden sonra 400 g'de 5 dk boyunca santrifüj edilip süpernatantlar atılarak Ca^{+2} içeren tamponuna [Na^{+} -HEPES [(mM cinsinden); NaCl, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 1,1; Glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] alınan hücreler manyetik olarak karıştırılıp, şeffaf küvetlere (Sarstedt, Almanya) hücre yoğunluğu yaklaşık 2×10^6 /ml olacak şekilde aktarıldı ve floresan spektrofloreometredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) küvet haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm'de (emisyon dalga boyu 505 nm olacak şekilde) floresan ışık ile uyarılarak kayıtlar daha önce belirtilen şekilde alındı (116). Stimülasyon için uygun agonistleri (TRPM7 için kolesterol, TRPM8 için mentol ve TRPV1 için kapsaisin) sırasıyla kullanılıp ve TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 aracılı hücre içi serbest Ca^{+2} düzeyi değişimleri bilgisayar

ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları kaydedildi. Elde edilen bulgular Gryniewicz ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre hesaplandı (117).

3.2.11. Alfa-sinüklein Seviyelerinin Belirlenmesi

Parkinson hastalığı etiyolojisinde alfa-sinüklein (veya Lewy cisimcikleri) bazal gangliyonlardan özellikle substansiya nigra da bulunan dopaminerjik nöronların hasarına sebep olur (13, 14). Deneysel modellerin işlediğinin göstergesi patolojik belirteçlerdir. Parkinson hastalığının hücresel modellerinde de alfa-sinüklein üretimi ve agregasyonu gözlenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda MPP⁺ ile başlatılan Parkinson hastalığı hücresel modelinde alfa-sinüklein ekspresyonunu enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ile Human Alpha Synuclein ELISA Kit (E1313Hu, BT Lab, Çin) prosedürü takip edilerek hedef TRP kanallarının susturulmasıyla grupların alfa-sinüklein üretimindeki olası değişiklikler araştırılmıştır (118).

3.2.12. Dopamin Seviyelerinin Belirlenmesi

Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronlardan az miktarda dopamin sentezlenebilmektedir. Dopamin sentezinin nöronal dejenerasyon süreçleriyle azalmasıyla normal beyin uyarı ileti sisteminde bazal gangliyonlar ile motor korteks arasındaki iletişim ve etkileşim bozulmakta ve bu durumda hastalığın seyri ilerlemektedir. Bu nedenle Parkinson hastalığı tedavisinde önerilen ilaçlardan bir grubu da dopamin agonistleri ve prekürsörleridir. Bu nedenle çalışmamızda MPP⁺ ile başlatılan Parkinson hastalığı hücresel modelinde dopamin salınımindaki olası değişimin incelenmesi gerektiği de düşünüldü. Dopamin tayini Human Dopamine ELISA Kit (EA0041Hu, BT Lab, Çin) prosedürü takip edilerek hedef TRP kanallarının susturulmasıyla grupların dopamin seviyelerindeki olası değişiklikler araştırılmıştır (119).

3.2.13. Mono Amin Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Parkinson hastalığında, nöronlardan az miktarda sentezlenebilen dopamin artan mono amin oksidaz (MAO) aktivitesiyle yıkılarak hastalığın seyri ilerlemektedir. Bu nedenle Parkinson hastalığı tedavisinde önerilen ilaçlardan bir grubu da MAO inhibitörleridir. MAO enzimatik aktivitesinin inhibisyonu ile sinaptik yarığa

dökülecek dopamin konsantrasyonunda artış hedeflenmekte ve hastalığın seyrini azaltmada yararlı sonuçlar alınmaktadır. MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki farklı MAO enzimi sinir sisteminde bulunur. Bu nedenle çalışmamızda MPP⁺ ile başlatılan Parkinson hastalığı hücresel modelinde MAO aktivitesinin değişiminin incelenmesi gerektiği de düşünülmüştür. Kolorimetrik metotla MAO aktivitesi tayini Monoamine Oxidase Assay Kit (MAK136, Sigma Aldrich, ABD) prosedürü takip edilerek yapılmıştır (120). Buna göre hedef TRP kanallarının susturulmasıyla grupların MAO aktivitesindeki olası değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

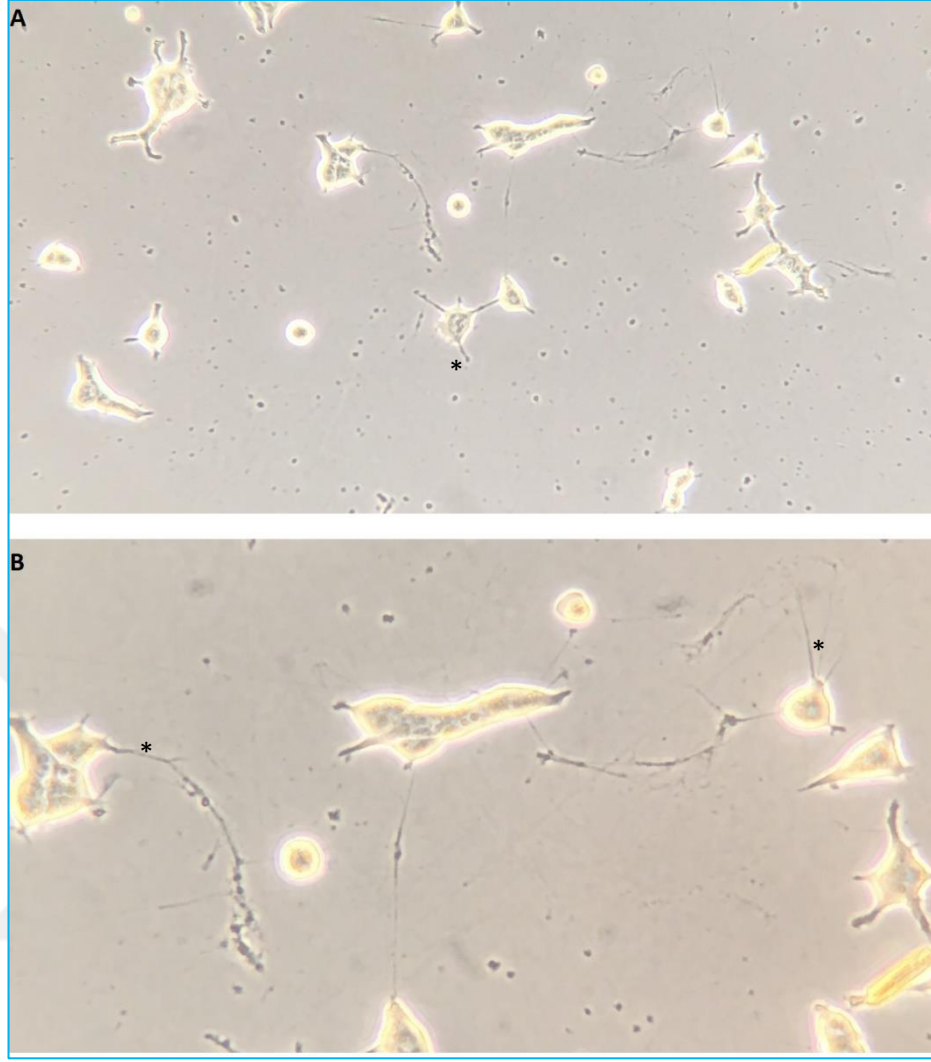
3.2.14. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama $\pm$ standart sapma [mean $\pm$ standard deviation (SD)] olarak verildi. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde çalışılan bilimsel verilerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı tek yönlü ANOVA-Tukey HSD testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

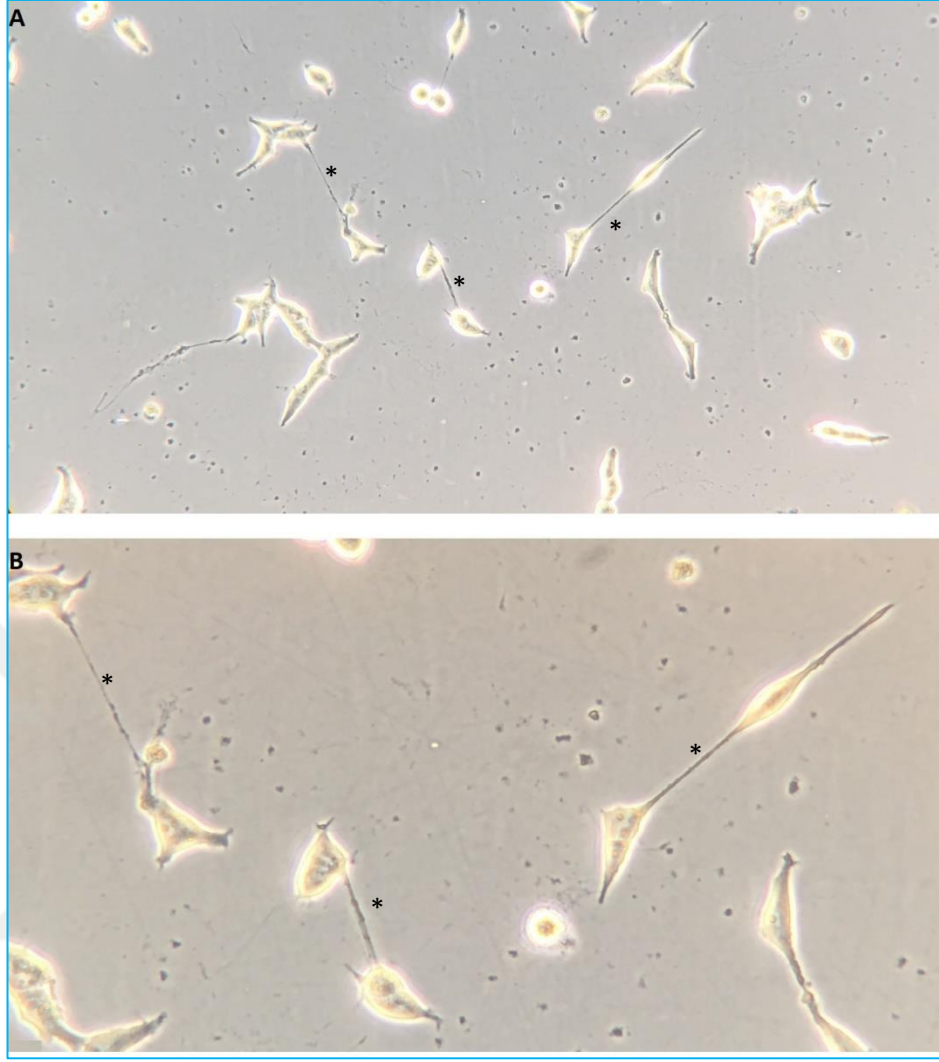
4.1. Farklılaştırma Aşamalarına Ait Bulgular

Pasajlamalar sırasında flasklardan uygun çoğalma yoğunluğa ulaşanlar farklılaştırma çalışmaları için ayrılmıştır. Farklılaştırma gruplarında hücreler flasklara yaklaşık olarak 1×10^4 hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir. Bu flasklardaki SH-SY5Y hücreleri kaldırılıp santrifüjle çöktürüldükten sonra %1 FBS ve 10 µM retinoik asit içeren medyum ile yeni flsaklarda inkübe edilmişlerdir. Tam konfluens bir T75 flask için santrifüjlemeden sonra falkonun dibinde kalan pelet 5 ml medyum ile yeniden süspense edildikten sonra 150 µl'si alınıp 10 ml farklılaştırma medyumunu içeren yeni flaska aktarılmıştır. Böylece farklılaştırma işlemi başlatılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin çoğalma kapasitesi yüksek olduğundan bu oran çalışmanın diğer aşamalarında da korunarak analizlere alınan hücreler bu şekilde üretilmiş ve farklılaştırılmıştır. İnkübasyon 6 gün süreyle sürdürülmüş ve her iki günde bir medyum değişimi yapılmıştır. Aşağıda inkübasyon aşamalarına ait görüntüler verilmiştir.



Resim 4.1. Retinoik asit ve düşük FBS içeren farklılaştırma medyumunu ile 1 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder.

İnkübasyona alınan flasklarda hücrelerin yapıştığı ilk saatlerden sonra sitoplazmik mikrouzantıların oluşumu başlamıştır. İlk 24 saatlik periyot tamamlanıp hücreler mikroskop altında incelendiğinde Resim 4.1.A ve 4.1.B'deki gibi görüntüler alınmaktadır. Görüntülerde hücreler arası bağlantıları sağlayan mikrouzantılar dikkat çekmiştir.

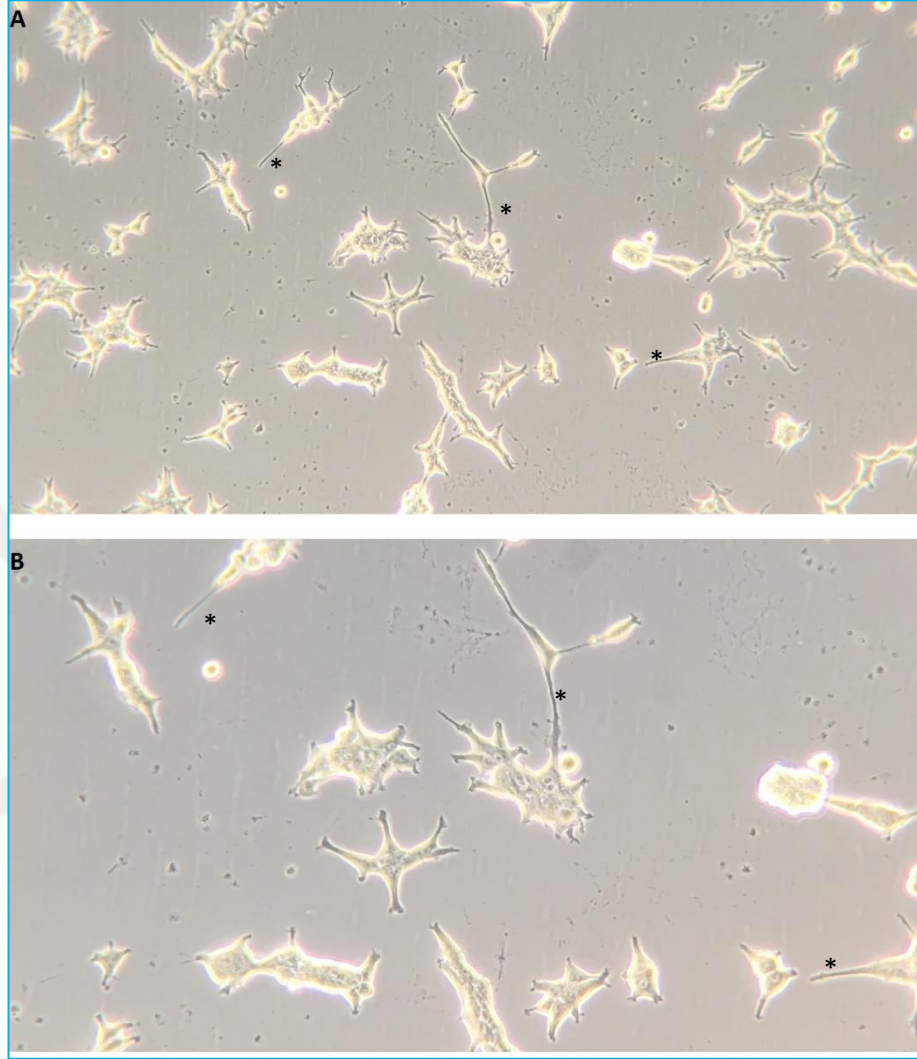


Resim 4.2. Farklılaştırma medyumuna ile 2 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder.

İnkübasyonun ilk günü tamamlandıktan sonra hücrelerin morfolojilerini daha iyi gösterdikleri ve kültür kabına büyük ölçüde adapte oldukları gözlenmiştir. Sitoplazmik uzantıların yeni bölünen hücrelerde ince olarak varlığını koruduğu gözlenirken bölünmesini tamamlamış hücrelerde kalınlaşıp nörit benzeri yapılar oluşmaya başladığı dikkat çekmiştir (Resim 4.2. A ve 4.2.B).

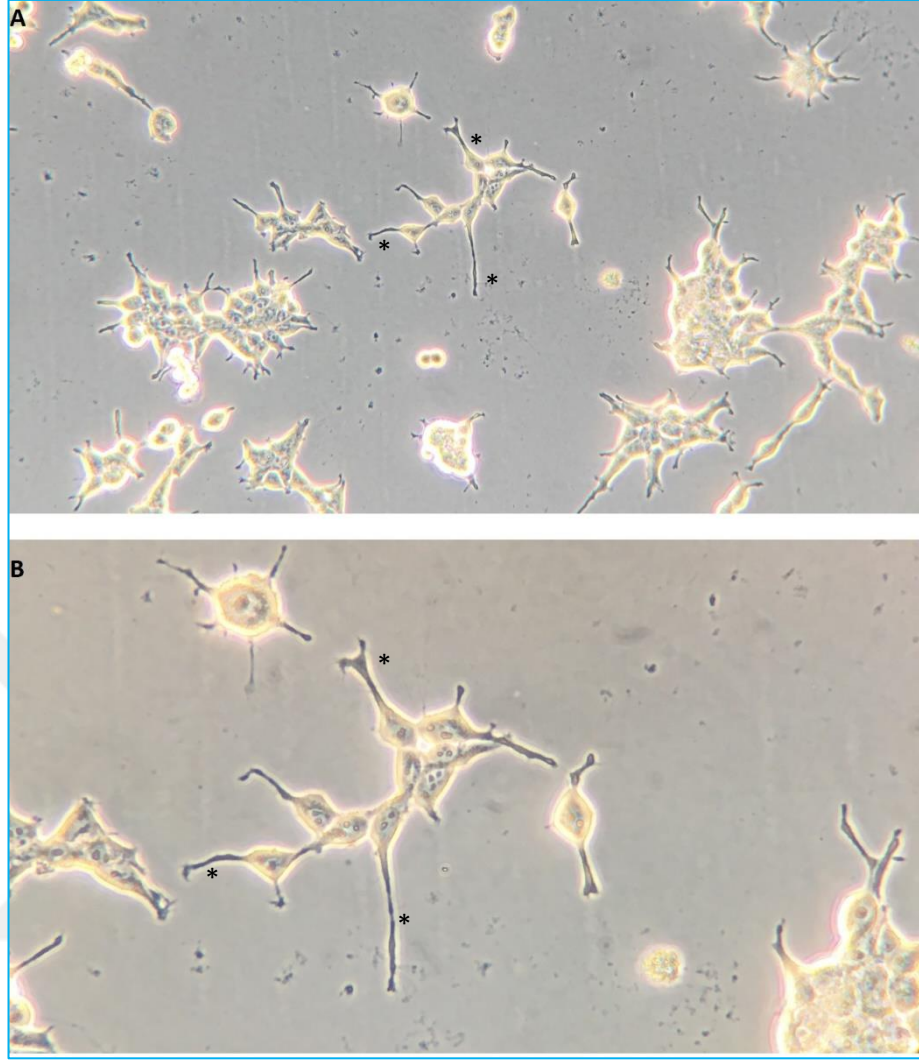
Farklılaştırmanın 2. gününden itibaren artan hücre yoğunluğu 3. günde gözle fark edilebilir düzeye ulaşmıştır. Flask tabanına yapışan hücreler bulundukları yerde bölünme ve nörit uzatma eğilimi göstermektedirler. Bu nedenle birkaç hücreden oluşan bir grubun etrafına yeni filizlenen nörit uzantıları attığı bu evrede

gözlenembilmektedir. Kimi hücrelerden çıkan uzantılar ise hücre gövdesinin çapından 4-5 kat uzun olabilmektedir (Resim 4.3.A ve 4.3.B).



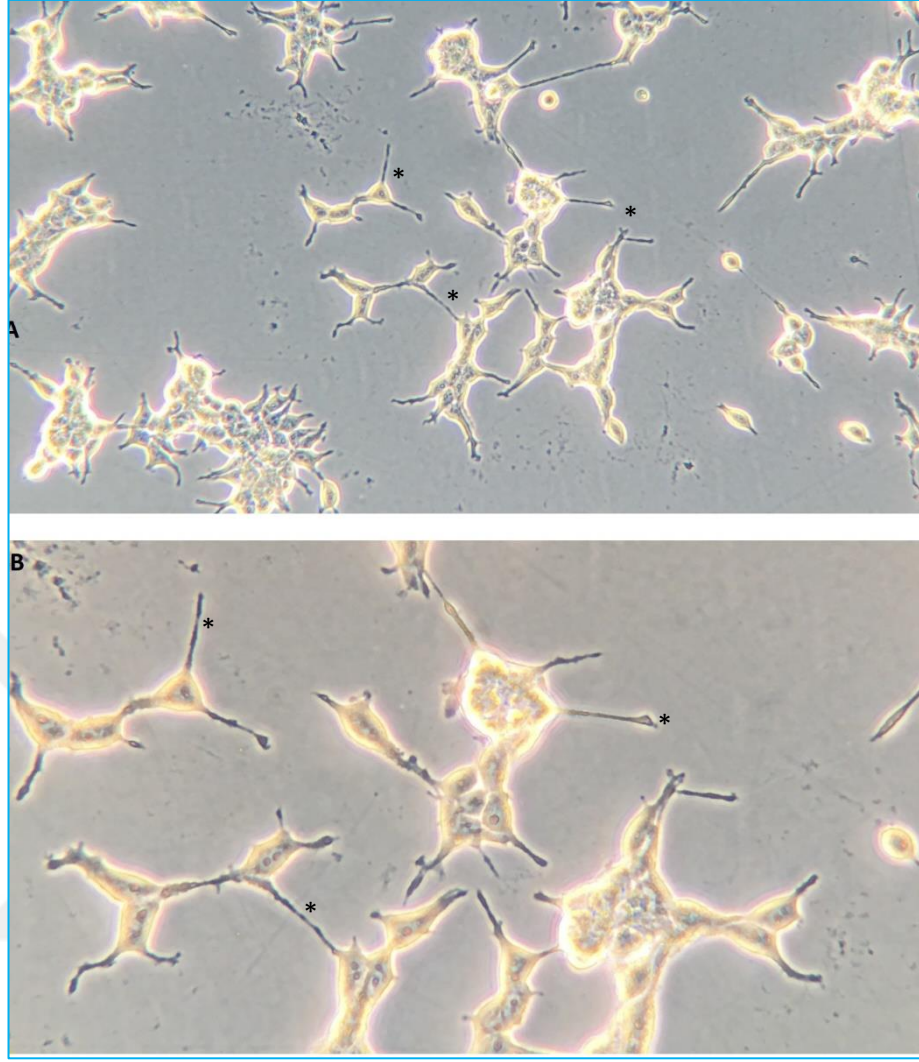
Resim 4.3. Farklılaştırma medyumuna ile 3 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder.

Farklılaştırma işlemi dördüncü güne ulaştığında belirginleşen morfolojik değişiklikler genel olarak hücrelerin münferit bölünme grupları oluşturmaya başlamasıydı. İlk iki günde bir tek hücreden etrafa yayılan nöritlerin yerini gruptaki hücrelerin boşluğa bakan tarafından çıkan nöritler almaya başlamıştı (Resim 4.4.A ve 4.4.B).



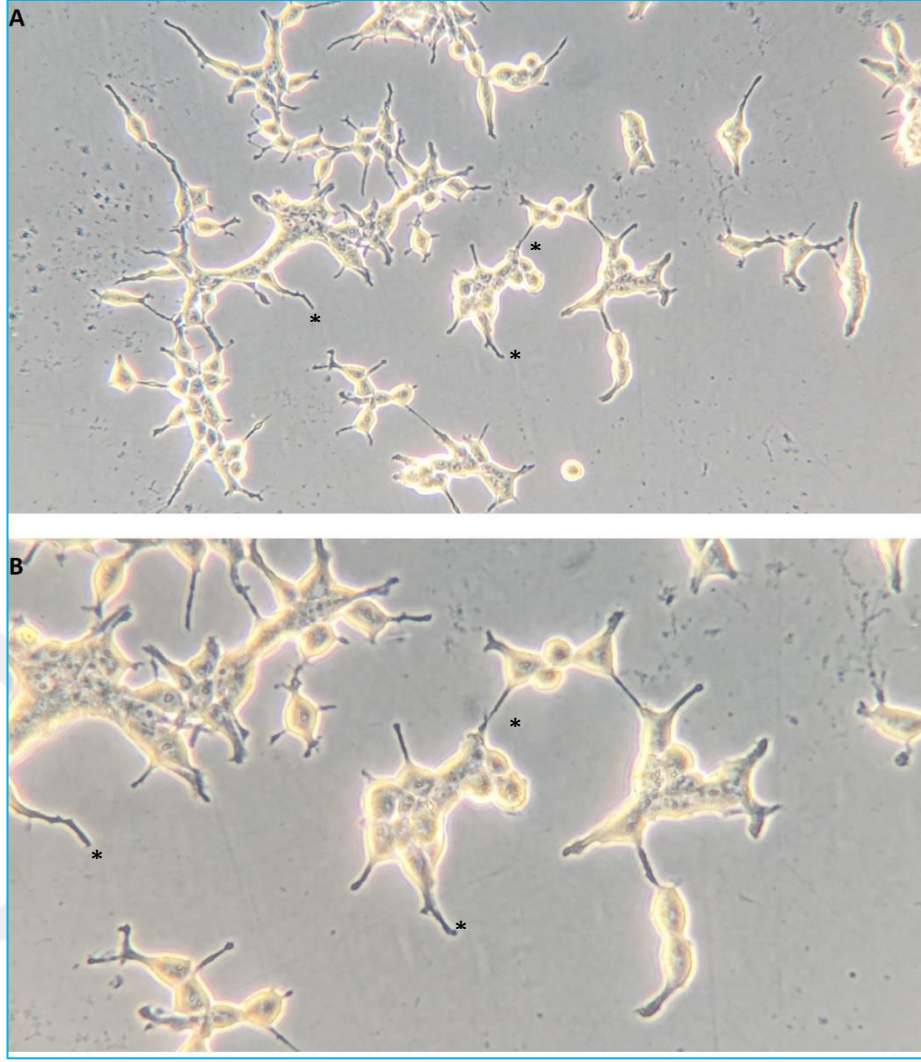
Resim 4.4. Farklılaştırma medyumuna ile 4 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder.

Farklılaştırma işleminin beşinci gününde ise hücrelerin genel görünümünü koruduğu ancak sayıca çoğalmanın devam ettiği gözlenmiştir (Resim 4.5.A ve 4.5.B).



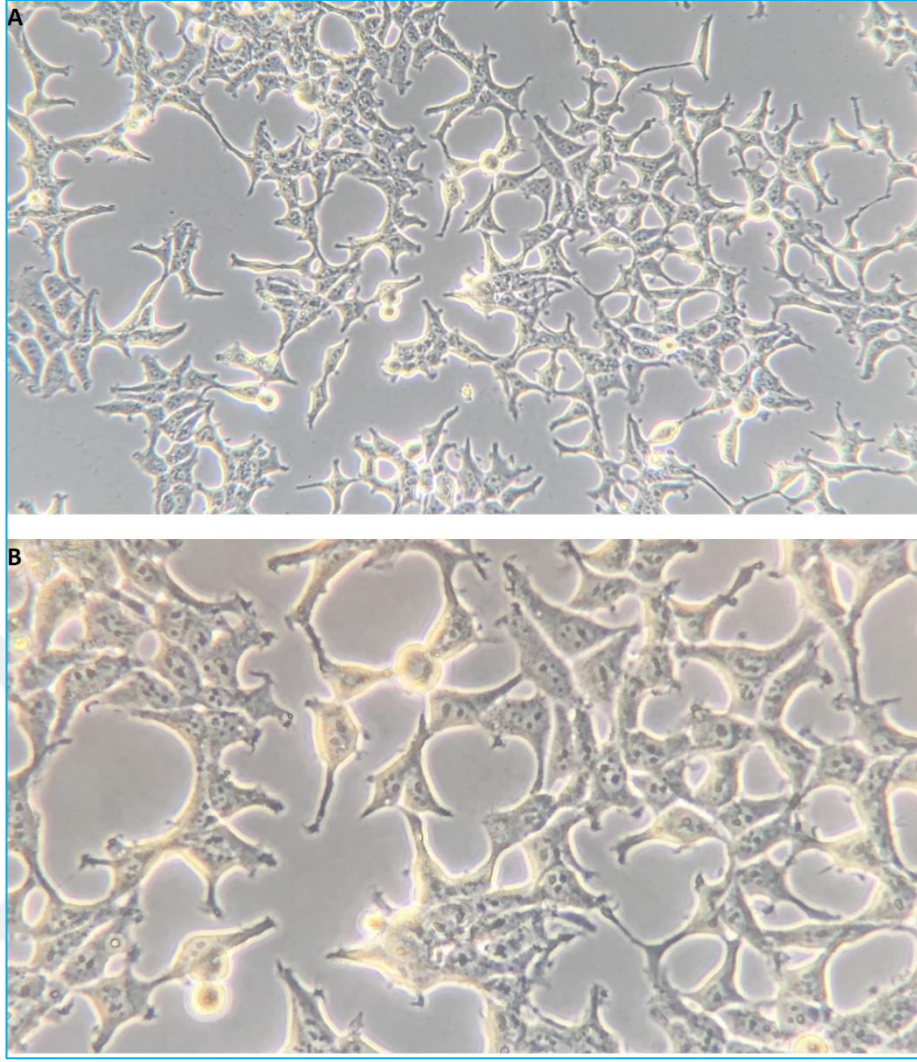
Resim 4.5. Farklılaştırma medyumuna ile 5 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder.

Farklılaştırma işleminin son gününde ise beşinci günden daha çok sayıda hücre olduğu gözlenmiştir (Resim 4.6.A ve 4.6.B). Farklılaştırma işlemine fazla yoğunlukta hücrenin inkübasyona alınarak başlanması sürecin tamamlanamadan flaskların tam konfluens hücre yoğunluğuna ulaşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu halde deneye alınma vakti gelmeden (farklılaşma işlemi tamamlanmadan) deneye alınması söz konusu olmadığından farklılaştırma işlemine yeni bir flaskta tekrar başlanması söz konusu olmaktadır. Bu nedenle başlangıç inkübasyonunda ekimi yapılan hücre yoğunluğu bir seri denemelerden sonra bulunmuştur. Deneyler müddetince bu tecrübeye sadık kalınarak gruplar oluşturulmuş ve çalışmalar yapılmıştır.



Resim 4.6. Farklılaştırma medyumuna ile 6 gün süreyle inkübe edilen SH-SY5Y hücreleri. A) 10 x büyütme ile alandaki hücrelerin genel, B) 20x büyütme ile hücrelerin detaylı görüntüsü. *: sitoplazmik nörit uzantılarına işaret eder.

İnkübasyona başlarken eşit yoğunlukta hücre koyulan aynı büyüklükteki bir başka flasktan alınan mikroskop görüntüsü Resim 4.7.A ve 4.7.B’de verilmiştir. İlk ekimin ardından 48 saat sonra alınan görüntüde (Resim 4.7.A) hücrelerin yapıştıkları ve çoğalmaya başladıkları gözlenmektedir. Morfolojik olarak daha çok yıldız şeklini andıran bu hücreler normal büyütme medyumuna ile inkübe edilmiştir. Ekimden yaklaşık 3 gün sonra çalışmalar için düzeyde uygun konfluense (%70-80) ulaşmaktadır. Bu da SH-SY5Y hücrelerinin bölünme kapasitelerinin hızlı olduğunu göstermektedir.

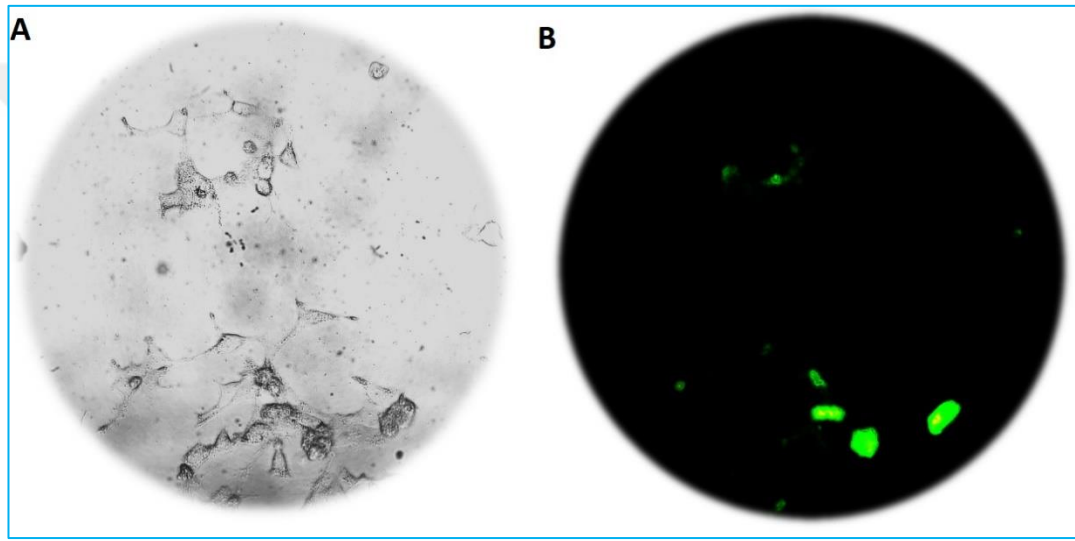


Resim 4.7. Normal büyüme medyumundaki SH-SY5Y hücreleri. A) 20 x büyüme ile alandaki hücrelerin detaylı, B) 10x büyüme ile hücrelerin genel görüntüsü.

4.2. siRNA Transfeksiyon İşleminin Optimizasyonu

siRNA transfeksiyonu ile post-transkripsiyonel gen susturma işlemi, kullanılacak siRNA miktarı ile kültür ortamında siRNA'ların hücreye ulaştırılmasını fiziki olarak sağlayan lipid bazlı kimyasal taşıyıcıların hacmine ve hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle transfeksiyon çalışmalarından önce metodun optimizasyonu gerekmektedir. Optimizasyon çalışması sonunda deney yapılacak hücre tipine, hücrelerin ekildiği kabın yüzey alanına ve kültür medyumunun hacmine oranla kullanılması gereken siRNA miktarı, lipid bazlı taşıyıcı hacmi, transfeksiyon medyumuna hacmi ve transfeksiyon aşamalarındaki detaylar belirlenmiş olur.

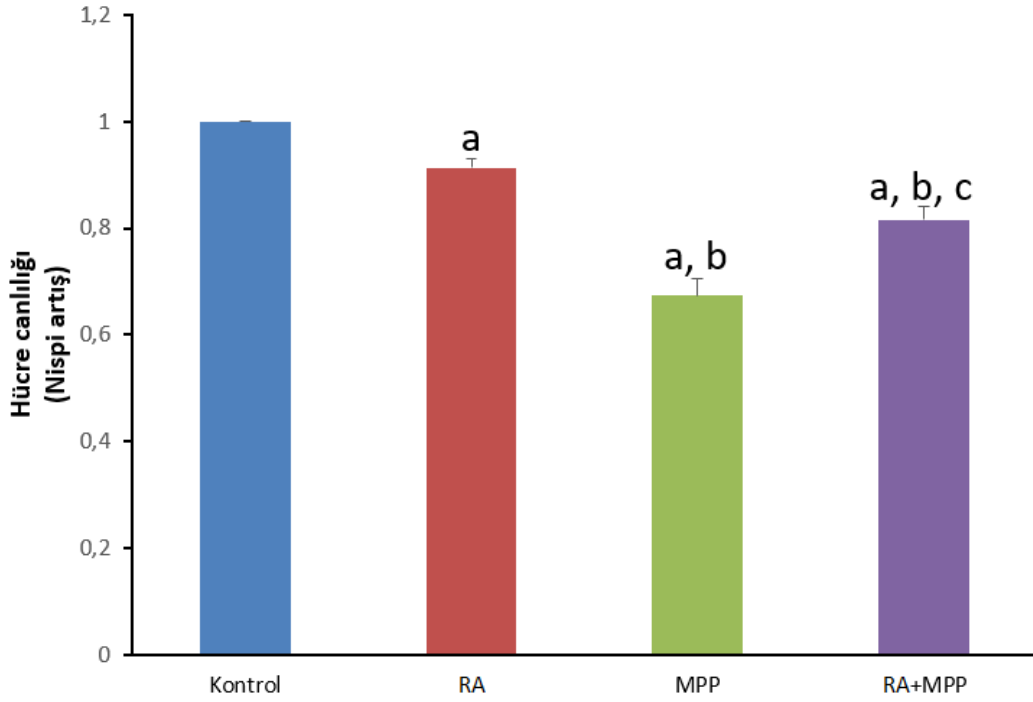
Pilot çalışma için kullanılan kontrol siRNA'ları (sc-36869, Santa Cruz, ABD) floresan izotiyosiyanat (FITC) eklentili olduğundan transfeksiyon için değişen konsantrasyonlarda siRNA ve kılavuzunda önerilen miktarda lipid bazlı taşıyıcı (FP 310, ABP Biosciences, ABD) kullanarak transfeksiyon aşamalarını önerilen şekilde yaptık. Optimal siRNA dozunu floresan eklentili invert mikroskop altında (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Almanya) fotoğraflar aldıktan sonra 30 nM dozun çalışmamız için uygun olduğunu belirledik. TRP kanallarıyla yapılan önceki siRNA çalışmaları da 30 nM dozun kullanıldığını gösterdiğinden çalışmamız boyunca transfeksiyon işlemlerinde aynı dozu kullandık (121,122).



Resim 4.8. Transfekte SH-SY5Y hücreleri. A) 20 x büyütme ile aydınlık alandaki hücrelerin, B) aynı hücre grubunun floresan ışık altında görüntüsü.

4.3. Hücre Canlılığı Tayini Sonuçları

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri yeterli çoğalma yoğunluğuna ulaşmış gruplara ayrıldıktan sonra farklılaştırılmayan ve farklılaştırılan gruplara MPP⁺ inkübasyonu uygulanmıştır. Gruplar grafiklerde Kontrol, RA, MPP ve RA+MPP olarak gösterilmiştir. İnkübasyon sonrasında kaldırılan hücrelere; hücre canlılığı (MTT) testi, apoptoz testi, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri tayini, hücrel reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi tayini, mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini, western blotlama, kalsiyum sinyali analizi ile alfa-sinüklein ve dopamin tayini, mono amin oksidaz (MAO) enzim aktivitesi tayinleri yapılmıştır. Ana gruplara ait hücre canlılığı bulguları Grafik 4.1'de sunulmuştur.

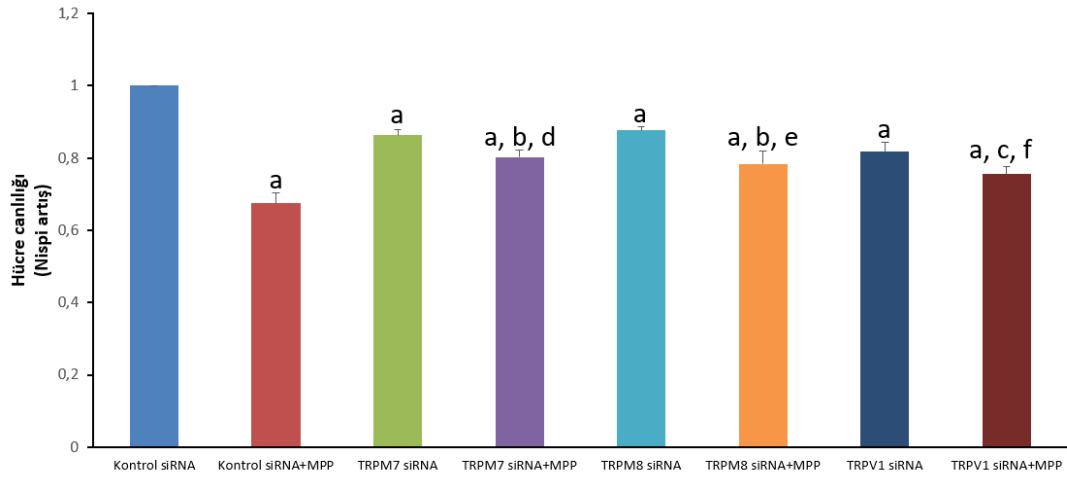


Grafik 4.1. Ana gruplara ait hücre canlılığı (MTT testi) tayini bulguları. a: $P < 0,005$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P < 0,005$ MPP grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Elde edilen hücre canlılığı bulgularına göre farklılaştırma uygulaması (6 gün süreyle 10 μ M retinoik asit ve %1 FBS içeren medyum ile inkübasyon) Kontrol grubuna kıyasla nispeten azaltmaktadır. Ancak MPP⁺ uygulaması yapılan grupta ise hücresel canlılığın daha fazla düştüğünü gözlemledik. RA+MPP grubunda ise Kontrole kıyasla azalma görülürken MPP grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında önce siRNA transfeksiyon işlemleri yapıldı ardından normal ve farklılaştırılan gruplara MPP⁺ inkübasyonu uygulanarak, normal, farklılaştırılmış, MPP⁺ ile Parkinson modeli indüklenmiş ve farklılaştırıldıktan sonra MPP⁺ ile Parkinson modeli indüklenmiş ana çalışma gruplarında siRNA transfeksiyonlarının etkisi ile kanal ekspresyonlarının azaltılmasının Parkinson hastalığı modelindeki muhtemel etkileri incelendi.

Normal gruplara ait hücre canlılığı bulguları Grafik 4.2’de sunulmuştur.



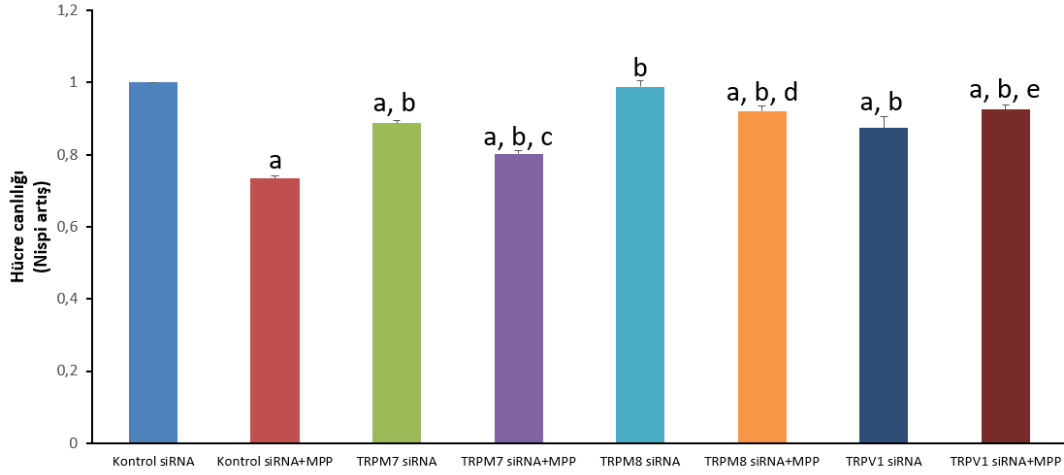
Grafik 4.2. siRNA transfekte normal gruplara ait hücre canlılığı tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P < 0,05$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, e: $P < 0,005$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, f: $P < 0,05$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Normal gruplarda; Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP^+ uygulaması yapılan hücrelerde canlılığın yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde azaldığı görüldü. Ancak TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla canlılık bakımından anlamlı azalmalar olduğu da gözlemlendi. Buna rağmen, kanalların siRNA transfeksiyonu yapılarak üzerine MPP^+ inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla canlılığın Kontrol siRNA seviyelerine yaklaştığı görüldü.

Farklılaştırılmış gruplara ait hücre canlılığı bulguları Grafik 4.3'te sunulmuştur.

Farklılaştırılmış gruplarda; normal gruplardakine benzer şekilde Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP^+ uygulaması yapılan hücrelerde canlılığın yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde azaldığı görüldü. Yine TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de nispeten canlılık bakımından anlamlı azalmalar olduğu gözlemlendi. Kanalların siRNA transfeksiyonu yapılarak üzerine MPP^+ inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol

siRNA+MPP grubuna kıyasla canlılığın Kontrol siRNA seviyelerine yaklaştığı görüldü.

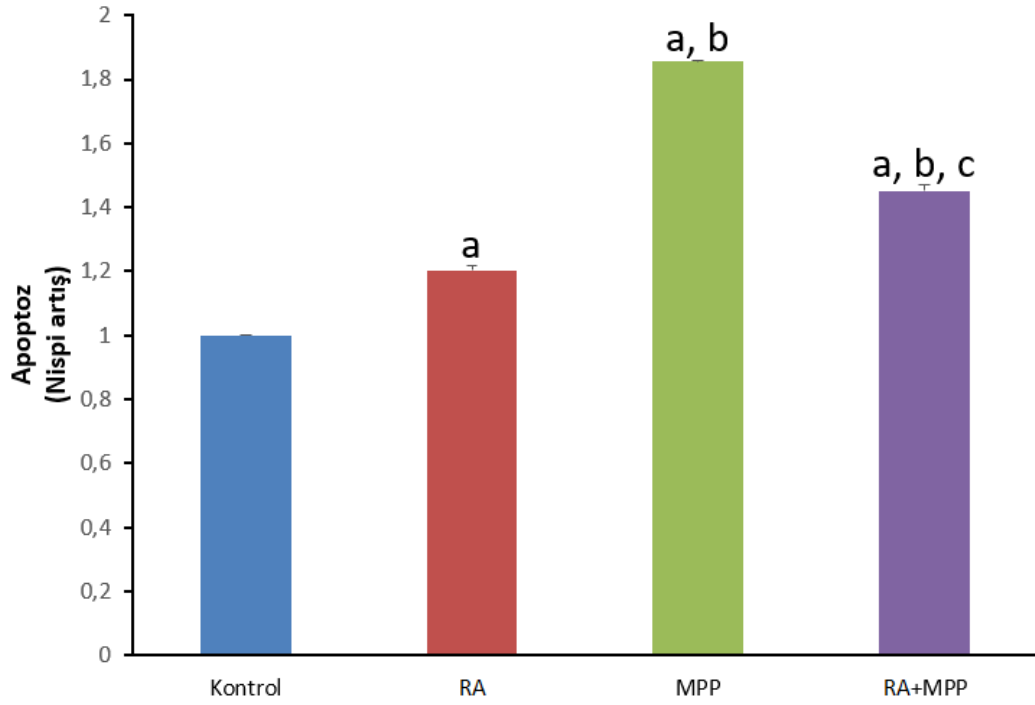


Grafik 4.3. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait hücre canlılığı tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, d: $P < 0,005$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, e: $P < 0,05$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Her üç kanal siRNA uygulamasının hücresel canlılığın azalması bakımından olumsuz etkileri olsa da, bunun üzerine MPP⁺ uygulaması yapıldığında kanal ekspresyonlarının baskılanmasının hücresel canlılığı olumlu etkileyebileceği değerlendirildi.

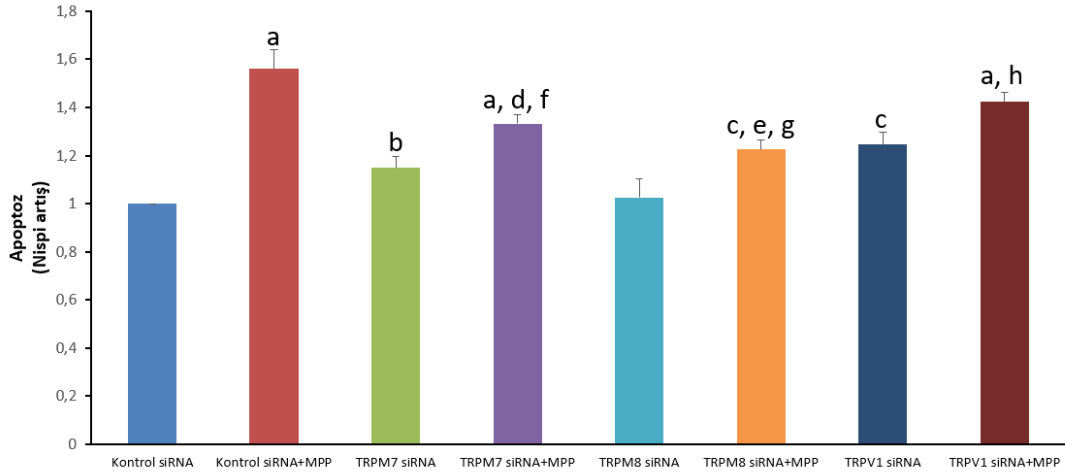
4.4. Apoptoz Bulguları

İnkübasyonları tamamlandıktan sonra kaldırılan flasklardan alınan numunelerle yapılan apoptoz testleri sonucunda Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda apoptozun arttığı belirlenmiştir. Ancak MPP⁺ uygulanan grupta ise apoptoz seviyelerinin en yüksek düzeyde olduğu dikkati çekmiştir. RA+MPP grubunda ise apoptoz seviyeleri sadece MPP⁺ uygulanan gruba göre anlamlı ölçüde azalmıştır. Ana gruplara ait apoptoz bulguları Grafik 4.4’de sunulmuştur.



Grafik 4.4. Ana gruplara ait apoptoz tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ MPP grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

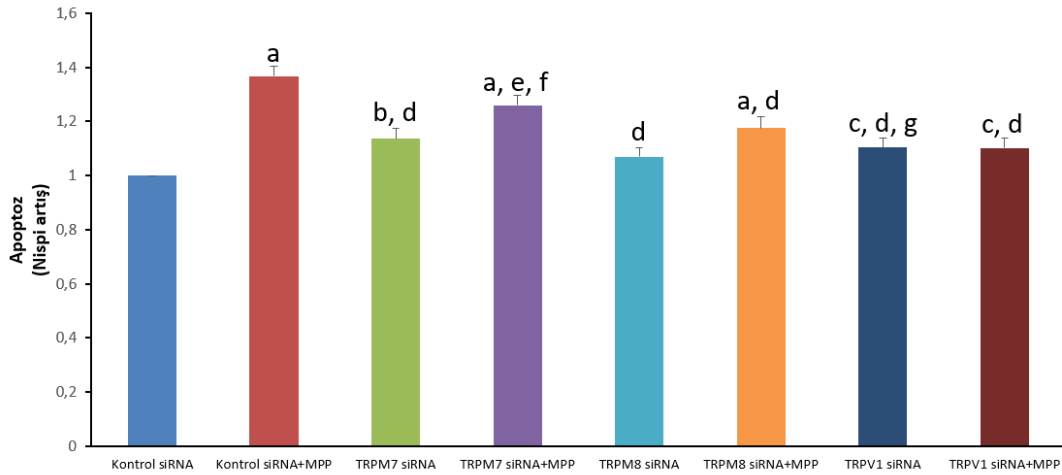
Normal gruplara ait apoptoz bulguları Grafik 4.5'te sunulmuştur.



Grafik 4.5. siRNA transfekte normal gruplara ait apoptoz tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, d: $P < 0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, f: $P < 0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, g: $P < 0,01$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, h: $P < 0,05$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Normal gruplarda; Kontrol siRNA'ları transfeke edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde apoptozun yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde arttığı görüldü. Fakat yalnız TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla anlamlı artışlar olduğu gözlemlendi. Buna rağmen, kanalların siRNA transfeksiyonu yapıp üzerine MPP⁺ inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla apoptoz seviyelerinin Kontrol siRNA+MPP grubundan az olduğu görüldü.

Farklılaştırılmış gruplara ait hücre canlılığı bulguları Grafik 4.6'da sunulmuştur.



Grafik 4.6. siRNA transfeke edilip farklılaştırılmış gruplara ait apoptoz tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, d: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, f: $P < 0,05$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, g: $P < 0,05$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Farklılaştırılmış gruplarda; normal gruplardakine benzer şekilde Kontrol siRNA'ları transfeke edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde apoptozun yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde arttığı görüldü. Yine TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de nispeten apoptoz bakımından yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde artışlar olduğu gözlemlendi. Kanalların siRNA transfeksiyonu yapıp üzerine MPP⁺

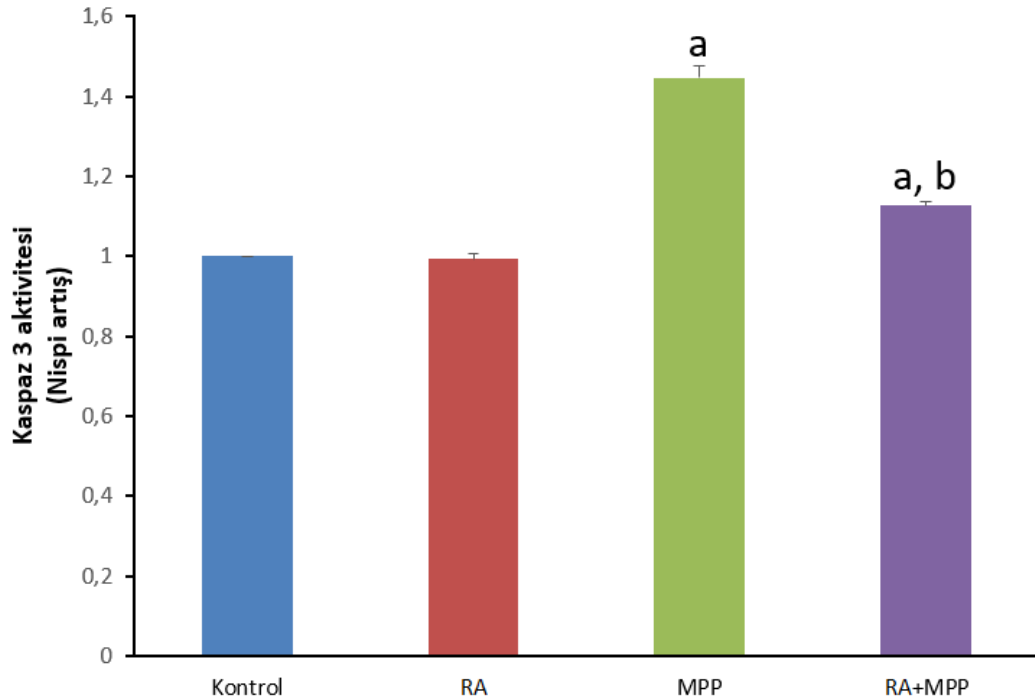
inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla apoptozun Kontrol siRNA seviyelerine yaklaştığı görüldü.

Her üç kanal siRNA uygulamasının apoptozun artması yönünden olumsuz etkileri olsa da, bunun üzerine MPP⁺ uygulaması yapıldığında kanal ekspresyonlarının baskılanmasının apoptoz seviyelerini olumlu etkileyebileceği değerlendirildi.

4.5. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Aktivite Sonuçları

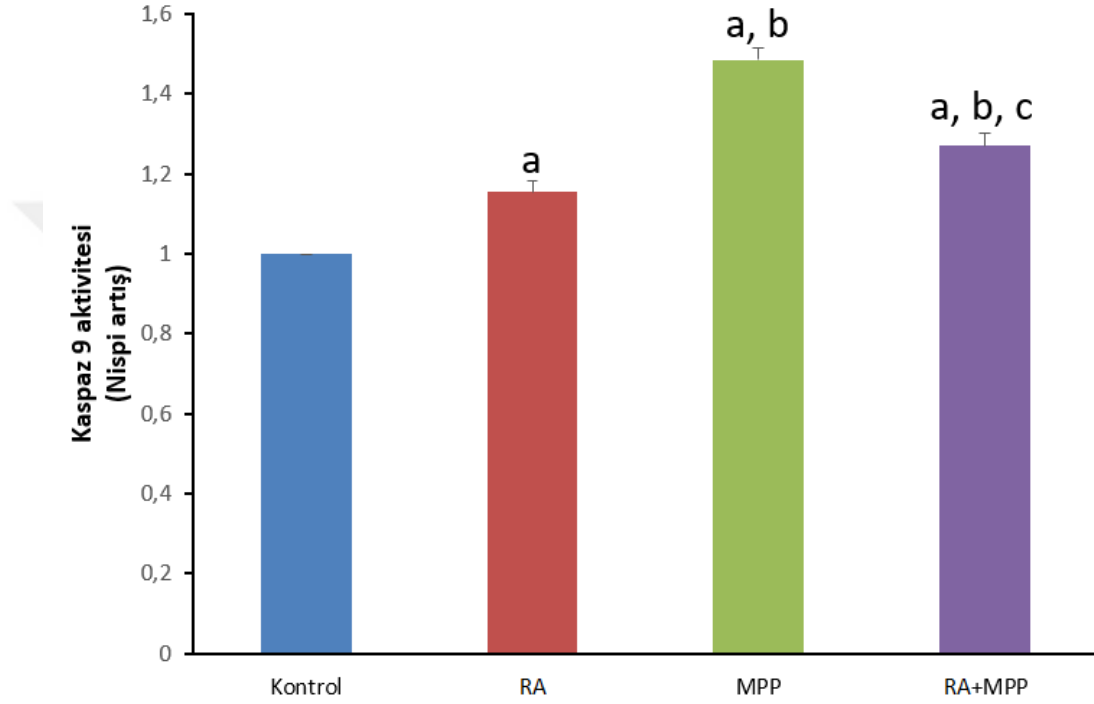
Kaspaz (cysteine aspartic protease, caspase) enzimleri apoptozom oluşumu ve apoptotik süreçlerin yürütülmesinde önemli role sahip enzimlerdir. Kaspaz 9 başlatıcı ve kaspaz 3 efektör kaspaz enzimi olarak nitelendirilmektedir. Kaspaz 9 enziminin proteolitik aktivitesiyle pro-kaspaz 3, kaspaz 3'e aktifleştirilmektedir.

Kaspaz enzimlerinin faaliyetiyle DNA parçalanması ve protein yıkımları gerçekleştirildiğinden bu enzimler apoptoz olgusunun en önemli belirteçlerindendir. Bu nedenle hücrel apoptozun sorgulandığı çalışmalarda kaspaz enzim aktivitelerini analiz eden yöntemler de eklenmektedir.



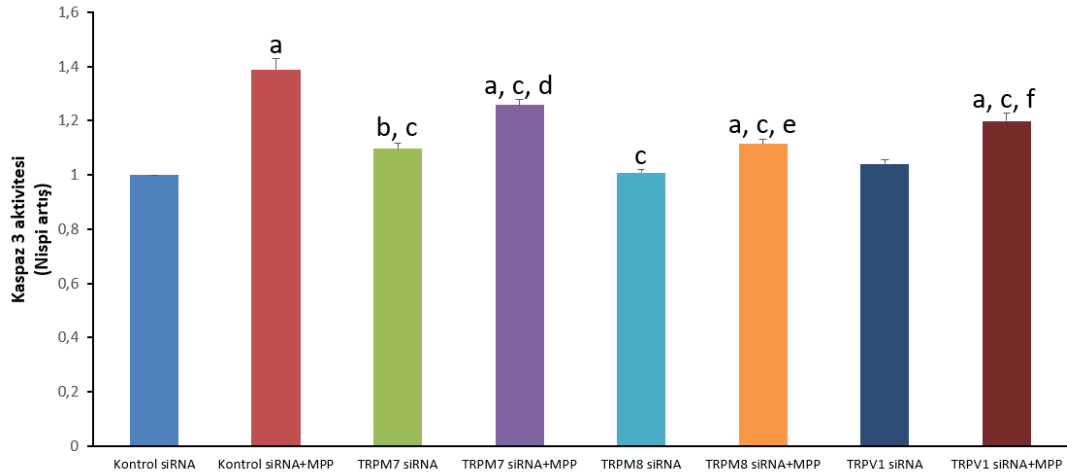
Grafik 4.7. Ana gruplara ait kaspaz 3 enzimi aktivitesi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol ve RA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA ve MPP grubuna kıyasla (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Ana gruplarda yaptığımız kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitesi tayini sonuçlarına göre her iki enzim aktivitesinin de Kontrol grubuna kıyasla MPP grubunda çok daha fazla arttığı gözlenmiştir. RA+MPP grubunda ise MPP grubuna kıyasla azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Grafik 4.7 ve 4.8). Ana grupların analizleri tamamlanınca siRNA transfeksiyonu yapılan, normal ve farklılaştırılmış grupların analizlerine geçilmiştir.



Grafik 4.8. Ana gruplara ait kaspaz 9 enzimi aktivitesi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P < 0,005$ MPP grubuna kıyasla (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

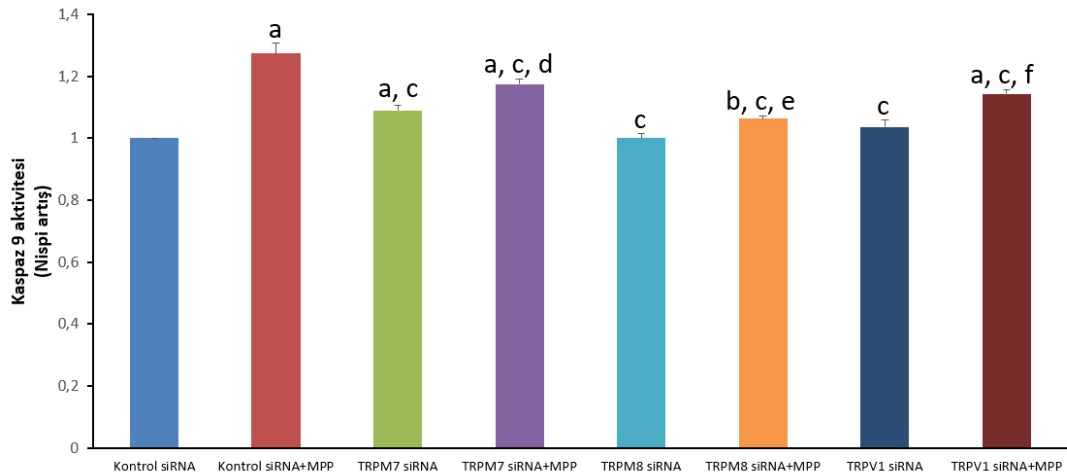
Normal siRNA transfekte gruplara ait kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitesi bulguları Grafik 4.9 ve 4.10'da sunulmuştur.



Grafik 4.9. siRNA transfekte normal gruplara ait kaspaz 3 tayini bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P<0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, e: $P<0,005$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, f: $P<0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Grafiklere bakıldığında Kontrol siRNA+MPP grubunun hem kaspaz 3 hem de kaspaz 9 aktivitesinin artışına sebep olduğu, ancak kanalların siRNA'ları ile MPP⁺ uygulanan gruplardaysa Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla enzimsel aktivitelerde azalma olduğu görülmektedir.

Yalnızca kanal siRNA'ları uygulanan gruplarda da apoptoz bulgularını doğrular şekilde Kontrol siRNA grubuna kıyasla artış tespit edilmiştir.

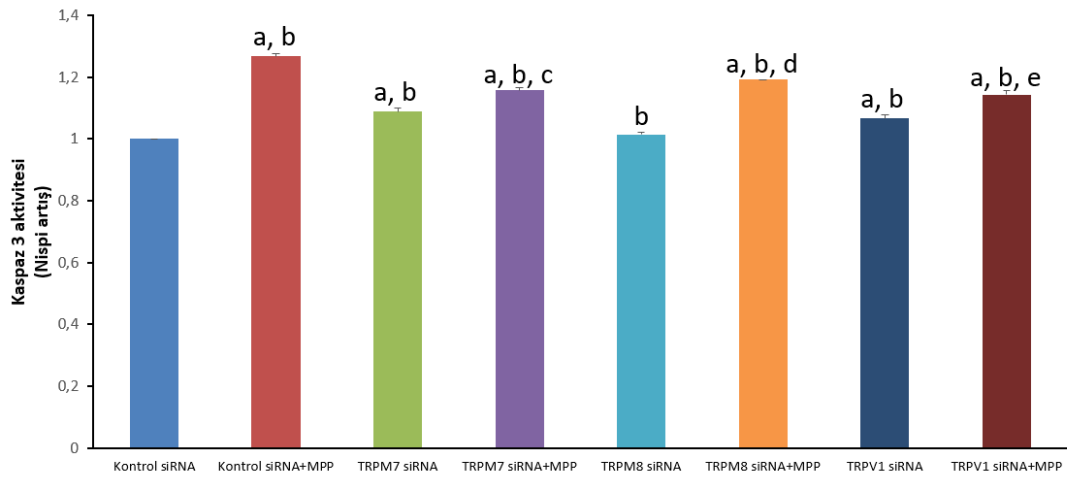


Grafik 4.10. siRNA transfekte normal gruplara ait kaspaz 9 tayini bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P<0,05$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d:

P<0,005 TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, e: P<0,05 TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, f: P<0,001 TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

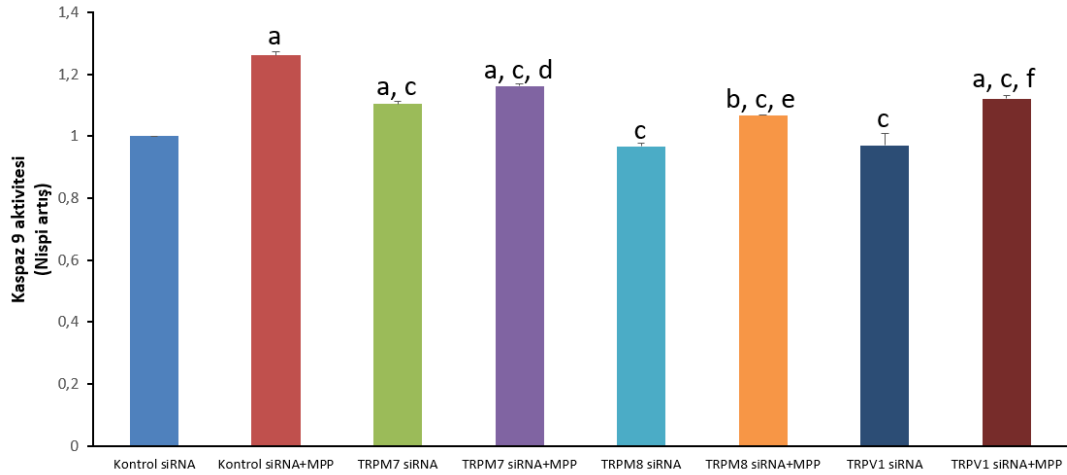
siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitesi bulguları Grafik 4.11 ve 4.12’de sunulmuştur.

Grafiklere bakıldığında farklılaştırılmış gruplarda; Kontrol siRNA+MPP grubunun hem kaspaz 3 hem de kaspaz 9 aktivitesinin artışına sebep olduğu, ancak kanalların siRNA’ları ile MPP⁺ uygulanan gruplardaysa Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla enzimsel aktivitelerde azalma olduğu gözlenmektedir.



Grafik 4.11. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait kaspaz 3 tayini bulguları. a: P<0,001 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: P<0,001 Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: P<0,001 TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, d: P<0,001 TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, e: P<0,001 TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

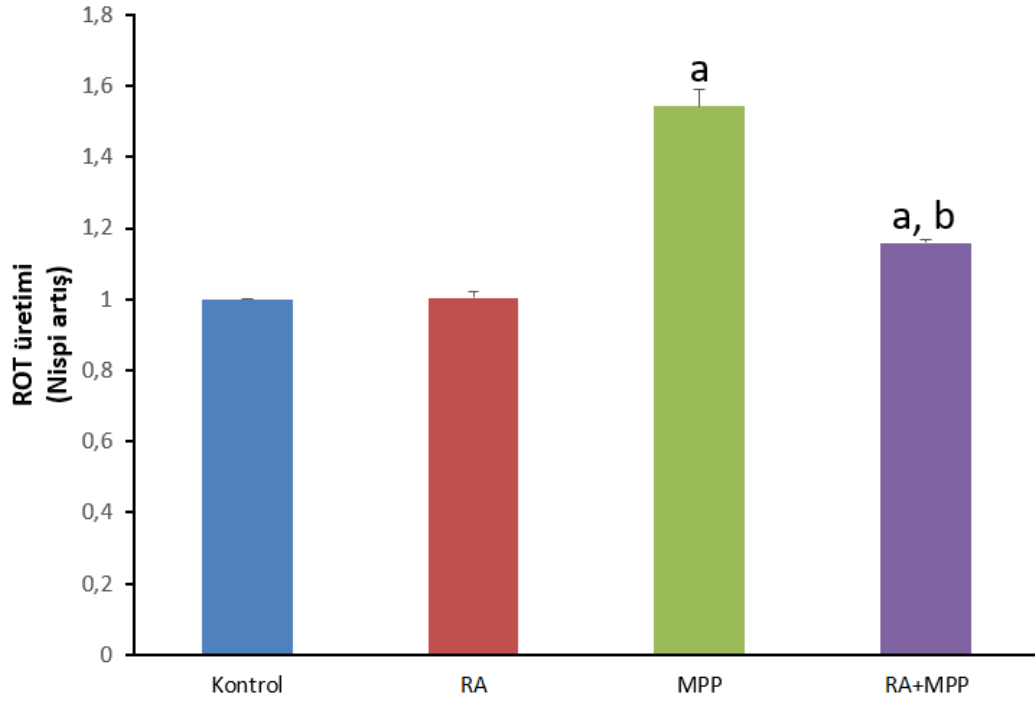
Normal gruplara benzer olarak, yalnızca kanal siRNA’ları uygulanan gruplarda da apoptoz bulgularını doğrular şekilde Kontrol siRNA grubuna kıyasla artış tespit edilmiştir.



Grafik 4.12. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait kaspaz 9 tayini bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P<0,01$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, e: $P<0,001$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, f: $P<0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

4.6. Hücresel ROT Üretimi Tayini Sonuçları

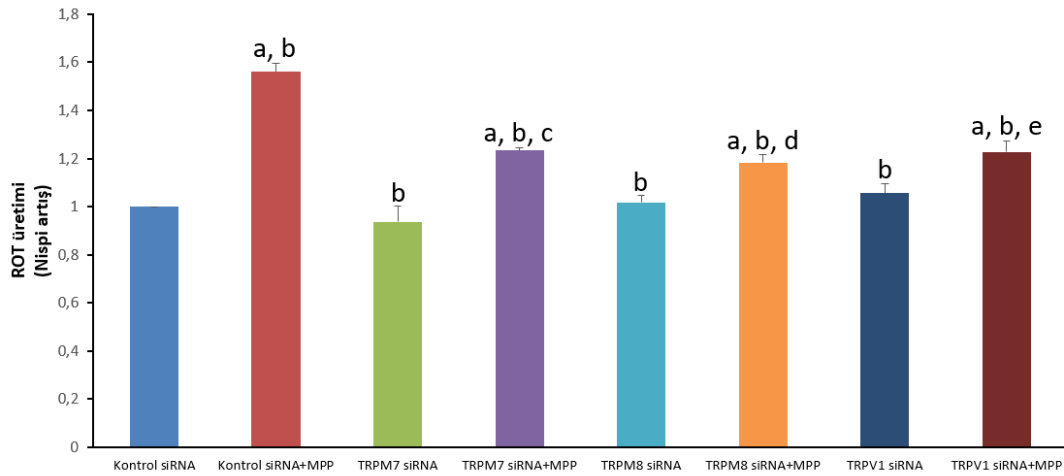
Hücre içinde oksidatif ajanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine kaymasıyla hücresel ROT üretiminin arttığı bilinmektedir. Hücresel ROT üretimi tayini için Dhydrorhodamine 123 (DHR-123) isimli prob kullanılmıştır. DHR-123 ile hücreler inkübe edilince hücre içine alınan boya oksidan ajanların etkisiyle floresan türevi rodamin 123'e dönüşür. Floresan ışık plate reader cihazında okunarak gruplara ait değerler alınmış ve kontrole nispetle Grafik 4.13'te sunulmuştur.



Grafik 4.13. Ana gruplara ait hücrel ROT üretimi tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol ve RA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ MPP grubuna kıyasla (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

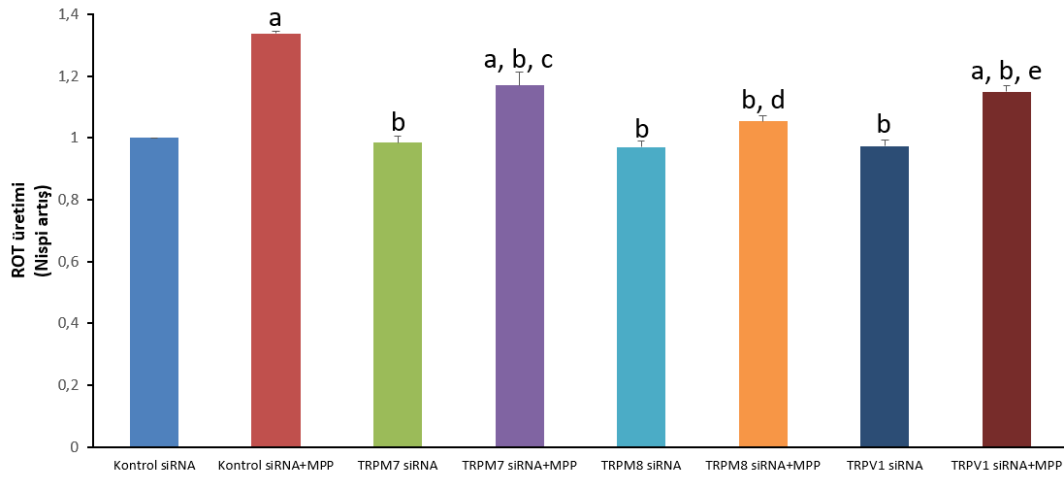
Buna göre MPP^+ inkübasyonu etkisiyle hücrel ROT üretiminin MPP grubunda en yüksek olduğu gözlenmektedir. RA+MPP grubunda ise MPP grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalma meydana geldiği görülmektedir.

siRNA transfekte edilmiş normal ve farklılaştırma uygulanmış gruplara ait hücrel ROT üretimi tayini bulguları Grafik 4.14 ve 4.15'te sunulmuştur.



Grafik 4.14. siRNA transfekte normal gruplara ait hücresel ROT üretimi tayini bulguları. a: P<0,001 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: P<0,001 Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: P<0,001 TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, d: P<0,005 TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, e: P<0,005 TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Grafiklere bakıldığında normal ve farklılaştırılmış gruplarda; Kontrol siRNA+MPP grubunun hücresel ROT üretiminde artışa sebep olduğu, ancak kanalların siRNA'ları ile MPP⁺ uygulanan gruplarda Kontrol siRNA+MPP grubuna göre ROT üretiminde azalma olduğu görülmektedir. Yalnızca kanal siRNA'sı uygulanan gruplarda ise Kontrol siRNA grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

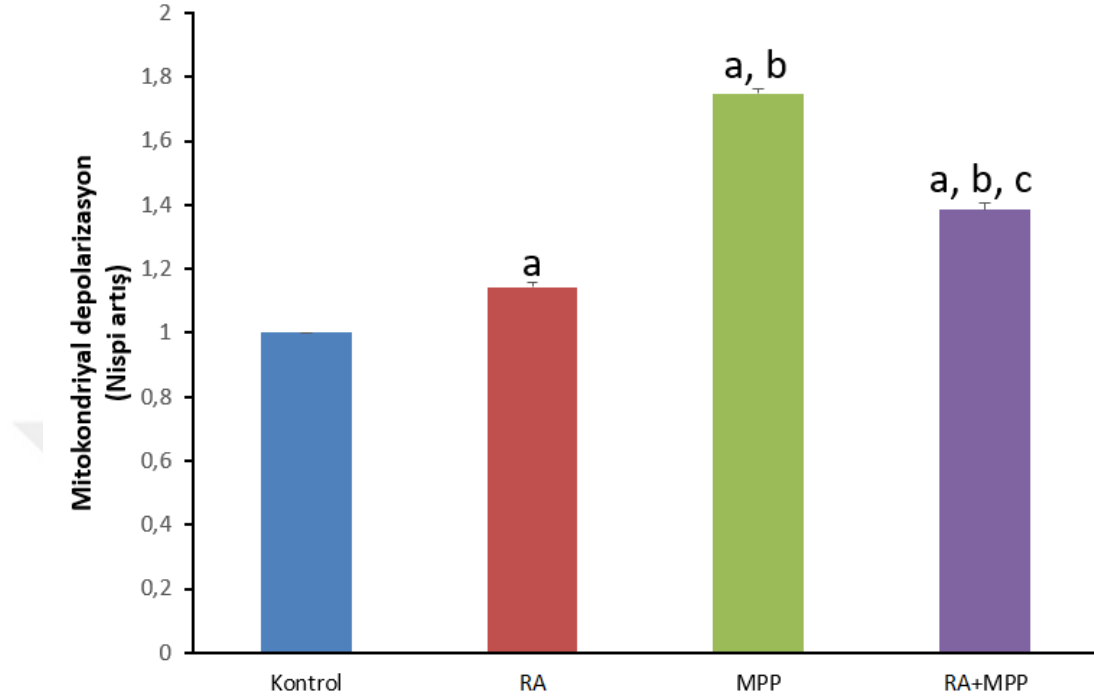


Grafik 4.15. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait hücresel ROT üretimi tayini bulguları. a: P<0,001 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: P<0,001 Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: P<0,001 TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, d: P<0,005 TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, e: P<0,001 TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

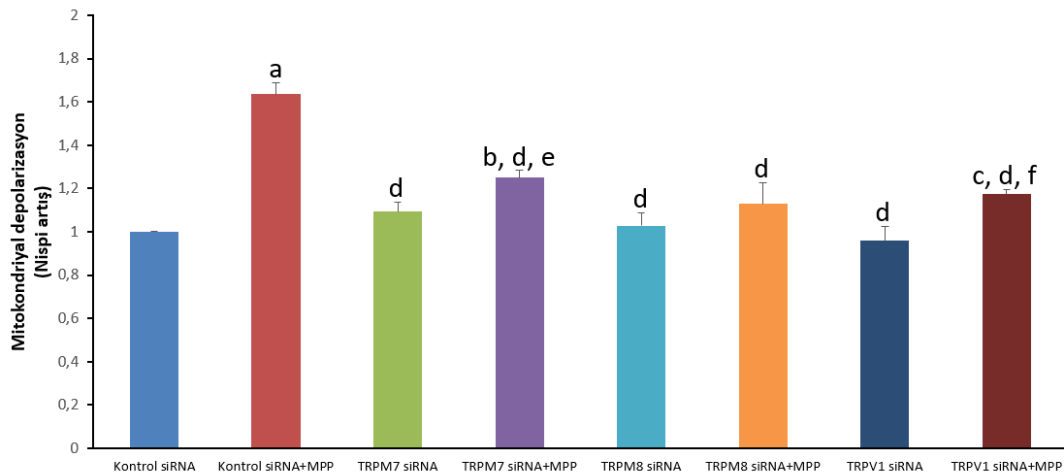
4.7. Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu Tayini Bulguları

Mitokondri membranları arası alandaki protonlar, elektron taşıma zinciri komponentleri, krebs döngüsü sonucu ortaya çıkan metabolitler mitokondriyal membran potansiyeli oluşumu ve sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Çalışmamızda MPP⁺ ile başlatılan hücresel Parkinson hastalığı modelinde mitokondrilere ait zar depolarizasyonu da JC-1 boyası kullanılarak çalışılmıştır. Buna göre Parkinson modellemesi yapılan MPP grubunda diğer gruplara kıyasla daha fazla mitokondriyal membran depolarizasyonu olduğu görülmüştür. RA+MPP grubu ise MPP grubuna

kıyasla MPP⁺ inkübasyonu ile başlatılan toksisiteden daha az ölçüde etkilenmiştir (Grafik 4.16).



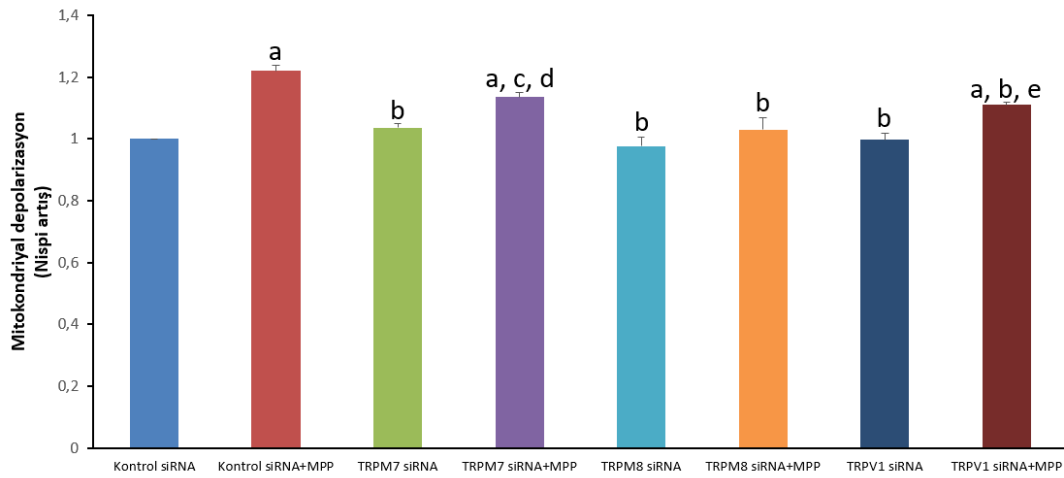
Grafik 4.16. Ana gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ MPP grubuna kıyasla (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).



Grafik 4.17. siRNA transfekte normal gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ Kontrol

siRNA grubuna kıyasla, d: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P<0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, f: $P<0,005$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

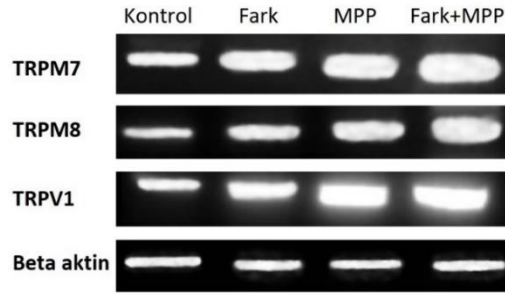
Grafiklere bakıldığında normal ve farklılaştırılmış gruplarda; Kontrol siRNA+MPP grubunun mitokondriyal membran depolarizasyonunda artışa sebep olduğu, ancak kanalların siRNA'ları ile MPP⁺ uygulanan gruplarda Kontrol siRNA+MPP grubuna göre depolarizasyonda azalma olduğu görülmektedir. Yalnızca kanal siRNA'sı uygulanan gruplarda ise Kontrol siRNA grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Grafik 4.17 ve 4.18).



Grafik 4.18. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu tayini bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P<0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P<0,005$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, e: $P<0,005$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

4.8. Western Blot Sonuçları

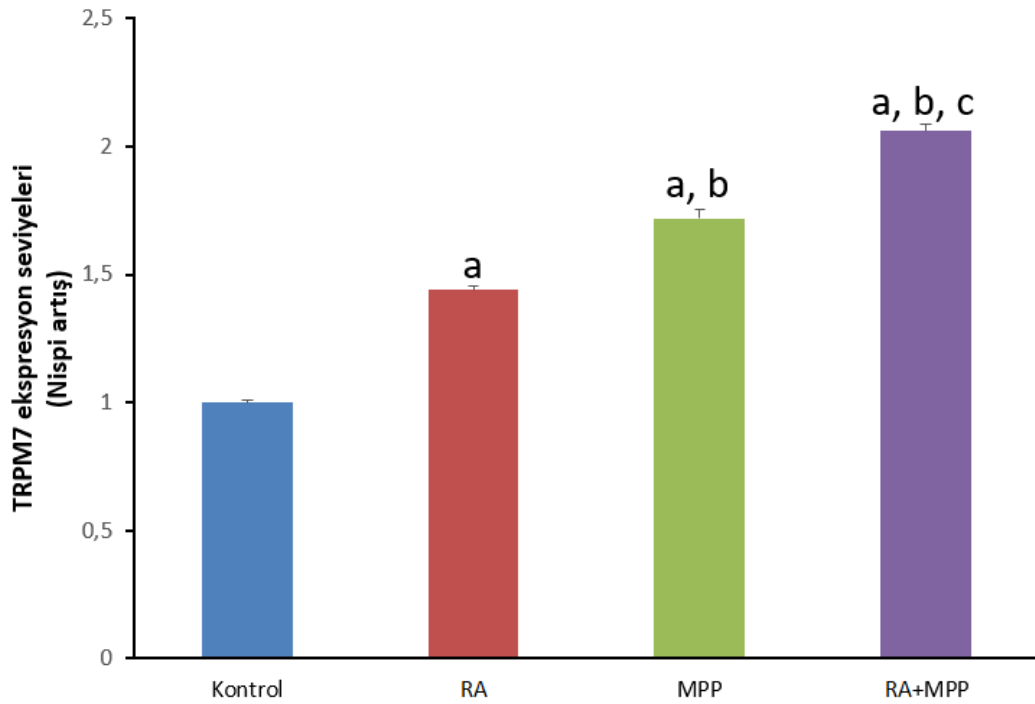
Ana grupların Western Blot bant sonuçları Resim 4.9'da verilmiştir. Buna göre üç kanal için de farklılaştırma işlemi kanalların protein ekspresyonlarını artırırken MPP⁺ uygulaması bu artışta daha fazla etkili olduğu görülmektedir (Resim 4.9).



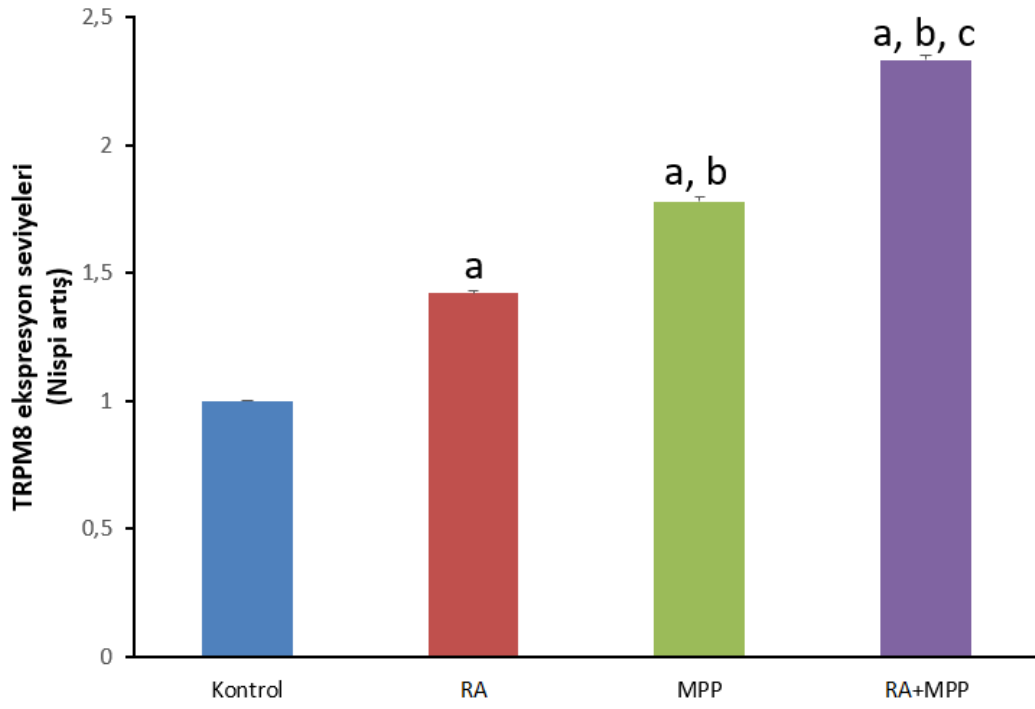
Resim 4.9. Ana gruplara göre TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanal ekspresyonlarının değişimi.

Farklılaştırılmış hücrelere MPP⁺ uygulandığında (RA+MPP grubu) sadece MPP⁺ uygulanan gruba kıyasla TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 kanallarında belirgin bir ekspresyon artışı gözlenmiştir.

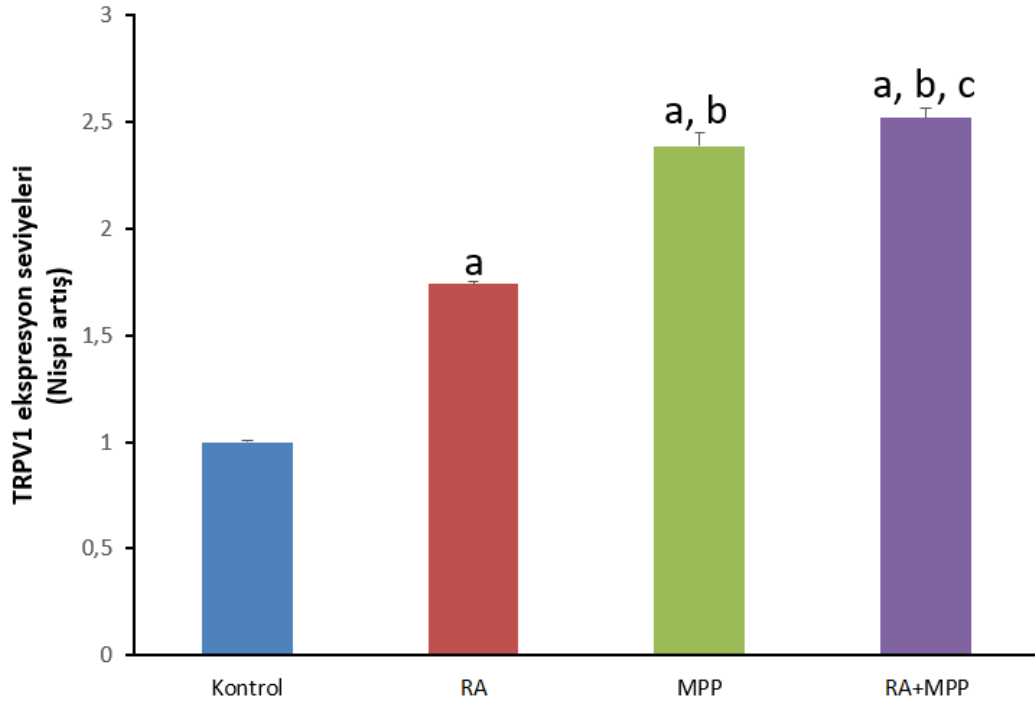
Ana gruplara ait TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanal ekspresyon bulguları sütun grafiği şeklinde sırasıyla Grafik 4.19-4.21’de verilmiştir.



Grafik 4.19. Ana gruplara ait TRPM7 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: P<0,001 Kontrol grubuna kıyasla, b: P<0,001 RA grubuna kıyasla, c: P<0,001 MPP grubuna kıyasla.

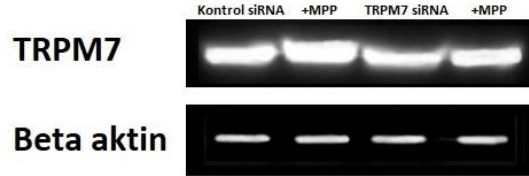


Grafik 4.20. Ana gruplara ait TRPM8 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ MPP grubuna kıyasla.

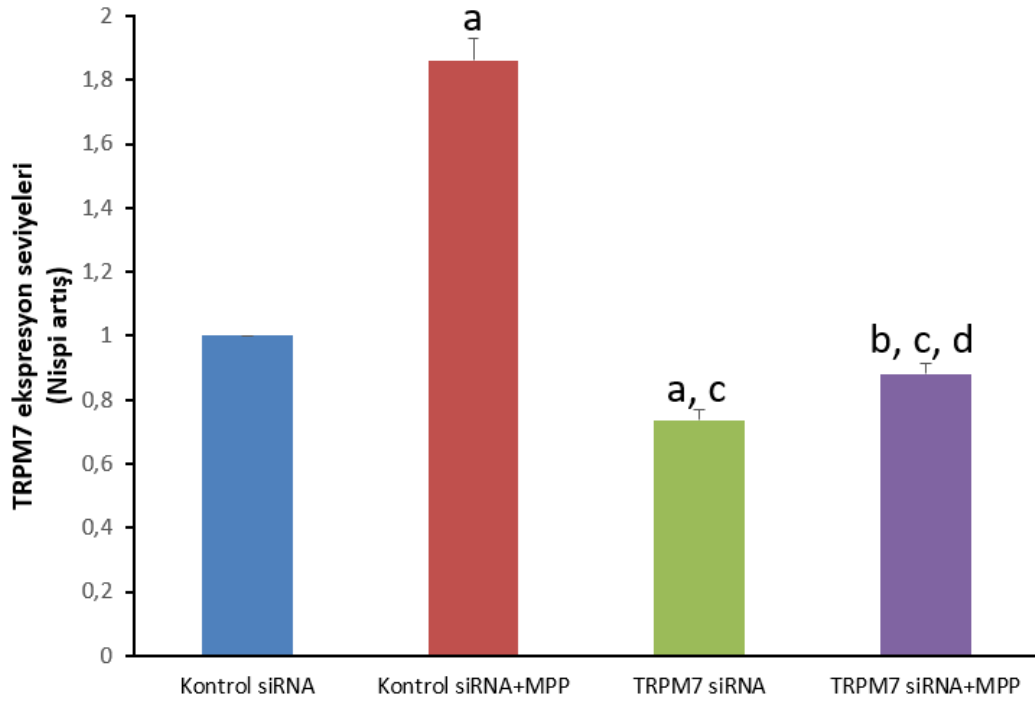


Grafik 4.21. Ana gruplara ait TRPV1 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P<0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P<0,005$ MPP grubuna kıyasla.

siRNA transfeksiyonu yapılan normal gruplara ait TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanal ekspresyonlarını gösteren bantlar Resim 4.10-4.12’te verilmiştir. Kanal ekspresyonlarına dair sütun grafikleri sırasıyla Grafik 4.22-4.24’te verilmiştir.



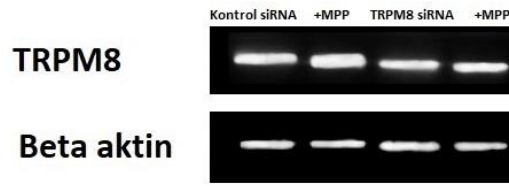
Resim 4.10. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM7 kanal ekspresyonlarının değişimi.



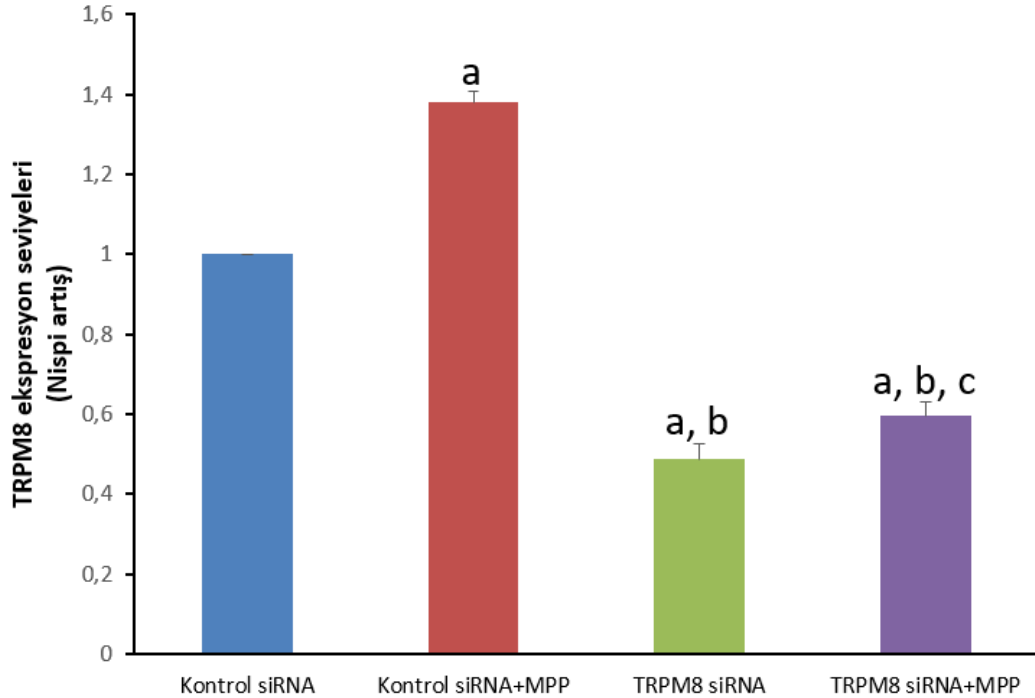
Grafik 4.22. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM7 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P<0,05$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla.

Kontrol siRNA grubuna kıyasla her üç kanal için de Kontrol siRNA+MPP grubunda önemli düzeyde kanal ekspresyonu artışı gözlenirken, kanal siRNA'sı uygulanan gruplarda ekspresyon bakımından anlamlı azalmalar gözlenmiştir.

TRPM7 kanal siRNA'sı uygulanan grupta Kontrol siRNA düzeylerine göre anlamlı ekspresyon azalışı gözlenirken TRPM7 siRNA'sı üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan grupta ise Kontrol siRNA seviyelerine doğru ekspresyon artışı görülmüştür (Grafik 4.22). TRPM7 siRNA'sı uygulanan iki grup arasında ise düşük düzeyde anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır.



Resim 4.11. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM8 kanal ekspresyonlarının değişimi.

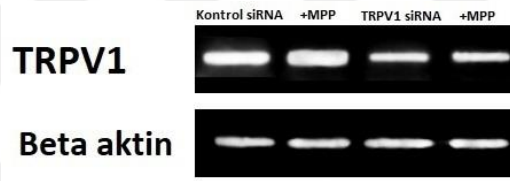


Grafik 4.23. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPM8 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$

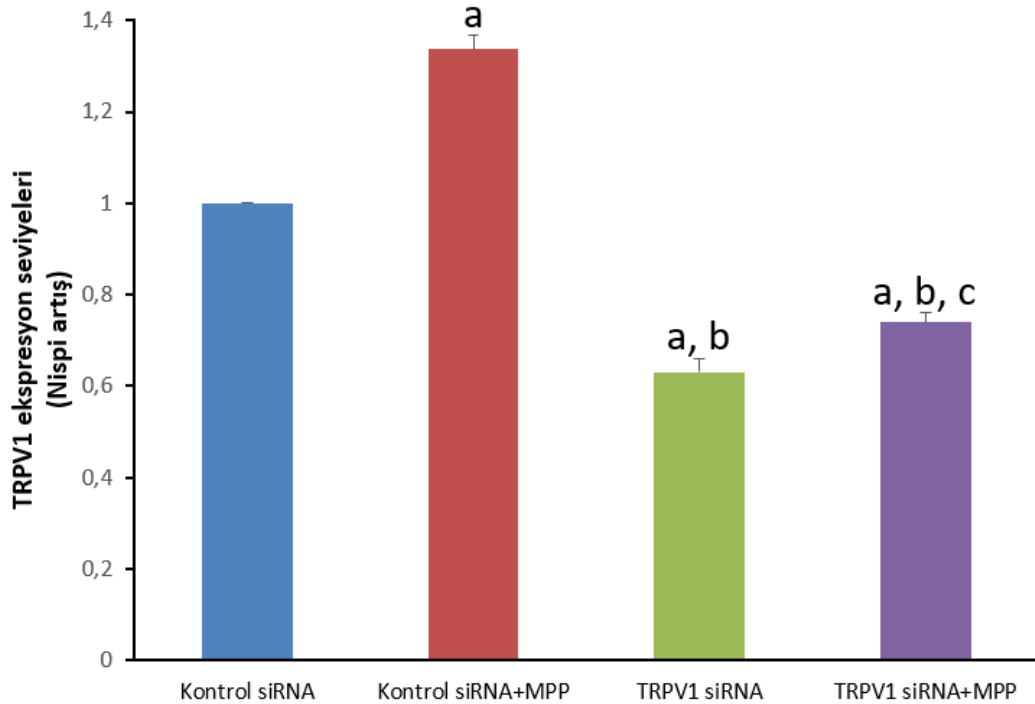
Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P<0,01$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla.

TRPM8 kanal siRNA'sı uygulanan grupta Kontrol siRNA düzeylerine göre anlamlı ekspresyon azalışı gözlenirken TRPM8 siRNA'sı üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan grupta ise Kontrol siRNA seviyelerine uzak da olsa ekspresyon artışı kaydedilmiştir (Grafik 4.23). TRPM8 siRNA'sı uygulanan iki grup arasında ise düşük düzeyde bir farklılığa rastlanmıştır.

TRPV1 kanal siRNA'sı uygulanan grupta Kontrol siRNA düzeylerine göre anlamlı ekspresyon azalışı gözlenirken TRPV1 siRNA'sı üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan grupta ise Kontrol siRNA seviyelerine uzak da olsa ekspresyon artışı gözlenmiştir (Grafik 4.24). TRPV1 siRNA'sı uygulanan iki grup arasında ise önemli bir farklılığa rastlanmıştır.



Resim 4.12. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPV1 kanal ekspresyonlarının değişimi.

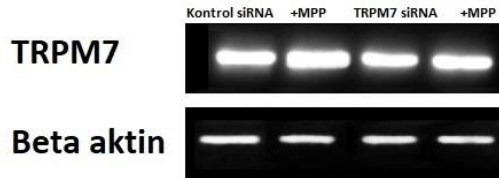


Grafik 4.24. siRNA transfekte normal gruplara ait TRPV1 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P<0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla.

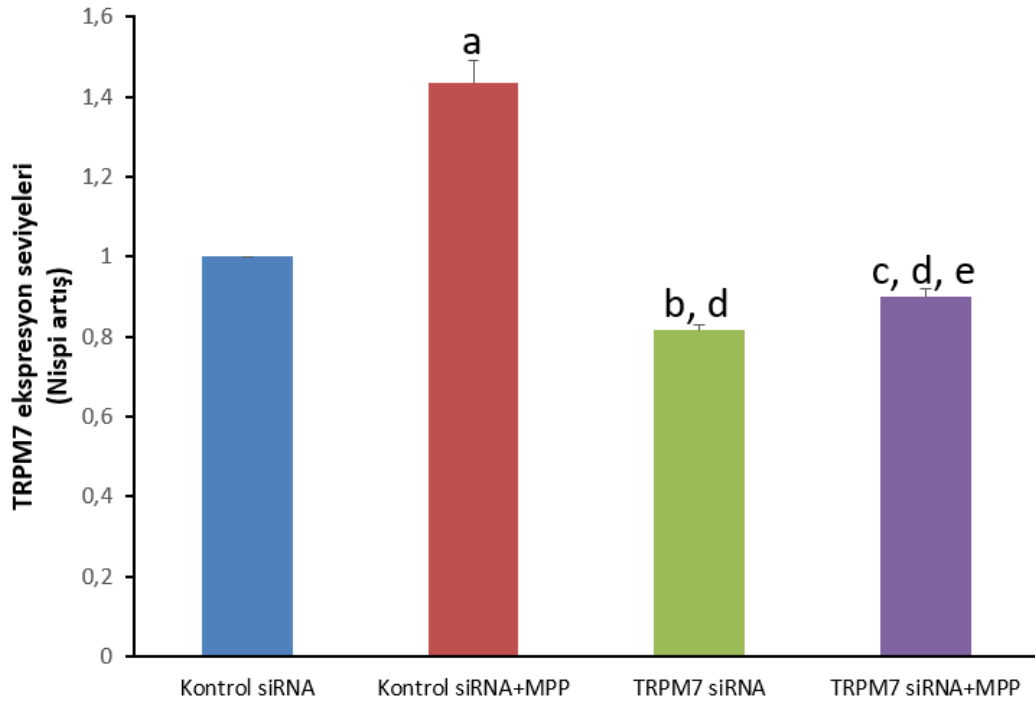
siRNA transfeksiyonu yapılan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanal ekspresyonlarını gösteren bantlar Resim 4.13-4.15’de verilmiştir. Kanal ekspresyonlarına dair sütun grafikleri sırasıyla Grafik 4.25-4.27’de verilmiştir.

Kontrol siRNA grubuna kıyasla her üç kanal için de Kontrol siRNA+MPP grubunda önemli düzeyde kanal ekspresyonu artışı gözlenirken, kanal siRNA’sı uygulanan gruplarda ekspresyon bakımından anlamlı azalmalar gözlenmiştir.

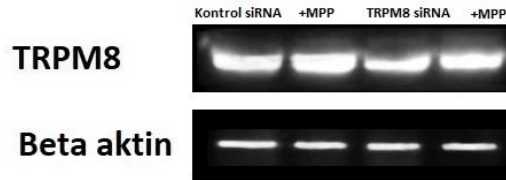
TRPM7 kanal siRNA’sı uygulanan grupta Kontrol siRNA düzeylerine göre anlamlı ekspresyon azalışı gözlenirken TRPM7 siRNA’sı üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan grupta ise Kontrol siRNA seviyelerine doğru ekspresyon artışı görülmüştür, ancak Kontrol siRNA seviyelerine göre daha düşük ekspresyon olduğu izlenmiştir (Grafik 4.25). TRPM7 siRNA’sı uygulanan iki grup arasında ise düşük düzeyde anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır.



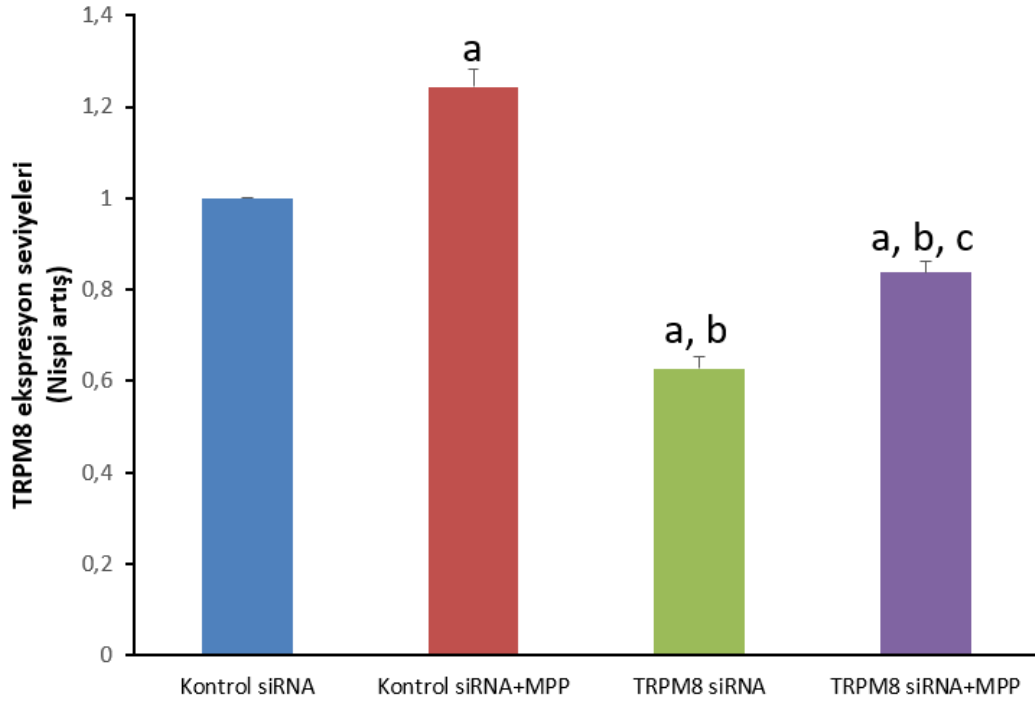
Resim 4.13. siRNA transfekte farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 kanal ekspresyonlarının değişimi.



Grafik 4.25. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, d: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,05$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla.

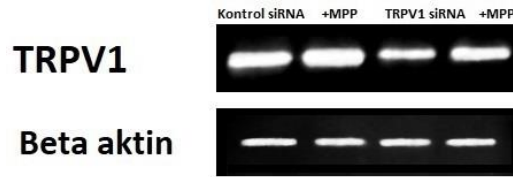


Resim 4.14. siRNA transfekte farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 kanal ekspresyonlarının değişimi.

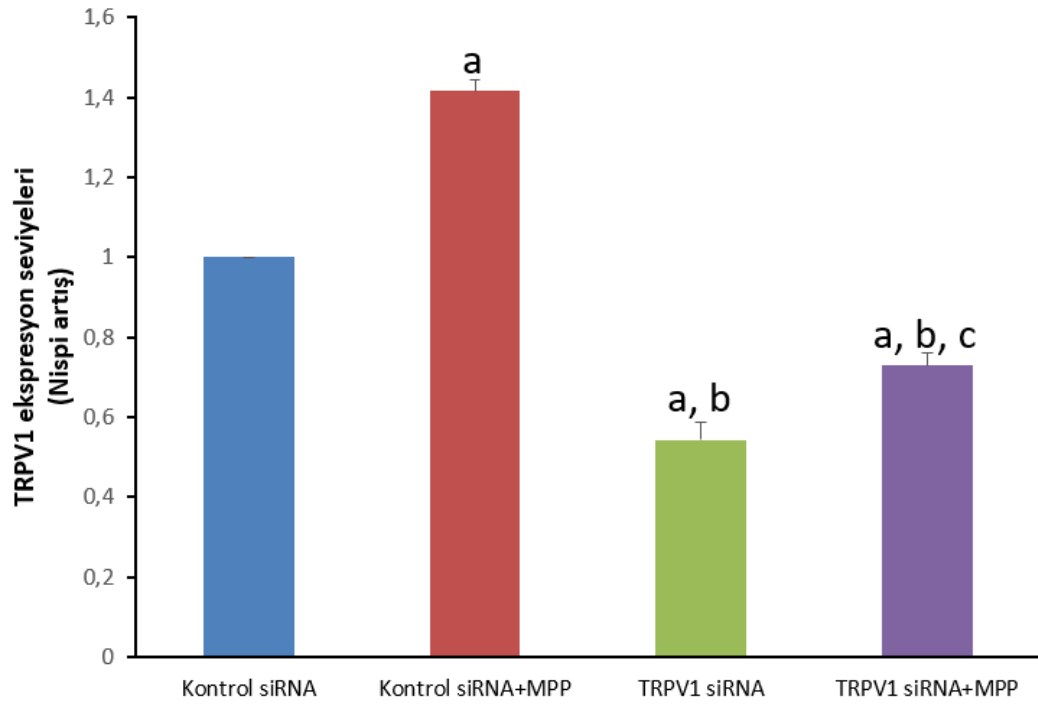


Grafik 4.26. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla.

TRPM8 kanal siRNA'sı uygulanan grupta Kontrol siRNA düzeylerine göre anlamlı ekspresyon azalışı gözlenirken TRPM8 siRNA'sı üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan grupta ise Kontrol siRNA seviyelerine kıyasla anlamlı bir değişim olduğu kaydedilmiştir (Grafik 4.26). TRPM8 siRNA'sı uygulanan iki grup arasında ise kuvvetli derecede anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır.



Resim 4.15. siRNA transfekte farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 kanal ekspresyonlarının değişimi.

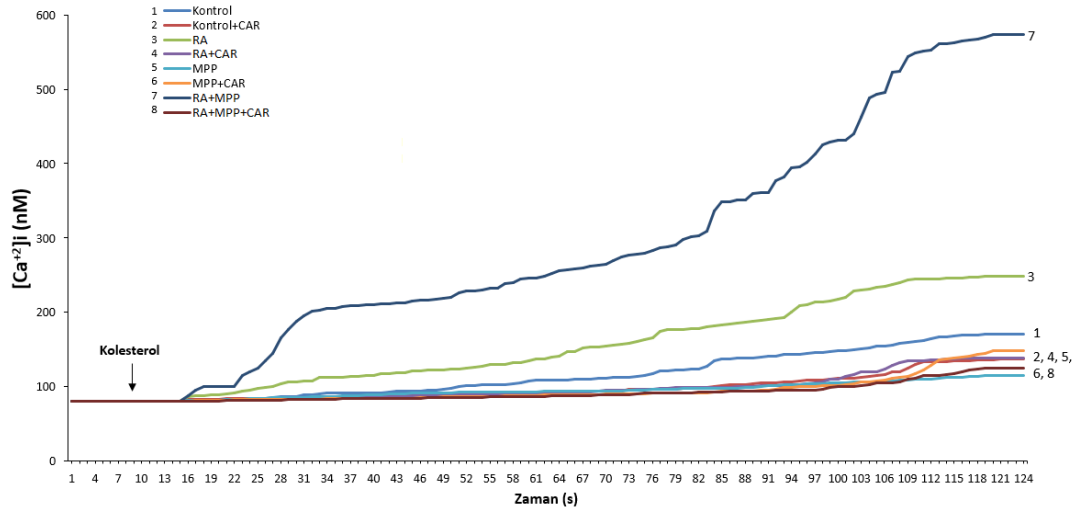


Grafik 4.27. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 kanal proteini ekspresyon bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla.

TRPV1 kanal siRNA'sı uygulanan grupta Kontrol siRNA düzeylerine göre anlamlı ekspresyon azalışı gözlenirken TRPV1 siRNA'sı üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan grupta da Kontrol siRNA seviyelerine göre anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (Grafik 4.27). TRPV1 siRNA'sı uygulanan iki grup arasında ise kuvvetli düzeyde bir farklılığa rastlanmıştır.

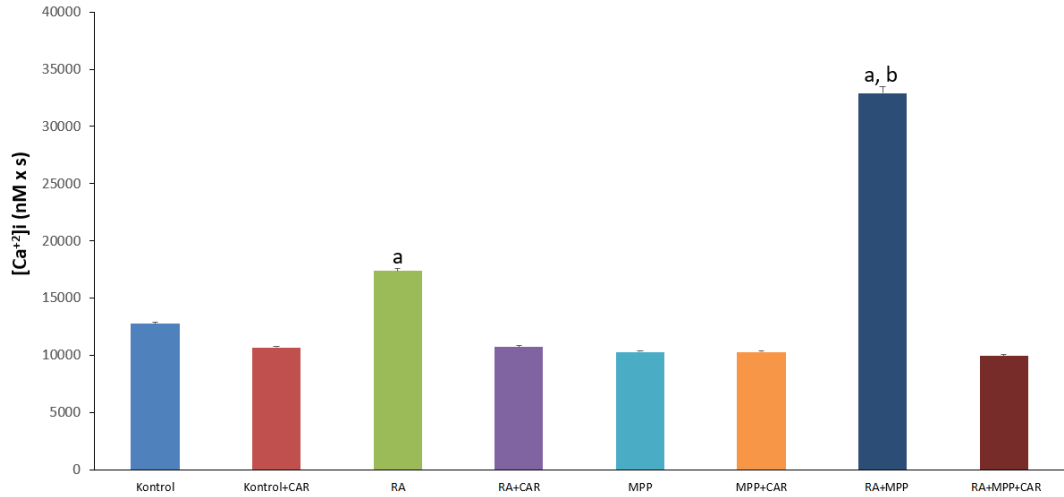
4.9. Kalsiyum Sinyali Analizi Sonuçları

Gruplardan alınan TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanallarına ait kalsiyum sinyali analiz sonuçları grafikler halinde sunulmuştur. Çizgi grafikler agonist stimülasyonundan sonra hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki anlık değişimleri gösterirken sütun grafikleri ise kümülatif kalsiyum konsantrasyonunu ifade etmektedir. Ana gruplardan alınan TRPM7 katyon kanalına ait kalsiyum sinyali analiz sonuçları Grafik 4.28 ve 4.29'da gösterilmiştir.



Grafik 4.28. Ana gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (CAR: karvakrol).

TRPM7 katyon kanallarının stimülasyonu için agonist olarak 1 μ M kolesterol kullanıldı (123). Antagonist uygulamalarında ise hücreler 500 μ M karvakrol ile uyarımdan 30 dk önce inkübe edildi (124,125). İnkübasyon sonrasında santrifüj edilen hücrelerden süpernatantlar atılarak Ca^{+2} içeren yeni tampona alınıp iyice karıştırıldı. Ardından uyarımlar yapılarak kayıtlar alındı.

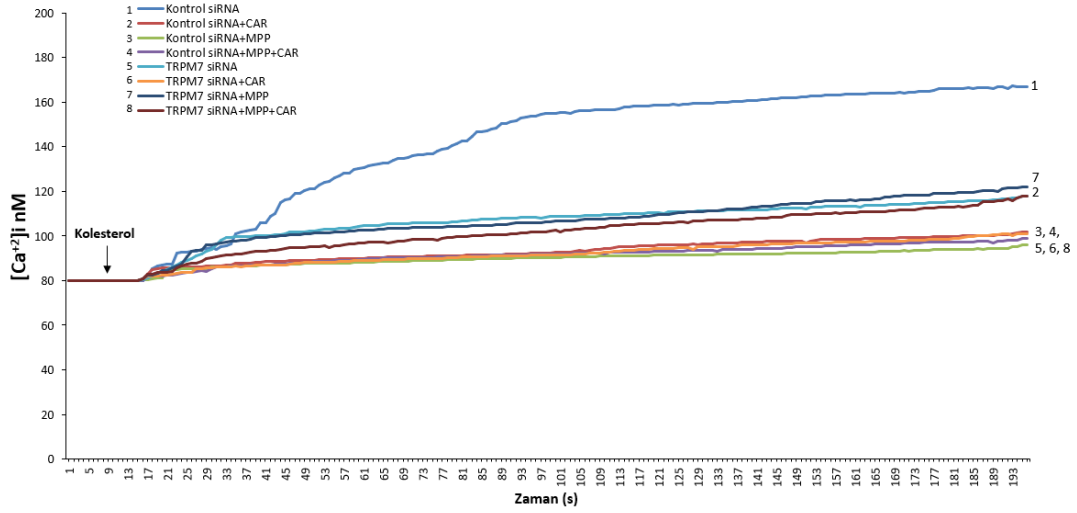


Grafik 4.29. Ana gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla. (CAR: karvakrol).

Elde edilen bulgulara göre RA grubunda kalsiyum düzeyleri Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı belirlendi. Öte yandan RA+MPP

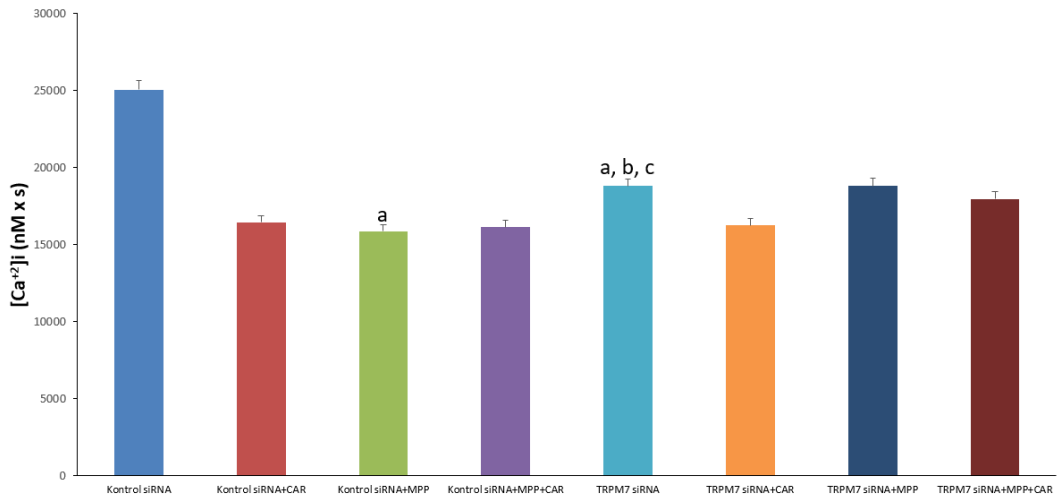
grubundan alınan verilere göre hem Kontrol hem de RA grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış olduğu gözlemlendi. TRPM7 katyon kanallarından alınan kalsiyum sinyali sonuçlarının kanal ekspresyonlarının artışıyla doğru orantılı olabileceği düşünüldü.

Kontrol siRNA ve TRPM7 siRNA uygulanan normal gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçları Grafik 4.30 ve 4.31’de sunulmuştur.



Grafik 4.30. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılığıyla Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (CAR: karvakrol).

Buna göre ana gruplardan alınan sonuçlara benzer şekilde Kontrol siRNA grubundan alınan kalsiyum girşine dair sinyallerin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Grafik 4.30).

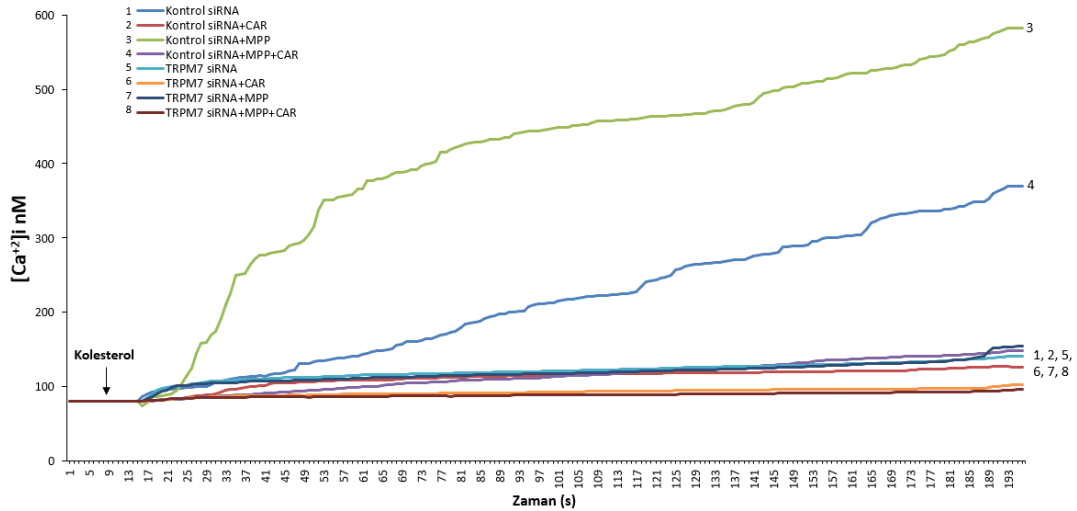


Grafik 4.31. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,001$ Kontrol siRNA+CAR grubuna kıyasla, c: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla. (CAR: karvakrol).

TRPM7 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatacıcı (CAR: karvakrol) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir. Ancak yine de kapatacıcı uygulanan gruplardan daha fazla düzeyde kalsiyum girişi söz konusudur (Grafik 4.31).

Kontrol siRNA ve TRPM7 siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçları Grafik 4.32 ve 4.33'te sunulmuştur.

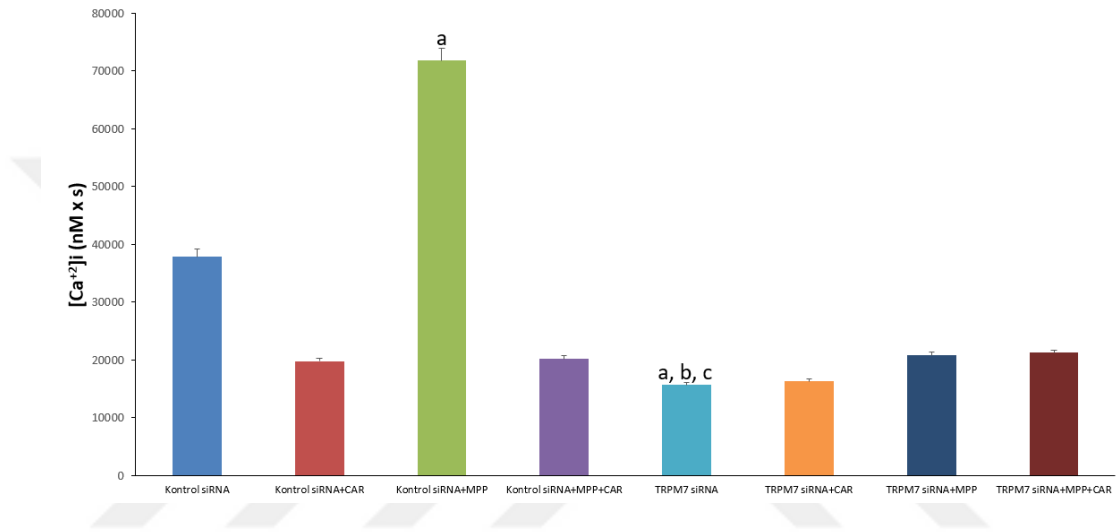
Buna göre ana gruplardan alınan sonuçlara benzer şekilde Kontrol siRNA uygulanıp farklılaştırılan gruptan alınan kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla daha düşük olduğu ancak bazal seviyelerin de yukarısında yer aldığı gözlenmiştir. En yüksek kalsiyum girişinin Kontrol siRNA+MPP grubunda olduğu görülmüştür (Grafik 4.32).



Grafik 4.32. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (CAR: karvakrol).

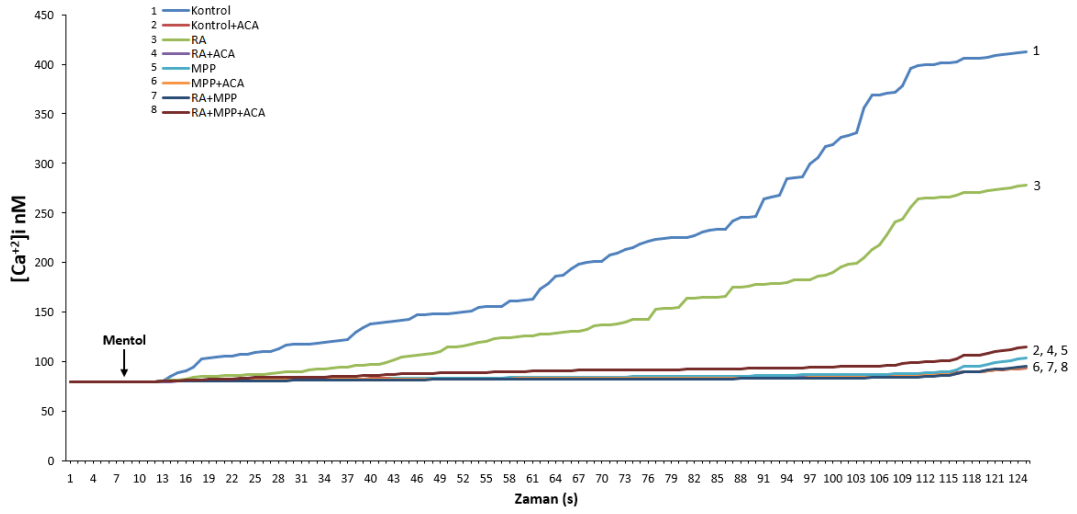
TRPM7 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatacıcı (CAR: karvakrol) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir. TRPM7

siRNA+MPP grubundaysa TRPM7 siRNA grubuna kıyasla daha yüksek kalsiyum akışı olduğu tespit edilmiştir (Grafik 4.33). Bu durum, SH-SY5Y hücreleri farklılaştırılmadan kullanıldığında TRPM7 kanallarının MPP⁺ etkisiyle uyarılamadığı ancak farklılaştırılmış hücrelerde de MPP⁺ etkisinde kalsiyum girşini artırdığını düşündürmüştür. TRPM7 kanallarının SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırma durumuna binaen Parkinson hastalığı indüklendiğinde değişik açılma-kapanma davranışı gösterdiğini düşündürmüştür.



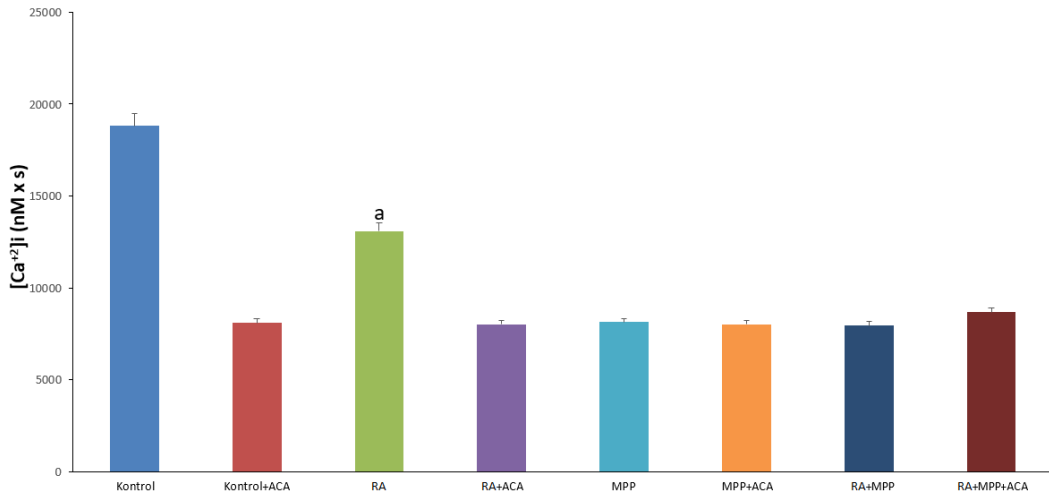
Grafik 4.33. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM7 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: P<0,001 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: P<0,001 Kontrol siRNA+CAR grubuna kıyasla, c: P<0,001 Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla. (CAR: karvakrol).

Ana gruplardan alınan TRPM8 katyon kanalına ait kalsiyum sinyali analiz sonuçları Grafik 4.34 ve 4.35'te gösterilmiştir.



Grafik 4.34. Ana gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (ACA: antranilik asit).

TRPM8 katyon kanallarının stimülasyonu için agonist olarak 100 μ M mentol kullanıldı (126). Antagonist uygulamalarında ise hücreler 25 μ M ACA ile uyarımdan 30 dk önce inkübe edildi (127). İnkübasyon sonrasında santrifüj edilen hücrelerden süpernatantlar atılarak Ca^{+2} içeren yeni tampona alınıp iyice karıştırıldı. Ardından uyarımlar yapılarak kayıtlar alındı.



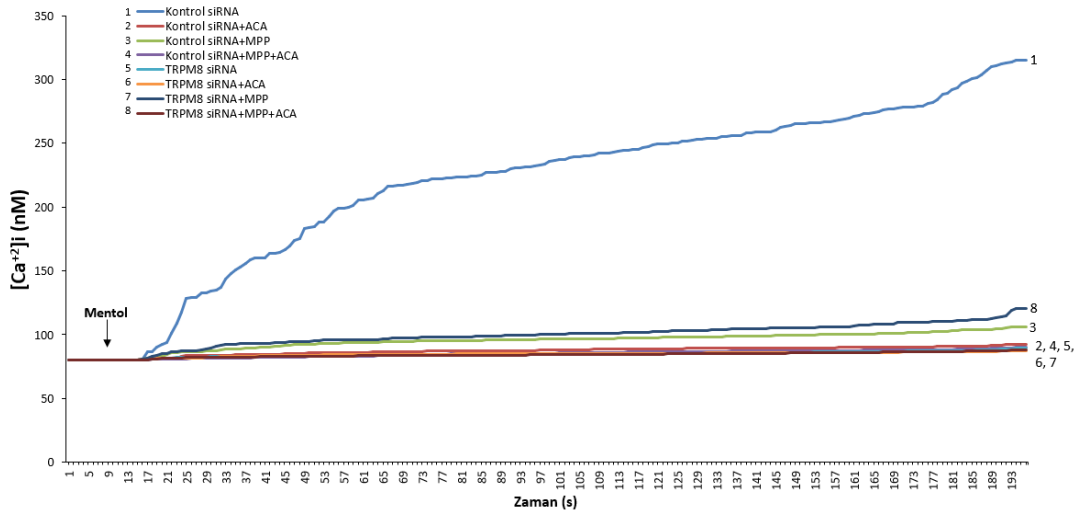
Grafik 4.35. Ana gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla. (ACA: antranilik asit).

Elde edilen bulgulara göre Kontrol grubunda kalsiyum düzeyleri diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla olduğu belirlendi. Kontrol grubuna en yakın seviyede olan RA grubunda ise Kontrol grubuna kıyasla önemli

ölçüde azalma olduğu gözlemlendi. TRPM8 katyon kanallarından alınan kalsiyum sinyali sonuçlarının kanal ekspresyonlarının artışıyla doğru orantılı olmadığı sonucuna varıldı. Ekspresyonu artan TRPM8 kanal proteininin kanal işlevselliğinin olmayabileceği düşünüldü.

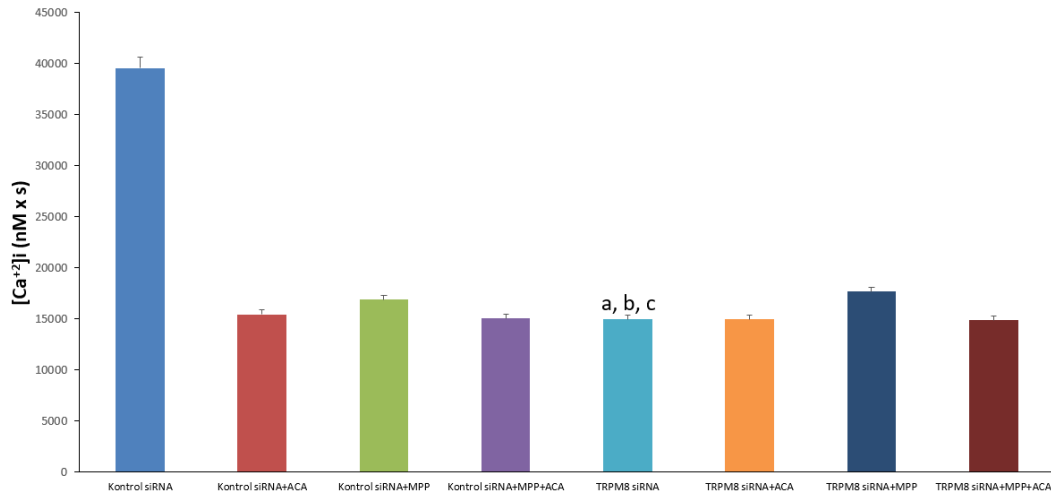
Kontrol siRNA ve TRPM8 siRNA uygulanan normal gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçları Grafik 4.36 ve 4.37’de sunulmuştur.

Buna göre ana gruplardan alınan sonuçlara benzer şekilde Kontrol siRNA grubundan alınan kalsiyum girişine dair sinyallerin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 4.36).



Grafik 4.36. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (ACA: antranilik asit).

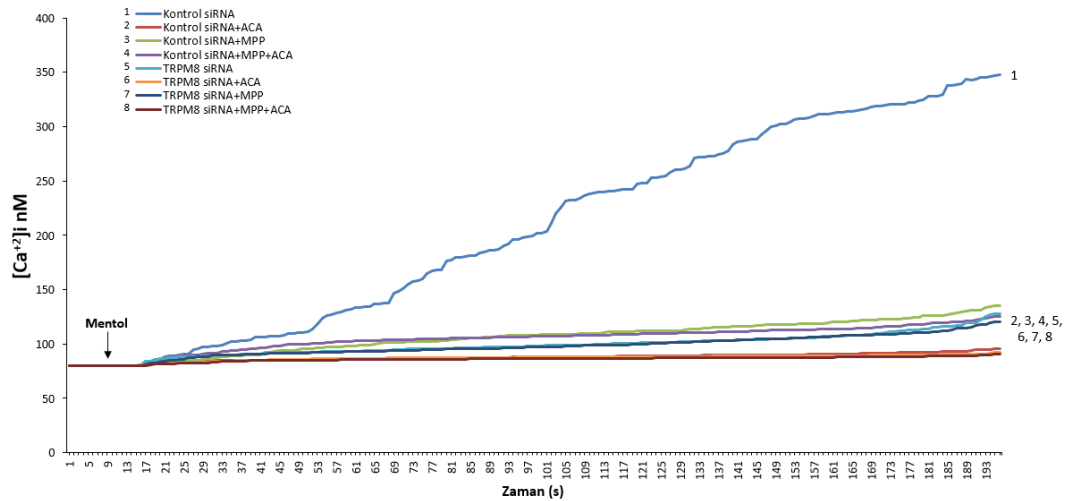
TRPM8 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatıcı (ACA: antranilik asit) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir (Grafik 4.37). Sonuç olarak en yüksek kalsiyum girişi Kontrol siRNA grubunda kaydedilmiştir. TRPM8 siRNA grubunun TRPM8 siRNA+MPP grubundan daha düşük kalsiyum sinyali göstermesi de dikkat çekmiştir.



Grafik 4.37. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,05$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ TRPM8 siRNA+MPP grubuna kıyasla. (ACA: antranilik asit).

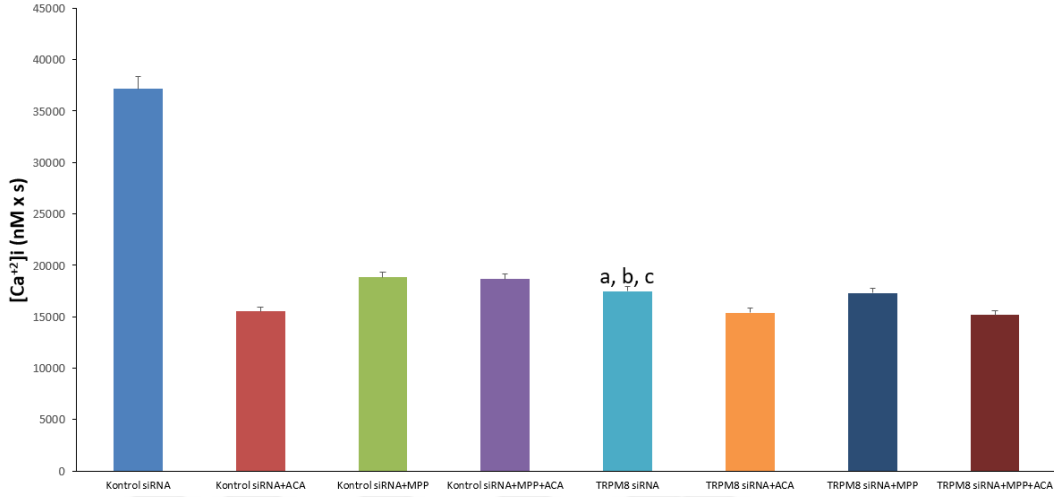
TRPM8 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatıcı (ACA: antranilik asit) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir (Grafik 4.37).

Kontrol siRNA ve TRPM8 siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçları Grafik 4.38 ve 4.39'da sunulmuştur.



Grafik 4.38. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (ACA: antranilik asit).

Buna göre ana gruplardan alınan sonuçlara benzer şekilde Kontrol siRNA uygulanıp farklılaştırılan gruptan alınan kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 4.38). En yüksek kalsiyum girişinin Kontrol siRNA grubunda olduğu görülmüştür.

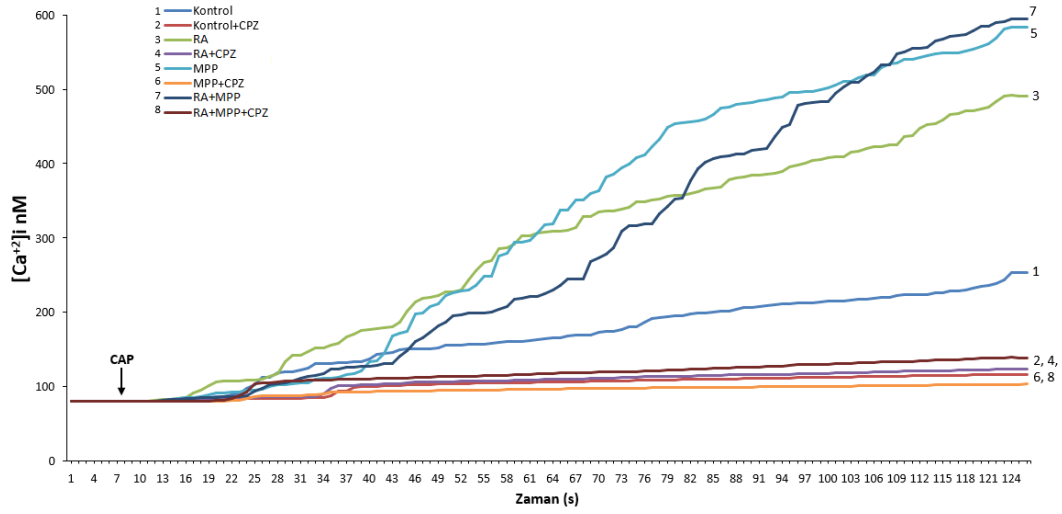


Grafik 4.39. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPM8 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,05$ Kontrol siRNA+ACA grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ TRPM8 siRNA+ACA grubuna kıyasla. (ACA: antranilik asit).

TRPM8 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatıcı (ACA: antranilik asit) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir (Grafik 4.39). TRPM8 siRNA grubu ile TRPM8 siRNA+MPP grubu arasında herhangi bir anlamlı bulguya rastlanmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar TRPM8 katyon kanallarının Parkinson hastalığı modelinde nedensellik bakımından rolü olmayabileceği izlenimini uyandırmıştır.

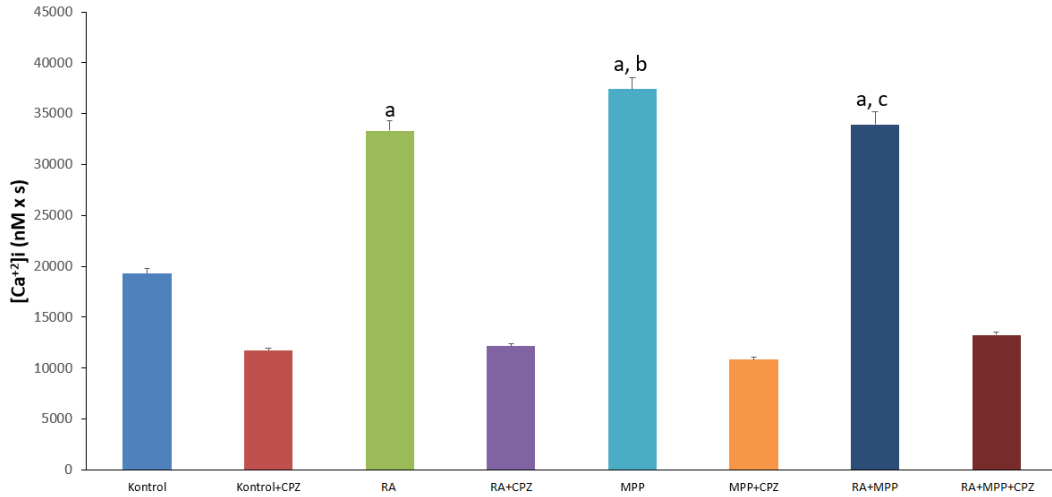
Ana gruplardan alınan TRPV1 katyon kanalına ait kalsiyum sinyali analiz sonuçları Grafik 4.40 ve 4.41'de gösterilmiştir.

TRPV1 katyon kanallarının stimülasyonu için agonist olarak 10 μ M kapsaisin kullanıldı (128). Antagonist uygulamalarında ise hücreler 100 μ M kapsazepin ile uyarımdan 30 dk önce inkübe edildi (129). İnkübasyon sonrasında santrifüj edilen hücrelerden süpernatantlar atılarak Ca^{+2} içeren yeni tampona alınıp iyice karıştırıldı. Ardından uyarımlar yapılarak kayıtlar alındı.



Grafik 4.40. Ana gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (CAP: kapsaisin, CPZ: kapsazepin).

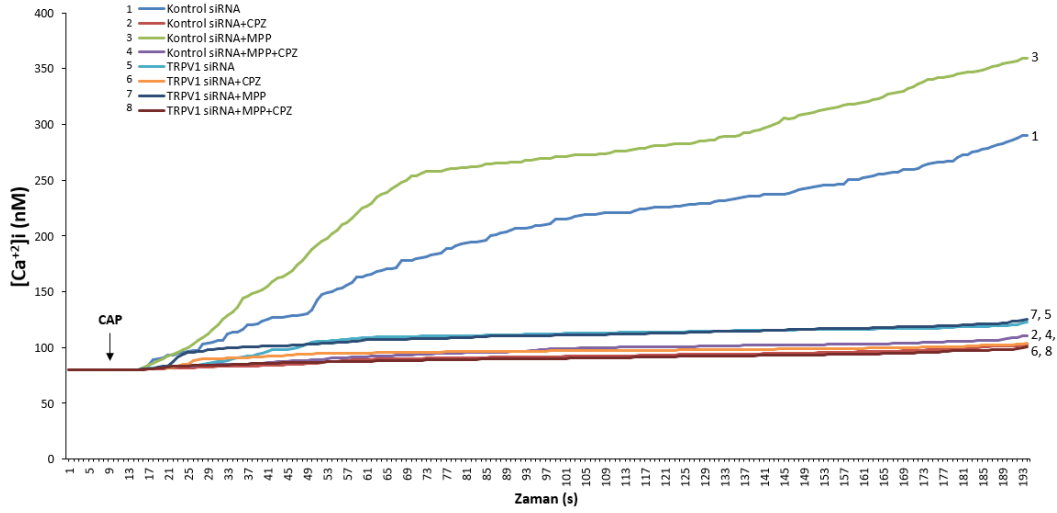
Elde edilen bulgulara göre Fark, MPP ve RA+MPP grubunda kalsiyum düzeyleri Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı belirlendi. RA+MPP grubunda ise MPP grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. TRPV1 katyon kanallarından alınan kalsiyum sinyali sonuçlarının kanal ekspresyonlarının artışıyla doğru orantılı olabileceği düşünüldü.



Grafik 4.41. Ana gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla, c: $P < 0,005$ MPP grubuna kıyasla. (CAP: kapsaisin, CPZ: kapsazepin).

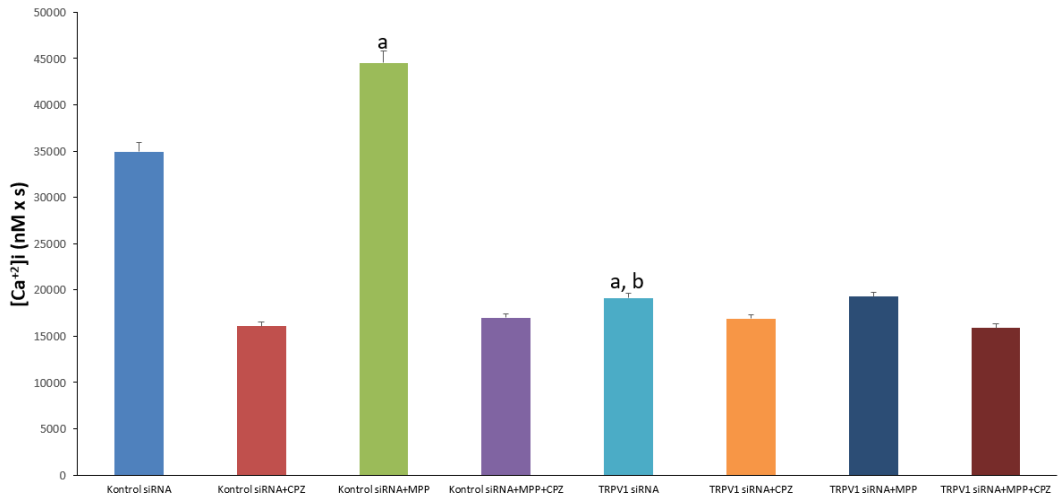
Kontrol siRNA ve TRPV1 siRNA uygulanan normal gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçları Grafik 4.42 ve 4.43'te sunulmuştur.

Buna göre ana gruplardan alınan sonuçlara benzer şekilde Kontrol siRNA+MPP grubundan alınan kalsiyum girişine dair sinyallerin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 4.42).



Grafik 4.42. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (CAP: kapsaisin, CPZ: kapsazepin).

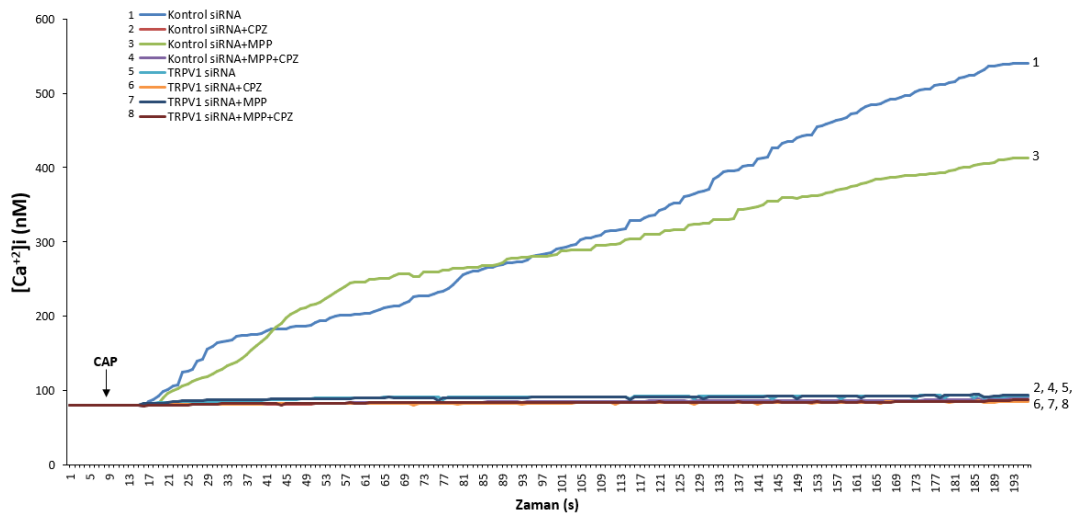
TRPV1 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatıcı (CPZ: kapsazepin) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir (Grafik 4.42). Sonuç olarak en yüksek kalsiyum girişi Kontrol siRNA+MPP grubunda kaydedilmiştir. İkinci sırada ise Kontrol siRNA grubu yer almıştır.



Grafik 4.43. siRNA uygulanan normal gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: P<0,001 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: P<0,001 Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla. (CAP: kapsaisin, CPZ: kapsazepin).

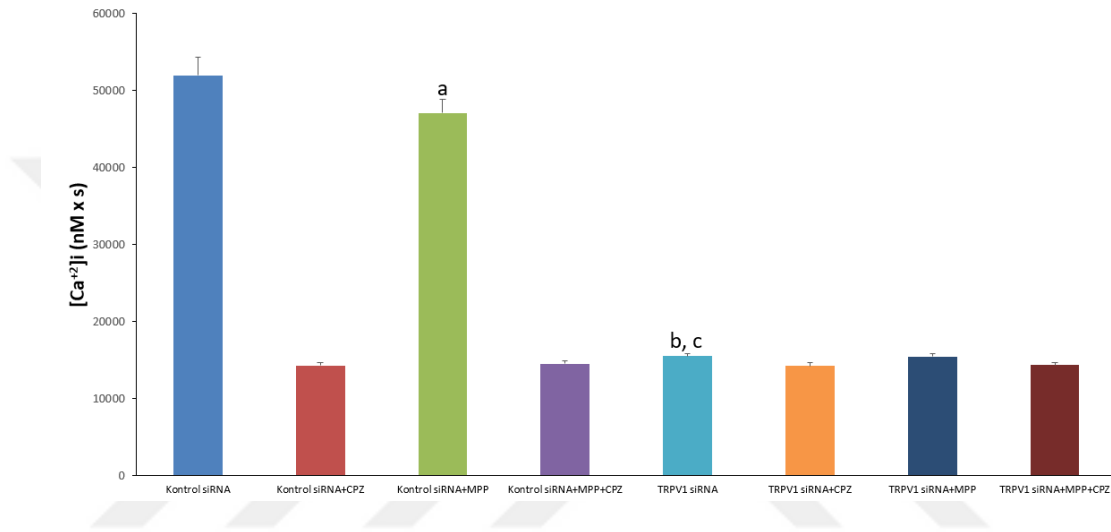
TRPV1 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatıcı (CPZ: kapsaisin) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir (Grafik 4.43).

Kontrol siRNA ve TRPV1 siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçları Grafik 4.44 ve 4.45'te sunulmuştur.



Grafik 4.44. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum sinyalinin zamana bağlı değişimi. (CAP: kapsaisin, CPZ: kapsazepin).

Buna göre ana gruplardan alınan sonuçlara benzer şekilde Kontrol siRNA uygulanıp farklılaştırılan gruptan alınan kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 4.44). En yüksek kalsiyum girişinin Kontrol siRNA grubunda olduğu görülmüştür. İkinci sırada ise Kontrol siRNA+MPP grubu yer almıştır. Bu sonuçlara göre MPP⁺ ile indüklenen Parkinson modelinde farklılaştırma uygulamasıyla TRPV1 aracılı kalsiyum girişinde değişimler olduğu dikkati çekmiştir.



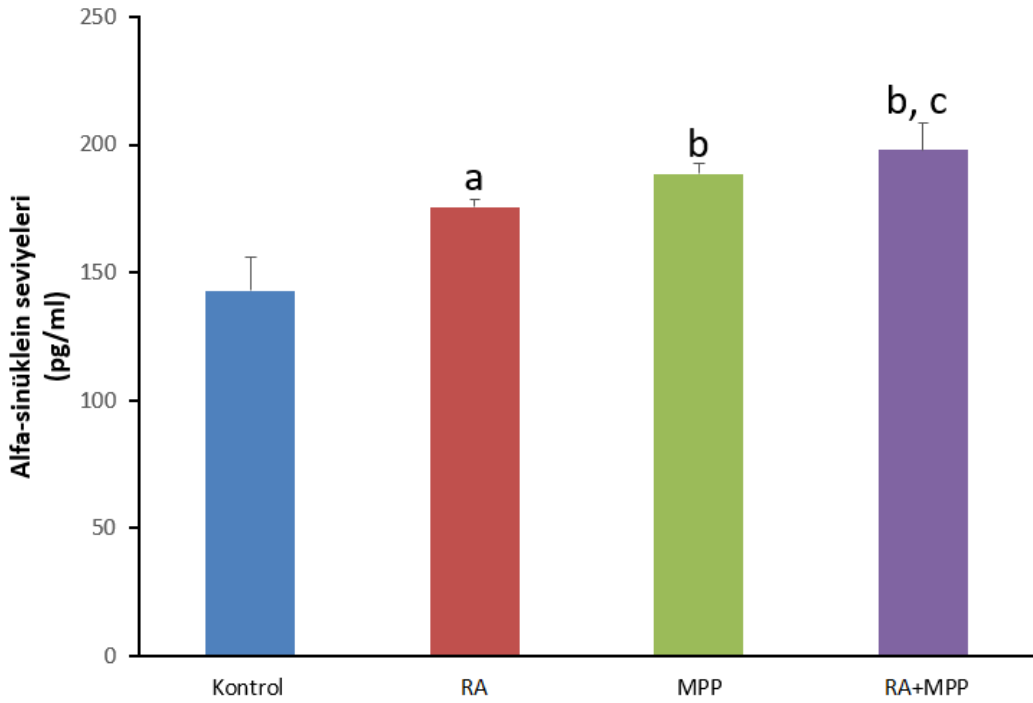
Grafik 4.45. siRNA uygulanan farklılaştırılmış gruplara ait TRPV1 katyon kanalı aracılı Fura-2 kalsiyum analizi bulguları. a: P<0,005 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: P<0,001 Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: P<0,001 Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla. (CAP: kapsaisin, CPZ: kapsazepin).

TRPV1 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise kapatıcı (CPZ: kapsazepin) gruplarına benzer bir etki görülerek kalsiyum girişine dair sinyallerin Kontrol siRNA grubuna kıyasla bazal seviyelere yakın olduğu dikkat çekmektedir (Grafik 4.45). Kalsiyum sinyali sonuçları birlikte düşünüldüğünde 3 kanalın da farklılaştırma ve MPP⁺ ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinden etkilendiği ancak sebep-sonuç ilişkisi bağlamında sadece TRPM7 ve TRPV1 katyon kanallarının patolojik koşulda davranış değişikliği gösterdiği düşünülmüştür.

4.10. Alfa-sinüklein Seviyeleri

ELISA analizi öncesi hazırlık işlemleri için inkübasyonları tamamlandıktan sonra flasklardan kaldırılan hücreler taze büyüme medyumuna alınarak -30 °C derin

dondurucuda analiz gününe kadar saklanmıştır. Analiz gününde 5 dk süreyle 100 g'de santrifüj edilen hücrelerin süpernatantları uzaklaştırılıp 1x PBS ile sulandırılmıştır. Ultrasonik parçalayıcı ile 30 sn süreyle parçalanan hücreler kit içeriğine uygun şekilde çalışılmıştır. Analiz sonucunda Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda alfa-sinüklein seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Ancak RA+MPP uygulanan grupta ise alfa-sinüklein seviyelerinin en yüksek düzeyde olduğu dikkati çekmiştir. MPP grubunda ise RA+MPP grubuna göre anlamlı ölçüde azalma olmasına rağmen RA grubuna kıyasla artış gözlenmiştir. Ana gruplara ait alfa-sinüklein proteini ELISA bulguları Grafik 4.46'da sunulmuştur.

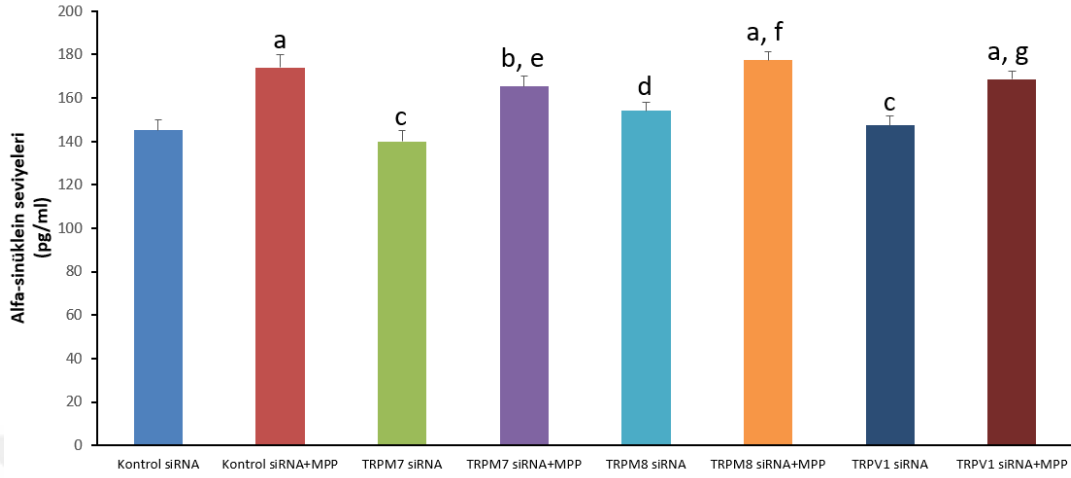


Grafik 4.46. Ana gruplara ait alfa-sinüklein seviyelerinin ELISA tayini bulguları. a: $P < 0,005$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ RA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Normal gruplara ait alfa-sinüklein ELISA tayini bulguları Grafik 4.47'de sunulmuştur.

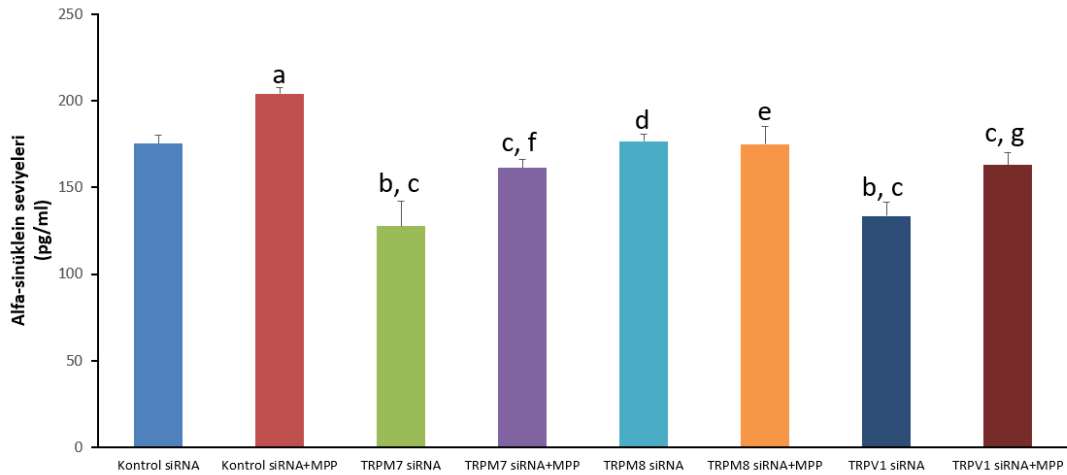
Normal gruplarda; Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde alfa-sinüklein seviyelerinin yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde arttığı görüldü. Ancak TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan ve üzerine MPP⁺ uygulanan hücrelerde Kontrol

siRNA+MPP grubuna kıyasla alfa-sinüklein seviyeleri bakımından anlamlı düşüşler olduğu gözlemlendi (Grafik 4.47).



Grafik 4.47. siRNA transfekte normal gruplara ait alfa-sinüklein seviyelerinin ELISA tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P < 0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, f: $P < 0,001$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, g: $P < 0,005$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Farklılaştırılmış gruplara ait alfa-sinüklein ELISA tayini bulguları Grafik 4.48'de sunulmuştur.



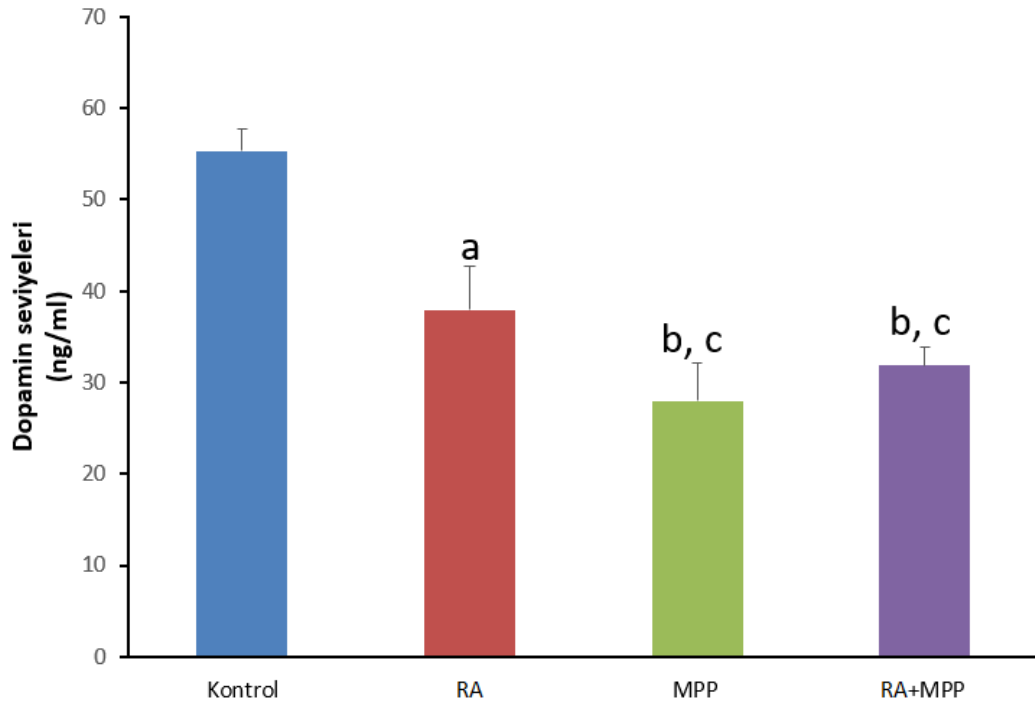
Grafik 4.48. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait alfa-sinüklein seviyelerinin ELISA tayini bulguları. a: $P < 0,01$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P < 0,05$ Kontrol

siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P<0,01$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, f: $P<0,005$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, g: $P<0,01$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Farklılaştırılmış gruplarda; normal gruplardakine benzer şekilde Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla alfa-sinüklein seviyelerinde önemli ölçüde artış görüldü. Yine TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de nispeten alfa-sinüklein seviyeleri bakımından anlamlı düşüşler olduğu gözlemlendi. Kanalların siRNA transfeksiyonu yapıp üzerine MPP⁺ inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla bu seviyelerin Kontrol siRNA seviyelerine yaklaştığı görüldü (Grafik 4.48).

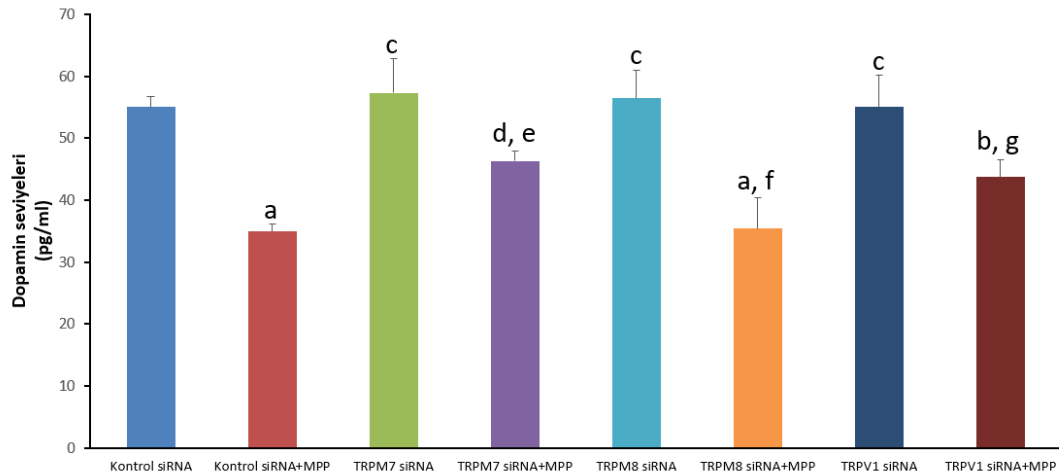
4.11. Dopamin Seviyeleri

Gruplardan alınan hücreler ELISA analizi öncesindeki hazırlık işlemlerinden geçirilerek analiz gününde kit içeriğine uygun şekilde çalışılmıştır. Analiz sonucunda Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda dopamin seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak RA grubuna göre MPP ve RA+MPP gruplarında dopamin seviyelerinin daha düşük düzeyde olduğu dikkati çekmiştir. MPP grubunda ise RA+MPP grubuna göre dopamin seviyelerinin anlamlı ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Ana gruplara ait dopamin nörotransmitteri salınımına dair ELISA bulguları Grafik 4.49'da sunulmuştur.



Grafik 4.49. Ana gruplara ait dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları. a: $P < 0,005$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, c: $P < 0,05$ RA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Normal gruplara ait dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları Grafik 4.50'de sunulmuştur.

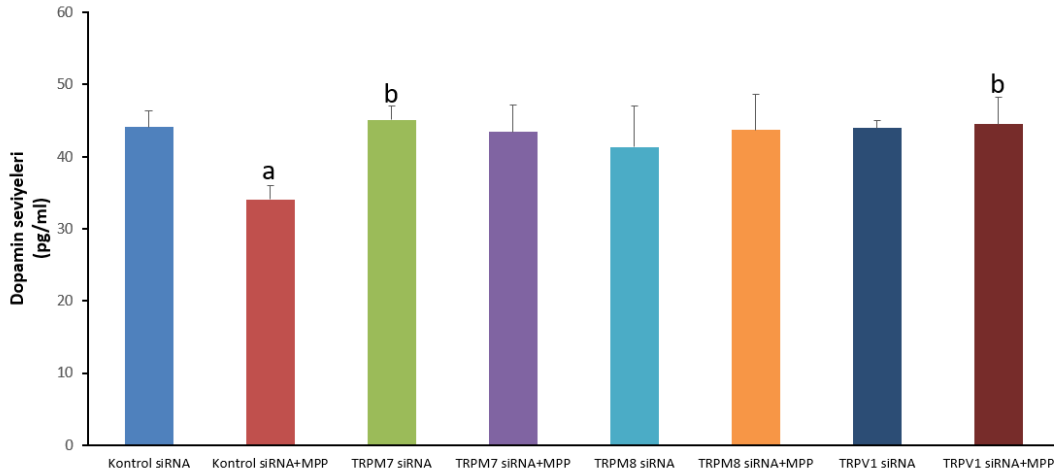


Grafik 4.50. siRNA transfekte normal gruplara ait dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P < 0,05$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,005$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, f: $P < 0,001$ TRPM8 siRNA

grubuna kıyasla, g: $P < 0,05$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Normal gruplarda; Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde dopamin seviyelerinin yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde azaldığı görüldü. Ancak TRPM7 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan ve üzerine MPP⁺ uygulanan hücrelerde Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla dopamin seviyeleri bakımından anlamlı artışlar olduğu gözlemlendi (Grafik 4.50).

Farklılaştırılmış gruplara ait Dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları Grafik 4.51'de sunulmuştur.

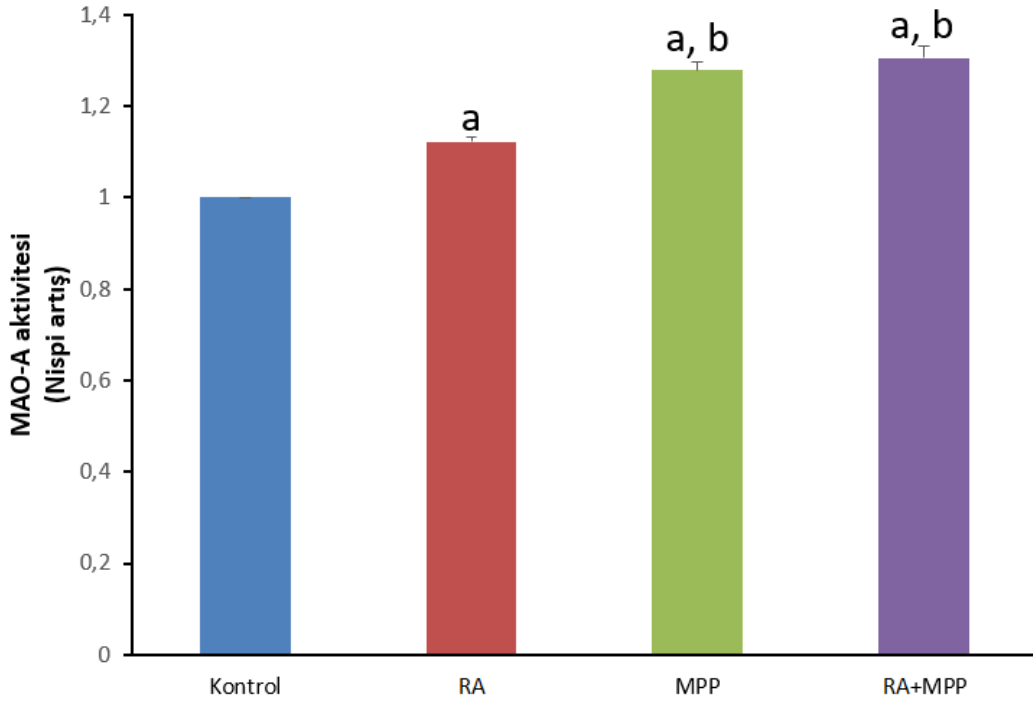


Grafik 4.51. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara dopamin seviyelerinin ELISA tayini bulguları. a: $P < 0,05$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,05$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Farklılaştırılmış gruplarda; normal gruplardakine benzer şekilde Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla dopamin seviyelerinde önemli ölçüde düşüş görüldü. Yine TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de nispeten dopamin seviyeleri bakımından anlamlı artışlar olduğu gözlemlendi. Kanalların siRNA transfeksiyonu yapıp üzerine MPP⁺ inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla bu seviyelerin Kontrol siRNA seviyelerine yaklaştığı görüldü (Grafik 4.51).

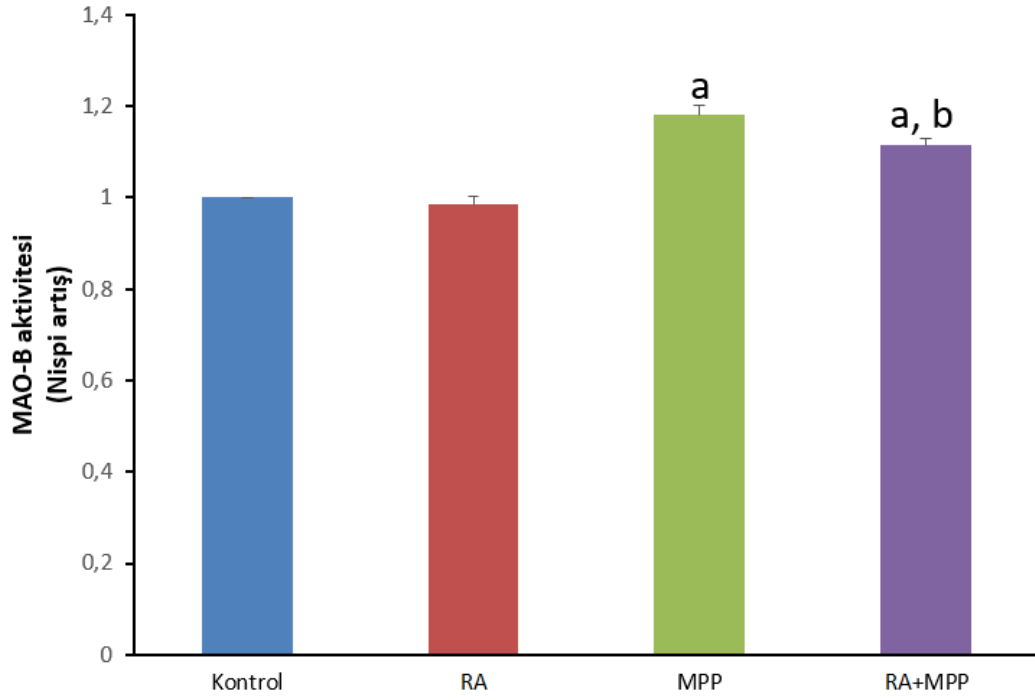
4.12. MAO Enzim Aktivite Bulguları

Gruplardan alınan hücreler kolorimetrik metotla MAO-A ve MAO-B aktivitesi analizi için tıpkı ELISA deneyleri öncesindeki hazırlık işlemlerinden geçirilerek analiz gününde kit içeriğine uygun şekilde çalışılmıştır. Analiz sonucunda Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda MAO-A aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Ancak RA grubuna göre MPP ve RA+MPP gruplarında dopamin seviyelerinin daha yüksek düzeyde olduğu dikkati çekmiştir. MPP grubunda ise RA+MPP grubuna göre dopamin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı saptanmıştır. Ana gruplara ait MAO-A aktivitesi bulguları Grafik 4.52’de sunulmuştur.



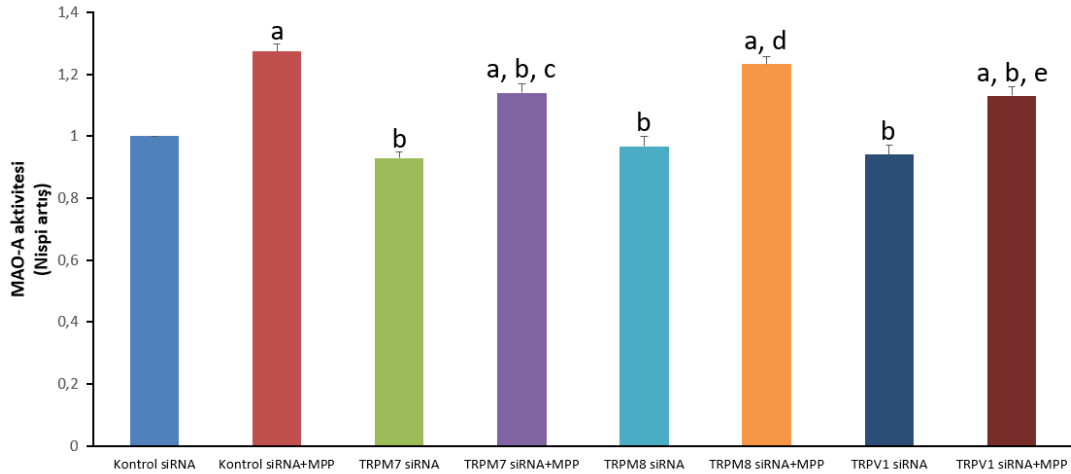
Grafik 4.52. Ana gruplara ait MAO-A aktivitesi tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $P < 0,001$ RA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Analiz sonucunda Kontrol ve RA grubuna kıyasla MPP⁺ uygulaması yapılan diğer iki grupta da MAO-B aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Ancak RA+MPP grubunda MPP grubuna göre MAO-B aktivitesinin biraz daha düşük düzeyde olduğu dikkati çekmiştir. Ana gruplara ait MAO-B aktivitesi bulguları Grafik 4.53’te sunulmuştur.



Grafik 4.53. Ana gruplara ait MAO-B aktivitesi tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol ve RA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ MPP grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Normal gruplara ait MAO-A ve MAO-B aktivitelerinin tayini bulguları Grafik 4.54 ve 4.55'te sunulmuştur.

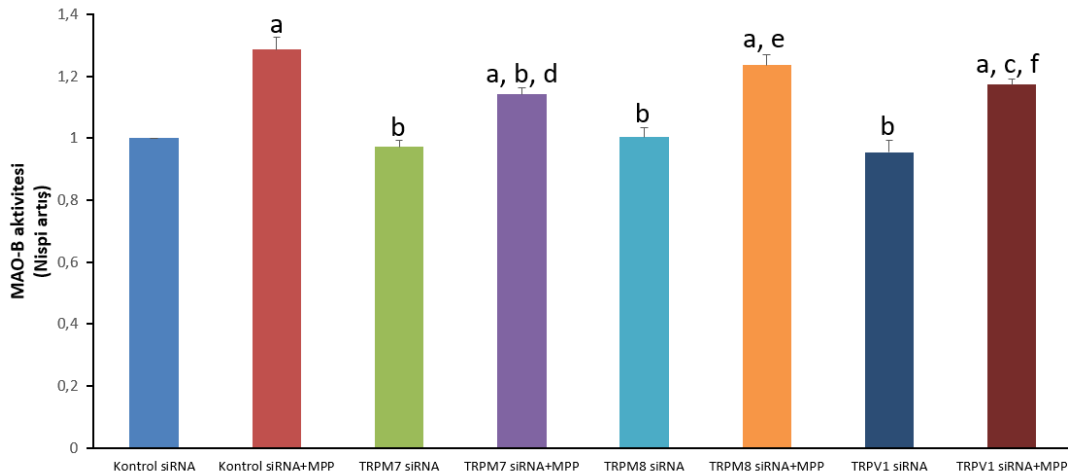


Grafik 4.54. siRNA transfekte normal gruplara ait MAO-A aktivitesi tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P < 0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,001$ TRPM7

siRNA grubuna kıyasla, f: $P<0,001$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, g: $P<0,005$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

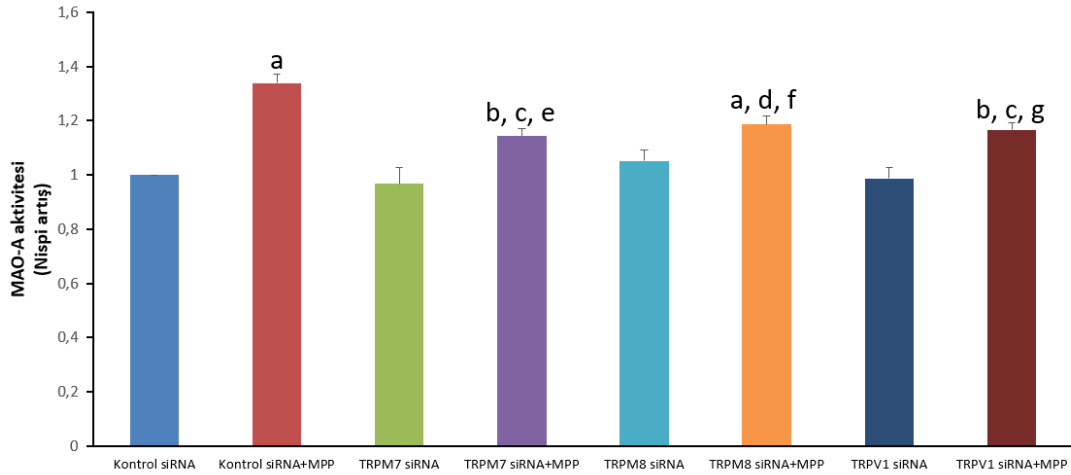
Normal gruplarda; Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde MAO-A aktivitesinin yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla önemli ölçüde arttığı görüldü. Ancak TRPM7 ve TRPV1 siRNA transfeksiyonu yapılan ve üzerine MPP⁺ uygulanan hücrelerde Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla MAO-A aktivitesi bakımından anlamlı düşüşler olduğu gözlemlendi (Grafik 4.54).

MAO-B seviyelerine bakıldığında ise Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla MPP⁺ uygulaması yapılan gruplarda artış gözlenirken kanalların siRNA uygulamalarında özellikle TRPM7 ve TRPV1 için anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Yalnızca kanal siRNA'sı uygulanan gruplarda ise Kontrol siRNA grubuna kıyasla anlamlı bir değişim olmadığı dikkat çekmiştir (Grafik 4.55).



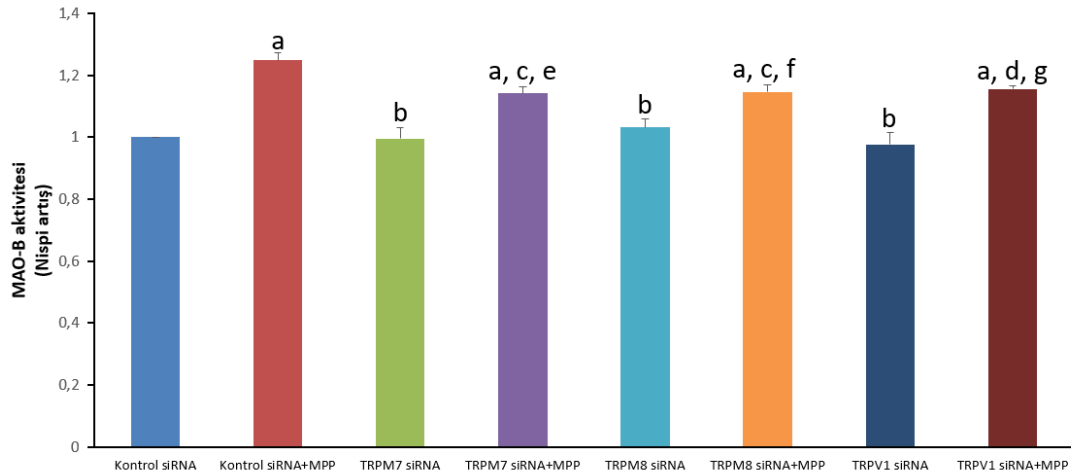
Grafik 4.55. siRNA transfekte normal gruplara ait MAO-B aktivitesi tayini bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P<0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P<0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, e: $P<0,001$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, f: $P<0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

Farklılaştırılmış gruplara ait MAO-A ve MAO-B aktivitelerinin tayini bulguları Grafik 4.56 ve 4.57'de sunulmuştur.



Grafik 4.56. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait MAO-A aktivitesi tayini bulguları. a: $P < 0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P < 0,005$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, c: $P < 0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P < 0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P < 0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, f: $P < 0,01$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, g: $P < 0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; $n=3$).

Farklılaştırılmış gruplarda; normal gruplardakine benzer şekilde Kontrol siRNA'ları transfekte edilip üzerine MPP⁺ uygulaması yapılan hücrelerde yalnızca Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla MAO-A aktivitelerinde önemli ölçüde artış görüldü. Yine kanalların siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde de nispeten MAO-A aktivitesi bakımından Kontrol siRNA grubuna kıyasla farklılık gözlenmedi. Kanalların siRNA transfeksiyonu yapıp üzerine MPP⁺ inkübasyonu yapılan gruplarda ise Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla bu seviyelerin Kontrol siRNA seviyelerine yaklaştığı görüldü (Grafik 4.56).



Grafik 4.57. siRNA transfekte edilip farklılaştırılmış gruplara ait MAO-B aktivitesi tayini bulguları. a: $P<0,001$ Kontrol siRNA grubuna kıyasla, b: $P<0,001$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, c: $P<0,005$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, d: $P<0,01$ Kontrol siRNA+MPP grubuna kıyasla, e: $P<0,001$ TRPM7 siRNA grubuna kıyasla, f: $P<0,005$ TRPM8 siRNA grubuna kıyasla, g: $P<0,001$ TRPV1 siRNA grubuna kıyasla. (Ortalama $\pm$ SD; n=3).

MAO-B enzim aktivitesine bakıldığında ise Kontrol siRNA uygulanan gruba kıyasla MPP⁺ uygulaması yapılan gruplarda artış gözlenirken kanalların siRNA uygulamalarında üç kanal için de anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Yalnızca kanal siRNA'sı uygulanan gruplarda ise Kontrol siRNA grubuna kıyasla anlamlı bir değişme olmadığı dikkat çekmiştir (Grafik 4.57).



5. TARTIŞMA

Nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanmayla birlikte nöronlarda ortaya çıkan dejenerasyon süreçleriyle karakterize olmaları sebebiyle diğer nörolojik hastalıklardan ayrılmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların ortak yönü anormal protein katlanmaları ve sitozolik veya ekstraselüler kompartımanlarda agregasyonudur.

SH-SY5Y hücreleri Parkinson ve Alzheimer hastalıklarını *in vitro* ortamda modellemede sıklıkla kullanılmaktadır. Parkinson modeli indüklemek için nörotoksinler kullanılırken en yaygın olanı MPP⁺'dir. Nörotoksinler mitokondriyal elektron transport zincirinin çeşitli aşamalarını inhibe etmekte ve nöronal hasara neden olmaktadır. Parkinson hastalığı için kullanılan nörotoksinler *in vivo* çalışmalarda denendiği gibi *in vitro* çalışmalarda da SH-SY5Y hücrelerinde kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri kalsiyum sinyali ile ilişkili iyon kanallarından; N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, voltaja duyarlı kalsiyum kanalları, TRP kanal ailesi üyeleri ve hücre içi organellerde görev yapan kanalları eksprese etmektedir (130). Bu nedenle hücrel Parkinson hastalığı *in vitro* modelinde kalsiyum sinyali ile ilişkili kanallar çeşitli araştırmalara konu edilmiştir. Geçmiş kaynaklar tarandığında SH-SY5Y hücrelerinde deneysel Parkinson hastalığı modelleri ile TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanallarının ilişkisini araştıran az sayıda çalışma olması, mevcut çalışmaların daha çok farmakolojik agonist ve antagonist uygulamasıyla dolaylı yollardan kanallarla ilişkilendirildiği, gen susturma (knock-out) veya siRNA ile protein ekspresyonlarının baskılandığı çalışmaların azlığı, Patch-Clamp veya kalsiyum sinyali gibi kanal işlevini araştıran analizlerin çalışmalarda olmayışı diğer kalsiyum geçirgen kanallara benzer şekilde anılan kanalların rollerinin olup olmadığının araştırılmasını gerekli kılmıştır. Geçmiş çalışmalarda kalsiyum kanalları aracılı kalsiyum girişinin SH-SY5Y hücrelerinde etkisi bazı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır.

NMDA reseptör antagonisti MK-801 (100 μ M) inkübasyonunun SH-SY5Y hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir ancak benzer bir çalışmada ise 50 μ M MK-801 ile inkübe edilen hücrelerin laktat dehidrojenaz enzimi salınımında kontrol grubuna kıyasla anlamlılık bulunmadığı bildirilmiştir. Bundan dolayı MK-801 inkübasyonu için hasar oluşturan ve oluşturmayan dozlar 50 μ M ve 100 μ M MPP⁺ ile kombine olarak çalışılmıştır (131).

SH-SY5Y hücrelerinde TRPC1 kanallarının MPP⁺ ile indüklenen Parkinson modelinde koruyucu rolü birkaç çalışmada vurgulanmaktadır. Bollimuntha ve ark. (2005) farklılaştırma uygulamaksızın yaptıkları çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde doğal olarak ifadelenen TRP kanallarının varlığını PCR çalışmasıyla göstermişler ve bunlardan TRPC1 kanallarının MPP⁺ ile başlatılan nörotoksisitede inkübasyon süresine bağlı olarak ekspresyonunun azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar TRPC1 kanal ekspresyonunun MPP⁺ nörotoksisitesinden olumsuz yönde etkilendiğinden dolayı hücelere TRPC1 kanal geni içeren plazmid transfeksiyonu yaparak hücre canlılığını değişik parametrelerle ölçmüşlerdir. Sonuçta TRPC1 ekspresyonu fazlalaştırılan hücrelerde hücresel canlılığın arttığını ve TRPC1 kanallarının apoptoza aracılık eden yolları baskılamakta olduğunu göstermişlerdir (132). Araştırmacılar hücre yüzeyinde patolojik durumda TRPC1 ekspresyonunun azalması ve TRPC1 kanallarının normal koşullarda daha fazla ekspresyona sahip olmasının normal fizyolojiyi yansıttığı ve hücresel metabolik süreçlerin sürdürülmesi için gerekli olduğunu vurgulamışlardır.

Arshad ve ark. (2013) tarafından yılında yapılan bir başka çalışmada ise yine farklılaştırma yapılmadan SH-SY5Y hücrelerine aralarında MPP⁺'nin de olduğu üç farklı nörotoksin uygulanmış ve benzer sonuçlara ulaşılarak TRPC1 ekspresyonunun MPP⁺ uygulamasıyla zamana bağlı olarak arttığı, ayrıca membrana yerleşik kanalların sitoplazmaya translokasyona uğradığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, apoptotik faktörlerden aktif kaspaz 3 seviyelerinin de ekspresyon bakımından arttığını ve mitokondriyal membran potansiyelinin MPP⁺ uygulamasıyla azaldığını vurgulamışlardır (1).

Bell ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada ise farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde store-operated Ca²⁺ entry (SOCE, depoya duyarlı kalsiyum girişi) ile ilişkili olduğu bilinen Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1), Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein 1 (Orai1) ve TRPC1 kanalları kanalları üzerinde retinoik asitle farklılaştırma uygulamasının TRPC1 kanal ekspresyonu düzeylerini artırdığını bildirmişlerdir (133).

Yuyang ve ark. (2018) araştırmalarında TRPM2 katyon kanallarını SH-SY5Y hücrelerine transfekte ederek TRPM2 kanallarının aşırı ekspresyonunun MPP⁺

uygulamasıyla başlatılan hücre ölümünü artırdığını göstermişlerdir. Tersine TRPM2 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise MPP⁺ etkisiyle artan kalsiyum girişi ve apoptozun baskılandığı vurgulanmıştır. Aynı zamanda N-asetil sistein ve resveratrol gibi antioksidan uygulamalarının TRPM2 aracılı apoptozu azalttığı da belirtilmiştir (2).

Yıldızhan ve Nazıroğlu (2020) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise glial hücrelerde MPP⁺ nörotoksisitesine karşı TRPM2 kanallarının susturulmasının hücreleri TRPM2 aracılı kalsiyum girişi ve oksidatif stres temelli apoptozdan koruduğu bildirilmiştir (134).

SH-SY5Y hücrelerinin dopamin taşıyıcı (DAT) proteini eksprese ettikleri (135) ve MPP⁺ gibi nörotoksinlerin DAT ile SH-SY5Y hücrelerine alındığı bilinmektedir (136). Çalışmalarda farklılaştırma prosedürü olmadan kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin, dopaminerjik aktivite eksikliği, nörotoksinlere ve nöroprotektif maddelere olan duyarlılıktaki zayıflığı, hızlı bölünme fazı nedeniyle farklılaştırılmış hücrelerine kıyasla Parkinson hastalığı modellerinde daha verimsiz olacağı görüşü de öne sürülmüştür (45).

Xicoy ve ark. (2017) tarafından yayınlanan sistematik bir derlemeye göre 962 çalışma incelenmiş ve SH-SY5Y hücreleri Parkinson hastalığının *in vitro* koşullarda modellenmesi için en çok kullanılan hücre hattı (incelenen çalışmaların yaklaşık %68'i) olmasına rağmen araştırmacıların modelleme yaparken hücreleri çalışmada kullanım biçimlerinde farklılık olduğuna dikkat çekilmiştir. Buna göre MPP⁺ ile Parkinson hastalığı indüklemek en çok başvurulan nörotoksin metodu olarak değerlendirilmişken çalışmalarda sıklıkla SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik karakterinden söz edilmediği gibi farklılaştırma yapma ve nöronal karakterlerin daha fazla dışı vurumu da az sayıda çalışmada tercih edildiği bildirilmiştir. SH-SY5Y hücre hattına alternatif olarak değerlendirilebilecek hücre hatları ile birlikte Parkinson hastalığının *in vitro* modeli için rat ya da fare primer nöron kültürü ve mesensefalik kültürlerin seçimi ise incelenen çalışmaların yaklaşık %20'lik bir kısmı olduğuna dikkat çekilmiştir (27).

Retinoik asitle nöronal farklılaştırma uygulamasının SH-SY5Y hücre proliferasyonunu yavaşlattığı ancak nörit uzamasını tetiklediği (137), hücrelerin daha fazla nöronal morfoloji gösterdiği ve nöronal markörlerin ekspresyonunda artışa neden

olduğu (135,136), hücrelerin nörotoksik kimyasallara karşı duyarlılaştığı (139) ve kolinerjik aktivitede artış gösterdiği (140) önceki çalışmalarda bildirilmiştir.

Parkinson hastalığının *in vivo* ve *in vitro* modellerinde ise TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanalları ile ilişkili olabilecek çalışmanın güncel literatür tarandığında oldukça az sayıda araştırma olduğu dikkati çekmektedir.

Sun ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada MPP⁺ ile başlatılan nörotoksisitenin substansiya nigra pars kompakta bölgesinde ve SH-SY5Y hücrelerinde magnezyum seviyelerini düşürdüğü, TRPM7 kanal ekspresyonun artırılması ve ekstraselüler magnezyum uygulamasıyla bu etkilerin düzeldiğini ve hücresel apoptotik faktörlerin azalıp hücre canlılığının arttığını vurgulamışlardır (141).

Aynı araştırmacıların yine 2020 yılında yayınladıkları bir başka çalışmada ise MPP⁺ uygulamasıyla SH-SY5Y hücrelerinde azalan hücresel canlılığının beta adrenerjik reseptör agonisti isoprotereneol uygulamasıyla geriye döndürüldüğü, değişen magnezyum dengesinin TRPM7 aktivasyonu ile yeniden kurulduğunu vurgulamışlardır. Ortaya çıkan etkilerin TRPM7 katyon kanalları aracılığıyla olduğunu bildiren araştırmacılar 2-APB ve TRPM7 siRNA uygulamasının nöronal apoptozu artırdığını göstermişlerdir (142).

Yang ve ark. (2016) PC-12 hücrelerinde yaptıkları çalışmada mikro RNA 22 (miR-22)'nin Parkinson hastalığı hücresel modelinde etkisini araştırmışlardır. Buna göre miR-22'nin TRPM7 katyon kanal ekspresyonunu hedef aldığını, 6-OHDA ile başlatılan Parkinson hastalığı modelinde bozulan hücre çoğalması ve hücre canlılığı parametrelerini artırdığını ROT üretimi ve kaspaz 3 enzim aktivite bulgularındaysa azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (143).

Sturgeon ve ark. (2016) Parkinson hastalarından ve normal kontrollerinden alınan kan, beyin-omurilik sıvısı ve beyin dokusu numunelerinden yapılan çalışmaları derleyerek Mg⁺² dengesinin patoloji ile bozulduğu ve bir magnezyum taşıyıcı protein olan SLC41A1'nin ve TRPM7 katyon kanallarının ilerleyen araştırmalara konu edilmesi gerektiği hipotezini ortaya atmışlardır (144).

Dati ve ark. (2017) yayınladıkları bir çalışmada 6-OHDA ile oluşturulan fare Parkinson modelinde TRPM7 katyon kanal antagonisti karvakrol'ün etkisinin araştırılması amacıyla fare striatumuna stereotaksi yöntemiyle tek taraflı enjeksiyon

yaparak Parkinson hastalığı modeli indüklemişlerdir. Hayvanlara enjeksiyondan 30 dk öncesinde intraperitoneal karvakrol uygulanarak Parkinson modeli üzerindeki olası etkileri davranış testleri ve moleküler biyolojik yöntemlerle çalışılmıştır. Parkinson indüklenen farelerde, TRPM7 ve kaspaz 3 ekspresyonunun arttığı, ancak tirozin hidroksilaz seviyelerinin azaldığı gözlenirken karvakrol uygulamasının ardından hastalık indüklenen farelerde ise bu parametrelerin hastalık grubuna kıyasla düzelerek kontrol seviyelerine yaklaştığı bildirilmiştir (145).

Çalışmamızın ana gruplarından elde edilen sonuçlara göre TRPM7 kanal ekspresyonu SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmayla ve ve MPP⁺ inkübasyonu ile artmaktadır. Ancak farklılaştırılmayan hücrelerde TRPM7 katyon kanalları aracılı kalsiyum girişinde kontrole kıyasla ciddi azalmalar olduğunu da gözlemledik. TRPM7 ekspresyonu MPP⁺ uygulamasıyla artarken muhtemelen apoptotik süreçlerin baskınlığı veya kanalların işlevsizliği ile farklılaştırma uygulanmayan gruplarda kalsiyum sinyalinde MPP⁺ uygulaması ile önemli bir düşüş tespit edilmiştir. Ancak farklılaştırma uygulamasının üzerine MPP⁺ inkübasyonu yapıldığıdaysa TRPM7 aracılı kalsiyum girişinde ciddi artışlar olduğu gösterildi (Grafik 4.29). Bu dual etki TRPM7 çalışmalarında SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılıp çalışılması gerektiği sonucuna ulaşmamıza neden olmuştur. Farklılaştırma yapılmadan çalışıldığında MPP⁺ nörotoksitesinin TRPM7 ekspresyon artışına rağmen kalsiyum sinyali izlenememesi kanal davranışının farklılaştırma uygulamasıyla değişebileceğini düşündürmüştür. TRPM7 siRNA'sı ile MPP⁺ uygulamasının birlikte yapıldığı gruplarda ise normal ve nöronal farklılaştırma yapılmış hücrelerde benzer sonuçlar alınmıştır. Buna göre TRPM7 siRNA'sı ile artan kanal ekspresyonunun baskılanışı özellikle farklılaştırma yapılmış gruplarda apoptotik faktörlerin, ROT üretimi, mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve 9, MAO-A ve B, alfa-sinüklein düzeylerinde azalışa neden olurken hücrenin canlılığı artırıcı etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bu bakımdan çalışmamızın TRPM7 katyon kanalları ile ilgili bölümü Dati ve ark. (2017) çalışmasına benzer sonuçlar ortaya koyduğu söylenebilir (145).

Araştırmalarımıza göre literatürde TRPM8 katyon kanallarının Parkinson hastalığı ile ilişkilendirildiği somut bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Williams ve ark. (2020) yayınladıkları bir çalışmada 898 Parkinson hastasından ağırlı hastalık geçiren ve geçirmeyen (420 kişi) bireylerden aldıkları numunelerde genom boyutunda

bir değerlendirme yaptıklarında 2 polimorfizmin ağrıyla ilişkili olabileceğini tespit etmişler. Bu polimorfizmlerin TRPM8 katyon kanal genini kodlayan genom bölgesinde olduğunun ve TRPM8 lokusuyla ilişkilendirilen genom boyutunda bir başka çalışma olmadığının farkına varmışlar. Bundan dolayı TRPM8 katyon kanallarının Parkinson hastalarında bir risk faktörü olabileceğini vurgulamışlardır (146).

Çalışmamızın ana gruplarından elde edilen sonuçlara göre TRPM8 kanal ekspresyonu SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmayla ve MPP⁺ inkübasyonu ile artmıştır. Ancak TRPM8 katyon kanalları aracılı kalsiyum girişinde ekspresyon düzeylerine uyumlu sonuçlara rastlanmamıştır (Grafik 4.35). Aksine farklılaştırma uygulamasından sonra TRPM8 kanalları aracılı kalsiyum girişinin baskılandığı görülmüştür. Bu durum TRPM8 kanallarının MPP⁺ nörotoksitesinden veya retinoik asitle farklılaştırma uygulamasından olumsuz etkilenerek işlevsiz bir hale geldiğini düşünmemize sebep olmuştur. TRPM8 siRNA'sı ile MPP⁺ uygulamasının birlikte yapıldığı gruplarda ise normal ve nöronal farklılaştırma yapılmış hücrelerde benzer sonuçlar alınmıştır. Ancak nedensellik bakımından TRPM8 kanallarının patolojik durum veya nöronal farklılaştırma uygulamasından sonra hücresel mekanizmalarda etken değil daha çok edilgen konum üstlendiğini düşünmemize sebep olmuştur. siRNA uygulamalarında ise TRPM8 siRNA'sı verilen normal veya farklılaştırılmış hücrelerdeki apoptotik parametrelerde artış ve hücre canlılığındaki azalış her şeye rağmen normal koşullarda hücresel hayati fonksiyonların idare edilmesinde TRPM8 kanallarına ihtiyaç duyulduğu fikrini uyandırmıştır.

Lam ve ark. (2007) yaptıkları bir araştırmada yine farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücrelerine insan TRPV1 geni içeren plazmid transfeksiyonuyla SH-SY5Y hücrelerinden nörotransmitter salınımını araştırmışlar ve TRPV1 aktivatörü kimyasallar verilince kalsiyum sinyali artışı ile birlikte nöradrenalin salınımında da anlık artış olduğunu göstermişlerdir (147).

TRPV1 katyon kanallarının hücresel Parkinson hastalığı modelinde araştırıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Ancak rat ve fare Parkinson modellerinde (6-OHDA, MPP⁺ veya alfa-sinüklein indükleme ile) TRPV1 katyon kanal

aktivasyonunun nörotoksisitenin azalmasından sorumlu olabileceğini bildiren kayıtlar mevcuttur.

Gorman ve ark. (2010) PC-12 hücrelerinde 6-OHDA ile başlatılan Parkinson hastalığı modelinde TRPV1 katyon kanal agonisti anandamidin rolünü araştırmışlar ve anandamid inkübasyonunun 6-OHDA'nın neden olduğu apoptozu azaltıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (148).

TRPV1 agonisti kapsaisinin koruyucu etkisinin rat Parkinson hastalığı modelinde araştırıldığı bir başka çalışmada ise, 6-OHDA'nın neden olduğu dopaminerjik nöron hasarını ve azalan tirozin hidroksilaz enzimi ekspresyonunun kapsaisin uygulanan hayvanlarda normale yaklaştığı bildirilmiştir (149).

Yine benzer bir araştırmada, fare MPTP Parkinson hastalığı modelinde TRPV1 katyon kanal agonisti anandamidin etkisi araştırılmış ve nigrostriatal nöronlar üzerinde MPTP'nin nörotoksik etkilerinin ve proinflamatuvar markörlerin sentezinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (150).

Bazı araştırmacılar hayvan modellerinde TRPV1 katyon kanallarının nöroprotektif etkilerinin doğrudan nöronlar üzerinden değil de mikroglia veya astrosit hücreleri gibi glial sistem hücrelerinde aktivasyonun azalması, ROT üretiminde ve oksidatif strese azalma veya nöroinflamasyonun baskılanması gibi dolaylı yollardan ortaya çıktığını vurgulamışlardır (151–153).

TRPV1 kanal aktivatörlerinin nöronal veya glial sistem üzerinden olumlu etkilerini bildiren çalışmaların yanı sıra, Parkinson hastalığı patolojisinin moleküler veya sistemik göstergelerinde olumlu etkilerin TRPV1 blokajı veya kanal inhibisyonu üzerinden olabileceğini bildiren yayınlar da mevcuttur (154–156). TRPV1 katyon kanalları diğer TRP kanallarına göre Parkinson hastalığı modellerinde daha çok çalışılmasına rağmen literatürdeki karşıt bulgular kapsamlı yeni araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir.

Çalışmamızın ana gruplarından elde edilen sonuçlara göre TRPV1 kanal ekspresyonu SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmayla ve MPP⁺ inkübasyonu ile artmaktadır. Ana gruplardan alınan kalsiyum sinyali analizi sonuçlarına göre ekspresyon artışına uyumlu bir şekilde TRPV1 katyon kanalları aracılı kalsiyum girişinde kontrole kıyasla anlamlı artışlar olduğunu gözlemledik (Grafik 4.41). Hem

normal hem de farklılaştırma yapılan gruplarda TRPV1 aracılı kalsiyum düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla önemli artışlar gözlenirken MPP⁺ uygulamasıyla bunun daha da fazlaştığını gözlemledik. TRPV1 kanallarının apoptotik süreçlere daha da katkı yaptığı ve nöronal ve patolojik değişimlerden diğer kanallara göre daha fazla etkilendiğini tespit ettik. TRPV1 siRNA'sı ile MPP⁺ uygulamasının birlikte yapıldığı gruplarda normal ve nöronal farklılaştırma yapılmış hücrelerde benzer sonuçlar alınmıştır. Buna göre TRPV1 siRNA'sı MPP⁺ uygulaması ile artan kanal ekspresyonunun baskılanışı özellikle farklılaştırma yapılmış gruplarda apoptotik faktörlerin, ROT üretimi, mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve 9, MAO-A ve B, alfa-sinüklein düzeylerinde düşüşe neden olurken hücresel canlılığı artırıcı etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bu bakımdan çalışmamızın TRPV1 katyon kanalları ile ilgili bölümü Razavinasab ve ark. (2013) çalışmasına benzer sonuçlar ortaya koyduğu söylenebilir (154).

Nöronal apoptoz mekanizmasını iyi açıklayan kalsiyum temelli hipoteze göre patolojik koşulda kalsiyum kanalları aracılı kalsiyum girişinin kaspaz aktivitesiyle apoptozu tetiklediği, hücresel ROT üretimi ve mitokondriyal membran depolarizasyonunda artışa sebep olduğu, dopamin seviyelerini düşürürken alfa-sinüklein düzeylerini artırdığı, MAO-A ve MAO-B aktivitelerinde artışa sebep olduğu önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (157–159).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre İnsan Protein Atlası (www.proteinatlas.com) verilerini doğrulayan şekilde TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanallarını eksprese ettiği gösterilmiştir. TRP kanal ekspresyonları retinoik asitle farklılaştırılan grupta (RA grubu) artmaktadır. Farklılaştırılmadan MPP⁺ inkübasyonu ile Parkinson modeli indüklenen grupta (MPP grubu) da benzer şekilde ekspresyon artışları tespit edilmiştir. RA+MPP grubundaysa ekspresyon seviyelerinin üç kanal için de yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir. Bu durumdan hem nörona farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde hem de Parkinson modeli indüklenen hücrelerde TRP kanal ekspresyonlarının arttığı sonucu çıkarılmıştır. Çalışmamızda farklılaştırma ve MPP⁺ uygulamalarının kanal ekspresyonlarının yanı sıra kalsiyum sinyalleri üzerine etkileri de gösterilmiştir.

Farklılaştırma uygulamalarıyla üç kanalın da ekspresyonu artarken MPP⁺ uygulanan gruplarda ekspresyonların daha da arttığı saptanmıştır. Buna bağlı olarak ana gruplarda TRPM7 ve TRPV1 kanallarında kalsiyum sinyali artışı gözlenirken TRPM8 kanallarında ekspresyon artışına rağmen kalsiyum sinyalinde değişim izlenmemiştir. Bu durum kalsiyum, ROT üretimi ve mitokondriyal oksidatif stres artışı ile TRPM7 ve TRPV1 kanallarının daha çok ilişkili olabileceğinden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Çalışmanın ikinci kısmında bu üç kanala ait siRNA uygulaması yapılmıştır. Transfeksiyon işlemleri Kontrol siRNA'ları kullanılarak optimize edilmiş ve dozlar belirlenmiştir. Kontrol siRNA uygulaması ile transfeksiyon işleminin de olası etkileri sinanmıştır. Literatüre benzer şekilde Kontrol ve kanal siRNA'ları 30 nM konsantrasyonda hücrelere uygulanarak transfeksiyonlar tamamlanmıştır (121,122).

TRP kanallarının siRNA uygulamaları az da olsa anlamlı ölçüde apoptozisi artırmakta ve hücre sel canlılığın azalışına katkı yapmaktadır. Literatürde benzer şekilde uygulanan siRNA temelli çalışmalara bakıldığında TRP katyon kanallarının siRNA'sı uygulanan hücrelerde de apoptozun arttığı görülmektedir (160–162). Ancak patolojik koşul indüklendiğinde (çalışmamızda MPP⁺ uygulaması) kanalların baskılanması durumu tersine çevirmekte ve kalsiyum girşinin azalmasıyla nispeten hücrenin apoptotik süreçlerini yavaşlatmakta olduğu kanaatine varılmıştır. Hücre sel ROT üretimi, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve kaspaz aktivitelerinin farklılaştırma uygulamasıyla artması ve TRP kanal siRNA'larının uygulanmasıyla bu parametrelerin baskılanışı TRP kanallarının hücre sel hayati fonksiyonların gerçekleştirilmesinde önemli roller üstlendiğı ancak patolojik koşullarda ise hücre sel apoptotik mekanizmaları hızlandırdığını desteklemektedir (163,164).

Retinoik asitle farklılaştırma uygulaması yapmadan SH-SY5Y hücrelerini Parkinson modeli oluşturmada kullanmak farklılaştırılan gruplara kıyasla net farklılıklar ortaya çıkardığı tam olarak söylenememekle birlikte çalışılacak kanal, protein, markör, analiz vs. hedef temelli araştırmalar yapılması planlandığında retinoik asitle farklılaştırma uygulamasının önemsenmesi gerekmektedir. Genel Bilgiler bölümünde verilen ve çalışmanın problem durumunu tespit eden araştırma sorularına cevap mahiyetinde yapılan analizler neticesinde aşağıdaki çıkarımlara ulaşılmıştır.

a) Çalışmanın konusunu oluşturan TRP kanalları farklılaştırılmayan hücrelerde de iyi düzeyde eksprese edilmektedir. Fakat nöronal karakter kazandırılan farklılaştırma işleminde ekspresyonu önemli ölçüde artmakta ve TRPM7 ve TRPV1 katyon kanallarının Ca^{+2} sinyali sonuçlarında görüleceği üzere Parkinson patolojisinde aktivasyon davranışı değişiklik göstermektedir.

b) Hedef kanallar farklılaştırma veya patolojik süreçleri indükleyen MPP+ uygulamasıyla ekspresyon bakımından artış göstermektedir. Bu ekspresyon artışı TRPM7 ve TRPV1 aracılı Ca^{+2} sinyalinde de artışa neden olmaktadır. Ancak siRNA uygulamalarıyla Ca^{+2} sinyalinde gözlenen nispi azalma hücreleri Parkinson patolojisi indüklediğimiz MPP+ nörotoksini etkisinden nispeten kurtarmaktadır.

c) Hedef TRP kanallarının nöronal hücrel apoptoziste rolünü açıklayan hipotezlerdekine benzer şekilde TRPM7 ve TRPV1 katyon kanalları MPP+ nörotoksini etkisiyle mitokondriyal depolarizasyon ve ROT üretimi aracılığıyla SH-SY5Y hücrelerinin apoptozisine TRPM8'e kıyasla daha fazla katkı yapmaktadır. Ancak TRPM7 ve TRPV1 siRNA uygulamasıyla bu kanalların baskılanması sonucu bu etkilerin nispeten azaltıldığı gözlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Parkinson hastalığı toplumda genellikle 60 yaş üstü kesimi etkileyen en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığı tedavisinde çeşitli yöntemler ve ilaçlar kullanılsa da nöronlarda başlayan dejenerasyon süreçlerini yavaşlatan kesin tedavi seçeneklerine hala ihtiyaç duyulmaktadır. TRP kanalları, nöronal apoptoz ile ilişkisi iyi araştırılmış Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır ancak Parkinson hastalığı patolojisinde bu kanalların rolünü araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle tez çalışmamızda nörodejeneratif hastalıklara *in vitro* hastalık modeli olarak sıklıkla kullanılan SH-SY5Y hücre hattında retinoik asit ve düşük konsantrasyonda serum içeren medyum ile indüklenen nöronal farklılaştırma işlemi ve MPP^{+} ile başlatılan Parkinson hastalığı modelinde günümüze kadar hakkında az sayıda çalışma bulunan TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanallarının rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Farklılaştırma ve Parkinson hastalığı hücresel modeli indüklemeye uygulamaları sonrasında hücrelerde, apoptoz, hücre canlılığı (MTT testi), hücre içi ROT üretimi, mitokondriyal membran depolarizasyonu, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitelerinin tayini yapılmıştır. Western Blot yöntemiyle hedeflenen TRP katyon kanallarının ekspresyon düzeyleri sorgulanırken, kalsiyum sinyali analiziyle hücre dışından hücre içine kanallar aracılı kalsiyum akışı da araştırılmıştır. Parkinson hastalığı patolojisinde rolü olan alfa-sinüklein seviyeleri, dopamin düzeyleri ve MAO-A ve MAO-B enzim aktiviteleri de ELISA ve spektrofotometrik tekniklerle araştırılmıştır. Çalışmamızda ayrıca, hücrelere siRNA transfeksiyonu yapılarak post-transkripsiyonel gen sessizleştirilmesi uygulamasıyla hedef kanalların ekspresyonları azaltılınca araştırılan parametrelerdeki değişikliklerin kaydedilmesi amaçlanmıştır.

Analizler sonucu ana gruplardan alınan verilere göre nöronal farklılaştırma işlemiyle üç kanalın da ekspresyon seviyelerinin arttığını, MPP^{+} uygulamasının ise bunu daha da artırdığını gözlemledik. MPP^{+} nörotoksitesinden etkilenen hücrelerde apoptotik parametrelerin değerlerinde yükselme olduğu gözlenirken hücre canlılığında belirgin azalmalar olduğunu kaydettik. Benzer şekilde, hücre içi kalsiyum artışıyla dopamin salınımında azalma gözlenirken, alfa-sinüklein seviyeleri ile MAO-A ve MAO-B enzim aktivitelerinde belirgin artışların olduğunu tespit ettik. Ancak kalsiyum

sinyali analizlerinden sonra TRPM7 ve TRPV1 katyon kanallarının patolojik durumdan TRPM8'e göre daha çok etkilendiği sonucuna ulaştık. Zira TRPM7 ve TRPV1 katyon kanalları patolojik koşullarda protein ekspresyonlarına paralel bir şekilde aktivasyon gösterirken TRPM8'de ise durum böyle değildi.

Yine de her üç kanalın da siRNA'larını ana gruplara ayrı ayrı olarak transfekte ettiğimizde protein ekspresyonlarında nispi azalmaya binaen aynı parametreler bakımından gruplar incelendiğinde TRPM7 ve TRPV1 katyon kanallarının sessizleştirilmesinin hücre canlılığında azalma ve apoptotik parametreler üzerinde artışa neden olduğunu gözlemledik. TRPM8 kanallarına ait bulgulardaysa daha değişken sonuçlara ulaştık. Üç kanala ait kalsiyum sinyali analizi sonuçları transfeksiyon işleminden sonra yeniden değerlendirildiğinde siRNA işleminin kanallar aracılı kalsiyum girişinde bariz azalmaya neden olduğu ve böylece ekspresyonu baskılanan kanalların aynı zamanda fonksiyonel olarak işlevsizleştiği de gösterilmiş oldu. Ana gruplarla birlikte değerlendirildiğinde patolojik koşullarda artan kanal ekspresyonu ve MPP⁺ etkisiyle tetiklenen kalsiyum girişi siRNA uygulamasıyla kanal ekspresyonlarının baskılanması da hücre sel canlılık süreçlerini olumlu yönde etkileyerek apoptotik olayları azalttığı sonucuna ulaştık. Bu durum da çalışılan kanalların hassas bir dengede bulunduğunu, normal koşullarda siRNA uygulamalarıyla apoptoz tetiklendiği halde MPP⁺ nörotoksitesi ile bu kanalların aşırı aktivasyonunun siRNA uygulamalarıyla baskılandığında hücreyi apoptotik süreçlerden nispeten koruduğu gözlemlendi. Bu da önceki çalışmaları destekleyen bir çıktı olarak görülmüştür. TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanallarının agonist ve antagonistlerini kullanarak yaptığımız çalışmada da bu kanalların benzer nitelikte sonuçlara ulaştığımızdan Parkinson hastalığında bu kanalların spesifik agonist ve antagonistleriyle beraber daha çok araştırılması hastalığın tedavisi ve yeni protektif ajanların geliştirilmesine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz (165).

Elde edilen veriler, başta Parkinson hastalığı olmak üzere, TRPM7, TRPM8 ve TRPV1 katyon kanalları kaynaklı/ilişkili diğer nörodejeneratif hastalıkların patogenezi anlamaya ve tedavisine yönelik *in vitro* çalışmalara ve hastalık modellerinde bu kanalların etkisini araştırmada potansiyel kaynak olarak geleceğe ışık tutacak niteliktedir. TRP kanallarının *in vivo* olarak baskılandığı genetik sessizleştirme (knock-out) yapılmış hayvan çalışmalarına da ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Arshad A, Chen X, Cong Z, Qing H, Deng Y. TRPC1 protects dopaminergic SH-SY5Y cells from MPP+, salsolinol, and N-methyl-(R)-salsolinol-induced cytotoxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(1):22–30.
2. Sun Y, Sukumaran P, Selvaraj S, Cilz NI, Schaar A, Lei S, et al. TRPM2 promotes neurotoxin MPP+/MPTP-induced cell death. *Mol Neurobiol*. 2018;55(1):409–20.
3. Öz A. Experimental cell culture models for investigating neurodegenerative diseases. *J Cell Neurosci Oxidative Stress*. 2019;11(2):835–51.
4. Tomruk C. The four horsemen of neurodegenerative diseases Alzheimer, Parkinson, Huntington and amyotrophic lateral skleroz; clinical definition and experimental models. *Istanbul Bilim Univ Florence Nightingale J Med*. 2018;4(1):37–43.
5. Matilla-Dueñas A, Corral-Juan M, Rodríguez-Palmero Seuma A, Vilas D, Ispuerto L, Morais S, et al. Rare neurodegenerative diseases: Clinical and genetic update. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2017. p. 443–96.
6. Top 10 Global Causes of Deaths [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
7. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: What is it and where are we? *J Clin Invest*. 2003;111(1):3–10.
8. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2018;592(5):692–702.
9. Hemmati-Dinarvand M, Saedi S, Valilo M, Kalantary-Charvadeh A, Alizadeh Sani M, Kargar R, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of

- oxidant-antioxidant systems. *Neurosci Lett*. 2019;709(134296):1–6.
10. Hemmati-Dinarvand M, Taher-Aghdam AA, Mota A, Zununi Vahed S, Samadi N. Dysregulation of serum NADPH oxidase1 and ferritin levels provides insights into diagnosis of Parkinson's disease. *Clin Biochem*. 2017;50(18):1087–92.
 11. Hettiarachchi NT, Parker A, Dallas ML, Pennington K, Hung CC, Pearson HA, et al. α -Synuclein modulation of Ca^{2+} signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem*. 2009;111(5):1192–201.
 12. Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(1):49–60.
 13. Williams AJ, Paulson HL. Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci*. 2008;31(10):521–8.
 14. Coskuner-Weber O, Uversky VN. Insights into the molecular mechanisms of alzheimer's and parkinson's diseases with molecular simulations: Understanding the roles of artificial and pathological missense mutations in intrinsically disordered proteins related to pathology. *Int J Mol Sci*. 2018;19(336):1–65.
 15. Hasegawa M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of alzheimer's disease and Tauopathies-Prion-Like seeded aggregation and phosphorylation. *Biomolecules*. 2016;6(24):1–12.
 16. Chong PA, Forman-Kay JD. A New Phase in ALS Research. *Structure*. 2016;24(9):1435–6.
 17. Hanspal MA, Dobson CM, Yerbury JJ, Kumita JR. The relevance of contact-independent cell-to-cell transfer of TDP-43 and SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(11):2762–71.

18. Labbadia J, Morimoto RI. Huntington's disease: Underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(8):378–85.
19. Dadakhujaev S, Noh HS, Jung EJ, Cha JY, Baek SM, Ha JH, et al. Autophagy protects the rotenone-induced cell death in α -synuclein overexpressing SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett.* 2010;472(1):47–52.
20. Smith WW, Margolis RL, Li X, Troncoso JC, Lee MK, Dawson VL, et al. α -synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *J Neurosci.* 2005;25(23):5544–52.
21. Bilgiç B. Bazal Ganglionlar: Anatomi, Fizyoloji ve İşlevleri. In: Emre M, editor. *Parkinson Hastalığı.* İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2010. p. 27–35.
22. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2017;124(8):901–5.
23. Antony PMA, Diederich NJ, Krüger R, Balling R. The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2013;280(23):5981–93.
24. Elibol B. Parkinson Hastalığı'nın Etyolojisi ve Patogenezi. In: Emre M, editor. *Parkinson Hastalığı.* İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2010. p. 81–92.
25. Yang YX, Wood NW, Latchman DS. Molecular basis of Parkinson's disease. *Neuroreport.* 2009;20(2):150–6.
26. Korecka JA, van Kesteren RE, Blaas E, Spitzer SO, Kamstra JH, Smit AB, et al. Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS One.* 2013;8(5):1–17.
27. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017;12(10):1–11.
28. Çakmur R. Parkinson Hastalığı'nın Farmakolojik Tedavisi: Kullanılan İlaçlar

ve Genel İlkeler. In: Emre M, editor. Parkinson Hastalığı. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2010. p. 275–93.

29. Xie W, Wan OW, Chung KKK. New insights into the role of mitochondrial dysfunction and protein aggregation in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2010;1802(11):935–41.
30. Ghiglieri V, Calabrese V, Calabresi P. Alpha-synuclein: From early synaptic dysfunction to neurodegeneration. *Front Neurol.* 2018;9(MAY).
31. Tofaris GK, Spillantini MG. Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Mov Disord.* 2005;20(SUPPL. 12).
32. Sato H, Kato T, Arawaka S. The role of Ser129 phosphorylation of α -synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: A review of in vivo models. *Rev Neurosci.* 2013;24(2):115–23.
33. Braak H, Bohl JR, Müller CM, Rüb U, de Vos RAI, Del Tredici K. Stanley Fahn lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord.* 2006;21(12):2042–51.
34. Cookson MR, van der Brug M. Cell systems and the toxic mechanism(s) of α -synuclein. *Exp Neurol.* 2009;209(1):5–11.
35. Saka E. Parkinson Hastalığı'nın Patolojisi. In: Emre M, editor. Parkinson Hastalığı. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2010. p. 93–100.
36. Chang KH, Chen CM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants.* 2020;9(7):1–32.
37. Zhang D, Zhang JJ, Liu GT. The novel squamosamide derivative (compound FLZ) attenuated 1-methyl, 4-phenyl-pyridinium ion (MPP⁺)-induced apoptosis

and alternations of related signal transduction in SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology*. 2007;52(2):423–9.

38. Mytilineou C, Han S -K, Cohen G. Toxic and Protective Effects of l-DOPA on Mesencephalic Cell Cultures. *J Neurochem*. 1993;61(4):1470–8.
39. Li H, Yang P, Knight W, Guo Y, Perlmutter JS, Benzinger TLS, et al. The interactions of dopamine and oxidative damage in the striatum of patients with neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 2020;152(2):235–51.
40. Nicolson GL. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: Treatment with natural supplements. *Integr Med*. 2014;13(4):35–43.
41. Esposito E, Di Matteo V, Di Giovanni G. Death in the substantia nigra: A motor tragedy. *Expert Rev Neurother*. 2007;7(6):677–97.
42. Salari S, Bagheri M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiol Res*. 2019;68(1):17–24.
43. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. 2003;39(6):889–909.
44. Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, Hotta K, Oka K. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP⁺ model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2015;1853(12):3182–91.
45. Xie HR, Hu L Sen, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(8):1086–92.
46. Hegarty S V., O'Leary E, Solger F, Stanicka J, Sullivan AM, O'Keeffe GW. A Small Molecule Activator of p300/CBP Histone Acetyltransferase Promotes Survival and Neurite Growth in a Cellular Model of Parkinson's Disease.

Neurotox Res. 2016;30(3):510–20.

47. Rajendra Kopalli S, Koppula S, Young Shin K, Noh SJ, Jin Q, Yeon Hwang B, et al. SF-6 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: An in vitro and in vivo investigation in experimental models of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(2):686–94.
48. Sever M, Turkyilmaz M, Sevinc C, Cakir A, Ocalan B, Cansev M, et al. Regenerative effects of peptide nanofibers in an experimental model of Parkinson's disease. *Acta Biomater.* 2016;46:79–90.
49. Solesio ME, Saez-atienzar S, Jordán J, Galindo MF. Characterization of mitophagy in the 6-hydroxydopamine Parkinson's disease model. *Toxicol Sci.* 2012;129(2):411–20.
50. Jing X, Shi H, Zhang C, Ren M, Han M, Wei X, et al. Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. *Neuroscience.* 2015;286:131–40.
51. Jing X, Wei X, Ren M, Wang L, Zhang X, Lou H. Neuroprotective Effects of Tanshinone I Against 6-OHDA-Induced Oxidative Stress in Cellular and Mouse Model of Parkinson's Disease Through Upregulating Nrf2. *Neurochem Res.* 2016;41(4):779–86.
52. La Cognata V, Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S, Federico C, Cavallaro S, et al. Differential expression of PARK2 splice isoforms in an in vitro model of dopaminergic-like neurons exposed to toxic insults mimicking Parkinson's disease. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):1062–73.
53. Mu X, He G, Cheng Y, Li X, Xu B, Du G. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92(4):642–8.

54. Duka T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A. α -Synuclein contributes to GSK-3 β -catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *FASEB J*. 2009;23(9):2820–30.
55. Lu M, Su C, Qiao C, Bian Y, Ding J, Hu G. Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(9):1–11.
56. Choi JS, Park C, Jeong JW. AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):147–51.
57. Gong P, Deng F, Zhang W, Ji J, Liu J, Sun Y, et al. Tectorigenin attenuates the MPP⁺-induced SH-SY5Y cell damage, indicating a potential beneficial role in Parkinson's disease by oxidative stress inhibition. *Exp Ther Med*. 2017;14(5):4431–7.
58. Lu JYD, Su P, Barber JEM, Nash JE, Le AD, Liu F, et al. The neuroprotective effect of nicotine in Parkinson's disease models is associated with inhibiting PARP-1 and caspase-3 cleavage. *PeerJ*. 2017;2017(10).
59. Ramalingam M, Kim SJ. Insulin on activation of autophagy with integrins and syndecans against MPP⁺-induced α -synuclein neurotoxicity. *Neurosci Lett*. 2016;633:94–100.
60. Yan W, Chen ZY, Chen JQ, Chen HM. LncRNA NEAT1 promotes autophagy in MPTP-induced Parkinson's disease through stabilizing PINK1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(4):1019–24.
61. Kim IS, Ko HM, Koppula S, Kim BW, Choi DK. Protective effect of *Chrysanthemum indicum* Linne against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and lipopolysaccharide-induced cytotoxicity in cellular model of Parkinson's

disease. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(4):963–73.

62. Xie H, Hu H, Chang M, Huang D, Gu X, Xiong X, et al. Identification of chaperones in a MPP + -induced and ATRA/TPA-differentiated SH-SY5Y cell PD model. *Am J Transl Res.* 2016;8(12):5659–71.
63. Lamine A, Létourneau M, Doan ND, Maucotel J, Couvineau A, Vaudry H, et al. Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology.* 2016;108:440–50.
64. Lee KW, Im JY, Woo JM, Grosso H, Kim YS, Cristovao AC, et al. Neuroprotective and Anti-inflammatory Properties of a Coffee Component in the MPTP Model of Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics.* 2013;10(1):143–53.
65. Verhaar R, Jongenelen CAM, Gerard M, Baekelandt V, Van Dam AM, Wilhelmus MMM, et al. Blockade of enzyme activity inhibits tissue transglutaminase-mediated transamidation of α -synuclein in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2011;58(7):785–93.
66. Verhaar R, Drukarch B, Bol JGJM, Jongenelen CAM, Musters RJP, Wilhelmus MMM. Increase in endoplasmic reticulum-associated tissue transglutaminase and enzymatic activation in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012;45(3):839–50.
67. Kang SY, Lee S Bin, Kim HJ, Kim HT, Yang HO, Jang W. Autophagic modulation by rosuvastatin prevents rotenone-induced neurotoxicity in an in vitro model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2017;642:20–6.
68. Condello S, Calabrò E, Caccamo D, Currò M, Ferlazzo N, Satriano J, et al. Protective effects of agmatine in rotenone-induced damage of human SH-SY5Y

neuroblastoma cells: Fourier transform infrared spectroscopy analysis in a model of Parkinson's disease. *Amino Acids*. 2012;42(2–3):775–81.

69. Yong-Kee CJ, Sidorova E, Hanif A, Perera G, Nash JE. Mitochondrial dysfunction precedes other sub-cellular abnormalities in an in vitro model linked with cell death in Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2012;21(2):185–94.
70. Ryu HW, Oh WK, Jang IS, Park J. Amurensin G induces autophagy and attenuates cellular toxicities in a rotenone model of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;433(1):121–6.
71. Zhang X, Xiong J, Liu S, Wang L, Huang J, Liu L, et al. Puerarin protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Neuroscience*. 2014;280:88–98.
72. Kim S, Park SE, Sapkota K, Kim MK, Kim SJ. Leaf extract of *Rhus verniciflua* Stokes protects dopaminergic neuronal cells in a rotenone model of Parkinson's disease. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(10):1358–67.
73. Sun H, He X, Liu C, Li L, Zhou R, Jin T, et al. Effect of Oleracein E, a Neuroprotective Tetrahydroisoquinoline, on Rotenone-Induced Parkinson's Disease Cell and Animal Models. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(1):155–64.
74. Choi BS, Kim H, Lee HJ, Sapkota K, Park SE, Kim S, et al. Celastrol from “Thunder God Vine” Protects SH-SY5Y cells through the preservation of mitochondrial function and inhibition of p38 mapk in a rotenone model of parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2014;39(1):84–96.
75. Jiang M, Yun Q, Shi F, Niu G, Gao Y, Xie S, et al. Downregulation of miR-384-5p attenuates rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310:755–63.

76. Zhang JY, Deng YN, Zhang M, Su H, Qu QM. SIRT3 Acts as a Neuroprotective Agent in Rotenone-Induced Parkinson Cell Model. *Neurochem Res.* 2016;41(7):1761–73.
77. Qin J, Wu M, Yu S, Gao X, Zhang J, Dong X, et al. Pyrroloquinoline quinone-conferred neuroprotection in rotenone models of Parkinson's disease. *Toxicol Lett.* 2015;238(3):70–82.
78. Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2007;11(3–4):151–67.
79. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C, Medical HH. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(June):387–96.
80. Zhang X, Hu M, Yang Y, Xu H. Organellar TRP Channels. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(11):1009–18.
81. Li H. TRP channel classification. *Adv Exp Med Biol.* 2017;976:1–8.
82. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005;2005(272).
83. Hong C, Jeong B, Park HJ, Chung JY, Lee JE, Kim J, et al. TRP Channels as Emerging Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases. *Front Physiol.* 2020;11(April):1–15.
84. Oancea E, Wicks NL. TRPM1: New trends for an old TRP. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:135–45.
85. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, et al. TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron.* 2011;70(3):482–94.
86. Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels,

magnesium transport, and vascular biology: Implications in hypertension. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2008;294(3).

87. Yamaguchi S, Tanimoto A, Iwasa S, Otsuguro KI. TRPM4 and TRPM5 channels share crucial amino acid residues for Ca^{2+} sensitivity but not significance of $\text{Pi}(4,5)\text{p}_2$. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8).
88. Banik DD, Martin LE, Freichel M, Torregrossa AM, Medler KF. TRPM4 and TRPM5 are both required for normal signaling in taste receptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(4):E772–81.
89. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: Where are we now? *Neurochem Res*. 2011;36(3):355–66.
90. Baş E, Nazıroğlu M, Pecze L. ADP-Ribose and oxidative stress activate TRPM8 channel in prostate cancer and kidney cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
91. Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE. Deletion of *Trpm7* disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg^{2+} homeostasis. *Science* (80-). 2008;322(5902):756–60.
92. Li M, Du J, Jiang J, Ratzan W, Su L-T, Runnels LW, et al. Molecular Determinants of Mg^{2+} and Ca^{2+} Permeability and pH Sensitivity in TRPM6 and TRPM7s. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25817–25830.
93. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct*. 2006;26(3):159–78.
94. Chen WL, Barszczyk A, Turlova E, Deurloo M, Liu B, Yang BB, et al. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget*. 2015;6(18):16321–40.

95. Chen WL, Turlova E, Sun CLF, Kim JS, Huang S, Zhong X, et al. Xylometolol B suppresses glioblastoma cell proliferation and migration in vitro through inhibiting TRPM7-regulated PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Mar Drugs*. 2015;13(4):2505–25.
96. Liang WZ, Chou CT, Hsu SS, Liao WC, Shieh P, Kuo DH, et al. The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett*. 2015;232(1):122–32.
97. Nazıroğlu M, Öz A, Yıldızhan K. Selenium and Neurological Diseases: Focus on Peripheral Pain and TRP Channels. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(6):501–17.
98. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*. 1999;398(6726):436–41.
99. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca²⁺ signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct*. 2012;32(3):134–41.
100. Wong GY, Gavva NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):267–77.
101. Juárez-Contreras R, Méndez-Reséndiz KA, Rosenbaum T, González-Ramírez R, Morales-Lázaro SL. TRPV1 channel: A noxious signal transducer that affects mitochondrial function. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):1–17.
102. Öz A, Çelik Ö. Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of transfection procedure. *Mol Membr Biol*. 2016;33(3–5):76–88.

103. Lopes FM, da Motta LL, De Bastiani MA, Pfaffenseller B, Aguiar BW, de Souza LF, et al. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res.* 2017;31(4):545–59.
104. Gündoğdu R, Çelik V. RNA İnterferans (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg.* 2009;25(1–2):34–47.
105. Web kaynağı - Erişim tarihi:08.01.2021 [Internet]. <https://www.ddw-online.com/using-rnai-to-identify-and-validate-novel-drug-targets-targeting-human-kinases-with-an-sirna-library-1743-200404/>
106. Jin X, Liu Q, Jia L, Li M, Wang X. Pinocembrin Attenuates 6-OHDA-induced Neuronal Cell Death Through Nrf2/ARE Pathway in SH-SY5Y Cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;35(3):323–33.
107. Alkozi HA, Perez de Lara MJ, Pintor J. Melatonin synthesis in the human ciliary body triggered by TRPV4 activation: Involvement of AANAT phosphorylation. *Exp Eye Res.* 2017;162:1–8.
108. Lin CC, Chou CH, Howng SL, Hsu CY, Hwang CC, Wang C, et al. GSKIP, an inhibitor of GSK3 β , mediates the N-cadherin/ β -catenin pool in the differentiation of SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem.* 2009;108(6):1325–36.
109. Pitman RT, Fong JT, Billman P, Puri N. Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a cell-type specific manner. *PLoS One.* 2012;7(6):1–9.
110. Uğuz AC, Öz A, Nazıroğlu M. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. *J Recept Signal Transduct.* 2016;36(4):395–401.

111. Yazıcı T, Koçer G, Nazıroğlu M, Övey İS, Öz A. Zoledronic Acid, Bevacizumab and Dexamethasone-Induced Apoptosis, Mitochondrial Oxidative Stress, and Calcium Signaling Are Decreased in Human Osteoblast-Like Cell Line by Selenium Treatment. *Biol Trace Elem Res.* 2018;184(2):358–68.
112. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009;232(1–3):15–23.
113. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB, et al. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res.* 2012;53(1):91–8.
114. Tök L, Naziroglu M, Uguz AC, Tök Ö. Elevated hydrostatic pressures induce apoptosis and oxidative stress through mitochondrial membrane depolarization in PC12 neuronal cells: A cell culture model of glaucoma. *J Recept Signal Transduct.* 2014;34(5):410–6.
115. Sakallı Çetin E, Nazıroğlu M, Çiğ B, Övey İS, Aslan Koşar P. Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: involvement of the TRPV1 channel. *J Recept Signal Transduct.* 2017;37(1):84–93.
116. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochem Res.* 2012;37(8):1631–8.
117. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440–50.

118. Berkhoudt Lassen L, Gregersen E, Kathrine Isager A, Betzer C, Hahn Kofoed R, Henning Jensen P. ELISA method to detect α -synuclein oligomers in cell and animal models. *PLoS One*. 2018;13(4):1–12.
119. Walker J, Rohm B, Lang R, Pariza MW, Hofmann T, Somoza V. Identification of coffee components that stimulate dopamine release from pheochromocytoma cells (PC-12). *Food Chem Toxicol*. 2012;50(2):390–8.
120. Renko JM, Bäck S, Voutilainen MH, Piepponen TP, Reenilä I, Saarma M, et al. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor (MANF) Elevates Stimulus-Evoked Release of Dopamine in Freely-Moving Rats. *Mol Neurobiol*. 2018;55(8):6755–68.
121. Inoue K, Xiong ZG. Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):547–57.
122. Sun H, Leng T, Zeng Z, Gao X, Inoue K, Xiong ZG. Role of TRPM7 channels in hyperglycemia-mediated injury of vascular endothelial cells. *PLoS One*. 2013;8(11):1–12.
123. Sun Y, Sukumaran P, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB. Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(9):1839–50.
124. Parnas M, Peters M, Dadon D, Lev S, Vertkin I, Slutsky I, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*. 2009;45(3):300–9.
125. Huguet F, Calvez ML, Benz N, Le Hir S, Mignen O, Buscaglia P, et al. Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR. *Cell Mol Life Sci*.

2016;73(17):3351–73.

126. Pertusa M, Madrid R, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F. N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. *J Biol Chem*. 2012;287(22):18218–29.
127. Nazıroğlu M, Özgül C. Effects of antagonists and heat on TRPM8 channel currents in dorsal root ganglion neuron activated by nociceptive cold stress and menthol. *Neurochem Res*. 2012;37(2):314–20.
128. Ertılav K, Uslusoy F, Ataizi S, Nazıroğlu M. Long term exposure to cell phone frequencies (900 and 1800 MHz) induces apoptosis, mitochondrial oxidative stress and TRPV1 channel activation in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis*. 2018;33(3):753–63.
129. Yüksel E, Nazlıroğlu M, Şahin M, Çiğ B. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
130. Chia JSM, Izham NAM, Farouk AAO, Sulaiman MR, Mustafa S, Hutchinson MR, et al. Zerumbone Modulates α 2A-Adrenergic, TRPV1, and NMDA NR2B Receptors Plasticity in CCI-Induced Neuropathic Pain In Vivo and LPS-Induced SH-SY5Y Neuroblastoma In Vitro Models. *Front Pharmacol*. 2020;11(March):1–18.
131. Zhu D, Zhang J, Wu J, Li G, Yao W, Hao J, et al. Paliperidone Protects SH-SY5Y Cells Against MK-801-Induced Neuronal Damage Through Inhibition of Ca^{2+} Influx and Regulation of SIRT1/miR-134 Signal Pathway. *Mol Neurobiol*. 2016;53(4):2498–509.
132. Bollimuntha S, Singh BB, Shavali S, Sharma SK, Ebadi M. TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2005;280(3):2132–40.

133. Bell N, Hann V, Redfern CPF, Cheek TR. Store-operated Ca²⁺ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(3):643–51.
134. Yıldızhan K, Nazıroğlu M. Glutathione Depletion and Parkinsonian Neurotoxin MPP⁺-Induced TRPM2 Channel Activation Play Central Roles in Oxidative Cytotoxicity and Inflammation in Microglia. *Mol Neurobiol.* 2020;57(8):3508–25.
135. Diaz-Corrales FJ, Miyazaki I, Asanuma M, Ruano D, Rios RM. Centrosomal aggregates and Golgi fragmentation disrupt vesicular trafficking of DAT. *Neurobiol Aging.* 2012;33(10):2462–77.
136. Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm.* 1994;98(2):107–18.
137. Khwanraj K, Phruksaniyom C, Madlah S, Dharmasaroja P. Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP⁺. *Neurol Res Int.* 2015;2015:1–11.
138. Cockova Z, Ujcikova H, Tlensky P, Novotny J. Protein profiling of SH-SY5Y neuroblastoma cells : The effect of rhein. *J Biosci.* 2019;44(88):1–16.
139. Martins F, Schröder R, Luiz M, Júnior F, Zanotto-filho A, Beatriz C, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 2010;1337:85–94.
140. Medeiros LM De, Bastiani MA De, Rico EP, Schonhofen P. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer ' s Disease Studies. *Mol Neurobiol.*

2019;56:7355–67.

141. Sun Y, Sukumaran P, Singh BB. Magnesium-Induced Cell Survival Is Dependent on TRPM7 Expression and Function. *Mol Neurobiol.* 2020;57(1):528–38.
142. Sun Y, Kamat A, Singh BB. Isoproterenol-Dependent Activation of TRPM7 Protects Against Neurotoxin-Induced Loss of Neuroblastoma Cells. *Front Physiol.* 2020;11(April):1–10.
143. Yang CP, Zhang ZH, Zhang LH, Rui HC. Neuroprotective Role of MicroRNA-22 in a 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Model of Parkinson's Disease via Regulation of Its Target Gene TRPM7. *J Mol Neurosci.* 2016;60(4):445–52.
144. Sturgeon M, Wu P, Cornell R. SLC41A1 and TRPM7 in magnesium homeostasis and genetic risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neuromedicine.* 2016;1(9):23–28.
145. Dati LM, Ulrich H, Real CC, Feng ZP, Sun HS, Britto LR. Carvacrol promotes neuroprotection in the mouse hemiparkinsonian model. *Neuroscience.* 2017;356:176–81.
146. Williams NM, Hubbard L, Sandor C, Webber C, Hendry H, Lawton M, et al. Genome-Wide Association Study of Pain in Parkinson's Disease Implicates TRPM8 as a Risk Factor. *Mov Disord.* 2020;35(4):705–7.
147. Lam PMW, Hainsworth AH, Smith GD, Owen DE, Davies J, Lambert DG. Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases $[Ca^{2+}]_i$, initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. *J Neurochem.* 2007;102(3):801–11.
148. Gorman AM, Mnich K, Finn DP, Dowd E. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int J Cell Biol.*

2010;2010(818497):1–10.

149. Zhao ZX, Wang JF, Wang LL, Yao XM, Liu YL, Li Y, et al. Capsaicin Protects Against Oxidative Insults and Alleviates Behavioral Deficits in Rats with 6-OHDA-Induced Parkinson's Disease via Activation of TRPV1. *Neurochem Res.* 2017;42(12):3431–8.
150. Wi R, Chung YC, Jin BK. Functional Crosstalk between CB and TRPV1 Receptors Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in the MPTP Model of Parkinson's Disease. *J Immunol Res.* 2020;1–11.
151. Park ES, Kim SR, Jin BK. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 contributes to mesencephalic dopaminergic neuronal survival by inhibiting microglia-originated oxidative stress. *Brain Res Bull.* 2012;89(3–4):92–6.
152. Nam JH, Park ES, Won SY, Lee YA, Kim KI, Jeong JY, et al. TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF. *Brain.* 2015;138(12):3610–22.
153. Chung YC, Baek JY, Kim SR, Ko HW, Bok E, Shin WH, et al. Capsaicin prevents degeneration of dopamine neurons by inhibiting glial activation and oxidative stress in the MPTP model of Parkinson's disease. *Exp Mol Med.* 2017;49(3):e298-9.
154. Razavinasab M, Shamsizadeh A, Shabani M, Nazeri M, Allahtavakoli M, Asadi-Shekaari M, et al. Pharmacological blockade of TRPV1 receptors modulates the effects of 6-OHDA on motor and cognitive functions in a rat model of parkinson's disease. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27(6):632–40.
155. González-Aparicio R, Moratalla R. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;62:416–25.

156. Li M, Zhu M, Xu Q, Ding F, Tian Y, Zhang M. Sensation of TRPV1 via 5-hydroxytryptamine signaling modulates pain hypersensitivity in a 6-hydroxydopamine induced mice model of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;521(4):868–73.
157. Fišar Z. Drugs related to monoamine oxidase activity. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2016;69:112–24.
158. Oreland L, Shaskant EG. Monoamine oxidase activity as a biological marker. *Trends Pharmacol Sci*. 1983;4:339–41.
159. Cao X, Wei Z, Gabriel GG, Li XM, Mousseau DD. Calcium-sensitive regulation of monoamine oxidase-A contributes to the production of peroxyradicals in hippocampal cultures: Implications for Alzheimer disease-related pathology. *BMC Neurosci*. 2007;8:1–10.
160. Wang Y, Yang Z, Meng Z, Cao H, Zhu G, Liu T, et al. Knockdown of TRPM8 suppresses cancer malignancy and enhances epirubicin-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *Int J Biol Sci*. 2013;10(1):90–102.
161. Huang XY, Leng TD, Inoue K, Yang T, Liu M, Horgen FD, et al. TRPM7 channels play a role in high glucose-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2018;293(37):14393–406.
162. Song C, Choi S, Oh KB, Sim T. Suppression of TRPM7 enhances TRAIL-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 2020;235(12):10037–50.
163. Samantaray S, Chandra G, Mohanakumar KP. Calcium channel agonist, ($\pm$)-Bay K8644, causes a transient increase in striatal monoamine oxidase activity in Balb/c mice. *Neurosci Lett*. 2003;342(1–2):73–6.
164. Avola R, Graziano ACE, Pannuzzo G, Albouchi F, Cardile V. New insights on

Parkinson's disease from differentiation of SH-SY5Y into dopaminergic neurons: An involvement of aquaporin4 and 9. *Mol Cell Neurosci.* 2018;88:212–21.

165. Öz A, Çelik Ö. P.827 Have the TRP channels a role in MPP+ neurotoxicity? *Eur Neuropsychopharmacol.* 2019;29(12):S550–1.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ahmi ÖZ

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi,
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı (2008-2013)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık
Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı (2013-2016)

Doktora Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık
Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı (2016-2021)

Yabancı Dil(ler) ve Düzeyi

1. İngilizce – B2

2. Almanca – A2

İş Deneyimi

1. Araştırma Görevlisi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı (2014-devam)

Bilimsel Yayınlar ve Çalışmalar

A) SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1- Nazıroğlu M, **Öz A**, Yıldızhan K. Selenium and Neurological Diseases: Focus on Peripheral Pain and TRP Channels. Current Neuropharmacology (2020) 18: 501. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200106152631>

2- Yiğit M, Güneş A, Uğuz C, Yalçın TÖ, Tök L, **Öz A**, Nazıroğlu M. Effects of astaxanthin on antioxidant parameters in ARPE-19 cells on oxidative stress model. Int J Ophthalmol. 2019 Jun 18;12(6):930-935. doi: 10.18240/ijo.2019.06.08. eCollection 2019. PubMed PMID: 31236348; PubMed Central PMCID: PMC6580212.

3- **Öz A**, Çelik Ö. Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of transfection procedure. Mol Membr Biol. 2016 May - Aug;33(3-5):76-88. doi: 10.1080/09687688.2017.1318224. Epub 2017 Jun 1. PubMed PMID: 28569571.

4- Yazıcı T, Koçer G, Nazıroğlu M, Övey İS, **Öz A**. Zoledronic Acid, Bevacizumab and Dexamethasone-Induced Apoptosis, Mitochondrial Oxidative Stress, and Calcium Signaling Are Decreased in Human Osteoblast-Like Cell Line by Selenium Treatment. Biol Trace Elem Res. 2018 Aug;184(2):358-368. doi: 10.1007/s12011-017-1187-8. Epub 2017 Oct 28.

5- Uguz AC, **Oz A**, Naziroglu M. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. J Recept Signal Transduct Res. 2016 Aug;36(4):395-401. doi: 10.3109/10799893.2015.1108337. Epub 2015 Nov 25.

6- Uguz AC, **Oz A**, Yilmaz B, Altunbas S, Celik O. Melatonin attenuates apoptosis and mitochondrial depolarization levels in hypoxic conditions of SH-SY5Y neuronal cells induced by cobalt chloride (CoCl₂), Turk J Biol (2015) 39: 896-903. doi:10.3906/biy-1505-100.

B) SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özetler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1- Öz A. Experimental cell culture models for investigating neurodegenerative diseases. J Cell Neurosci Oxid Stress 2019;11(2): 835-851.

2- Öz A, Çelik Ö, Övey İS. Effects of different doses of curcumin on apoptosis, mitochondrial oxidative stress and calcium influx in DBTRG glioblastoma cells. J Cell Neurosci Oxid Stress 2017;9(2): 617-629.

3- Öz A, Çelik Ö, Bejarano I, Uğuz AC. Antioxidants: novel approach to ROS sensitive TRP channels gating manner. Electronic Journal of Biology, 2017, Vol.13(3): 243-246.

4- Öz A, Uğuz AC. Migren patogeneğinde oksidatif strese duyarlı TRP kanallarının rolleri, Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg 2015;22(4):144-150.

C) SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayın

1- Öz A, Çelik Ö. Have the TRP channels a role in MPP+ neurotoxicity? European Neuropsychopharmacology, Volume 29, Supplement 6, 2019, Pages S550-S551.

2- Öz A, Çelik Ö, Nazıroğlu M. Role of Selenium on MPP+ Neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Focus on TRPV1 Channels. Turkish Journal of Biochemistry (2019), 44(s2), pp. 65-68.

D) Uluslararası toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterimleri

1- Helvacı C, Öz A, Nazıroğlu M. The importance of selenium on treatment of memory impairment: focus on TRPM2 and TRPV1 channels. 7th Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels World Congress. 20-23 April 2018, Alanya, Antalya, Turkey.

2- **Öz A**, Nazıroğlu M, Liehn E, Curaj A, Çelik Ö, Staudt M. Protective role of N-acetyl cysteine on chemical hypoxia induced cell death in human cardiac myocytes. 7th Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels World Congress. 20-23 April 2018, Alanya, Antalya, Turkey.

3- Nazıroğlu M, **Öz A**, Yıldızhan K, Çelik Ö. Effects of UV-C exposure on apoptosis, mitochondrial depolarization and ROS production in ARPE-19 eye cells. 7th Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels World Congress. 20-23 April 2018, Alanya, Antalya, Turkey.

4- **Öz A**, Çelik Ö, Nazıroğlu M. Protective role of selenium on an experimental model of Parkinson's disease in SH-SY5Y cells. 11th FENS Forum of Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany.

5- **Öz A**, Celik O, Ovey IS. Curcumin Induces Apoptosis via TRPM2 Cation Channel Independent Pathways in a Cellular Model of Glioblastoma, FENS Regional Meeting, 20-23 September 2017, Pécs, Hungary.

6- **Öz A**, Celik O. Curcumin Modulates Oxidative Stress Induced TRPM2 Channel Activation, Calcium Influx and Apoptosis in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells, FENS Regional Meeting, 20-23 September 2017, Pécs, Hungary.

7- **Öz A**, Çınar R, Çelik Ö, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of N-acetylcysteine treatment on CoCl₂-induced apoptosis and oxidative stress levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 24-27 May 2016, Isparta, Turkey.

8- Celik O, **Oz A**, Uguz AC, Naziroglu M. Role of TRPC1 in CoCl₂ induced neuronal cell death. Neurizons 2015 – 'Notes of an orchestrated brain', 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.

9- Uguz AC, **Oz A**, Naziroglu M. Regulatory role of selenium on apoptosis, GSH, GSH-Px, caspase-3 and -9 levels in CoCl₂ induced hypoxia model in neuroblastoma cells. Neurizons 2015 – 'Notes of an orchestrated brain', 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.

E) Ulusal toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterim

1- Uğuz AC, **Öz A**, Yılmaz B, Altunbaş S, Çelik Ö. SH-SY5Y Hücrelerinde Kobalt Klorür ile İndüklenmiş Hipoksi Modelinde Melatoninin Koruyucu Rolü, 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan-3 Mayıs 2015, Selçuk Üniversitesi, Konya.

2- **Öz A**, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Rutin Kullanılan Hücre Hatlarında Doğal İfadelenen TRP Kanalları, 8. Hücresel Sinir Bilim Günleri, 29-30 Kasım 2014, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.

F) Ulusal toplantıda sunulacak özet metin olarak yayımlanan bildiri

1- Yiğit M, Güneş A, Uğuz AC, **Öz A**, Nazıroğlu M, Tök L, Tök Ö. Astaksantin'in, Retina Pigment Epitel Hücrelerinde (ARPE-19) Hydroquinone'un Tetiklediği Oksidatif Stresin Hücre İçi Ca^{+2} Sinyali, Mitokondriyal Depolarizasyon Düzeyleri ve Apoptosis Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi, 4-8 Kasım 2015, İstanbul.

2- **Öz A**, Uğuz AC. Arka Kök Gangliyon Nöronlarında Patch-Clamp (Elektrofizyoloji) Kayıtları Alınması, 2. Ulusal Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, 17-20 Nisan 2014, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.

G) Ulusal kuruluşlarca desteklenen projede görev alma

1- SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinde Curcuminin TRPM2 Katyon Kanalları Üzerine Etkisinin Patch-Clamp Sistemi ile Araştırılması, TÜBİTAK - 1002 - Hızlı Destek Programı (Bursiyer)

H) Alanında bilimsel araştırma ve çalışmalar için ulusal burs almak

1- TÜBİTAK-BİDEB 2211/A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı Bursiyeri (Nisan 2017- Eylül 2020)

I) Alanında uluslararası bilimsel nitelikli ödül

1- FENS Regional Meeting Travel Grant Awardee, 20-23 September 2017, Pécs, Hungary.

2- ALBA-FKNE-YIBRO diversity grant for participating in the FENS 2020 Virtual Forum, 11-15 July 2020.

