

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VİTRO PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE
KARVAKROLÜN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Serenay KARATAŞ

ORCID: 0009-0005-2244-7043

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

OCAK 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2022970184

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE
KARVAKROLÜN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Serenay KARATAŞ

ORCID: 0009-0005-2244-7043

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ORCID: 0000-0001-7939-5153

Bu araştırma Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) kurumu tarafından
32942 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İZMİR
OCAK 2025

T.C.

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “In vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Karvakrolün Etkisinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgesel akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Serenay KARATAŞ 24.12.2024

TEŐEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitiminin başından sonuna kadar beni her zaman destekleyen, hatalarımı anlayışla karşılayan, bana bilimsel bakış açısı kazandırmanın yanında hayata bakış açısıyla da örnek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ'a,

Tezimin deneylerinde bana desteği çok büyük olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Serap KURT ve Beste BALBAL'a,

Sundukları imkanlar için Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve bana kattıkları bilgiler için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı akademik kadrosundaki her bir hocama,

Tez sürecimde bana kolaylık sağladığı ve her konuda desteği için Hacettepe Üniversitesi, Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü'nden sayın hocam Prof. Dr. Hülya KARATAŞ KURŐUN'a; yardımcılarıyla tez sürecimi kolaylaştırdıkları için Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü'nden ekip arkadaşlarım Dr. Tuğçe BİLBAY ve Dr. Taha SOLAKOğLU'na,

Son olarak da sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

Bu tez TÜSEB A Grubu Acil AR-GE Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenen 32942 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Parkinson Hastalığı	2
2.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi.....	2
2.3. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi.....	2
2.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi.....	4
2.5. Dopamin Sentezi ve Salıverilmesi	6
2.6. Parkinson Hastalığında Kullanılan Tedavi Yöntemleri.....	7
2.7. Parkinson Hastalığı Hücre Modellemeleri	8
2.8. Apoptoz.....	9
2.8.1. İntrensik Apoptoz Yolağı	9
2.8.2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı	10
2.8.3. Parkinson Hastalığında Apoptoz	11
2.9. Mitofaji.....	12
2.10. Karvakrol	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Araştırmanın Tipi.....	17

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	17
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme	17
3.4. Çalışma Materyali	17
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	17
3.6. Veri Toplama Araçları	17
3.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	17
3.6.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları.....	18
3.6.3. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları	19
3.6.4. Kullanılan Metotlar	22
3.7. Araştırma Planı	34
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	34
4. BULGULAR	35
4.1. SH-SY5Y Hücre Hattını Farklılaştırma Protokolü Bulguları	35
4.2. MTT Deney Bulguları.....	38
4.2.1. 6-OHDA Sitotoksosite Deneyi	38
4.2.2. Karvakrol Sitotoksosite Deneyi	38
4.3. Karvakrol Tedavisinin 6-OHDA ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Apoptoz ve Mitofaji İlişkili Genlerin İfadesine Etkisinin mRNA Seviyesinde Araştırılması	41
4.4. Karvakrol Tedavisinin 6-OHDA ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Apoptoz ve Mitofaji İlişkili Genlerin İfadesine Etkisinin Protein Seviyesinde Araştırılması	43
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
7. KAYNAKLAR.....	51
8. EKLER	59

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları	18
Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları.....	19
Tablo 3. cDNA sentez kiti bileşenleri.....	28
Tablo 4. RT-qPCR deneyinde kullanılan primerlerin nükleotit dizileri	29
Tablo 5. Western blot deneyinde kullanılan antikorların katalog numaraları ve dilüsyon oranları	31

SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Parkinson hastalığıyla ilişkili risk faktörlerinin ve koruyucu faktörlerin etkisinin şematize edilmesi.....	3
Şekil 2. Parkinson hastalığının moleküler mekanizması	4
Şekil 3. a-sinükleinden Lewy cisimciği oluşumunun şematik gösterimi	5
Şekil 4. Parkinson hastalarındaki ortak patofizyolojik olayların moleküler mekanizması	5
Şekil 5. PD patogenezinde mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve UPS bozukluğu ile ilişkili temel yollar	6
Şekil 6. Nigrostriatal yolda dopamin salınması ve Parkinson hastalığı ile ilişkisi	7
Şekil 7. 6-OHDA ile Parkinson modellemesinin moleküler mekanizması	9
Şekil 8. İntrinsik apoptoz yolağı.....	10
Şekil 9. Ekstrinsik apoptoz yolağı.....	11
Şekil 10. Mitofaji modeli.....	13
Şekil 11. Karvakrolün moleküler yapısı.....	14
Şekil 12. Karvakrolün farmakolojik etkileri.....	15
Şekil 13. Proliferatif SH-SY5Y nöroblastom hücre hattını nörojenik farklılaşması için uygulanan protokol	24
Şekil 14. MTT protokolü uygulanan plate'in görüntüleme öncesindeki görüntüsü. .	26
Şekil 15. RNA izolasyonu için uygulanan protokolün zaman çizelgesi.....	27
Şekil 16. 6-well plate'e ekimi yapılan hücreler deney grupları ve tekrar sayılarıyla gösterilmiştir.....	27
Şekil 17. Hücre lizatı eldesi/protein izolasyonu için uygulanan protokolün zaman çizelgesi	30
Şekil 18. Bikinkoninik asit (BCA) yöntemiyle oluşturulan standart eğrisi	32

Şekil 19. Membran-jel sandviç sisteminin düzeni.....	33
Şekil 20. Nörojenik farklılaştırma protokolünün 1., 3. ve 5. günlerinde ters ışık mikroskopunda alınan hücre görüntüleri.....	36
Şekil 21. (solda) Standart besiyerinde idame ettirilen SH-SY5Y hücreleri ile (sağda) nörojenik farklılaşma protokolü uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin (d-SH-SY5Y) ters ışık mikroskobu ile alınan görüntüleri.....	37
Şekil 22. d -SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı 6-OHDA dozlarının 24 saatin sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi.....	38
Şekil 23. d-SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı Karvakrol dozlarının 24 saatin sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi.....	39
Şekil 24. 6 -OHDA ile muamele edilen d-SH-SY5Y hücrelerinin canlılığına farklı Karvakrol dozlarının etkisi	40
Şekil 25. KARV, 6-OHDA ve KARV ile 6-OHDA dozlarının d-SH-SY5Y hücrelerinde Bcl-2, Bax, Cyt-c ve Pink-1 genlerinin ifadesi üzerine etkisinin RT- qPCR ile mRNA seviyesinde analizi	41
Şekil 26. RT-qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin Agaroza Jel Elektrophoretik göçü görüntüleri	42
Şekil 27. KARV, 6-OHDA ve KARV ile 6-OHDA dozlarının d-SH-SY5Y hücrelerinde BCL-2, BAX, CYT-C ve PINK-1 genlerinin ifadesi üzerine etkisinin Western blot ile protein seviyesinde analizi.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

6-OHDA	6-hidroksidopamin
ATP	Adenozin trifosfat
ATRA	All-trans retinoik asit
BAX	Bcl-2 ilişkili X
BCA	Bisinkoninik asit
BCL-2	B hücreli lenfoma 2
BSA	Bovin Serum Albumin
CC50	%50 sitotoksosite konsantrasyonu
cDNA	Komplementer DNA
CYT-C	Sitokrom c
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri ve F12 Besin Karışımı
DMSO	Dimetil sülfoksit
d-SH-SY5Y	Diferansiye olmuş SH-SY5Y hücre hattı
FBS	Fetal Bovine Serum
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KARV	Karvakrol
MAO	Monoamin oksidaz
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	Fosfat tamponlu salin
PH	Parkinson Hastalığı
PINK-1	Pten ile indüklenen kinaz-1

PVDF	Polivinilidin florür
RA	Retinoik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribonükleik asit
RT-qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SNpc	Substantia nigra pars compacta
TH	Tirozin hidroksilaz
UPS	Ubikuitin-proteozom sistemi
VMAT2	Vezikül monoaminerjik transporter
	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece

IN VİTRO PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNDE KARVAKROLÜN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Serenay KARATAŞ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Parkinson Hastalığı (PH) beyindeki dopaminerjik nöronların ilerleyici kaybı ile karakterize edilmiş, hastada motor ve motor olmayan semptomlar ile kendini gösteren ve uzun süreçte etkili olmayan semptom azaltıcı ilaçlar ile hastanın yaşam kalitesinin iyileştirilmeye çalışıldığı nörodejeneratif bir hastalıktır. PH'nin kompleks bir moleküler mekanizması vardır ve henüz tam olarak anlaşılammıştır. Yapılan son çalışmalar PH'deki nöronal ölüme apoptozun yol açtığını göstermektedir. Nöron kaybının sebebinin altında yatan temel moleküler mekanizmaların Lewy cisimciği oluşumu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olduğu hipotezi öne sürülmektedir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu sonucunda ATP yetersizliği, serbest radikallerin ve oksidatif stresin artışı, apoptoz öncüsü proteinlerde artışa sebebiyet vermektedir. Benzer bir mekanizmayla nöron kaybını tetikleyen 6- hidroksidopamin (6-OHDA) hem *in vitro* hem de *in vivo* PH modellemelerinde sıklıkla tercih edilen bir nörotoksindir. 6-OHDA hücrelerde oksidatif stresi arttırarak apoptozu tetikler. Ülkemizde yaygınca yetişen kekik bitkisinde bulunan ve çeşitli hastalık modellerinde anti-apoptotik ve nöroprotektif olduğu gösterilen karvakrolün PH modellerinde etkisini gösteren az sayıda yayın olmakla beraber bu etkisinin mekanizması da henüz tam olarak anlaşılammıştır.

Bu tez çalışmasında SH-SY5Y hücrelerine retinoik asit ile nöron karakteri kazandırılıp, 6-OHDA ile indüklenen oksidatif stres koşullarında karvakrol etkisiyle apoptoz ve mitofaji ile ilişkili genlerdeki ifade düzeyinin araştırılmıştır.

RNA bulgularının aksine protein bulguları 6-OHDA ile indüklenen apoptozun KARV

ile tersine çevrilemediğini göstermiştir. Bu durum KARV'ın iyileştirici etkisini farklı bir hücre ölüm yolağını baskılayarak yapabileceğini düşündürmektedir. Parkinson modelinde KARV uygulandığında total PINK-1 ifadesi değişmemesine rağmen kırılmamış PINK-1 miktarının artmasıyla mitofajinin de arttığı söylenebilir. Sonuç olarak, KARV hücre kaybını apoptoza alternatif bir yolak üzerinden baskılamaktadır, bozulan mitofajiyi ise düzeltmektedir.

Anahtar kelimeler: 6-OHDA, apoptoz, karvakrol, mitofaji, Parkinson hastalığı

Tezin sayfa adedi: 77

Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CARVACROL IN IN VITRO
PARKINSON'S DISEASE MODEL**

Master Thesis

Serenay KARATAŞ

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Department of Medical Biology

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by Progressive loss of dopaminergic neurons in brain, presented by motor and non-motor symptoms in patients, and tried to improve patients' quality of life by symptom- relieving medications which are not effective in long-term. PD has a complex molecular mechanism which is not fully understood yet. Latest researches have showed that neuron loss in Parkinson's patients is result of apoptotic cell death. It is suggested that the undelying mechanisms deriving neuron loss is Lewy body formation and mitochondrial dysfunction. ATP depletion and increase of free radicals and oxidative stress as a result of mitochondrial dysfunction increases pro-apoptotic proteins. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) which induces neuron death by similar mechanism is a neurotoxin frequently used to model PD both in *in vivo* and *in vitro* studies. 6-OHDA incerases oxidative stress therefore induces apoptosis. Carvacrol (CARV) is found in thyme plant that grows widely in our country and has been shown to be anti-apoptotic and neuroprotective in various disease models. Mechanism of action of carvacrol in PD tretament is not been fully understood yet.

In this thesis, SH-SY5Y cells were given neuronal character via retinoic acid and the alterations in the expression level of genes related to apoptosis and mitophagy with the effect of carvacrol under 6-OHDA-induced oxidative stress conditions was investigated.

Contarary to RNA results, protein results showed that 6-OHDA-induced apoptosis could not be reversed by CARV However, the mode of action of CARV's therapeutic effect may depend on the inhibition of another cellular death pathway. Even though, total PINK-1 expression was not altered by CARV in model, full-lenght PINK-1 level was increased

therefore mitophagy was increased. As a result, CARV inhibited neuron loss via alternative pathway and enhanced mitophagy.

Keywords: 6-OHDA, apoptosis, carvacrol, mitophagy, Parkinson's disease **Page**

number: 77

Supervisor: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nörodejeneratif hastalıklar nöronların ilerleyici kaybı ile karakterize edilen ve kesin tedavi yöntemi bulunmayan bir hastalık grubudur. Parkinson hastalığı (PH) nörodejeneratif hastalıklardan ikinci en sık rastlanandır ve kullanılan Levodopa gibi semptom düzenleyici ilaçlar nöron kaybının önüne geçememektedir. Hastalığın ortaya çıkışı çoğunlukla çeşitli faktörlerin bir araya gelmesiyle ilişkilidir ve bu da hastalığın patogenezini, dolayısıyla da tedavi için hedeflenmesi gereken mekanizmayı karmaşıklaştırmaktadır. Postmortem çalışmalar PH hastalarında mitokondri hasarı ve oksidatif stres biyobelirteçlerinde artış olduğunu göstermektedir. Dopaminerjik nöronların oksidatif stres oluşturmaya yatkınlıkları düşünüldüğünde mitokondri hasarını düzeltip hücrenin homeostazisini düzenleyebilen potansiyel ilaç ajanlarının tespit edilmesi nöronların ilerleyici kaybının önlenmesinde önemli bir adım olabilir. Günümüzde bitkilerden elde edilen aktif maddelerin etki mekanizmaları araştırılmakta olup, anti-oksidan özellikteki bileşiklerin serbest radikalleri temizleyerek hücrelerdeki oksidatif stres kaynaklı hasarı azalttığı gösterilmiştir.

1.2. Araştırmanın Amacı

In vitro SH-SY5Y hücre hattına, retinoik asit ile nöron karakteri kazandırılması ve devamında 6-OHDA nörotoksini ile oluşturulan PH modelinde karvakrolün hücre canlılığına etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

6-OHDA ile oluşturulan PH modelinde karvakrolün, mitokondriyal biyogenezde rol oynayan PINK1 gen ekspresyonunu düzenleyerek hücre canlılığı üzerinde koruyucu etki göstermesi

6-OHDA ile oluşturulan PH modelinde karvakrolün, apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücre canlılığı üzerinde koruyucu etki göstermesi

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

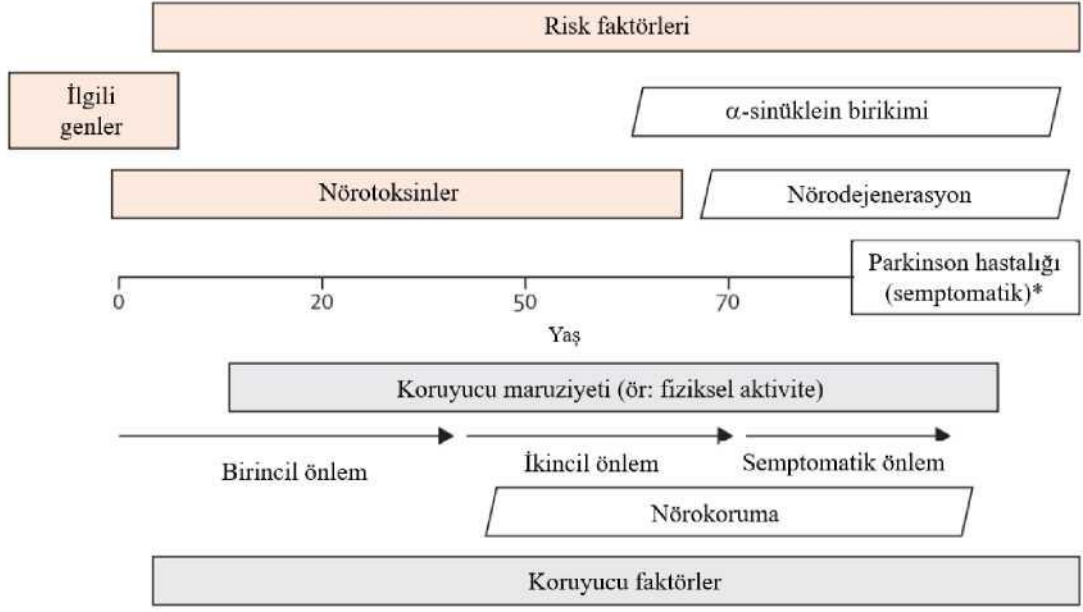
Parkinson Hastalığı (PH), 1817 yılında Dr. James Parkinson tarafından tanımlanmıştır (1). Alzheimer'dan sonra popülasyonda en sık rastlanan nörodejeneratif hastalıktır. Beynin striatumunda bulunan substantia nigra pars compacta (SNpc) bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ile patoloji göstermektedir (2). Bu bölge, istemli hareketlerin kontrolünün sağlandığı bazal gangliyanın bir parçasıdır. Striatal dopaminerjik nöronların dejenerasyonu sonucunda hareketlerde yavaşlama (bradikezi), istemli hareketi başlatmada zorlanma (akinezi), istirahat halinde uzuvlarda titreme (tremor), kaslarda rijidite ve ayakta duruş bozukluğu gibi motor semptomların yanında ortaya çıkabilecek demans, depresyon ve uyku bozukluğu gibi motor olmayan semptomlar hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir (3).

2.2. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi

Parkinson hastalığı ile yaşayan 6,1 milyon insan olduğu 2016 yılında bildirilmiş olup bu sayı gün geçtikçe artmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı yaş arttıkça artmaktadır ve 60 yaşının üzerindeki her 100 kişiden 1'i Parkinson hastasıdır (4, 5). Hastalığın görülme ve mortalite oranları erkeklerde kadınların 1,4 katıdır. (6).

2.3. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi

Parkinson hastalığı hem genetik hem de çevresel faktörler sebebiyle ortaya çıkabilmektedir, dolayısıyla da multifaktöriyel bir hastalıktır. Toksinler, diyet gibi yaşam tarzı ile ilgili faktörler, travma gibi fiziksel faktörler, genetik yatkınlık, metabolizma, eşlik eden hastalıklar, epigenetik değişiklikler, mikrobiyom gibi iç ve dış faktörler Parkinson hastalığının risk faktörleridir. Buna karşın maruz kalınan koruyucu etmenler (fiziksel aktivite, koruyucu ajanlar gibi) hastalık riskini azaltabilmekte ya da başlangıcını erteleyebilmektedir (4)(Şekil 1).

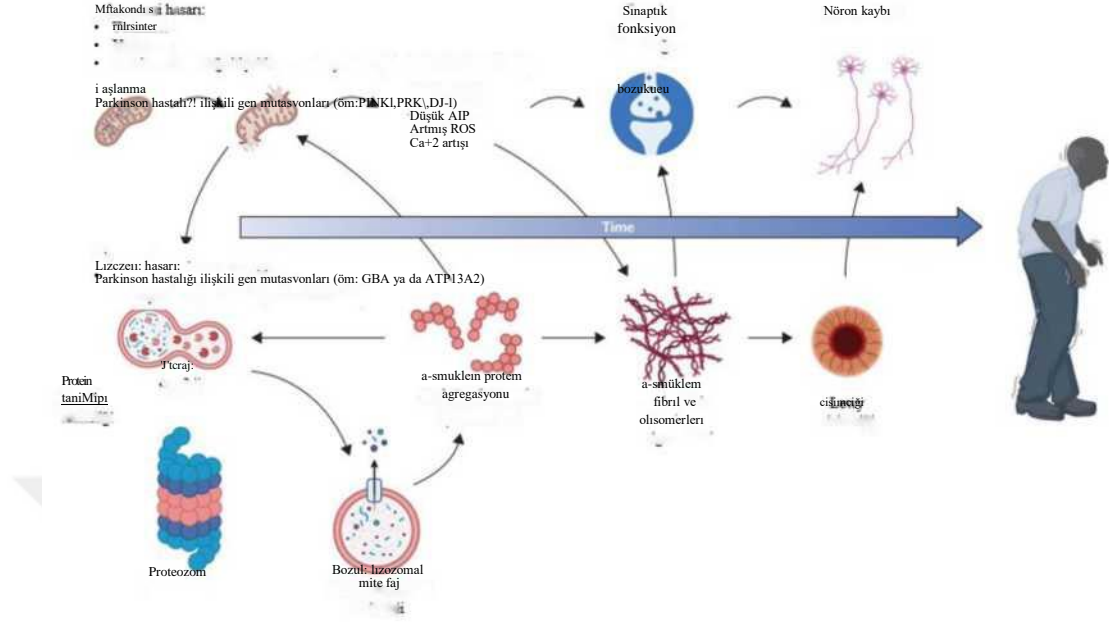


Şekil 1. Parkinson hastalığıyla ilişkili risk faktörlerinin ve koruyucu faktörlerin etkisinin şematize edilmesi (4).

Parkinson hastalığıyla ilişkili 20'den fazla gen tespit edilmiştir. Alfa-sinüklein kodlayan SNCA gen kopyasının çoğalması, a-sinüklein birikmesine ve Lewy cisimciği oluşumuna sebep olarak; protein deglikaz DJ-1 (PARK7), E3 ubiquitin protein ligaz (PRKN) ya da serin/treonin-protein kinaz (PINK1) proteinlerinin genlerindeki mutasyonlar mitokondriyal fonksiyonu ve mitofajiyi bozarak; beta glukoserebrozidaz (GBA), katyon taşıyıcı ATPaz 13A2 (ATP13A2) ve lösin açısından zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2) proteinlerinin genlerindeki mutasyonlar lizozomal ve trafik yollarını etkileyerek hücre ölümüne sebep olmaktadır. (7).

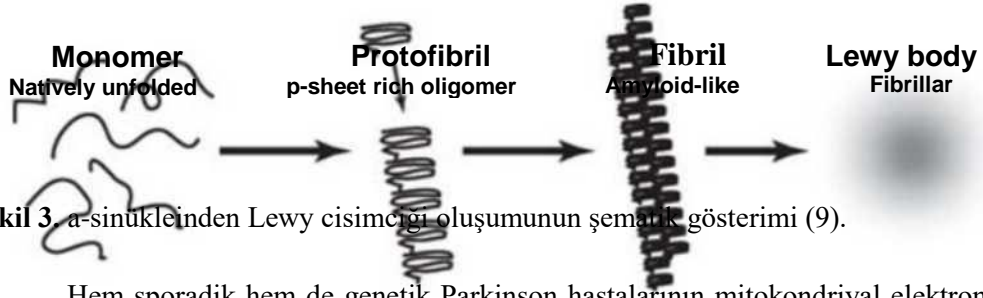
Genetik faktörlerin yanında çevresel risk faktörlerine maruziyet de hastalığa yakalanma olasılığını arttırmaktadır. Parakuat, rotenon gibi pestisitler, toksik çözücüler, bazı metaller ve hava kirliliği bu çevresel faktörlerdendir. Pestisitler mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, inflamasyon, epigenetik metilasyon ve mikrobiyomda değişikliklere sebep olabilir. Havada, toprakta, suda ve yiyeceklerde bulunabilen toksik bir kimyasal olan trikloroetilen gibi klorlu çözücülere uzun süreli maruziyet de Parkinson hastası olma riskini arttırmaktadır (4).

2.4. Parkinson Hastalığının Patogenezi



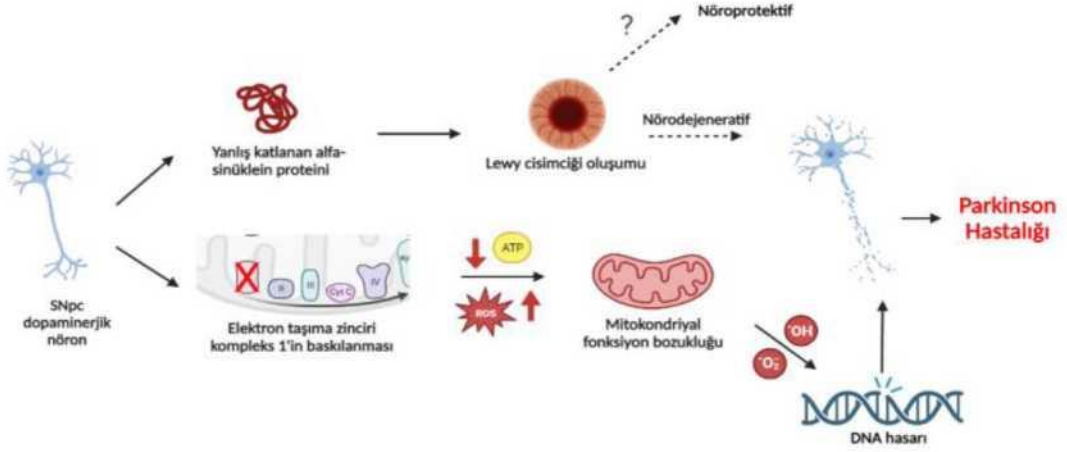
Şekil 2. Parkinson hastalığının moleküler mekanizması (8).

Parkinson hastalarında Lewy cisimciği oluşumu ve mitokondrideki fonksiyon bozukluğu ortak olarak gözlenen patofizyolojik olaylardır (Şekil 2). Lewy cisimciğinin hücre için fonksiyonu tam olarak anlaşılammıştır fakat sinaptik vezikül trafiğinin modülasyonunda rol oynadığı düşünülen α -sinüklein proteini fosforillendiğinde önce küçük oligomerler oluşturmakta ve sonrasında daha çok agregat olarak fibril bir yapı oluşturmaktadır. Bu fibriller son aşama olarak Lewy cisimciğini oluşturmaktadır (Şekil 3). Aynı zamanda bu proteini kodlayan SNCA genindeki mutasyonlar sonucunda α -sinüklein ifadesinin artması veya proteinin yanlış katlanıp yıkımının gerçekleşmemesi gibi sorunların Lewy cisimciği oluşumuna sebep olabileceği düşünülmektedir. α -sinükleinin yıkımından birincil sorumlu olan lizozomal otofajinin disfonksiyonu sonucunda da proteinin agregasyonu ile Lewy cisimciği oluşumu gözlenmektedir (8).



Şekil 3. α -sinükleinden Lewy cisimciği oluşumunun şematik gösterimi (9).

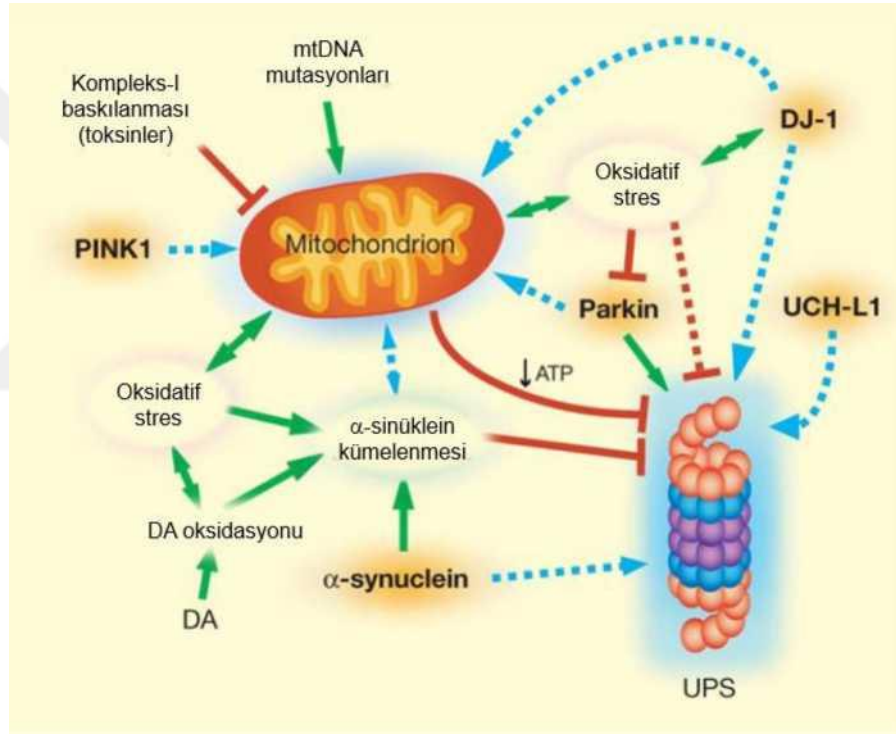
Hem sporadik hem de genetik Parkinson hastalarının mitokondriyal elektron taşıma sistemi kompleks 1’inde sistemik bir eksiklik gözlenmiştir. Bu da mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun, mitokondriyal kompleks 1’in baskılanması sonucunda ATP yetersizliği ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışıyla ortaya çıktığını düşündürmektedir. Mitokondrinin fonksiyonunu yerine getirememesi daha fazla serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Hidroksil radikali ve süperoksit gibi serbest radikaller DNA hasarına sebep olmaktadır (10,



11) (Şekil 4).

Şekil 4. Parkinson hastalarındaki ortak patofizyolojik olayların moleküler mekanizması (10, 11).

Hasarlı mitokondri ve artan reaktif oksijen türleri Lewy cisimciği oluşumu sürecini hızlandırmaktadır (12). Bunların yanında dopaminin oksidasyona yatkınlığının hücrede oksidatif stresi artırarak normal hücre oksidatif stres eşiğini düşürdüğü düşünülmektedir. Dopaminin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2), iyonlarla reaksiyona girerek toksik hidroksil radikali oluşturabilmektedir (13, 14) (Şekil 5). Aynı zamanda dopaminin oksidasyonu da mitokondriyal elektron taşıma zinciri komplekslerinin aktivitesini baskılayabilmektedir (15). Henüz sebebi ve patofizyolojisi tam olarak anlaşılammış olsa da SNpc dopaminerjik nöronlarının dejenerasyonunda oksidatif stresin önemli bir sebep olduğu düşünülmektedir (8).

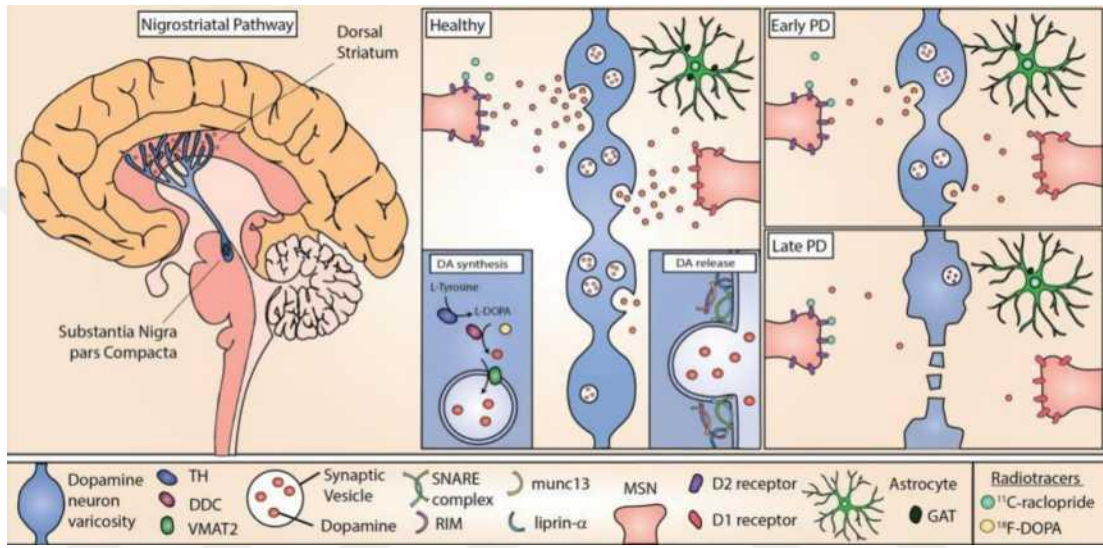


Şekil 5. PD patogenezinde mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve UPS bozukluğu ile ilişkili temel yolaklar (9).

2.5. Dopamin Sentezi ve Saliverilmesi

Dopaminerjik nöronların somaları SNpc'de bulunur ve dorsal striatuma uzantılar yaparlar. Dopamin salınımı aksonal varikozitelerden gerçekleşir ve dopamin striatumdaki D1 ve D2 metabotropik reseptörleri üzerinden etkisini gösterir. Tirozin amino asidinin tirozin hidroksilaz (TH) enzimi tarafından hidroksillenmesiyle L-DOPA, DOPA dekarboksilaz (DDC) enziminin katalitik aktivitesi sonucunda da dopamin

üretilir. Üretilen dopamin doğrudan vezikül monoaminerjik transporter (VMAT2) aracılığıyla vezikül içerisine alınır (16, 17). Dopamin monoamin oksidaz (MAO) enzimi tarafından metabolize edilip H₂O₂ oluşmasına sebep olabilir. H₂O₂ hücrede ROS'u artırır. Bunun yanında dopaminin yıkımında oluşan ürünlerin oto- oksidasyonu da ROS üretimini arttırmaktadır. Parkinson hastalığının erken evrelerinde dopamin salınmasında azalma görülürken ilerleyen evrelerde dopaminerjik sinirler dejenere olmaya başlar (16) (Şekil 6).



Şekil 6. Nigrostriatal yolakta dopamin salınması ve Parkinson hastalığı ile ilişkisi (16).

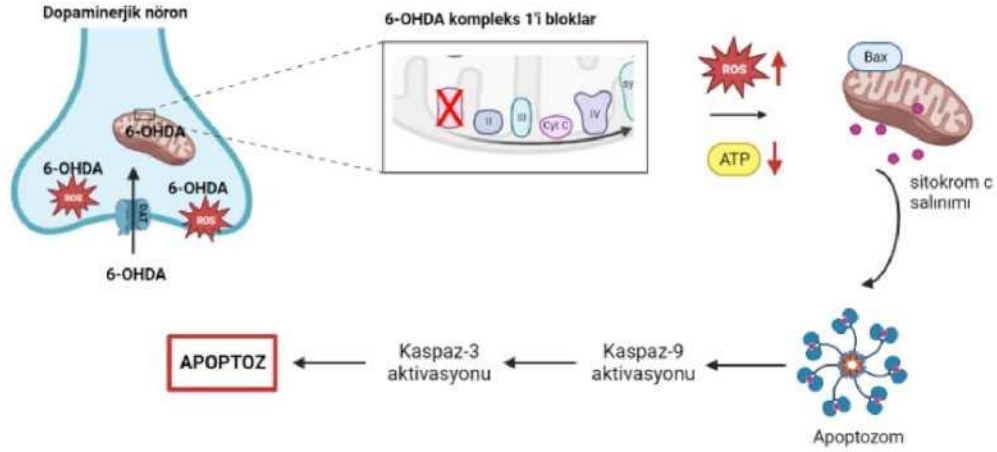
2.6. Parkinson Hastalığında Kullanılan Tedavi Yöntemleri

Hastalığın semptomatik tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir ilaç olan Levodopa, hastalarda azalan dopaminerjik nöron sayısı sonucunda üretimi azalan dopaminin yerini alarak motor semptomları azaltıp hastalığın bir süre kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır. Fakat uzun süreli kullanım sonucunda farklı diskineziler ve çeşitli motor olmayan yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçlardan ne Levodopa (L-DOPA) ne de diğer dopamin agonistleri dopaminerjik nöron dejenerasyonunu engelleyici bir etki göstermemektedir (18). Şimdiye kadarki klinik çalışmalar başarısızlıkla sonuçlansa da mitokondriyal fonksiyon bozukluğu yeni ilaç tedavileri için bir hedef olabilir (19).

2.7. Parkinson Hastalığı Hücre Modellemeleri

İnsan nöroblastom hücre hattı olan SH-SY5Y, Parkinson hastalığı da dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* modellenmesinde sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır. Farklılaştırma yapılmamış SH-SY5Y hücreleri sürekli bir şekilde çoğalır, olgunlaşmamış nöronlara ait belirteçleri eksprese ederler ve olgun nöron belirteci bulundurmazlar (20). Oldukça heterojen bir morfolojiye sahip olan bu hücre hattında hem agresifçe çoğalan (nöroblastik) N-tipi hem de daha az agresif olan (substrat adherent) epitel hücre benzeri S-tipi hücreler bulunmaktadır. SH-SY5Y hücrelerinin indükleyici ajanlarla muamele edilerek farklılaştırılması onlara nöron benzeri fenotip kazandırmaktadır. Farklılaşmayla birlikte hücrelerde nöron-spesifik proteinlerin ve nörotransmitterlerin oluşumu indüklenmektedir. Bu farklılaşma hücre döngüsünü de senkronize edip, daha homojen bir popülasyonun elde edilmesini sağlamaktadır (21). Hücre besiyerine retiooik asit (RA) eklenmesi, SH-SY5Y hücrelerinde farklılaşmanın yapılması için yaygın olarak kullanılan ve iyi tanımlanmış metotlardan biridir. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine nörotoksik bir ajanla (6-OHDA, MPTP, rotenon gibi) muamele edilmesi, dopamin nöronlarında ROS artışını ve programlanmış hücre ölümünü (apoptozu) tetikleyerek PH'deki nöron kaybının taklit edilmesini sağlamaktadır (22).

6-hidroksidopamin (6-OHDA) hem *in vitro* hem de *in vivo* Parkinson modellemelerinde sıklıkla tercih edilen bir nörotoksindir (23). 6-OHDA, doğal dopamin nörotransmitterinin hidroksillenmiş halidir ve 1959'da Senoh tarafından izole edilmiştir (24). 6-OHDA hücre içerisine dopamin taşıyıcı (DAT) veya norepinefrin taşıyıcı (NET) aracılığıyla alınır ve hem dopaminerjik hem de noradrenerjik nöronlar için seçici bir nörotoksindir (25). Mitokondride birikip elektron taşıma zincirindeki kompleks 1'i baskılayabilmektedir (23). 6-OHDA'nın toksik etkisi, ROS üretimini arttırmasından kaynaklanmaktadır. ROS artışıyla meydana gelen hasarlardan dolayı mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesiyle mitokondriden salınan sitokrom c (Cyt-c) ile apoptozom oluşumu sonucunda, kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzimleri aktive olarak DNA tamirinde görevli enzimleri, hücre iskeleti yapılarını ve çekirdek zarını yıkıma uğratar ve böylelikle hücre apoptozu gerçekleşir (26) (Şekil 7).



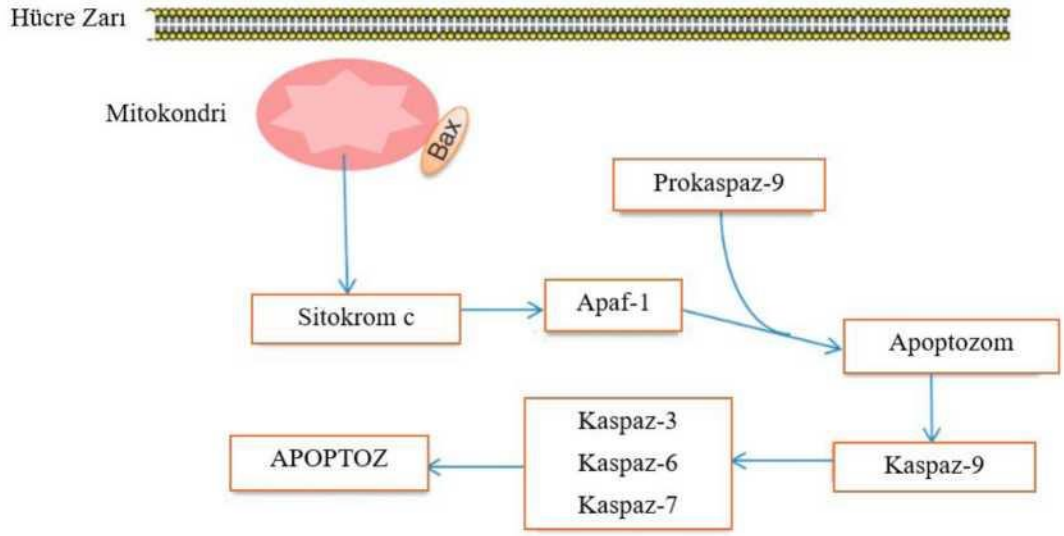
Şekil 7. 6-OHDA ile Parkinson modellemesinin moleküler mekanizması (27).

2.8. Apoptoz

Nörodejeneratif hastalıklarda meydana gelen nöron kaybı, apoptotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmektedir. Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. İntrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik apoptoz yollarından en az birinin indüklenmesiyle hücre içerisinde bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler gerçekleşir. Hücre büzülür fakat hücre zarı bütünlüğü korunur, kromatin yoğunlaşır, DNA fragmentasyona uğrar, yüksek oranda protein degradasyonu gerçekleşir, apoptotik cisimcikler oluşur. Nörodejeneratif hastalıklarda hem post-mortem hem de *in vitro* modelleme çalışmalarında antiapoptotik BCL-2 seviyelerinin azaldığı, proapoptotik BAX ifadesinin ve Kaspaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (26).

2.8.1. İntrinsik Apoptoz Yolağı

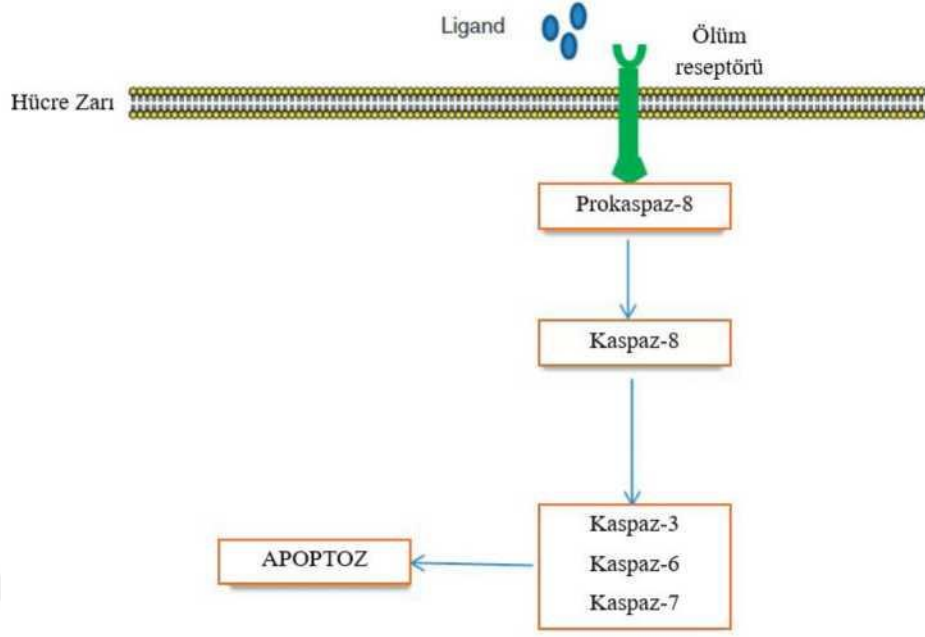
Hücre içerisinde artan oksidatif stres intrinsik yolağı tetikleyerek antiapoptotik Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinleri ise aktive eder. Bax mitokondri membranının geçirgenliğini artırarak sitozole sitokrom c salınmasına sebep olur. Sitokrom c sitozolde Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluşturur. Aktive olup kompleksten ayrılan kaspaz-9; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi aşağı hücre sinyal yolağı efektörlerini aktive eder (26, 28) (Şekil 8).



Şekil 8. İntrinsik apoptoz yolağı (26).

2.8.2. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı

Ekstrinsik apoptoz yolağı, hücre zarındaki ölüm reseptörlerine ligandının bağlanıp reseptörü aktive etmesiyle başlar. Tümör nekroz faktörü (TNF) ya da sinir büyüme faktörü (NGF) gibi reseptör süper ailelerinin üyesi olan bu reseptörler ligandlarının bağlanmasıyla trimerize olup hücre içi reseptör bağımlı bir protein olan pro-kaspaz-8'i kırparak aktif formu olan kaspaz-8'i oluştururlar. Kaspaz-8, kaspaz-3'ü, kaspaz-6'yı ve kaspaz-7'yi kırparak aktifleştirir. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 DNA onarımında görev alan nükleer enzim poli(ADP-riboz) polimerazı (PARP) kırparak DNA onarımını baskılar. Bununla birlikte kaspaz-3; DNA-bağımlı protein kinazı yıkarak hücrenin DNA onarım kapasitesini düşürür böylece DNA parçalanması gerçekleşebilir. Kaspaz-3, hücre iskeleti proteinlerini yıkarak hücrenin büzülmesine ve protein kinaz C'yi aktifleştirerek kromatin yoğunlaşması ve çekirdeğin parçalanmasına sebep olur. Kaspaz-6 çekirdek zarının altında bulunan laminleri yıkarak çekirdeğin yıkımına sebep olur (26, 29) (Şekil 9).



Şekil 9. Ekstrinsik apoptoz yolağı (26).

2.8.3. Parkinson Hastalığında Apoptoz

Parkinson hastalarındaki dopaminerjik nöron kaybına sebep olan ana mekanizmanın apoptoz olduğu post mortem çalışmalarla gösterilmiştir (30, 31). Benzer çalışmalarda Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ifadesinin ve aktif kaspaz-3 miktarının arttığı da gösterilmiştir (32). Parkinson modellemelerinde kaspaz-3 inhibitörünün hücre ölümünün önüne geçmesi de bu bulguları desteklemiştir (33). Hücre içerisinde reaktif oksijen türlerinin yükselmesi, sitokrom c salınımı ve ATP yetersizliğiyle tetiklenen mitokondriyal (intrinsik) apoptozun baskın mekanizma olduğu düşünülmektedir (34). Parkinson hastalarının SNpc'sinde mitokondriyal kompleks I'in aktivitesinde bozukluk olduğu görülmüştür. Dopaminerjik nöronlarda ifade edilen α -sinüklein proteini birikip bir araya gelerek Parkinson hastalığının ayırt edici patolojik oluşumu olan Lewy cisimciklerini meydana getirmeye oldukça yatkın olmakla birlikte bu birikme mitokondriyal kompleks I'i baskılayıp reaktif oksijen türlerinin artmasına da sebep olmaktadır. α -sinükleinin mitokondrinin membranına konumlandığı SH-SY hücrelerinde gösterilmiştir. Dopaminin veya yıkımında ortaya çıkan ürünlerin oksitlenmesiyle hücrede ROS'un artışı da mitokondriyal kompleks I'in baskılanmasına sebep olan bir diğer mekanizma olduğu düşünülmektedir (26, 35).

Antioksidanların dopaminle indüklenen apoptozu engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (36, 37).

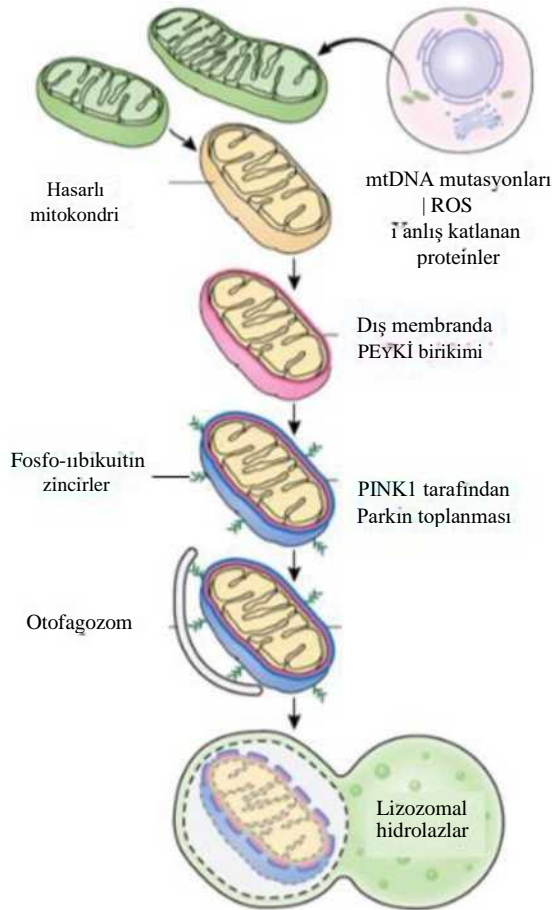
2.9. Mitofaji

Mitokondri hücrelerdeki enerji üretiminden sorumlu olan bir organeldir. Glukoz metabolizması ürünü olarak oluşan pirüvat veya yağ asitlerinin mitokondride yükseltgenmesiyle hücrenin kullanabileceği kimyasal bir enerji formu olan ATP üretilir. Mitokondri hücrenin enerji ihtiyacını karşılayarak hücre homeostazının korunmasına katkı sağlamaktadır fakat çeşitli sebeplerle bozulabilen hücre içi denge mitokondrinin fonksiyonunu da bozabilir. Hücre içerisinde çevresel stres ajanları sebebiyle artan reaktif oksijen türleri (ROS) hücrede oksidatif strese sebep olur. ROS normal koşullarda mitokondrideki oksidatif fosforilasyon esnasında ara ürün olarak bir miktar üretilmektedir fakat hücre içindeki ROS miktarı antioksidan ajanlar tarafından dengelenmektedir. Çeşitli sebeplerle (hipoksi, besin yetersizliği, sitokinler veya mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesi) bu dengenin bozulmasıyla hücrede yüksek miktarda bulunan ROS, mitokondrinin elektron taşıma zincirindeki proteinlerle reaksiyona girerek mitokondriden daha fazla endojen ROS üretimine sebep olur. DNA, protein, lipit gibi biyomoleküllere zarar veren bu durumun hasarlı mitokondrinin ortadan kaldırılmasıyla düzeltilmesi amaçlanır (38).

Hasarlı mitokondrinin seçici olarak otofajik yıkımını tanımlayan “mitofaji” terimi 2005 yılında Dr. Lemasters tarafından önerilmiştir (39). Parkinson hastalığıyla ilişkili olan Parkin proteininin, 2008 yılında Youle ve ekibi tarafından mitokondri zarını depolarize ederek mitokondrinin yıkımına sebep olduğunun gösterilmesinden sonra mitofaji konulu araştırmalar hızlanmış ve çeşitli mitofaji-ilişkili yolak ortaya çıkarılmıştır (40, 41). Yine aynı yıllarda Parkinson hastalığıyla ilişkili bir başka protein olan PINK1’in mitokondrinin füzyon/fizyon dinamiklerinde rol oynadığı ve Parkin ile ilişkisi gösterilmiştir (42, 43).

PINK1 geni bir serin/treonin kinaz kodlamaktadır ve bu gendeki fonksiyon kaybına sebep olan mutasyonların otozomal çekinik erken başlangıçlı Parkinson hastalığına sebep olduğu bilinmektedir. Beyinde yüksek miktarda ifade edilmektedir normal koşullarda mitokondrideki MPP ve PARL tarafından proteolitik olarak kırılıp sitozole geri salınmaktadır. Sitozoldeki 52-55 kDA’lık olgun PINK1’in nöronun

oluşumunda, gelişiminde, hayatta kalmasında, farklılaşmasında ve plastisitede rol oynadığı düşünülmektedir (44). Mitokondrinin membran potansiyelindeki değişim ile proteolitik kırılması gerçekleşmeyen PINK1 dış zarda birikir ve mitokondri içine alınması gereken proteinlerin geçişini bloklar. PINK1'in otofosforilasyonu mitofaji başlar. PINK1 aynı zamanda Parkin ve ubikuitini de fosforillemektedir. Sitozolde baskılanmış halde bulunan Parkin fosforillenmiş ubikuitin ile etkileştiğinde yapısı değişir ve aktifleşir. Aktif Parkin mitokondrinin dış membranında konumlanır ve membrandaki diğer proteinleri ubikuitinler. Yoğun poliubikuitinlenme otofagozom için bir sinyaldir ve hasarlı mitokondriyi içine alan otofagozom lizozom ile füzyona uğrar. Bunun sonucunda hasarlı mitokondri lizozomal enzimler tarafından yıkıma uğrar (45, 46) (Şekil 10).

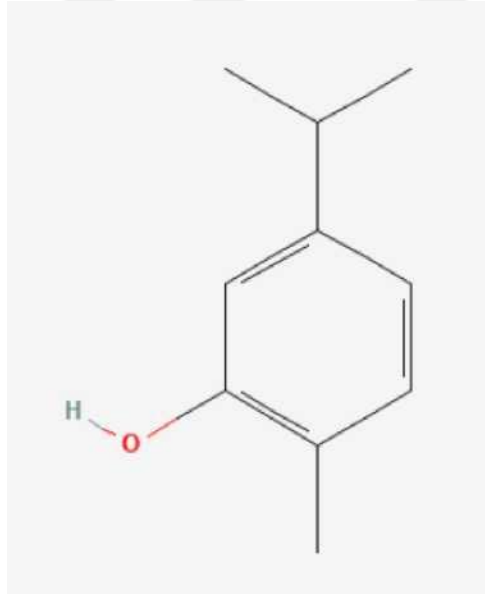


Şekil 10. Mitofaji modeli (46).

Araştırmalarda mitokondriyal hasarın önüne geçtiği gözlenen bazı potansiyel terapötikler; süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler; glutasyon, ürik asit, bilirubin, melatonin gibi enzim olmayan antioksidanlar; E,C ve A vitaminleri; polifenoller (flavonoidler, fenolik bileşikler ve fenolik asitler) ve laktoferrindir (38).

2.10. Karvakrol

Son zamanlarda çeşitli hastalıklar için potansiyel terapötikler olduğu düşünölen doğal fenolik bileşikler, hidroksil grupları sayesinde serbest radikallere tutunarak hücredeki oksidatif stresi azaltabilmektedirler (47). Yüksek antioksidan özellikleriyle bilinen katekin, kurkumin, kuersetin gibi fenolik bileşikler *in vitro* ve *in vivo* Parkinson modellemelerinde serbest radikallere tutunmuş, mitokondriyal kompleks 1'in baskılanmış aktifliğini arttırmış, Nrf2 sinyal yolağını aktifleştirerek antioksidan genlerinin ifadesini arttırmış, dolayısıyla da hücrelerdeki oksidatif stresi azaltmıştır (48-50) Bir araştırmada, SH-SY5Y hücrelerine 6-OHDA ile muamele edilmesiyle mimik edilen PH modellemesine naringin uygulanması, Nrf2 geninin ifadesini arttırarak endojen antioksidan kodlayan genleri aktifleştirmiştir. Nrf2 genini susturdıklarında ise naringin koruyucu etkisini gösterememiştir (51).



şekil 11. Karvakrolün moleküler yapısı (PubChem)

Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) doğal fenolik bir monoterpoid'tir (şekil 11). Kekik bitkisinin birçok türünün esansiyel yağında (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Origanum onites*) bulunmaktadır. Düşük miktarlarda kullanımı zararsız olmakla birlikte

kullanımı FDA tarafından onaylıdır. Paketli gıdalarda koruyucu ve aroma verici olarak kullanılmaktadır. Karvakrolün antimikrobiyal, antiviral, antikarsinojenik, antioksidan, anti-enflamatuvar özelliklerinin bulunduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (52) (Şekil 12). Karvakrol, hidroksil grubu sayesinde serbest radikalleri uzaklaştırabilmektedir. Alzheimer ve Parkinson modellerinde olumlu sonuçlar göstermiş bir bileşiktir (53, 54)



Şekil 12. Karvakrolün farmakolojik etkileri (52).

6-OHDA ile PH modellemesi yapılan sıçanlara karvakrol ile önceden muamele edildiğinde karvakrolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde dopamin nöronlarının dejenerasyonunun engellendiği ve motor semptomların düzeldiği gözlenmiştir. Bu sıçanların hipokampus ve striatumunda yapılan incelemelerde karvakrolün lipid peroksitletmesini düşürdüğü de saptanmıştır (55, 56). Başka bir nörotoksin olan reserpin ile oluşturulan bir PH modelinde de dopaminerjik nöron biyobelirteçlerinin arttığı ve motor semptomların düzeldiği görülmüştür (57). Karvakrol ile muamele sonucunda *in vivo* PH modellerinde, malondialdehit gibi oksidatif stres belirteçlerinin miktarı ve kaspaz-3 gibi apoptoz belirteçlerinin aktiviteleri azalmış, bununla birlikte glutasyon gibi antioksidan moleküllerin miktarları artmıştır (58, 59). Bir başka araştırmada ise sıçanlarda oksidatif stres oluşturmak için 6-OHDA yerine kadmiyum kullanılmış ve karvakrolün oksidatif stresi Nrf2/HO-1 (hem oksijenaz-1) yolağı üzerinden azalttığı belirtilmiştir (60). *In vitro* PC-12 hücrelerine 6-OHDA ile muamele edilerek oluşturulan PH modelinde hücreler erken apoptoza uğramıştır. Karvakrolün doza bağımlı olarak bu etkiyi tersine çevirdiği ve aynı zamanda da 6-OHDA ile indüklenen ROS artışını da engellediği gözlemlenmiştir (59). Bir çalışmada H₂O₂ye maruz bırakılarak 6-OHDA'nın etkisine benzer bir şekilde oksidatif stres

oluşturulan *in vitro* SH-SY5Y hücreslerinde karvakrol, HO-1 enzimi üzerinden antioksidan etki göstermiştir. HO-1'in ekspresyonunun, bir antioksidan transkripsiyon faktörü olan Nrf-2 tarafından kontrol edildiği bilinmektedir fakat bu tez çalışmasında karvakrolün Nrf-2 ekspresyonuna etkisi araştırılmamıştır (61). *In vitro* SH-SY5Y hücreslerinde 6-OHDA ile indüklenen oksidatif stres koşullarında Nrf2'nin, PH ile ilişkili olduğu bilinen PINK1 geninin ifadesini arttırdığı da bildirilmiştir (62).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel, kontrollü bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Şubat 2024 - Ocak 2025 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmada SH-SY5Y hücre hattı üzerinde çalışılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan SH-SY5Y hücre hattı ATCC'den temin edilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı Değişken: BCL-2, BAX, CYT-C ve PINK-1 gen ifadeleri

Bağımsız Değişken: Karvakrol

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve diğer malzemeler Tablo 1 ve Tablo 2'de markalarıyla belirtilmiştir.

3.6.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Cihaz	Marka / Model	Kullanım Amacı
Laminar Akışlı Biyogüvenlik Kabini	Nuve / LN 090	Hücrelere muamele edilmesi
Karbondioksit Inkübatör	Nuve / EC 160	Hücrelerin idamesinde optimal koşullar sağlar
Faz-Kontrast Mikroskop	Olympus / CK X 41	Hücre morfolojisinin incelenmesi
Su Banyosu	Nuve NB9	Besiyerini 37 dereceye ısıtmak
Santrifüj	Hettich / Rotanta 460R	Hücre çöktürmek
4°C Buzdolabı	Beko	Sarf malzemelerin idamesi
-20°C Derin Dondurucu	Beko	Sarf malzemelerin idamesi, uzun süreli DNA örneği saklama
-80°C Derin Dondurucu	Hettich / HT5786- A	Donuk hücre ve proteinlerin uzun süreli saklanması
Mikropipet Seti	Eppendorf	Pipetleme işlemi için, çeşitli deneylerde
Mikrosantrifüj	Eppendorf	Nükleik Asit/Protein izolasyonlarında çöktürme işlemi için
Vorteks	Labnet	Çözünmeyi sağlamak
Hassas Elektronik Tartı	Precisa 205A SCS	6-OHDA ve Askorbik asit tartımı
Mikroplate Okuyucu	Multiscan	MTT testi, BCA testi ve RNA konsantrasyonu ölçümünde

Mikrodalga Fırın	Samsung	Agar tozunun çözünmesi için
Yatay Elektroforez Tankı	Thermo	Agaroz jelin döküleceği sistem
Güç Kaynağı	Biorad / PowerPac	Agaroz jel elektroforezine akım sağlayacak kaynak
Jel Görüntüleme Sistemi (UV Translüminatör)	Vilber	EtBr ile kalitatif DNA görüntülemesi için ultraviyole ışın sağlar
RT-qPCR Cihazı	Roche LightCycler480	/cdDNA'yı çoğaltmak için uygun sıcaklık döngüsünü sağlar
Kuru Isı Bloğu	Major Science	Protein denatürasyonunda kullanıldı
Dikey Elektroforez Tankı	Biorad / Mini-PROTEAN Tetra System	SDS-PAGE jelin kurulduğu sistem
Transfer Sistemi	Biorad / Trans-Blot Turbo	Jelden membrana protein transferini sağlayan sistem
Kemilüminesans Görüntüleyici	Azure / ChemiSOLO	Western membranında işaretlenen proteini görüntüleme

3.6.3. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları

Malzemeler	Marka	Kullanım Amacı
DMEM/F-12	Gibco™	Hücrelerin büyümesi için bazal ortam
FBS (Fatal Sığır Salini)	Gibco™	Büyüme ortamına eklenen serum

PBS (Fosfat Tamponlu Salin)	Gibco™	Hücrelerin yıkanması için kullanılan tampon
Penisilin/Streptomisin	Gibco™	Antibiyotik
Tripsin	Gibco™, Trypsin-Edta (0.25%), Phenol Red	Hücrelerin kaldırılması için kullanılan enzim
Hücre kültürü flaskları	Labselect (25 cm ² ve 75 cm ² , filtreli kapaklı)	Hücrelerin tutunacağı plastik yüzey
Hücre kültürü plateleri	Labselect (96-well ve 6- well)	Hücrelerin tutunacağı plastik yüzey
Kriyoj enik tüp	Biosharp	Hücrelerin dondururken kullanılan tüp
Serolojik pipetler	Labselect (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Hücrelerin ortamı yenilemek için
Santrifüj tüpleri	Labselect (15 mL, 50 mL)	Hücre çöktürmek için
PCR tüpü	Isolab	PCR reaksiyonu kurmak için
All-trans retinoik asit (ATRA)	Sigma-Aldrich	Hücrelerin nöronal fenotipe farklılaşmasını sağlayan ajan
6-hidroksidopamin (6-OHDA)	Sigma-Aldrich	Parkinson modeli oluşturmak için nörotoksin
L-Askorbik asit	Sigma-Aldrich	6-OHDA'nın oksitlenmesini engelleyen antioksidan
Karvakrol	Sigma-Aldrich, %98	Koruyucu etkisi test edilen ajan
MTT Kiti	Sigma-Aldrich	Hücre canlılığı testi

Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	MTT reaksiyonuyla oluşan formazan kristallerinin çözgeni
TRizol Reagent	Invitrogen	Hücre lizisi
Kloroform	Sigma-Aldrich	Faz ayrımının oluşması
İzopropanol	Sigma-Aldrich	RNA'nın çöktürülmesi için
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	RNA'dan cDNA sentezi için
RT-qPCR Kiti	Applied Biosystems™ Powerup SYBR Green Mastermix	İlgili transkriptin çoğaltılması için
Agar tozu	Sigma-Aldrich	Agaroz jelin hammaddesi
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich	DNA'yı konsantrasyona bağlı boyamak
TBS	Gibco™	Agar çözgeni, elektroforezlerde iletken ve Western blot yıkama tamponu.
Tween-20	Merck	Spesifik antikor bağlanması için yıkama ve bloklama solüsyonlarına eklenen sürfaktan
Yağsız Süt Tozu	Sigma-Aldrich	Spesifik olmayan antikor bağlanmasını önleyen ajan
RIPA Tamponu	Sigma-Aldrich	Hücre lizatı eldesinde

BCA Protein Assay Kit	Takara	Protein konsantrasyonu tayini
Akrilamid Jel	Bio-rad, Tgx Stain-Free Fast Cast Acrylamid Jel	Protein örneklerinin boyutlarına göre ayrışması için
Protein Marker	Thermo Scientific PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Protein örneklerinin boyutları için referans
PVDF Membran	Bio-rad, Trans-Blot Turbo Transfer Pack	Antikorların proteinlere ulaşabileceği ortamı sağlar
Anti-BCL2, Anti- BAX, Anti-CYT-C, Anti-PINK1, Anti-P- AKTIN Primer Antikorları	Proteintech	İlgili proteine tutunacak antikor
Anti-Mouse Sekonder Antikor, Anti-Rabbit Sekonder Antikor	Proteintech	Primer antikoru tanıyan ve HRP konjuge antikor
ECL Görüntüleme Solüsyonu	Biorad	Sekonder antikor üzerindeki HRP ile etkileşerek sinyal oluşturur

3.6.4. Kullanılan Metotlar

3.6.4.1. SH-SY5Y Hücre Hattının Çözdürülmesi ve Uygun Koşullarda İnkübe Edilmesi

Dondurulmuş hücreler çözülmeden önce ön hazırlık olarak besiyeri olarak kullanılacak olan, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 Penisilin/streptomisin içeren DMEM/F-12 +4°C'den çıkarılıp 37°C'deki su banyosuna bırakıldı. Besiyerinin hücreler için optimum sıcaklık olan 37°C'ye gelmesi beklenirken deneyin gerçekleştirileceği laminar akış kabini açıldı. Kabinin içi %70'lik etanol ile silindi. Kullanılacak olan mikropipet ucu,

serolojik pipet, 15 mL'lik falkon, T-25 flask ve ısınan besiyeri %70'lik etanolla silinerek kabin içerisine alındı. Ön hazırlık sonrasında 1 mL'lik dondurma ortamında bulunan SH-SY5Y hücreleri -80°C'den çıkarılacak 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlı bir şekilde - yaklaşık 3-4 dakikada- çözdürüldü. Çözünen hücreler beklemeden laminar akış kabinine alındı ve bir falkona aktarıldı. Üzerine 9 mL besiyeri eklendi. 120 g'de 6 dk santrifüjlenerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Falkon santrifüj cihazına yerleştirilirken karşısında denge olarak 10 mL su içeren falkon kullanıldı. Hücrelerin çökmesi beklenirken hücrelerin ekiminin yapılacağı T-25 flaskın üzerine hücre hattının ismi, pasaj numarası, tarih ve araştırmacının adı yazıldı. Flaskın içerisine 4 mL besiyeri serolojik pipet vasıtasıyla eklendi. Çöken hücreler yeniden laminar akış kabinine alındı, üzerlerindeki sıvı çekilip 1 mL besiyeri içerisinde hücreler yavaşça pipetaj yapılarak yeniden çözdürüldü ve 4 mL besiyeri içeren flaskın içerisine aktarıldı. Flask sağa sola ileri geri eğilerek hücrelerin flask yüzeyine eşit bir şekilde yayılması sağlandı. Hücreler invert mikroskop altında gözlemlendikten sonra sorun olmadığı gözlemlendiyse 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre bırakıldı. Kullanılan laminar akış kabini UV ışıkla sterilize edildi.

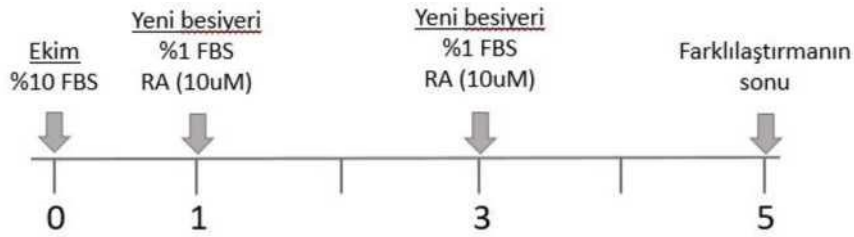
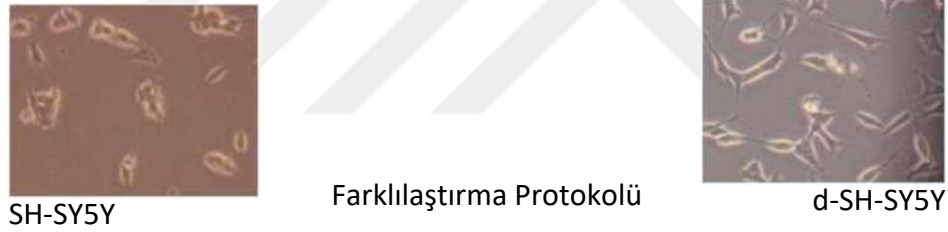
3.6.4.2. SH-SY5Y Hücre Hattının Pasajlanması ve Dondurulması

Her gün invert mikroskop altında gözlemlenen SH-SY5Y hücreleri, flask yüzeyinin %70'ini kapladığı gözlemlendiğinde yani %70 konfluent olduğunda hücrelere pasajlama işlemi uygulandı. Bunun için öncelikle ön hazırlık olarak besiyeri, PBS ve tripsin 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosu içerisinde ısınmaya bırakıldı. Laminar akış kabininin içi ve içeriye alınacak mikropipet ucu, serolojik pipet, falkon ve flask gibi malzemeler %70'lik etanolla silindi. Hücreler kabin içerisine alındı ve üzerlerindeki ortam serolojik pipet ile hücreler kaldırılmadan çekildi. 1 mL 1X PBS hücrelerin üzerine yavaşça verildi. Flaskı sağa sola eğerek her yere nüfuz etmesi sağlanan PBS de serolojik pipet ile hücreler kaldırılmadan çekildi. Böylelikle kalan atık ve FBS içeren besiyeri kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmış oldu. Hücrelerin üzerine 1 mL tripsin eklendi ve flask 3 dk boyunca 37°C'de inkübe edildi. 37°C'de aktifleşen tripsin hücre-matriks proteinlerini enzimatik olarak parçalayarak yüzeye tutunan hücrelerin yüzeyden kopmalarını sağladı. 3 dk'nın sonunda invert mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendiyse protokole devam edildi.

Gözlenmediği durumlarda hücreler tekrar inkübatöre kaldırılarak tripsine 1 dk daha maruz bırakıldı. Yüzeiden ayrılan hücrelerin tripsinin katalitik aktivitesiyle zarar görmelerini engellemek için flaska tripsinin 3 katı hacimde yani 3 mL besiyeri eklendi. Böylelikle besiyerinin içinde bulunan FBS ile tripsinin aktivitesini yitirmesi sağlandı. Flasktaki sıvı birkaç kez çek bırak yapılarak yüzeye yapışık kalan hücrelerin de fiziksel kuvvetle ayrılması sağlandı. Flasktaki hücreleri içeren sıvının tamamı bir falkona aktarıldı ve 120g'de 6 dk boyunca santrifüjlendi. Çöken hücrelerin üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL besiyerinde pipetajla çözdürüldü. Hücreler 1:2 oranında seyreltilerek yeni flaslara ekildi. Yeni flaskların üzerine pasaj numarası bir sayı artırılarak yazıldı. Dondurulacak olan hücreler ise pasajlama protokolündeki gibi çöktürülüp üzerlerindeki sıvı çekildikten sonra besiyeri yerine %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %20 FBS içeren dondurma ortamında çözüldüler. Falkondan kriyojenik tüpe aktarılıp iki aşamada donduruldular. Önce -20°C'de 3 saat inkübe edilip uzun süreli saklama için -80°C'ye kaldırıldılar.

3.6.4.3. SH-SY5Y Hücre Hattına Sinir Hücresi Fenotipinin Kazandırılması

Şekil 13. Proliferatif SH-SY5Y nöroblastom hücre hattını nörojenik farklılaşması için



uygulanan protokol.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda SH-SY5Y hücrelerine nöron fenotipi kazandırılması, FBS oranı %1'e düşürülmüş ve 10 retinoik asit içeren besiyeriyle 5 günde Şekil 13'te özetlenen protokolle gerçekleştirilmiştir. Retinoik asit hızlı okside olan bir molekül olduğu için karanlık ortamda çalışılmıştır. Farklılaştırma ortamı için öncelikle 660 mM'lık retinoik asit ara stoğu %1 FBS'li besiyeri ile 1:10 oranında seyreltilerek 66 mM konsantrasyonlu yeni bir ara stok elde edildi. Bu ara stoktan 7.5 çekilerek total hacmi 50 mL olan %1 FBS'li besiyeri içerisine eklendi. Pipetajla ve falkonu ters-düz yapılarak retinoik asidin homojen bir şekilde karışması sağlandı. Hazırlanan bu farklılaştırma ortamının falkonu alüminyum folyo ile kaplanarak ortamın ışık almaması sağlandı. Farklılaştırma ortamı, ortamın yenileneceği her gün taze olarak hazırlanmıştır. Hücre ekiminden 24 saat sonra besiyeri farklılaştırma ortamıyla değiştirilmiş ve flask/plate alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunmuştur. İki günde bir hücrelerin ortamı yenilenmiş ve protokolün birinci, üçüncü ve beşinci günlerinde hücrelerin 4X, 10X ve 20X büyütülmüş görüntüleri fotoğraflanmıştır. 5 günlük farklılaştırma protokolü sonunda hücrelere deney prosedürüne göre işlem uygulanmıştır.

3.6.4.4. 6-OHDA Nörotoksininin d-SH-SY5Y Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması ve Bulunan CC50 Değeriyle Parkinson Hastalığının Modellenmesi

Bu protokol spektrofotometrik ölçüme kadar biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi. 6-OHDA nörotoksin, DMSO ise toksindir. Hücrelerin ekimi 96-well plate'e kuyu başına 15.000 hücre ve her grup üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Ekim %10 FBS'li DMEM/F-12 ortamıyla gerçekleştirildi. 24 saat sonra farklılaştırma ortamına geçildi. Farklılaştırma protokolünün sonunda belirlenen dozlar uygulandı. 6- OHDA dozu taze olarak, protokolü uygulamadan hemen önce hazırlandı. Toz haldeki 6-OHDA ana stoğu %0,02 askorbik asit içerecek şekilde hazırlanan steril su içerisinde pipetajla ve vorteksenerek çözüldü. Bu çözelti ve dilüsyonlarının ışığa maruziyetini en aza indirmek için karanlık ortamda çalışıldı ve çözeltileri içeren tüpler alüminyum folyo ile sarıldı. Dilüsyonlar %1 FBS'li ortam ile gerçekleştirildi. Dozu uyguladıktan 24 saat sonra MTT protokolü uygulandı. Bunun için hücrelerin ortamının üzerine 10 uL MTT reaktifi (Sigma Aldrich, #M2128) eklenerek hücreler 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında hücrelerin üzerindeki sıvı tamamen çekildi ve kuyulara DMSO verildi. Bu işlem olabildiğince karanlık bir ortamda gerçekleştirildi. DMSO kuyuya verildikten sonra yapılan pipetaj ile formazan kristallerinin

çözünmesi sağlandı ve sıvının mor renk aldığı gözlemlendi. Son durumda plate'in görüntüsü Şekil 14'te gösterilmiştir. Kuyuların 540 nm'deki absorban değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.



Şekil 14. MTT protokolü uygulanan plate'in görüntüleme öncesindeki görüntüsü.

3.6.4.5. Karvakrolün SH-SY5Y Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Proliferatif Etkilerinin Araştırılması

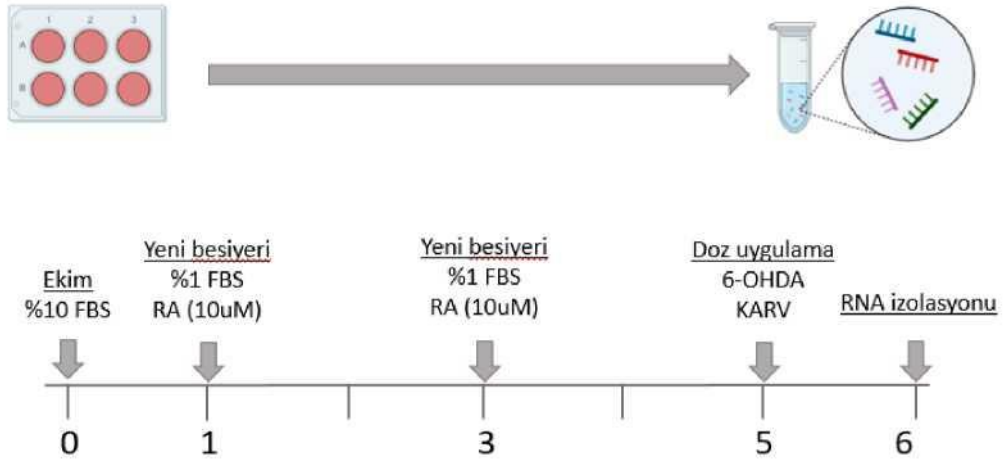
Bu protokol spektrofotometrik ölçüme kadar biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi. Hücrelerin ekimi 96-well plate'e kuyu başına 15.000 hücre ve 3 tekrarlı gruplar olacak şekilde yapıldı. Ekim %10 FBS'li DMEM/F-12 ortamıyla gerçekleştirildi. 24 saat sonra farklılaştırma ortamına geçildi. Karvakrol %1 FBS'li besiyeri ile literatüre göre belirlenen dozlara seyreltilip hücrelerin ortamına katıldı. Dozu uyguladıktan 24 saat sonra bölüm 3.6.4.4'teki MTT protokolü aynı şekilde uygulandı.

3.6.4.6. Karvakrol Tedavisinin 6-OHDA ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Apoptoz ve Mitofaji İlişkili Genlerin İfadesine Etkisinin mRNA Seviyesinde Araştırılması

d-SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA ile oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde Karvakrol tedavisinin mRNA seviyesinde nöroprotektif etkisi RT-qPCR ile araştırılmıştır.

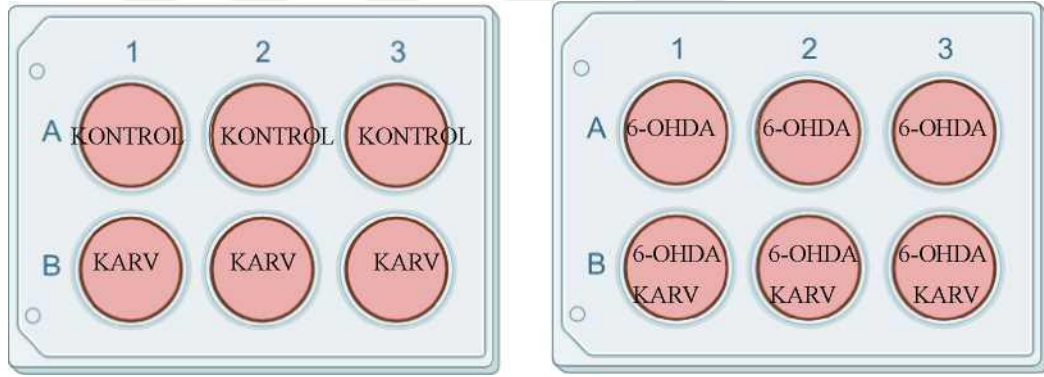
a) RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için uygulanan protokol Şekil 15'te şematize edilmiştir.



Şekil 15. RNA izolasyonu için uygulanan protokolün zaman çizelgesi.

Total RNA izolasyonu için 2 adet 6-well plate'e kuyu başına 300.000 hücre ekildi. Plate düzeni aşağıdaki Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. 6-well plate'e ekimi yapılan hücreler deney grupları ve tekrar sayılarıyla gösterilmiştir. NK=Negatif Kontrol Grubu, KARV=Karvakrol Grubu.

6. günün sonunda (doz uyguladıktan 24 saat sonra) hücreler hücre kazıyıcı ile plate'in yüzeyinden kazınarak ayrılıp bir falkona aktarıldı. Aynı gruba ait hücreler aynı falkonun içerisinde birleştirildi. 4 grup da 4600 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Çöken hücrelerin üzerindeki sıvı kısım (süpernatant) uzaklaştırıldı ve peletin üzerine 4 mL 1X PBS eklendi. Pelet PBS içerisinde çözündürülmeden doğrudan 4600 rpm'de 15 dk boyunca santrifüjlenerek yıkama yapılmış oldu. Süpernant uzaklaştırıldı ve pelet 1 mL Trizol (Thermo, #15596018) içerisinde çözündürüldü. Pelet tamamen çözündükten sonra örnek 1.5 mL'lik bir ependorfa aktarılıp 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında üzerine 200 kloroform eklendi. Tüp sallanarak kloroformun her yere eşit bir şekilde yayılması

sağlandı. Faz ayrışması için 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 12.000 g'de +4°C'te 15 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda üstte gözlenen şeffaf sıvı faz mikropipetle dikkatlice çekilerek temiz bir ependorf tübe aktarıldı. Bu aşamada DNA kontaminasyonunu önlemek için beyaz renkli ara faza dokunmamaya özen gösterildi. Yaklaşık 500 µL RNA içeren sıvı faz temiz bir tübe aktarıldıktan sonra üzerine aynı hacimde izopropanol eklendi. Tüp yavaşça 5-6 kez ters-düz edildi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 12.000 g'de +4°C'te 10 dk santrifüjlenip süpernant uzaklaştırıldı ve pelete 1 mL %75 etanol eklenip çok kısa vorteksledi. 7600 g'de +4°C'te 5 dk santrifüjlendi. Süpernant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 30-35 dk boyunca kurumaya bırakıldı. Peletler kuruduktan sonra 30 RNaz içermeyen suda çözüldü. 55°C'ye ayarlanan su banyosunda 10 dk inkübe edildi. İzole edilen nükleik asit konsantrasyonu spektrofotometre cihazında ölçüldü. 230 nm, 260 nm ve 280 nm'de yapılan okumalar sonucunda nükleik asit konsantrasyonu ve saflığı hesaplandı.

b) *cDNA Sentezi*

cDNA sentezi için yaklaşık 2 µg RNA örneği kullanılarak cDNA sentez kitinin (Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Katalog no: 4368814) protokolü uygulandı. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve kullanım miktarları Tablo 3'te verilmiştir. Reaksiyonun toplam hacmi 20 µL'dir.

Tablo 3. cDNA sentez kiti bileşenleri.

Bileşenler	Bir Örnek için Bileşen Hacmi
10X RT Tampon Çözelti	2
25X dNTP Karışımı	0,8
10X RT Random Primerler	2
Ters Transkriptaz	1 µL
Nükleaz içermeyen su	4,2 µL
2X Master Karışımın Toplam Hacmi	10 µL

c) *RT-qPCR*

Sentezlenen cDNA kurulacak olan RT-PCR için kalıp olarak kullanıldı. Öncelikle cDNA 1:3 oranında seyreltilti. PCR karışımı, Powerup SYBR Green Mastermix

(Appliedbiosystems, A25741) kitinin protokolüne uygun olarak hazırlandı. PCR karışımı 5 μ L 2X Master mix, 0,5 μ L ileri primer, 0,5 μ L geri primer ve 4 μ L kalıp cDNA kullanılarak toplam hacim 10 μ L olacak şekilde hazırlandı. Primer dizileri Tablo 4'te verilmiştir. 96-well PCR plate'e yüklenen PCR karışımı Roche LightCycler480 cihazında kitte tavsiye edilen termal döngü ayarlarıyla gerçek zamanlı olarak kantifiye edildi.

Tablo 4. RT-qPCR deneyinde kullanılan primerlerin nükleotit dizileri.

AKT-B	İleri Primer	5' -CACCATGGCAATGAGCGGTTC- 3'
	Geri Primer	5' -AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT- 3'
BCL-2	İleri Primer	5' -ACCTGACGCCCTTCAC- 3'
	Geri Primer	5' -AGGTACTCAGTCATCCAC - 3'
BAX	İleri Primer	5' -AAGAAGCTGAGCGAGT- 3'
	Geri Primer	5' -GCCCATGATGGTTCTG- 3'
CYT-C	İleri Primer	5' -TGGGTGATGTTGAGAAAGG- 3'
	Geri Primer	5' -TTTGTTCCAGGGATGTACT- 3'
PINK1	İleri Primer	5' -GTGGACCATCTGGTTCAACAGG- 3'
	Geri Primer	5' -GCAGCCAAAATCTGCGATCACC- 3'

d) Agaroz Jel Elektrofrez

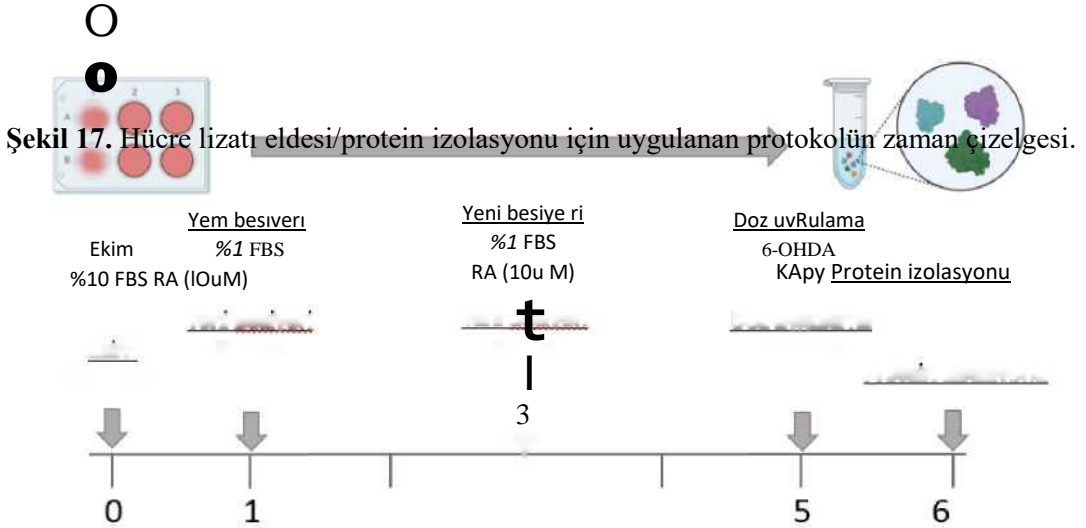
RT-qPCR sonucunda elde edilen ampliconların varlığını kalitatif olarak tespit etmek ve primer bağlanmasının spesifik olduğunu görmek için PCR ürünleri jel elektrofrez sistemine yüklenerek görüntülendi.

%2,5 konsantrasyonda agaroz jel için, 1,25 gram agar tozu 50 mL 1X TAE (Tris-asetat EDTA) tampon içerisinde mikrodalga fırında çözdürüldü. Bir miktar soğuduktan sonra içerisine 4 µL etidyum bromür eklenip iyice karıştırıldı, beklemeden yatay elektrofrez tankına döküldü ve tarak yerleştirildi. Jel tamamen polimerize olunca (yaklaşık 30 dk) tarak dikkatlice çıkarıldı. Tank içerisine jelin üzerini 2-3 mm geçecek kadar 1X TAE tamponu eklendi. 2 µL 6X Loading Dye ile 10 µL PCR ürünü karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Örnekler 120V'ta 50 dk yürütüldükten sonra UV translüminatör aracılığıyla görüntülendi.

3.6.4.7. Karvakrol Tedavisinin 6-OHDA ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Apoptoz ve Mitofaji İlişkili Genlerin İfadesine Etkisinin Protein Seviyesinde Araştırılması

a) Protein izolasyonu

Hücre lizatı elde etmek için uygulanan protokol Şekil 17'de şematize edilmiştir.



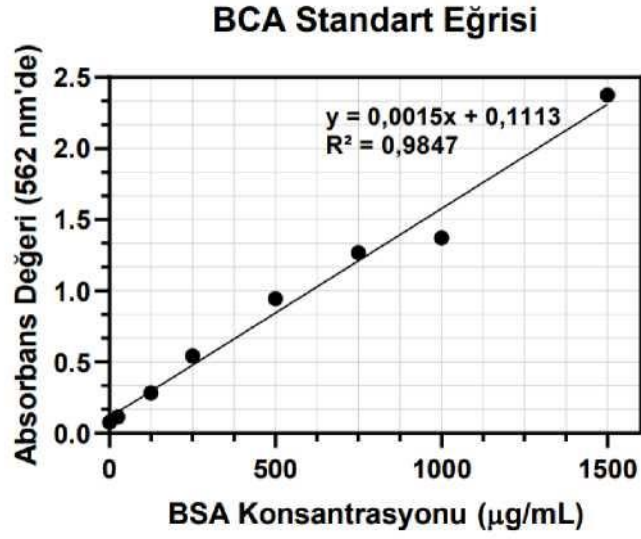
Protein izolasyonu için 2 adet 6-well plate'e kuyu başına 300.000 hücre ekildi. Plate düzeni Şekil 16'te gösterilmiştir. Hücrelere 6 gün boyunca uygulanan farklılaştırma ve doz uygulamaları içeren protokol Şekil 17'te gösterilmiştir. 6. günün sonunda (doz uygulandıktan 24 saat sonra) hücreler hücre kazıyıcı ile plate'in yüzeyinden kazınarak ayrılıp bir falkona aktarıldılar. Aynı gruba ait hücreler aynı falkonun içerisinde birleştirildiler. 4 grup da +4°C'de 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Supernant atıldı ve pelet üzerine 4 mL 1X PBS eklenerek +4°C'de 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Supernant atıldı ve pelete 70 µL xTractor tamponu (Takara katalog no: 635671) eklendi. Kısa bir vorteksin ardından oda sıcaklığında 10 dk hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. +4°C'de 12.000g'de 20 dk boyunca santrifüjlendi ve proteini içeren sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı. Elde edilen protein örnekleri western blot deneyine kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Tablo 5. Western blot deneyinde kullanılan antikörlerin katalog numaraları ve dilüsyon oranları.

Antikor	Katalog No	Dilüsyon
Anti-Bcl-2 Monoklonal	68103-1-Ig	1:5.000
Anti-Bax Monoklonal	60267-1-Ig	1:10.000
Anti-Cytc Monoklonal	66264-1-Ig	1:5.000
Anti-Pinkl Poliklonal	23274-1-AP	1:1.000
Anti-B-Actin Monoklonal	66009-1-Ig	1:10.000
Anti-Mouse Sekonder	SA00001-1	1:20.000
Anti-Rabbit Sekonder	SA00001-2	1:20.000

b) Protein Miktar Tayini

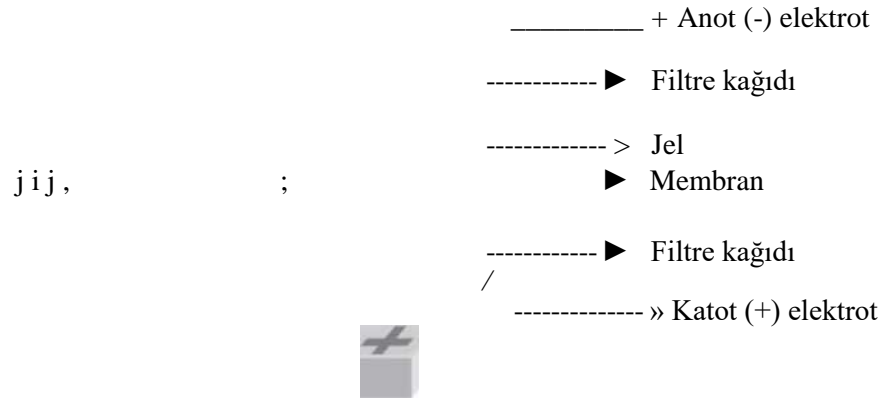
Örneklerdeki toplam protein miktarı BCA protein assay kitinin (Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit katalog no: 23227) protokolü uygulanarak belirlendi. Oluşturulan BCA standart eğrisi Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. Bisinkonik asit (BCA) yöntemiyle oluşturulan standart eğrisi.

c) Western Blot

Proteinlerin büyüklüklerine göre jelde ayrılması işlemi için %10'luk akrilamid jel (Biorad, #456-8123) kullanıldı. Jel, Mini-Protean Elektroforez tankına yerleştirildi, sistem running tamponu ile dolduruldu ve tarak dikkatlice çıkarıldı. Protein lizatı 1:3 (tampon:lizat) oranında 4X Laemmli Tamponu (yükleme tamponu) ile karıştırılıp 95°C'ye ayarlanan ısı bloğunda 5 dk inkübe edildi. Böylelikle hem proteinlerin denatüre olması hem de jelde yürürken gözlenebilir olmaları sağlandı. Kuyulara 20 µL örnek ve bir kuyuya da protein marker yüklendi. Proteinlerin jelde migrasyonu 300V'da 20 dk'da gerçekleştirildi. Proteinlerin jelden membrana transfer olacağı blotlama aşamasında PVDF membran (Biorad) ve Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Biorad) kullanıldı. Membran-jel sandviçi Şekil 19'de gösterildiği gibi hazırlandı.



Şekil 19. Membran-jel sandviç sisteminin düzeni.

Membran ve jel arasında hava baloncuğu olmadığından emin olduktan sonra hazırlanan sandviç sisteme yerleştirildi. Transfer gerçekleşirken bloklama tamponu (%5 yağsız süt tozu) PBS-T içerisinde hazırlandı. Transfer sonrasında membran jelden dikkatlice ayrılarak bloklama tamponuyla oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Bu sürede primer antikor bloklama tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı. Antikorum çeşidine göre dilüsyon oranı değiştiğinden antikorumların dilüsyon oranları Tablo 5’te verilmiştir. Bloklama sonunda tampon döküldü ve hazırlanmış olan primer antikor membran üzerine eklendi. Antikorum membranın her yerine temas ediyor olmasına özen gösterildi. Membran oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Sonrasında sırasıyla 5dk, 15dk, 5dk ve 5dk’lık yıkamalar PBS-T ile gerçekleştirildi. 1:20.000’lik sekonder antikor PBS-T ile hazırlandı. Yıkamalardan sonra membran sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor bağlanmasından sonra membran yeniden 5dk, 15dk, 5dk ve 5dk PBS-T ile yıkayıp bağlanmayan antikorumların ortamdan uzaklaşması sağlandı. Yıkamalar bitince görüntülemeye kadar kurumasını önlemek için membranın üzerine PBS eklendi. Görüntüleme için membran ECL solüsyonuna maruz bırakıldı ve proteinler kemilüminesans görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

3.7. Araştırma Planı

Ekim-Aralık 2023	Ön çalışma deneylerinin yapılması
Ocak-Nisan 2024	SH-SY5Y hücre hattına nöron karakteri kazandırılması
Mart-Temmuz 2024	6-OHDA'nın SH-SY5Y hücrelerine olan sitotoksik etkisini araştırarak CC50 değerinin belirlenmesi
Mart-Temmuz 2024	Karvakrolün SH-SY5Y hücrelerine olan sitotoksik ve proliferatif dozlarını araştırarak tedavi için en uygun dozların belirlenmesi
Mayıs-Eylül 2024	Karvakrolün 6-OHDA sitotoksitesine karşı tedavi edici dozunun belirlenmesi. RNA ve protein izolasyonları.
Ekim-Kasım 2024	Karvakrolün apoptoz ve mitofaji ilişkili genlerin ifadesi üzerindeki etkisinin RT-qPCR ile araştırılması
Ekim -Kasım 2024	Karvakrolün apoptoz ve mitofaji ilişkili proteinler üzerindeki etkisinin Western blotlama ile araştırılması
Kasım2024-Aralık 2024	Tekrar deneyleri ve tez yazımı

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

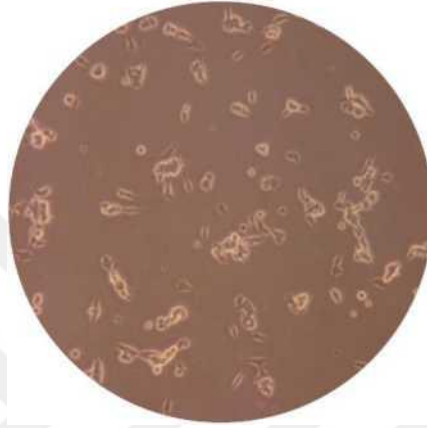
Deneyler en az üçer tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. MTT deney sonuçlarının istatistiksel analizleri Student's t-Test ile, RT-qPCR ve Western Blot sonuçlarının istatistiksel analizleri ANOVA Testi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart hata şeklinde özetlenmiştir. $p < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

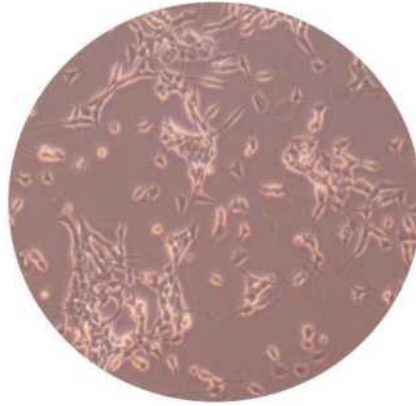
4.1. SH-SY5Y Hücre Hattını Farklılaştırma Protokolü Bulguları

%1 FBS DMEM/F-12 KONTROL
(%1 FBS DMEM/F-12)

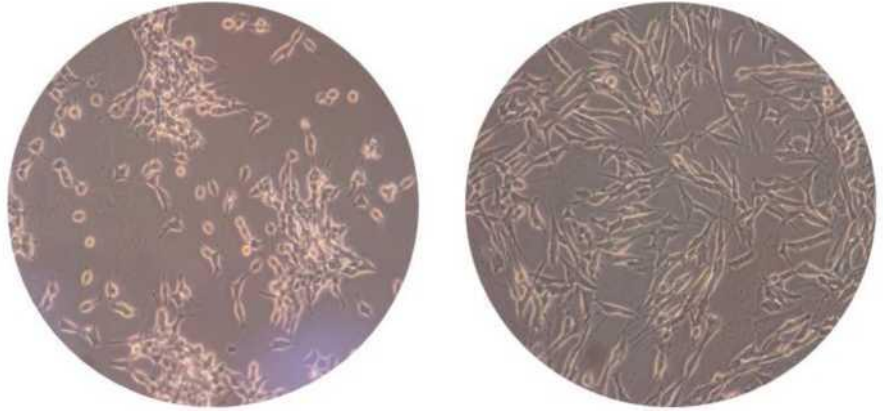
+
10 μ M ATRA



3. GÜN

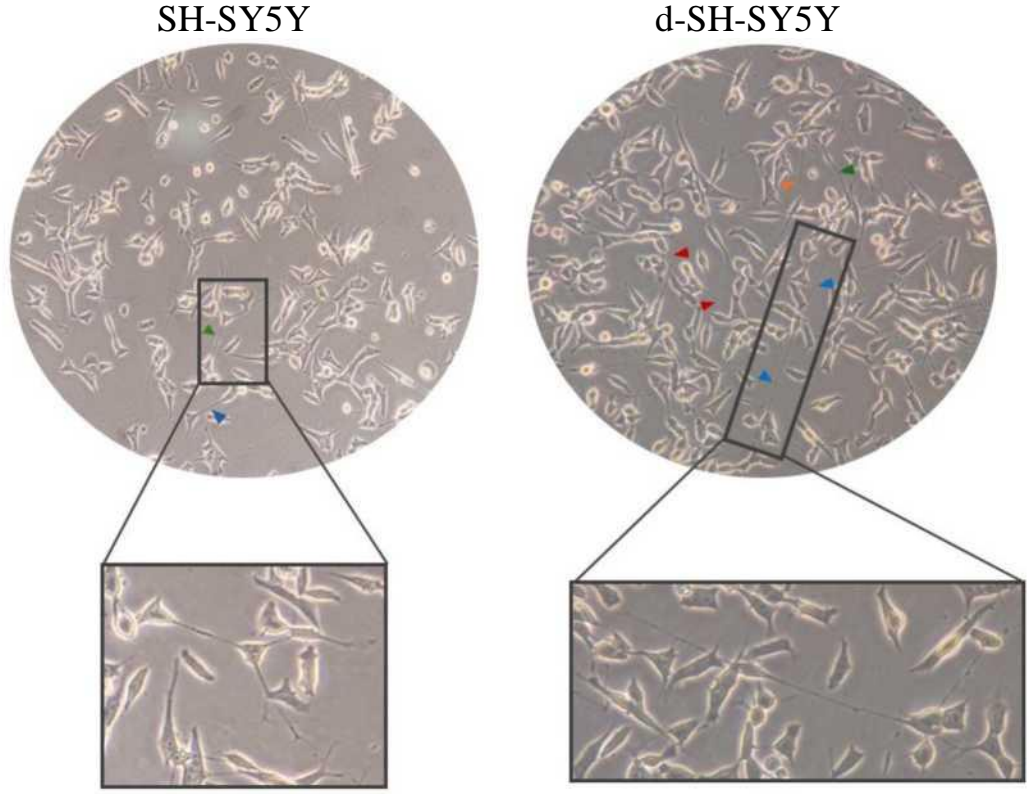


5. GÜN



Şekil 20. Nörojenik farklılaştırma protokolünün 1., 3. ve 5. günlerinde ters ışık mikroskopunda alınan hücre görüntüleri.

SH-SY5Y hücrelerine nöron fenotipi kazandırmak için 5 günlük bir farklılaştırma protokolü uygulanmıştır. Üçüncü günden itibaren hücrelerin fenotipinde farklılıklar gözlenmeye başlanmıştır. Kontrol grubundaki hücreler kümeleşmeye başlamışken, deney grubundaki hücreler ise homojen dağılımlarını koruyup nöronal uzantılarını artırmışlardır. Bununla birlikte deney grubundaki hücreler kutuplaşarak piramidal bir sinir hücresi fenotipi kazanmaya da başlamışlardır. Protokolün sonunda ise kontrol grubundaki hücrelerin kümeleşmesinin arttığı, deney grubundaki hücrelerin ise nöronal uzantılarının ve piramidal şekillerinin daha da belirginleştiği gözlenmiştir (Şekil 20) .

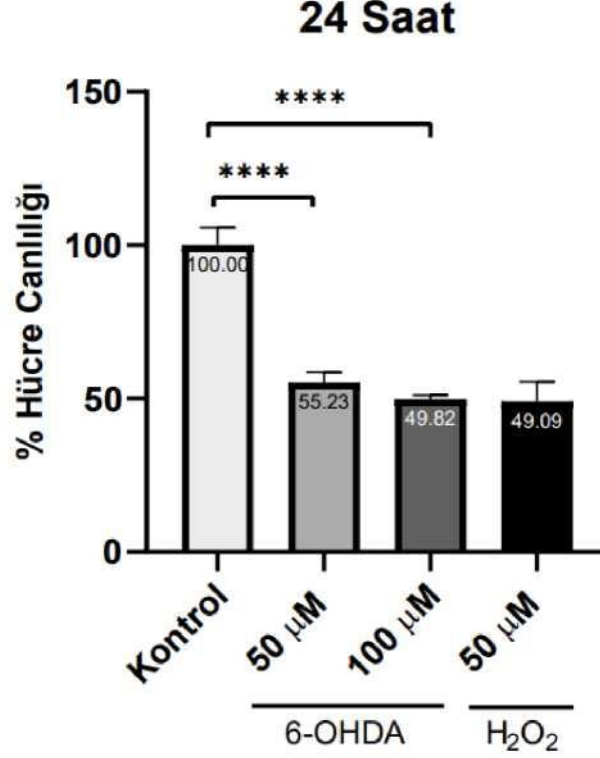


Şekil 21. (solda) Standart besiyerinde idame ettirilen SH-SY5Y hücreleri ile (sağda) nörojenik farklılaşma protokolü uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin (d-SH-SY5Y) ters ışık mikroskobu ile alınan görüntüleri.

Şekil 21’de hücrelerin bağlantı oluşturmuş nöronal uzantıları ok başı ile işaretlenmiştir. Aynı renkteki ok başları aynı SH-SY5Y hücresine ait olan uzantıları işaretlemek için kullanılmıştır. d-SH-SY5Y hücrelerinin nöronal uzantılarının sayısı ve uzunluğu SH-SY5Y hücrelerine göre daha fazladır.

4.2. MTT Deney Bulguları 4.2.1. 6-

OHDA Sitotoksosite Deneyi

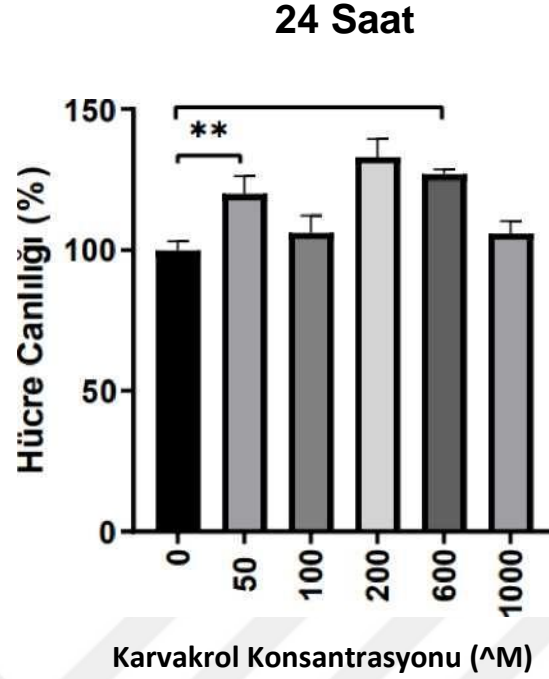


Şekil 22. d -SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı 6-OHDA dozlarının 24 saatin sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi (****p<0,0001).

Farklılaştırılmış hücrelere uygulanan 50^µM ve 100^µM 6-OHDA dozlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testiyle kolorimetrik olarak ölçülen değerlerden hesaplanmıştır. Hücre canlılığının her iki dozda da anlamlı olarak %50'ye yakın oranda düştüğü gözlenmiştir (Şekil 22).

4.2.2. Karvakrol Sitotoksosite Deneyi

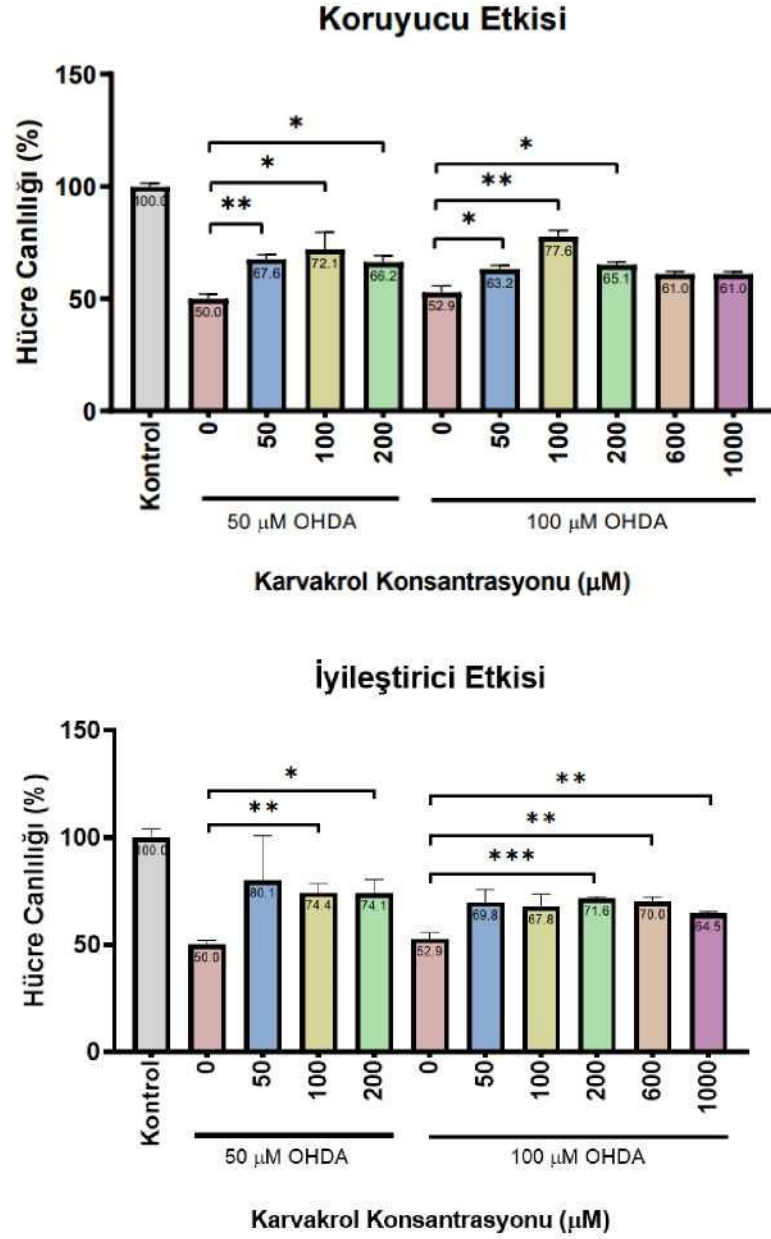
Karvakrolün d-SH-SY5Y hücrelerinin canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. 50, 100, 200, 600 ve 1000 ^µM dozlarında KARV ile 24 saat muamele edilen hücrelerde 50, 200 ve 600 ^µM KARV dozları hücre proliferasyonunu arttırmıştır. Uygulanan hiçbir dozda sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 23).



Şekil 23. d-SH-SY5Y hücrelerine uygulanan farklı Karvakrol dozlarının 24 saatin sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi (**p<0,01; ****p<0,0001).

50 ve 100 μ M 6-OHDA ile d-SH-SY5Y hücrelerinde Parkinson hastalığı modellenmiş ve karvakrolün %50'ye düşen hücre canlılığını tersine çevirmesi beklenmiştir. Karvakrolün koruyucu etkisini test etmek için d-SH-SY5Y hücrelerine 6-OHDA nörotoksininden 24 saat önce farklı KARV dozları ile ön muamele gerçekleştirilmiş, iyileştirici etkisi için ise KARV dozları 6-OHDA ile aynı anda uygulanmıştır.

50 μ M ve 100 μ M 6-OHDA muamelelerinden 24 saat önce 50, 100 ve 200 μ M KARV dozları ile ön muamele edilen d-SH-SY5Y hücrelerinin sağkalım oranları artmıştır. KARV ve 6-OHDA birlikte uygulandığında ise 50 μ M KARV hücre canlılığına etki etmemiştir. 100, 200 ve 600 μ M KARV hücre sağkalımını önemli oranlarda arttırmıştır.

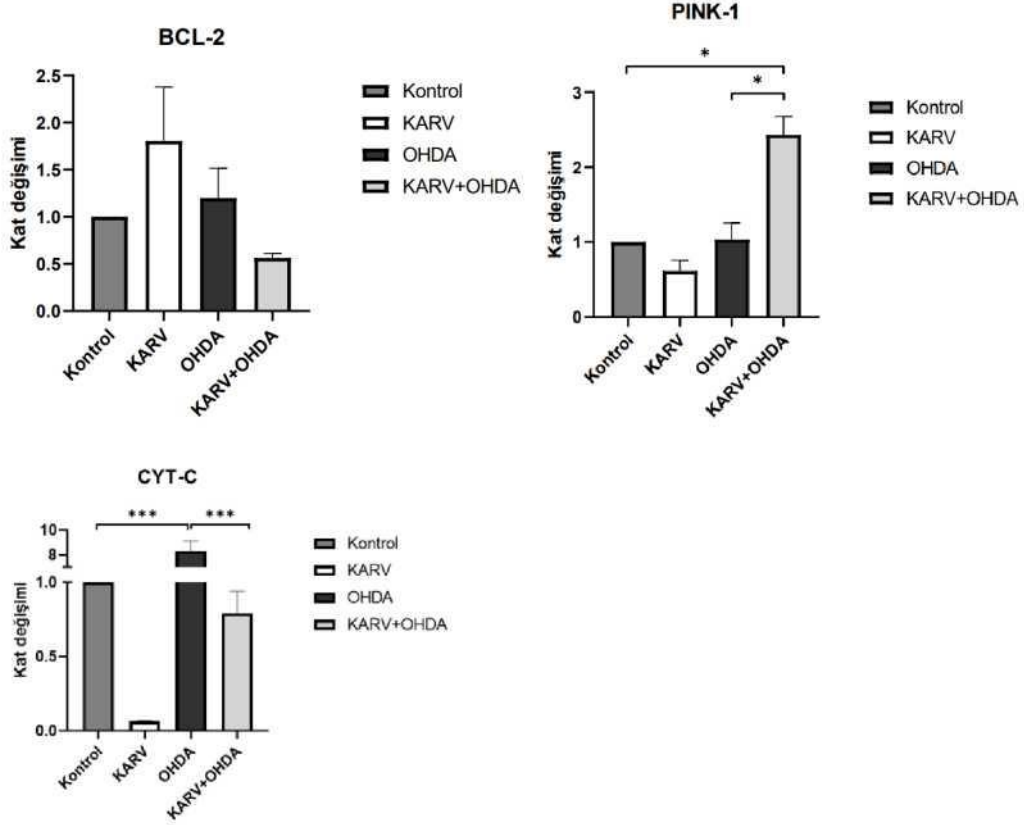


Şekil 24. 6-OHDA ile muamele edilen d-SH-SY5Y hücrelerinin canlılığına farklı Karvakrol dozlarının etkisi. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Şekil 24'te MTT testi ile karvakrolün sitotoksitesi analiz edilmiştir. Karvakrol 6-OHDA'dan 24 saat önce uygulanmıştır dolayısıyla da koruyucu etkisi gösterilmektedir, alttaki grafikte ise 6-OHDA ile aynı anda uygulanmıştır dolayısıyla da iyileştirici etkisi gösterilmektedir.

4.3. Karvakrol Tedavisinin 6-OHDA ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Apoptoz ve

Mitofaji ilişkili Genlerin İfadesine Etkisinin mRNA Seviyesinde Araştırılması

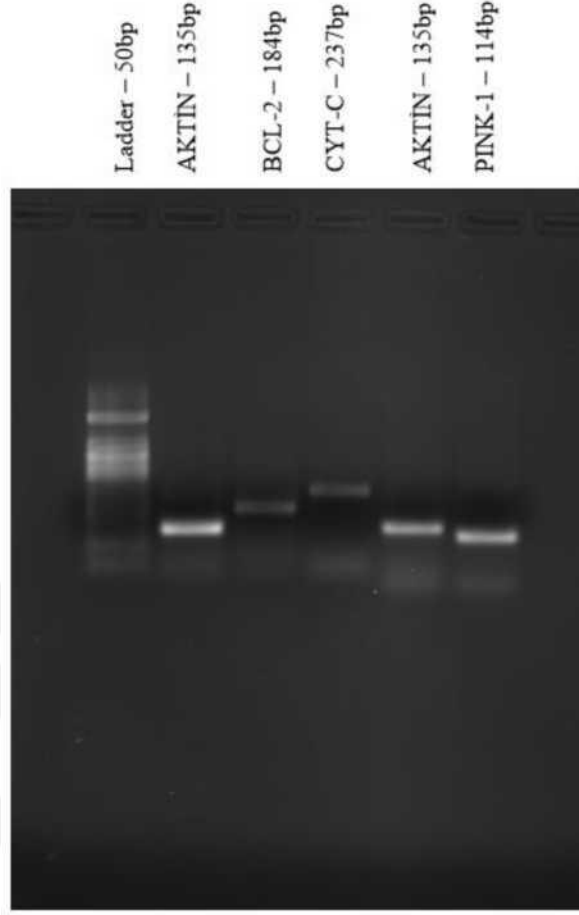


Şekil 25. KARV, 6-OHDA ve KARV ile 6-OHDA dozlarının d-SH-SY5Y hücrelerinde Bcl-2, Cyt-c ve Pink-1 genlerinin ifadesi üzerine etkisinin RT-qPCR ile mRNA seviyesinde analizi (internal kontrol: p-aktin). İstatistiksel analizler Student's t-test kullanılarak yapılmıştır. Ortalama \pm standart hata (n=3) gösterilmiştir. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

Şekil 25'te sağlıklı hücrelerde karvakrolün, 6-OHDA toksininin ve 6-OHDA ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde KARV'ın Bcl-2, Cyt-c ve Pink-1 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir.

KARV antiapoptotik Bcl-2 mRNA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmasa da anlamlıya yakın bir artış gözlenmiş, Pink-1 seviyesinde bir farklılık gözlenmemiştir. 6-OHDA ile indüklenen Parkinson modelinde Bcl-2 ve Pink-1 seviyelerinde mRNA seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmemektedir. KARV tedavisi uygulanan Parkinson modelinde ise Bcl-2 mRNA seviyesi kontrole göre değişmemiş, fakat Pink-1

seviyesi hem kontrol grubuna hem de 6-OHDA grubuna göre artmıştır.



Şekil 26. RT-qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin Agaroz Jel Elektroforez görüntüleri.

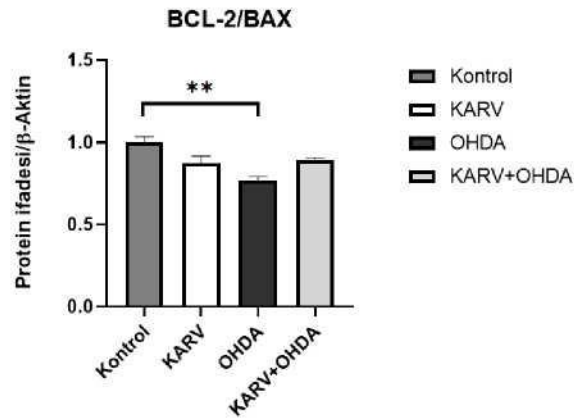
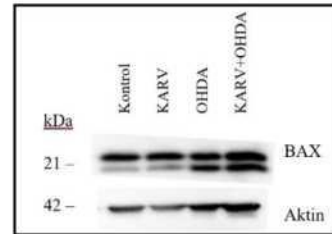
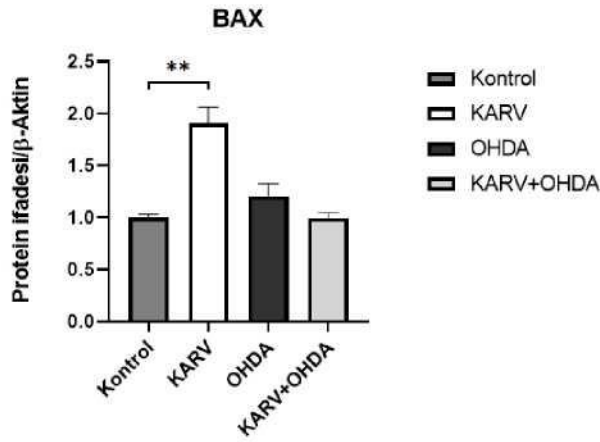
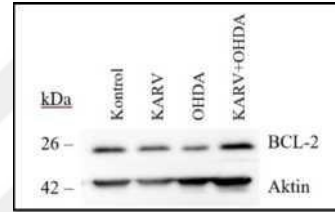
RT-qPCR sonrasında spesifik olarak ilgili gen ürününün amplifiye edildiğini doğrulamak için PCR ürünleri Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Örnekler amplicon uzunluklarına beklenen baz çifti uzunluğunda görüntülenmiştir (Şekil 26).

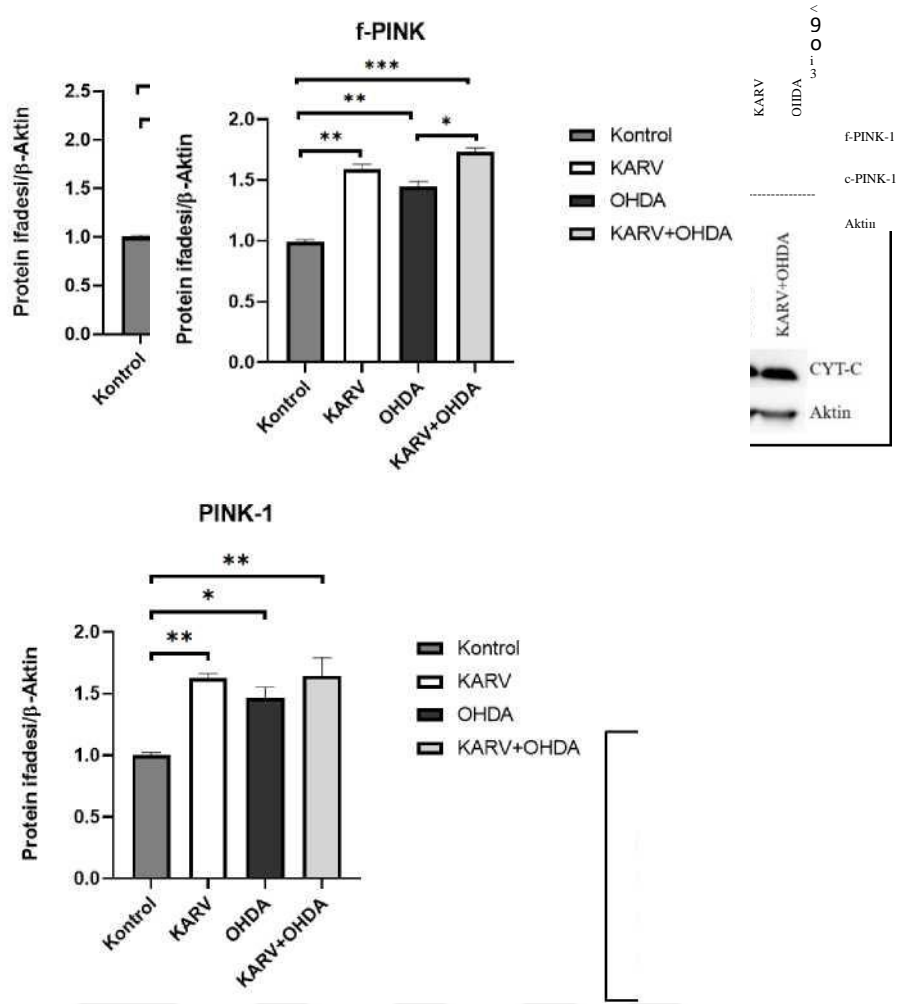
4.4. Karvakrol Tedavisinin 6-OHDA ile Oluşturulan Parkinson Modelinde Apoptoz ve Mitofaji ilişkili Genlerin ifadesine Etkisinin Protein Seviyesinde



Araştırılması

Kontr
ol
KAR
V OH
DA
KARV+OHDA





Şekil 27. KARV, 6-OHDA ve KARV ile 6-OHDA dozlarının d-SH-SY5Y hücrelerinde BCL-2, BAX, CYT-C ve PINK-1 genlerinin ifadesi üzerine etkisinin Western blot ile protein seviyesinde analizi ve jel görüntüleri (internal kontrol: P-aktin). İstatistiksel

analizler Student's t-test kullanılarak yapılmıştır. Ortalama \pm standart hata (n=3) gösterilmiştir. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

BCL-2, BAX ve PINK-1 protein ifadesi KARV grubunda artmıştır. OHDA ve KARV+OHDA gruplarında CYT-C ve PINK-1 protein seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. BCL-2/BAX oranı ise yalnızca OHDA grubunda azalmıştır Total PINK-1'den farklı olarak kırılmamış PINK-1 seviyesinde KARV+OHDA grubunda OHDA grubuna kıyasla da anlamlı bir artış bulunmaktadır (Şekil 27).



5. TARTIŞMA

Çalışmanın amacı, fenolik bir küçük molekül olan karvakrolün *in vitro* Parkinson hastalığı modeli üzerindeki etkisini araştırmaktır. Karvakrol, gıda endüstrisinde ambalajlı ürünlerde koruyucu olarak kullanılmakta olup antioksidan özellikleri ile de bilinen bir biyoaktif moleküldür (63).

Parkinson hastalığı dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterize edilmiş bir hastalıktır. Dolayısıyla da hücre hatlarında hastalığı modellerken dopaminerjik nöron fenotipinde hücrelerin kullanımını modelin hastalığı daha iyi taklit etmesini sağlayabilir. Parkinson hastalığı araştırmalarında sıklıkla kullanılan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı insandaki nöronların aksine hızlı bölünebilen hücrelerden oluşmaktadır. DNA replikasyon hataları da göz önüne alındığında bu durum heterojen bir fenotip oluşmasına sebep olur. Hücrelerin olgun nöronal bir fenotipe farklılaştırılması hücre döngüsünü senkronize eder ve proliferasyonu baskılar, böylece daha homojen bir hücre popülasyonu elde edilebilir (64). All-trans retinoik asit (ATRA) Parkinson hastalığı araştırmalarında SH-SY5Y hücre hattını farklılaştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (65). Düşük serum konsantrasyonlarında retinoik asit uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı, nöronal uzantılarının ve bağlantı sayılarının arttığı, dopaminerjik ve/veya kolinerjik sinir hücresine ait biyobelirteçlerin ifadesinin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (66, 67). Bu çalışmada da hücre proliferasyonunun azaldığı, nöronal uzantıların arttığı ve hücrelerin morfolojisinin çok kutuplu piramidal nöronlara doğru farklılaştığı ışık mikroskopu aracılığıyla gözlenmiştir. Bu kalitatif bulgular literatürle uyum sağlamaktadır (21, 67, 68).

Retinoik asit hücre çekirdeğine girerek RA reseptörüne (RAR) ve retinoid X reseptörüne (RXR) bağlanarak dimerize olmalarını sağlar. Dimerize olan reseptörler DNA üzerindeki RA yanıt elementi (RARE) dizisine bağlanarak hedef genlerin ifadesini aktifleştirmektedir (69). Bu sebeple de SH-SY5Y hücreleri ile d-SH-SY5Y hücrelerinin uygulanan toksine veya tedaviye yanıtları farklı olabilir. Literatürde bu konuyla ilgili çelişkili bulgular bulunmaktadır. Örneğin bir çalışmada, farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde canlılıkla ilgili genlerin ifadesinin arttığı gerekçesiyle 6-OHDA'ya karşı daha dirençli oldukları belirtilmiştir (70). Bir başka çalışmada ise farklılaşan SH-SY5Y hücrelerinde bazal antioksidan seviyesinin yükselmesine karşın

6-OHDA'ya duyarlılıklarının arttığı bildirilmiştir (71). Retinoik asit ile farklılaştırılan hücrelerde kullanılan 6-OHDA dozu 25 ile 200[^]M arasında değişmektedir (72-76).

Bu tez çalışmasında farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde denenen 15, 30, 50 ve 100[^]M 6-OHDA dozları arasından 100[^]M'lık doz %50 hücre sel sitotoksik konsantrasyon (CC50) olarak belirlenmiştir. 50[^]M'lık dozda da %50'ye yakın bir sitotoksik etki gözleendiğinden MTT deneylerinin devamında her iki doz da test edilmiştir.

Karvakrolün sitotoksik olmayan maksimum konsantrasyonunu belirlemek için 50[^]M, 100[^]M, 200[^]M, 600[^]M ve 1000[^]M konsantrasyonları test edilmiştir. 50[^]M, 200[^]M ve 600[^]M dozlarında hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Chenet'in bir çalışmasında proliferere olan SH-SY5Y hücrelerinde 10 ve 100 CARV hücre canlılığını etkilemezken 500 ve 1000 [^]M CARV hücre canlılığını anlamlı bir şekilde düşürmüştür (61). Benzer bir çalışmada 330[^]M ve daha düşük konsantrasyonlarda KARV'n hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (77). Literatürdeki bu bilgileri de göz önünde bulundurarak 50, 100 ve 200[^]M KARV dozlarının bir sonraki MTT deneyinde test edilmesine karar verilmiştir.

Karvakrolün 6-OHDA sitotoksitesine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını test etmek için KARV 6-OHDA'dan 24 saat önce uygulanmıştır. Böylece KARV'n hücre içerisinde genetik değişiklikler yapmasına olanak sağlanmıştır. KARV'n iyileştirici/tedavi edici etkisini test etmek için ise KARV hücrelere 6-OHDA ile aynı anda uygulanmıştır. MTT sitotoksite testinden elde edilen bulgulara göre 50 [^]M 6- OHDA'ya karşı 100 [^]M ve 200 KARV dozları hem koruyucu hem de iyileştirici etki gösterirken 50 KARV dozu yalnızca koruyucu etki göstermiştir. 100 6-OHDA'ya karşı ise yalnızca 200 KARV dozunda hem iyileştirici hem de koruyucu etki gözlenmiştir. Görece daha düşük olan KARV dozları (50 ve 100 [^]M) yalnızca koruyucu etki gösterirken, görece daha yüksek KARV dozları (600 ve 1000 [^]M) ise yalnızca iyileştirici etki göstermiştir. Bu durumun sebebi düşük dozlarda KARV'n antioksidan ya da hayatta kalım ile ilgili genlerin ifadesini açarak etki etmesi olabilir. Bunun gerçekleşmesi için zamana ihtiyaç vardır. 6-OHDA ile aynı anda verildiğinde hücreler yeni gen ekspresyonuna henüz fırsat bulamamış olabilir ve bununla birlikte KARV'n literatürdeki bazı diğer fitokimyasallar gibi düşük dozlarda serbest radikal yakalama gücü de az olabilir (80, 81). Bu sebeplerle de düşük dozda KARV, 6- OHDA'ya karşı koruyucu etki gösterirken iyileştirici etki

göstermemiş olabilir. Sonuç olarak Parkinson hastalığına karşı düşük dozlarda KARV'dan, patogenez gerçekleşmeden önce yararlanması daha etkili olabilir.

MTT verileri değerlendirildiğinde 200 KARV dozunun 100 6-OHDA'ya karşı iyileştirici etkisi istatistiksel olarak en anlamlı veri olduğundan bu dozların mRNA ve protein seviyelerinin analizinde kullanılmasına karar verilmiştir.

Proapoptotik BAX proteini sağlıklı hücrelerde antiapoptotik BCL-2 proteini tarafından inaktif durumda tutulur. BAX miktarının BCL-2'ye üstün gelmesi apoptotik hücre ölümü yolağını aktifleştirir ve mitokondriden sitokrom salınımı gerçekleşir. 6-OHDA'nın apoptotik yolağı aktifleştirmesi beklendiğinden öncelikle bu genlerin mRNA seviyesindeki değişimler RT-qPCR ile analiz edilmiştir. Bax transkript analizinden bir sonuç alınamadığı için bu gen yalnızca protein seviyesinde incelenmiştir. KARV grubunda Bcl-2 seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıya yakın bir seviyede artmış Cyt-c ise beklendiği üzere anlamlıya yakın bir seviyede azalmıştır. Bu bulgu KARV'ın antiapoptotik özelliğini göstermektedir. OHDA grubunda Bcl-2 transkript seviyesinde bir değişim olmazken Cyt-c seviyesinde ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir. Bax için veri olmadığından Bcl-2/Bax oranı hesaplanamamıştır fakat Cyt-c'nin artışı da apoptotik yolağın 6-OHDA ile indüklendiğini göstermektedir. KARV+OHDA grubunda ise Bcl-2'de anlamlı bir değişim yine gözlenmemiş fakat 6-OHDA tarafından ifadesi artan Cyt-c mRNA seviyesinin KARV tarafından tersine çevrildiği Şekil 25'te açık bir şekilde görülebilmektedir. Mitofajinin düzenlenmesinden sorumlu bir protein olan PINK-1'in 6-OHDA ve KARV'ın etkisiyle mRNA seviyesindeki değişime bakıldığında ise OHDA veya KARV'ın tek başlarına bir etkilerinin olmadığı fakat birlikte uygulandıklarında Pink-1 mRNA seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Bu durum KARV'ın 6-OHDA tarafından hasarlanan mitokondrinin yıkımını hızlandırmak için gösterdiği bir etki olabilir. Pink-1'in artması, onun mitokondrinin membranında daha fazla birikmesine ve mitofajinin gerçekleşmesine sebep olur. Ek olarak Pink-1'in ifadesindeki artışın Cyt-c salınımını baskıladığı da *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (82, 83).

Western blot sonuçlarında beklenildiği üzere toksik 6-OHDA'nın BCL-2/BAX oranını düşürerek ve CYT-C seviyesini de arttırarak hücrelerde apoptoz yolağını aktifleştirdiği gösterilmiştir. KARV grubunda ise BCL-2 ve BAX proteinlerinin ikisinin de seviyelerinde ayrı ayrı artış gözlenmesine rağmen hem BCL-2/BAX oranı hem de CTY-C proteini düzeyinde bir değişim gözlenmemesi hücrelerde apoptoz gerçekleşmediğini göstermektedir.

İlginç bir şekilde KARV+OHDA grubunun sonuçları BCL-2/BAX oranı değişmemesine rağmen CYT-C seviyesinde kontrole göre anlamlı bir artışla hücrelerin apoptoza uğradıklarını göstermektedir. 6-OHDA ile tetiklenen apoptoz KARV ile tersine çevrilememiştir. Apoptozun engellenememesi fakat MTT sonuçlarına göre hücre kaybının azalması KARV'ın iyileştirici etkisini apoptotik hücre ölümü yolağı üzerinden sağlamadığını göstermekte, alternatif bir yolak üzerinden sağlayabileceğini düşündürmektedir.

PINK-1 proteininin 6-OHDA ile indüklenen oksidatif stres koşullarında arttığı literatürde gösterilmiştir (62). Bu çalışmadaki western blot bulguları da bunu desteklemektedir. KARV'ın etkisiyle 6-OHDA ile artan total PINK-1 seviyesi değişmese de kırılmamış PINK-1 seviyesinin artması mitokondrinin membran potansiyelinin düzeldiğini ve mitofajinin daha etkili bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Retinoik asit ile nörojenik bir fenotip kazandırılan SH-SY5Y hücrelerinde 6- OHDA ile Parkinson hastalığı modellenmiştir. Bu modelde karvakrolün tedavi edici etkisi apoptoz ve mitofaji yolları üzerinden incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre KARV tedavi edici etkisini apoptoza alternatif bir yolak üzerinden baskılamaktadır, bozulan mitofajiyi ise düzeltmektedir.

Literatürde SH-SY5Y hücre hattının farklılaştırıldığını biyobelirteç işaretlemesi ile gösteren yayınlar da bulunmaktadır. Dopaminerjik nöronlarda ifadesi artan tirozin hidroksilaz gibi biyobelirteçler ya da olgun nöronlarda ifadesi artan beta-tübülin gibi biyobelirteçler Western blot ya da immünfloresan işaretleme gibi yöntemlerle kantitatif olarak analiz edilebilmektedir. Gelecekteki çalışmamızda hücre farklılaştırmanın başarısının kalitatif analizinin yanında beta-tübülin immünfloresan işaretleme ile kantitatif olarak da desteklenmesi planlanmaktadır.

Apoptozla ilişkili Bcl-2, Bax ve Cyt-c ifadelerinin analizi KARV tedavisinin Parkinson modelindeki apoptotik hücre kaybını tersine çevirmediği gözlenmiştir fakat alt yolak elemanlarından kritik bir öneme sahip olan kaspaz-3'ün aktivitesi incelenememiştir. Gelecekteki çalışmalarda kaspaz-3 ile ilgili verilerin de değerlendirilip gerekirse nekroz gibi farklı bir hücre ölüm yolağının elemanlarının analiz edilmesi planlanmaktadır. Bunun yanında KARV'ın mitofaji ile ilişkisini desteklemek için Parkin proteininin de değerlendirilmesi düşünülebilir.

Bu tez çalışmasıyla kekik bitkisinde bulunan karvakrol isimli bir fitokimyasalın Parkinson hastalığında gözlenen dopaminerjik nöron dejenerasyonuna karşı koruyucu bir etki gösterdiği ve bunu hangi mekanizmalar üzerinden sağladığını aydınlatacak veriler elde edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy (London 1817): Mediscript.; 1817.
2. Kandel E, Koester J, Mack S, Siegelbaum S. Principles of neural science. New York: McGraw Hill; 2021. p. 1548-50.
3. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. The Lancet. 2021;397(10291):2284-303.
4. Ben-Shlomo Y, Darweesh S, Llibre-Guerra J, Marras C, San Luciano M, Tanner C. The epidemiology of Parkinson's disease. The Lancet. 2024;403(10423):283-92.
5. Dorsey ER, Elbaz A, Nichols E, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdelalim A, ve ark. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Neurology. 2018;17(11):939-53.
6. Wooten G, Currie L, Bovbjerg V, Lee J, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 2004;75(4):637-9.
7. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. The Lancet Neurology. 2020;19(2):170-8.
8. Morris HR, Spillantini MG, Sue CM, Williams-Gray CH. The pathogenesis of Parkinson's disease. The Lancet. 2024;403(10423):293-304.
9. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. Annu Rev Neurosci. 2005;28(1):57-87.
10. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003;39(6):889-909.
11. Raza C, Anjum R. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. Life sciences. 2019;226:77-90.
12. Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease. International journal of molecular medicine. 2018;41(4):1817-25.
13. Adams Jr JD, Odunze IN. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. Free Radical Biology and Medicine. 1991;10(2):161-9.

14. Burbulla LF, Song P, Mazzulli JR, Zampese E, Wong YC, Jeon S, ve ark. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*. 2017;357(6357):1255-61.
15. Jana S, Maiti AK, Bagh MB, Banerjee K, Das A, Roy A, ve ark. Dopamine but not 3, 4-dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC) inhibits brain respiratory chain activity by autoxidation and mitochondria catalyzed oxidation to quinone products: implications in Parkinson's disease. *Brain Research*. 2007;1139:195-200.
16. Cramb KM, Beccano-Kelly D, Cragg SJ, Wade-Martins R. Impaired dopamine release in Parkinson's disease. *Brain*. 2023;146(8):3117-32.
17. Segura-Aguilar J, Paris I, Munoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2014;129(6):898-915.
18. Foltynie T, Bruno V, Fox S, Kühn AA, Lindop F, Lees AJ. Medical, surgical, and physical treatments for Parkinson's disease. *The Lancet*. 2024;403(10423):305-24.
19. Grünewald A, Kumar KR, Sue CM. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 2019;177:73-93.
20. McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM. α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism & related disorders*. 2014;20:S62-S7.
21. Kovalevich J, Santerre M, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*: Springer; 2021. p. 9-23.
22. Bove J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2012;211:51-76.
23. Blandini F, Armentero M-T, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism & related disorders*. 2008;14:S124-S9.
24. Senoh S, Creveling CR, Udenfriend S, Witkop B. Chemical, enzymatic and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine¹. *Journal of the American Chemical Society*. 1959;81(23):6236-40.
25. Kostrzewa RM. Survey of Selective Monoaminergic Neurotoxins Targeting Dopaminergic, Noradrenergic, and Serotonergic Neurons. *Handbook of Neurotoxicity*: Springer; 2023. p. 9-12.
26. Erekat NS. Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. Exon Publications. 2018:65-82.
27. Kaji H, Matsui-Yuasa I, Matsumoto K, Omura A, Kiyomoto K, Kojima-Yuasa A. Sesaminol prevents Parkinson's disease by activating the Nrf2-ARE signaling pathway.

Heliyon. 2020;6(11).

28. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004;305(5684):626-9.

29. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15(1):269-90.

30. Jellinger K. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*. 2000;107:1-29.

31. Kösel S, Egensperger R, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB. On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta neuropathologica*. 1997;93:105-8.

32. Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2000;166(1):29-43.

33. Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carri MT, Barone P. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Human molecular genetics*. 2007;16(11):1319-26.

34. Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;991(1):111-9.

35. Perier C, Tieu K, Guegan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, et al. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(52):19126-31.

36. Jones DC, Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE. Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 2000;74(6):2296-304.

37. Junn E, Mouradian MM. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *Journal of Neurochemistry*. 2001;78(2):374-83.

38. Kowalczyk P, Sulejczak D, Kleczkowska P, Bukowska-Osoko I, Kucia M, Popiel M, et al. Mitochondrial oxidative stress—a causative factor and therapeutic target in many diseases. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(24):13384.

39. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*. 2005;8(1):3-5.

40. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 2008;183(5):795-803.
41. Wang S, Long H, Hou L, Feng B, Ma Z, Wu Y, ve ark. The mitophagy pathway and its implications in human diseases. *Signal transduction and targeted therapy*. 2023;8(1):304.
42. Liu S, Lu B. Reduction of protein translation and activation of autophagy protect against PINK1 pathogenesis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS genetics*. 2010;6(12):e1001237.
43. Yang Y, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, Vogel H, ve ark. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(19):7070-5.
44. Soman SK, Dagda RK. Role of cleaved PINK1 in neuronal development, synaptogenesis, and plasticity: Implications for Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2021;15:769331.
45. Chen X, Wang Q, Li S, Li X-J, Yang W. Mitochondrial-dependent and independent functions of PINK1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10:954536.
46. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*. 2015;85(2):257-73.
47. Naoi M, Shamoto-Nagai M, Maruyama W. Neuroprotection of multifunctional phytochemicals as novel therapeutic strategy for neurodegenerative disorders: Antiapoptotic and antiamyloidogenic activities by modulation of cellular signal pathways. *Future Neurology*. 2019;14(1):FNL9.
48. Cui Z-w, Xie Z-x, Wang B-f, Zhong Z-h, Chen X-y, Sun Y-h, ve ark. Carvacrol protects neuroblastoma SH-SY5Y cells against Fe²⁺-induced apoptosis by suppressing activation of MAPK/JNK-NF- κ B signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015;36(12):1426-36.
49. Karuppagounder S, Madathil S, Pandey M, Haobam R, Rajamma U, Mohanakumar K. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience*. 2013;236:136-48.
50. Singh A, Tripathi P, Yadawa AK, Singh S. Promising polyphenols in Parkinson's disease therapeutics. *Neurochemical Research*. 2020;45:1731-45.
51. Lou H, Jing X, Wei X, Shi H, Ren D, Zhang X. Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway. *Neuropharmacology*. 2014;79:380-8.
52. Ali T, Majeed ST, Majeed R, Bashir R, Mir SA, Jan I, ve ark. Recent advances in the pharmacological properties and molecular mechanisms of carvacrol. *Revista Brasileira de*

Farmacognosia. 2024;34(1):35-47.

53. Azizi Z, Majlessi N, Choopani S, Naghdi N. Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2022;12(4):371.

54. Imran M, Aslam M, Alsagaby SA, Saeed F, Ahmad I, Afzaal M, ve ark. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food science & nutrition*. 2022;10(11):3544-61.

55. Hamzehloei L, Rezvani ME, Rajaei Z. Effects of carvacrol and physical exercise on motor and memory impairments associated with Parkinson's disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2019;77(7):493-500.

56. Ribeiro CT, Gasparotto J, Petiz LL, Brum PO, Peixoto DO, Kunzler A, ve ark. Oral administration of carvacrol/p-cyclodextrin complex protects against 6- hydroxydopamine-induced dopaminergic denervation. *Neurochemistry international*. 2019;126:27-35.

57. Lins LCR, Souza MF, Bispo JMM, Gois AM, Melo TCS, Andrade RAS, ve ark. Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. *Brain Research Bulletin*. 2018;139:9-15.

58. Dati L, Ulrich H, Real C, Feng Z, Sun H, Britto L. Carvacrol promotes neuroprotection in the mouse hemiparkinsonian model. *Neuroscience*. 2017;356:176- 81.

59. Manouchehrabadi M, Farhadi M, Azizi Z, Torkaman-Boutorabi A. Carvacrol protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in in vivo and in vitro models of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 2020;37:156-70.

60. Yıldız MO, Çelik H, Caglayan C, Genç A, Doğan T, Satıcı E. Neuroprotective effects of carvacrol against cadmium-induced neurotoxicity in rats: role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Metabolic brain disease*. 2022;37(4):1259-69.

61. Chenet AL, Duarte AR, de Almeida FJS, Andrade CMB, de Oliveira MR. Carvacrol depends on heme oxygenase-1 (HO-1) to exert antioxidant, anti- inflammatory, and mitochondria-related protection in the human neuroblastoma SH- SY5Y cells line exposed to hydrogen peroxide. *Neurochemical research*. 2019;44:884- 96.

62. Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh N-h, Sakaguchi M. NRF2 regulates PINK1 expression under oxidative stress conditions. *PloS one*. 2015;10(11):e0142438.

63. Hakimi Z, Salmani H, Marefati N, Arab Z, Gholamnezhad Z, Beheshti F, ve ark. Protective effects of carvacrol on brain tissue inflammation and oxidative stress as well as learning and memory in lipopolysaccharide-challenged rats. *Neurotoxicity research*. 2020;37:965-76.

64. Alrashidi H, Eaton S, Heales S. Biochemical characterization of proliferative and differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Parkinson's disease. *Neurochemistry*

International. 2021;145:105009.

65. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*. 2017;12:1-11.

66. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity research*. 2003;5:579-98.

67. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2016(108):53193.

68. Bell N, Hann V, Redfern CP, Cheek TR. Store-operated Ca²⁺ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013;1833(3):643-51.

69. Maden M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(11):843-53.

70. Cheung Y-T, Lau WK-W, Yu M-S, Lai CS-W, Yeung S-C, So K-F, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 2009;30(1):127-35.

71. Lopes FM, Schröder R, da Frota Junior MLC, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*. 2010;1337:85-94.

72. Cicek B, Danişman B. Cerium Oxide Nanoparticles Rescue Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Model of SH-SY5Y Cells via Modulating Nrf2 Signaling and Ameliorating Apoptotic Cell Death. *ABC Research*. 2023;5(2):284-90.

73. 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. *Neurotoxicity research*. 2017;31:545-59.

74. Magalingam KB, Somanath SD, Ramdas P, Haleagrahara N, Radhakrishnan AK. 6-Hydroxydopamine induces neurodegeneration in terminally differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells via enrichment of the nucleosomal degradation pathway: a global proteomics approach. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2022;72(5):1026-46.

75. Rehfeldt SCH, Silva J, Alves C, Pinteus S, Pedrosa R, Laufer S, et al. Neuroprotective effect of luteolin-7-O-glucoside against 6-OHDA-induced damage in undifferentiated and RA-differentiated SH-SY5Y cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):2914.

76. Chao J, Lau WK-W, Huie MJ, Ho Y-S, Yu M-S, Lai CS-W, et al. A pro-drug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) prevents differentiated SH-SY5Y

cells from toxicity induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience letters*. 2010;469(3):360-4.

77. Caputo L, Amato G, De Martino L, De Feo V, Nazzaro F. Anti-cholinesterase and anti- α -amylase activities and neuroprotective effects of carvacrol and p-cymene and their effects on hydrogen peroxide induced stress in SH-SY5Y cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(7):6073.

78. Celik Topkara K, Kilinc E, Cetinkaya A, Saylan A, Demir S. Therapeutic effects of carvacrol on beta-amyloid-induced impairments in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*. 2022;56(9):5714- 26.

79. Mason SE, Mullen KA, Anderson KL, Washburn SP, Yeatts JL, Baynes RE. Pharmacokinetic analysis of thymol, carvacrol and diallyl disulfide after intramammary and topical applications in healthy organic dairy cattle. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017;34(5):740-9.

80. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, ve ark. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant science*. 2002;163(6):1161-8.

81. Tokumaru O, Shuto Y, Ogata K, Kamibayashi M, Bacal K, Takei H, ve ark. Dose-dependency of multiple free radical-scavenging activity of edaravone. *Journal of Surgical Research*. 2018;228:147-53.

82. Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, ve ark. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(40):34025-32.

83. Wang H-L, Chou A-H, Yeh T-H, Li AH, Chen Y-L, Kuo Y-L, ve ark. PINK1 mutants associated with recessive Parkinson's disease are defective in inhibiting mitochondrial release of cytochrome c. *Neurobiology of disease*. 2007;28(2):216-26.

8. EKLER

EK-1: ETİK KURUL KARARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSİZ OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARARI Sayın Prof.Dr. Sefa Kızıldağ
Arattırmanıza ilişkin Kurulumuz karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSİZ OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	gosek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8219-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input checked="" type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	In vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Karvakrolün Etkisinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÖN VANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe El	İngilizce	Diğer
Bilgi Mrü-K	ARAŞTIRMA	Mevcut		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Diğer 0
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Diğer Q
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR	Mevcut		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Diğer D
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	. Kfeer LJ

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2023/23-20 Tarih: 19.07.2023				
	Prof Dr Sefa Kızıldağ'ın sorumlusu olduğu "İn vılr Parkinson Hastalr^ Modelinde Karvakrolün Etkisinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeleri araşmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate atarak incelenmiş, araştırmanın mevcut halıyla etik vönden 'uvautı olduğuna ov birliği ile karar verilmiştir				
ETİK KIRLI BİLGİLERİ					
ÇALIşMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmaları Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İvi Klinik İK sulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
İsim	Uzmanlık Alanı	Kuruma	Cinsiyet	Araştırma İlişimi	m* ile ilgili mi?
Prof Dr.Mehmet Brhan Yılmaz	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	ED	HB
Prof Dt. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıktan ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	ED	HB
Prof Dr. Ahmet Oka) Çağlayan	Mokküller Tıp	Sağlık Bilimlen Enstitüsü	Erkek	ED	HB
Prof.Dr Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıktan	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	ED	HB
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	ED	HB
Prof-Dz. özĐür Ez	Efldodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	ED	
Prof Dr. Hatice Şimşek Kerkin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	ED	HB
Doç.Dr.Scher Özyünek	Muskulosketal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	ED	HB
Doç.Dr.Nil Hocaoğlı Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	ED	HB
Doç Dt. Meryem önnrk Hatrey	Halk Sağlığı Hemşirelik	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	ED	HB
Doç Dr. Şule Özbilgin	Nnestciyoloji ve Renmmasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cenalri Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	ED	HB
DoçJ>.Tolga Şairin	Spor Y findim Bilinilen	Necat Hepkon Spor Bilimlen Fakültesi	Erkek	ED	HB
DrÖĞrÜycesi Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	F-D	HB

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmaları Etik Kurulu Kurulma Formu

EK-2: ÖZGEÇMİŞ



SERENAYKARATAŞ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

09 Şubat 2023 - Şu Anda 0 yıl 11 ay)

Yüksek Lisans. Tezli Program. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ. TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK<YL> (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması 3.92 /AO

11 Ağustos 2017-07 Temmuz 2021 <3 yıl 11 ayl

Lisans. Anadal/Normal Öğretim. İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE FEN FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR, (İNGİLİZCE)
Diploma Numarası S287
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması 283 /A O

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Nisan 202A - Şu Anda {9 ayl {Tam Zamanlı)

ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ. ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ NÖROLOJİK BİLİMLER VE PSİKİYATRİ ENSTİTÜSÜ NÖROLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ NÖROLOJİK VE PSİKİYATRİK TEMEL BİLİMLER ANABİLİM DALI

Ağustos 2020 • Şubat 2021 {7 ay) {Yan Zamanlı)

STAJYER. SOLAR BİYOTEKNOLOJİ İLAÇ KİMYA VE GIDA SAN. VE TIC LTD.ŞTİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE {Okuma İyi, Yazru İyi, Konuşma İyi}

Bilimsel Teknolojik faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri Sağlık Bilimleri-- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri-- Tıbbi Biyoloji

Anahtar Kelimeler

Tıbbi Biyoloji

Nörobiyoloji

Ar-Ge Yetkinlik

Projeler

TÜSEB, ARAŞTIRMACI, In vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Karvakrolün Etkisinin Araştırılması (Devam ediyor).

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0