



**SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA
NÖRODEJENERASYONA KARŞI KUERSETİN VE
SODYUM SELENAT İÇEREN ÇOK HEDEFLİ İLACIN
NÖROPROTEKTİFETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökhan DERVİŞOĞLU

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
2019
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA
NÖRODEJENERASYONA KARŞI KUERSETİN VE SODYUM
SELENAT İÇEREN ÇOK HEDEFLİ İLACIN NÖROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökhan DERVİŞOĞLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA NÖRODEJENERASYONA
KARŞI KUERSETİN VE SODYUM SELENAT İÇEREN ÇOK HEDEFLİ
İLACIN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Gökhan DERVİŞOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 02/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği / ~~oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **02.01./2020** tarih ve **.01...../..15.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma (BAP) projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FHD-2019-7215

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA NÖRODEJENERASYONA KARŞI KUERSETİN VE SODYUM SELENAT İÇEREN ÇOK HEDEFLİ İLACIN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökhan DERVİŞOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Hidrojen peroksit (H_2O_2), canlı organizmalarda oksidatif strese neden olan önemli bir reaktif oksijen türüdür. Oksidatif stres; Alzheimer, amiotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson ve Huntington gibi 600'den fazla merkezi sinir sistemi hastalığı patoetiyojisine sebep olan en önemli nörodejeneratif faktörlerden birisidir. Kuersetin bitkisel bir flavonoiddir ve güçlü antioksidan özelliğinin yanı sıra çeşitli nöroprotektif aktivitelere de sahiptir. Sodyum selenat bir serin-treonin fosfataz olan PP2A'nın (protein fosfataz 2A) spesifik ve güçlü bir aktivatörüdür. Nörodejeneratif hastalıkların karmaşık patogenezi ve etiyolojisi, tek bir reseptör veya enzimatik sisteme hedeflenen monoterapötik ilaçlar ile bu çok faktörlü hastalıkların başarılı bir şekilde tedavisinin mümkün olamayacağını açıkça göstermektedir. Son zamanlarda multipotansiyel tedaviler daha çekici stratejiler haline gelmiş ve literatürde çok işlevli ilaç yaklaşımlarının potansiyeli vurgulanmıştır. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında; kuersetin (Q) ve sodyum selenat (SS) karışımı ile elde edilen çok hedefli ilaç kombinasyonunun (QSS) insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı sinerjistik nöroprotektif etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla H_2O_2 kaynaklı oksidatif stres varlığında Q, SS ve QSS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerine; canlılık testleri (WST-1, propidium iyodür içeren annexin V-FITC ve JC-1 mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim ($\Delta\Psi_m$)), hücre içi antioksidan aktivite testleri (hücre içi katalaz enzimi (CAT) aktivitesi, hücre içi toplam antioksidan kapasite (TAC)) ve oksidatif stres testleri (hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS), lipid peroksidasyonu (LPO) ve hücre dışı insan $A\beta_{(1-42)}$) uygulandı. Sonuç olarak, elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde QSS'nin SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı sinerjistik olarak nöroprotektif etki gösterdiği belirlendi.

2019, 118 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kuersetin, Sodyum selenat, SH-SY5Y hücreleri, Nöroprotektif etki, Nörodejenerasyon, Sinerjistik etki

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF MULTI-TARGETED DRUG CONTAINING QUERCETIN AND SODIUM SELENATE AGAINST NEURODEGENERATION IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELL LINE

Gökhan DERVİŞOĞLU

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is an important reactive oxygen species that causes oxidative stress in living organisms. Oxidative stress is one of the most important neurodegenerative factors that causes pathophysiology of more than 600 central nervous system diseases such as Alzheimer's, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Parkinson and Huntington diseases. Quercetin is a plant flavonoid and has a strong antioxidant properties as well as a variety of neuroprotective activities. Sodium selenate is a specific and potent activator of PP2A (protein phosphatase 2A) which is a serine-threonine phosphatase. The complex pathogenesis and etiology of neurodegenerative diseases clearly demonstrate that monotherapeutic drugs targeted to a single receptor or enzymatic system cannot successfully treat these multifactorial diseases. Recently, multipotential therapies have become more attractive strategies and the potential of multifunctional drug approaches has been emphasized in the literature. Therefore, within the scope of this thesis; the aim of this study was to investigate the synergistic neuroprotective effects of multi-targeted drug combination (QSS) obtained with a mixture of quercetin (Q) and sodium selenate (SS) against oxidative stress-induced neurodegeneration induced by H_2O_2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. For this purpose, SH-SY5Y cells were pretreated with Q, SS and QSS in the presence of H_2O_2 induced oxidative stress; viability tests (WST-1, annexin V-FITC containing propidium iodide and change in JC-1 mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)), intracellular antioxidant activity tests (intracellular catalase enzyme (CAT) activity, intracellular total antioxidant capacity (TAC)) and oxidative stress tests (intracellular reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO) and extracellular human $A\beta_{(1-42)}$) were applied. In conclusion, when the data obtained from all tests are evaluated together, it was determined that QSS showed neuroprotective effect synergistically against oxidative stress induced neurodegeneration in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.

2019, 118 pages

Keywords: Quercetin, Sodium selenate, SH-SY5Y cells, Neuroprotective effect, Neurodegeneration, Synergistic effect

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Komisyonu tarafından “SH-SY5Y Nöronal Hücre Hattında Kuersetin ve Sodyum Selenat Kombinasyonu İçeren Çok Hedefli İlacın Hidrojen Peroksit Kaynaklı Nörodejenerasyona Karşı Sinerjistik Nöroprotektif Etkilerinin Araştırılması” konulu Hızlı Destek projesi tarafından belirli bir kısmı desteklenen bu tez çalışması Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarları, Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasına verdikleri destekten dolayı Atatürk Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Öncelikle danışmanım Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU’na doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince verdiği sürekli destek, deneyim ve bilgisini cömertçe paylaştığı için teşekkür ediyorum. Tez çalışmalarım süresince bölümümüzün imkânlarını benden esirgemeyen ve gösterdiği anlayıştan ötürü Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Doç. Dr. Nevzat ESİM’e, bölümümüzün bütün imkânlarını sunan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL’e ve deneysel çalışmalarım için gerekli SH-SY5Y İnsan nöroblastoma hücre hattının temini aşamasında göstermiş olduğu yardımlardan dolayı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU’na ve bölüm asistanlarından Sayın Arş. Gör. Kemal Alp NALCI’ya teşekkür ederim.

Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAYA’ya ve bölüm asistanlarından Sayın Arş. Gör. Gürkan AYKUTOĞLU’na tez süresince verdikleri desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) çalışanlarından Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal Şimşek ÖZEK ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN'e tez çalışmam sırasında verdikleri sürekli destek, deneyim ve bilgilerini cömertçe paylaştıkları için teşekkür ediyorum.

Özellikle benim için dünyadaki en değerli insanlar olan babam Sayın Ahmet Dervişoğlu'na, annem Sayın Fatma Dervişoğlu'na, ağabeyim Sayın Dr. Muhammet Murat Dervişoğlu'na ve sevgili eşim Melike Dervişoğlu'na sonsuz sevgi ve destek, anlayış, sabır ve cesaretlendirme için içtenlikle teşekkür ediyorum. Ayrıca bu çalışmamı tezimin sonlarına doğru ailemize dahil olan yeni aile üyemiz canım kızım sevgili Deniz Dervişoğlu'na ithaf ediyorum.

Gökhan Dervişoğlu

Aralık, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Oksidatif Stres	1
1.2. Nörodejenerasyon.....	4
1.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidatif Stres	6
1.3.1. Alzheimer hastalığı (AD) ve oksidatif stres	7
1.3.2. Huntington hastalığı (HD) ve oksidatif stres.....	8
1.3.3. Parkinson hastalığı (PD) ve oksidatif stres.....	9
1.3.4. Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve oksidatif stres	10
1.3.5. Spinoserebellar ataksi hastalığı (SCA) ve oksidatif stres.....	11
1.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Terapötik Yaklaşımlar ve Kombine İlaç Terapisi.....	11
1.5. Kuersetin	13
1.5.1. Kuersetinin nöroprotektif etkisi.....	14
1.5.1.a. Oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı kuersetin.....	16
1.5.1.b. Nöroinflamatuvar yanıtı karşı kuersetin	16
1.5.1.c. Glutamat kaynaklı eksitotoksositeye karşı kuersetin	17
1.5.1.d. Kolinesteraz inhibitörü olarak kuersetin	17
1.5.1.e. α -Sinüklein fibrilizasyonu ve kuersetin.....	17
1.5.1.f. Tau patolojisine karşı kuersetin	18
1.5.1.g. Amiloidojenik protein oluşumuna karşı kuersetin	18
1.5.1.h. Nörotrofik faktörler ve kuersetin.....	18
1.5.1.i. Sirtuinler ve kuersetin	19
1.5.1.i. Kuersetinin hafıza ve biliş gelişimi üzerindeki etkileri.....	19

4.1.1.b. <i>In vitro</i> nörodejenerasyona karşı kuersetinin (Q) doz konsantrasyon sonuçları	63
4.1.1.c. <i>In vitro</i> nörodejenerasyona karşı sodyum selenatın (SS) doz konsantrasyon sonuçları	64
4.1.1.d. <i>In vitro</i> nörodejenerasyona karşı kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) nöroprotektif etkilerinin sonuçları	65
4.1.1.e. Çok hedefli kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) nörotoksisite sonuçları	66
4.1.2. Apoptotik testlerin sonuçları	67
4.1.2.a. Mitokondriyal membran potansiyel (MMP) değişimi ($\Delta\Psi_m$) sonuçları	67
4.1.2.b. Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı SH-SY5Y nöroblastoma sonuçları	70
4.2. Hücre İçi Antioksidan Testlerinin Sonuçları	73
4.2.1. Katalaz (CAT) aktivite sonuçları	73
4.2.2. Toplam antioksidan kapasite sonuçları	74
4.3. Oksidatif Hasar Testlerinin Sonuçları	76
4.3.1. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) oranları sonuçları	76
4.3.2. Lipit peroksidasyonu (LPO) sonuçları	77
4.3.3. <i>In vitro</i> hücre dışı insan A $\beta_{(1-42)}$ peptit konsantrasyonlarının sonuçları	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	80
KAYNAKLAR	98
EKLER	111
EK 1.	111
EK 2.	112
EK 3.	113
EK 4.	113
EK 5.	116
ÖZGEÇMİŞ	119

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Araşidonik Asit
AD	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APO E	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
Asetilkolin	Ach
Asetilkolinesteraz	AChE
ATP	Adenozin Trifosfat
ATXN1	Ataksin 1
A β	Amiloid Beta
BACE-1	β -Bölgesi APP Kesim Enzimi-1
Ca ²⁺	Kalsiyum Iyonu
CAT	Katalaz
CO ₂	Karbondioksit
CTF β	C-Terminal Parçası β
DCFH	2',7'-Dikloroflorosein
DCFH-DA	2',7'-Dikloroflorosein Diasetat
DHA	Dokosaheksaenoik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
E _{max}	Maksimum Nöroprotektif Etki Gösteren Doz Konsantrasyon Değeri
GCS	γ -Glutamil-Sistein Sentetaz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSH	Okside Olmuş Glutasyon
GST	Glutasyon Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HD	Huntington Hastalığı
HOO [•]	Hidroperoksil Radikali

HTT	Huntingtin Proteini
LD ₅₀	En Az %50 Oranında Hücre Ölümüne Yol Açan Doz
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LOO [•]	Lipit Peroksil Radikali.
LPO	Lipid Peroksidasyonu
MAPK	P38 Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
MDA	Malondialdehit
mHTT	Mutant Huntingtin Proteini
MS	Multiple Skleroz
NFT	Nörofibriler Yumak
NMDARs	N-Metil-D-Aspartat Tipi Glutamat Reseptörleri
NO [•]	Nitrik Oksit Radikali
NO ₂ [•]	Nitrojen Dioksit Radikali
Nrf2-ARE	Nükleer Faktör (Eritroid Türevi 2) Benzeri 2-Antioksidan Yanıt Elementi
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Anyon Radikali
OH [•]	Hidroksil Radikali
PARP	Poli [ADP-Riboz] Polimeraz
PBS	Fosfat Tuz Tanponu
PD	Parkinson Hastalığı
PGC-1 α	Peroksizom Proliferatör-Aktif Reseptör Gama Koaktivatörü 1-Alfa
PNO ₂	Paraoksijenaz 2
PP2A	Protein Fosfataz 2A
PRX	Peroksiredoksin
Q	Kuersetin (3,3',4',5,7-Pentahidroksiflavon)
QSS	Kuersetin ve Sodyum Selenat İçeren İlaç Kombinasyonu
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROO [•]	Peroksil Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
sAPP β	Çözünebilir Amiloid Öncü Protein B

SCA	Spinocerebellar Ataksi
Se	Selenyum
SOD	Süperoksit Dismutaz
SS	Sodyum Selenat (Na_2SeO_4)
TAC	Toplam Antioksidan Kapasite
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
TCA	Trikloroasetik Asit
TRX	Tiyoredoksin
TrxR-1	Tiyoredoksin Redüktaz-1
α -syn	Alfa-Sinüklein
$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal Membran Potansiyeli Değişimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Reaktif oksijen türleri üretiminin çeşitli aktivatör ve inhibitörlerinin şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2. Fizyolojik durum ve oksidatif stres durumunda hücre içi pro-oksidan/antioksidan dengesinin şematik gösterimi	3
Şekil 1.3. Reaktif oksijen türleri (ROS)/reaktif azot türleri (RNS) ve hastalıkların eksojen ve endojen kaynakları.....	4
Şekil 1.4. Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi	5
Şekil 1.5. Çok hedefli bir hastalıkta kombinasyon ilaç tedavisine yönelik üç yaklaşım.....	12
Şekil 1.6. Kuersetinin (A) kimyasal ve (B) 3D molekül yapısı	14
Şekil 1.7. Kuersetinin nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynayan çeşitli potansiyel hedefler üzerindeki etkileri	15
Şekil 1.8. Sodyum selenatın (Na_2SeO_4) (A) açık kimyasal formülü ve (B) 3D molekül yapısı	20
Şekil 3.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin görüntüsü, (20x) büyütme.....	39
Şekil 4.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 'nin LD_{50} değerinin belirlenmesi	63
Şekil 4.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde Q'nun maksimum nöroprotektif etki ($E_{\max}$) değerinin belirlenmesi	64
Şekil 4.3. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde SS'nin maksimum nöroprotektif etki ($E_{\max}$) değerinin belirlenmesi	65
Şekil 4.4. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde $E_{\max}$ değerlerindeki Q, SS ve QSS'nin nörotoksik ve <i>in vitro</i> nörodejenerasyona karşı nöroprotektif etkileri	66
Şekil 4.5. JC-1 ile boyanan SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerinin ($\Delta\psi_m$) floresan mikrografları	68
Şekil 4.6. JC-1 ile boyanan SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerinin ($\Delta\psi_m$) Flow sitometrik analizi (A) flow sitometri görüntüleri, (B) JC-1 agregatlarının % oranları	69

Şekil 4.7. PI içeren Annexin V-FITC apoptoz belirleme testi ile test edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin apoptotik, nekrotik ve sağlıklı olma durumlarını gösteren floresan mikrografları.....	72
Şekil 4.8. PI içeren Annexin V-FITC apoptoz belirleme testi ile test edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin apoptotik, nekrotik ve sağlıklı olma durumlarının değerlendirilmesi (A) Flow sitometri görüntüleri, (B) %hücre oranları.....	72
Şekil 4.9. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde katalaz aktivitesinin (%Kontrol) belirlenmesi.....	74
Şekil 4.10. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde toplam antioksidan kapasitelerin (%Kontrol) belirlenmesi	75
Şekil 4.11. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türleri miktarının (%Kontrol) belirlenmesi	76
Şekil 4.12. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde lipit peroksidasyonu seviyelerinin (%Kontrol) belirlenmesi	78
Şekil 4.13. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde <i>in vitro</i> insan A β ₍₁₋₄₂₎ peptit seviyelerinin (%Kontrol) belirlenmesi	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Başlıca endojen oksidanlar	2
Çizelge 1.2. Enzimatik antioksidan savunma sistemi	2
Çizelge 3.1. Hemositometre ile analiz çeşidine göre sayılarak ekilen hücre konsantrasyonları	42
Çizelge 3.2. Formaldehit standartlarının hazırlanması	52
Çizelge 3.3. Trolox standartlarının hazırlanması	54
Çizelge 3.4. Malondialdehit (MDA) Standartlarının Hazırlanması	57
Çizelge 4.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde deney grupları ve katalaz aktivite (nmol/min/ml) miktarları	73
Çizelge 4.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde deney grupları ve toplam antioksidan kapasite (mM trolox) miktarları	75
Çizelge 4.3. H ₂ O ₂ varlığında ve yokluğunda Q, SS ve QSS ile tek tek muamele edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyonu konsantrasyonları	77
Çizelge 4.4. Hidrojen peroksit varlığında ve yokluğunda Q, SS ve QSS ile tek tek muamele edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde A β ₍₁₋₄₂₎ peptit konsantrasyonları	79
Çizelge 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında H ₂ O ₂ ile indüklenen sitotoksitede çeşitlilik	81

1. GİRİŞ

1.1. Oksidatif Stres

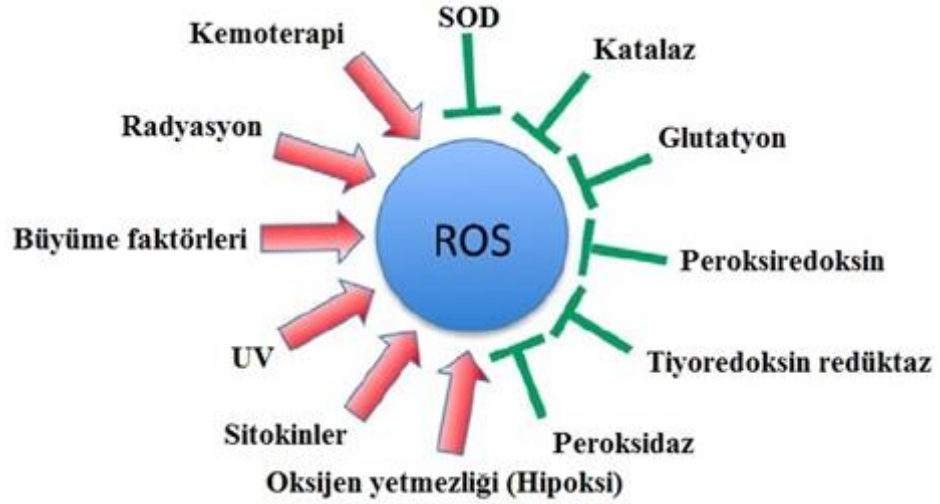
Solunum yapan tüm canlılar yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için moleküler oksijene (O_2) ihtiyaç duyarlar (Singh *et al.* 2019). Solunumda alınan O_2 'nin büyük bir çoğunluğu hücrelerde besin maddelerinden enerji eldesi için mitokondriyal redoks tepkimelerinde kullanılır. Fizyolojik koşullarda, mitokondriyal redoks tepkimeleri sonucunda moleküler oksijen vasıtasıyla yüksek enerji eldesinin yanı sıra düşük seviyede reaktif oksijen türleri (ROS) ve/veya reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi birçok serbest radikal çeşidi de oluşturulur. Serbest bir radikal, bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren ve bundan dolayı diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girme eğilimi gösteren yüksek enerjili atom veya moleküllerdir (Halliwell 2006b). ROS'lar, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksil radikali ($HOO^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$), lipit peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibi oksijen radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi sonradan radikallere dönüşebilen ve radikal olmayan türleri içerirler (Çizelge 1.1). RNS'ler ise nitrik oksit radikali ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit radikali ($NO_2^{\cdot}$) gibi türleri içerirler. Hücre içinde düşük seviyede oluşturulan ROS ve/veya RNS türleri hücre içi oksidasyon, hücre çoğalması ve canlılığını sürdürmesinde kritik sinyal molekülleri olarak çeşitli hücresel aktivitelerde kullanılırlar ve hücre sel antioksidan savunma sistemi (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), vs.) tarafından belli bir seviyede kontrol altında tutulurlar (Ray *et al.* 2012) (Çizelge 1.2, Şekil 1.1 ve Şekil 1.2).

Çizelge 1.1. Başlıca endojen oksidanlar

Oksidan	Formül	Reaksiyon Denklemi	Kaynak
Süperoksit anyon	$O_2^{\bullet -}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\bullet -} + H^+$ $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$Hipoksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow Ksantin + H_2O_2$ $Ksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow \ddot{U}rik\ asit + H_2O_2$ $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Hidroksil radikal	$OH^{\bullet}$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Peroksil radikalleri	$ROO^{\bullet}$	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Hidroperoksil radikali	$HOO^{\bullet}$	$H_2O + O_2^{\bullet -} \leftrightarrow HOO^{\bullet} + OH^-$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Lipit peroksil radikali	$LOO^{\bullet}$	$L^{\bullet} \text{ (Lipit radikal)} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$	Yin <i>et al.</i> (2011)

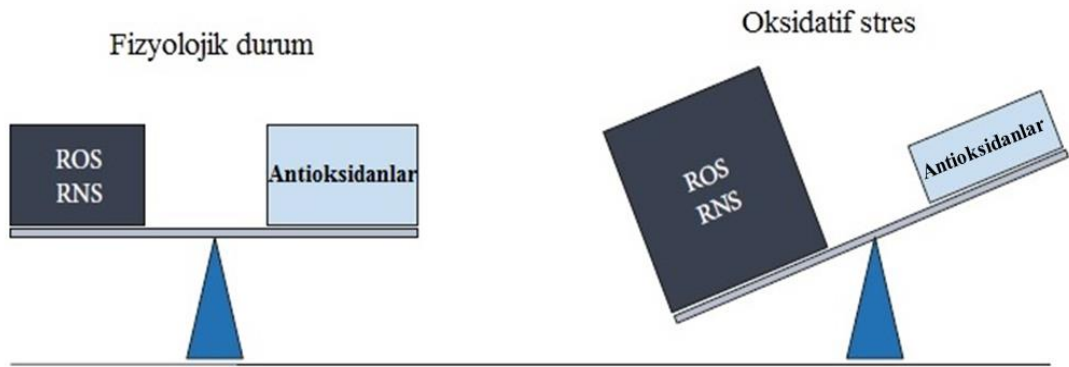
Çizelge 1.2. Enzimatik antioksidan savunma sistemi

Enzim adı	Kısaltma	Katalizlediği Reaksiyon	Kaynak
Süperoksit dismutaz	SOD	$M^{(n+1)+} -SOD + O_2^{\bullet -} \leftrightarrow M^{n+} -SOD + O_2$ $M^{n+} -SOD + O_2 + 2H^+ \leftrightarrow M^{n+} -SOD + H_2O_2$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Katalaz	CAT	$2 H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + H_2O$ $Fe(III)-E + H_2O_2 \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)-E(.+)$ $H_2O + O = Fe(IV)-E(.+) \rightarrow Fe(III)-E + H_2O + O_2$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Glutasyon peroksidaz	GPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Tiyoredoksin	TRX	Adenozin monofosfat + sülfid + tiyoredoksin disülfid = 5'-adenilil sülfat + tiyoredoksin Adenozin 3',5'-bisfosfat + sülfid + tiyoredoksin disülfid = 3'-fosfoadenilil sülfat + tiyoredoksin	Birben <i>et al.</i> (2012)
Peroksiredoksin	PRX	$2 R'-SH + ROOH = R'-S-S-R' + H_2O + ROH$	Birben <i>et al.</i> (2012)
Glutasyon transferaz	GST	$RX + GSH = HX + R-S-GSH$	Birben <i>et al.</i> (2012)



Şekil 1.1. Reaktif oksijen türleri üretiminin çeşitli aktivatör ve inhibitörlerinin şematik gösterimi (Reuter *et al.* 2010)

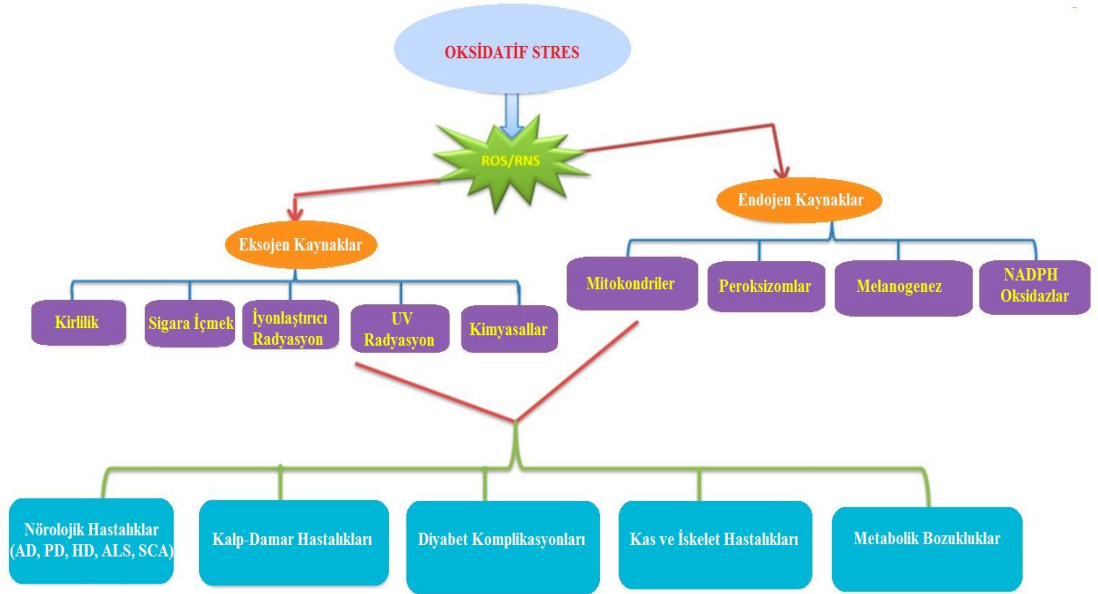
Oksidatif stres, çeşitli endojen ve eksojen stres faktörleri (Şekil 1.1 ve Şekil 1.3) varlığında hücre içi pro-oksidan/antioksidan dengenin pro-oksidan tarafa doğru kayması olarak tanımlanabilir (Zhao 2005). Bu durum mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına ve hücre içi serbest radikal (ROS/RNS) üretiminin aşırı artmasına sebep olur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Fizyolojik durum ve oksidatif stres durumunda hücre içi pro-oksidan/antioksidan dengesinin şematik gösterimi (Cenini *et al.* 2019)

Oksidatif stres durumunda üretilen serbest radikaller oldukça kararsız ve reaktif bir yapıdadırlar. Bu nedenle proteinler, lipidler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi ana

hücrel biyomoleküllere saldırarak hücre veya dokularda oksidatif hasara neden olurlar. Oksidatif stres kaynaklı hasarlar ateroskleroz, diyabet, kanser, nörodejenerasyon ve yaşlanma gibi çeşitli dejeneratif süreç, hastalık ve sendromlara yol açarlar (Şekil 1.3) (Ray *et al.* 2012; Poljsak and Milisav 2013).

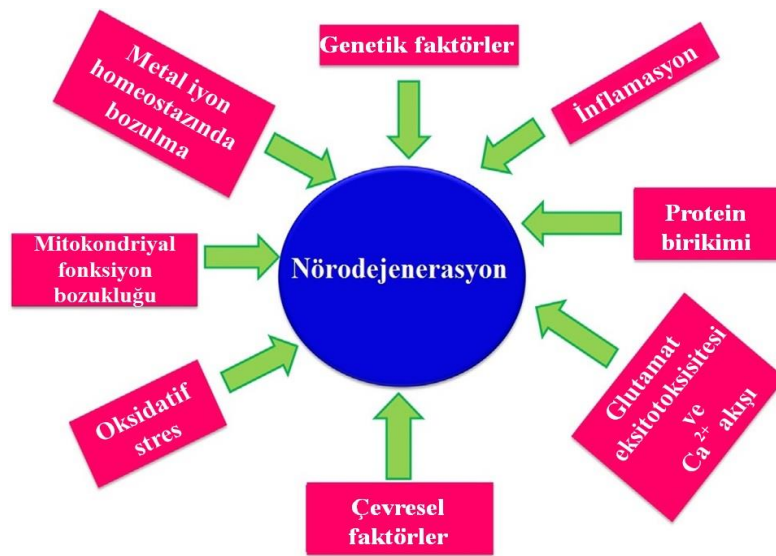


Şekil 1.3. Reaktif oksijen türleri (ROS)/reaktif azot türleri (RNS) ve hastalıkların eksojen ve endojen kaynakları (Singh *et al.* 2019)

1.2. Nörodejenerasyon

Oksijen canlı organizmalarda tartışmasız şekilde hayati bir role sahiptir. Canlılar farklı dokularındaki metabolik fonksiyonlarına bağlı olarak farklı miktarda oksijene ihtiyaç duyarlar. Beyin toplam vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Total glikoz tüketiminin büyük bir bölümü ve vücuda alınan toplam oksijenin yaklaşık %20'den fazlası beyin dokusu tarafından kullanılmaktadır. Bu metabolik faaliyetlerden de yüksek oranda nöronlar ve astrositler sorumludurlar (Halliwell 2006a). Beyin, çoklu doymamış yağ asitleri (Araşidonik asit (AA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA)), okside edilebilir substratlar olarak katekolaminler ve redoks aktif metaller (Demir, bakır ve çinko) bakımından zengindir. Beynin antioksidan savunma sistemi diğer organlarla karşılaştırıldığında nispeten daha zayıftır ve bu nedenle beyin daha fazla ROS üretimine

ve oksidatif hasara yatkındır (Berg *et al.* 2004; Haddadi *et al.* 2014). Beyin fonksiyonlarının düzgün çalışması için büyük miktarda oksijen tüketilir ve hiperoksi durumunda O_2 molekülü ROS artışına sebep olur. Buda nöronlar üzerinde toksik etki gösterir. Nörodejenerasyona dahil olan ROS, H_2O_2 , O_2^- ve yüksek oranda reaktif $OH^\bullet$ içerir. Nitrik oksit (NO) gibi reaktif azot türlerinin (RNS) de nöronlar üzerinde dejeneratif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Singh *et al.* 2019). ROS hücrede protein, nükleik asitler veya lipit gibi biyomolekülleri hedef alarak onların fonksiyonunu modüle eder ve nörodejenerasyon gelişimine katkıda bulunur. Örneğin, beyinde bol miktarda bulunan araşidonik asit ve dokosaheksanoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak lipit peroksidasyonuna ve malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına yol açarlar; proteinlere saldırarak amino asit zincirlerinin hem omurgasını hem de amino asit yan zincirlerini okside ederek karbonil grupları oluştururlar; nükleik asitlere saldırarak DNA-protein çapraz bağlarına, pürin ve pirimidin bazlarını değişime uğratmak suretiyle DNA mutasyonlarına ve zincirde kırılmaya sebep olurlar (Singh *et al.* 2019). Çeşitli çevresel ve genetik faktörler beyinde oksidatif strese yol açabilir. Beyinde oluşan oksidatif stres sonucu nöronlarda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, metal-iyon iç dengesinde bozulma, inflamasyon, amiloid protein birikimi, hücre içine kalsiyum akışı ve glutamat eksitotoksitesisi yoluyla nörodejenerasyon ve nöronal apoptoz oluşur (Şekil 1. 4) (Suganthi *et al.* 2016).



Şekil 1.4. Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi (Suganthi *et al.* 2016)

1.3. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidatif Stres

Nörodejeneratif hastalıklar nöronal hücrelerde ilerleyici nörodejenerasyon ile birlikte nöronal kayıp ile karakterize edilirler ve hasta bireylerde motor veya bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya yol açarlar. Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD), Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Spinoserebellar ataksi hastalığı (SCA) yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklardır ve bu hastalıklar gibi 21. yüzyılın başlıca problemlerinden olan 600'den fazla hastalık merkezi sinir sistemini etkilemektedir. Yaşlanan nüfus artmaya devam ettikçe bu durum kaçınılmaz olarak artmaktadır ve bu hastalıklar toplum için ciddi bir sosyoekonomik yük teşkil etmektedir (Hamer and Chida 2009; Matilla-Dueñas *et al.* 2014; Kovacs 2014; Association 2016). AD, Amerika Birleşik Devletleri'nde en önde gelen altıncı ölüm nedeni iken 65 yaş üstü nüfusun %1-2'sini etkileyen PD ise en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalık olarak yer alır (Bekris *et al.* 2010; Association 2011). Oksidatif stres nörodejeneratif hastalıklarda nöronal kayıptan sorumlu ana faktörlerden biridir. PD ve AD üzerine yapılan birçok çalışmada, doğal antioksidan glutatyon (GSH) seviyesinin düşük olduğu görülürken; oksidatif hasar belirteçlerinin, lipid peroksidasyonunun (LPO), keto-protein oluşumunun ve DNA oksidasyonunun daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir (Haddadi *et al.* 2014).

Biyolojik sistem içinde doğal olarak üretilen ROS; iltihaplanma, hücrenin hayatta kalması ve stres etkisine tepkilerin yanı sıra kardiyovasküler bozukluklar, kas fonksiyon bozukluğu, alerji ve kanser gibi birçok hastalığa aracılık etmede önemli rol oynarlar (Zuo *et al.* 2015b; He and Zuo 2015). Nörodejeneratif hastalıklara sahip bireylerin beyinde yaygın olarak yüksek oksidatif stres seviyeleri gözlenmektedir ve bu durum ROS'un nörodejeneratif hastalıklarda kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Dias *et al.* 2013). Mitokondriden üretilen ROS, NADPH oksidaz (Nox) ve ksantin oksidaz (XO) gibi stres faktörleri fizyolojik koşullar altında endojen antioksidanlar tarafından düşük seviyelerde dengede tutulur. Bununla birlikte nöronal inflamasyon veya anormal mitokondriyal fonksiyonla bu redoks dengesi bozulabilir (Rego and Oliveira 2003). AD ve PD gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezi, yanlış

katlanmış proteinlerin birikmesi ile ilişkilidir. Bu modifiye edilmiş proteinlerin toplanması, beyinde, belirgin ROS salınımını ve ardından oksidatif stresi indükleyen, inflamatuvar bir yanıtı tetikleyebilir (Zuo *et al.* 2015b). Genellikle anormal ROS üretimine eşlik eden mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, nörodejeneratif bozukluklarla sıkı sıkıya ilişkilidir (Lin and Beal 2006).

1.3.1. Alzheimer hastalığı (AD) ve oksidatif stres

AD; günlük yaşam aktivitelerini önemli ölçüde bozan davranış, biliş ve işlevselliğin giderek kötüleşmesi ile karakterize olan en yaygın görülen nörodejeneratif bir hastalıktır (Zuo *et al.* 2015a). AD'nin patofizyolojik özellikleri temel olarak hücre dışı amiloid beta (A β) plakların ve hücre içi tau nörofibriler yumakların (NFT) birikimini içerir (Butterfield 2014). Oksidatif stres kaynaklı A β peptitleri birikiminin AD patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. A β plakları, N-metil-D-aspartat tipi glutamat reseptörlerini (NMDARs) aktive ederek kalsiyum iyonun (Ca²⁺) membran geçişini artırır, Ca²⁺ homeostazisinde dengesizliğe yol açarak Ca²⁺'nin sitozolde aşırı birikmesine neden olur ve ayrıca endoplazmik retikulumda (ER) Ca²⁺ depolarını azaltabilir. Sitozolik Ca²⁺ artışına cevap olarak; endojen GSH seviyeleri azalır, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu gerçekleşir, adenosin trifosfat (ATP) üretimi azalır ve hücre içi ROS'un aşırı üretimi gerçekleşir. ROS aşırı üretimi AD'de A β peptiti artışı ve birikiminde önemli rol oynamaktadır (Ferreiro *et al.* 2008; Huang *et al.* 2016). Yaşlanma, iltihaplanma, çevresel stres ve bazı beslenme faktörleri (örneğin redoks aktif metaller), A β peptit üretimini artırır ve ilaveten oksidatif stresi indükleyebilir. Ayrıca oksidatif stres; kirleticiler, kimyasallar ve radyasyon gibi çevresel faktörler tarafından da indüklenebilir (Aseervatham *et al.* 2013). ROS potansiyel olarak JNK/stresle aktive olan protein kinaz yollarını aktive ederek tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunda ve A β kaynaklı hücre ölümünde rol oynamaktadır (Patten *et al.* 2010). A β peptitleri, NADPH oksidazı aktive ederek serbest radikal oluşumunu doğrudan başlatabilir (Shelat *et al.* 2008). A β kaynaklı ROS aşırı üretimi, MAPK'ı (p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz) aktive ederek tau hiperfosforilasyonuna neden olur. Hiperfosforile tau proteinleri anormal bir şekilde birikerek, hücre içi nörofibriler yumakların (NFTs)

oluşumuna yol açar (Giraldo *et al.* 2014). Ayrıca A β , spesifik olarak kalsinörin aktivitesini artırarak Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörünü aktive eder ve mitokondriden sitokrom c salınımına yol açarak hücrel apoptotik kaskadlara aracılık etmede önemli bir rol oynar. A β ayrıca kaspazlarla doğrudan ilişkiye girebilir, apoptozisi tetikleyebilir ve sonunda nöronal hücre kaybına yol açabilir (D'amelio *et al.* 2011). AD için terapötik yaklaşımlar; A β oligomerlerini ve fosforile tau seviyelerini düşürmeye, oksidatif stresi azaltmaya ve epigenetik değişiklikleri kontrol etmeye odaklanır. Bu tedaviler çoğunlukla nöroprotektif, anti-enflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip bileşiklere dayanır (Dumont and Beal 2011). ROS ile ilişkili bazı nöroprotektif terapötik stratejiler AD tedavisinde büyük bir potansiyel göstermeye devam etmektedir (Liu *et al.* 2017).

1.3.2. Huntington hastalığı (HD) ve oksidatif stres

Huntington hastalığı (HD), genel popülasyonda 7500 kişiden 1'ini etkileyen ve en yaygın kalıtsal nörodejeneratif hastalıklardan biri olan, otozomal dominant, nörodejeneratif bir hastalıktır (Fisher and Hayden 2014). HD'nin genetik nedeni, huntingtin geninin 1 ekzonunda CAG (sitozin, adenin, guanin) dizilerinin 35 tekrarın ötesinde patojenik bir şekilde artışıdır. CAG'nin artışı HTT geninin eksonunda tekrar ederek poliglutamin artmasına neden olan bir mutasyona yol açar ve bu da agregasyona karşı meyilli bir protein ürünü olan mutant Huntingtin proteini (mHTT) ile sonuçlanır. mHTT agregatları hasta bireylerin beyni boyunca birikir ve bu da protein kalite kontrol ve transkripsiyon sürecini bozabilir. Ayrıca sitoplazmik plak ve nöronal nükleer birikinti oluşumlarında katkıda bulunabilir. Etkilenen bireylerin beyindeki bu değişiklikler HD'deki anormal motor ve bilişsel sorunlardan potansiyel olarak sorumludur (Andrew *et al.* 1993; Labbadia and Morimoto 2013; Liu *et al.* 2017). mHTT'nin, antioksidan enzimlerin seviyesini değiştirerek ve Striatumda mitokondrinin miktarını azaltarak PGC-1 α 'nın (peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör- γ koaktivatör-1 α) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Cui *et al.* 2006). PGC-1 α , enerji metabolizmasında yer alan genleri düzenleyen transkripsiyonel bir koaktivatördür. Mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicisidir (Sanchis-Gomar *et al.* 2014). mHTT'nin mitokondriyal disfonksiyonda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. mHTT,

mitokondriyal membrana doğrudan temas eder ve kalsiyum homeostazını bozar, mitokondriyal fisyon/füzyonu ve mitokondriyal enerji metabolizmasını engeller, mitokondriyal DNA'ya zarar vererek mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve ayrıca aşırı ROS birikimine neden olur. ROS kaynaklı oksidatif stres nörodejeneratif bir şekilde apoptoz ve hücre ölümüne yol açar (Song *et al.* 2011; Shirendeb *et al.* 2011; Suzuki *et al.* 2012; Zheng *et al.* 2018).

1.3.3. Parkinson hastalığı (PD) ve oksidatif stres

Parkinson hastalığı (PD), beynin substantia nigra'nın pars kompakta bölümünde dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterize kronik, progresif ve ikinci en yaygın görülen nörodejeneratif bir hastalıktır (Blesa *et al.* 2015; Qin *et al.* 2017). PD'nin görülme sıklığı 65 yaş üstü bireylerde yaklaşık %1-2 dir ve bu oran 85 yaşın üzerindeki bireylerde %4'e kadar yükselir (Tysnes and Storstein 2017). Dünya çapında Parkinson hastası sayısının, 1990'dan 2016'ya kadar 26 yılda iki kattan daha fazla artarak 2,5 milyondan 6,1 milyon hastaya kadar ulaştığı bildirilmiştir (Rocca 2018). Dopaminerjik nöronların dejenerasyonunun altında yatan patolojik mekanizmalar, aşırı ROS veya diğer serbest radikallerin üretimi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu veya inflamasyondan kaynaklanabilir (Hwang 2013). Beyinde, nöronlarda ve gliada ROS üretimi başlıca mitokondride gerçekleştirilir. PD'de nöroinflamasyon, dopamin yıkımı, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, yaşlanma, GSH tükenmesi ve yüksek demir veya Ca^{2+} seviyelerine bağlı olarak serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır (Dias *et al.* 2013). Ayrıca, bireyler pestisitler, nörotoksinler ve dopamin gibi çevresel faktörlere maruz kaldığında PD'de ROS birikimi daha da artabilir (Gangemi *et al.* 2016).

Nörodejenerasyon kaynaklı ROS, önemli hücrel proteinlere zarar verebilir ve oksidatif stresi teşvik ederek hücrel ve mitokondriyal lipid membranlarını bozabilir. Mitokondriyal disfonksiyon, solunum zincirinde serbest radikal üretiminin artmasına, oksidatif fosforilasyon sistem bozukluğu ve mitokondriyal kompleks I eksikliğine neden olur (Dias *et al.* 2013; Guo *et al.* 2018). Mitokondriyal kompleks I eksikliği PD ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve nöronal apoptozun büyük bir kısmı kompleks I

eksikliğine bağlanabilir (Guo *et al.* 2018). PINK1, DJ-1, parkin, α -sinüklein ve LRRK2 (lösin bakımından zengin tekrar kinaz 2) genlerindeki mutasyonların, PD gelişiminde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu mutasyonlar potansiyel olarak mitokondriyal fonksiyonu bozabilir, bu da ROS oluşumunun artmasına ve oksidatif strese duyarlılığın artmasına neden olabilir (Cookson 2012). Ayrıca, α -sinüklein agregasyonu mitokondriyal kompleks I aktivitelerini kesintiye uğratarak ATP sentezinin azalmasına ve mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına sebep olur. PD'de α -sinüklein birikimini proteazomal bozukluğun yanı sıra protein parçalanma veriminin azalmasına, translayon ve translayon sonrası protein aşırı birikimine neden olur (Ganguly *et al.* 2017). Kısmen dopamin kaynaklı ROS'un neden olduğu proteazomal bozulmanın, PD'deki nörodejenerasyonda kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Ganguly *et al.* 2017).

1.3.4. Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve oksidatif stres

Amiyotrofik lateral skleroz (ALS), omuriliğin ön boynuzunda ilerleyeci motor nöron kaybı ile karakterize edilen en yıkıcı nörolojik hastalıklardan biridir (Kiernan *et al.* 2011; D'Amico *et al.* 2013). ALS'li hastalar, tüm iskelet kaslarının yanı sıra bulbar ve solunum kaslarını içeren, sürekli ilerleyen felç geliştirir. ALS hastalığı ailesel veya sporadik olarak sınıflandırılır. Ailesel ALS tüm ALS vakalarının %5-10'unu oluşturur (D'Amico *et al.* 2013). Sporadik ALS (sALS) tipik olarak 50-60 yaşları arasında ortaya çıkar (Ingre *et al.* 2015). Ailesel ALS olgularının yaklaşık %20'si SOD1'deki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Kiernan *et al.* 2011). SOD1'in birincil fonksiyonunun, $O_2^{\cdot-}$ 'yi O_2 'ye ve H_2O_2 'e dönüştüren sitozolik ve mitokondriyal bir antioksidan enzim olduğu düşünülmektedir; ayrıca hücre solunum modülasyonu, enerji metabolizması ve post-translasyonel modifikasyonlarında da rol oynar (Saccon *et al.* 2013; Bunton-Stasyshyn *et al.* 2015). SOD1 mutantları, ALS'de motor nöron ölümünün nedeni olduğu düşünülen Nox2'ye bağlı ROS üretimini artırır (Li *et al.* 2011). Oksitlenmiş veya yanlış katlanmış doğal tip SOD1'in, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açarak sALS patogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (D'Amico *et al.* 2013). Mutant SOD1, motor nöronlarda ve destekleyici glial hücrelerin

aktivitesinde sinyal iletim yollarının düzensizliği yoluyla ailesel ALS'nin ilerlemesine de katkıda bulunabilir (Lee *et al.* 2016).

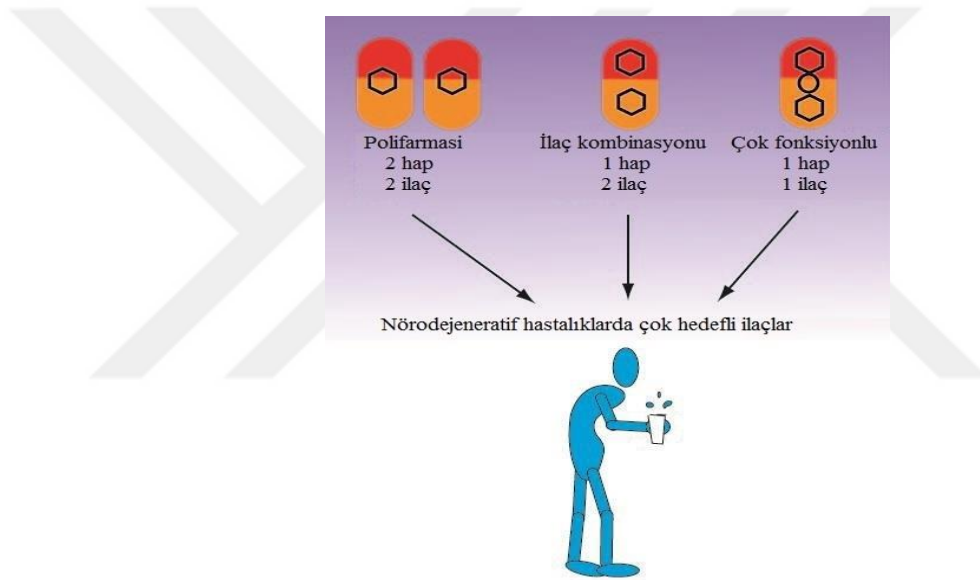
1.3.5. Spinoserebellar ataksi hastalığı (SCA) ve oksidatif stres

Spinoserebellar ataksi (SCA), patofizyolojik olarak tekrarlanan CAG trinükleotitlerinin artması yoluyla arttırılmış bir poliglutamine sahip olan mutant ATXN1 (ataksin 1) proteininin aşırı ifadesi sonucu beyincik, beyin sapı ve omurilikte ilerleyici dejenerasyon ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. SCA ile ilişkili ortak semptomlar, nihayetinde ölüme neden olabilen ataksik yürüme bozukluğu, dizatri, osculomotor ve bilişsel bozukluklardır (Rossi *et al.* 2014). SCA hastalığına sahip bireylerin beyinde solunum kompleksi I eksikliği, mitokondriyal DNA hasarı ve yüksek oksidatif stres gözlemlenmiştir (Hakonen *et al.* 2008). Oksidatif stres kaynaklı mitokondriyal bozulmalar ile SCA'nın şiddetlenmesi arasında potansiyel bir korelasyon olduğu düşünülmektedir (Stucki *et al.* 2016).

1.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Terapötik Yaklaşımlar ve Kombine İlaç Terapisi

Nörodejeneratif hastalıklara sahip olan kişiler geleneksel “bir ilaç-bir hastalık hedefi” felsefesine dayanan ve genellikle tek bir moleküler hedefe etki etmek için geliştirilen ilaçlardan yararlanmaktadır. Aslında nörodejeneratif hastalıklar çok sayıda ilaç hedefi içeren bir yolak sistemine sahiptirler. Bu yüzden tek hedefli etki mekanizmasına sahip bir ilacın her zaman karmaşık yolak sistemine sahip bir hastalığı iyileştirmesi veya düzeltmesi beklenemez. Ayrıca bir “ilaç-bir hastalık hedefi” felsefesine dayanan mevcut farmakolojik yaklaşımlar, hastalığın seyrini önemli ölçüde değiştirme kabiliyetleri bakımından da sınırlıdır ve hastalara eksik/geçici yararlar sunmaktadır. Literatürde yapılan son çalışmalarda, karmaşık etiyolojik yollara sahip hastalıkları tedavi etmek için geleneksel tedavi felsefesinde bir strateji değişikliğine gidilerek çok hedefli ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi gerekliliği vurgulanmaktadır. Bu strateji değişikliği kapsamında nörodejeneratif hastalıkların “polifarmasi” (her biri hastalıktaki

farklı yollara etki eden birden fazla ilacın ayrı ayrı olarak verilmesi), “ilaç kombinasyonu” (her biri hastalıktaki farklı yollara etki eden birden fazla ilacın uygun dozlarda kombine edilerek tek bir ilaç şeklinde verilmesi) veya “çoklu mekanizma ilaçları” (farklı yollara etki eden ve farmakolojik olarak aktif birden fazla moleküle sahip sentezlenmiş bir ilaç) ile tedavi edilmesinin gerekliliği bildirilmektedir (Şekil 1. 5) (Morphy *et al.* 2004; Youdim and Buccafusco 2005a; Youdim and Buccafusco 2005b; Morphy and Rankovic 2005; Zheng *et al.* 2005; Van der Schyf *et al.* 2006; Zimmermann *et al.* 2007; Bolognesi *et al.* 2009; Youdim 2010b).



Şekil 1.5. Çok hedefli bir hastalıkta kombinasyon ilaç tedavisine yönelik üç yaklaşım (Youdim 2010a)

Bu yaklaşımlardan hangisinin önümüzdeki yıllarda daha başarılı olduğuna bakılmaksızın, nörodejeneratif hastalıkların gelecekte hastalığı modifiye eden çoklu tedavi yaklaşımları gerektirmesi muhtemeldir.

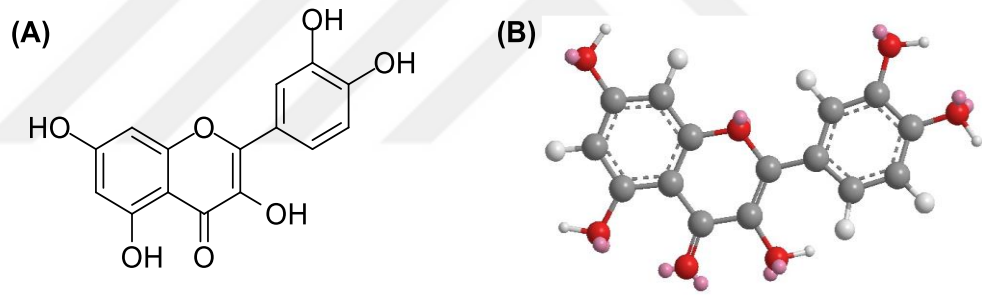
Polifarmasi, belirli bir hastalığı tedavi etmek amacıyla hastanın ilaç profilinde farklı etiyolojik hedeflere bağımsız olarak etki eden iki veya daha fazla ilacın klinik uygulamasıdır. Birkaç ilacın kombinasyonunu kullanarak yapılan çoklu hedefleme ile tedavi, polifarmasötik bir yaklaşımla birkaç yıl boyunca klinik ortamda kullanım alanı

bulmuştur. Örneğin, böyle bir yaklaşım, HIV ters transkriptaz inhibitörleri ve HIV proteaz inhibitörlerinin bir kokteyl olarak birlikte uygulandığı AIDS terapisinde yaygın olarak kullanılmıştır (Rutherford *et al.* 2003). Astım tedavisinde salmeterol (β_2 -adrenerjik agonist) ve flutikazon (bir glukokortikoid steroid) kombinasyon halinde uygulanmıştır. Ayrıca, simvastatin [3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü] ve ezetimibin (diyet kolesterol alımının bir inhibitörü) kombinasyonu (Vytorin®'de) hiperlipidemiye tedavi etmek için kullanılmaktadır (Zimmermann *et al.* 2007). *In vitro* nöronal çalışmalarda ise Romero *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada görüldüğü gibi; galantamin ve melatoninin birlikte sinerjistik etkilerinin nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmek için kullanışlı ve yeni bir strateji sağlayabileceği hipotezi üzerinde durulmuştur. Oksidatif strese maruz kalan SH-SY5Y hücrelerine en düşük melatonin ve galantamin konsantrasyonlarının kombinasyonunun verilmesiyle yalnızca etkin ve yüksek melatonin veya galantamin konsantrasyonlarının sağladığı maksimum korumaya benzer sinerjik ve önemli bir nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir. Ryu *et al.* (2006) *in vivo* olarak Huntington hastalığının eksitotoksik hayvan bir modeline minosiklin ve piruvat ile kombine tedavi uygulamışlar ve uygulanan her ajana göre kombine bileşenin; inflamasyon, oksidatif hasar ve nöronal zararlara karşı daha fazla nöroprotektif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Morton *et al.* (2005) bir genetik mutasyon kaynaklı Huntington hastalığına sahip transgenik R6/2 farelerine kombinasyon ilaç tedavisi (takrin, moklobemid ve kreatin) uygulamışlar ve kombine ilaç tedavisinin R6/2 transgenik farelerde gen ekspresyonu değişikliklerini tersine çevirdiğini ve bilişsel fenotipi iyileştirdiği göstermişlerdir. Literatür çalışmalarında görüldüğü gibi birden fazla yolağı modüle etmek için farmakolojik ajanların bir kombinasyonunun kullanılması, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde en etkili ve ümit verici yollardan birisidir.

1.5. Kuersetin

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan ve ilk olarak 1936 yılında fizyolog Albert Szent-Györgyi de Nagyrápolt tarafından izole edilen eşsiz bir biflavonoid dir (Harborne 1988). Kuersetin, flavonol alt sınıfının önemli bir

bileşenidir ve toplam flavonoid alımının %60-75'ini oluşturur (Bouktaib *et al.* 2002). Geleneksel ayurveda, unani, Çin tıbbı ve yerli amerikan ilaçlarında yaygın olarak kullanılan tıbbi otlar, kuersetin bakımından zengindirler. Antioksidan, pro-oksidan, apoptotik ve proapoptotik, nöroprotektif, antiviral, antikanser, kardiyovasküler, antimikrobiyal, anti-enflamatuar, hepatoprotektif ve antiobezite aktiviteleri de dahil olmak üzere kuersetinin çoklu farmakolojik etkileri, bu fitokimyasalı yaşam tarzıyla ilişkili hastalıkların önlenmesi için umut verici bir gıda bileşeni yapmıştır (Nishimuro *et al.* 2015; Suganthi *et al.* 2016). Kuersetinin güçlü antioksidan özelliği onun eşsiz kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Yapısında bulundurduğu beş -OH grubu ve konjuge π bağ orbitali; güçlü elektron/proton donörleri ve H_2O_2 temizleyici olarak işlev görerek bu eşsiz kimyasalın biyolojik aktivitesini belirler (Şekil 1.6) (Gutzke *et al.* 1957; Hollman and Katan 1997).



Şekil 1.6. Kuersetinin (A) kimyasal ve (B) 3D molekül yapısı

1.5.1. Kuersetinin nöroprotektif etkisi

Kuersetin, nörodejeneratif bozukluklarda rol alan oksidatif stres, nöro-inflamasyon, glutamat eksitotoksitesi, asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, α -sinüklein birikimi, tau hiperfosforilasyonu, amiloidojenik protein birikimi, nörotrofik faktörler, sirtuinlerin regülasyonu gibi mekanizmalar üzerinde çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir. Bu etkiler şu şekilde özetlenebilir (Şekil 1.7);

Şekil 1.7. Kuersetinin nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynayan çeşitli potansiyel hedefler üzerindeki etkileri (Suganthi *et al.* 2016)

1.5.1.a. Oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı kuersetin

Kuersetin, direkt serbest radikal süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri sayesinde, oksidatif stres kaynaklı nöronal hasarı etkili bir şekilde önleyebilir (Echeverry *et al.* 2010). Kuersetinin direkt antioksidan aktivitesinin yanı sıra, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz inhibisyonunu, Nrf2-ARE (Nükleer faktör (eritroid türevi 2) benzeri 2-antioksidan yanıt elementi) aktivasyonunu ve GCS (γ -glutamil-sistein sentetaz) ekspresyonunun artışını da sağlayarak oksidatif stres kaynaklı nöronal hasarı önlediği bildirilmiştir (Arredondo *et al.* 2010). Kuersetin, hücrelerin H_2O_2 , hidroperoksit ve A β peptit, 6-hidroksidopamin gibi oksidanlar tarafından indüklenen oksidatif strese direncini artırır (Suematsu *et al.* 2011; Magalingam *et al.* 2016). Kuersetinin, makrofajlarda, beyin hücrelerinde, striatal astrositlerde ve nöronlarda oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını önlemede önemli bir rol oynayan PNO₂'nin (Paraoksijenaz 2) hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. (Costa *et al.* 2014).

1.5.1.b. Nöroinflamatuvar yanıtı karşı kuersetin

İnflamasyon, nörodejeneratif hastalıklarda merkezi bir rol oynar (Glass *et al.* 2010). Kuersetin güçlü bir anti-enflamatuvar aktiviteye sahiptir. NO aşırı üretimini, iNOS ekspresyonunu baskılayarak, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz, c-Jun, N-terminal kinaz, AKT, Src, Janus kinaz-1'i azaltarak, protein-1'i (AP-1) aktive ederek ve HMOX1 (heme oksijenaz-1) ekspresyonunu artırarak enflamasyonu inhibe eder (Sun *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2011). Kuersetinin ayrıca sitokinler TNF α ve IL-1 α 'nın mRNA ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Sharma *et al.* 2007). Kuersetin, TLR4 (Toll benzeri reseptör 4) ve COX-2 (siklooksijenaz 2) sinyal kaskadını zayıflatarak güçlü bir anti-enflamatuvar aktivite göstermiştir (Testa *et al.* 2014). Kuersetin, ROS üretimini düşürerek, apoptotik hücreleri azaltarak ve hem oksijenaz-1 ekspresyonunu artırarak nöroprotektif etki gösterir (Lavoie *et al.* 2009). Kuersetinin, IL-6, IL-8, monosit kemoatraktan protein-1 ve ROS üretiminin salımını inhibe ederek inflamasyonu hafiflettiği rapor edilmiştir. (Sharma *et al.* 2007). Kuersetin anti-enflamatuvar etkilerinin arkasındaki potansiyel bir

mekanizması da, Paraoksonaz 2 yolunu indükleyen NF-kB'yi modüle ederek TNF- α ekspresyonunu inhibe etme kabiliyetidir (Suganthi *et al.* 2016).

1.5.1.c. Glutamat kaynaklı eksitotoksositeye karşı kuersetin

Glutamat eksitotoksitesisi, glutamat reseptörlerinin aşırı ve düzensiz aktivasyonundan kaynaklanır. Eksitotoksosite; nörotravmaya, epilepsi, hipoksik-iskemik beyin yaralanmasına ve AD, PD, MS ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açan nöronal hasara katkıda bulunur (Esposito *et al.* 2013). Kuersetinin, hücre içi ROS üretimini, glutamat aracılı Ca^{2+} akışını azaltarak, mitokondriyal transmembran potansiyelini koruyarak ve apoptosis ile ilişkili birkaç biyokimyasal markörü düzenleyerek nöron hücrelerini eksitotoksositeye karşı koruduğu bildirilmiştir (Yang *et al.* 2013).

1.5.1.d. Kolinesteraz inhibitörü olarak kuersetin

Kolinerjik hipotez, asetilkolin (ACh) ve kolinerjik reseptör düzeyindeki bir azalışın, Alzheimer hastalığında bilişsel bozulmanın ana nedeni olduğunu göstermektedir. Asetilkolinesteraz (AChE), sinaptik ACh seviyesinin düzenlenmesinde rol oynayan anahtar enzimdir. AChE ayrıca AD hastalarında nöronal ölüme yol açan beta amiloid peptidi ($A\beta$)'nin birikimine sebep olur. Bu nedenle, AChE'nin inhibisyonu, AD için beyin bölgelerinde mevcudiyeti artıran ve $A\beta$ birikimini azaltan terapötik bir hedef olarak kabul edilmiştir (Mirjana *et al.* 2013; Anand and Singh 2013). Islam *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada kuersetinin AChE aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

1.5.1.e. α -Sinüklein fibrilizasyonu ve kuersetin

α -syn (α -sinüklein) LBs'nin (Lewy cisimcikleri) ana protein bileşenidir. Ayrıca α -syn, PD'nin ve topluca sinükleinopatiler olarak bilinen diğer hastalıkların patolojik işaretidir. Yapılan çalışmalarda kuersetinin, önceden oluşturulmuş fibrilleri, protein-kuersetin etkileşimi yoluyla stabil oligomerlere ayrıştırdığı ve α -syn kümelenmesini etkili bir

şekilde inhibe ederek, sinükleinopatilere karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Zhu *et al.* 2013).

1.5.1.f. Tau patolojisine karşı kuersetin

Kuersetin, PI3K/Akt/GSK3 β sinyal yolağını düzenleyerek etkin biçimde GSK3 β inaktivasyonu yoluyla tau hiperfosforilasyonunu önemli ölçüde baskılar ve hiperfosforile edilmiş işlemi tersine çevirerek tau patolojisini etkili bir şekilde inhibe eder (Jiang *et al.* 2016).

1.5.1.g. Amiloidojenik protein oluşumuna karşı kuersetin

Kuersetin, A β 'nin β yaprak yapıları ile aromatik halkalar arasındaki hidrofobik etkileşimi hidrojen bağları ile güçlendirerek A β fibrillerinin oluşumunu inhibe eder ve önceden oluşturulmuş olgun fibrillerin dengesini bozar (Jiménez-Aliaga *et al.* 2011). Kuersetin, makrotofaji ve proteozomal yıkım yollarını aktive ederek A β ₍₁₋₄₂₎ peptidin birikimini azaltır (Regitz *et al.* 2014). A β birikiminin doğrudan inhibisyonunun yanı sıra, kuersetin dolaylı olarak BACE-1 (β -bölgesi APP kesim enzimi-1) aktivitesini inhibe ederek APP kesim yolağını amiloidojenik olmayan yöne doğru kaydırır ve böylece baştan A β ₍₁₋₄₂₎ peptit oluşumunu engeller (Shimmyo *et al.* 2008).

1.5.1.h. Nörotrofik faktörler ve kuersetin

Kuersetin, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ ortak taşıyıcı izoformunun (NKCC1) aktive edilmesi ve Rho GTPaz aktivitesinin modüle edilmesi yoluyla nörotrofin [NGF] ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör [BDNF] kaynaklı nörit büyümesini belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Nakajima *et al.* 2011; Palazzolo *et al.* 2012). Kuersetin ayrıca, büyüme ile ilişkili protein 43 (GAP-43), mikrotübül ile ilişkili protein (MAP) ve tau, sinaptofizin ve sinapsin gibi nörit büyümesine bağlı nörotrofik proteinlerin ekspresyonunu artırarak nöronal kaybı azaltır (Moosavi *et al.* 2016).

1.5.1.i. Sirtuinler ve kuersetin

Sirtuinler, hücrede metabolizmanın, stres yanıtlarının ve uzun ömürlülüğün düzenlenmesinde önemli rol oynayan NAD^+ bağımlı deasetilazlar (SIRT 1-7)'dir. Kuersetinin SIRT1 ile regüle edilmiş strese bağlı süreci indükleyerek ve aktive ederek yaşlanma karşıtı etki ve nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (de Boer *et al.* 2006). Klinik öncesi çalışmalar, kuersetinin SIRT1'e bağlı yolları aktive ettiğini ve enflamatuvar sitokinleri modüle ettiğini, böylece nöronların demiyelinasyonunu sınırladığını, MS ve ALS tedavisinde etkin rol oynadığını göstermiştir (Hendriks *et al.* 2003).

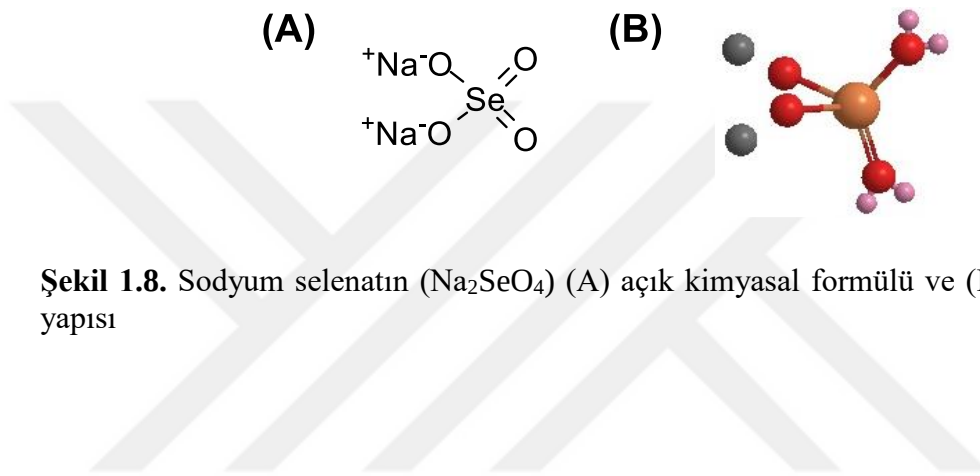
1.5.1.i. Kuersetinin hafıza ve biliş gelişimi üzerindeki etkileri

Kuersetin, bilişsel işlevi geliştirici özelliğe sahiptir. Yapılan çalışmalar, kuersetinin, PD, AD ve kronik serebral iskemi modelleri dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda davranışsal ve bilişsel bozulmayı hafifletme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Yao *et al.* 2010). Kuersetinin, AMP-protein kinazı aktive ederek öğrenme ve hafızayı arttırarak, senil plakları azaltarak, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu iyileştirerek ve oksidatif savunma mekanizmasını artırarak bilişsel açıkları iyileştirdiği rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2014). Kuersetinin ayrıca, farelerde antioksidan ve anti-apoptotik aktivite ile hipoksinin neden olduğu hafıza fonksiyon bozukluğunu da iyileştirdiği bildirilmiştir (Jyotsna *et al.* 2013).

1.6. Sodyum Selenat

Sodyum selenat (Na_2SeO_4) küçük, suda çözünen bir bileşiktir. Ayrıca bir serin-treonin fosfataz olan PP2A'nın (protein fosfataz 2A) spesifik ve güçlü bir aktivatörüdür. PP2A beyinde tau ve mikrotübüller ile birlikte lokalize olur. PP2A hiperfosforile tau'nun defosforilasyonuna aracılık eden en aktif fosfatazdır. Düşük seviyede PP2A aktivitesi AD ile ilişkilendirilir. Tau fosforilasyonunun düzenlenmesindeki ana rolünün yanı sıra, PP2A ayrıca hücresel çoğalmanın ve onu takiben malign transformasyonun ana

aracısıdır. Sodyum selenat ile ilgili yapılan güncel çalışmalarda; *in vitro* ve *in vivo* AD modellerinde sodyum selenatın, PP2A fosfataz aktivitesini arttırdığı, mikrotübüle bağlı tau protein fosforilasyonunu defosforile ederek nörofibriler yumak (NFT) oluşumunu engellediği ve buna bağlı olarak hafıza bozukluklarını tersine çevirdiği bildirilmiştir (Nonn *et al.* 2003; O'Collins *et al.* 2006; Corcoran *et al.* 2010; Hovens *et al.* 2010; Rikkert *et al.* 2014).



Şekil 1.8. Sodyum selenatın (Na_2SeO_4) (A) açık kimyasal formülü ve (B) 3D molekül yapısı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Shi *et al.* (2009b) tarafından insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada $A\beta_{(1-42)}$ peptit kaynaklı oksidatif stres ve sitotoksosite üzerine Ginkgo biloba ekstraktından (EGb 761) elde edilen kuersetin'in etkisi araştırılmıştır. $A\beta_{(1-42)}$ peptidi ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres sonucu hücre canlılığı, mitokondriyal membran potansiyeli, siklooksijenaz (COX) aktivitesi ve ATP sentez oranında istatistiksel olarak ciddi miktarda azalma ile birlikte nöronal apoptoz miktarı, hücre içi ROS oluşumu, aktif kaspaz 3, fosforile JNK, fosforile ERK1/2 ve fosforile Akt seviyelerinde istatistiksel olarak ciddi miktarda artmalar olduğu rapor edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri sadece kuersetin ile muamele edildiğinde hücrelerde herhangi bir olumsuz etkinin olmadığı bildirilmiştir. Kuersetinin, $A\beta_{(1-42)}$ peptidi varlığında oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünü azalttığı, apoptozu tamamen engellediği, hücre içi ROS oluşumunu engellediği, c-jun N-terminal kinaz (JNK), hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) ve Akt sinyalizasyon yolları üzerinde durdurucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Buna karşın, kuersetinin $A\beta_{(1-42)}$ peptidi varlığında mitokondriyal membran potansiyeli, COX aktivitesi ve ATP sentez oranında herhangi bir koruyucu etki gösteremediği de tespit edilmiştir. Bu çalışmada hem H_2O_2 hem de trombosit aktive edici faktörün (PAF) $A\beta$ toksisitesine aracılık ettiği öne sürülmüştür. Bu sebeple EGb 761'den elde edilen kuersetin'in H_2O_2 ve PAF kaynaklı hücre ölümü üzerine etkileri MTT ve TUNEL apoptoz analizi ile ayrıca değerlendirilmiştir. Kuersetinin H_2O_2 kaynaklı hücre ölümünü ve apoptozu tamamen engellediği, PAF kaynaklı hücre ölümünü ve apoptozu kısmen durdurabildiği sonucuna varılmıştır.

Echeverry *et al.* (2010) primer serebellar granül nöronlarında (CGN) yaptıkları bir çalışmada CGN hücrelerine 24 saatlik 150 μM H_2O_2 uygulamak suretiyle bu hücre hattında H_2O_2 kaynaklı oksidatif stres oluşturmuşlar ve oluşan oksidatif stres kaynaklı nöronal ölüme karşı Kenya bitkilerinden izole edilen kuersetin ve 12 kuersetin türevli flavonun nöroprotektif etkilerini incelemişlerdir. Bunun için her bir flavon (0-100 μM) nöronal hücrelere H_2O_2 muamelesinden 24 saat önce uygulanmıştır. Flavonların sitotoksik ve nöroprotektif etkileri 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum

bromür (MTT) deneyi ile değerlendirilmiştir. Belirlenen 13 kuersetin türevli flavon arasından 10 μ M konsantrasyonlarda (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon, kuersetin), (3,5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon), (3,5,7,3'-tetrahidroksi-4'metoksiflavon, tamarixetin), (3,5,7,4'-tetrahidroksi-3'metoksiflavon, izorhamnetin) olmak üzere sadece 4 flavonun H_2O_2 varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde nöroprotektif etki gösterdiklerini ve H_2O_2 yokluğunda ise kendi başlarına herhangi bir sitotoksik etki göstermediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sonuç olarak kuersetinin yapısında C halkasındaki C3, A halkasındaki C5 ve C7 pozisyonlarından bulunan hidroksil (-OH) gruplarının varlığının kuersetini güçlü bir antioksidan haline getirdiği, direkt serbest radikal süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri sayesinde oksidatif stres kaynaklı nöronal hasarı etkili bir şekilde önleyerek nöroprotektif etki sağladığı yorumuna varılmıştır.

Haleagrahara *et al.* (2011) tarafından erkek Sprague-Dawley ratları üzerinde yapılan bir çalışmada kuersetinin 6-hidroksidopamin (6-OHDA) kaynaklı PD modeli üzerindeki koruyucu etkisi incelenmiştir. Bu sebeple erkek Sprague-Dawley ratlarına tek bir intrasisternal 6-OHDA (300 μ g) enjeksiyonu ile PD modeli oluşturulmuştur. 6-OHDA enjeksiyonundan 48 saat sonra 14 gün boyunca kuersetin (30 mg/kg vücut ağırlığı) ile muamele edilen ratlar ile yalnızca 6-OHDA ile muamele edilen ratlar ile karşılaştırıldığında kuersetinin nöronal sağkalımı, striatal dopamin ve antioksidan enzim seviyelerini belirgin şekilde arttırdığını ve striatumda protein karbonil içeriğini önemli bir şekilde azalttığını rapor etmişlerdir. PD rat modelinde kuersetinin striatum'daki oksidatif strese karşı koyduğu ve dopaminerjik nöronal kaybını engellemede önemli bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

Suematsu *et al.* (2011) insan nöronal SH-SY5Y hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada kuersetinin H_2O_2 kaynaklı apoptoza karşı nöroprotektif etkilerini incelemişlerdir. SH-SY5Y hücreleri 100 μ M H_2O_2 ile 24 saat muamele edildiğinde oluşan oksidatif stres şartlarında kontrol grubu hücrelerine kıyasla; hücre morfolojisinde ciddi hasar, hücre canlılığında ~ %38 azalma, LDH salınımında ~ 4,8 kat artma, hücre içi GSH miktarında ~ %42 azalma, aktif kaspaz 3 ve 9 miktarında ~ 3,7 ve 4,3 kat artma, kaspaz 3/7 aktivitesinde ~ 1,4 kat artma, pro-apoptotik Bax geni ve anti-apoptotik Bcl-2 geni

ifadeleri oranında ~ 2,5 kat artma olduğu gösterilmiştir. Kuersetinin kendi başına herhangi bir sitotoksik veya LDH salınımı etkisi göstermediği de ayrıca rapor edilmiştir. Bununla birlikte SH-SY5Y hücreleri 100 μM H_2O_2 varlığında 100 μM kuersetin ile 24 saat muamele edildiğinde yalnız 100 μM H_2O_2 muamele edilen hücre grubuna kıyasla hücre morfolojisinde hasarın baskılandığı, hücre canlılığında ~ %67 artma, LDH salınımında ~ %79 azalma, hücre içi GSH miktarında ~ 1,3 kat artma, aktif kaspaz 3 ve 9 miktarında ~ %59 ve %28 azalma, kaspaz 3/7 aktivitesinde ~ %37 azalma, pro-apoptotik Bax geni ve anti-apoptotik Bcl-2 geni ifadeleri oranında ~ %51 azalma olduğu bildirilmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar ile SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı apoptoza karşı kuersetinin baskılayıcı bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak; oksidatif stres ve apoptoz tarafından sebep olunan nörodejeneratif hastalıklara karşı korunmada ve tedavisinde kuersetinin etkili bir ajan olarak kullanılabileceği yorumunda bulunmuşlardır.

Jembrek *et al.* (2012a) tarafından yapılan çalışmada kuersetinin (150 μM 'ye kadar) sağlıklı P19 nöronları üzerindeki etkisi, nörodejeneratif korunmada uzun süreli kullanımının etkinliği ve güvenilirliği incelenmiştir. Bunun için P19 nöronları çeşitli konsantrasyonlarda kuersetin (3-150 μM) ile 24 saat inkübe edilmiştir. Geniş bir konsantrasyon aralığında 24 saat boyunca kuersetine maruz kalmanın P19 nöronlarında hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilirken ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik incelemede 150 μM kuersetinin nöronal dallanma ve ara bağlantı ağını azalttığı bildirilmiştir. 150 μM kuersetinin P19 nöronlarında LDH salınımını kontrol grubuna göre %33 azalttığı tespit edilmiştir. Kuersetinin, hücre içi ROS birikiminde konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olduğu ve 150 μM kuersetin uygulanan P19 nöronlarının kontrol grubuna kıyasla %40 daha az hücre içi ROS seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde kuersetinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisinin zamana bağlı olduğu ve 24 saat 150 μM kuersetin uygulanan grubun en düşük lipid peroksidasyonu seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, 24 saat 150 μM kuersetine maruz kalmanın aynı zamanda ana hücrel antioksidanlardan biri GSH'nun hücrel seviyesinde %30 oranında önemli bir azalışa neden olduğu bildirilmiştir. 24 saat boyunca 30 ve 150 μM kuersetine maruz bırakılan P19

hücrelerinde kuersetinin, kromatin yoğunlaşması ve/veya nükleer parçalanması gibi nükleer morfolojide apoptoz ile ilgili değişiklikleri tetiklemediği ifade edilmiştir. P19 nöronlarının kuersetine maruz bırakılması kaspaz-3/7 aktivitesini etkilemediği de tespit edilmiştir. P19 nöronlarında kuersetine maruz bırakılmanın kontrol grubuna göre 30 μM kuersetin varlığında yaklaşık %28,3 ve 150 μM kuersetin varlığında ise yaklaşık %34,6 toplam RNA seviyesinde bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. 24 saat 150 μM kuersetine maruz kalma transkripsiyon seviyesinde anti-apoptotik BCL-2 proteinin ekspresyonunu %37,3 ve c-fos mRNA'nın ekspresyonunu %40,2 oranında azalttığı, pro-apoptotik Bax'ın transkripsiyonel ifadesinin etkilenmediği ve p53 mRNA seviyesini de %81,1 oranında arttırdığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, kuersetinin P19 nöronları üzerinde, hücre canlılığı üzerine olumsuz etki etmemesi ve apoptotik olayların belirtilerini göstermemesinden dolayı hücrel homeostazı koruduğunu ifade etmişlerdir. Kuersetinin yüksek dozlarda veya uzun süreli kullanımı onun etki çeşitliliği ve olası hücre içi etkileşimlerinin karmaşıklığı dolayısıyla kuersetince zenginleştirilmiş takviyelerin dikkatli alınması gerekliliğini vurgulamışlardır.

Jembrek *et al.* (2012b) tarafından P19 nöron hücre hattında yapılan çalışmada kuersetinin H_2O_2 kaynaklı orta ve ileri şiddetli nöronal hücre ölümünü engelleme yeteneği ve kuersetinin koruyucu etkisinin altında yatan moleküler ve hücrel mekanizmalar araştırılmıştır. P19 nöronları 150 μM H_2O_2 (orta şiddet/o.ş.) ve 1500 μM H_2O_2 (ileri şiddet/i.ş.)'ye 24 saat maruz bırakılarak oksidatif stres tetiklenmiştir. Oksidatif strese karşı koruyucu etki ise hücrelerin 150 μM H_2O_2 veya 1500 μM H_2O_2 ile birlikte 150 μM kuersetin muamelesi vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Oksidatif stres koşulları altında P19 nöronları kontrol grubu nöronlarına kıyasla hücre canlılığında %10,4 (o.ş.) ve %67,3 (i.ş.) oranında azalma, LDH salınımında orta şiddette herhangi bir etki olmaz iken ileri şiddette %174 oranında artma, hücre içi ROS birikiminde az fakat ölçülebilir bir miktarda artma (o.ş.) ve %63,9 (i.ş.) oranında artma, nükleer yoğunlaşmada %56,29 (o.ş.) ve %24,41 (i.ş.) oranında artma, kaspaz 3/7 aktivitesinde orta şiddette %35 oranında artma ve ileri şiddette herhangi bir etki göstermediğini, Bcl-2 geni ifadesinde %26 (o.ş.) oranında azalma ve Bax geni ifadesinde herhangi bir etki olmadığını (o.ş.), PARP geni ifadesinde %63 (o.ş.) oranında artma gözlemlendiğini

bildirmişlerdir. 150 μ M kuersetin varlığında P19 nöronları yalnızca H_2O_2 grubu nöronlarına kıyasla hücre canlılığında %10,4 (o.ş.) ve %46 (i.ş.) oranında artma, LDH salınımında orta şiddette bazal koşullarda elde edilen seviyenin altına gerileme ve ileri şiddette LDH salınımında önemli derecede azalma, hücre içi ROS birikiminde orta ve ileri şiddette bazal seviyenin altına gerileme, nükleer yoğunlaşmada %48,34 (o.ş.) oranında azalma ve istatistiksel olarak önemli derecede (i.ş.) azalma, kaspaz 3/7 aktivitesinde orta şiddette bazal seviyeye kadar gerileme ve ileri şiddette herhangi bir etki göstermediğini, Bcl-2 ve Bax geni ifadesinde herhangi bir etki olmadığını (o.ş.), PARP geni ifadesinde kontrol seviyesine kadar gerileme gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Kuersetinin nöronal canlılık üzerindeki nöroprotektif etkisinin muhtemelen sahip olduğu güçlü antioksidan kapasitesi, ROS üretimini önlemesi ve anti-apoptotik aktivitelerinden dolayı olduğu sonucuna varmışlardır.

Xi *et al.* (2012) tarafından SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında yapılan çalışmada kuersetinin H_2O_2 kaynaklı hücre ölümü ve Krüppel benzeri faktör 4 (KLF4) geni ifadesi üzerine etkileri incelenmiştir. Krüppel benzeri faktör 4 (KLF4), çinko-parmak transkripsiyon faktörleri ailesi olan Krüppel benzeri faktörler (KLF'ler) ailesinin bir üyesidir. KLF4'ün H_2O_2 ile stimüle edilmesinin lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri 500 μ M H_2O_2 'ye 12 saat maruz bırakılarak oksidatif stres tetiklenmiştir. Koruyucu etki ise hücrelerin 10 μ M kuersetin ile 12 saat inkübasyonundan sonra bir diğer 12 saat boyunca 500 μ M H_2O_2 muamelesi vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Oksidatif stres şartlarında (yalnızca H_2O_2 grubu) kontrol grubu nöronlarına kıyasla hücre ölümünde, apoptotik hücre oranında, kaspaz 3 aktivitesinde, PARP geni ifadesinde, KLF4 geni ifadesinde, Bax/Bcl-2 genleri ifade oranında istatistiksel olarak anlamlı derecelerde artma gözlemlenmiştir. SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri yalnızca 10 μ M kuersetin ile 12 saat inkübe edildiğinde kuersetinin kontrol grubu nöronlarına kıyasla hücre canlılığına, apoptotik hücre oranına, kaspaz 3 aktivitesine, PARP geni ifadesine, KLF4 geni ifadesine, Bax/Bcl-2 genleri ifade oranına herhangi bir etkide bulunmadığı bildirilmiştir. H_2O_2 varlığında kuersetin ile ön muamele edilen hücrelerde yalnızca H_2O_2 grubu nöronlarına kıyasla hücre ölümünde, apoptotik hücre oranında, kaspaz 3 aktivitesinde, PARP geni ifadesinde,

KLF4 geni ifadesinde, Bax/Bcl-2 genleri ifade oranında istatistiksel olarak anlamlı derecelerde azalma gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, oksidatif stres ile ilişkili nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kuersetinin potansiyel koruma mekanizmasını ortaya koyduğunu ve gelecekte klinik tıpta kullanılmasının faydalı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Sajad *et al.* (2013) tarafından nöronal öncü hücreler de (NPC'ler) yapılan çalışmada kuersetinin H₂O₂ kaynaklı oksidatif hasar ve merkezi sinir sistemi rejenerasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. NPC'ler 4 saat 50 µM H₂O₂ varlığında oksidatif strese sokulmuştur. Koruyucu etki ise hücrelerin 4 saat 50 µM H₂O₂ muamelesinden önce 24 saat farklı konsantrasyonlarda (0,01-1 µg/mL) kuersetin ile ön muamele edilmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Oksidatif stres şartlarında (yalnızca H₂O₂ grubu) kontrol grubu nöronlarına kıyasla hücre canlılığında, ikincil nörosfer oluşumunda ve genişlemesinde, PK-M2 (piruvat kinaz M2 izoformu) aktivitesinde, antioksidan enzimler olan SOD, CAT aktivitesinde ve GSH/GSSH oranında ciddi miktarda azalma gözlemlenirken; LDH salınımında, peroksinitrit oluşumu ile protein nitrasyonunda, kaspaz-3 aktivitesinde, hücre içi ROS seviyesinde, nükleer DNA fragmentasyonunda ve PARP aktivitesinde ciddi miktarlarda artma gözlemlenmiştir. H₂O₂ varlığında kuersetin ile ön muamele edilen hücrelerde yalnızca H₂O₂ grubu nöronlarına kıyasla kuersetinin oksidatif stresin neden olduğu tüm bu olumsuzlukları doza bağımlı bir şekilde önlediği ve oksidatif koşullarını nötralize ederek peroksinitrit oluşumunu, protein nitrasyonunu ve PK-M2 tükenmesini azaltarak nörosferlerin genişlemesini onardığını bildirmişlerdir.

Yang *et al.* (2014) tarafından erişkin Sprague-Dawley ratlarında yapılan çalışmada kuersetinin travmatik beyin hasarı (TBI) kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozis upregülasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. TBI, Feeney'in ağırlık serbest düşüş modeline göre gerçekleştirilmiş ve parietal kontüzyon beyin hasarı modeli oluşturulmuştur. Feeney'in ağırlık serbest düşüş modelinde anestezi ile uyutulan farelerin kafasının üst kısmına yüksekten serbest bırakılan bir ağırlık ile travmatik beyin hasarı oluşturulmaktadır. Tedavi için ise TBI'dan 0, 24, 48 ve 72 saat sonra ratlara kuersetin (30 mg/kg intraperitoneal enjeksiyon) uygulanmıştır. TBI sonrasında kontrol

grubuna göre TBI ratlarında bilişsel işlevde, SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimleri aktivitelerinde ve interlökin-10 seviyesinde ciddi miktarda azalma gözlemlenirken; lipid peroksidasyonunda, apoptotik hücre sayısında, BAX ve aktif kaspaz-3 proteinlerinin ifadesinde, ED-1 immünoreaktif hücrelerin miktarında, interlökin-6, TNF- α ve interlökin-1 β aktivitelerinde ciddi miktarda artma gözlemlenmiştir. Bu durum aynı zamanda travmatik beyin hasarı sonrasında nöronal hücrelerde oksidatif stresin arttığını da göstermektedir. TBI sonrasında kuersetin ile muamele edilen ratlar yalnız TBI grubuna göre bilişsel işlevde, SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimleri aktivitelerinde ve interlökin-10 seviyesinde ciddi miktarda artma gözlemlenirken; lipid peroksidasyonunda, apoptotik hücre sayısında, BAX ve aktif kaspaz-3 proteinlerinin ifadesinde, ED-1 immünoreaktif hücrelerin miktarında, interlökin-6, TNF- α ve interlökin-1 β aktivitelerinde ciddi miktarda azalma gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan TBI sıçanlarında, kuersetinin oksidatif stresi engelleyerek nöroprotektif etkisi sayesinde enflamatuvar cevabın azalmasına yol açtığı, nöronal ölümü azalttığı ve böylelikle bilişsel işlevi geliştirdiği gösterilmiştir.

Chen *et al.* (2016b) rat adrenal feokromositoma hattında (PC12 hücreleri) yaptıkları bir çalışmada kuersetinin H₂O₂ tarafından indüklenen apoptoz üzerindeki nöroprotektif etkileri ve altında yatan mekanizmaları araştırılmıştır. 24 saat boyunca 200 μ M H₂O₂ varlığında PC12 hücrelerinde oksidatif stres tetiklenmiştir. Kuersetin grubunda, hücreler önce 1 saat farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 μ g/mL) kuersetin ile ayrı ayrı inkübe edildikten sonra 24 saat 200 μ M H₂O₂ ile inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla H₂O₂ grubunda hücre canlılığının yaklaşık %43,89 oranında azaldığı, LDH salınımının ve hücre içi ROS seviyesinin sırasıyla %30,67 ve %121,61 oranında arttığı, antioksidan enzimler SOD ve GSH-Px seviyelerinin sırasıyla yaklaşık %61,53 ve %40,63 oranında azaldığı, MDA seviyesinin %257,14 oranında arttığı, BAX/BCL-2 oranını %89,90 oranında arttırdığı bildirilmiştir. Kuersetinin sinyal iletimi yolağındaki mekanizmayı araştırmak için fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) inhibitörü LY294002 kullanılmıştır ve p-Akt proteini Western blot yöntemiyle tespit edilmiştir. H₂O₂ ve LY294002 gruplarında kontrol grubuna göre p-Akt/Akt proteini ifade oranında benzer miktarlarda (sırasıyla ~ %49,31 ve ~ %41,09 oranlarında) azalma görülmüştür.

Çalışmada kuersetin konsantrasyonları (10, 20 ve 30 µg/mL) arttıkça nöroprotektif etkinin daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Bu sebeple H₂O₂ varlığında 30 µg/mL kuersetinin yalnız H₂O₂ grubuna kıyasla hücre canlılığını yaklaşık %46,57 oranına kadar arttığı, LDH salınımını ve hücre içi ROS seviyesini sırasıyla %17,38 ve %33,55 oranına kadar azalttığı, antioksidan enzimler SOD ve GSH-Px seviyelerinin sırasıyla yaklaşık %76,15 ve %64,81 oranına kadar arttığı, MDA seviyesinin %56,00 oranına kadar, BAX/BCL-2 oranını %47,07 oranına kadar azalttığı bildirilmiştir. LY294002 ile birlikte kuersetin içeren grubun LY294002 grubuna göre p-Akt/Akt proteini ifade oranını ~ %83,78 oranına kadar arttırdığı görülmüştür. Elde edilen tüm bu verilerden kuersetinin, PC12 hücrelerini H₂O₂ kaynaklı oksidatif strese karşı PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ederek koruyabildiği sonucuna varmışlardır.

Li *et al.* (2016) tarafından erkek ICR fareleri üzerinde yapılan çalışmada kuersetinin mitokondriyal biyogeneze nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf2) rolü üzerinde durularak, kuersetin uygulamasının oksidatif strese karşı çeşitli mitokondriyal solunum kompleksi alt birimleri üzerindeki koruyucu etkisine ilişkin olası bir moleküler mekanizmanın açıklanmasına çalışılmıştır. ICR farelerinde travmatik beyin hasarı (TBI) anestezi altında uyutulan farelerde Marmarou ağırlık düşürme modelinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, ICR fareleri kontrol grubu, TBI grubu, TBI+%0,9 tuz ve TBI+kuersetin grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. TBI+kuersetin grubundaki farelere, TBI'nın başlamasından 30 dakika sonra periton boşluğu içine 50 mg/kg kuersetin enjekte edilmiştir. Beyin örnekleri, analiz için 24 saat sonra toplanmıştır. Kuersetin tedavisi ile TBI'lı farelerde sitokrom c ve Nrf2 gen ifadesinin arttığı, malondialdehit (MDA) seviyesinin azaldığı ve SOD seviyesinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca kuersetinin, Nrf2 proteinini sitoplazmadan çekirdeğe taşınmasını belirgin şekilde desteklediği bildirilmiştir. Bu gözlemler ile kuersetinin TBI modellerinde, muhtemelen Nrf2 yolağını aktive ederek mitokondriyal fonksiyonu geliştirdiği kanaatine varmışlardır.

Sharma *et al.* (2016) tarafından erkek albino ratlarda yapılan çalışmada rat hipokampusünde meydana gelen alüminyum kaynaklı nörodejenerasyona karşı

kuersetinin etkileri araştırılmıştır. Alüminyum, yeryüzünde her yerde bulunan hafif bir toksik metaldir ve nörotoksik etkileri nedeniyle AD, PD ve ALS dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarla rol aldığı bilinmektedir. Hayvanlar kontrol grubu (C), kronik alüminyum (10 mg/kg) ile muamele edilen grup (Al), kronik alüminyum+kuersetin ile muamele edilen grup (Al+Q), kronik kuersetin ile muamele edilen grup (Q) (10 mg/kg) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Sonuç olarak; Beyinde hipokampus de Al grubu ratların ROS seviyelerinin kontrol grubu ratlarına göre %175 oranında arttığı, Al+Q grubu ratların, sadece Al grubu ratlara kıyasla ROS seviyelerinde %36,4 oranında önemli bir azalma olduğu bunu yanı sıra sadece Q grubu ratlar ile C grubu ratları kıyaslandığında ROS seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmediği bildirilmiştir. Kuersetin ön muamelesinin, alüminyum gruba kıyasla ROS oluşumunu engelleyebildiği yorumunda bulunmuşlardır. Serum alüminyum konsantrasyonu C grubunda 112 ng/mL, Al grubunda 271 ng/mL ve Al+Q grubunda ise 257 ng/mL olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlarda kuersetinin, alüminyumun bağırsak emilimini engellemediğini bildirmişlerdir. Al grubu ratların beyin hipokampus bölgesinde kontrol grubuna kıyasla MnSOD aktivitesinde %57 oranında azalma olduğu, kuersetinin Al+Q grubu ratlarında Al grubu ratlara kıyasla MnSOD aktivitesini %70,7 oranında arttırdığı, yalnız Q grubu ratlar ile C grubu ratlar kıyaslandığında MnSOD aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmediği bildirilmiştir. Al rat grubunda C rat grubuna göre DNA fragmentasyonunda artış gözlemlenirken, Al+Q rat grubunda Al rat grubuna göre kuersetinin DNA fragmentasyonunu önlediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, Q rat grubunun beyinde DNA'nın parçalanmasında C rat grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Al ile muamele edilmiş hipokampusta pro-apoptotik protein BAX (21 kDa) ekspresyonunun arttığı ve anti-apoptotik protein BCL-2'nin ekspresyonunun azaldığı, sitokrom-c ekspresyonunun arttığı, aktif kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı ve p53 proteini ekspresyonunun arttığı gözlemlenirken, Al+Q ile muamele edilmiş hipokampusta pro-apoptotik protein BAX (21 kDa) ekspresyonunun azaldığı ve anti-apoptotik protein BCL-2'nin ekspresyonunun arttığı, sitokrom-c ekspresyonunun azaldığı, aktif kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı ve p53 proteini ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlardan kuersetinin alüminyum kaynaklı oksidatif stresi azalttığı ve nörodejenerasyona karşı nöronal ölümü tersine çevirebilecek potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, kuersetinin

Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini yavaşlatmak için profilaktik olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Haq and AlAmro (2019) tarafından rat kortikal beyin dokusu hücrelerinde yapılan çalışmada kuersetinin H_2O_2 kaynaklı oksidatif strese karşı nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Wister ratlarından alınan kortikal beyin dokusu kültürleri kontrol (C) grubu; yalnız H_2O_2 (1mM) (H) ile muamele edilen grup; kuersetin (100 μ g/mL)+ H_2O_2 (1mM) (Q+H) ile muamele edilen grup ve yalnız DMSO ile muamele edilen grup olmak üzere dört grupta toplanılarak biyokimyasal deneyler gerçekleştirilmiştir. DNA hasarı göstergelerinden biri olan 8-OH-dG seviyesinin yalnız H grubunda C grubuna göre %101,49 oranında arttığı, Q+H grubunda 8-OH-dG seviyesinin yalnız H grubuna göre %44,73 oranında azaldığı ve DMSO ile muamele grubunun 8-OH-dG seviyesi ile C grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı gösterilmiştir. DNA fragmentasyonu, yalnız H grubunda C grubuna göre önemli ölçüde artarken Q+H grubunda C grubuna göre herhangi bir farklılığın olmadığı ve dolayısıyla genomik DNA ipliklerinin kuersetin tarafından tamamen korunmuş olabileceği bildirilmektedir. Glutasyon S transferaz (GST) aktivitesi olarak yalnız H grubunda C grubuna göre %56,87 oranında azaldığı, Q+H grubunda GST aktivitesinin yalnız H grubuna göre %265,93 oranında arttığı ve DMSO ile muamele grubunun GST aktivitesi ile C grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı görülmektedir. Oksidatif stres belirteçlerinden biri olan lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesinin H grubunda C grubuna göre %34,96 oranında arttığı, Q+H grubunda LPO seviyesinin yalnız H grubuna göre %35,23 oranında azaldığı ve DMSO ile muamele grubunun LPO seviyesi ile C grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, kuersetinin H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif strese ve nöronal hasara karşı nöroprotektif bir etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklardan kaynaklanan nöronal kaybın önlenmesi için, kuersetinin terapötik potansiyele sahip olduğu, kuersetin ile zenginleştirilmiş gıdaları ve ticari olarak satılan takviyeleri almanın önemli olduğu vurgulanmıştır.

van Eersel *et al.* (2010) tarafından *in vitro* ve *in vivo* Alzheimer hastalığı modellerinde yapılan çalışmada sodyum selenatın etkileri araştırılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine artan konsantrasyonda (0,01-1000 μ M) sodyum selenat muamelesinden sonra, doza bağlı bir şekilde tau fosforilasyonunun azaldığı gözlemlenirken fosforile edilmemiş tau seviyelerine sodyum selenat'ın herhangi bir etkide bulunmadığı bildirilmiştir. Primer hipokampal nöronlarda artan konsantrasyonda (0,01-1000 μ M) sodyum selenat muamelesi ile yapılan toksisite testi sonucunda sodyum selenatın 100 μ M konsantrasyona kadar herhangi bir toksik etkide bulunmadığı gösterilmiştir. NFT patolojisine sahip iki bağımsız tau transgenik fare türü olan P301L mutant pR5 ve K369I mutant K3 farelerine kronik sodyum selenat oral tedavisinin tau hiperfosforilasyonunu azalttığı ve NFT oluşumunu tamamen inhibe ettiği, bellek ve motor performansını geliştirdiği ve nörodejenerasyonu önlediği rapor edilmiştir. Alzheimer hastalarının beyinde hem seviye hem de aktivite olarak azalmış PP2A, tau fosforilasyonunda rol oynayan önemli bir fosfatazdır. Sodyum selenatın PP2A'yı aktive ettiği ve PP2A-tau komplekslerini stabilize ettiği bilinmektedir. PP2A'nın bir dominant-negatif mutant formunu birlikte eksprese eden tau transgenik farelerde sodyum selenat muamelesinin herhangi bir terapötik etkide bulunmadığı bunda sodyum selenatın PP2A'nın tau defosforilasyonu rolüne aracılık ettiğini bildirmişlerdir. Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında, sodyum selenatın, birçok AD modelinde tau patolojisini hafifleterek, AD'nin ve bununla ilişkili demansların tau hedefli tedavileri için ümit verici bir öncül bileşik olabileceği kanaatine varılmıştır.

Corcoran *et al.* (2010) tarafından *in vitro* ve *in vivo* Alzheimer hastalığı modellerinde yapılan çalışmada sodyum selenatın etkileri araştırılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinde sodyum selenat muamelesinin kontrol grubu hücrelerine göre PP2A aktivitesini istatistiksel olarak önemli bir derecede arttığı tespit edilmiştir. PC3 hücre hattında gerçekleştirdikleri Akt immünopresipitasyon deneyinde Akt'nin çöktüğünü ve bu çökmenin, Akt ile ilişkili PP2A'nın düzenleyici alt biriminin, PR55 B alt birim ailesinin bir üyesi olduğu rapor edilmiştir. BE2M17 ve SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde ve normal yaşlı farelerde sodyum selenatın PHF fosfo-tau proteini seviyelerini önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Artan konsantrasyonda (5, 25, 100

μM) sodyum selenatın primer hipokampal hücre kültürlerine en yüksek konsantrasyonda ($100 \mu\text{M}$) bile herhangi bir toksik etkide bulunmadığı tespit edilmiştir. İnsan TAU441 genini iki mutasyonla (V337M ve R406W) aşırı ifade eden transgenik TMHT farelerinde gerçekleştirilen immünohistokimya (IHC) analizinde sodyum selenat muamelesinden sonra, araştırılan tüm beyinlerde IHC ile boyanmış bölgelerin alanının oldukça sabit olduğu bununda selenat tedavisinin merkezi sinir sistemi atrofisini tetiklemediği rapor edilmiştir. Selenat ($1,2 \text{ mg/mL}$ içme suyu) ile muamele edilen hayvanlarda hipokampus da relatif AT180-tau boyama alanının yüzdesinde kontrollere kıyasla anlamlı bir azalma olduğu da görülmüştür. Morris Water Maze davranış testinde sodyum selenat ile muamele edilmiş transgenik TAU441 farelerinde geliştirilmiş uzamsal öğrenme ve hafızada önemli ölçüde gelişme sağlandığı bildirilmiştir.

Chen *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada sodyum selenat ile muamele edilen Alzheimer hastalığı modeline sahip N2aSW nöroblastoma hücrelerinin fosfoproteomik profili araştırılmıştır. N2aSW hücre hattı, APP proteininin bir İsveç mutanı olan stabil bir şekilde APP_{sw} ifade eden N2a nöroblastoma hücresinden türetilmiştir. Farklı konsantrasyonda sodyum selenat ($0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000 \mu\text{M}$) ile muamele edilen N2aSW nöroblastoma hücrelerinde doza bağlı olarak $100 \mu\text{M}$ konsantrasyona kadar hücre canlılığında istatistiksel olarak önemli bir oranda artış sağlandığı görülmektedir. En fazla hücre canlılığı sağlayan sodyum selenat konsantrasyonu $10 \mu\text{M}$ olarak tespit edilmiştir. 24 saat boyunca $10 \mu\text{M}$ sodyum selenat ile muamele edilmiş N2aSW hücrelerinde tanımlanmış 25 proteinin 10 tanesi fosforilasyonda artış gösterirken, 15 fosfoprotein fosforilasyonda azalma göstermiştir. $10 \mu\text{M}$ sodyum selenat ile muamele edilen N2aSW hücrelerinde, homosistein seviyesinin azaldığı görülmüştür. Sodyum selenatın total tau protein ekspresyon seviyesini veya pS404 ve pT231'de tau fosforilasyon seviyelerini etkilemediği, ancak diğer bazı AD modellerinde daha önce bildirilenlerle tutarlı olan pS422 ve pS396'da tau fosforilasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, sodyum selenat ile muamele edilen hücreler kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında sodyum selenatın hücre dışı A β peptit seviyesini azalttığı, APP ve BACE1 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı rapor edilmiştir.

Zheng *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada Alzheimer hastalığının üçlü transgenik fare modelinde sodyum selenatın beyin iyonumu ve oksidatif stres üzerine etkileri araştırılmıştır. Mineral metabolizması dengesizliğinin Alzheimer hastalığı (AD) ilerlemesinde önemli bir role sahip olduğu literatürde birçok çalışmada sunulmaktadır. Yüksek doz sodyum selenat takviyesi ile AD'nin üçlü bir transgenik fare modeli kullanılarak beyinde 15 element arasındaki etkileşimlerin araştırılması çok zaman noktalı iyon analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Selenyum hariç, önemli ölçüde değişen elementlerin çoğunluğu, 6 aylık selenat takviyesinden sonra azalan bir seviye gösterdiği ve özellikle demirin incelenen hemen hemen tüm zaman noktalarında tamamen normal seviyelerine döndürüldüğü görülmüştür. Sodyum selenat takviyesi ile 3xTg-AD farelerinin serebral dokularında GSH-Px ve TrxR'nin aktivitelerinde anlamlı artış olduğu ve böyle bir etkinin erken evreden (4 aylık) meydana gelip geç evreye (12 aylık) kadar devam ettiği rapor edilmiştir. Sodyum selenat takviyesi 3xTg-AD farelerinin serebral dokularında malondialdehit (MDA) seviyesini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Sodyum selenatın GSH-Px ve TrxR aktivitelerini arttırarak AD farelerinin beyinlerinde lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasara karşı nöroprotektif etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

Jin *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada mutant insan APP_{swe}, tauP301L ve fare PS1M146V genlerini ifade eden üçlü transgenik (3xTg-AD) Alzheimer hastalığı fare modelinde sodyum selenatın etkileri araştırılmıştır. Alzheimer modeline sahip farelere sodyum selenat muamelesi 6 µg/mL konsantrasyonda 10 ay boyunca farelerin içme suyuna katılarak gerçekleştirilmiştir. Yenidoğan 3xTg-AD farelerinin hipokampuslarından izole edilen primer nöronlar ve N2aSW nöroblastoma hücre hattı 24 saat boyunca 0,1µM sodyum selenat ile muamele edilmiştir. AD farelerinin beyinlerinde transgenik olmayan farelere kıyasla glukoz metabolizmasında önemli derecede azalma gözlemlenirken, sodyum selenat ile muamele edilen AD farelerinde serebral glukoz metabolizması azalmasının bastırıldığı görülmektedir. AD modelinde hipokampal dokuda ve primer nöronlarda sinaptofizin ekspresyon düzeyleri transgenik olmayan kontrollerle kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azaldığı, ancak sodyum selenatın, bu patolojik değişiklikleri tersine çevirerek, hipokampusta ve ayrıca AD

farelerinin kültüre edilmiş nöronlarında sinaptofizin ekspresyonu arttırdığı ve sinaps büyümesini sağladığı rapor edilmiştir. AD fareleri transgenik olmayan farelere kıyasla Ser404, Ser396 ve Thr231 rezidülerinden hipokampal tau fosforilasyon (tau-pS404, tau-pS396 and tau-pT231) seviyelerinin büyük ölçüde arttığı, sodyum selenat muamelesinin AD farelerinin hipokampüsünde tau-pS404, tau-pS396 ve tau-pT231 seviyelerini önemli ölçüde azalttığı görülmektedir. AD farelerin hipokampüsünde APP, BACE1, sAPP β ve CTF β düzeyleri transgenik olmayanlara kıyasla anlamlı olarak arttığı, sodyum selenat ile muamelesinin AD faresinde APP seviyesini değiştirmedığı, ancak BACE1, sAPP β ve CTF β seviyelerini belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir. A β ₍₁₋₄₂₎ peptit seviyesi, AD modelinin hipokampüsünde, transgenik olmayan fareye kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı; sodyum selenat muamelesinin, AD faresinde A β ₍₁₋₄₂₎ peptit seviyesindeki artışı engellediği rapor edilmiştir. AD fareleri transgenik olmayan farelere kıyasla β -katenin ekspresyonunda azalma, apoptozda artma, survivin ve c-myc ekspresyonunda azalma, BCL-2 seviyesinde azalma, BAX ve aktif kaspaz 3 seviyelerinde artma, PP2A aktivitesinde azalma, GSK3 β aktivitesinde artma olduğu görülmüştür. Sodyum selenat muamelesinin AD farelerinde β -katenin ekspresyonunu arttırdığı, apoptozu baskıladığı, survivin ve c-myc ekspresyonunu arttırdığı, BCL-2 seviyesini arttırdığı, BAX ve aktif kaspaz 3 seviyelerini azalttığı, PP2A aktivitesini arttırdığı, GSK3 β aktivitesini azalttığı bildirilmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlardan sodyum selenatın AD tedavisi için kullanılabilecek etkili bir ajan olabileceği yorumuna varılmıştır.

Yanardag *et al.* (2007) tarafından Sprague-Dawley ratlarında yapılan çalışmada etanol kaynaklı organ hasarı üzerine C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat kombinasyonunun koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bunun için ratlar; Grup I: Sağlam hayvanlar (kontrol), grup II: 3 gün boyunca C vitamini (250 mg/kg/gün), E vitamini (250 mg/kg/gün) ve sodyum selenat (0,5 mg/kg/gün) alan kontrol hayvanları, grup III: 1 ml saf etanol alan hayvanlar, grup IV: saf etanol verilmesinden 1 saat önce 3 gün boyunca C vitamini (250 mg/kg/gün), E vitamini (250 mg /kg/gün) ve sodyum selenat (0,5 mg/kg/gün) alan hayvanlar olmak üzere rastgele dört gruba ayrılmış ve biyokimyasal incelemeler serum, karaciğer ve bağırsak dokularında tüm gruplardan

gerçekleştirilmiştir. Karaciğer ve bağırsak dokularında kontrol grubuna göre etanol grubundaki LPO seviyelerin anlamlı olarak arttığı, glutatyon (GSH) seviyelerin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat kombinasyonu muamelesinin etanol grubunda LPO seviyelerini belirgin bir şekilde azalttığı ve GSH seviyelerini anlamlı olarak arttırdığı bildirilmiştir. Serumda kontrol grubuna göre etanol grubunda CAT aktivitesi anlamlı olarak azaldığı bununla birlikte üre, kreatinin, ürik asit ve toplam lipit seviyelerinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat kombinasyonu muamelesinin etanol grubunda CAT aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı bununla birlikte üre, kreatinin, ürik asit ve toplam lipit seviyelerini anlamlı olarak azalttığı rapor edilmiştir. Karaciğer ve bağırsak dokularında etanol grubunda kontrol grubuna göre CAT, SOD, ve GPx aktivitelerinde anlamlı olarak azalma olduğu gözlemlenirken LDH ve MPO seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat kombinasyonu muamelesinin etanol grubunda CAT, SOD, ve GPx aktivitelerini belirgin bir şekilde arttırırken LDH ve MPO seviyelerini de anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir.

Nichols *et al.* (2015) tarafından Primer kortikal nöron kültürlerinde yapılan çalışmada *in vitro* inme modeli üzerine epikateşin (E) ve kuersetin (Q) kombinasyonunun sinerjistik nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Primer kortikal nöronlar 90 dakika (1,5 saat) boyunca oksijen-glukoz yoksunluğuna (OGD) maruz bırakılarak *in vitro* inme/hipoksik-iskemik hasar modeli oluşturulmuştur. 1,5 saat OGD'den önce 24 saat boyunca E (1 μ M) veya Q (1 μ M) ile ön muamele edilen hücrelerde OGD grubuna göre hücre canlılığı sırasıyla %62,5 ve %65 oranında arttığı, buna karşılık, E+Q (1 μ M) kombinasyonunun OGD grubuna hücre canlılığını sinerjistik olarak %92 oranında arttırmıştır. 1,5 saat OGD'den önce 24 saat boyunca E (0,3 μ M) veya Q (0,3 μ M), E+Q (0,3 μ M) ile ön muamele edilen hücrelerde OGD grubuna göre flavonoidlerin apoptozu azalttığı ve hücre canlılığını arttırdığı gösterilmiştir. E+Q ile ön-muamele OGD'nin neden olduğu hücre ölümüne karşı kortikal nöron kültürlerini nöronal apoptozdan sinerjistik olarak koruduğu görülmektedir. OGD'nin kortikal nöronlarda mitokondriyal solunum parametresi olan yedek solunum kapasitesini (SRC) kontrole göre %70'den %30'a %40 azaltırken OGD yokluğunda E (0,3 μ M) veya Q (0,3 μ M), E+Q (0,3 μ M) ön

muamelesi ile SRC'yi kontrole göre %70'den %110'a %40 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. E (0,3µM) veya Q (0,3 µM), OGD'nin neden olduğu SRC kaybını önleyemez iken, E+Q (0,3 µM) ön muamelesinin, OGD nöronlarında SRC'yi %110'a kadar arttırdığı bulunmuştur. Flavonoid kombinasyonunun (E+Q (0,3 µM)) mitokondriyal fonksiyonu koruyarak nöroproteksiyona katkıda bulunduğunu ifade etmişlerdir. E (0,1 µM), Q (0,1 µM) ve E+Q (0,1 µM), OGD'den 12 saat sonra kortikal nöronlarda OGD grubuna kıyasla BCL-2, PGC-1α, MT-ND2 ve MT-ATP6'yı kodlayan mRNA'larda önemli derecede artışlar sağladığı görülmüştür. 1,0 µM'lık konsantrasyonda, E+Q, BCL-2 için mRNA'ları ve ayrıca PGC-1α, MT-ND2 ve MT-ATP6'yı, E (1,0 µM) veya Q (1,0 µM)'dan daha büyük bir oranda arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre E+Q'nun, OGD sonrası kortikal nöronlarda hücre canlılığı ve mitokondriyal gen ekspresyonunda sinerjistik artışlar sağladığını ifade etmişlerdir. Q (0,1 ve 0,3 µM), protein kinaz B (Akt) fosforilasyon seviyelerine istatistiksel olarak herhangi bir etkide bulunamaz iken, E ve E+Q'nun bu kinazın fosforilasyonunda hem 0,1 hem de 0,3 µM'de karşılaştırılabilir artışlar sağladığı bildirilmiştir. Q (0,1 µM) hariç, E (0,1 µM) ve E+Q (0,1 µM)'nun cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteini (CREB)'nin fosforilasyon seviyelerini arttırdığı ancak E+Q (0,1 µM)'nun E (0,1 µM)'ye göre daha fazla artış sağladığını rapor etmişlerdir. Q (0,3 µM), E (0,3 µM) ve E+Q (0,3 µM)'nun CREB fosforilasyonunu daha fazla arttırdığı bununla birlikte E (0,3 µM) ve E+Q (0,3 µM)'nun Q (0,3 µM)'ya göre CREB fosforilasyonu artış miktarlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada son olarak C57Bl/6 faresine, 5 gün boyunca günde bir kez E+Q [75 mg/kg: E (37,5 mg)+Q (37,5 mg)] veya su (8 mL/kg) oral yoldan verilmiş ve ardından 40 dk tüm fareler hipoksik-iskemiye (HI) maruz bırakılmıştır. Kontrol farelerine kıyasla, E+Q'nun enfarktüs hacminde ortalama %46 oranında azalma sağladığı ifade edilmiştir.

2.1. Amaç

Nörodejeneratif hastalıklar gerek indüklenme şekilleri gerekse indüklendikten sonraki hastalığa ait olan içsel yollar da dahil olmak üzere çok faktörlü hastalıklardır. Literatürde nörodejenerasyona karşı kuersetin ve sodyum selenat da dahil olmak üzere

monoterapötik ilaç uygulamasının yapıldığı birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalarda kuersetinin antioksidan, anti-apoptotik aktivite ve düşük dozlarda $A\beta_{(1-42)}$ peptit toksisitesine karşı nöroprotektif etkileri olduğu; sodyum selenatın ise antioksidan enzim glutatyon peroksidazın ve hiperfosforile tau proteininin defosforilasyonuna aracılık eden PP2A'nın spesifik ve güçlü bir aktivatörü olduğu bildirilmiştir. Ancak, nörodejeneratif hastalıklara karşı multiterapötik bir yaklaşımla söz konusu iki maddenin kombine bir şekilde kullanılarak amiloid patolojisi, oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki sinerjistik etkilerinin araştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında; kuersetin ve sodyum selenat karışımı ile elde edilen çok hedefli ilaç kombinasyonunun (QSS) insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı sinerjistik nöroprotektif etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla QSS uygulanan insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde bir seri oksidatif stres göstergesi olarak hücre ölüm oranları, toplam antioksidan kapasite seviyeleri, katalaz enzim aktiviteleri, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri, lipid peroksidasyon seviyeleri, hücre dışı insan $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyeleri, mitokondriyal membran potansiyeli seviyelerindeki değişim, apoptotik ve nekrotik hücre miktarları incelenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan hücre hattı

Tez kapsamındaki araştırmalarda kullanılan SH-SY5Y (ATCC®, CRL-2266™) insan nöroblastoma hücre hattı Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'nun laboratuvarından (Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı) temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve kitler

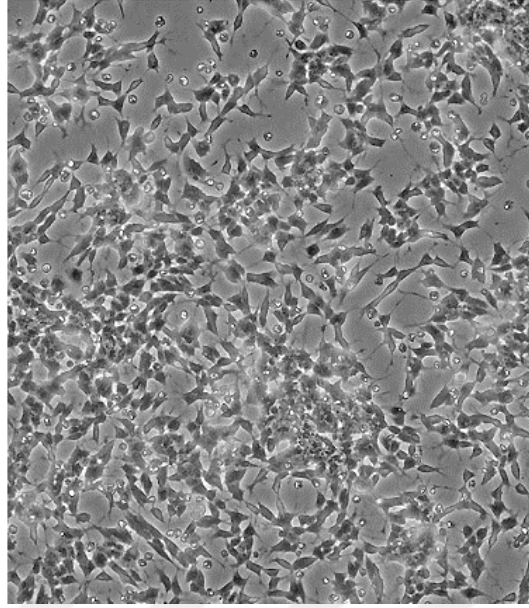
Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve kitler **EK 1** ve **EK 2**'de listelenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. SH-SY5Y hücrelerinin *in vitro* koşullarda kültürü

3.2.1.a. SH-SY5Y hücreleri

SH-SY5Y, bilimsel çalışmalarda kullanılan insan kaynaklı bir hücre hattıdır. SH-SY5Y ilk kez 1973'te nöroblastomlu dört yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliği biyopsisinden izole edilen SK-N-SH hücre hattından 1978 yılında üçüncü kez alt klonlanlama yapılarak elde edilmiştir. Morfolojik olarak *in vitro* nöroblast hücrelerine benzer fenotipe sahiptir (Şekil 3.1) ve nöronal hücre benzeri özellikleri nedeniyle nörodejeneratif hastalık çalışmalarında kullanılmaktadır (Xie *et al.* 2010; Cheng *et al.* 2013).



Şekil 3.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin görüntüsü, (20x) büyütme

3.2.1.b. Hücre hattının çözündürülmesi

Donmuş hücre süspansiyonunu içeren Cryo tüpler hızlıca azot tankından veya -80°C 'deki soğutucudan çıkartıldı ve 37°C 'deki su banyosunda hafifçe çalkalayarak yaklaşık iki dakika inkübe edilmek suretiyle çözündürüldü. Hücreler çözülür çözülmez Cryo tüpler su banyosundan çıkartıldı ve aseptik koşullar altında %70 etanol ile dekontamine edildi. Cryo tüp içindeki hücre süspansiyonu pipet ile 2-3 kez süspanse edilerek 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı ve üzerine 5 mL besiyeri (besiyeri içeriği EK 3'de belirtilmiştir.) eklenerek pipet ile 1-2 kez alt üst edildi. Tüpler 1020 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpenatant atıldı. Dipte kalan hücre pelleti 4 mL besiyerinde pipet yardımıyla süspanse edilerek çözündürüldü. Hücreler flasklara (25 cm^3 veya 75 cm^3 'lük hücre kültür kapları) aktarılaraq üzeri besiyeri ile uygun hacime tamamlandı. 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nem'e ayarlanmış inkübatöre dikkatli bir şekilde yerleştirildi.

Hücreler %70-80 oranında konfluent'e ulaştığı mikroskopta görüldükten sonra çalışmaya devam edildi. Hücreler haftada 2 kez pasajlandı ve ortalama onsekizinci pasaj kadar çoğaltılan hücreler analizler için kullanıldı.

3.2.1.c. Hücrelerin pasajlanması

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin %70-80 oranında konfluent'e ulaştığı mikroskopta görüldükten sonra flasklardaki besiyeri atıldı ve kalan besiyerini uzaklaştırmak için 4 mL steril PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Flask tabanına tutunan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı. Tripsinizasyon işlemi 25 cm³'lük flasklara 2 mL, 75 cm³'lük flasklara ise 6 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin ilave edilerek 1-2 dk 37°C'de inkübatörde bekletilmek suretiyle gerçekleştirildi. Flask tabanına el ile birkaç kez vurularak tabanda tutunmuş kalan hücrelerinde kalkması sağlandı. Tüm hücreler kalktıktan sonra tripsin enziminin aktivitesini durdurmak için hızlı bir şekilde eklenilen tripsin hacmi kadar besiyeri eklendi ve pipet yardımı ile 1-2 kez karıştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüplere alındı. Tüpler yaklaşık 1020 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve tripsinli medyum (süpenatant) uzaklaştırıldı. Steril PBS ile yıkamadan sonra hücre pelleti 4 mL besiyerinde çözündürüldü. Analizlerin gerektirdiği sayıdaki hücreler "hemositometre ile hücre sayımı" protokolüne göre sayılarak tekrar çoğalmaları için uygun flasklara veya çok kuyucuklu (6, 12, 24 veya 96) plakalara aktarıldı.

3.2.1.d. SH-SY5Y hücrelerinin kültüre edilmesi

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri Zhang *et al.* (2010) çalışmalarında tarif edildiği gibi 37 °C'de %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda %10 FBS (fetal dana serumu) ve %0,5 antibiyotik ile desteklenen DMEM-Ham's F12 (1:1) besiyerinde (EK 3) kültüre edilerek çoğaltıldı. Kültüre edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerine ilaç uygulanması ve deney grupları EK 4'de verilmiştir.

3.2.1.e. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin stoklarının elde edilmesi için hücreler %70-80 konfluent olduktan sonra hücrelerin pasajlanması işleminde anlatıldığı gibi tripsinizasyon işlemi ile flask yüzeyinden kaldırılıp 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı.

Tüpler 1020 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve tripsinli medyum uzaklaştırıldıktan sonra pellet steril PBS ile yıkandı. Hücre pelleti besiyerinde çözündürüldü. Cryo tüplere 140 µL DMSO ve üzerine 1860 µL süspanse haldeki hücreler eklenerek -80 °C’deki soğutucuda bir gece bekletildi ve ertesi gün Cryo tüpler -80 °C’deki soğutucudan çıkarıldı ve hücrelerin daha uzun süre saklanması için sıvı azot tankına (-200 °C) yerleştirildi.

3.2.1.f. Hemositometre ile hücre sayımı

Canlı hücre sayım işlemi, tripan mavisi boyası kullanılarak hemositometre (thoma lamı) üzerinde gerçekleştirildi. Tripan mavisi boyası canlı hücreler tarafından hücre dışına atıldı. Bu nedenle, canlı hücreler beyaz renkte görüldü. Ölü hücreler ise, membran bütünlükleri bozulduğu için tripan mavisi ile maviye boyandı. Hücre hatları monolayer hücreler oldukları için hücreler %70-80 konfluente ulaştığı mikroskop ile gözlemlendikten sonra tripsinizasyon işlemi ile flask yüzeyinden kaldırılıp 15 mL’lik falkon tüplere aktarıldı. Tüpler 1020 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve tripsinli medyum uzaklaştırıldıktan sonra pellet steril PBS ile yıkandı. Hücre pelleti 6 mL besiyerinde çözündürüldü. Daha sonra bir eppendorf tüp içerisine 100 µL tripan mavisi boyası, 50 µL PBS ve 50 µL hücre süspansiyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 5 dakika beklendi. Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10 µL örnek alınarak thoma lamı üzerine aktarıldı ve bir mikroskop altında canlı hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

$$\text{Canlı hücre sayısı/ mL} = A \times SF \times 10000$$

Burada; A = 16 büyük karede sayılan ortalama hücre sayısı, SF ise seyreltme faktörüdür. 10000 ise 0,1 mm³’deki sayım sonucunu 1 mL’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir sabittir.

Hemositometre ile sayılan hücreler araştırma süresince Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi analiz çeşidine göre belirtilen miktarlarda besiyeri ile seyreltilerek uygun hücre kültürü

kaplarına ekildi. 37°C’de nemlendirilmiş %5 CO₂ ve %95 hava atmosferinde 24 saat boyunca inkübe edildi. Tüm analizler aynı pasaj sayısına sahip hücrelerle yapıldı.

Çizelge 3.1. Hemositometre ile analiz çeşidine göre sayılarak ekilen hücre konsantrasyonları

Analiz	Hücre süspansiyon hacmi (Kuyucuk/flask başına)	Hücre sayısı (Kuyucuk/flask başına)	Hücre kültür kabı
WST-1 testleri	100 µL	1 x 10 ⁴	96 kuyucuklu plak
$\Delta\Psi_m$ ölçülmesi	2 mL	3 x 10 ⁵	6 kuyucuklu plak
Apoptoz testi	2 mL	3 x 10 ⁵	6 kuyucuklu plak
CAT aktivitesi	5 mL	2 x 10 ⁶	25 cm ³ ’lük flask
TAC testi	5 mL	2 x 10 ⁶	25 cm ³ ’lük flask
ROS testi	5 mL	2 x 10 ⁶	25 cm ³ ’lük flask
LPO testi	5 mL	2 x 10 ⁶	25 cm ³ ’lük flask
A β ₍₁₋₄₂₎ peptit konsantrasyonlarının belirlenmesi	5 mL	2 x 10 ⁶	25 cm ³ ’lük flask

3.2.2. Hücre canlılık testleri

3.2.2.a. WST-1 testi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂’in ortalama öldürücü doz (LD₅₀) değeri; H₂O₂ varlığında Q’nun ve SS’nin maksimum nöroprotektif etki gösterdiği (E_{max}) doz konsantrasyon değerleri, E_{max} değerlerindeki Q ve SS kombinasyonunun (QSS) nöroprotektif etkisi; H₂O₂ yokluğunda E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS’nin hücre canlılığı üzerine etkileri WST-1testi ile belirlendi. WST-1testi üretici firmanın (Boster, Wuhan, PR China) protokolüne göre yapıldı.

WST-1 testi ışığı 450 nm’de absorbe eden koyu kırmızı formazanı oluşturmak üzere mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından tetrazolyum tuzu WST-1’in parçalanmasına dayanmaktadır.

Stok WST-1 Reaktifinin Hazırlanması:

Steril ve karanlık koşulda WST-1 tetrazolyum tozuna 5mL elektron bağlama reaktifi eklendi ve iyice karıştırılarak stok WST-1 reaktifi hazırlandı. Stok WST-1 reaktifinin analiz için gerekli olan miktarı steril eppendorf tüplerde 200’er µL’lik alikotlara ayrılarak +4°C’de saklandı. Geri kalan WST-1 reaktifinin daha uzun süreli muhafazasının sağlanması için karanlık ortamda -20°C’de saklandı. Her analiz öncesi oluşan WST-1 reaktifi çökeltilerinin tamamen çözünmesi için 37°C’de 2-10 dakika inkübe edildi.

Uygulama Basamakları:

1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri 96 kuyucuklu plaklarda hücre kültürü deney gruplarına göre kültüre edildi (EK 4).
2. Her kuyuya 10 µL WST-1 reaktifi ilave edildi.
3. Canlı hücrelerden salınan mitokondriyal dehidrogenaz ile WST-1 reaktifinin tetrazolyum tuzu arasındaki reaksiyonu sağlamak için hücreler 4 saate kadar inkübe edildi.
4. Absorbans, bir mikropilaka okuyucusu kullanılarak 690 nm’de ki bir referans ile 450 nm’de ölçüldü.
5. Absorbans seviyesi doğrudan canlı hücre sayıları ile ilişkilidir.
6. Pozitif kontrol olarak SH-SY5Y hücre kültürü içeren besiyeri kullanıldı.
7. Negatif kontrol olarak %0,1 DMSO içeren besiyeri kullanıldı.

Hesaplama:

Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre yüzde değer olarak hesaplandı ve hücrelerin canlılık oranları, örneklerin kontrol grubuna yüzde oranı olarak %kontrol cinsinden ifade edildi.

$$\text{Canlı hücre oranı (\%)} = [(A_{\text{Örnek}} - A_{\text{NK}})/(A_{\text{PK}} - A_{\text{NK}})] * 100$$

$A_{\text{Örnek}}$: Örneğin absorbans değeri

A_{PK} : Pozitif kontrolün absorbans değeri

A_{NK} : Negatif kontrolün absorbans değeri

1. H₂O₂ ile *in vitro* nörodejenerasyon modelinin oluşturulması

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modeli oluşturmak için 50 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 400 µM, 500 µM konsantrasyonlarda H₂O₂ ile hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra WST-1 hücre canlılık testi yapıldı. Hücre canlılık testi sonunda en az %50 oranında hücre ölümüne yol açan doz konsantrasyon (LD₅₀) değeri belirlendi. Daha sonraki denemelerde SH-SY5Y hücrelerinde nörodejenerasyon oluşturmak için bu LD₅₀ değeri ile çalışılmaya devam edildi.

2. *In vitro* nörodejenerasyona karşı kuersetinin (Q) ve sodyum selenatın (SS) doz aralıklarının belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna 100µL'de 1×10^4 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Hücrelerin plak kuyucuklarına tutunabilmesi için ilk 24 saat besiyeri içinde 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri dikkatli ve yavaş bir şekilde çekilerek atıldı. Daha önceden 10 µM, 20 µM, 25 µM, 40 µM, 50 µM, 80 µM,

100 μM konsantrasyonlarda besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan Q ve SS çözeltileri kuyucuklara eklenerek SH-SY5Y hücreleri ile ön muamele edildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri tekrar dikkatli ve yavaş bir şekilde çekilerek atıldı. Daha önceden 10 μM , 20 μM , 25 μM , 40 μM , 50 μM , 80 μM , 100 μM konsantrasyonlarda 200 μM H_2O_2 içeren besiyeri ile seyreltilerek hazırlanan Q ve SS çözeltileri kuyucuklara eklenerek SH-SY5Y hücreleri ile muamele edildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde tekrar 24 saat inkübe edildi. Eş zamanlı olarak kontrol gruplarını oluşturmak için hücelere H_2O_2 , Q ve SS içermeyen sade besiyeri eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde *in vitro* oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modeline karşı Q ve SS'nin maksimum nöroprotektif etki (E_{max}) gösterdiği doz konsantrasyon değerleri WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi. Daha sonraki denemelerde SH-SY5Y hücrelerinde *in vitro* oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modeline karşı Q ve SS'nin bu E_{max} gösterdiği doz konsantrasyon değerleri ile çalışılmaya devam edildi.

3. *In vitro* nörodejenerasyona karşı çok hedefli kuersetin (Q) ve sodyum selenat (SS) kombinasyonunun (QSS) etkilerinin belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna $100\mu\text{L}$ 'de 1×10^4 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Hücrelerin plak kuyucuklarına tutunabilmesi için ilk 24 saat besiyeri içinde 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri dikkatli ve yavaş bir şekilde çekilerek atıldı. WST-1 testi ile belirlenen E_{max} değerlerindeki Q ve SS kombinasyonunu (QSS) içeren besiyeri kuyucuklara eklenerek SH-SY5Y hücreleri ile ön muamele edildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri tekrar dikkatli ve yavaş bir şekilde çekilerek atıldı. 200 μM H_2O_2 varlığında E_{max} değerlerindeki QSS içeren besiyeri kuyucuklara eklenerek SH-SY5Y hücreleri ile muamele edildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde tekrar 24 saat inkübe edildi. Eş zamanlı olarak kontrol gruplarını oluşturmak için hücelere H_2O_2 , QSS içermeyen

sade besiyeri eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modeline karşı E_{max} değerlerindeki QSS'nin nöroprotektif etkisi WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi.

4. Kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve kombinasyonlarının (QSS) hücre canlılığı üzerine etkisi

SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna $100\mu\text{L}$ 'de 1×10^4 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Hücrelerin plak kuyucuklarına tutunabilmesi için ilk 24 saat besiyeri içinde 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri dikkatli ve yavaş bir şekilde çekilerek atıldı. WST-1 testi ile belirlenen E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS içeren besiyerleri ayrı ayrı kuyucuklara eklenerek SH-SY5Y hücreleri ile ön muamele edildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri tekrar dikkatli ve yavaş bir şekilde çekilerek atıldı. E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS içeren taze besiyerleri ayrı ayrı kuyucuklara tekrar eklenerek SH-SY5Y hücreleri ile muamele edildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde tekrar 24 saat inkübe edildi. Eş zamanlı olarak kontrol gruplarını oluşturmak için hücelere Q, SS ve QSS içermeyen sade besiyeri eklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS'nin etkileri WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi.

3.2.2.b. Apoptotik testler

1 Mitokondriyal membran potansiyeli değişiminin ($\Delta\Psi_m$) belirlenmesi

a. Mitokondriyal membran potansiyeli değişim ($\Delta\Psi_m$) miktarlarının belirlenmesi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyellerindeki değişim ($\Delta\Psi_m$) miktarı, ticari olarak satılan JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyel Deney kiti (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay kit/Cayman) kullanılarak flow sitometri yöntemiyle kit protokolüne göre belirlendi. Mitokondriyal membran potansiyeli (Ψ_m), mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir ve hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılır.

Testin Prensibi:

Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimleri fluorimetrik olarak ölçmek için sitofluorimetrik, lipofilik katyonik boya, 5,5',6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyaniniyodür (JC-1) geliştirilmiştir. JC-1, mitokondriye girmesi ve probun birikimine dayanarak floresan özelliklerini değiştirmesi bakımından avantajlara sahiptir. Yüksek $\Delta\Psi_m$ 'li hücrelerde, JC-1, yoğun kırmızı floresanslı J-agregatları olarak bilinen kompleksleri oluşturur. Bununla birlikte, düşük $\Delta\Psi_m$ 'li hücrelerde, JC-1, mavi flüoresans gösteren monomerik formda kalır. Kırmızı ile mavi floresans arasındaki oran arttıkça, mitokondriyal zarın polarizasyonu da artar.

Uygulama Basamakları:

1. Kültüre edilen SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldıktan sonra falkon tüplerine aktarıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 250 x g'de santrifüjlendi.

2. Süpernatant dikkatli bir şekilde atıldı ve 100 μ L 10 μ M FCCP kontrol solüsyonunda yeniden süspanse edilen FCCP kontrol örnekleri hariç, hücreler 100 μ L deney tamponu içinde tekrardan süspansiyon haline getirildi.
3. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
4. Her bir örneğe 100 μ L JC-1 Boyama çözeltisi (2X) eklendi.
5. Mümkün olduğunca karanlıkta ve oda sıcaklığında tutulan numunelerin flow sitometresindeki verileri hızlı bir şekilde elde edildi.
6. JC-1 agregatları (yüksek $\Delta\Psi_m$) PE kanalında ve JC-1 monomerleri (düşük $\Delta\Psi_m$) ise FITC kanalında tespit edildi.
7. Hücrelerin mitokondriyal membran potansiyeli değişim ($\Delta\Psi_m$) miktarı, JC-1 agregatları (yüksek $\Delta\Psi_m$) içeren sağlıklı mitokondriyal fonksiyona sahip hücreler veya JC-1 monomerleri (düşük $\Delta\Psi_m$) içeren mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sahip hücrelerin miktarları %hücre miktarı cinsinden değerlendirildi.

b. Mitokondriyal membran potansiyeli değişiminin ($\Delta\Psi_m$) görüntülenmesi

Mitokondriyal membran potansiyelinde hiperpolarizasyona uğramış nöroblastoma hücrelerinin görüntüleri, ticari olarak satılan JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyel Deney kiti (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay kit/Cayman) kullanılarak floresan mikroskobu yöntemiyle kit protokolüne göre belirlendi.

Uygulama Basamakları:

1. 6 kuyucuklu plaklarda kültüre edilen SH-SY5Y nörodejeneratif hücre gruplarına (EK 4) her bir kuyuya 1 mL kültür ortamı için 100 μ L JC-1 boyama solüsyonu eklendi ve yavaşça karıştırıldı.
2. Daha sonra örnekler CO₂ inkübatöründe 37°C'de 15 dakika inkübe edildi ve ardından örneklerin floresan mikroskobundaki görüntüleri hızlı bir şekilde elde edildi.
3. JC-1 agregatları içeren sağlıklı mitokondriyal fonksiyona sahip hücreler, rodmini (excitation/emission= 540/570 nm) tespit etmek için tasarlanmış filtre setleri ve 20x büyütme oranına sahip objektif vasıtasıyla görüntülendi.

4. JC-1 monomerleri içeren mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sahip hücreler ise FITC'yi (uyarım/emilim= 485/535 nm) tespit etmek için tasarlanmış filtre setleri ve 20x büyütme oranına sahip objektif vasıtasıyla görüntülendi.

2. Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücrelerin belirlenmesi

a. Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücre miktarlarının belirlenmesi

Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin belirlenmesi, ticari olarak satılan PI ile FITC Annexin V Apoptoz Saptama Kiti (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI/BioLegend) kullanılarak flow sitometri yöntemiyle kit protokolüne göre belirlendi.

Testin Prensipleri:

Bu kit, çoğu hücre tipinde bulunan ve bir membran fosfolipidi olan Fosfatidilserin (PS)'in apoptozun erken safhalarında plazma membranının iç yüzeyinden hücre dış yüzeyine yaptığı translokasyon ve hücre dış yüzeyinde Fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanan 35,8-kDa büyüklüğündeki Annexin V proteininin oluşturduğu kompleks gözlemine dayanır. Nekrotik hücrelerin spesifik özelliklerinden biri hücre zarı bütünlüğünün kaybolmasıdır. Propidyum iyodür (PI) hücre zarı bütünlüğü kaybolmuş nekrotik hücreleri tanımlamak için kullanılır. Ayrıca, bu deney canlı hücrelerin (Annexin V-FITC negatif; PI negatif), apoptotik hücrelerin (Annexin V-FITC pozitif; PI negatif) ve nekrotik / non-apoptotik hücrelerin (Annexin V-FITC negatif; PI-pozitif) ayırt edilmesini de mümkün kılar.

Uygulama Basamakları:

1. Kültüre edilen SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldıktan sonra falkon tüplerine aktarıldı.

2. $0,25-1,0 \times 10^7$ hücre/mL konsantrasyonundaki hücreler soğuk BioLegend hücre boyama tamponu ile iki kez yıkandı ve daha sonra Annexin V bağlama tamponu içinde hücreler tekrar süspanse edildi.
3. Hücre süspanسیونunun 100 μ L'si 5 mL'lik bir test tüpüne aktarıldı ve sırasıyla 5 μ L FITC Annexin V, 10 μ L propidyum iyodür solüsyonu eklendi.
4. Hücreler yavaşça vortekslendi ve karanlıkta oda sıcaklığında (25 °C) 15 dakika inkübe edildi.
5. Her tüpe 400 μ L Annexin V bağlama tamponu eklendi.
6. Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücrelerin miktarları 488 nm'de uyarımla bir flow sitometre cihazı ile ölçüldü ve %hücre miktarı cinsinden değerlendirildi.

b. Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücrelerin görüntülenmesi

Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı SH-SY5Y hücrelerinin görüntülenmesi, ticari olarak satılan PI ile FITC Annexin V Apoptoz Saptama Kiti (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI/BioLegend) kullanılarak floresan mikroskobu yöntemiyle kit protokolüne göre belirlendi.

Uygulama Basamakları:

1. Apoptotik ve nekrotik hücre görüntülerinin elde edilmesi için SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) Annexin V ile inkübe edildikten sonra hücreler yıkandı ve %2 formaldehit ile bir cam slayta sabitlendi.
2. FITC ve rodamin çift filtre seti kullanarak bir floresans mikroskobu altında 10x büyütme oranına sahip objektif vasıtasıyla apoptotik ve nekrotik hücrelerin morfolojik yapıları incelendi.

3.2.3. Hücre içi antioksidan testleri

3.2.3.a. Katalaz (CAT) aktivitenin belirlenmesi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde katalaz aktivitesi ticari olarak satılan Katalaz deney kiti (Catalase assay kit/Cayman) kullanılarak ve kit protokolüne göre belirlendi.

Testin Prensipleri:

Katalaz deneyi kiti, enzim aktivitesinin belirlenmesi için katalazın peroksidatik fonksiyonunu kullanır. Yöntem, enzimin optimum bir H_2O_2 konsantrasyonu varlığında metanol ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Üretilen formaldehit, kromojen olarak 4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol (Purpald) ile kolorimetrik olarak ölçülür. Purpald, özellikle oksidasyondan sonra renksizden mor bir renge dönüşen aldehitler ile bisiklik heterohalka oluşturur. Deney hücresel lizatların CAT aktivitesini ölçmek için kullanılır.

Hücre Lizatlarının Oluşturulması:

1. Kültüre edilen SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) plastik bir hücre kazıyıcı (Cell Scraper) yardımıyla kaldırıldıktan sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca $1000\text{-}2000\text{ x g}$ 'de santrifüjleme ile toplandı.
2. Hücre pelleti, buz üzerinde 1-2 mL soğuk tamponda (1 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat, pH 7.0) sonikasyona tabi tutuldu.
3. Ardından $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika $10,000\text{ x g}$ 'de santrifüj edildi.
4. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için süpernatant elde edildi.

Formaldehit Standartlarının Hazırlanması:

1. İlk olarak 7 adet eppendorf tüp A'dan G'ye işaretlendi.
2. 4,25 mM formaldehit stok çözeltisi elde etmek için Katalaz Formaldehit standardının 10 µL'si seyreltilmiş örnek tamponunun 9,99 mL'si ile seyreltildi.
3. Çizelge 3.2'de açıklandığı gibi her bir tüpe formaldehit stok ve seyreltilmiş deney tamponu eklendi.

Çizelge 3.2. Formaldehit standartlarının hazırlanması

Tüp	Formaldehit (µL)	Deney Tamponu (µL)	Son Konsantrasyon (µM formaldehit)
A	0	1000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

Uygulama Basamakları:

1. 96 kuyulu plakalarda formaldehit standart kuyularında, belirlenen her bir kuyucuğa sırasıyla A-G tüplerindeki 100 µL seyreltik deney tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL standart eklendi.
2. Örnek kuyuları için ise; belirlenen iki kuyuya 100 µL seyreltik deney tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL örnek eklendi.
3. Kullanılan tüm kuyulara mümkün olduğunca çabuk bir şekilde 20 µL seyreltik H₂O₂ eklenerek reaksiyonlar başlatıldı.
4. 96 kuyulu plaka plakanın kapağı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 20 dakika boyunca bir çalkalayıcıda inkübe edildi.

5. Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyuya 30 μ L potasyum hidroksit eklendi ve ardından her kuyuya 30 μ L katalaz purpald (kromojen) eklendi.
6. 96 kuyulu plaka plakanın kapağı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bir çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. Her kuyucuğa 10 μ L katalaz potasyum periodat eklendi. 96 kuyulu plaka plakanın kapağı ile örtüldü ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca bir çalkalayıcıda inkübe edildi.
8. Daha sonra plaka kapağı çıkarıldı ve bir plaka okuyucu kullanarak 540 nm'de absorbans ölçüldü.
9. Sırasıyla formaldehit standart eğrisi, örneklerin katalaz aktiviteleri (nmol/min/mL) ve örneklerin katalaz seviyeleri (%Kontrol) belirlendi.
10. Ölçüm sonunda formaldehit standartları grubundan elde edilen verilerle formaldehit standart eğri grafiği oluşturuldu.
11. Örneklerin katalaz aktiviteleri formaldehit standart eğri grafiği kullanılarak nmol/min/mL cinsinden hesaplandı.
12. Relatif katalaz aktiviteleri, örneklerin ortalama katalaz aktivitelerinin kontrol grubunun ortalama katalaz aktivitelerine oranı olarak %kontrol cinsinden hesaplandı.

3.2.3.b. Toplam antioksidan kapasitenin (TAC) belirlenmesi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde toplam antioksidan kapasite ticari olarak satılan Antioksidan deney kiti (Antioxidant assay kit/Cayman) kullanılarak ve kit protokolüne göre belirlendi.

Testin Prensibi:

Deney, örmekteki antioksidanların metmiyoglobin tarafından ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-etilbenztiazolin sülfonat]) oksidasyonunu ABTS^{®+}ya karşı inhibe etme esasına dayanır. ABTS^{®+}'nın üretilen miktarı, 750 nm veya 405 nm'de absorbans okunarak izlenebilir. Kullanılan reaksiyon koşulları altında, numunedeki antioksidanlar, 750 nm veya 405 nm'de absorbansın konsantrasyonlar ile orantılı bir dereceye kadar bastırılmasına neden olur. ABTS® oksidasyonunu önlemek için numunedeki

antioksidanların kapasitesi, suda çözünebilir bir tokoferol benzeri olan Trolox'un ki ile karşılaştırılır ve milimolar Trolox eşdeğerleri olarak ölçülür.

Hücre Lizatlarının Oluşturulması:

1. Kültüre edilen SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) plastik bir hücre kazıyıcı (Cell Scraper) yardımıyla kaldırıldıktan sonra +4°C'de 10 dakika boyunca 1000-2000 x g'de santrifüjleme ile toplandı.
2. Hücre pelleti, buz üzerinde 1-2 mL soğuk tamponda (%0,9 sodyum klorür ve %0,1 glukoz içeren 5 mM potasyum fosfat, pH 7,4) sonikasyona tabi tutuldu.
3. Ardından +4°C'de 15 dakika 10000 x g'de santrifüj edildi.
4. Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için süpernatant elde edildi.

Trolox Standartlarının Hazırlanması:

1. İlk olarak 7 adet eppendorf tüp A'dan G'ye işaretlendi.
2. Çizelge 3.3'de açıklandığı gibi her bir tüpe seyreltilmiş trolox ve deney tamponu eklendi.

Çizelge 3.3. Trolox standartlarının hazırlanması

Tüp	Trolox (µL)	Deney Tamponu (µL)	Son Konsantrasyon (mM Trolox)
A	0	1000	0
B	30	970	0,045
C	60	940	0,090
D	90	910	0,135
E	120	880	0,18
F	150	850	0,225
G	220	780	0,330

Uygulama Basamakları:

1. 96 kuyulu plakalarda trolox standart kuyularında, belirlenen her bir kuyucuğa sırasıyla A-G tüplerindeki 10 μ L Trolox standardı, 10 μ L metmiyoglobin 150 μ L kromojen eklendi.
2. Örnek kuyuları için ise; belirlenen iki kuyuya 10 μ L örnek, 10 μ L metmiyoglobin ve 150 μ L kromojen eklendi.
3. Kullanılan tüm kuyulara hızlı bir şekilde 40 μ L hidrojen peroksit çalışma solüsyonu eklenerek reaksiyonlar başlatıldı.
4. 96 kuyulu plaka plakanın kapağı ile kapatıldı ve oda sıcaklığında beş dakika boyunca bir çalkalayıcıda inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası plaka kapağı çıkarıldı ve bir plaka okuyucuda 750 nm’de absorbansı ölçüldü
6. Ölçüm sonunda trolox standartları grubundan elde edilen verilerle trolox standart eğri grafiği oluşturuldu.
7. Örneklerin toplam antioksidan kapasite miktarları trolox standart eğri grafiği kullanılarak mM Trolox cinsinden hesaplandı.
8. Relatif toplam antioksidan kapasite miktarları, örneklerin ortalama toplam antioksidan kapasite miktarlarının kontrol grubunun ortalama toplam antioksidan kapasite miktarlarına oranı olarak %kontrol cinsinden hesaplandı.

3.2.4. Oksidatif hasar testleri

3.2.4.a. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) oranlarının belirlenmesi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, Shen *et al.* (1996) tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilmesiyle 2',7'-Dikloroflorosein diasetat (DCFH-DA) kullanılarak belirlendi.

Testin Prensibi:

2',7'-Dikloroflorosein diasetat hücre zarından geçebilen floresan olmayan bir probdur. Oksidatif stres şartlarında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ile 2',7'-Dikloroflorosein diasetat hücre içinde de-esterleşir ve oksidasyondan sonra yüksek oranda floresan 2',7'-Dikloroflorosein'e dönüşür. Reaksiyon sonrası oluşan floresan yoğunluğu hücre içi ROS miktarı ile doğru orantılıdır.

Uygulama Basamakları:

1. Kültüre edilen SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldıktan sonra 15 mL'lik falkon tüplerine aktarıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 250 x g'de santrifüjlendi.
2. Süpernatant dikkatli bir şekilde pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı.
3. Falkon tüplerde bulunan her bir pellete (1×10^6 SH-SY5Y hücresi) steril PBS'de çözünmüş 3mL 2 μ M DCFH-DA eklendi.
4. Hücreler 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
5. DCFH'nin floresan yoğunluğu, 485 nm ve 525 nm'lik uyarım ve emilim dalga boyları kullanılarak bir spektrofloreometre (Perkin-Elmer LS-55, ABD) ile ölçüldü.
6. Örneklerin hücre içi toplam reaktif oksijen türleri miktarı oranları, örneklerin hücre içi toplam reaktif oksijen türleri miktarlarının kontrol grubuna yüzde oranı olarak hesaplandı ve %kontrol cinsinden ifade edildi.

3.2.4.b. Lipit peroksidasyonu (LPO) oranlarının belirlenmesi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyon seviyeleri Smith *et al.* (1982) tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilmesi ile belirlendi.

Testin Prensibi:

Tiyobarbitürik asit (TBA) perokside nöronal lipidlerden meydana gelen malondialdehit (MDA) ile reaksiyona girerek tiyobarbitürik asit reaktif maddelerini (TBARS) oluşturur. TBARS, lipid peroksidasyonu kaynaklı oksidatif stres için standart bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyon seviyeleri, TBARS miktarının ölçülmesiyle analiz edilmiştir.

Malondialdehit (MDA) Standartlarının Hazırlanması:

1. İlk olarak 7 adet eppendorf tüp A'dan G'ye işaretlendi.
2. Çizelge 3.4'de açıklandığı gibi 1 mM malondialdehit stok çözeltisinden her bir tüpe malondialdehit stok ve su eklenerek malondialdehit standartları hazırlandı.

Çizelge 3.4. Malondialdehit (MDA) Standartlarının Hazırlanması

Tüp	MDA (μ L)	H ₂ O (μ L)	MDA Konsantrasyon (μ M)
A	0	1000	0
B	12,5	987,5	12,5
C	25	975	25
D	50	950	50
E	100	900	100
F	200	800	200
G	400	600	400

Uygulama Basamakları:

1. Malondialdehit standart tüplerinde, sırasıyla A'dan G'ye her bir tüpe 200 μ L PBS, 250 μ L trikloroasetik asit (%70 w/v) ve 1 mL tiyobarbitürik asit (%0,8 w/v) ilave edildi.

2. Örnekler için ise; SH-SY5Y nörodejeneratif hücre grupları (EK 4) tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldıktan sonra +4°C'de 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüjlenerek toplandı.
3. Pellet 200 µL PBS ile çözdürüldükten sonra, 250 µL trikloroasetik asit (%70 w/v) ve 1 mL tiyobarbitürik asit (%0,8 w/v), hücrelere ilave edildi.
4. Malondialdehit standartları ve örnekler 60 dakika boyunca 95°C'de kaynar su banyosunda inkübe edildi.
5. Daha sonra, reaksiyonu durdurmak için standartlar ve hücreler 10 dakika boyunca buz üzerinde soğutuldu ve +4°C'de 10 dakika boyunca 1600 x g'de santrifüjlendi.
6. Süpernatantlar alındı ve 96 kuyucuklu plakada belirlenen standart kuyucuklarına 150 µL malondialdehit standart, örnek kuyucuklarına ise 150 µL örnek eklenerek Spectra Max Plus 384 mikroparka okuyucusu (Molecular Devices, ABD) tarafından 532 nm'de ölçüldü.
7. Ölçüm sonunda malondialdehit standartları grubundan elde edilen verilerle malondialdehit standart eğri grafiği oluşturuldu.
8. Örneklerin lipid peroksidasyon miktarları malondialdehit standart eğri grafiği kullanılarak µM MDA cinsinden hesaplandı.
9. Relatif lipid peroksidasyon miktarları, örneklerin ortalama lipid peroksidasyon miktarlarının kontrol grubunun ortalama lipid peroksidasyon miktarlarına oranı olarak %kontrol cinsinden hesaplandı.

3.2.4.c. *In vitro* hücre dışı insan A β ₍₁₋₄₂₎ peptit konsantrasyonlarının kantitatif tayini

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde hücre dışı A β ₍₁₋₄₂₎ peptit konsantrasyonu ticari olarak satılan insan A β ₍₁₋₄₂₎ peptit (Amiloid Beta Peptit 1-42) ELISA kiti (Human A β ₍₁₋₄₂₎ peptide (Amyloid Beta Peptide 1-42) ELISA kit/Elabscience) kullanılarak Sandwich ELISA yöntemiyle kit protokolüne göre belirlendi.

Testin Prensipleri:

Bu test, Sandwich-ELISA ilkesine dayanır. Kit içinde sağlanan mikro ELISA plakası, Human $A\beta_{(1-42)}$ peptidine özgü antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler, mikro ELISA plaka kuyularındaki spesifik antikor ile birleşir. Daha sonra, Human $A\beta_{(1-42)}$ peptide ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinine edilmiş bir tespit antikorunu, kuyularındaki spesifik örnek-antikor kompleksi ile birleşerek kolorimetrik renk oluşturur. Optik yoğunluk (OD), spektrofotometrik olarak ölçülerek *in vitro* hücre dışı insan $A\beta_{(1-42)}$ peptit konsantrasyonları tespit edilir.

$A\beta_{(1-42)}$ Peptidi Standartlarının Hazırlanması:

1. İlk olarak 7 adet eppendorf tüp A'dan G'ye işaretlendi.
2. Her bir tüpe 500 μ L örnek seyreltici eklendi.
3. Daha sonra A tüpüne 1000 pg/mL'lik $A\beta_{(1-42)}$ peptit referans standart çözeltisinden 500 μ L eklendi ve A'dan G'ye seri dilüsyon yöntemiyle sırasıyla 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 0 pg/mL konsantrasyonlarında $A\beta_{(1-42)}$ peptit standartları hazırlandı.

Uygulama Basamakları:

1. Örneklerin hazırlanması için, SH-SY5Y nörodejeneratif hücre gruplarının (EK 4) süpernatantları (besiyeri) toplandı.
2. Safsızlığı ve hücre artıklarını gidermek için 20 dakika boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $1000\times g$ 'de SH-SY5Y hücre kültür gruplarının besiyerleri santrifüjlendi ve süpernatant elde edildi.
3. 96 kuyulu mikro ELISA plakasının belirlenen her bir kuyucuğuna 100 μ L standart, örnek ve kör eklendi.
4. Mikro ELISA plaka, kapağı ile kapandı ve 90 dakika boyunca 37°C 'de inkübe edildi.
5. Yıkama yapmadan her kuyucuktan sıvı uzaklaştırıldı ve hızlı bir şekilde her bir kuyucuğa 100 μ L Biyotinlenmiş $A\beta$ belirleme çözeltisinden eklendi.

6. Plaka, kapağı ile kapandı.
7. Yavaşça karıştırıldı ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
8. Her bir kuyucuktan solüsyon aspire edildi ve bir mikrolaka yıkayıcı ile her bir kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklenmesi suretiyle üç kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
9. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat solüsyonu eklendi.
10. Plaka, kapağı ile kapandı ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
11. Her bir kuyucuktan solüsyon aspire edildi ve bir mikrolaka yıkayıcı ile her bir kuyucuğa 350 µL yıkama tamponu eklenmesi suretiyle beş kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
12. Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklendi. Plaka, kapağı ile kapandı ve ışıktan korunacak bir şekilde 37 °C’de 15 dakika inkübe edildi.
13. Her kuyuya 50 µL durdurma çözeltisi eklendi.
14. Her bir kuyunun optik yoğunluğu (Absorbans/OD değeri) Spectra Max Plus 384 mikrolaka okuyucusu (Molecular Devices, ABD) tarafından 450 nm’de ölçüldü.
15. Ölçüm sonunda A $\beta_{(1-42)}$ peptidi standartları grubundan elde edilen verilerle A $\beta_{(1-42)}$ peptit standart eğrisi oluşturuldu.
16. Örneklerin A $\beta_{(1-42)}$ peptit miktarları A $\beta_{(1-42)}$ peptit standart eğri grafiği kullanılarak pg/mL cinsinden hesaplandı.
17. Relatif A $\beta_{(1-42)}$ peptit miktarları, örneklerin ortalama A $\beta_{(1-42)}$ peptit miktarlarının kontrol grubunun ortalama A $\beta_{(1-42)}$ peptit miktarlarına oranı olarak %kontrol cinsinden hesaplandı.

3.2.5. İstatistiksel analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanıldı. Analizler, Student’s two-tailed t-test kullanılarak gerçekleştirildi. ^{##} P <0,01, ^{###} P <0,001 kontrole karşı; ^{ns} P >0,05, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, yalnız H₂O₂’ye karşı olarak değerlendirildi. P >0,05=ns (not significant) önemsiz, p<0,05=* (significant) önemli, p<0,01=** (very significant) çok önemli, p<0,001=*** (highly significant) yüksek derecede önemli

olarak değerlendirildi. Her deney üęlü setler halinde geręekleřtirildi. Tüm veriler üę deneyin ortalaması ve $\pm$ SEM olarak ifade edildi.



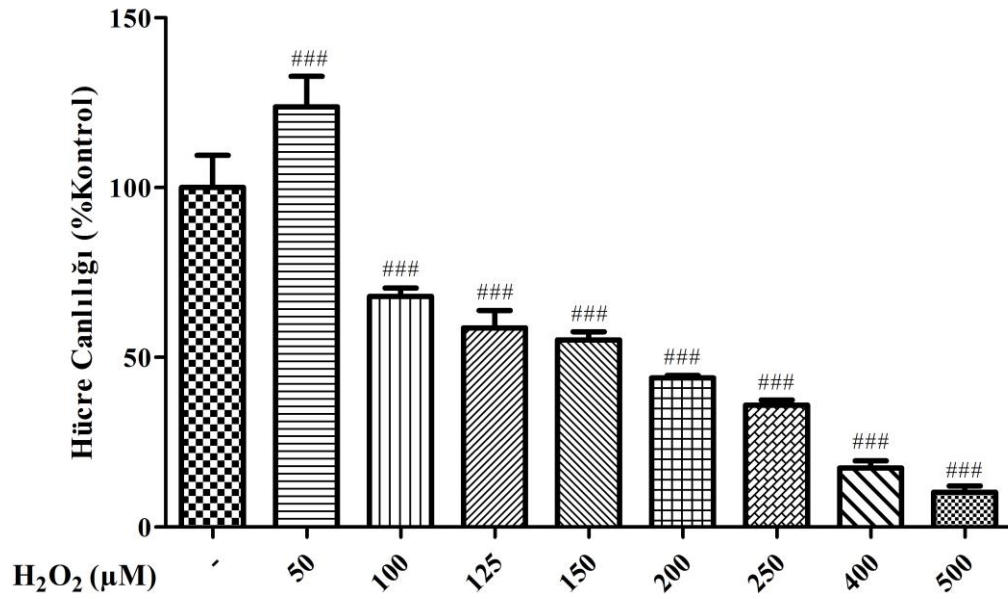
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Canlılık Testleri Sonuçları

4.1.1. WST-1 testi sonuçları

4.1.1.a. SH-SY5Y hücre hattında *in vitro* hidrojen peroksit nörotoksisitesi sonuçları

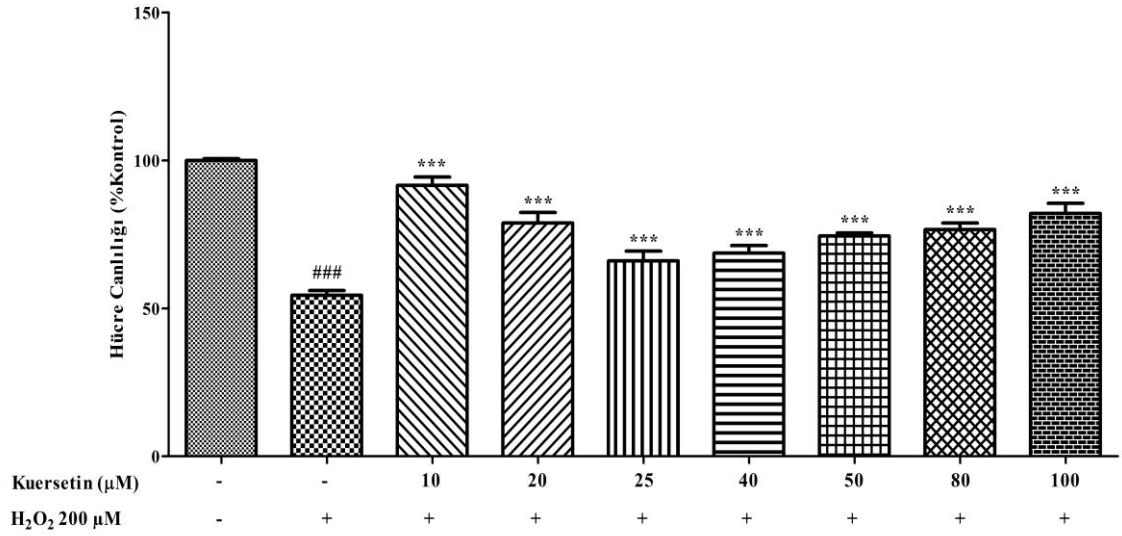
SH-SY5Y hücrelerine uygulanan H_2O_2 doz konsantrasyonları arttıkça hücrelerin canlılık oranlarının ($50 \mu M H_2O_2$ hariç) doza bağlı bir şekilde önemli derecede azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.1). Buna göre kontrol grubu ve artan konsantrasyonlardaki H_2O_2 gruplarında hücre canlılık oranları sırasıyla %100, %123,72, %67,91, %58,67, %55,20, %43,94, %35,96, %17,43, %10,30 olarak tespit edildi. H_2O_2 'in LD_{50} değeri %56,06 oranında hücre ölümüne yol açan $200 \mu M$ doz konsantrasyon değeri olarak belirlendi ve daha sonraki denemelerde SH-SY5Y hücre hattında *in vitro* nörodejenerasyon oluşturmak için bu doz konsantrasyon değeri kullanıldı.



Şekil 4.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂'nin LD₅₀ değerinin belirlenmesi

4.1.1.b. *In vitro* nörodejenerasyona karşı kuersetinin (Q) doz konsantrasyon sonuçları

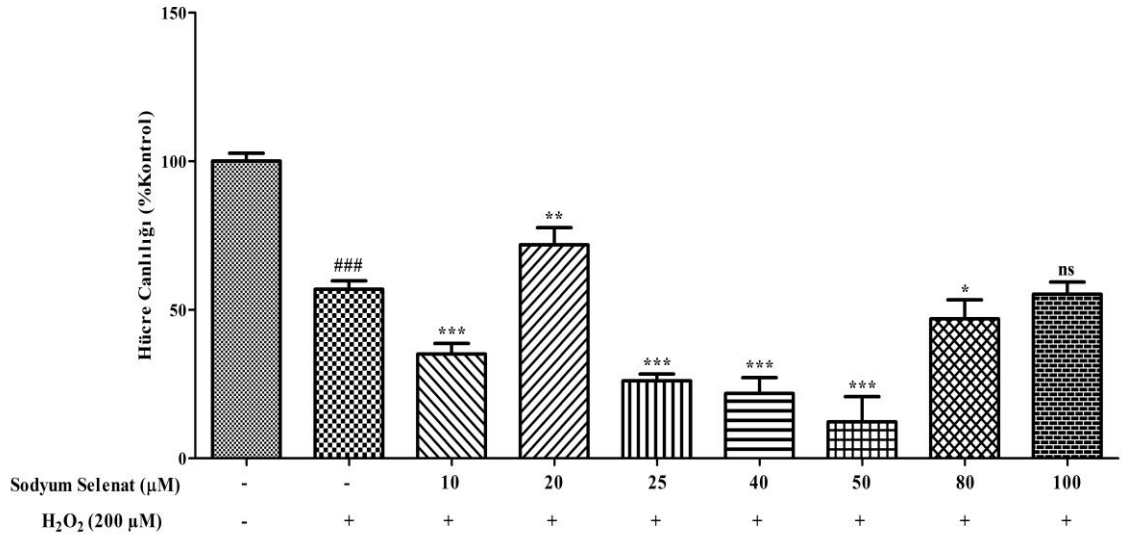
SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H₂O₂ varlığında oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı artan konsantrasyonlarda (10, 20, 25, 40, 50, 80, 100 μM) kuersetinin etkili olduğu konsantrasyon değerleri belirlendi. Hücre canlılık testi sonunda 200 μM H₂O₂ varlığında kuersetin (Q) ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde maksimum nöroprotektif etki (E_{max}) 10 μM konsantrasyonda gözlemlenmiş olup 200 μM H₂O₂'e göre hücre canlılığında %37,13 oranında artış sağlamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde Q'nun maksimum nöroprotektif etki (E_{max}) değerinin belirlenmesi

4.1.1.c. *In vitro* nörodejenerasyona karşı sodyum selenatın (SS) doz konsantrasyon sonuçları

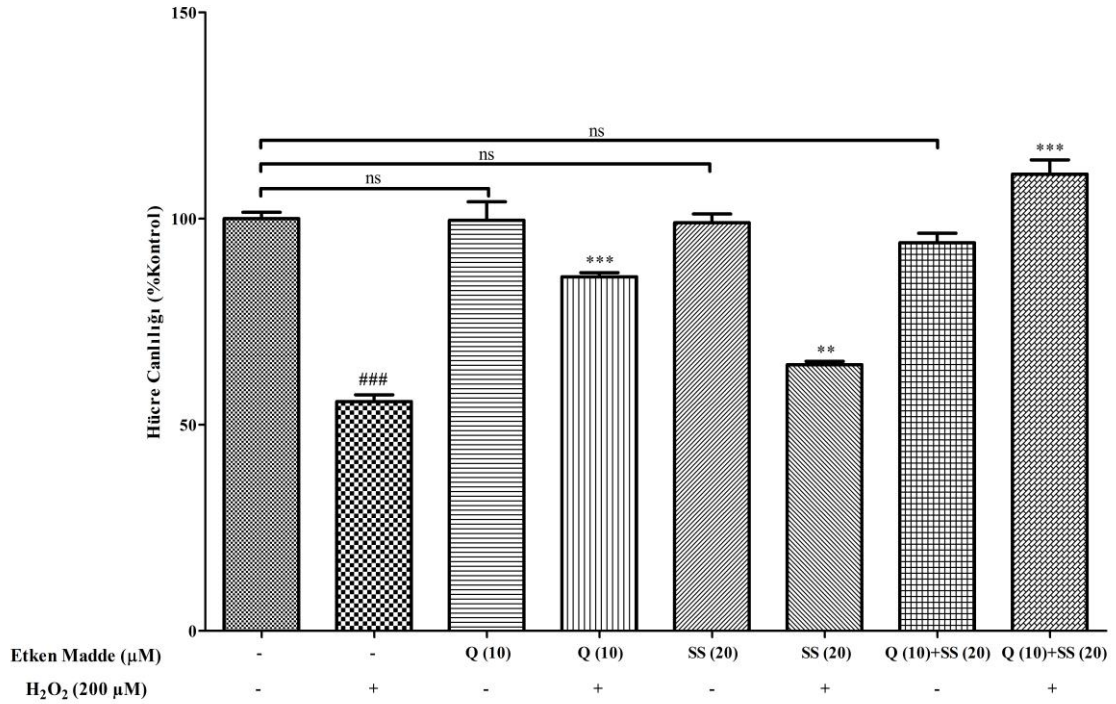
SH-SY5Y hücrelerinde ilk olarak 200 μ M H₂O₂ varlığında oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı artan konsantrasyonlarda (10, 20, 25, 40, 50, 80, 100 μ M) sodyum selenatın etkili olduğu konsantrasyon değerleri belirlendi. Hücre canlılık testi sonunda 200 μ M H₂O₂ varlığında sodyum selenat (SS) ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde maksimum nöroprotektif etki (E_{max}) 20 μ M konsantrasyonda gözlemlenmiş olup 200 μ M H₂O₂'e göre hücre canlılığında %14,91 oranında artış sağlamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde SS'nin maksimum nöroprotektif etki (E_{max}) değerinin belirlenmesi

4.1.1.d. *In vitro* nörodejenerasyona karşı kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) nöroprotektif etkilerinin sonuçları

Kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde 200 µM H₂O₂'e karşı gösterdiği nöroprotektif etki sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir. Şekil 4.4'deki sonuçlara göre kontrol grubu, H₂O₂ grubu, kuersetin, sodyum selenat ve kombine ilaç uygulanan gruplarda sırasıyla %100, %55,63, %85,87, %64,58 ve %110,80 oranında hücre canlılığı tespit edildi. Bu verilere göre; kuersetin ile sodyum selenat ikili ilaç kombinasyonunun kuersetin'e göre 0,29 kat ve sodyum selenata göre 0,72 kat hücre canlılığını arttırdığı ve sinerjistik nöroprotektif etki gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.4. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS'nin nörotoksik ve *in vitro* nörodejenerasyona karşı nöroprotektif etkileri

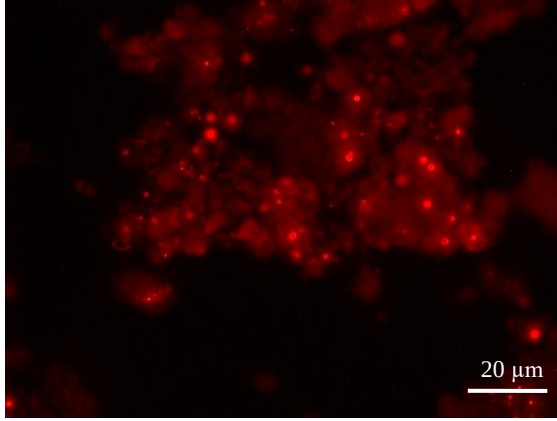
4.1.1.e. Çok hedefli kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) nörotoksisite sonuçları

200 μM H₂O₂ yokluğunda kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerine nörotoksisite sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir. Şekil 4.4'deki sonuçlara göre kontrol grubu, Q, SS ve QSS uygulanan gruplarda sırasıyla %100, %99,60, %98,99 ve %94,13 oranında hücre canlılığı tespit edildi. Q, SS ve QSS uygulanan gruplar tek tek kontrolle ve kendi aralarında kıyaslandığında hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak hiçbir olumsuz ve toksik etkisinin olmadığı görüldü. Elde edilen tüm bu olumlu verilerden dolayı bundan sonraki çalışmalar bu iki madde ve karışımı ile gerçekleştirildi.

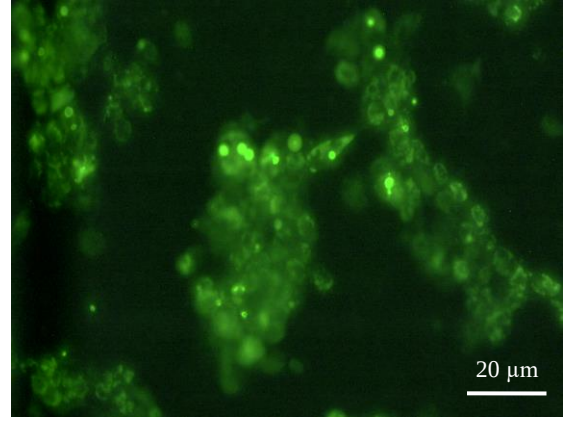
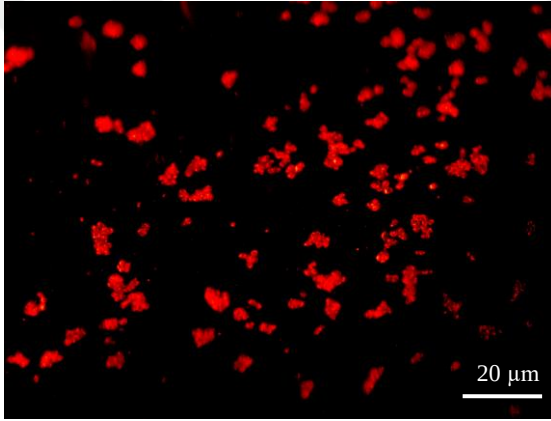
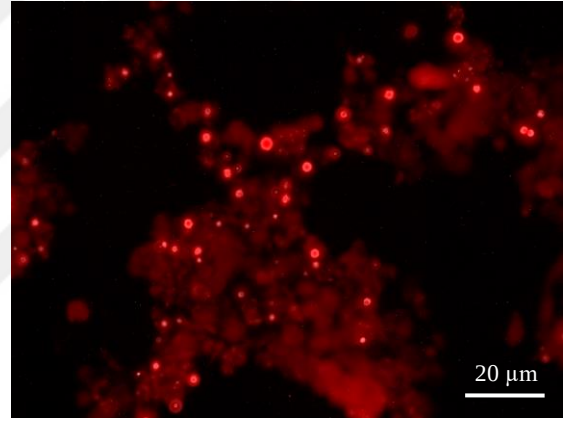
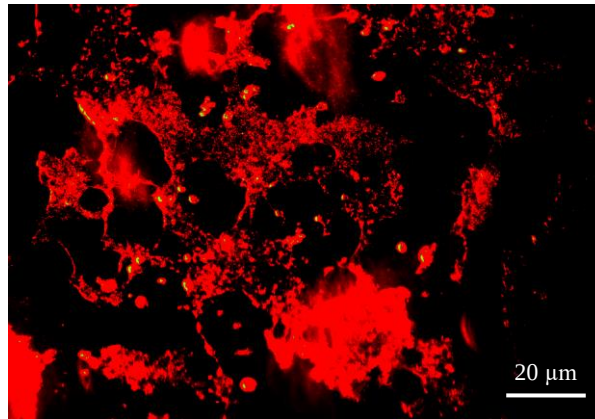
4.1.2. Apoptotik testlerin sonuçları

4.1.2.a. Mitokondriyal membran potansiyel (MMP) değişimi ($\Delta\Psi_m$) sonuçları

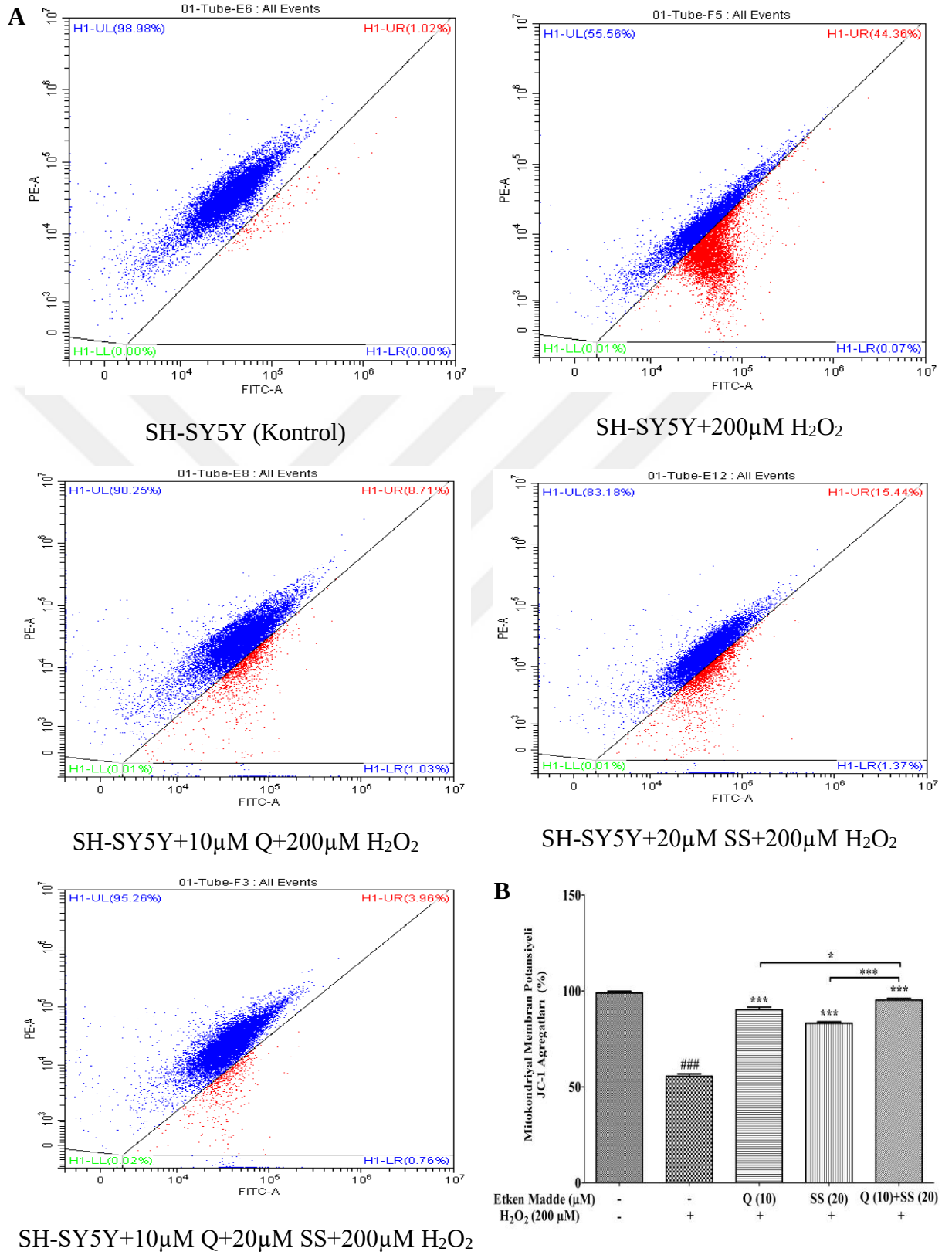
SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) sitofluorimetrik, lipofilik katyonik JC-1 boyasının monomerik ve agregre olma durumuna göre sağlıklı ve polarize $\Delta\Psi_m$ 'ye sahip hücrelerin görüntüleri ve miktarları olarak Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre kontrol grubu, H_2O_2 , Q, SS ve QSS uygulanan gruplarda sırasıyla %1,02, %44,36, %8,71, %15,44 ve %3,96 oranında polarize olmuş mitokondriyal membran potansiyeline sahip veya mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna sahip SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri gözlemlendi. H_2O_2 uygulanan grup; kontrol grubu ile kıyaslandığında H_2O_2 'in nöroblastoma hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli polarizasyonunu ($\Delta\Psi_m$) yaklaşık 43,50 kat arttırarak sağlıklı hücre sayısında %43,42 oranında azalışa neden olduğu gözlemlendi. Ayrıca, H_2O_2 uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q, SS ve QSS'nin nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı mitokondriyal membran potansiyeli polarizasyonlarını ($\Delta\Psi_m$) sırasıyla 5,09, 2,87 ve 11,20 kat azaltarak sağlıklı hücre sayısında sırasıyla %34,69, %27,62 ve %39,70 oranında artışa neden olduğu belirlendi. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup Q ve SS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında QSS'nin; Q'ya göre 1,20, SS'ye göre ise 2,90 kat daha fazla bir şekilde H_2O_2 kaynaklı mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerine karşı koruyucu etkisi olduğu belirlendi (Şekil 4.6).



SH-SY5Y (Kontrol)

SH-SY5Y+200μM H₂O₂SH-SY5Y+10μM Q+200μM H₂O₂SH-SY5Y+20μM SS+200μM H₂O₂SH-SY5Y+10μM Q+20μM SS+200μM H₂O₂

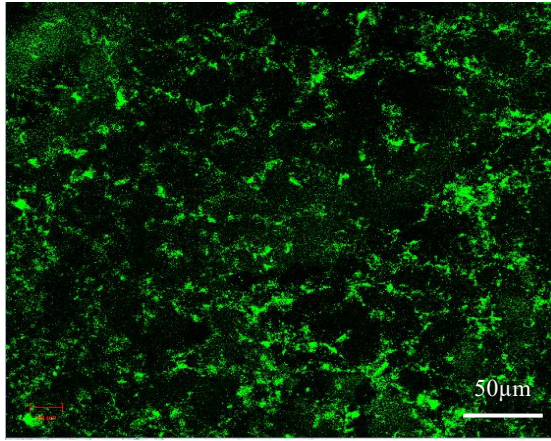
Şekil 4.5. JC-1 ile boyanan SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerinin ($\Delta\psi_m$) floresan mikrografları



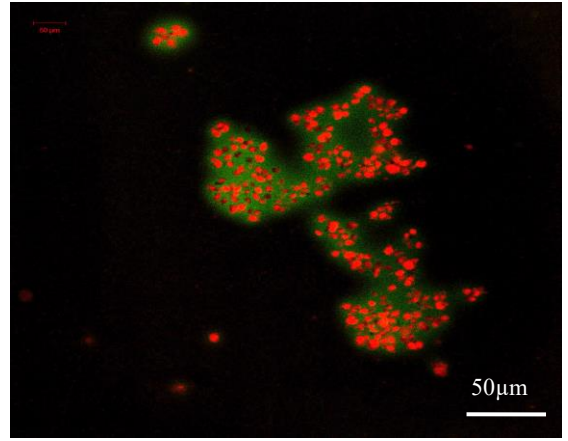
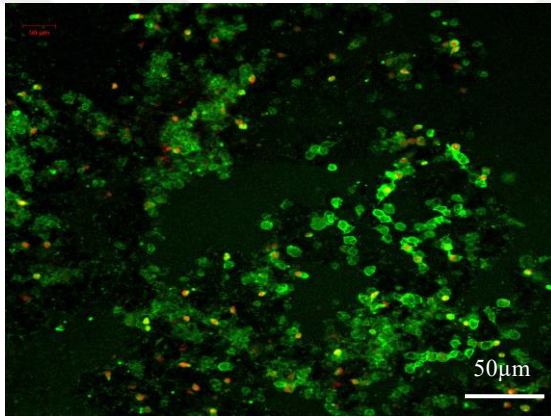
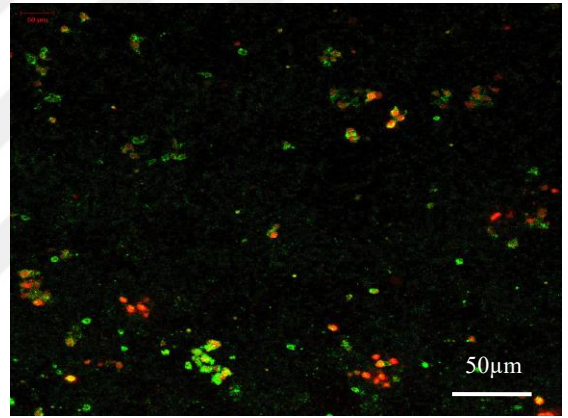
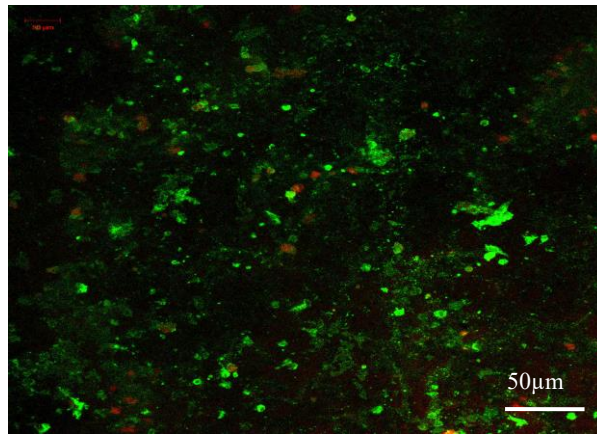
Şekil 4.6. JC-1 ile boyanan SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerinin ($\Delta\psi_m$) flow sitometrik analizi (A) Flow sitometri görüntüleri, (B) JC-1 agregatlarının % oranları

4.1.2.b. Apoptotik, nekrotik ve sağlıklı SH-SY5Y nöroblastoma sonuçları

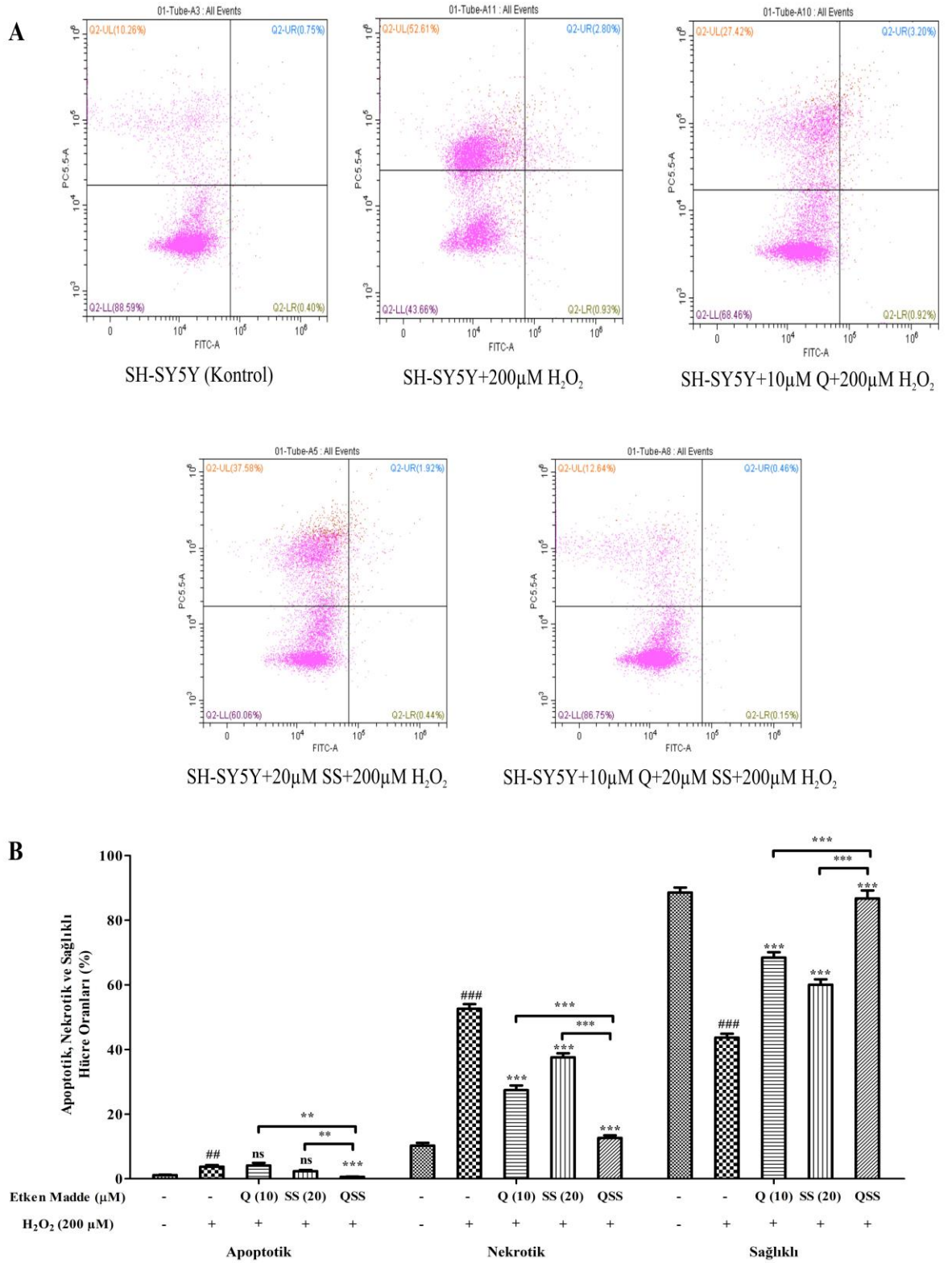
SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı apoptotik ve nekrotik nöron kaybına karşı Q, SS ve QSS'nin nöroprotektif etkileri Propidium iyodür (PI) içeren Annexin V-FITC apoptoz saptama deneyi ile belirlendi (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Elde edilen Annexin V-FITC verilerine göre kontrol grubu, H_2O_2 , Q, SS ve QSS uygulanan gruplarda sırasıyla %1,15, %3,73, %4,12, %2,36 ve %0,61 oranında önemsenmeyecek kadar az miktarda apoptotik nöron kaybı gözlemlendi. Elde edilen Propidium iyodür (PI) verilerine göre kontrol grubu, H_2O_2 , Q, SS ve QSS uygulanan gruplarda sırasıyla %10,26, %52,61, %27,42, %37,58 ve %12,64 oranında nekrotik nöron kaybı gözlemlendi. H_2O_2 uygulanan grup; kontrol grubu ile kıyaslandığında H_2O_2 'in nöroblastoma hücrelerinin nekrotik nöron kaybını yaklaşık 5,13 kat arttırarak sağlıklı hücre sayısında %44,93 oranında azalışa neden olduğu gözlemlendi. Ayrıca, H_2O_2 uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q, SS ve QSS'nin nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı nekrotik nöron kaybını sırasıyla 1,92, 1,40 ve 4,16 kat azaltarak sağlıklı hücre sayısında sırasıyla %24,80, %16,40 ve %43,09 oranında artışa neden olduğu belirlendi. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup Q ve SS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında QSS'nin; Q'ya göre 1,17, SS'ye göre ise 1,97 kat daha fazla bir şekilde H_2O_2 kaynaklı nekrotik nöron kaybına karşı koruduğu tespit edildi (Şekil 4.8).



SH-SY5Y (Kontrol)

SH-SY5Y+200µM H₂O₂SH-SY5Y+10µM Q+200µM H₂O₂SH-SY5Y+20µM SS+200µM H₂O₂SH-SY5Y+10µM Q+20µM SS+200µM H₂O₂

Şekil 4.7. PI içeren Annexin V-FITC apoptoz belirleme testi ile test edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin apoptotik, nekrotik ve sağlıklı olma durumlarını gösteren floresan mikrografları



Şekil 4.8. PI içeren Annexin V-FITC apoptoz belirleme testi ile test edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin apoptotik, nekrotik ve sağlıklı olma durumlarının değerlendirilmesi (A) Flow sitometri görüntüleri, (B) %hücre oranları

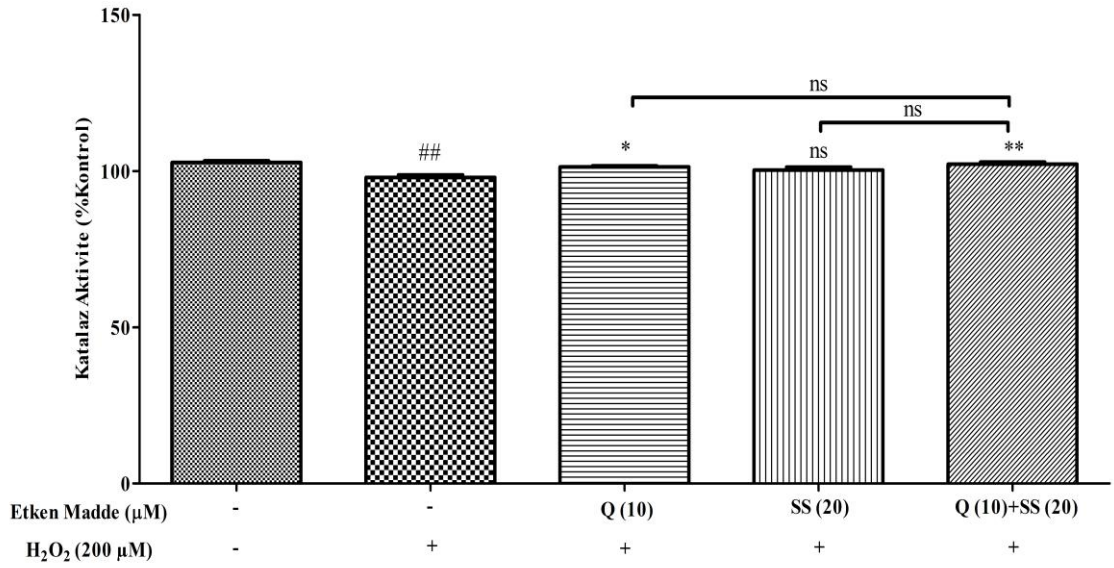
4.2. Hücre İçi Antioksidan Testlerinin Sonuçları

4.2.1. Katalaz (CAT) aktivite sonuçları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde katalaz aktivite sonuçları Çizelge 4.1’de nmol/min/ml ve Şekil 4.9’da %kontrol olarak verilmiştir. Örneklerin katalaz aktivite miktarlarının hesaplanmasında kullanılacak formaldehit standart eğri grafiği EK 5’de verilmiştir. H₂O₂ uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında H₂O₂’in nöroblastoma hücrelerinin katalaz aktivitesini %4,76 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede azalttığı belirlendi. H₂O₂ uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q ve QSS’nin nöroblastoma hücrelerinin katalaz aktivitelerini sırasıyla %3,34 ve %4,23 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede arttırdığı belirlenirken SS’nin istatistiksel olarak katalaz aktivite üzerinde herhangi bir arttırıcı etkiye sahip olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup; Q ve SS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak benzer katalaz aktivitelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde deney grupları ve katalaz aktivite (nmol/min/ml) miktarları

Gruplar	Katalaz Aktivite (nmol/min/ml)
SH-SY5Y	2,473 ± 0,022
SH-SY5Y+200µM H ₂ O ₂	2,358 ± 0,035 ^{##}
SH-SY5Y+10µM Q+200µM H ₂ O ₂	2,438 ± 0,014 [*]
SH-SY5Y+20µM SS+200µM H ₂ O ₂	2,415 ± 0,038 ^{ns}
SH-SY5Y+10µM Q+20µM SS+200µM H ₂ O ₂	2,459 ± 0,036 ^{**}



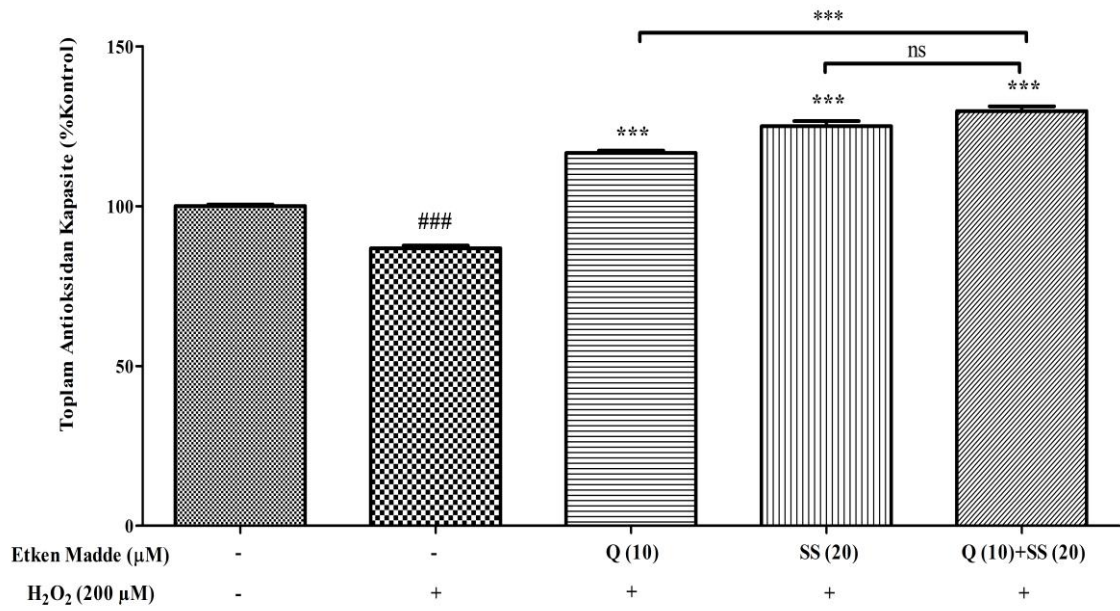
Şekil 4.9. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde katalaz aktivitesinin (%Kontrol) belirlenmesi

4.2.2. Toplam antioksidan kapasite sonuçları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde toplam antioksidan kapasite sonuçları Çizelge 4.2’de mM trolox ve Şekil 4.10’da %kontrol olarak verilmiştir. Örneklerin toplam antioksidan kapasite miktarlarının hesaplanmasında kullanılacak trolox standart eğri grafiği EK 5’de verilmiştir. H₂O₂ uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında H₂O₂’in nöroblastoma hücrelerinin toplam antioksidan kapasitesini %13,2 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede azalttığı belirlendi. Ayrıca, H₂O₂ uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q, SS ve QSS’nin nöroblastoma hücrelerinin toplam antioksidan kapasitelerini sırasıyla %29,81, %38,21 ve %42,95 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede arttırdığı belirlendi. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup; Q uygulanan gruba göre nöroblastoma hücrelerinin toplam antioksidan kapasitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede 0,11 kat daha fazla arttırdığı belirlenirken, SS uygulanan grup ile istatistiksel olarak benzer toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde deney grupları ve toplam antioksidan kapasite (mM trolox) miktarları

Gruplar	Toplam Antioksidan Kapasite (mM Trolox)
SH-SY5Y	95,831 ± 0,979
SH-SY5Y+200µM H ₂ O ₂	83,177 ± 1,652 ###
SH-SY5Y+200µM H ₂ O ₂ +10µM Q	111,745 ± 1,475 ***
SH-SY5Y+200µM H ₂ O ₂ +20µM SS	119,802 ± 3,060 ***
SH-SY5Y+200µM H ₂ O ₂ +10µM Q+20µM SS	124,341 ± 2,801 ***

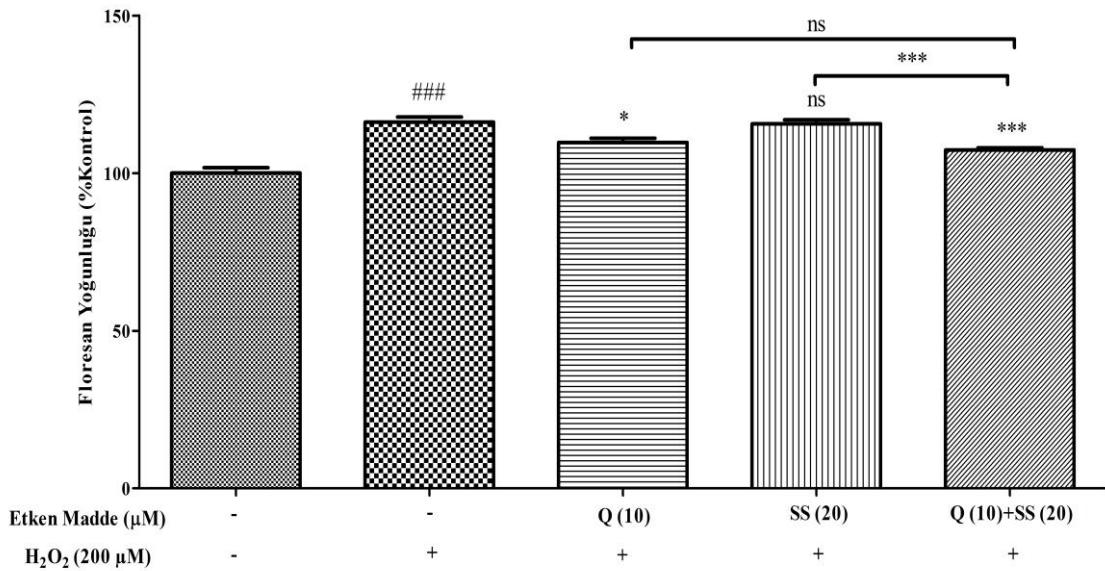


Şekil 4.10. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde toplam antioksidan kapasitelerin (%Kontrol) belirlenmesi

4.3. Oksidatif Hasar Testlerinin Sonuçları

4.3.1. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) oranları sonuçları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) sonuçları Şekil 4.11 gösterildiği gibi %kontrol olarak verilmiştir. H_2O_2 uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında H_2O_2 'in nöroblastoma hücrelerinin ROS miktarını %16,22 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede arttırdığı belirlendi. Ayrıca, H_2O_2 uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q ve QSS'nin nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı artan ROS miktarlarını sırasıyla %6,46 ve %8,86 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede azalttığı; SS'nin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre içi ROS artışını baskılayamadığı gözlemlendi. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup Q ve SS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında; Q ile istatistiksel olarak benzer bir şekilde H_2O_2 kaynaklı artan hücre içi ROS miktarlarını azaltırken, SS'ye göre istatistiksel olarak 0,08 kat daha fazla anlamlı bir şekilde hücre içi ROS miktarını azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).



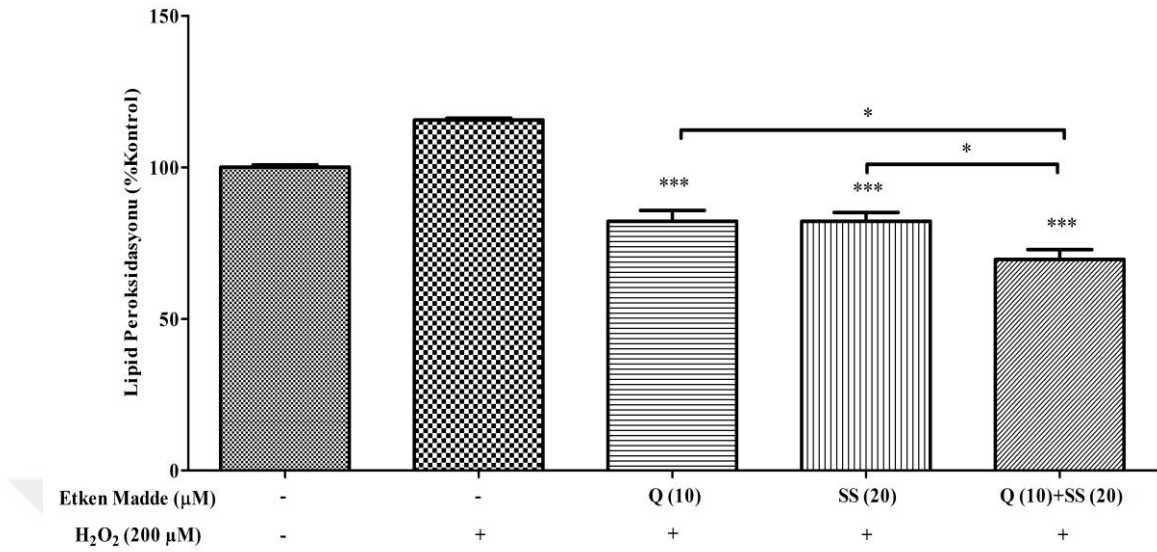
Şekil 4.11. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türleri miktarının (%Kontrol) belirlenmesi

4.3.2. Lipit peroksidasyonu (LPO) sonuçları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyon seviyeleri Çizelge 4.3'de μM MDA ve Şekil 4.12'de %kontrol olarak verilmiştir. Örneklerin perokside lipit miktarlarının hesaplanmasında kullanılacak malondialdehit (MDA) standart eğri grafiği EK 5'de verilmiştir. H_2O_2 uygulanan grup; kontrol grubu ile kıyaslandığında H_2O_2 'in nöroblastoma hücrelerinde LPO miktarını %15,56 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede arttırdığı gözlemlendi. Ayrıca, H_2O_2 uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q, SS ve QSS'nin nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı artan LPO miktarlarını sırasıyla %33,34, %33,34 ve %45,93 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede azalttığı gözlemlendi. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup; Q ve SS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında; QSS'nin Q ve SS'ye göre her iki H_2O_2 kaynaklı artan hücre içi LPO miktarlarını 0,18 kat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla miktarda azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Çizelge 4.3. H_2O_2 varlığında ve yokluğunda Q, SS ve QSS ile tek tek muamele edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde lipid peroksidasyonu konsantrasyonları

Gruplar	MDA (μM)
SH-SY5Y	$1,421 \pm 0,002$
SH-SY5Y+200 μM H_2O_2	$1,447 \pm 0,002$ ###
SH-SY5Y+200 μM H_2O_2 +10 μM Q	$1,392 \pm 0,012$ ***
SH-SY5Y+200 μM H_2O_2 +20 μM SS	$1,392 \pm 0,009$ ***
SH-SY5Y+200 μM H_2O_2 +10 μM Q+20 μM SS	$1,371 \pm 0,011$ ***



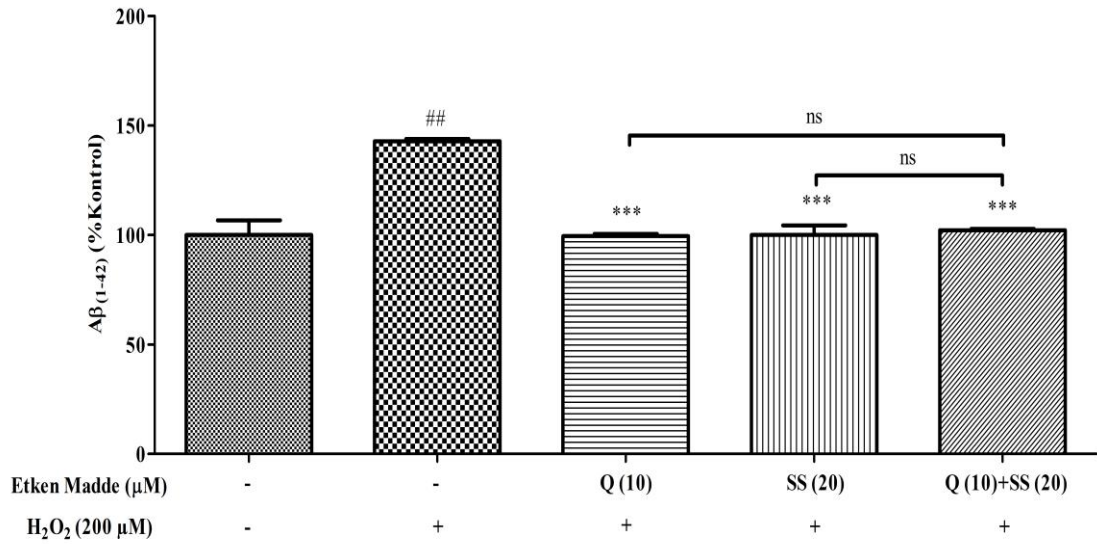
Şekil 4.12. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde lipit peroksidasyonu seviyelerinin (%Kontrol) belirlenmesi

4.3.3. *In vitro* hücre dışı insan A β ₍₁₋₄₂₎ peptit konsantrasyonlarının sonuçları

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde hücre dışı A β ₍₁₋₄₂₎ peptit konsantrasyonlarının sonuçları Çizelge 4.4'de pg/mL ve Şekil 4.13'de %kontrol olarak verilmiştir. Örneklerin A β ₍₁₋₄₂₎ peptit miktarlarının hesaplanmasında kullanılacak A β ₍₁₋₄₂₎ peptidi standart eğri grafiği EK 5'de verilmiştir. H₂O₂ uygulanan grup; kontrol grubu ile kıyaslandığında H₂O₂'nin nöroblastoma hücrelerinin hücre dışı A β ₍₁₋₄₂₎ peptit miktarını %42,78 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede arttırdığı belirlendi. Ayrıca, H₂O₂ uygulanan grup; Q, SS ve QSS grupları ile karşılaştırıldığında Q, SS ve QSS'nin nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı artan hücre dışı A β ₍₁₋₄₂₎ peptit miktarlarını sırasıyla %43,34, %42,78 ve %40,56 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede azaltarak, kontrol hücre grubunun hücre dışı A β ₍₁₋₄₂₎ peptit miktarı seviyesine kadar indirgediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, QSS uygulanan grup; Q ve SS uygulanan gruplar ile kıyaslandığında; QSS'nin H₂O₂ kaynaklı artan hücre dışı A β ₍₁₋₄₂₎ peptit miktarlarını Q ve SS ile istatistiksel olarak benzer miktarda azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).

Çizelge 4.4. Hidrojen peroksit varlığında ve yokluğunda Q, SS ve QSS ile tek tek muamele edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde $A\beta_{(1-42)}$ peptit konsantrasyonları

Gruplar	$A\beta_{(1-42)}$ Peptit (pg/mL)
SH-SY5Y	1,567 $\pm$ 0,011
SH-SY5Y+200 μ M H_2O_2	1,607 $\pm$ 0,002 ##
SH-SY5Y+200 μ M H_2O_2 +10 μ M Q	1,566 $\pm$ 0,002 ***
SH-SY5Y+200 μ M H_2O_2 +20 μ M SS	1,567 $\pm$ 0,007 ***
SH-SY5Y+200 μ M H_2O_2 +10 μ M Q+20 μ M SS	1,569 $\pm$ 0,001 ***



Şekil 4.13. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde *in vitro* insan $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyelerinin (%Kontrol) belirlenmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ökaryotik organizmalarda ROS, moleküler oksijenin $O_2^{\bullet-}$ ye indirgendiği mitokondriyal elektron taşıma zinciri tarafından aktif bir elektronun kaçması nedeniyle sürekli olarak üretilir. Üretilen $O_2^{\bullet-}$ kendiliğinden veya enzimatik olarak H_2O_2 'ye dönüştürülür. Daha sonra H_2O_2 , geçiş metal iyonları (Fe^{2+} veya Cu^{2+}) tarafından katalize edilen bir reaksiyonda bir elektron alarak $OH^{\bullet}$ ve OH^- ye dönüştürülebilir. Üretilen hidroksil radikalleri oldukça reaktiftirler ve önemli oksidatif hasara yol açmaktadırlar. Bu zararlı hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için H_2O_2 , katalaz ve GPx gibi enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar yoluyla suya dönüştürülür (Lushchak 2014). H_2O_2 'nin hücre içi konsantrasyonu bu nedenle hücresel antioksidan savunma sistemi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Homeostatik H_2O_2 konsantrasyonunun 1-700 nM arasında değiştiği ve 1 μM 'ın üzerindeki hücre içi bir konsantrasyonun oksidatif stresi indüklediği düşünülmektedir (Güliden *et al.* 2010). Whittemore *et al.* (1995), düşük H_2O_2 (10-100 μM) konsantrasyonlarına maruz kalmanın, nöronal hücrelerin apoptozisini indüklediğini göstermiştir. Bu nedenle, nöronal hücrelerde oksidatif stres mekanizmalarını araştırmak için H_2O_2 iyi bir oksidatif stres tetikleme kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında ilk olarak; insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hatlarında H_2O_2 kaynaklı nörodejenerasyon oluşturuldu. Bu amaçla 50-500 μM konsantrasyon aralığında H_2O_2 konsantrasyonları incelendi ve (50 μM H_2O_2 hariç) artan (100-500 μM) H_2O_2 konsantrasyonlarında, konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında kontrol grubuna göre azalmalar görüldü. Belirlenen 200 μM sitotoksik H_2O_2 konsantrasyonu (LD_{50}) değerinin Çizelge 5.1'de görüldüğü gibi Taki-Nakano *et al.* (2014); Xiao *et al.* (2013); Zhang *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, sitotoksik H_2O_2 konsantrasyonlarındaki değişimler hücre ekim yoğunluğundaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Güliden *et al.* 2010). 50 μM H_2O_2 içeren grubun kontrol grubuna göre daha fazla hücre canlılığı göstermesinin sebebi olarak; 50 μM H_2O_2 konsantrasyonunun ekilen hücre sayısına göre düşük konsantrasyonda kaldığı, bununla birlikte oksidatif stresi hücrede sitotoksik etki

yaratacak dereceye kadar arttıramadığından dolayı hücresel antioksidan savunma ve büyüme sistemlerini tetikleyerek hücre canlılığını arttırdığı düşünülmektedir.

Çizelge 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında H₂O₂ ile indüklenen sitotoksistede çeşitlilik (Othman and Yabe 2015)

Hücre hattı	H ₂ O ₂ konsantrasyonu	Muammele süresi (saat)	Hücre canlılığı	Referans
SH-SY5Y	1 mM	16	~15%	Ju <i>et al.</i> (2012)
	1 mM	16	~25%	Ruffels <i>et al.</i> (2004)
	750 µM	16	~80%	Ruffels <i>et al.</i> (2004)
	200 µM	24	~70%	Taki-Nakano <i>et al.</i> (2014)
	200 µM	24	~60%	Xiao <i>et al.</i> (2013)
	200 µM	24	~50%	Zhang <i>et al.</i> (2007)
	100 µM	24	~65%	Zhang <i>et al.</i> (2007)
	100 µM	24	~40%	Suematsu <i>et al.</i> (2011)

H₂O₂ varlığında kuersetinin hücre canlılığı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla belirlenen LD₅₀ (200 µM) değerindeki H₂O₂ varlığında SH-SY5Y hücreleri 10-100 µM konsantrasyon aralığında kuersetin ile ön muamele edildi. Analiz sonrası kuersetinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, tüm kuersetin konsantrasyonlarında 200 µM H₂O₂'e karşı nöroprotektif etki sağlandığı belirlendi. Bununla birlikte, 10 µM konsantrasyonunda (E_{max}) kuersetinin Xi *et al.* (2012); Chen *et al.* (2016a) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı en etkili nöroprotektif etkiye sahip olduğu görülmektedir. Kuersetinin düşük konsantrasyonda hücre canlılığı üzerinde yüksek koruyucu etki göstermesi, onun H₂O₂'yi güçlü bir şekilde detoksifiye etme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, elde ettiğimiz verilerle uyumlu olarak Cai *et al.* (1997); Franco *et al.* (2007); (Wagner *et al.* 2010) tarafından yapılan çalışmalarda kuersetinin, etkili bir H₂O₂ temizleyicisi olduğu bildirilmiştir.

H₂O₂ varlığında sodyum selenatın SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaç ile LD₅₀ (200 µM) değerindeki H₂O₂ varlığında SH-SY5Y hücreleri 10-100 µM konsantrasyon aralığında sodyum selenat ile ön muamele edildi. Canlılık testi sonunda sodyum selenatın hücre canlılığı üzerine etkileri

incelenecek olursa, 20 μM konsantrasyonda (E_{max}) sodyum selenatın 200 μM H_2O_2 'e karşı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde nöroprotektif etki gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte; 100, 80, 50, 40, 25 ve 10 μM sodyum selenat konsantrasyonlarının 200 μM H_2O_2 'e karşı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde nöroprotektif etki gösteremediği görülmektedir. Chen *et al.* (2014) tarafından Alzheimer hastalığı modeline sahip N2aSW nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada (0,01-100 μM) konsantrasyonlarında sodyum selenatın doza bağlı olarak hücre canlılığında istatistiksel olarak önemli bir oranda artış sağladığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda 20 μM sodyum selenatın 200 μM H_2O_2 varlığında hücre canlılığına sağladığı bu nöroprotektif etki Chen *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışma ile uyum sağlamaktadır. Ancak artan 10-100 μM sodyum selenat konsantrasyonlarından sadece 20 μM sodyum selenatın 200 μM H_2O_2 'e karşı nöroprotektif etki göstermesi farmakolojik olarak hücre sayısına göre optimum miktarda ilaç doz konsantrasyonu arası ilişki ile açıklanabilir. Ayrıca 20 μM sodyum selenatın H_2O_2 'ye karşı hücre canlılığı üzerine gösterdiği bu nöroprotektif etkinin biyokimyasal sebebinin ise Şekil 4.10'da görüldüğü gibi SH-SY5Y hücrelerinin hücre içi toplam antioksidan kapasitesini önemli bir şekilde arttırarak H_2O_2 'nin giderilmesini ve oksidatif hasara karşı direnç sağlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

H_2O_2 varlığında kuersetin ve sodyum selenat kombinasyonunun SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda LD_{50} (200 μM) değerindeki H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS) ile ön muamele edildi. WST-1 testi sonunda QSS'nin hücre canlılığı üzerine etkileri incelenecek olursa, QSS'nin kuersetin ve sodyum selenata göre sinerjistik olarak daha fazla nöroprotektif etki ve hücre canlılığında bir artış sağladığı görülmektedir. Nichols *et al.* (2015) primer kortikal nöron kültürlerinde yaptıkları çalışmada oksijen-glukoz yoksunluğuna bağlı oksidatif stres modeli üzerine epikateşin ve kuersetin kombinasyonunun oksidatif stres kaynaklı nöronal hücre ölümünü sinerjistik olarak azalttığını rapor etmişlerdir. Li *et al.* (2012) tarafından insan hepatosit (HepG2) hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada H_2O_2 varlığında sülfurafan ve selenyum kombinasyonunun TrxR-1 (tiyoredoksin redüktaz-1) aktivitesini arttırarak

H₂O₂ kaynaklı hücre ölümüne karşı sinerjistik koruma sağladığını ortaya koymuştur. Çalışmamızda 200 µM H₂O₂ varlığında QSS'nin hücre canlılığına sağladığı bu sinerjistik nöroprotektif etki Nichols *et al.* (2015); (Li *et al.* 2012) tarafından yapılan çalışmalar ile uyum sağlamaktadır. Kuersetin molekülünün güçlü antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri ve sodyum selenatın ise glutatyon peroksidaz ve Wnt/β-katenin sinyalizasyon yolağı aktivasyonu yoluyla H₂O₂ temizleyebilme, β-amiloid oluşumunu ve PP2A aktivasyonu ile nöronal apoptozisi baskılayabilme özellikleri literatürde bildirilmiştir. Bu nedenle hücre canlılığı üzerinde sinerjistik etkinin sebebi olarak QSS'nin burada da benzer etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

H₂O₂ yokluğunda kuersetin, sodyum selenat ve kombine ilacın SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı üzerine sitotoksik etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bu kapsamda H₂O₂ yokluğunda SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS) ile ön muamele edildi. WST-1 testi sonunda E_{max} değerlerindeki kuersetin, sodyum selenat ve ilaç kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkileri incelenecek olursa, 10 µM kuersetinin nöroprotektif etkisinin yanı sıra Xi *et al.* (2012); Jembrek *et al.* (2012b) tarafından yapılan çalışmalarla da uyumlu olarak SH-SY5Y hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Sodyum selenat grubunun sitotoksitesisi araştırıldığında Alturkmani *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada 100 µM sodyum selenatın insan mikrovasküler endotel hücreleri (HMEC-1) üzerinde, Corcoran *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada primer hipokampal kesit kültürleri üzerinde ve van Eersel *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada ise insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) üzerinde 10 nM'dan 100 µM'a kadar sodyum selenat konsantrasyonlarının toksik etkisinin olmadığı açıkça belirtilmiştir. Literatürdeki bu çalışmalar ile uyumlu olarak SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 20 µM sodyum selenata maruz bırakılmasının hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür. Kuersetin ve sodyum selenat içeren QSS grubu araştırıldığında QSS'nin SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı görülmektedir. QSS'nin SH-SY5Y hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermemesinin sebebi olarak; belirlenen dozlarda kuersetin ve sodyum selenatın kendi başlarına SH-SY5Y hücreleri üzerinde

sitotoksik etkilerinin olmamasından ve bu iki ilacın birbirleri ile farmakodinamik olarak antagonistik etki yaratacak bir şekilde değilde birbirlerinin farmakodinamik özelliklerini tamamlayıcı olarak uyumlu bir şekilde bir araya gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Oksijenli solunum yapan tüm canlılarda mitokondrinin fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi hücre için hayati önem taşımaktadır. Bu da hücresel metabolik süreçlerde mitokondrinin yapı, bütünlük ve fonksiyonunun korunması ile sağlanabilir. AD, PD, HD, ALS ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ortak patofizyoloji olarak görülmektedir. Bu nedenle tez kapsamında SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan H_2O_2 kaynaklı *in vitro* nörodejenerasyon modelinde Q, SS ve QSS'nin mitokondri fonksiyonu üzerine etkileri JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\psi_m$) değişim analizi ile incelenmiştir. Bu amaç ile LD_{50} (200 μM) değerindeki H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS) ile ön muamele edildi. Analiz sonunda SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde 200 μM H_2O_2 'nin kontrol grubuna göre mitokondriyal membran potansiyelini Zhang *et al.* (2007); Shi *et al.* (2009a); Wang *et al.* (2009a) tarafından yapılan çalışmalarla da uyumlu bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görülmektedir. Oksidatif stres altında hücrede reaktif oksijen türlerinin ve lipid peroksidasyonunun artması mitokondrinin çift zarlı membran yapısının bozulmasına ve dolayısıyla da mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına ve mitokondri fonksiyon bozukluğuna yol açtığı literatürde birçok çalışmada belirtilmektedir. Şekil 4.11 ve 4.12'de gösterildiği gibi SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 muamelesi sonrası ROS ve LPO seviyelerindeki artış Şekil 4.6'da gösterildiği gibi membran potansiyelindeki azalmayı doğrular niteliktedir. Ayrıca kuersetin, sodyum selenat ve ilaç kombinasyonunun SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde mitokondri üzerindeki etkileri incelendiğinde, 10 μM kuersetinin H_2O_2 grubuna göre mitokondriyal membran potansiyelini Sajad *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı ve mitokondriyal fonksiyonları koruduğu görülmektedir. Kumari *et*

al. (2012) tarafından fare hipokampal HT22 hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada glutamat toksisitesi sonucu oluşan mitokondriyal hiperpolarizasyona karşı selenyumun koruyucu etki gösterdiği ve glutamat toksisitesi kaynaklı nörodejeneratif HT22 hücre hattına göre mitokondriyal membran potansiyelini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı bildirilmiştir. Selenyum içeren sodyum selenatın mitokondri fonksiyonu üzerindeki etkileri araştırıldığında, 20 μ M sodyum selenatın H_2O_2 grubuna göre mitokondriyal membran potansiyelini Kumari *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışma ile benzer bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı ve mitokondriyal fonksiyonları koruduğu görülmektedir. Kuersetin ve sodyum selenat içeren ilaç kombinasyonunun mitokondri fonksiyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, ilaç kombinasyonu H_2O_2 grubuna göre mitokondriyal membran potansiyelini Nichols *et al.* (2015) tarafından epikateşin ve kuersetin kombinasyonu ile yapılan çalışmayla benzer bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir. Çalışmada kuersetin ve ilaç kombinasyonunun mitokondri üzerindeki protektif etkileri ve mitokondriyal membran potansiyellerini etkili bir şekilde arttırmasının sebebi; her iki ilacında Şekil 4.11 ve 4.12’de gösterildiği gibi ROS üretimini ve LPO oluşumunu etkili bir şekilde baskılayabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca sodyum selenatın Şekil 4.11’de gösterildiği gibi ROS üretimi üzerinde baskılayıcı bir etkisi görülmez iken Şekil 4.12’de gösterildiği gibi LPO oluşumunu etkili bir şekilde baskılayabildiği görülmektedir. Elde edilen bu veri ile sodyum selenatın çift zarlı mitokondrinin, oksidatif strese karşı mitokondriyal lipidlerinin bozulmalarını etkili bir şekilde engelleyerek mitokondrinin yapı, bütünlük ve fonksiyonlarını koruduğu ve bu şekilde mitokondriyal membran potansiyelini arttırabildiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, kuersetin, sodyum selenat ve ilaç kombinasyonunun SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ’nin dejeneratif gücüne karşı mitokondrinin yapı ve fonksiyonunu açıkça koruduğu ve nöroproteksiyona katkıda bulunduğu Şekil 4.5’de görülmektedir. Kombine ilaç (QSS) ile bileşenlerinin (Q ve SS) mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki protektif etkileri kıyaslandığında; QSS> Q> SS şeklinde olduğu ve QSS’nin mitokondri fonksiyonu üzerinde sinerjistik protektif etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Oksidatif stresin neden olduğu nöronal ölüm, oksidatif hasarın şiddetine bağlı olarak geniş ölçüde nekrotik ve apoptotik olarak sınıflandırılabilir (Chandra *et al.* 2000; Valencia and Morán 2004; Fatokun *et al.* 2007). Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde nöronların apoptoz ve nekroz durumuna karşı kuersetin, sodyum selenat ve ilaç kombinasyonunun etkileri araştırıldı. İlk olarak H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde 200 μM H_2O_2 'nin kontrol grubuna göre apoptotik ve nekrotik hücre miktarları üzerindeki etkileri incelendiğinde, H_2O_2 'nin Ismail *et al.* (2012); Jembrek *et al.* (2012b) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu olarak apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi. 200 μM H_2O_2 varlığında 10 μM kuersetin ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde kuersetinin H_2O_2 grubuna göre Jembrek *et al.* (2012b) tarafından yapılan çalışmaya uygun olarak apoptotik hücre miktarlarını bir miktar arttırdığı ancak nekrotik hücre miktarlarını önemli derecede azalttığı görülmektedir. 200 μM H_2O_2 varlığında 20 μM sodyum selenat ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde sodyum selenatın H_2O_2 grubuna göre Schwarz and Foltz (1989) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bir şekilde apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarını anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi. Kombine ilacın SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde apoptotik ve nekrotik hücre miktarları üzerindeki etkisi incelendiğinde, kombine ilacın H_2O_2 grubuna göre Anderson *et al.* (1985); Saunders *et al.* (1987) tarafından yapılan çalışmalar ile benzer şekilde apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarını azalttığı görülmektedir. Nekroz, esas olarak ciddi toksik indirgemeler veya fiziksel hasar ile başlar. Nekrotik hücreler tipik olarak hacmi artırır, membran bütünlüğünü kaybeder ve sitoplazmik içerikleri serbest bırakır. Programlanmış bir hücre ölümü tipi olan apoptoz kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, hücre büzülmesi ve kaspaz olarak anılan proteazların aktivasyonu ile apoptotik gövde oluşumu da dahil olmak üzere, morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterizedir (Kauppinen 2007; Wang *et al.* 2009b). Armstrong *et al.* (2018) pankreatik hücrelerde H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarda (1-10 μM) hücre apoptozunu teşvik ettiğini fakat daha yüksek (0.5-1 mM) H_2O_2 seviyelerinin apoptotik hücre ölümünü, nekroza çevirdiğini bildirmişlerdir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde H_2O_2 , kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinden (Q ve SS) elde edilen veriler

incelendiğinde Armstrong *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada da bildirildiği gibi hücrelerin apoptozdan daha çok nekroz yoluyla canlılıklarını yitirdiği görülmektedir. Bununla birlikte literatürde apoptotik hücre ölümünün, iki olası mekanizma ile oksidatif stres sırasında nekroza çevrilebileceğinden bahsedilmektedir. İlk olarak, Samali *et al.* (1999); Melino *et al.* (1997) oksidatif stres nedeniyle kaspazların inaktive edilmesi suretiyle, hücrelerin nekroz benzeri hücre ölümüne yol açabileceğini bildirmişlerdir. Leist *et al.* (1999); Tsujimoto *et al.* (1997) ise apoptozu nekroza çevirebilen ikinci bir mekanizmanın oksidanlar tarafından mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ve enerji üretiminin başarısızlığından dolayı hücresel ATP seviyelerinde bir düşüş olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde Şekil 4.11 ve Şekil 4.6 daki H_2O_2 grubu incelendiğinde; H_2O_2 'nin kontrol grubuna göre ROS oluşumunu önemli bir şekilde arttırması ve mitokondriyal membran potansiyelini önemli bir derecede azaltması hücrelerin neden nekroz yoluyla canlılıklarını yitirdiğini açıklayabilmektedir. SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde Şekil 4.11 ve Şekil 4.6 daki kuersetin, sodyum selenat ve ilaç kombinasyon grupları incelendiğinde; kuersetin ve ilaç kombinasyon gruplarının H_2O_2 grubuna göre ROS oluşumunu önemli bir şekilde baskılayabilmesi ve mitokondriyal membran potansiyelini önemli bir derecede arttırabilmesinden dolayı her iki ilacın etkili bir şekilde nekrotik hücre ölümüne karşı nöroprotektif etki gösterebildiği düşünülmektedir. Ayrıca sodyum selenatın nekrotik hücre ölümüne karşı nöroprotektif etkisi; Şekil 4.6'da görüldüğü gibi sodyum selenatın mitokondriyal membran potansiyelini etkili bir şekilde arttırabilmesinden kaynaklandığı sonucuna varılabilir. Bununla birlikte Şekil 4.8'de kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinden (Q ve SS) elde edilen veriler kıyaslandığında ise kombine ilacın H_2O_2 kaynaklı nöronal apoptoz ve nekrozu sinerjistik bir şekilde azalttığı görülmektedir.

Hücreler, ROS'un neden olduğu hasarı önlemek veya onarmak ve ayrıca redoks'a duyarlı sinyal yollarını düzenlemek için esas olarak üç ana antioksidan enzim; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx)'dan oluşan kendi antioksidan savunma sistemine sahiptirler. Halliwell (1992) tarafından yapılan

çalışmada beyinde katalaz aktivitesinin zayıf olduğu ve beyinin az bir miktarda süperoksit dismutaz (SOD) ve GPx'e sahip olduğu bildirmiştir. SOD'lar $O_2^{\cdot-}$ 'yi O_2 'ye ve H_2O_2 'ye; CAT ve GPx'lar ise H_2O_2 'i suya dönüştürür. Dolayısıyla, H_2O_2 ile muamele edilmiş hücrelerde antioksidan savunma sistemi olarak H_2O_2 'ye karşı SOD enziminden ziyade CAT ve GPx enzimleri en etkili rolü oynamaktadırlar (Weydert and Cullen 2010; Tian *et al.* 2015). Bununla birlikte, H_2O_2 ile muamele edilmiş hücrelerde H_2O_2 antioksidan savunma sistemi ile ROS üretimi arasında ROS artışı ve hücreSEL bozulmaya yol açan bir dengesizliğe neden olmaktadır. CAT, SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin ROS'a karşı birincil savunma sağladığı ve bu enzimlerin aktivitelerinin ROS kaynaklı oksidatif stres altında azaldığı bildirilmektedir (Tian *et al.* 2015).

H_2O_2 varlığında kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS)'nun SH-SY5Y hücrelerinde hücre içi katalaz enzimi aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaç ile LD_{50} (200 μM) değerindeki H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS ile ön muamele edildi. Analiz sonunda SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde 200 μM H_2O_2 'in kontrol grubuna göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görülmektedir. 200 μM H_2O_2 varlığında sırasıyla; 10 μM Q ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde Q'nun H_2O_2 grubuna göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı, 20 μM SS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde SS'nin H_2O_2 grubuna göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesinde istatistiksel olarak herhangi bir etkiye bulunamadığı, E_{max} değerlerindeki QSS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde QSS'nin H_2O_2 grubuna göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir. Elde edilen bu verilerden 200 μM H_2O_2 'nin kontrol grubuna göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltması Guizani *et al.* (2011); Tsai *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışma ile uyum sağlamaktadır. Ayrıca 200 μM H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücrelerinde CAT enzim aktivitesindeki azalmanın Şekil 4.11'de görüldüğü gibi yüksek oranda ROS artışından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kuersetinin 200 μM H_2O_2 varlığında SH-SY5Y

hücrelerinde H_2O_2 grubuna göre CAT enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırması Sajad *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışma ile uyum sağlamaktadır. Bununla birlikte Alrawaiq and Abdullah (2014) kuersetinin güçlü bir H_2O_2 temizleyicisi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Şekil 4.9'da görüldüğü gibi kuersetinin SH-SY5Y hücrelerinde katalaz enzimi aktivitesini arttırırken Şekil 4.11'de görüldüğü gibi oksidatif stresi baskılayarak hücre içi ROS'u benzer miktarda azalttığı görülmektedir ve bu durum sonuçların birbirlerini doğruladığını göstermektedir. Beynin katalaz aktivitesince zayıf olduğu (Halliwell 1992) dikkate alındığında, sodyum selenatın 200 μM H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 grubuna göre CAT enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etki gösterememesi ancak Şekil 4.12'de görüldüğü gibi LPO oluşumunu önemli bir şekilde azaltması selenyum içeren sodyum selenatın nöronal sistemde bulunan GPx gibi başka bir antioksidan enzim üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. 200 μM H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 grubuna göre QSS, CAT enzim aktivitesini Yanardag *et al.* (2007) tarafından yapılan C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat kombinasyonu çalışmasına benzer bir şekilde arttırdığı görülmektedir. Kombine ilaç içeren SH-SY5Y grubu kuersetin ve sodyum selenat içeren SH-SY5Y grupları ile kıyaslandığında QSS'nin Q ve SS'ye göre istatistiksel olarak benzer katalaz aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Bunun sebebi olarak kombine ilaç bileşenlerinden sodyum selenatın CAT aktivitesi üzerinde çok fazla etkili olamaması ancak kuersetin ile bir araya gelince hücre içi CAT aktivitesini kuersetine göre az miktar da olsa arttırabildiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

H_2O_2 varlığında kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS)'nin SH-SY5Y hücrelerinde hücre içi toplam antioksidan aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaç ile LD_{50} (200 μM) değerindeki H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS ile ön muamele edildi. Analiz sonunda SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde 200 μM H_2O_2 'nin kontrol grubuna göre hücre içi toplam antioksidan aktivitesini Guizani *et al.* (2011); Tsai *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmalar ile benzer şekilde önemli derecede azalttığı görülmektedir. 200 μM H_2O_2 varlığında 10 μM Q ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde kuersetinin H_2O_2 grubuna göre Robaszkiewicz

et al. (2007) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bir şekilde hücre içi toplam antioksidan aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir. Liu *et al.* (2018) tarafından tavuk pankreasında oksidatif strese karşı selenyumun koruyucu etkileri üzerine yapılan çalışmada selenyumun toplam antioksidan kapasiteyi önemli derecede arttırdığını göstermişlerdir. 200 μM H_2O_2 varlığında selenyum ihtiva eden 20 μM SS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde SS'nin H_2O_2 grubuna göre hücre içi toplam antioksidan aktivitesini Liu *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bir şekilde önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir. 200 μM H_2O_2 varlığında E_{max} değerlerindeki QSS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde QSS'nin H_2O_2 grubuna göre Yanardag *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışma ile benzer bir şekilde hücre içi toplam antioksidan aktivitesini istatistiksel olarak çok anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir. Beyinde nöronlar ve glialar tarafından katalaz ve GPx olmak üzere iki ana H_2O_2 indirgeyici enzim bulunmaktadır (Damier *et al.* 1993; Desagher *et al.* 1996). Kuersetin, peroksidaz varlığında singlet oksijen radikaliyle reaksiyona girerek H_2O_2 oluşturur ve ortamdaki glutasyonu indirmek suretiyle GPx ve antioksidan aktivitede artış sağlar (Ademosun *et al.* 2016; Robaszkiewicz *et al.* 2007). Kuersetin ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde Şekil 4.9'da görüldüğü gibi kuersetinin H_2O_2 grubu hücrelerine göre hücre içi katalaz aktivitesini anlamlı bir derecede arttırdığı, bununla birlikte hücre içi toplam antioksidan kapasitede çok daha fazla anlamlı bir derecede artış sağladığı (Şekil 4.10) görülmektedir. Hücre içi toplam antioksidan kapasitedeki bu artışın sebebi olarak artan katalaz aktivitesinin yanı sıra Ademosun *et al.* (2016); Robaszkiewicz *et al.* (2007) çalışmalarında bildirildiği gibi kuersetinin GPx aktivitesini de belirli bir dereceye kadar arttırdığı düşünülebilir. Solovyev (2015) selenyum (Se), memeli GPx'inin aktif bölgesinin bir bileşeni olduğunu ve GPx enziminin aktivitesini arttırdığını bildirmiştir. Sodyum selenat ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde Şekil 4.9'da görüldüğü gibi sodyum selenatın H_2O_2 grubu hücrelerine göre hücre içi katalaz aktivitesinde olumlu yönde bir değişiklik sağlayamaz iken hücre içi toplam antioksidan kapasitesini çok daha fazla anlamlı bir derecede arttırdığı (Şekil 4.10) görülmektedir. Bunun sebebi olarak selenyum ihtiva eden sodyum selenatın nöronal hücrelerde bir diğer ana antioksidan enzim olan GPx enziminin aktivitesini yüksek oranda arttırmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kuersetin ve sodyum selenat içeren kombine ilaç

grubu kuersetin, sodyum selenat ve H_2O_2 gruplarına göre kıyaslandığında kombine ilacın $200 \mu M H_2O_2$ 'ye göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesini ve toplam antioksidan kapasiteyi anlamlı bir derecede arttırdığı tespit edilmiştir. Kombine ilaç içeren hücre grubu kuersetin içeren hücre grubu ile kıyaslandığında kombine ilacın kuersetine göre istatistiksel olarak benzer katalaz aktiviteye sahip olduğu gözlemlenirken, toplam antioksidan kapasitede kuersetine göre istatistiksel olarak çok daha fazla toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte kombine ilaç içeren hücre grubu sodyum selenat içeren hücre grubu ile kıyaslandığında kombine ilacın sodyum selenata göre istatistiksel olarak benzer hücre içi katalaz aktivite ve toplam antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmektedir. Kombine ilacın kuersetin ve sodyum selenata göre hücre içi katalaz enzimi aktivitesi ve toplam antioksidan kapasite açısından bu göreceli ilişkisinin sebebi olarak, kombine ilaç içeriğindeki kuersetin ve sodyum selenat molekülünün GPx enzim aktivesini yüksek oranda arttırmasından kaynaklanabileceği varsayılmaktadır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen ROS, LPO ve hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit analizleri hücrel oksidatif stres belirteçleri olarak değerlendirildi. Çalışma kapsamında SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 varlığında, kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS)'nin reaktif oksijen türleri (ROS) üzerine etkileri araştırıldı. İlk olarak LD_{50} ($200 \mu M$) değerindeki H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS ile ön muamele edildi. Analiz sonunda SH-SY5Y hücrelerinde $200 \mu M H_2O_2$ ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde $200 \mu M H_2O_2$ 'nin kontrol grubuna göre Jiménez-Aliaga *et al.* (2011); Tian *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmalarla benzer şekilde hücre içi ROS miktarını hızlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir. $200 \mu M H_2O_2$ varlığında $10 \mu M$ Q ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde kuersetinin H_2O_2 grubuna göre yine Jiménez-Aliaga *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu olarak hücre içi ROS oluşumunu anlamlı bir şekilde baskıladığı görülmektedir. $200 \mu M H_2O_2$ varlığında $20 \mu M$ SS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde SS'nin H_2O_2 grubuna göre hücre içi ROS oluşumunu baskılayamadığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturamadığı görülmektedir. Liu *et al.* (2007) tarafından nöronal PC12 hücreleri üzerinde yapılan çalışmada

picroside II ve NGF (sinir büyüme faktörü) kombinasyonunun H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif strese karşı sinerjistik nöroprotektif etki gösterdiği ve ROS oluşumunu sinerjistik bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. 200 μM H_2O_2 varlığında E_{max} değerlerindeki QSS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde QSS'nin H_2O_2 grubuna göre hücre içi ROS oluşumunu Liu *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışma ile benzer bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı derecede baskılayarak azalttığı görülmektedir. Suski *et al.* (2012) hidrojen peroksitin oksidan doğasından dolayı mitokondriyal membran potansiyelinde ve mitokondri fonksiyonunda azalmaya neden olarak H_2O_2 'nin aşırı ROS üretimine katkı sağlayacağını ifade etmişlerdir. 200 μM H_2O_2 varlığında H_2O_2 grubunda SH-SY5Y hücrelerinde aşırı ROS artışının sebebi olarak Şekil 4.6'da görüldüğü gibi mitokondriyal membran potansiyelinin ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi SH-SY5Y hücrelerinin toplam antioksidan aktivitelerinin hızlı bir şekilde azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada kuersetin ve ilaç kombinasyonunun hücre içi ROS oluşumu üzerindeki protektif etkileri ve hücre içi ROS oluşumunu etkili bir şekilde azaltmasının sebebi; her iki ilacında Şekil 4.6'da görüldüğü gibi mitokondri üzerinde protektif etkiler göstererek mitokondriyal membran potansiyellerini ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi SH-SY5Y hücrelerinin toplam antioksidan (SOD, CAT ve GPx) kapasitelerini önemli ölçüde arttırabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca sodyum selenatın Şekil 4.9'da gösterildiği gibi katalaz enzimi aktivitesi üzerinde arttırıcı ve Şekil 4.11'de gösterildiği ROS üretimi üzerinde baskılayıcı bir etkisi görülmez iken; ilginç bir şekilde SH-SY5Y hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyellerini etkili bir şekilde arttırabildiği (Şekil 4.6), LPO oluşumunu ise etkin bir şekilde azaltabildiği (Şekil 4.12) görülmektedir. Elde edilen bu veriler ile sodyum selenatın nöronal hücrelerde antioksidan ana savunma (SOD, CAT ve GPx) sistemlerinden GPx aktivitesi yoluyla ortamda var olan H_2O_2 'i suya (H_2O) dönüştürür iken, SOD aktivitesi üzerinde etkili olamayarak oksidatif stres şartlarında $O_2^{\bullet -}$ 'yi O_2 'e ve H_2O_2 'ye dönüştürememesinden dolayı hücre içi ROS oluşumunu baskılayamadığı düşünülmektedir.

H_2O_2 varlığında kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonu (QSS)'nin SH-SY5Y hücrelerinde lipid peroksidasyonu (LPO) oluşumu üzerindeki etkileri

incelenmiştir. Bu amaç ile LD₅₀ (200 µM) değerindeki H₂O₂ varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS ile ön muamele edildi. Analiz sonunda SH-SY5Y hücrelerinde 200 µM H₂O₂ ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde 200 µM H₂O₂'nin kontrol grubuna göre LPO oluşumunu Haq and AlAmro (2019); Chen *et al.* (2016b) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu bir şekilde önemli miktarda arttırdığı görülmektedir. 200 µM H₂O₂ varlığında 10 µM Q ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde kuersetinin H₂O₂ grubuna göre LPO oluşumunu Haq and AlAmro (2019); Chen *et al.* (2016b) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı miktarda baskıladığı görülmektedir. Zheng *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada Alzheimer hastalığının üçlü transgenik fare modelinde sodyum selenat takviyesinin 3xTg-AD farelerinin serebral dokularında malondialdehit (MDA) seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. 200 µM H₂O₂ varlığında 20 µM SS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde SS'nin H₂O₂ grubuna göre Zheng *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bir şekilde lipid peroksidasyonu seviyesini anlamlı bir şekilde baskıladığı görülmektedir. Yanardag *et al.* (2007) tarafından ratlarda yapılan çalışmada etanol kaynaklı oksidatif stres vasıtasıyla organ hasarı üzerine C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat içeren ilaç kombinasyonunun koruyucu etkisi araştırılmıştır. Karaciğer ve bağırsak dokularında etanol grubundaki LPO seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlenirken, C vitamini, E vitamini ve sodyum selenat içeren ilaç kombinasyonu muamelesinin etanol grubunda LPO seviyelerini belirgin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. Çalışmamız kapsamında 200 µM H₂O₂ varlığında E_{max} değerlerindeki QSS ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde QSS'nin H₂O₂ grubuna göre Yanardag *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışma ile benzer şekilde lipid peroksidasyonu seviyesini anlamlı bir derecede azalttığı tespit edilmiştir. 200 µM H₂O₂ varlığında H₂O₂ grubunda SH-SY5Y hücrelerinde aşırı LPO artışının sebebi olarak Şekil 4.11'de görüldüğü gibi H₂O₂ grubunda aşırı hücre içi ROS artışı ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi hücre içi toplam antioksidan aktivitenin önemli ölçüde azalmasından kaynaklandığı varsayılmaktadır. Çalışmada kuersetin ve ilaç kombinasyonunun SH-SY5Y hücrelerinde LPO oluşumunu etkili bir şekilde azaltmasının sebebi; her iki ilacında Şekil 4.11'de görüldüğü gibi H₂O₂ grubunda hücre içi ROS üretimini istatistiksel olarak anlamlı bir miktarda azaltabilmesi ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi SH-SY5Y hücrelerinin hücre içi toplam antioksidan

aktivitelerini yüksek oranda arttırabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca sodyum selenatın Şekil 4.11’de gösterildiği ROS üretimi üzerinde baskılayıcı bir etkisi görülmez iken Şekil 4.10’da SH-SY5Y hücrelerinin hücre içi toplam antioksidan aktivitesi üzerinde önemli derecede arttırıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla daha öncede belirtildiği gibi sodyum selenatın GPx aktivitesini önemli ölçüde arttırması vasıtasıyla ortamda var olan H_2O_2 ’i suya dönüştürmesinden dolayı LPO oluşumunu önemli ölçüde azaltabildiği düşünülmektedir. Bununla birlikte SH-SY5Y hücre hattında kombine ilacın (QSS) bileşenlerine (Q ve SS) kıyasla lipid peroksidasyonunu sinerjistik bir şekilde daha fazla baskılayabildiği görülmektedir.

Çalışmamızda son oksidatif stres belirteci olarak SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde kuersetin (Q), sodyum selenat (SS) ve ilaç kombinasyonunun (QSS) hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için LD_{50} (200 μM) değerindeki H_2O_2 varlığında SH-SY5Y hücreleri E_{max} değerlerindeki Q, SS ve QSS ile ön muamele edildi. Analiz sonunda SH-SY5Y hücrelerinde 200 μM H_2O_2 ile oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde 200 μM H_2O_2 ’nin kontrol grubuna göre $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesi üzerindeki etkileri incelendiğinde, Tong *et al.* (2005); Ashabi *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak H_2O_2 ’nin hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesini önemli bir miktarda arttırdığı gözlemlendi. Ono *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmada kuersetinin $A\beta_{(1-40)}$ ve $A\beta_{(1-42)}$ peptitleri oluşumlarını ve $A\beta$ fibrilizasyonunu engellediği bildirilmiştir. 200 μM H_2O_2 varlığında 10 μM kuersetin ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde kuersetinin H_2O_2 grubuna göre Ono *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmaya uygun olarak hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit oluşumunu anlamlı bir miktarda baskıladığı görülmektedir. 200 μM H_2O_2 varlığında 20 μM sodyum selenat ile ön muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde sodyum selenatın H_2O_2 grubuna göre Jin *et al.* (2017) ve Chen *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bir şekilde hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit oluşumunu anlamlı bir miktarda azalttığı görülmektedir. Giunta *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada APP genini aşırı ifade eden transgenik Tg2576 farelerde balık yağı ve yeşil çay EGCG (Epigallocateşin gallat) kombinasyonunun $A\beta$ oluşumu ve $A\beta_{(1-42)}$ peptit miktarını ciddi bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Kombine ilacın SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile

oluşturulan *in vitro* nörodejenerasyon modelinde hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, kombine ilacın H_2O_2 grubuna göre Giunta *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada bildirildiği gibi hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit oluşumunu anlamlı bir miktarda azalttığı görülmektedir. APP (amiloid öncü proteini) nöronal hücrelerde hücre zarında bulunan transmembran bir proteindir. Oksidatif stres şartlarında BACE-1 (β -sekretaz enzimi-1) aktivitesi artar ve APP proteini BACE-1 ve γ -sekretaz enzimleri ile seri bir şekilde proteolitik kesilime uğrar ve 42 amino asit uzunluğundaki $A\beta_{(1-42)}$ peptidide içeren çeşitli amino asit uzunluklarında ($A\beta_{(1-40)}$, $A\beta_{(25-35)}$ vs.) beta amiloid peptidlerinin oluşumunu sağlar. $A\beta_{(1-42)}$, beta amiloid peptidleri arasında agregasyona en meyilli ve en nörotoksik olan beta amiloid formudur. Oksidatif stres şartlarında $A\beta_{(1-42)}$ peptit miktarının artması nöronal hücrelerde içinde bulunduğu stres durumuna ilaveten $A\beta_{(1-42)}$ peptidi tarafından da daha fazla oksidatif stres oluşturarak nöronal hücrelerde $A\beta_{(1-42)}$ peptit toksisitesine ve nöronal hücre ölümlerine yol açar (LaFerla and Green 2012). Jiménez-Aliaga *et al.* (2011) tarafından APPswe SH-SY5Y hücrelerinde yapılan çalışmada kuersetinin, BACE-1 (β -sekretaz enzimi-1) aktivitesini ve $A\beta$ fibrillerinin oluşumunu engellediği, $A\beta$ fibrillerinin ayrıştırıldığı ifade edilmiştir. Jin *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada ise mutant insan APPswe, tauP301L ve fare PS1M146V genlerini ifade eden üçlü transgenik (3xTg-AD) Alzheimer hastalığı fare modelinde sodyum selenatın APP seviyesini değiştirmedeği, ancak BACE1, sAPP β ve CTF β seviyelerini belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu sonuçlar ile birlikte sodyum selenatın AD faresinde $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesindeki artışı da engellediği rapor edilmiştir. 200 μM H_2O_2 varlığında H_2O_2 grubunda SH-SY5Y hücrelerinde hücre dışı aşırı $A\beta_{(1-42)}$ peptit artışının sebebi olarak çalışmamızın LPO basamağında da belirttiğimiz gibi yine H_2O_2 grubunda aşırı hücre içi ROS artışı (Şekil 4.11) ve hücre içi toplam antioksidan aktivitenin (Şekil 4.10) önemli ölçüde azalmasından ve literatürde de belirtildiği gibi BACE-1 enzimi aktivitesinin artmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmada kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) SH-SY5Y hücrelerinde hücre dışı $A\beta_{(1-42)}$ peptit üretimini önemli ölçüde azaltmasının sebebi; her üç ilacında Şekil 4.10'de görüldüğü gibi SH-SY5Y hücrelerinin hücre içi toplam antioksidan aktivitelerini yüksek oranda arttırması ve bu sayede SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresi ve Jiménez-Aliaga *et al.* (2011); Jin *et al.* (2017) tarafından da bildirildiği gibi BACE-1 enzimi aktivitesini önemli

ölçüde baskılayarak transmembran protein olan APP'nin amiloidojenik olmayan yolak üzerinden kesilmesini sağlayabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte kombine ilacın (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) birbirleri arasında $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesi üzerindeki etkileri kıyaslandığında her üç ilacında istatistiksel olarak benzer şekilde $A\beta_{(1-42)}$ peptit oluşumunu baskıladığı ve kontrol grubu ile aynı $A\beta_{(1-42)}$ peptit seviyesine kadar azalttıkları görülmektedir.

Sonuç olarak;

1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 muamelesi sonrası hücre içi CAT aktivitesi ile birlikte TAC'ın önemli seviyede azalması, bununla birlikte hücre içi ROS seviyesi, hücresel LPO seviyesi ve hücre dışı insan $A\beta_{(1-42)}$ peptidi konsantrasyonlarının önemli miktarda artması; H_2O_2 'nin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif strese yol açtığına göstergesidir.
2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde H_2O_2 muamelesi sonrası mitokondriyal membran potansiyelinin önemli seviyede azalması, apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarının önemli oranda artması ve bu patofizyolojik olaylara bağlı olarak hücre canlılığının büyük oranda azalması; SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile tetiklenen oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyonun gerçekleştiğinin göstergesidir.
3. SH-SY5Y hücrelerinde elde edilen oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı kombine ilaç (QSS) ve bileşenlerinin (Q ve SS) ön muamelesi sonucu;
 - a) QSS ve Q'nun hücre içi CAT aktivitelerini ve TAC'larını arttırdığı, SS'nin ise hücre içi CAT aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi görülmez iken hücre içi TAC'ı önemli miktarda arttırdığı tespit edilmiştir.
 - b) QSS ve Q'nun hücre içi ROS seviyelerini, hücresel LPO seviyelerini ve hücre dışı insan $A\beta_{(1-42)}$ peptidi konsantrasyonlarını önemli miktarda azalttığı belirlenmiştir. SS'nin ise hücre içi ROS seviyesi üzerine herhangi bir etkisi görülmez iken hücresel LPO seviyelerini ve hücre dışı insan $A\beta_{(1-42)}$ peptidi konsantrasyonlarını önemli miktarda azalttığı görülmüştür.

c) QSS, Q ve SS'nin mitokondriyal membran potansiyelini önemli seviyede arttırdığı, apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarını önemli oranda azalttığı ve hücresel canlılığın büyük oranda artmasını sağladığı belirlenmiştir.

4. QSS, Q ve SS'nin hücresel antioksidan savunmayı arttırarak oksidatif stresin etkin bir şekilde baskılayabildiği, baskılanan oksidatif stres ile birlikte mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmayı, apoptotik ve nekrotik hücre kayıplarını engelleyerek hücresel canlılığın artmasını sağladığı görülmektedir.

5. Ayrıca hücre canlılık, hücre içi antioksidan aktivite ve oksidatif stres testlerinden elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde; kombine ilacın (QSS), bileşenlerine (Q ve SS) göre SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyona karşı sinerjistik nöroprotektif etki gösterdiği görülmektedir.

6. Bu tez çalışmasının çok hedefli ilaçlar veya ilaç karışımları ile nörodejeneratif hastalıklara karşı gerçekleştirilecek sinerjistik nöroprotektivite çalışmalarına bir basamak oluşturabileceği, bununla birlikte sinerjistik etkisi sayesinde QSS'nin oksidatif stres ile ilişkili nörodejeneratif hastalıkların tedavisi veya önlenmesi için potansiyel bir terapötik ilaç adayı olabileceği ve böylece literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO. 2016. Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine* 21(4):NP11-NP7.
- Alrawaiq NS, Abdullah A. 2014. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. *International Journal of PharmTech Research* 6(3):933-41.
- Alturkmani HJ, Zgheib C, Zouein FA, Alshaaer NEF, Kurdi M, Booz GW. 2012. Selenate enhances STAT3 transcriptional activity in endothelial cells: Differential actions of selenate and selenite on LIF cytokine signaling and cell viability. *Journal of inorganic biochemistry* 109:9-15.
- Anand P, Singh B. 2013. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* 36(4):375-99.
- Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braugher JM, Hall ED, Means ED, Horrocks LA. 1985. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Central Nervous System Trauma* 2(4):257-67.
- Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA. 1993. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature genetics* 4(4):398.
- Armstrong JA, Cash NJ, Ouyang Y, Morton JC, Chvanov M, Latawiec D, Awais M, Tepikin AV, Sutton R, Criddle DN. 2018. Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift. *Journal of Biological Chemistry* 293(21):8032-47.
- Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antúnez K, Jones DP, Go Y-M, Liang Y-L, Dajas F. 2010. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology and Medicine* 49(5):738-47.
- Aseervatham GSB, Sivasudha T, Jeyadevi R, Ananth DA. 2013. Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans—an overview. *Environmental Science and Pollution Research* 20(7):4356-69.
- Ashabi G, Ahmadiani A, Abdi A, Abraki SB, Khodagholi F. 2013. Time course study of A β formation and neurite outgrowth disruption in differentiated human neuroblastoma cells exposed to H₂O₂: Protective role of autophagy. *Toxicology in Vitro* 27(6):1780-8.
- Association As. 2011. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 7(2):208.
- Association As. 2016. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 12(4):459-509.

- Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. 2010. The genetics of Parkinson disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 23(4):228-42.
- Berg D, Youdim MBH, Riederer P. 2004. Redox imbalance. *Cell and Tissue Research* 318(1):201-13.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5(1):9.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy* 9:91.
- Bolognesi ML, Matera R, Minarini A, Rosini M, Melchiorre C. 2009. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Current opinion in chemical biology* 13(3):303-8.
- Bouktaib M, Atmani A, Rolando C. 2002. Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O- β -d-glucuronide. *Tetrahedron Letters* 43(35):6263-6.
- Bunton-Stasyshyn RKA, Saccon RA, Fratta P, Fisher EMC. 2015. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *The Neuroscientist* 21(5):519-29.
- Butterfield DA. 2014. The 2013 SFRBM discovery award: selected discoveries from the butterfield laboratory of oxidative stress and its sequela in brain in cognitive disorders exemplified by Alzheimer disease and chemotherapy induced cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine* 74:157-74.
- Cai Q, Rahn RO, Zhang R. 1997. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer letters* 119(1):99-107.
- Cenini G, Lloret A, Cascella R. 2019. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3-4):323-33.
- Chen J, Deng X, Liu N, Li M, Liu B, Fu Q, Qu R, Ma S. 2016a. Quercetin attenuates tau hyperphosphorylation and improves cognitive disorder via suppression of ER stress in a manner dependent on AMPK pathway. *Journal of functional foods* 22:463-76.
- Chen L, Sun L, Liu Z, Wang H, Xu C. 2016b. Protection afforded by quercetin against H₂O₂-induced apoptosis on PC12 cells via activating PI3K/Akt signal pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 36(1):98-102.
- Chen P, Wang L, Wang Y, Li S, Shen L, Liu Q, Ni J. 2014. Phosphoproteomic profiling of selenate-treated Alzheimer's disease model cells. *PLoS One* 9(12):e113307.
- Cheng B, Lu H, Bai B, Chen J. 2013. d- β -Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H₂O₂ via inhibiting oxidative stress. *Neurochem Int* 62(5):620-5.
- Cookson MR. 2012. Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(9):a009415-a.
- Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, Nguyen T, Nheu L, Sundstrom LE, Costello AJ, Hovens CM. 2010. Sodium selenate specifically activates

- PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci* 17(8):1025-33.
- Costa LG, de Laat R, Dao K, Pellacani C, Cole TB, Furlong CE. 2014. Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection. *NeuroToxicology* 43:3-9.
- Costa LG, Garrick JM, Roqu, #xe8, PJ, Pellacani C. 2016. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:10.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. 2006. Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127(1):59-69.
- D'amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L. 2011. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 14(1):69.
- D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. 2013. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 65:509-27.
- Damier P, Hirsch E, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52(1):1-6.
- de Boer VCJ, de Goffau MC, Arts ICW, Hollman PCH, Keijer J. 2006. SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mechanisms of Ageing and Development* 127(7):618-27.
- Desagher S, Glowinski J, Premont J. 1996. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16(8):2553-62.
- Dias V, Junn E, Mouradian MM. 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease* 3(4):461-91.
- Dumont M, Beal MF. 2011. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free radical biology and medicine* 51(5):1014-26.
- Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, Dajas F. 2010. Pretreatment with Natural Flavones and Neuronal Cell Survival after Oxidative Stress: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(4):2111-5.
- Esposito Z, Belli L, Toniolo S, Sancesario G, Bianconi C, Martorana A. 2013. Amyloid β , Glutamate, Excitotoxicity in Alzheimer's Disease: Are We on the Right Track? *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19(8):549-55.
- Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. 2007. Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide *in vitro*: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. *Brain Res* 1132:193-202.
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CM. 2008. The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiology of disease* 30(3):331-42.
- Fisher ER, Hayden MR. 2014. Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. *Movement Disord* 29(1):105-14.
- Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG. 2007. Mercurial-induced hydrogen peroxide

- generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chemical research in toxicology* 20(12):1919-26.
- Gangemi S, Gofita E, Costa C, Teodoro M, Briguglio G, Nikitovic D, Tzanakakis G, Tsatsakis AM, Wilks MF, Spandidos DA. 2016. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases. *International journal of molecular medicine* 38(4):1012-20.
- Ganguly G, Chakrabarti S, Chatterjee U, Saso L. 2017. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug design, development and therapy* 11:797.
- Giraldo E, Lloret A, Fuchsberger T, Viña J. 2014. A β and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E. *Redox biology* 2:873-7.
- Giunta B, Hou H, Zhu Y, Salemi J, Ruscin A, Shytle RD, Tan J. 2010. Fish oil enhances anti-amyloidogenic properties of green tea EGCG in Tg2576 mice. *Neurosci Lett* 471(3):134-8.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. 2010. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* 140(6):918-34.
- Guizani N, Waly MI, Ali A, Al-Saidi G, Singh V, Bhatt N, Rahman MS. 2011. Papaya epicarp extract protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuronal cells. *Experimental Biology and Medicine* 236(10):1205-10.
- Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. 2018. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease. *International journal of molecular medicine* 41(4):1817-25.
- Gutzke M, Fox D, Ciereszko L, Wender S. 1957. Notes - Synthesis of Quercetin-2-C14. *The Journal of Organic Chemistry* 22(10):1271-2.
- Gülden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. 2010. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine* 49(8):1298-305.
- Haddadi M, Jahromi SR, Sagar BC, Patil RK, Shivanandappa T, Ramesh S. 2014. Brain aging, memory impairment and oxidative stress: a study in *Drosophila melanogaster*. *Behav Brain Res* 259:60-9.
- Hakonen AH, Goffart S, Marjavaara S, Paetau A, Cooper H, Mattila K, Lampinen M, Sajantila A, Lönnqvist T, Spelbrink JN. 2008. Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion. *Human molecular genetics* 17(23):3822-35.
- Haleagrahara N, Siew CJ, Mitra NK, Kumari M. 2011. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neurosci Lett* 500(2):139-43.
- Halliwell B. 1992. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *J Neurochem* 59(5):1609-23.
- Halliwell B. 2006a. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97(6):1634-58.
- Halliwell B. 2006b. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2):312-22.

- Hamer M, Chida Y. 2009. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychological medicine* 39(1):3-11.
- Haq SH, AlAmro AA. 2019. Neuroprotective effect of quercetin in murine cortical brain tissue cultures. *Clinical Nutrition Experimental* 23:89-96.
- Harborne JB. 1988. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Plant flavanoids in biology and medicine II* 17.
- He F, Zuo L. 2015. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16(11):27770-80.
- Hendriks JJA, de Vries HE, van der Pol SMA, van den Berg TK, van Tol EAF, Dijkstra CD. 2003. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology* 65(5):877-85.
- Hollman PCH, Katan MB. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 51(8):305-10.
- Hovens CM, Ittner LM, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, Nguyen A, Costello AJ, Gotz J, Corcoran NM. 2010. Sodium selenate specifically boosts PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits and prevents neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease models. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 6(4):S577.
- Huang WJ, Zhang X, Chen WW. 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports* 4(5):519-22.
- Hwang O. 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental neurobiology* 22(1):11-7.
- Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. 2015. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical epidemiology* 7:181.
- Islam MR, Zaman A, Jahan I, Chakravorty R, Chakraborty S. 2013. In silico QSAR analysis of quercetin reveals its potential as therapeutic drug for Alzheimer's disease. *Journal of Young Pharmacists* 5(4):173-9.
- Ismail N, Ismail M, Farhana Fathy S, Asma Musa SN, Umar Imam M, Foo JB, Iqbal S. 2012. Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice against Hydrogen Peroxide Induced Cell Death in Human SH-SY5Y Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 13(8):9692-708.
- Jembrek MJ, Gašparović AČ, Vuković L, Vlaineć J, Žarković N, Oršolić N. 2012a. Quercetin supplementation: insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 385(12):1185-97.
- Jembrek MJ, Vuković L, Puhović J, Erhardt J, Oršolić N. 2012b. Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *J Mol Neurosci* 47(2):286-99.
- Jiang L, Kundu S, Lederman James D, López-Hernández Gretchen Y, Ballinger Elizabeth C, Wang S, Talmage David A, Role Lorna W. 2016. Cholinergic Signaling Controls Conditioned Fear Behaviors and Enhances Plasticity of Cortical-Amygdala Circuits. *Neuron* 90(5):1057-70.
- Jiménez-Aliaga K, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Martín-Aragón S. 2011. Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects *in vitro* and potent antioxidant activity in APP^{swe} cells. *Life Sci* 89(25-26):939-45.
- Jin N, Zhu H, Liang X, Huang W, Xie Q, Xiao P, Ni J, Liu Q. 2017. Sodium selenate activated Wnt/ β -catenin signaling and repressed amyloid- β formation in a triple

- transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 297:36-49.
- Ju H-Y, Chen SC, Wu K-J, Kuo H-C, Hseu Y-C, Ching H, Wu C-R. 2012. Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology* 50(3-4):492-502.
- Jyotsna P, Iswar B, Kumar SA, Ruma D, Dipti P, Bala SS. 2013. Quercetin Reverses Hypobaric Hypoxia-Induced Hippocampal Neurodegeneration and Improves Memory Function in the Rat. *High Altitude Medicine & Biology* 14(4):383-94.
- Kauppinen TM. 2007. Multiple roles for poly (ADP-ribose) polymerase-1 in neurological disease. *Neurochem Int* 50(7-8):954-8.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 377(9769):942-55.
- Kovacs GG. 2014. Current concepts of neurodegenerative diseases. *EMJ Neurol* 1:78-86.
- Kumari S, Mehta SL, Li PA. 2012. Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. *PLoS One* 7(6):e39382.
- Labbadia J, Morimoto RI. 2013. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in biochemical sciences* 38(8):378-85.
- LaFerla FM, Green KN. 2012. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(11):a006320.
- Lavoie S, Chen Y, Dalton TP, Gysin R, Cuénod M, Steullet P, Do KQ. 2009. Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem* 108(6):1410-22.
- Lee J, Hyeon SJ, Im H, Ryu H, Kim Y, Ryu H. 2016. Astrocytes and microglia as non-cell autonomous players in the pathogenesis of ALS. *Experimental neurobiology* 25(5):233-40.
- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Experimental cell research* 249(2):396-403.
- Li D, Wang W, Shan Y, Barrera LN, Howie AF, Beckett GJ, Wu K, Bao Y. 2012. Synergy between sulforaphane and selenium in the up-regulation of thioredoxin reductase and protection against hydrogen peroxide-induced cell death in human hepatocytes. *Food chemistry* 133(2):300-7.
- Li Q, Spencer NY, Pantazis NJ, Engelhardt JF. 2011. Alsln and SOD1G93A proteins regulate endosomal reactive oxygen species production by glial cells and proinflammatory pathways responsible for neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* 286(46):40151-62.
- Li X, Wang H, Gao Y, Li L, Tang C, Wen G, Zhou Y, Zhou M, Mao L, Fan Y. 2016. Protective Effects of Quercetin on Mitochondrial Biogenesis in Experimental Traumatic Brain Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. *PLoS One* 11(10):e0164237.
- Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113):787.

- Liu J-w, Yu Y-j, Zheng P-y, Zhang X-d, Li T, Cao Y, Guo M-c. 2007. Synergistic protective effect of picoside II and NGF on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂. *Pharmacological Reports* 59(5):573.
- Liu R, Jia T, Cui Y, Lin H, Li S. 2018. The protective effect of selenium on the chicken pancreas against cadmium toxicity via alleviating oxidative stress and autophagy. *Biological trace element research* 184(1):240-6.
- Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. 2017. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.
- Lushchak VI. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* 224:164-75.
- Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. 2016. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercetrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 29(1):30-9.
- Matilla-Dueñas A, Ashizawa T, Brice A, Magri S, McFarland K, Pandolfo M, Pulst S, Riess O, Rubinsztein D, Schmidt J. 2014. Consensus paper: pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *The Cerebellum* 13(2):269-302.
- Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistic G, Finazzi-Agr A. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388(6641):432.
- Mirjana BC, Danijela ZK, Tamara DL-P, Aleksandra MB, Vesna MV. 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* 11(3):315-35.
- Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O. 2016. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug design, development and therapy* 10:23.
- Morphy R, Kay C, Rankovic Z. 2004. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug discovery today* 9(15):641-51.
- Morphy R, Rankovic Z. 2005. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* 48(21):6523-43.
- Morton AJ, Hunt MJ, Hodges AK, Lewis PD, Redfern AJ, Dunnett SB, Jones L. 2005. A combination drug therapy improves cognition and reverses gene expression changes in a mouse model of Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience* 21(4):855-70.
- Nakajima K-i, Niisato N, Marunaka Y. 2011. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻-cotransporter. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28(1):147-56.
- Nichols M, Zhang J, Polster B, Elustondo P, Thirumaran A, Pavlov E, Robertson G. 2015. Synergistic neuroprotection by epicatechin and quercetin: activation of convergent mitochondrial signaling pathways. *Neuroscience* 308:75-94.
- Nishimuro H, Ohnishi H, Sato M, Ohnishi-Kameyama M, Matsunaga I, Naito S, Ippoushi K, Oike H, Nagata T, Akasaka H, Saitoh S, Shimamoto K, Kobori M. 2015. Estimated Daily Intake and Seasonal Food Sources of Quercetin in Japan. *Nutrients* 7(4):2345-58.
- Nonn L, Williams RR, Erickson RP, Powis G. 2003. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Molecular and cellular biology* 23(3):916-22.

- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59(3):467-77.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87(1):172-81.
- Othman SB, Yabe T. 2015. Use of hydrogen peroxide and peroxy radicals to induce oxidative stress in neuronal cells. *Reviews in Agricultural Science* 3:40-5.
- Palazzolo G, Horvath P, Zenobi-Wong M. 2012. The Flavonoid Isoquercitrin Promotes Neurite Elongation by Reducing RhoA Activity. *PLoS One* 7(11):e49979.
- Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. 2010. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 20(s2):S357-S67.
- Poljsak B, Milisav I. 2013. Aging, oxidative stress and antioxidants. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants: IntechOpen*.
- Qin L-x, Tan J-q, Zhang H-n, Rizwana K, Lu J-h, Tang J-g, Jiang B, Shen X-m, Guo J-f, Tang B-s. 2017. BAG5 interacts with DJ-1 and inhibits the neuroprotective effects of DJ-1 to combat mitochondrial oxidative damage. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.
- Ray PD, Huang B-W, Tsui Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-90.
- Regitz C, Marie Dußling L, Wenzel U. 2014. Amyloid-beta (A β 1-42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 58(10):1931-40.
- Rego AC, Oliveira CR. 2003. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemical research* 28(10):1563-74.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49(11):1603-16.
- Rikkert O, Marcel G, Verhey FR, Sijben JW, Bouwman FH, Dautzenberg PL, Lansink M, Sijpers WM, van Asselt DZ, van Hees AM. 2014. Differences in nutritional status between very mild Alzheimer's disease patients and healthy controls. *Journal of Alzheimer's disease* 41(1):261-71.
- Robaszkiewicz A, Balcerzyk A, Bartosz G. 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology International* 31(10):1245-50.
- Rocca WA. 2018. The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *The Lancet Neurology* 17(11):928-9.
- Romero A, Egea J, García AG, López MG. 2010. Synergistic neuroprotective effect of combined low concentrations of galantamine and melatonin against oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of pineal research* 49(2):141-8.
- Rossi M, Perez-Lloret S, Doldan L, Cerquetti D, Balej J, Millar Verneti P, Hawkes M, Cammarota A, Merello M. 2014. Autosomal dominant cerebellar ataxias: a systematic review of clinical features. *European Journal of Neurology* 21(4):607-15.

- Ruffels J, Griffin M, Dickenson JM. 2004. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *European journal of pharmacology* 483(2-3):163-73.
- Rutherford GW, Sangani P, Kennedy GE. 2003. Three-or four-versus two-drug antiretroviral maintenance regimens for HIV infection. *Cochrane Db Syst Rev* (4).
- Ryu J, Choi H, McLarnon J. 2006. Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. *Neuroscience* 141(4):1835-48.
- Sacson RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, Fratta P. 2013. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain* 136(8):2342-58.
- Sajad M, Zargan J, Zargar MA, Sharma J, Umar S, Arora R, Khan HA. 2013. Quercetin prevents protein nitration and glycolytic block of proliferation in hydrogen peroxide insulted cultured neuronal precursor cells (NPCs): implications on CNS regeneration. *Neurotoxicology* 36:24-33.
- Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E, Orrenius S. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Bioph Res Co* 255(1):6-11.
- Sanchis-Gomar F, Luis Garcia-Gimenez J, Carmen Gomez-Cabrera M, V Pallardo F. 2014. Mitochondrial biogenesis in health and disease. *Molecular and therapeutic approaches. Curr Pharm Design* 20(35):5619-33.
- Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Horrocks LA, Anderson DK. 1987. Effects of Methylprednisolone and the Combination of α -Tocopherol and Selenium on Arachidonic Acid Metabolism and Lipid Peroxidation in Traumatized Spinal Cord Tissue. *J Neurochem* 49(1):24-31.
- Schwarz K, Foltz CM. 1989. Factor 3 activity of selenium compounds. *Nutrition reviews* 47(4):108-10.
- Sharma D, Wani W, Sunkaria A, Kandimalla R, Sharma R, Verma D, Bal A, Gill K. 2016. Quercetin attenuates neuronal death against aluminum-induced neurodegeneration in the rat hippocampus. *Neuroscience* 324:163-76.
- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E. 2007. Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Research Bulletin* 73(1):55-63.
- Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY. 2008. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106(1):45-55.
- Shi C, Zhao L, Zhu B, Li Q, Yew DT, Yao Z, Xu J. 2009a. Dosage effects of EGb761 on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Chemico-Biological Interactions* 180(3):389-97.
- Shi C, Zhao L, Zhu B, Li Q, Yew DT, Yao Z, Xu J. 2009b. Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against β -amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chemico-biological interactions* 181(1):115-23.

- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. 2008. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780(5):819-25.
- Shirendeb U, Reddy AP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Tagle DA, Hemachandra Reddy P. 2011. Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Human molecular genetics* 20(7):1438-55.
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. 2019. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 24(8):1583.
- Solovyev ND. 2015. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *Journal of Inorganic Biochemistry* 153:1-12.
- Song W, Chen J, Petrilli A, Liot G, Klinglmayr E, Zhou Y, Poquiz P, Tjong J, Pouladi MA, Hayden MR. 2011. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature medicine* 17(3):377.
- Stucki DM, Rueggsegger C, Steiner S, Radecke J, Murphy MP, Zuber B, Saxena S. 2016. Mitochondrial impairments contribute to Spinocerebellar ataxia type 1 progression and can be ameliorated by the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Free Radical Biology and Medicine* 97:427-40.
- Suematsu N, Hosoda M, Fujimori K. 2011. Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 504(3):223-7.
- Suganthi N, Devi KP, Nabavi SF, Braidly N, Nabavi SM. 2016. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84:892-908.
- Sun GY, Chen Z, Jasmer KJ, Chuang DY, Gu Z, Hannink M, Simonyi A. 2015. Quercetin Attenuates Inflammatory Responses in BV-2 Microglial Cells: Role of MAPKs on the Nrf2 Pathway and Induction of Heme Oxygenase-1. *PLoS One* 10(10):e0141509.
- Suski JM, Lebieczinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. 2012. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Mitochondrial bioenergetics*: Springer. p. 183-205.
- Suzuki M, Nagai Y, Wada K, Koike T. 2012. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem Biophys Res Co* 429(1-2):18-23.
- Taki-Nakano N, Ohzeki H, Kotera J, Ohta H. 2014. Cytoprotective effects of 12-oxo phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin jasmonate, on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840(12):3413-22.
- Testa G, Gamba P, Badilli U, Gargiulo S, Maina M, Guina T, Calfapietra S, Biasi F, Cavalli R, Poli G, Leonarduzzi G. 2014. Loading into Nanoparticles Improves Quercetin's Efficacy in Preventing Neuroinflammation Induced by Oxysterols. *PLoS One* 9(5):e96795.
- Tian X, Guo L-P, Hu X-L, Huang J, Fan Y-H, Ren T-S, Zhao Q-C. 2015. Protective effects of *Arctium lappa* L. roots against hydrogen peroxide-induced cell injury

- and potential mechanisms in SH-SY5Y cells. *Cellular and molecular neurobiology* 35(3):335-44.
- Tong Y, Zhou W, Fung V, Christensen MA, Qing H, Sun X, Song W. 2005. Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and A β generation. *Journal of Neural Transmission* 112(3):455-69.
- Tsai F-H, Lien J-C, Lin L-W, Chen H-Y, Ching H, Wu C-R. 2009. Protective effect of *Broussonetia papyrifera* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73(9):1933-9.
- Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H. 1997. Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia* (08876924) 11.
- Tysnes O-B, Storstein A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 124(8):901-5.
- Valencia A, Morán J. 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine* 36(9):1112-25.
- Van der Schyf CJ, Gal S, Geldenhuys WJ, Youdim MB. 2006. Multifunctional neuroprotective drugs targeting monoamine oxidase inhibition, iron chelation, adenosine receptors, and cholinergic and glutamatergic action for neurodegenerative diseases. *Expert opinion on investigational drugs* 15(8):873-86.
- van Eersel J, Ke YD, Liu X, Delerue F, Kril JJ, Götz J, Ittner LM. 2010. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(31):13888-93.
- Wagner C, Vargas AP, Roos DH, Morel AF, Farina M, Nogueira CW, Aschner M, Rocha JB. 2010. Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Archives of toxicology* 84(2):89-97.
- Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, Moustaid-Moussa N. 2014. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25(4):363-76.
- Wang W, Sun F, An Y, Ai H, Zhang L, Huang W, Li L. 2009a. Morroniside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology* 613(1):19-23.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. 2009b. Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental neurology* 218(2):193-202.
- Weydert CJ, Cullen JJ. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5(1):51.
- Whittemore E, Loo D, Watt J, Cotmans C. 1995. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* 67(4):921-32.
- Xi J, Zhang B, Luo F, Liu J, Yang T. 2012. Quercetin protects neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress by inhibiting expression of Krüppel-like factor 4. *Neurosci Lett* 527(2):115-20.

- Xiao Z, Huang C, Wu J, Sun L, Hao W, Leung LK, Huang J. 2013. The neuroprotective effects of ipriflavone against H_2O_2 and amyloid beta induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *European journal of pharmacology* 721(1-3):286-93.
- Xie H-r, Hu L-s, Li G-y. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal* 123(8):1086-92.
- Yanardag R, Ozsoy-Sacan O, Ozdil S, Bolkent S. 2007. Combined effects of vitamin C, vitamin E, and sodium selenate supplementation on absolute ethanol-induced injury in various organs of rats. *International journal of toxicology* 26(6):513-23.
- Yang E-J, Kim G-S, Kim JA, Song K-S. 2013. Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacognosy magazine* 9(36):302.
- Yang T, Kong B, Gu J-W, Kuang Y-Q, Cheng L, Yang W-T, Xia X, Shu H-F. 2014. Anti-apoptotic and anti-oxidative roles of quercetin after traumatic brain injury. *Cellular and molecular neurobiology* 34(6):797-804.
- Yao Y, Han DD, Zhang T, Yang Z. 2010. Quercetin improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia and inhibits voltage-dependent sodium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Phytotherapy Research* 24(1):136-40.
- Yin H, Xu L, Porter NA. 2011. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews* 111(10):5944-72.
- Youdim M, Buccafusco J. 2005a. CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of neural transmission* 112(4):519-37.
- Youdim MB. 2010a. Why Do We Need Multifunctional Neuroprotective and Neurorestorative Drugs for Parkinson's and Alzheimer's Diseases as Disease Modifying Agents. *Experimental neurobiology* 19(1):1-14.
- Youdim MB. 2010b. Why do we need multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's and Alzheimer's disorders? *Rambam Maimonides medical journal* 1(2).
- Youdim MB, Buccafusco JJ. 2005b. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* 26(1):27-35.
- Zhang L, Yu H, Sun Y, Lin X, Chen B, Tan C, Cao G, Wang Z. 2007. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology* 564(1):18-25.
- Zhang L, Yu H, Zhao X, Lin X, Tan C, Cao G, Wang Z. 2010. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 57(5):547-55.
- Zhang M, Swarts SG, Yin L, Liu C, Tian Y, Cao Y, Swarts M, Yang S, Zhang SB, Zhang K, Ju S, Olek DJ, Schwartz L, Keng PC, Howell R, Zhang L, Okunieff P. 2011. *Antioxidant Properties of Quercetin*. Boston, MA: Springer US. p. 283-9.
- Zhao B. 2005. Natural antioxidants for neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology* 31(1-3):283-93.
- Zheng H, Gal S, Weiner LM, Bar-Am O, Warshawsky A, Fridkin M, Youdim MB. 2005. Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases: *in vitro* studies on antioxidant

- activity, prevention of lipid peroxide formation and monoamine oxidase inhibition. *J Neurochem* 95(1):68-78.
- Zheng J, Winderickx J, Franssens V, Liu B. 2018. A mitochondria-associated oxidative stress perspective on Huntington's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 11.
- Zheng L, Zhu H-Z, Wang B-T, Zhao Q-H, Du X-B, Zheng Y, Jiang L, Ni J-Z, Zhang Y, Liu Q. 2016. Sodium selenate regulates the brain ionome in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep-Uk* 6:39290.
- Zhu M, Han S, Fink AL. 2013. Oxidized quercetin inhibits α -synuclein fibrillization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(4):2872-81.
- Zimmermann GR, Lehar J, Keith CT. 2007. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug discovery today* 12(1-2):34-42.
- Zuo L, Hemmelgarn BT, Chuang C-C, Best TM. 2015a. The role of oxidative stress-induced epigenetic alterations in amyloid- β production in Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015.
- Zuo L, Zhou T, Pannell B, Ziegler A, Best TM. 2015b. Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. *Acta Physiologica* 214(3):329-48.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2005'de girdiği Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, lisans programından 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılında girdiği İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Anabilim dalı Biyoteknoloji (İngilizce) programından 2014 yılında mezun oldu. Yüksek lisans öğrenimi sırasında 2011 yılında Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Anabilim dalında Araştırma Görevlisi ünvanını aldı ve halen görevine devam etmektedir. Araştırma görevlisi görevi süresince bünyesinde bulunduğu birimde birçok bölüm dersinin laboratuvar ve uygulama derslerinde dersin yürütücüsü olarak görev aldı. 2014 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı Biyoteknoloji Bilim dalında doktora programına başladı ve Ağustos 2011'den beri doktora programındaki tüm laboratuvar çalışmalarını Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarları, Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Hücre Kültürü Laboratuvarlarında yapmıştır.

Gökhan DERVİŞOĞLU evli ve bir çocuk babasıdır.