



**IN VITRO PARKİNSON MODELİNDE RESVERATROL VE HİDROJEN
SÜLFÜRÜN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sahar NAJDAT AMEEN KARKUKLİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sahar NAJDAT AMEEN KARKUKLİ

19/02/2025

IN VITRO PARKİNSON MODELİNDE RESVERATROL VE HİDROJEN SÜLFÜRÜN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Sahar NAJDAT AMEEN KARKUKLİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2025

ÖZET

Parkinson hastalığı (PH), dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilen, hareket bozukluklarına ve motor kontrol kaybına neden olan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Özellikle yetişkin ve ileri yaş gruplarını etkileyen PH, tedavi edilemez doğası ve mevcut terapötik seçeneklerin sınırlılığı nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Güncel bilimsel araştırmalar, yan etkileri düşük ve biyoyararlanımı yüksek doğal bileşiklerin, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanım potansiyelini araştırmaya odaklanmaktadır. Bu bağlamda, bitkilerde doğal olarak bulunan bir stilbenoid olan resveratrol (RSV) ile endojen bir gazotransmitter olan hidrojen sülfür (H_2S), oksidatif stres ve inflamasyon gibi patolojik süreçleri modüle edebilme potansiyelleriyle dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, 6-hidroksidopamin (6-OHDA) kullanılarak PH'nin dopaminerjik nöronlarda yol açtığı toksik etkiler modellenmiş ve RSV ile H_2S 'in nöroprotektif etkileri farklı konsantrasyon ve uygulama protokolleriyle değerlendirilmiştir. 6-OHDA indüksiyonunun, hücresel zarar biyobelirteçlerinden LDH salınımında, kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitelerinde, reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinde ve mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulmada anlamlı bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın, RSV ve H_2S 'in önleyici ve eş zamanlı uygulanması, hücre hasar göstergelerinde anlamlı azalmalar sağlamış, hücre canlılığını artırmış ve mitokondriyal fonksiyonları korumuştur. Sonuçlar, düşük konsantrasyonlarda RSV ve H_2S kombinasyonunun, 6-OHDA'nın toksik etkilerine karşı nöroprotektif özellikler sergilediğini ve bu iki bileşiğin sinerjik etkilerle oksidatif stres, apoptoz ve mitokondriyal disfonksiyonu baskılayabileceğini göstermektedir. Çalışma bulguları, RSV ve H_2S 'in PH ile ilişkili nörodejeneratif süreçlere karşı terapötik potansiyel taşıyan ajanlar olarak değerlendirilmesi gerektiğini ve bu bileşiklerin yeni nesil nöroprotektif stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir araç olabileceğini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Bilim Kodu : 1055.1

Anahtar Kelimeler : Resveratrol, Hidrojen Sülfür, 6-OHDA, Parkinson Hastalığı

Sayfa Adedi : 73

Danışman : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL
AND HYDROGEN SULFIDE IN AN IN VITRO PARKINSON MODEL

(M. Sc. Thesis)

Sahar NAJDAT AMEEN KARKUKLİ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2025

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the degeneration of dopaminergic neurons, leading to movement disorders and loss of motor control. PD, which particularly affects adults and older age groups, remains an important public health problem due to its incurable nature and the limitations of current therapeutic options. Current scientific research focuses on investigating the potential of natural compounds with low side effects and high bioavailability for the treatment of neurodegenerative diseases. In this context, resveratrol (RSV), a naturally occurring stilbenoid found in plants, and hydrogen sulfide (H₂S), an endogenous gasotransmitter, have attracted attention with their potential to modulate pathological processes such as oxidative stress and inflammation. In this study, we modeled the toxic effects of PH on dopaminergic neurons using 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and evaluated the neuroprotective effects of RSV and H₂S with different concentrations and application protocols. 6-OHDA induction caused a significant increase in LDH release, caspase-3, -8 and -9 activities, reactive oxygen species (ROS) levels and mitochondrial membrane potential disruption, which are biomarkers of cellular damage. In contrast, preventive and simultaneous administration of RSV and H₂S resulted in significant reductions in cellular damage indicators, increased cell viability and preserved mitochondrial function. The results suggest that the combination of RSV and H₂S at low concentrations exhibits neuroprotective properties against the toxic effects of 6-OHDA and that these two compounds may suppress oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction through synergistic effects. The study findings strongly support that RSV and H₂S should be considered as agents with therapeutic potential against PD-associated neurodegenerative processes and that these compounds may be an important tool in the development of next generation neuroprotective strategies.

Science Code : 1055.1

Key Words : Resveratrol, Hydrogen Sulphide, 6-OHDA, Parkinson's Disease

Page Number : 73

Supervisor : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında değerli katkılarını esirgemeyen, her aşamada rehberlik eden ve bana gösterdiği sabır ve anlayış ile sürecin başarıyla tamamlanmasına olanak sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bilgi ve deneyimleriyle katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Duygu Deniz USTA SALİMİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Anabilim Dalımız değerli öğretim üyelerine,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini her zaman yanımda hissettiğim ve benimle birlikte bu süreci paylaşan kıymetli arkadaşım Öğr. Gör. Ayşe AKSOY'a içten teşekkürlerimi ifade etmek isterim.

Başarıya giden yolda en büyük ilham kaynağım olan ve yaşamım boyunca izinden gitmekten onur duyduğum sevgili babam Necdet Emin'e saygı ve özlemle teşekkür ederim.

Zorluklar karşısında bana cesaret veren, her an yanımda olduğunu hissettiren ve bu süreçteki en büyük destekçilerimden olan sevgili annem Suzan Faik, değerli abim Sinan Necdet ve canım kardeşlerime en samimi teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Parkinson Hastalığı	5
2.1.1. Parkinson hastalığının motor semptomları	6
2.1.2. Parkinson hastalığının motor dışı semptomları.....	7
2.1.3. Parkinson hastalığının genetik risk faktörleri	7
2.1.4. Parkinson hastalığının genetik olmayan risk faktörleri.....	8
2.2. Antioksidanlar	9
2.2.1. Flavonoidler	10
2.3. Resveratrol	10
2.3.1. Resveratrolün nöroprotektif etkileri.....	12
2.3.2. Resveratrolün Parkinson hastalığı üzerindeki etkileri.....	13
2.4. Hidrojen Sülfür (H ₂ S)	14
2.4.1. Hidrojen sülfür (H ₂ S) nöroprotektif etkileri.....	17
2.4.2. Hidrojen sülfür'ün parkinson hastalığı üzerindeki etkileri	18
2.5. Nörotoksin Tabanlı <i>in vitro</i> Parkinson Modelleri	19
2.6. Apoptoz Mekanizması	21

	Sayfa
2.6.1. Apoptozun düzenlenmesi	22
2.6.2. Bcl-2 protein ailesi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Kullanılan cihazlar	25
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	25
3.1.3. Kullanılan kitler	25
3.1.4. Kullanılan kimyasallar	26
3.1.5. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı.....	26
3.2. Metot ve Yöntemler	27
3.2.1. <i>İn vitro</i> deneyler	27
4. BULGULAR	35
4.1. SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi	35
4.2. SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın hücre canlılığı üzerine etkisi	36
4.3. 6-OHDA-indüklü sitotoksositeye karşı RSV ve NaHS'ın nöroprotektif etkisi ...	37
4.4. 6-OHDA-indüklü sitotoksositeye karşı RSV ve NaHS'ın sitotoksik etkisi.....	38
4.5. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın ROS seviyesi üzerine etkisi	39
4.6. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın MMP üzerine etkisi	40
4.7. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-3, -8 ve 9 düzeyleri üzerine etkisi	41
4.8. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerine etkisi	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	73

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması	9
Çizelge 3.1. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları	32
Çizelge 3.2. Gen spesifik qPCR primer dizileri ve UPL probe numarası.....	32
Çizelge 3.3. GAPDH, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3, Casp8 ve Casp9 genlerinin Real-time PCR tepkime karışımı	33
Çizelge 3.4. PCR amplifikasyon programı	33

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Resveratrol'ün kimyasal yapısı	12
Şekil 2.2. H ₂ S dozlarının hücreler üzerindeki etkisi	15
Şekil 2.3. NO, CO ve H ₂ S biyolojik işlevlerde rol oynayan gaz halindeki sinyal molekülleridir.	16
Şekil 2.4. H ₂ S beyin fonksiyonlarını modüle eder. H ₂ S'in uzun vadeli güçlenme oluşumu gibi nöronal aktivitelerin modülasyonuna aktif olarak katıldığı gösterilmiştir (a), hücre içi kalsiyum homeostazı (b), ve hücre içi pH düzenlemesi (c)	17
Şekil 4.1. 6-OHDA uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.2. (A) 4 saat RSV uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, (B) 4 saat NaHS uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (C) 24 saat RSV uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, (D) 24 saat NaHS uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	37
Şekil 4.3. 6-OHDA indüklü sitotoksositeye karşı RSV ve NaHS'ın nöroprotektif etkisi	38
Şekil 4.4. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın LDH salınımı ile belirlenen sitotoksosite üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 4.5. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın ROS seviyesi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.6. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın MMP üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.7. (A) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, (B) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-8 aktivitesi üzerine etkisi, (C) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.8. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın inkübasyonu sonunda Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA düzeylerindeki değişiklik.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
cm ²	Santimetrekare
C°	Santigrat
Dk	Dakika
mM	Milimolar
nM	Nanometre
Pmol	Pikomol
rpm	Dakikada devir
Sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
2mRNA	Siklooksijenaz-2mRNA
3-MST	3-merkaptopiruvat sülfoniltransferaz
6-OHDA	6-Hidroksidopamin
AH	Alzheimer hastalığı
ATP	Adenosin trifosfat
Aβ	Amyloid-beta
Bak	Bcl-2 antagoinst/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Casp-3, -8, -9	Kaspaz-3, -8, -9
CAT	Sistein transaminaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
CAT	Katalaz
CBS	Sistasyonin Beta-Sentaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CO	Karbonmonoksit
CO₂⁻	Karbonat iyonu
CO₂	Karbondioksit
CP	Serebral Palsi
CSE	Sistasyonin-Gama Liyaz
DAO	D-amino asit oksidaz
DAO	Diamin Oksidaz
DAT	Dopamin Transporteri
ddH₂O	Double Distilled Water
DEPC	Dietil Pirokarbonat
DHE	Assay-Reactive Oxygen Species kiti
DME	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DRT	Dopamin Replasman Tedavisi
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GBA1	Glukozilseramidaz beta1
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H₂S	Hidrojen sülfür
HD	Huntington hastalığı
IL-1β	Interleukin-1 beta
LC	Light Cycle Deney Programı
LC	Lewy Cisimcikleri
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LDL	Low-Density Lipoprotein

Kısaltmalar	Açıklamalar
LRRK2	Lösın Zengin Tekrar Kinaz
LTP	Uzun Süreli Potansiasyon
MAPT	Mikrotübül İlişkili Protein Tau
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
MPP+	1-Metil-4-Fenilpiridinyum
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaHS	Sodyum hidrosülfür hidratı
NF-κB	Nükleer faktör kappa betta
NMDA	N-Metil-D-Aspartik Asit
NO	Nitrik Oksit
Nrf 2	Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
OH⁻	Hidroksit iyonu
P-38 MAPK	p38 Mitojen Aktive Protein Kinaz
PBS	Phosphate tampon salin solüsyonu
Pc	Kritik basınç
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PH	Parkinson hastalığı
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
qPCR	Kantitatif Gerçek zamanlı Polimeraz Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSV	Resveratrol
RT-PCR	Ters transkriptaz PCR
SIRT 1	Sirtuin 1
SN	Substantia Nigra
SNCA	Alfa-sinüklein
SNpc	Substantia Nigra pars compacta
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS 24.0	Statistical Package for the Social Sciences
TNF-α	Tümör nekroz factor-alfa

Kısaltmalar**Açıklamalar****UPL**

Universal Probe Library,

UPS

Ubikitin-Proteazom Sistemi



1. GİRİŞ

Bilim insanları, tedavisi olmayan veya mevcut tedavilere yanıt vermeyen hastalıklar için sürekli olarak etkili tedaviler bulmaya çalışmaktadır. Amaç, hastaların doğru zamanda uygun tedaviyi almaları, yaşamlarında niteliksel ve niceliksel iyileşmeler elde etmeleri ve iyileşmelerini hızlandırmalarıdır [1].

Parkinson hastalığı (PH) gibi nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde doğal kimyasallar ve şifalı bitkiler büyük bir potansiyel taşımaktadır. Çok sayıda çalışma, doğal ürünlerin ve fitokimyasalların nörodejeneratif hastalıkların semptomlarını azaltma ve seyrini durdurma kabiliyetini göstermiştir [2]. PH'nın ve diğer karmaşık nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için tamamlayıcı veya alternatif tedavi yöntemleri olarak doğal ürünlerin ve şifalı bitkilerin kullanılması lehine artan miktarda araştırma ve bilimsel kanıt göstermektedir. Bu alanda devam eden araştırmaların bir sonucu olarak, hastalar için tedavi seçenekleri daha erişilebilir, güvenli ve başarılı hale gelebilir [3].

Resveratrol gibi şifalı bitkiler PH ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut vaat etmektedir. Bu doğal maddelerin PH'nın altında yatan patojenik süreçleri azaltmaya yardımcı olabilecek antioksidatif, anti inflamatuvar ve nöroprotektif nitelikler içerdiği keşfedilmiştir [4].

Alzheimer hastalığı (AH) ve Huntington hastalığı (HD) ile birlikte nörodejeneratif hastalıklardan biri olan PH, sosyal ve ekonomik birçok etkisi olan ve tedavisi olmayan bir hastalık grubudur. İnsan yaşam süresinin uzaması, hastalıkların görülme sıklığını ve gelişimini önemli ölçüde artırmıştır. Günümüzde kullanılan tedavi yaklaşımları ise genellikle hastalıkların patofizyolojik süreçlerini hedef almamakta ve yalnızca semptomların yönetimine odaklanmaktadır. Bu doğrultuda, düşük toksisiteye sahip, farklı etki mekanizmalarını içeren ve birden fazla biyokimyasal hedefe yönelik etkili yeni kimyasal alternatiflerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum, modern ilaçların bileşenlerinde ve geliştirilmesinde kullanılmak üzere doğada yaygın olarak bulunan kimyasallara yönelmeye yol açmıştır [4].

PH tedavisine gelince, doğal malzemeler, bitkilerdeki aktif bileşenlerin ve doğada bulunan kimyasalların araştırılması yoluyla yaşlanmanın tedavisine ve nörodejeneratif bozuklukların hafifletilmesine katkıda bulunmuştur [4].

PH sendromunu ilk tanımlayan, hastalığı tarif eden ve ilk kez "Parkinson felci" olarak adlandıran İngiliz cerrah James Parkinson olmuştur [5]. Yaşlı hastalarda en sık görülen hastalık olmasına rağmen, etkilenenlerin yaklaşık %5'i 40 yaşın altındadır. Bazen diskinezi olarak da adlandırılan hastalık, tökezleyerek yürüme, hafıza ve bilişsel işlevlerde azalma ile karakterizedir [6].

Hareket bozuklukları ve nörodejeneratif özelliklere sahip kronik bir nörolojik bozukluk olarak bilinen PH yavaş hareket, titreme, genel vücut pozisyonunda dengesizlik ve sertlik gibi belirgin klinik semptomlarla teşhis edilir. Ayrıca depresyon ve anksiyeteye de yol açabilir. Bu hastalığın en önemli özellikleri, substantia nigra pars compacta'daki (SNpc) dopamin nöronlarının kademeli olarak hasar görmesi veya kaybı ve striatumdaki dopamin tükenmesidir. Bu durum, motor fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. PH, yalnızca dopaminerjik sistemle sınırlı kalmayıp, kolinerjik işlevler ile serotonerjik, glutamaterjik ve noradrenerjik yollar üzerinde de etkili olabilmektedir. Bu yolların etkilenmesi, nöronal hücre ölümüyle ilişkilendirildiği gibi dopamin sisteminde bozulmalara da neden olabilmektedir. Bu hastalığın gelişimi, motor semptomlara ek olarak, uyku bozuklukları, bilişsel gerileme, otonomik disfonksiyon, ruh hali değişiklikleri, depresyon, yorgunluk ve huzursuzluk gibi motor olmayan bir dizi semptomla da ilişkilendirilmektedir. PH'nin teşhisinde, önemli bir patolojik özellik olarak Lewy cisimciklerinde yanlış katlanmış alfa-sinüklein proteinlerinin birikimi dikkate alınmaktadır. Bu nedenle, PH, alfa-sinükleinopatiler grubuna dahil edilen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır.

Alfa-sinüklein ister aile öyküsü olsun ister sporadik olsun PH'nin nedenlerinden biri olarak büyük önem taşımaktadır. Alfa-sinüklein, post-translasyonel modifikasyonlar, nöro-enflamasyon, oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve morfolojik değişim ile ilişkilidir. Ayrıca sinaptik ve fosfolipid fonksiyon kaybına neden olur ve indüklenmiş endoplazmik retikulum stresi ve metal iyonları ile ilişkilidir. Yaşlanma ile birlikte vücudun antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalması, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine yol açarak beyinde oksidatif stresin artmasına neden olur. Bunun sonucunda,

yanlış katlanmış alfa-sinüklein birikimi, PH’da yaşlanma sürecini tetikleyen önemli bir faktör haline gelmektedir.

Nöron ölümüne katkıda bulunan mekanizmaları kontrol etmek ve ortaya çıkan işlev bozukluğunu tedavi etmek için yeni terapötik stratejiler aranmaktadır. Çünkü PH için řu anda mevcut olan tedavilerin zararlı yan etkileri vardır ve pahalıdır. Bu nedenle, eğilim doğal ürünlere yöneliktir. PH’ını tedavi etmek için olası tedavilerin bir kaynağı olarak, ürünler demir birikimi ve protein yanlış katlanmasında, proteazom parçalanmasının sürdürülmesinde, mitokondriyal homeostazda ve diğeri nöroprotektif süreçlerde inhibe edici roller oynar [7].



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra görülen en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalıkta sadece sinir hücreleri ölmekle kalmaz, aynı zamanda belirli nöronal devreler de tehlikeye girer. İngiliz bilim insanı James Parkinson, PH'nı ilk kez 1817 yılında tanımlamış: en önemlisi yavaşlık veya hareket edememe olan ve PH olarak adlandırılmasına yol açan bir grup semptomun eşlik ettiği nörolojik bir bozukluk olarak tanımlamıştır. Hastalığa kas sertliği, dinlenme sırasında titreme ve dengesizlik gibi diğer semptomlar da eşlik edebilir [8].

PH motor semptomları, PH ile bağlantılı olan substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybedilmesinden kaynaklanır. Oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve anormal protein birikimi PH ile bağlantılı olsa da, hastalığın kesin kökenleri henüz net değildir. Dopamin replasman tedavisi (DRT) PH'nin birincil tedavisidir. Şu anda PH'nı tedavi etmek için birçok doğal madde alternatif ilaç olarak kullanılmaktadır [9, 10].

65 yaş üstü kişilerin yaklaşık %1'inde PH vardır. Genellikle 40 ila 70 yaşları arasında başlar ve nadiren 20 yaşından önce ortaya çıkar. Genç başlangıçlı PH yirmi yaşından önce ortaya çıkar. Küresel Hastalık Yüku tarafından yapılan bir araştırmaya göre 2017 yılında 1,02 milyon yeni PH vakası görülmüştür. Küresel olarak 2016 yılında 6,1 milyon PH hastası kaydedilmiştir ve yaşa göre standardize edilmiş prevalans oranı 1990 ile 2016 yılları arasında %21,7 oranında artmıştır. Yaşa göre standardize edilmiş PH bağlı genç yaşam ölüm oranları 1990'dan 2007'ye kadar %8,9 artarak keskin bir yükseliş göstermiş, ardından 2007'den 2017'ye kadar %1,0 artmıştır. Çalışmalar, PH yükünün önümüzdeki yıllarda önemli ölçüde artacağını öngörmektedir [11].

Aşırı çalışma, travma, soğuğa maruz kalma, katı kişilikler ve stres gibi değişkenlerin PH için predispozan faktörler olduğu düşünülmektedir. Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte, ailesel PH ile bağlantılı bazı genlerdeki mutasyonlar, belirli proteinlerin işlevlerine ve hastalığın gelişiminin arkasındaki süreçlere ışık tutabilir [12, 13].

PH için birincil tedavi geleneksel olarak beynin dopamin eksikliğini telafi eden DRT olmuştur. Bununla birlikte, DRT nörodejeneratif süreci durdurmaz ve uzun vadede motor dalgalanmalar ve diskineziler gibi motor komplikasyonlara neden olabilir [14, 15, 16]. PH patojenik faktörlere ilişkin kritik noktalar şunlardır: Güncel görüşlerin çoğu, alfa-sinüklein (SNCA) fibrilasyonunun ve anormal agregasyonunun PH'nın klinik oluşumunda birincil bileşenler olduğuna inanmaktadır [17, 18, 19, 20]. Alfa-sinükleinden oluşan Lewy cisimciklerinin (LC) varlığı, PH'nın önemli bir patolojik belirticidir [17, 19]. Oksidatif stres ve ara oligomer konformasyonu da dahil olmak üzere birçok faktör, farklı metabolik yollar aracılığıyla PH patogenezinde temel rol oynamaktadır [17, 19, 20]. Çoğu PH hastasında keşfedilen patojenik faktörler henüz kesin olarak doğrulanmamış olsa da, giderek artan sayıda kanıt, birçok ortak moleküler sinyal yolunun PH'nın gelişimi ve ilerlemesiyle bağlantılı olduğunu göstermektedir [17, 18, 19, 20]. Fosfoinozitid 3-kinaz/protein kinaz B yolu, PH patogenezindeki en önemli sinyal yollarından biri olarak kabul edilmektedir. Nükleer faktör eritriod 2 ile ilişkili faktör2 yolu gibi diğer yollar da PH patogenezinde dahil edilmiştir [19]. Mevcut bilgiler, alfa-sinüklein fibrilasyonu ve agregasyonunun, oksidatif stres ve düzensiz sinyal yolları gibi diğer faktörlere ek olarak, PH patogenezinde temel oyuncular olduğunu göstermektedir, ancak bu süreçlerin altında yatan kesin mekanizmalar hala araştırılmaktadır. Mevcut bilgilere göre yaş, kalıtsal ve çevresel değişkenler arasındaki karmaşık bir etkileşim sonucu ortaya çıkan PH için en önemli risk faktörüdür. Genetik, PH vakalarının yaklaşık %10-15'ini oluşturur ve hastalıkla bağlantılı çeşitli gen mutasyonları vardır. Yaygın genetik risk faktörleri arasında Lösin Zengin Tekrar Kinaz (LRRK2), Glukozilseramidaz beta1 (GBA1), alfa-sinüklein ve diğerlerindeki varyantlar yer almaktadır.

2.1.1. Parkinson hastalığının motor semptomları

PH öncelikle motor semptomlarla tanımlanır ve hastalığın temel motor özellikleri nigrostriatal yoldaki çoğu dopaminerjik hücrenin kaybını takiben ortaya çıkar. Hastalığın kinetik tanısı, istemli hareketlerin yavaşlığına ve hareket yavaşlığına katkıda bulunan ya da bundan kaynaklanan verimlilik ve hızdaki düşüşe dayanır. Ek olarak, semptom olarak kas sertliği, istirahat titremeleri veya dengesiz duruş olabilir. Harekette asimetri ve semptomların vücudun bir tarafında başlaması önemli motor belirtilerdir. Yürüme yavaştır, kollar sallanmaz ve gövde kambur görünür. Ayrıca uzuvlarda ve aksiyal sistemde sertlik vardır. Ek olarak, motor semptomlar ifadesiz bir yüz ve daha küçük el yazısı ile

sonuçlanabilir. Çoğu insan istirahat halindeyken elleri titrer. Bacak titremeleri ve kısa adımlar da bunun bir parçası olabilir, bu da denge kaybına ve düşmeye neden olabilir [21].

2.1.2. Parkinson hastalığının motor dışı semptomları

Hastaların yaşam kalitesi motor olmayan semptomlardan etkilenir. Bunlar salya akması, yorgunluk ve gece idrarıdır. Hastalık ilerledikçe, engellilik ve motor dışı semptomların sıklığı arttıkça yaşam kalitesi düşer. PH diğer motor dışı semptomları anksiyete ve depresyondur. Bireyler, zamanla yaşam kalitesini bozan bilişsel bozulma yaşayabilir [22].

2.1.3. Parkinson hastalığının genetik risk faktörleri

Nörodejeneratif hastalıkların genetik nedenlerden kaynaklanabileceği vurgulanmaktadır. Bunun yanı sıra PH'nın, çevresel faktörler ve genetik yatkınlık arasındaki karmaşık etkileşimlerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür [23].

Polymeropoulos ve çalışma arkadaşları, otozomal dominant bir Parkinson hastalığı formunu ilk kez İtalyan bir ailede tanımlamış ve bu formu PARK1 olarak adlandırılan genetik bir lokusla ilişkilendirmiştir. Bu keşif, Parkinson hastalığının genetik temellerini anlamak için önemli bir kilometre taşı olmuş ve α -sinüklein genindeki mutasyonların hastalığın gelişimindeki rolünü ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, PARK1'den PARK13'e kadar adlandırılan on üç farklı genetik lokusun, Parkinson hastalığının nadir görülen formlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, PARK gen ailesinin altı farklı lokasyonunda meydana gelen mutasyonların hastalık riskini artırabileceği belirtilmiştir [24].

PH, bazı durumlarda monojenik (tek genle ilişkili) formlarla ilişkilendirilebilir ve bu durumdan sorumlu olduğu belirlenen 15 gen bulunmaktadır. Ancak, bu genlerdeki mutasyonlar monojenik vakaların yalnızca yaklaşık %30'unu ve genetik açıdan daha karmaşık vakaların %3-5'ini açıklayabilmektedir. Bu bulgular, PH'nın genetik altyapısının büyük ölçüde karmaşık olduğunu ve genetik faktörlerin tek başına tüm vakaları açıklamakta yetersiz kaldığını göstermektedir [25].

Yapılan çalışmalar, PH ile ilişkilendirilen genetik mutasyonların yaygın olarak SNCA, LRRK2 ve MAPT genlerinde bulunduğunu, ayrıca GBA genindeki düşük frekanslı

kodlama varyantlarının da bu hastalıkla bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur [26]. PH'da en yaygın görülen genetik mutasyonlar şu şekildedir:

Alfa-sinüklein (SNCA): Bu gen, Parkinson hastalarının beyinlerinde Lewy cisimcikleri oluşturmak üzere biriken alfa-sinüklein proteinini üretir. PH'nın erken evreleri özellikle bu gendeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar [27].

PARK2 (Parkin): Mitokondriyal aktivite ve protein yıkımında rol oynayan bir E3 ubiquitin ligaz enzimi olan Parkin, PARK2 tarafından üretilir. Resesif juvenil PH, oksidatif stresi artıran ve mitokondriyal fonksiyon kaybına yol açan bu gen mutasyonları sonucunda gelişmektedir [27].

PARK7 (DJ-1): Bu gen, hücreleri mitokondrilerinin hasardan koruyan DJ-1 proteinini üretir. Erken başlangıçlı PH'nın nadir görülen bir türü PARK7'deki mutasyonlardan kaynaklanır [27].

PINK1: Mitokondriyi stresten korumaya yardımcı olan bir protein kinazı kodlamak Pink1'in işlevidir PH, PINK1 mutasyonlarının bir sonucu olarak daha erken gelişir [27].

LRRK2 (Lösin bakımından zengin tekrar kinaz 2): Bu gendeki mutasyonlar otozomal dominant olarak kalıtılır ve geç başlangıçlı PH ile bağlantılıdır. LRRK2 proteini, nöronal sağkalımı destekleyen birçok biyolojik işlevde rol almaktadır [27].

2.1.4. Parkinson hastalığının genetik olmayan risk faktörleri

Pestisitlere, herbisitlere ve ağır metallere mesleki maruziyet-tütün, kahve ve alkol tüketimi genetik olmayan risk faktörlerine örnek olarak verilebilir. Parkinson hastalarının substantia nigrasında yüksek demir seviyeleri tespit edilmiştir ve diyetle alınan demir serbest radikal üretimine neden olabilir. Fiziksel aktivite de PH riskini azaltırken, kafa travması PH gelişimini etkiler ve gelecekte PH gelişme riskinin daha yüksek olmasıyla bağlantılı olan diğer faktörler koku alma bozuklukları, depresyon ve anksiyedir [28, 29].

2.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif strese karşı vücudun temel savunma mekanizmalarından biridir. Bu moleküller, serbest radikal temizleyicisi olarak işlev görerek hücre hasarını önler, serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesini sağlar ve dolayısıyla hastalık riskini azaltır. Antioksidanlar, vücut tarafından doğal yollarla üretilbildiği gibi eksojen kaynaklardan da alınabilir. Ayrıca, normal hücresel metabolizmanın zararlı yan ürünleri olan serbest radikalleri nötralize ederek vücudu koruma görevini üstlenir [30].

Çizelge 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması [37, 38]

Savunma Kategorisi	Alt Kategori	Örnek Bileşikler	Temel Fonksiyonel Görevler
Endojen Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar	Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon redüktaz (GR).	Serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidatif hasarı önler [31, 32].
Endojen Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	Glutasyon, Melatonin, Koenzim Q10, Selenyum, Ürik asit, α -lipoik asit, Bilirubin, Albümin, Transferrin, Seruloplazmin.	Serbest radikal toplayıcılar olarak oksidatif stresi azaltır [33, 34].
Eksojen Antioksidanlar	Vitamin Antioksidanlar	α -Tokoferol (Vitamin E), β -karoten (Vitamin A), Askorbik asit (Vitamin C), Folik asit (Vitamin B9).	Lipid peroksidasyonunu azaltır, serbest radikallerin etkisini düşürür [33, 34].
Eksojen Antioksidanlar	Farmakolojik Antioksidanlar	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol), NADPH oksidaz inhibitörleri, Rekombinant SOD, Trolox-C.	Endojen sistemlerin yetersiz kaldığı durumlarda serbest radikalleri etkisiz hale getirir [31, 32].
Hücresel Koruyucu Mekanizmalar	Onarıcı Sistemler	DNA onarım mekanizmaları, protein katlanma sistemleri (şaperon proteinler).	Hasarlı moleküllerin onarılmasını sağlayarak hücresel homeostazı korur [35].
Hücresel Koruyucu Mekanizmalar	Adaptif Mekanizmalar	Nrf2 transkripsiyon faktörü, hızlandırılmış antioksidan gen ekspresyonu.	Oksidatif strese yanıt olarak antioksidan savunma kapasitesini artırır [36].

2.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, damarlı bitkilerden elde edilen ve fenolik kimyasal bileşikler grubuna dahil olan önemli maddelerdir. Günümüzde yaklaşık 8.000 farklı fenolik madde bilinmektedir. Bitkilerde flavonoidler, antioksidan ve antibakteriyel etkiler göstermenin yanı sıra, fotoreseptör ve görsel çekicilik sağlayıcı işlevler üstlenir. Ayrıca, serbest radikal üretimini ve temizlenmesini düzenleyerek organizmalarda oksidatif stresi azaltma potansiyeline sahiptir [39]. Flavonoidler, fenilalanin, tirozin ve malonat gibi aromatik amino asitlerden türetilir ve temel yapılarında 15 karbon atomundan oluşan, üç halka şeklinde düzenlenmiş (C6-C3-C6) flavan çekirdeği bulunur [40].

Bitkilerde flavonoidler genellikle glikozillenmiş türevler şeklinde bulunur ve çiçeklere, yapraklara ve meyvelere turuncu, kırmızı ve mavi gibi renkler verir [41]. Flavonoidler; sebzeler, meyveler, tohumlar, tahıllar, baharatlar ve bitkisel ilaçlarda yaygın olarak yer alır. Ayrıca çay, bira ve özellikle kırmızı şarap gibi içeceklerde de yüksek miktarda bulunmaktadır [42].

Flavonoidler, H_2O_2 , O_2^- ve OH^- gibi reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirme yetenekleriyle güçlü antioksidan özellikler sergiler. Bu bileşikler, lipid oksidasyonunu baskılama ve oksijen radikallerini temizleme işlevleri sayesinde hücresel hasarı önlemeye katkıda bulunur. Flavonoidlerin bir alt grubu olan resveratrol, serbest radikalleri etkili bir şekilde nötralize etme kapasitesiyle öne çıkan başlıca fenolik kimyasallar arasında yer alır [43].

2.3. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4 Trihidroksistilben), özellikle kırmızı üzüm kabuklarında bulunan ve antioksidan, anti inflamatuvar özellikleriyle dikkat çeken bir polifenol bileşiktir [44, 45]. Bu bileşiğin, serbest oksijen radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak hücresel hasarı önlediği ve böylece kronik hastalıkların patogenezinde koruyucu bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [46, 47].

RSV'nin, sirtuin 1 (SIRT1) proteinini aktive ederek hücresel enerji metabolizmasını düzenlediği ve mitokondriyal biyogenezi artırdığı rapor edilmiştir [48, 49]. Bu mekanizma,

yaşlanma süreçlerini yavaşlatma ve nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini durdurma potansiyeline sahiptir [50, 51].

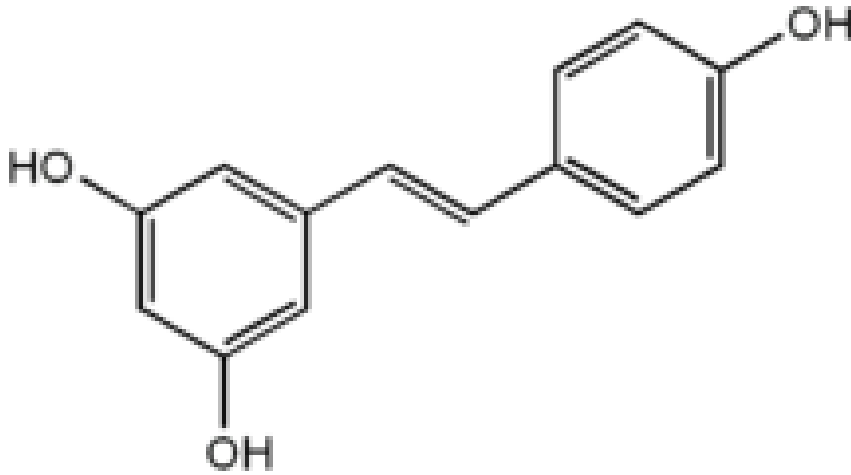
Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri de dikkat çekicidir; RSV'nin kan damarlarını gevşeterek endotelial işlevi iyileştirdiği ve hipertansiyon riskini azalttığı bildirilmiştir [52, 53]. Ayrıca, bu polifenolün düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önleyerek aterosklerotik süreçleri engellediği gösterilmiştir [54, 55].

Nöroprotektif etkiler açısından, RSV'nin AH'ında amiloid beta ($A\beta$) birikimini ve tau hiperfosforilasyonunu inhibe ederek sinaptik fonksiyonları koruduğu ortaya konmuştur [56, 57]. PH modellerinde ise dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu yavaşlattığı ve mitokondriyal kompleks I işlevlerini iyileştirdiği rapor edilmiştir [58, 59].

RSV'nin anti inflamatuvar etkileri, özellikle nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yolunu inhibe ederek inflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılamasıyla ilişkilendirilmiştir [60, 61]. Ayrıca, mikrogial aktiviteyi düzenleyerek merkezi sinir sisteminde nöroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [62, 63].

Metabolik hastalıklar üzerine yapılan çalışmalarda, RSV'nin insülin duyarlılığını artırdığı ve yağ dokusundaki iltihaplanmayı azalttığı belirtilmiştir [64, 65]. Bu etkiler, tip 2 diyabet ve obezite gibi metabolik bozuklukların yönetiminde RSV'nin potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanımını desteklemektedir [66].

Sonuç olarak, RSV'nin sağlık üzerindeki etkileri, antioksidan, anti inflamatuvar ve metabolik düzenleyici özelliklerinden kaynaklanmakta olup, kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde umut verici bir bileşik olarak öne çıkmaktadır [67, 68]. Bununla birlikte, düşük biyoyararlanımı ve hızlı metabolizması, bu bileşiğin klinik kullanımını sınırlandırmakta ve farmasötik formülasyonların geliştirilmesini gerektirmektedir [52, 62].



Şekil 2.1. Resveratrol'ün kimyasal yapısı [69].

2.3.1. Resveratrolün nöroprotektif etkileri

RSV, polifenolik yapıya sahip doğal bir bileşik olup, nörodejeneratif hastalıklarda hücrel savunma mekanizmalarını desteklediği gösterilmiştir [70]. Özellikle oksidatif stresin nörodejeneratif süreçlerdeki rolü dikkate alındığında, RSV'nin antioksidan özellikleri, reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize ederek nöronları hasardan koruma potansiyeli taşır [46].

RSV'nin sirtuin 1 (SIRT1) enzim aktivitesini artırarak hücrel enerji dengesini düzenlediği ve mitokondriyal biyogenezi teşvik ettiği rapor edilmiştir [48]. Bu mekanizma, enerji metabolizmasının bozulmasıyla ilişkili olan AH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu bir rol oynar [71].

AH modellerinde, RSV'nin amiloid beta ($A\beta$) birikimini ve tau protein hiperfosforilasyonunu inhibe ederek sinaptik plastisiteyi desteklediği gösterilmiştir [57]. Ayrıca, bu etkiler inflamatuvar yanıtların baskılanması ve mikroglia aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla da sağlanmaktadır [63, 72].

RSV, PH modellerinde dopaminerjik nöron kaybını azaltmakta ve alfa-sinüklein birikimini önlemekte etkili bulunmuştur [58, 73]. Bu etkiler, RSV'nin mitokondriyal kompleks I üzerindeki koruyucu etkileri ve oksidatif stresin azaltılması ile ilişkilidir [59, 74].

Hücre ölümüne karşı RSV'nin antiapoptotik etkileri, özellikle Bcl-2 ve Bax proteinlerinin düzenlenmesi yoluyla gerçekleşmektedir [75, 76]. Apoptozun önlenmesi, nörodejeneratif süreçlerin yavaşlatılmasında kritik bir rol oynar, çünkü bu süreçlerde nöron kaybı temel bir patolojik özellik olarak öne çıkar [77, 78].

RSV'nin nöroinflamasyonu baskılama yeteneği, NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu ve inflamatuvar sitokin üretiminin azalması ile ilişkilendirilmiştir [60, 61]. Ayrıca, bu bileşik kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü koruyarak beyindeki patolojik süreçlere karşı bir savunma mekanizması sunmaktadır [62, 79].

Sonuç olarak, RSV, nöroprotektif etkilerini antioksidan, anti inflamatuvar ve antiapoptotik mekanizmalar aracılığıyla göstermekte ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde umut verici bir terapötik ajan olarak dikkat çekmektedir [80, 81]. Bununla birlikte, RSV'nin biyoyararlanımını artırmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesi, klinik uygulamalar için önem arz etmektedir [67, 68].

2.3.2. Resveratrolün Parkinson hastalığı üzerindeki etkileri

RSV'nin, güçlü antioksidan özellikleri ve nöroinflamasyonu önleyici etkileri bu polifenolik bileşiği PH'nin tedavisinde potansiyel bir nöroprotektif ajan olarak terapötik bir hedef haline getirmiştir [58, 59]. Özellikle dopaminerjik nöronları oksidatif strese karşı koruma kapasitesi, mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesi ve ROS seviyelerinin azaltılması ile ilişkilendirilmiştir [74, 82]. Özellikle, RSV'nin mitokondriyal kompleks I üzerindeki koruyucu etkisi, enerji metabolizmasının sürdürülebilirliğini destekleyerek dopaminerjik nöron dejenerasyonunu azaltmaktadır [73]. Ayrıca, RSV'nin oksidatif stresin yanı sıra inflamatuvar süreçleri de inhibe ettiği, mikrogial aktiviteyi baskılayarak nöroinflamasyonun etkilerini azalttığı rapor edilmiştir [62, 63].

PH patogenezinde önemli bir yere sahip olan alfa-sinüklein agregasyonunun, RSV uygulaması ile azaldığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir [58, 83]. RSV'nin bu etkisinin, protein homeostazını destekleyen otofaji mekanizmalarını aktive etmesi ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir [84, 85]. Ayrıca, RSV'nin apoptoz sürecini inhibe ederek dopaminerjik nöron kaybını azalttığı ve Bcl-2/Bax oranını artırarak hücrel hayatta kalmayı desteklediği rapor edilmiştir [75, 76].

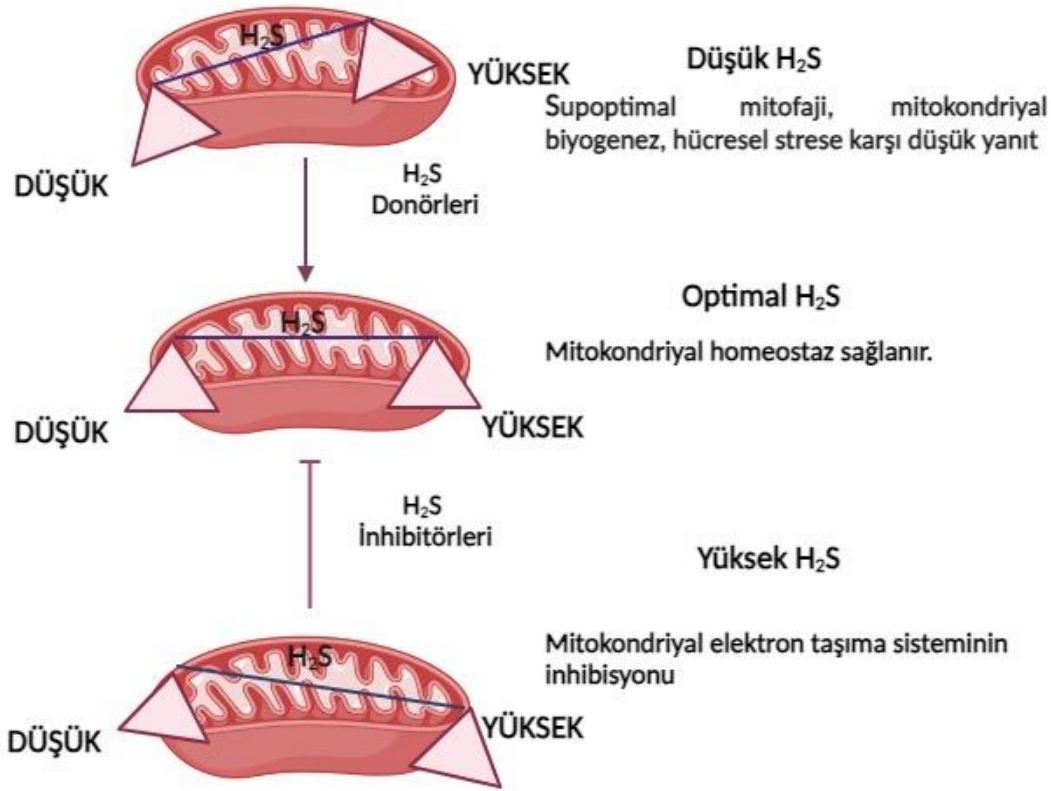
Hayvan modellerinde, RSV uygulamasının motor fonksiyon bozukluklarını azalttığı ve dopaminerjik nöronların korunduğu bildirilmiştir [59, 73]. Özellikle, 6-OHDA ve MPTP gibi nörotoksinlerle oluşturulan Parkinson modellerinde, RSV'nin nöroprotektif etkileri belirgin bir şekilde gözlenmiştir [58, 83]. Bu etkiler, RSV'nin hem oksidatif stres hem de inflamasyon süreçlerini hedef alan çok yönlü mekanizmalarına bağlanmaktadır [76, 82].

2.4. Hidrojen Sülfür (H₂S)

Hidrojen sülfür (H₂S), 1777 yılında keşfedilmiş ve çürük yumurta kokusuna benzer keskin bir kokuya sahip gaz olarak tanımlanmıştır. İlk zamanlarda çevresel bir kirletici ve mesleki alanlarda sağlık riski oluşturduğu düşünülen H₂S, yıllarca bu perspektiften incelenmiştir [86].

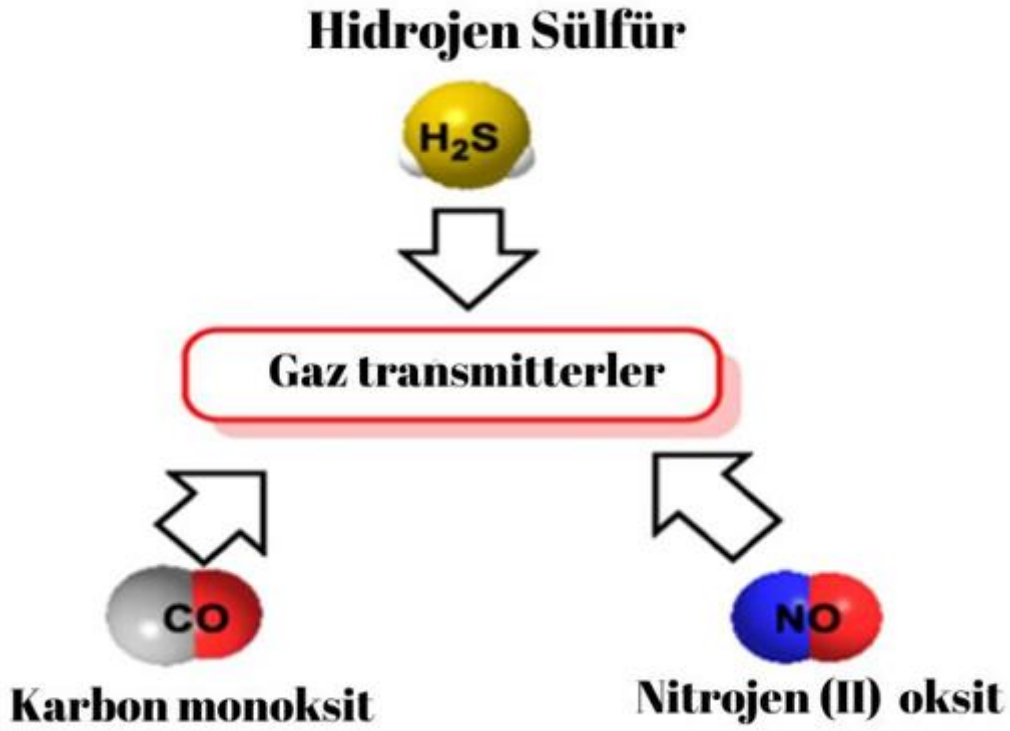
H₂S'in biyolojik etkileri, dozuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarda fizyolojik süreçlere katkı sağlarken, yüksek konsantrasyonlarda hücreler için toksik etkiler gösterir [87]. Yüksek konsantrasyonlarda H₂S, nörodejenerasyon, bilişsel ve hafıza bozuklukları, motor ve duyuşsal eksiklikler, kronik baş ağrıları ve hatta ölüm gibi ciddi nörotoksik etkilere yol açabilir [86].

H₂S, sitokrom c oksidaz, karbonik anhidraz, monoamin oksidaz ve Na⁺/K⁺ ATPaz gibi önemli enzimler üzerinde güçlü bir inhibitör etki gösterir [88]. Ayrıca, Abe ve Kimura tarafından 1996 yılında yapılan araştırma, H₂S'in endojen bir nöromodülatör olarak rol oynadığını ve memelilerdeki fizyolojik önemine dair ilk kanıtları ortaya koymuştur [89].



Şekil 2.2. H₂S dozlarının hücreler üzerindeki etkisi [90].

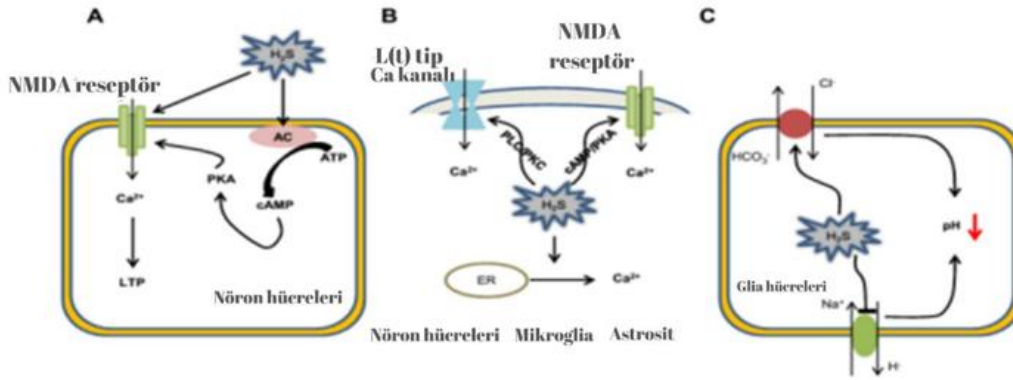
H₂S, nitrik oksit (NO) ve karbon monoksit (CO) ile benzer biyokimyasal özelliklere sahip bir moleküldür. H₂S, sistein transaminaz (CAT), sistatyonin-beta-sentaz (CBS), sistatyonin-gama liyaz (CSE), 3-merkaptopiruvat sülfoniltransferaz (3MST) ve D-amino asit oksidaz (DAO) gibi çeşitli enzimlerin katıldığı enzimatik süreçler aracılığıyla sentezlenmektedir. Bu molekül, insan vücudundaki farklı sistemler üzerinde önemli fizyolojik etkilere sahiptir; endokrin sistemin düzenlenmesinde rol oynar ve karaciğer ile böbrek fonksiyonlarının korunmasına katkıda bulunur [91].



Şekil 2.3. NO, CO ve H_2S biyolojik işlevlerde rol oynayan gaz halindeki sinyal molekülleridir.

H_2S , canlı organizmalarda belirli sistemlerin ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar [92]. Ancak, bu molekül yalnızca düşük konsantrasyonlarda etkili bir sinyal iletilici olarak işlev görmektedir [93]. Çeşitli in vivo çalışmalardan elde edilen bulgular, H_2S 'in hafıza, biliş ve öğrenme eksikliklerini iyileştirebildiğini ve aynı zamanda nöronal ve sinaptik dejenerasyonu önleyebildiğini ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, anti enflamatuar, antioksidan ve anti apoptotik özellikleri sayesinde H_2S , güçlü bir nöroprotektif etkiye sahiptir [94].

H_2S sinaptik plastisite, kalsiyum sinyali ve hücrel homeostaz dahil olmak üzere fonksiyonunun çeşitli yönlerini etkileyen önemli bir nöromodulatördür. H_2S , beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde çeşitli mekanizmalar aracılığıyla önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, öğrenme ve hafıza süreçleri için kritik olan uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) oluşumuna katkı sağlar. H_2S , sinaptik plastisiteyi desteklemek amacıyla N-metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonunu, nörotransmitter salınımını ve nöronal uyarılabilirliği düzenler. Ayrıca, hücre içi kalsiyum homeostazının sürdürülmesi ve hücre içi pH dengesinin sağlanması gibi hayati nöronal işlevlerde de etkili olmaktadır [95].



Şekil 2.4. H₂S beyin fonksiyonlarını modüle eder. H₂S'in uzun vadeli güçlenme oluşumu gibi nöronal aktivitelerin modülasyonuna aktif olarak katıldığı gösterilmiştir (a), hücre içi kalsiyum homeostazı (b), ve hücre içi pH düzenlemesi (c) [88].

H₂S, nöronları oksidatif strese koruyan reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizleyicisi olarak işlev görür. Nöronal hücrelerdeki oksidatif hasarı azaltmaya yardımcı olan önemli bir antioksidan olan glutatyon sentezini artırır [96].

H₂S, nöroinflamasyonu azaltabilen ve patolojik koşullar altında nöronal hücre ölümünü önleyebilen bir nöroprotektan olarak tanımlanmıştır. Mitokondriyal fonksiyonu destekler ve apoptotik yolları modüle ederek stres sırasında nöronal sağkalıma katkıda bulunur [97].

2.4.1. Hidrojen sülfür (H₂S) nöroprotektif etkileri

H₂S, gazotransmitter olarak bilinen biyolojik olarak aktif gazlar grubuna ait olup, nörolojik hastalıkların tedavisinde terapötik bir ajan olarak dikkat çekmektedir [98, 99]. Merkezi sinir sisteminde H₂S, nöronlarda ve gliyal hücrelerde CSE ve CBS enzimleri tarafından üretilir ve fizyolojik düzeylerde nöroprotektif etkiler gösterir [100, 101].

H₂S, oksidatif stresle ilişkili nörodejeneratif süreçleri hafifletmekte önemli bir role sahiptir; bu etki, ROS doğrudan nötralize etme ve endojen antioksidan savunma sistemlerini artırma yeteneğinden kaynaklanmaktadır [102, 103]. Ayrıca, H₂S'in mitokondriyal işlevi düzenlediği ve ATP üretimini optimize ederek hücrelerin enerji dengesini koruduğu gösterilmiştir [104, 105].

Nörodejeneratif hastalıklarda H_2S , inflamatuvar yanıtları baskılayarak nöroinflamasyonun olumsuz etkilerini azaltır; bu mekanizma, NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir [106, 107]. Parkinson hastalığı modellerinde, H_2S 'in dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu yavaşlattığı ve alfa-sinüklein agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir [108, 109, 110].

AH ile ilişkili çalışmalar, H_2S 'in A β birikimini ve tau hiperfosforilasyonunu inhibe ederek sinaptik plastisiteyi koruyabileceğini ortaya koymaktadır [111, 112]. Ek olarak, H_2S 'in nöronal hücrelerde apoptotik sinyal yollarını bloke ederek hücre ölümünü önlediği rapor edilmiştir [113, 114].

H_2S bir diğer önemli etkisi, kalsiyum homeostazını düzenlemesi ve glutamat eksitotoksitesine karşı koruma sağlamasıdır; bu mekanizma, NMDA reseptörlerinin modülasyonu ile ilişkilendirilmiştir [89, 114]. Ayrıca, H_2S 'in kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü koruyarak beyindeki patolojik değişikliklere karşı koruyucu bir bariyer görevi gördüğü bildirilmektedir [115, 116].

Sonuç olarak, H_2S 'in antioksidan, anti inflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri, nöroprotektif bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır [102, 98]. Bu bulgular, hidrojen sülfür temelli terapötik stratejilerin, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir [101].

2.4.2. Hidrojen sülfür'ün parkinson hastalığı üzerindeki etkileri

H_2S , gazotransmitter olarak bilinen biyolojik olarak aktif gazlardan biridir ve son yıllarda PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda terapötik bir ajan olarak potansiyeli araştırılmaktadır [102, 117]. PH'nin temel patolojik mekanizmaları arasında oksidatif stres, nöroinflamasyon ve mitokondriyal fonksiyon kaybı yer alırken, H_2S 'in bu süreçleri modüle edebileceği gösterilmiştir [118, 98].

Oksidatif stres, PH'nin patogenezinde dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda kritik bir role sahiptir ve H_2S , güçlü antioksidan etkileri sayesinde ROS nötralize ederek bu hasarı önleyebilmektedir [109, 119]. Ayrıca, H_2S 'in endojen antioksidan savunma sistemlerini,

özellikle glutatyon (GSH) seviyelerini artırdığı ve oksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir [99, 108].

Mitokondriyal disfonksiyon, PH'nin erken dönemlerinde sık görülen bir patojenik bulgu olup, H₂S'in mitokondriyal fonksiyonları düzenlediği ve enerji metabolizmasını desteklediği rapor edilmiştir [105]. H₂S'in mitokondriyal kompleks IV aktivitesini artırarak ATP üretimini optimize ettiği ve hücrel enerji krizini önlediği belirtilmiştir [98]. Ayrıca, H₂S'in mitokondriyal membran potansiyelini koruduğu ve apoptotik süreçleri inhibe ettiği bildirilmiştir [110, 120].

H₂S'in PH ile ilişkili alfa-sinüklein agregasyonunu azalttığı ve protein homeostazını desteklediği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur [109, 119]. Bu etkiler, H₂S'in otofaji süreçlerini aktive etmesi ve protein yıkım mekanizmalarını düzenlemesiyle ilişkilendirilmektedir [121, 107]. Özellikle, dopaminerjik nöron kaybını önleme potansiyeli, H₂S'in PH modellerinde motor fonksiyonları iyileştirmesiyle desteklenmektedir [108].

2.5. Nörotoksin Tabanlı *in vitro* Parkinson Modelleri

PH, dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilen bir nörodejeneratif hastalık olup, bu süreci incelemek için nörotoksin tabanlı *in vitro* modeller yaygın olarak kullanılmaktadır [122, 123]. Bu modeller, hastalığın moleküler ve hücrel mekanizmalarını anlamaya, terapötik hedefler belirlemeye ve yeni tedaviler geliştirmeye olanak tanır [124, 125].

6-OHDA, dopamin ve norepinefrin taşıyıcılarına yüksek afinitesi olan bir katekolamin türevidir ve dopaminerjik nöronların seçici olarak yok edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [126, 127]. Bu nörotoksin, dopamin taşıyıcıları aracılığıyla nöronlara alındıktan sonra oto-oksidasyona uğrayarak ROS üretir ve oksidatif stres yoluyla hücrel hasara neden olur [126, 128]. Ayrıca, 6-OHDA mitokondriyal kompleks I ve IV'ü inhibe ederek ATP üretimini bozar ve enerji metabolizmasını olumsuz etkiler [129, 130]. Bu mekanizmalar, dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna yol açar ve Parkinson hastalığının patofizyolojisini taklit eder [124, 131]. *In vitro* PH modellerinde, 6-OHDA genellikle SH-SY5Y gibi insan nöroblastoma hücre hatlarına uygulanır [58, 76]. Bu hücre

hatları, dopaminerjik nöronların özelliklerini taşıdığından, 6-OHDA'nın neden olduğu hücrel ve moleküler değişiklikleri incelemek için idealdir [124, 126]. 6-OHDA uygulaması, hücre canlılığında azalma, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz gibi PH benzer fenotipik değişikliklere yol açar [76, 131]. Bu model, potansiyel terapötik ajanların etkinliğini ve mekanizmalarını değerlendirmek için kullanılmaktadır [58, 76]. Örneğin, 6-OHDA ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinde, antioksidan ve anti inflamatuvar özelliklere sahip olduğu bilinen alıç meyvesi (*Crataegus spp.*) ekstraktının nöroprotektif etkileri araştırılmıştır [76, 85]. Bu çalışmada, alıç meyvesi ekstraktının 6-OHDA kaynaklı nörotoksositeye karşı hücre canlılığını artırdığı ve oksidatif stres seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [76, 85]. Bu tür çalışmalar, 6-OHDA ile oluşturulan *in vitro* Parkinson modellerinin, potansiyel tedavi stratejilerinin etkinliğini ve mekanizmalarını anlamada değerli araçlar olduğunu göstermektedir [58, 126].

MPP+ (1-Metil-4-fenilpiridinyum), PH ile ilişkilendirilen nörotoksin MPTP'nin aktif metaboliti olup, mitokondriyal kompleks I'ı inhibe ederek ATP üretimini bozar ve hücre ölümüne yol açar [132, 133]. Dopamin taşıyıcıları (DAT) aracılığıyla dopaminerjik nöronlara giren MPP+, enerji krizine ve oksidatif stresin artışına neden olur [134, 135]. MPP+, SH-SY5Y hücre hattı gibi dopaminerjik hücrelerde sıklıkla kullanılan bir ajandır [136, 137]

Rotenon, lipofilik yapısı sayesinde hücre zarından kolayca geçerek mitokondriyal kompleks I'ı inhibe eden ve oksidatif stres oluşturan güçlü bir nörotoksindir [129, 138]. Rotenon uygulaması, dopaminerjik nöron kaybına ek olarak alfa-sinüklein agregasyonuna neden olarak Parkinson hastalığının patolojik özelliklerini modelleyebilir [139, 140]. Düşük dozlarda bile etkili olan bu toksin, özellikle primer nöron kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [130, 141].

Paraquat, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak oksidatif stres yoluyla dopaminerjik nöron kaybını tetikleyen bir pestisit olarak PH modellerinde kullanılmaktadır [142, 143]. Paraquat, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon kaybı ile ilişkili süreçleri incelemek için SH-SY5Y hücreleri gibi dopaminerjik hücre hatlarında kullanılır [144, 145].

Bu nörotoksin tabanlı modellerin her biri, PH'nın farklı patolojik yönlerini taklit ederek spesifik araştırma hedeflerine hizmet eder [131, 133]. Örneğin, 6-OHDA ve MPP+

oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonu çalışmak için ideal iken, rotenon ve paraquat alfa-sinüklein patolojisini ve proteostaz bozukluklarını araştırmak için uygundur [129, 138].

Sonuç olarak, nörotoksin tabanlı *in vitro* Parkinson modelleri, hastalığın moleküler mekanizmalarının incelenmesinde ve terapötik ajanların geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır [122, 124]. Ancak, bu modellerin sınırlamaları, bulguların klinik anlamlılığını artırmak için diğer model sistemlerle kombinasyon halinde kullanılmasını gerektirir [125, 146].

2.6. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz yani programlanmış hücre ölümü terimi, ilk kez 1972 yılında literatüre kazandırılmıştır [147]. Gelişimsel süreçlerin bir parçası olarak bazı hücrelerin belirli bir program doğrultusunda öldüğünü öne sürmüştür [148].

Programlanmış hücre ölümü, hücresel homeostazın korunmasında kritik rol oynayan bir süreçtir ve günümüze kadar yaklaşık 15 farklı alt türü tanımlanmıştır. Apoptoz, bu alt türler arasında en çok çalışılan ve hücresel ölümlerin düzenlenmesinde merkezi bir öneme sahip olan bir mekanizmadır. Hücre ölümü genel olarak iki ana kategoriye ayrılır: nekroz ve apoptoz. Apoptozun, plazma zarını genellikle bozulmadan koruyarak çevre hücrelere zarar vermeden tamamlanması, nekrozdan en önemli farklarından biridir. Bu süreçte hücre kalıntıları, çevredeki fagositik hücreler veya makrofajlar tarafından etkin bir şekilde ortadan kaldırılmaktadır [149].

Apoptozun düzenlenmesi, ölüm ligandları, kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri ve bu proteinlerin alt düzenleyici unsurları tarafından gerçekleştirilir. Bununla birlikte, bazı hücre ölüm türleri nekrozla ortak özellikler taşıyabilir. Piroptoz, nekroptoz, nekroz, termal nekroz ve mitotik ölüm gibi mekanizmalar, bu kategoride değerlendirilebilir. Ayrıca otofaji, hücre metabolizmasını düzenleyen ve hayatta kalmayı sağlayan bir diğer kritik mekanizmadır. Ferroptoz, lizozom bağımlı hücre ölümü ve partanatos ise programlanmış hücre ölümünün diğer özgün türlerindendir [150].

Farklı hücre tipleri, sinir hücreleri dahil, çeşitli patojenik uyarılara yanıt olarak programlanmış hücre ölümüne uğrayabilir. Bu uyarılar arasında viral enfeksiyonlar, iskemi, şiddetli doku hasarı ve genetik bozukluklar bulunmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan PH'nda, nöronal hücre ölümü sürecinin temel mekanizması olarak apoptoz öne çıkmaktadır.

PH'nda apoptoz, içsel (mitokondri aracılı) ve dışsal (hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aracılı) olmak üzere iki ana yolak üzerinden gerçekleşmektedir. Mitokondri aracılı içsel yolak, kaspaz-9 aktivasyonunu tetikleyen bir mekanizmaya dayanırken; dışsal yolak, ölüm reseptörleri aracılığıyla kaspaz-8'i aktive ederek apoptoz sürecini başlatır. Her iki yolak da apoptozun farklı yönlerini düzenleyen ve patofizyolojik süreçlerde önemli rol oynayan mekanizmalardır [151].

2.6.1. Apoptozun düzenlenmesi

Apoptoz çok hassas bir şekilde düzenlenen bir süreçtir ve bu düzenlemenin bozulması, birçok farklı hastalığın gelişmesine yol açabilir. Apoptozun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi, organizmanın sağlıklı bir şekilde gelişmesini ve işlev görmesini sağlarken, bu süreçteki herhangi bir bozulma, hücre ölümünün ya fazla ya da yetersiz olmasına neden olabilir. Bu da gelişimsel bozukluklar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi ciddi sağlık sorunlarını tetikleyebilir [152, 153]. Apoptoz, hücrenin sağlıklı bir şekilde öldürülmesi için çok hassas bir süreçtir ve bu sürecin düzenlenmesinde Bcl-2 protein ailesi ve kaspaz enzimleri çok önemli rol oynayan hücresel moleküllerdir. Bu moleküller arasındaki etkileşimler, apoptozun ne zaman ve nasıl gerçekleşeceğini belirler ve organizmanın homeostazını korumasına yardımcı olur [154].

2.6.2. Bcl-2 protein ailesi

Bcl-2 ailesi, apoptozun kontrolünü sağlayan bir grup proteindir. Bu proteinin temel işlevi, hücre içindeki stres yanıtlarına göre apoptoz sürecini başlatmak ya da engellemektir. Bcl-2 ailesi, anti apoptotik ve pro apoptotik olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir [152].

Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri

Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 gibi proteinler, apoptozun engellenmesine yardımcı olur. Bu proteinler, mitokondri zarının stabilitesini koruyarak, hücredeki enerji üretiminin devam etmesini sağlar ve böylece apoptozun tetiklenmesini önler. Bu proteinler, hücrenin hayatta kalmasını destekler [155].

Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri

Bax, Bak, Bid gibi proteinler ise apoptozu başlatan proteinlerdir. Bu proteinler, mitokondri zarında porlar açarak, sitokrom C ve diğer pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasına yol açar. Sitokrom C'nin salınması, kaspaz kaskadını tetikler ve apoptoz sürecini başlatır [156].

Kaspazlar

Kaspazlar, apoptoz sürecinde merkezi bir rol oynayan sistein proteazlar enzimleridir. Bu enzimler aspartik asit içeren substratları keserek işlev gösterirler. Kaspazlar, iki ana grupta incelenebilir [157].

Başlatıcı kaspazlar

Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 gibi kaspazlar, apoptozun başlatılmasında önemli rol oynar. Bu kaspazlar, dışsal veya içsel sinyallerle aktive edilir. Aktivasyonları, efektör kaspazların aktive olmasına neden olur [158].

Effektör kaspazlar

Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 gibi kaspazlar, apoptozun ilerleyen aşamalarını başlatan ve hücresel yapıları tahrip eden enzimlerdir. Bu kaspazlar, hücre iskeletini, DNA'yı ve diğer hücresel bileşenleri parçalayarak hücrenin ölümünü gerçekleştirir [159].



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Terazi (Precisa, İsviçre)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)
- Mikrolaka ELISA okuyucu (Spectra Max M3, Molecular Devices, ABD)
- Tüp Çalkalama Cihazı (Vortex; REAMIX 2789, Almanya)
- Derin dondurucu, -80°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Biyogüvenlik Kabini (CLANLAF VFRS 1206, Danimarka)
- Karbondioksit Etüv (Sanyo, Japonya)
- Ters mikroskop (Zeiss, Almanya)
- İnkübatör (NÜVE EN 500, Türkiye)
- Mikropipet seti 10-100-1000 µl (Marka, Almanya)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Beher (10 ml'lik)
- Santrifüj tüpleri (50 ml ve 15 ml'lik)
- Ependorf (1,5 ve 2 ml'lik)
- Steril pipet uçları
- Steril 6'lık kuyu plakası
- Steril 96'lık kuyu plakası
- 25 cm²-75 cm² steril hücre kültürü flaskları

3.1.3. Kullanılan kitler

- Caspase3, Caspase8 ve Caspase9 Multipleks Aktivite Test Kiti (Florometrik)
- İScript cDNA Sentez Kiti, 100 Rxn

- Sitotoksosite Tespit Kiti Plus (LDH), Roche
- Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit II (Cell Signaling Technology)
- BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific)
- Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH), Roche
- Assay-Reactive Oxygen Species kiti (DHE)

3.1.4. Kullanılan kimyasallar

- Mutlak etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, EtOH, Merck)
- Hücre kültürü besiyeri; L-Glutamin içeren yüksek glukozlu DMEM (Wisent)
- Fetal Sığır Serum (Biological Industries)
- Penisilin-Streptomisin antibiyotik (Biological Industries)
- Amfoterisin B antimikotik (Biological Industries)
- Tripsin (Biyolojik Endüstriler)
- MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (Calbiochem)
- Dimetil sülfoksit (DMSO, AppliChem)
- Tripan mavisi boyası (BioFroxx)
- Trizol
- Resveratrol (Sigma-Aldrich)
- RIPA Buffer (Thermo Fisher)
- PMSF Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF, Merck)
- Hidrojen sülfür (H_2S)
- 6-hidroksidopamin (6-OHDA)

3.1.5. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

10 % FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

Önceden ısı ile inaktive edilmiş 50 ml FBS, daha sonra 5 ml penisilin-streptomisin ve 500 µl amfoterisin B kullanılarak toplam hacim 500 ml olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır.

1 % FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

Önceden ısı ile inaktive edilmiş 5 ml FBS, daha sonra 5 ml penisilin-streptomisin ve 500 µl amfoterisin B kullanılarak toplam hacim 500 ml olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır.

MTT solüsyonu hazırlanması

PBS içinde 5 mg/ml olacak şekilde 5 ml MTT stok solüsyonundan 1 ml'de 5 mg olacak şekilde çözündürülmüştür.

3.2. Metot ve Yöntemler

3.2.1. *İn vitro* deneyler

Hücre kültürü

Çalışmamızda SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Hücre hattı, American Type Culture Collection (ATCC CRL-2638)'den ticari olarak daha önceki projelerimizden temin edilmiştir. Hücre kültürü, 2 mM glutamin, %10 fetal dana serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) ve antibiyotikler (100 ünite/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin) ile desteklenmiş yüksek glukoz içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) besiyerinde %5 CO₂ 'li 37 °C nemlendirilmiş ortamda gerçekleştirilmiştir.

İn vitro parkinson modeli oluşturulması

Bu modeli oluşturmak için çalışmada nörotoksik bir ajan olan 6-OHDA kullanılmıştır. 6-OHDA ana stok konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür. Optimum konsantrasyon aralığını belirlemek için SH-SY5Y hücrelerine 6, 12 ve 24 saat süresince 6-OHDA'nın farklı konsantrasyonları (5-250 µM) uygulanmıştır. Sonuçları analiz etmek için MTT hücre canlılığı testi uygulandı.

MTT Hücre canlılığı analizi

H₂S'in hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için çalışmamızda H₂S donörü olan Sodyum hidrosülfür hidratı (NaHS) kullanılmıştır. NaHS ve RSV'nin hücre canlılığına olan

etki/etkilerinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla çoğalan SH-SY5Y hücrelerinin pasajlanmasının ardından, hücrelerin üzerine %1 FBS içeren DMEM eklenip, hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler, %1 FBS içeren DMEM içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra Hücreler 96 kuyucuklu platelere 2×10^4 hücre sayısı olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece inkübasyondan sonra hücreler, %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde tek başına 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M artan konsantrasyonlarda NaHS, tek başına 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M artan konsantrasyonlarda RSV ve son olarak H₂S ve RSV kombine bir şekilde 5 μ M RSV + 10 μ M NaHS, 5 μ M RSV + 25 μ M NaHS, 25 μ M RSV + 10 μ M NaHS, 25 μ M RSV + 25 μ M NaHS arasındaki konsantrasyonlarda uygulanmıştır. IC₅₀, hücrelerin %50'sinin büyümesini inhibe eden konsantrasyon hesaplanmıştır. 4 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyeri hazırlanmış olan 5mg/ml MTT çözeltisinden 10 μ l eklenerek 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazon kristalleri 100 μ l DMSO'da çözüldükten sonra çözünen kristallerin absorbans değeri 570 nm dalga boyunda Spectramax M3 Elisa mikropłaka okuyucuda ölçülmüştür. Deney tüm konsantrasyonlar için 6 kez tekrarlanmıştır. Hücre canlılığı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}}{\text{Yüksek kontrol absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}} \times 100 \quad (3.1)$$

Sitotoksitesi ölçümü

Hücre sitotoksitesi, hücreden salınan laktat dehidrojenaz (LDH) seviyesi kullanılarak ölçülür. SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu kültür plakalarına kuyu başına 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra hücelere belirlenen dozlarda RSV, NaHS ve 6-OHDA 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. İnkübasyondan sonra kültür ortamından 100 μ l besiyeri alınmış ve 96 kuyulu mikropłakanın her bir kuyusuna eklenmiştir. Ardından, her bir kuyucuğa 100 μ l taze reaksiyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika boyunca ışıktan uzakta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, absorbans değerleri 490-492 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucu kullanılarak okunmuştur. İlaçların yüzde sitotoksite değeri, aşağıdaki formül kullanılarak elde edilen absorbans değerlerinden boş kontrolün absorbansının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre Sitotoksiste (\%)} = \frac{\text{Örnek absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}}{\text{Yüksek kontrol absr.} - \text{Düşük kontrol absr.}} \times 100 \quad (3.2)$$

Kaspaz-3/8/9 aktivitesi ölçümü

Parkinson hastalığı modelinde kullanılan ilaçların apoptozu indükleyip indüklediğini belirlemek amacıyla, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Caspase-3/8/9 Multipleks Aktivite Test Kiti (florometrik) kullanılmıştır. Deney prosedürüne göre, hücre lizatı 14.500 rpm hızında 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant dikkatlice başka bir tüpe aktarılmıştır. Protein konsantrasyonunun ölçümü, bir mikropilaya okuyucu kullanılarak 562 nm absorbans değerinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar, geleneksel BCA eğrisi hesaplamalarına dayalı olarak analiz edilmiştir.

Caspase-3/8/9 multipleks aktivite test kitinin talimatları doğrultusunda, her bir numuneden 150 µl alınmış ve protein miktarı belirlendikten sonra 50 µl substrat çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra, numuneler ışıktan korunaklı bir ortamda bir saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, floresan yoğunluğu eksitasyon/emisyon = 380/500 nm (Ex/Em) dalga boylarında ölçülerek kaspaz aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Hücre içi ROS oluşumunun ölçümü

Hücre içi ROS aktivitesinin ölçümü için Assay-Reactive Oxygen Species kiti (DHE) kullanılmıştır. Bu kit, canlı hücrelerde ROS'un doğrudan ölçülmesini sağlar. Kit prosedürü aşağıda sunulmuştur;

1. SH-SY5Y hücreleri her kuyuda 2×10^4 olacak şekilde 96 kuyulu plate ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra belirlenen dozlarda RSV, NaHS ve 6-OHDA uygulanmıştır.
2. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri aspire edildikten sonra 150 µl cell-based assay tamponu eklenmiştir.
3. Kuyuda yaklaşık 10-20 µL bırakarak cell-based assay tamponunun kalan kısmını aspire edildi ve her kuyucuğa 130 µl ROS staining tamponu eklendi.

4. Negatif kontrol olarak kitle birlikte verilen üç N-asetil sistein Assay Reagent kullanıldı ve ilgili kuyucuklara 10 µl'lik üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir.
5. 30 dakika bekledikten sonra 96 kuyucuklu kültür kabını 37 °C ışıktan koruyarak inkübe edildi.
6. Süre sonunda pozitif kontrol olarak kitin Antimisin A Working Reagent'dan kullanıldı. Üç tekrarlı olacak şekilde ilgili kuyulara 10 µl eklendi, ışıktan korundu ve bu şekilde tutuldu. Bir saat boyunca, güvenli tutmak için 37 °C'de muhafaza edildi.
7. ROS staining buffer kuyucuklardan dikkatlice aspire edildikten sonra, 100 µl Cell-Based Assay Tamponu eklendi.
8. Spectramax M3 cihazı kültür kabında Ex=480-520 nm, Em=570-600 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Mitokondriyel membran potansiyelinin ölçülmesi

Apoptozun tetiklenmesinde iki kilit unsur mitokondriyal membran bozulması ve mitokondriyal işlev bozukluğudur. Canlı hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin saptanmasını sağlayan ve floresan bir yöntem olan Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit II (Cell Signaling Technology) kit, mitokondriyal hasarı değerlendirmek için kullanılır. Buna göre;

1. 96 kuyucuklu plakalara SH-SY5Y hücreleri 2×10^4 hücre/ kuyu olacak şekilde ekilmiş ve 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücrelere RSV, NaHS ve 6-OHDA belirlenen doz ve sürede uygulanmıştır.
2. Süre sonunda her bir kuyucuğa 10 µl 2 µM TMRE verilmiş ve ardından 20 dakika inkübe edilmiştir. 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyonun ardından, her bir kuyucuk üç kez ılık 1X PBS ile yıkanmıştır.
4. Son olarak, 100 ul 1X PBS eklendikten sonra Spectramax M3 cihazı kullanılmıştır. Ex/Em = 550/580 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Hücre kültüründen total RNA'nın elde edilmesi

H₂S, RSV ve 6-OHDA ile inkübasyon sürelerinin dolmasıyla SH-SY5Y hücrelerinden RNA izolasyonu, Trizol solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için; Hücrelerin üzerinde yer alan besiyeri uzaklaştırılarak, hücre peletleri 200 µl soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, hücrelerin üzerine 1000 µl Trizol eklenerek pipetaj yardımıyla homojenize edilmiştir. Ardından, örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca vortekslenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C mikrosantrifüjde santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrılmıştır. Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra başlangıçta kullanılan Trizol miktarının yarısı kadar izopropanol eklenerek vorteklenmiştir. Örnekler 1.5 saat -20 °C' de bekletilmiş, ardından 11.500 rpm'de 10 dakika 4 °C mikrosantrifüjde santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra ependorf tüp üzerine 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 10.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de mikrosantrifüjde santrifüj edilmiştir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatanın atılmasının ardından pelet kurulmaya bırakılmış, kuruyan örnekler 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırılmıştır. Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de 260/280 nanometre (nm)'de ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlenmiştir.

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

RNA örneklerinden High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Primer olarak hekzamerlerin kullanıldığı cDNA sentez yönteminde kullanılan bileşenler ve miktarları çizelge 3.1'de verilmiştir. Otomatik ısı döngüsü cihazında örnekler sırasıyla 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika boyunca işlemiştir. cDNA örnekleri gerçek zamanlı PCR için hazırlanmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları

	Son konsantrasyon
Reaksiyon Tamponu (X5) MgCl ₂	8mM
Dntp	1mM
Random hekzamer primeri	60µM
RNaz inhibitörü	20 U/µg
DTT	5mM
Ters Transkriptaz	10 U/µg
Steril Ultra Saf Su	RNA sabitlemesine göre değişir
Total RNA	1µg

Kantitatif real-time PCR analizi

Gerçek zamanlı PCR, Light Cycler 480 cihazı kullanılarak gen ekspresyon seviyelerini tespit etmek için kullanılmıştır. Toplam 10 µl reaksiyon hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL probu ve Light Cycler Probe Master miks kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) genine özgü primer ve UPL probu, hedef gen ifade seviyelerini normalleştirmek amacıyla elde edilen cDNA örneklerini analiz etmek için kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Gen spesifik qPCR primer dizileri ve UPL probe numarası. UPL: Universal Probe Library, qPCR: Kantitatif Real Time Polimeraz Reaksiyonu

Gen	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')	UPL Probe number
Bax	ATGTTTTCTGACGGCAACTTC	ATCAGTTCCGGCACCTTG	57
Bak	AAACTGGGCTCCCACTCA	CAGTGGAGGACGGGATCA	66
Bcl-2	AGTACCTGAACCGGCACCT	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	75
Bcl-Xl	AGCCTTGGATCCAGGAGAA	GCTGCATTGTTCCCATAGAGT	28
Casp3	TGGAATTGATGCGTGATGTT	TGGCTCAGAAGCACACAAAC	68
Casp8	TCCAAATGCAAACTGGATGA	TCCCAGGATGACCCTCTTCT	62
Casp9	CCATATGATCGAGGACATCCA	GACTCCCTCGAGTCTCCAGAT	27
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	60

Çizelge 3.3. GAPDH, Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3, Casp8 ve Casp9 genlerinin Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	4.7 µl
Prob karışımı (X10)	1X	1.4 µl
25 mM MgCl ₂	4 mM	1.2 µl
Primer F	10 pmol/µl	0.5 µl
Primer R	10 pmol/µl	0.5 µl
TaqMan prob	10 pmol	0.1 µl
cDNA	-	2 µl

Light cyclers (LC) deney programı

Önceden elde edilen cDNA'lar, kantitatif gerçek zamanlı PCR karışımlarının hazırlanması ve dağıtılmasını takiben 96 kuyucuklu mikrolakalara eklenmiştir. Şeffaf bir kapatici uygulandıktan sonra mikrolakalar Light Cyclers 480 cihazına yerleştirilmiştir. PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için çizelge 3.4'te listelenen amplifikasyon protokolü kullanılmıştır. Tüm genler için aynı program uygulanmıştır. Reaksiyon sonucunda hedef genlerin mRNA ifade düzeylerini gösteren kesişme noktası (Cp) değerleri tespit edilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR amplifikasyon programı

Program. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi		Değer
Döngüler		1
Analiz Modu		-
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)		95
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)		10:00dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		20.0
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program verisi		Değer
Döngüler		50
Analiz Modu		Çoğalma
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)		95
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)		10 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		20.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi		Değer
Döngüler		1
Analiz Modu		-
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)		40
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)		30sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		20.0

İstatistiksel analiz yöntemleri

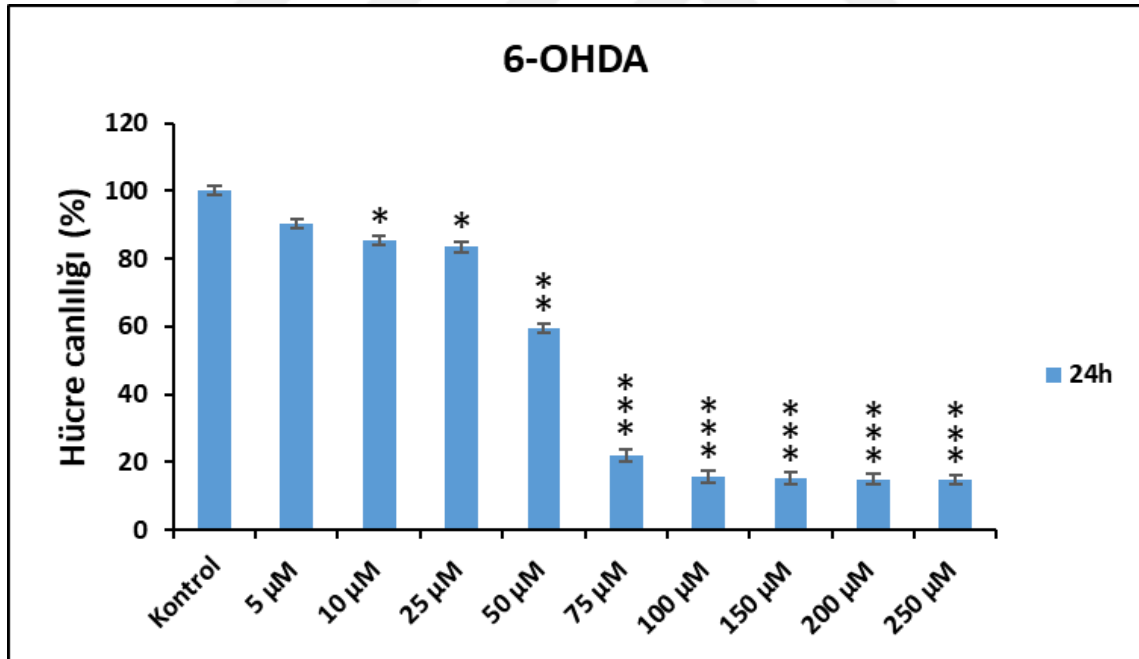
Gruplar arasındaki farklılıklar, elde edilen veriler SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. cDNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırılmıştır. Sürekli verileri karşılaştırmak için Student's t testi kullanıldı. P değerleri $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. SH-SY5Y hücrelerinde 6-OHDA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi

Bu çalışmada *in vitro* PH modeli 6-OHDA kullanılarak oluşturulmuştur. PH modelinin oluşturulmasında kullanılacak hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüren 6-OHDA konsantrasyonunun belirlenmesi için ilk olarak sitotoksikite analizi gerçekleştirilmiş ve hücreler farklı konsantrasyonlarda 6-OHDA ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; SH-SY5Y hücrelerinin 24 saat süresince 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 μ M konsantrasyonlarında 6-OHDA ile muamele edilmeleri sonrasında hücre canlılıkları sırası ile %83,52; 59,63; %21,81; %15,58; %15,35, %14,93 ve %14,64 olarak bulunmuştur. Ayrıca 6-OHDA SH-SY5Y hücrelerinde doza bağımlı şekilde sitotoksik etkiye sebep olmuş, Uygulanan tüm 6-OHDA dozları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.1.) ($p<0.05$).

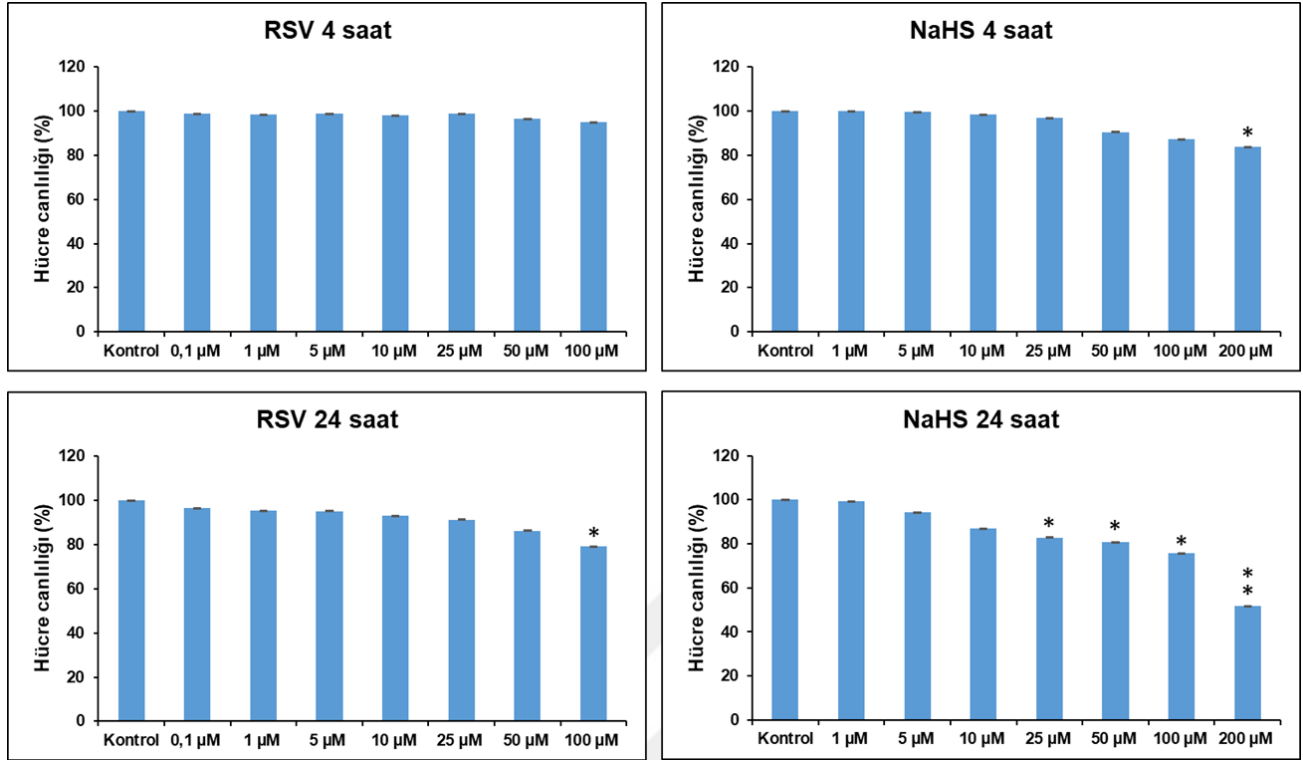


Şekil 4.1. 6-OHDA'nın 24 saat boyunca uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin.

4.2. SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın hücre canlılığı üzerine etkisi

RSV'nin SH-SY5Y hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile değerlendirilmiş ve hücreler 4 ve 24 saat süresince 0.1, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında RSV ile muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 4 ve 24 saat süre sonunda 0.1, 1, 5, 10, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarında RSV uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerinde anlamlı düzeyde bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0.05$), ancak 100 μ M konsantrasyonda RSV uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerinde 24 saat sonunda anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.2.A, C) ($p<0.05$).

NaHS'ın SH-SY5Y hücrelerindeki sitotoksik etkisi yine MTT analizi ile değerlendirilmiş ve hücreler 4 ve 24 saat süresince 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında NaHS ile muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 4 saat süre sonunda 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında NaHS uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerinde anlamlı düzeyde bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). 24 saat sonunda 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında NaHS uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerinde anlamlı düzeyde bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0.05$), ancak 24 saat süre sonunda 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonda NaHS uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı üzerinde 24 saat süre sonunda anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.2.B, D) ($p<0.05$). 24 saat sonunda 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarda NaHS uygulaması sonrasında hücre canlılıkları sırası ile %82,89, %80,61, %75,65 ve %51,81 olarak belirlenmiştir.



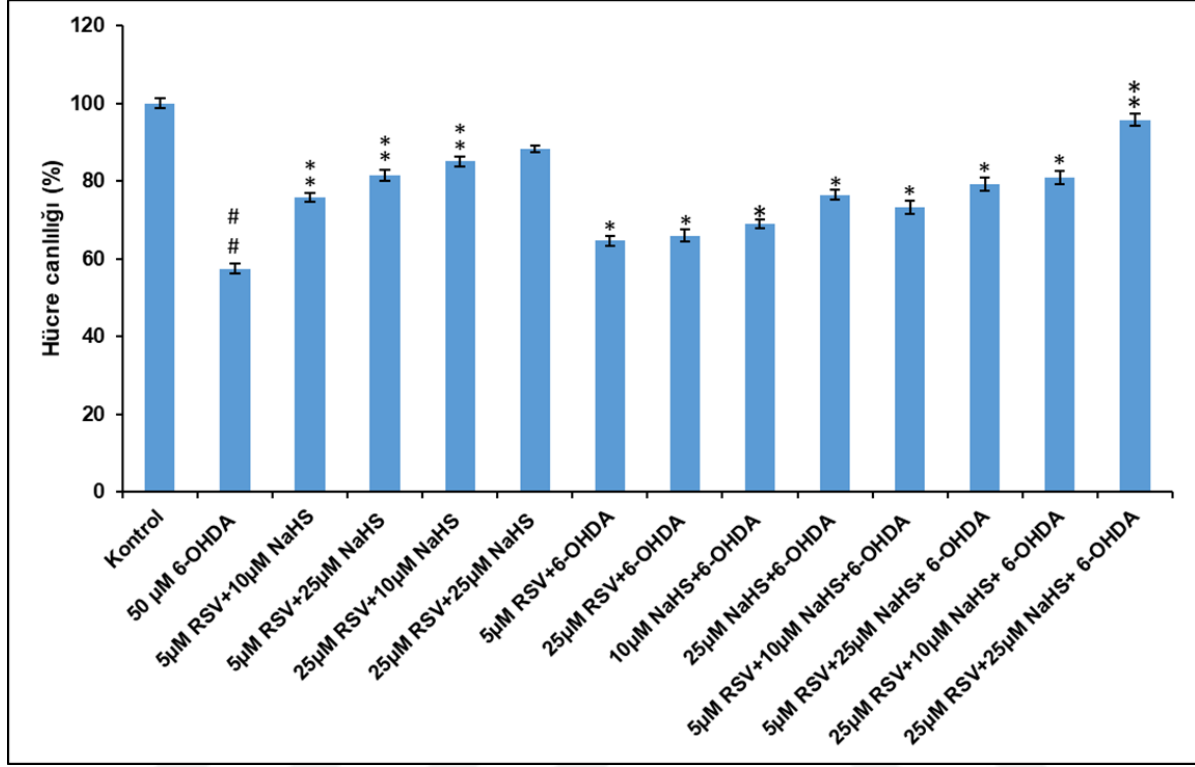
Şekil 4.2. (A) 4 saat RSV uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, (B) 4 saat NaHS uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, (C) 24 saat RSV uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, (D) 24 saat NaHS uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

4.3. 6-OHDA-indüklü sitotoksositeye karşı RSV ve NaHS'ın nöroprotektif etkisi

6-OHDA ile oluşturulmuş *in vitro* PH modelinde RSV ve NaHS'ın olası nöroprotektif etkisini açığa çıkarmak amacı ile RSV ve NaHS'ın SH-SY5Y hücrelerindeki toksik olmayan dozları kullanılmıştır. Bunun için hücreler 5 ve 25 μ M RSV ve 10 ve 25 μ M NaHS ile 4 saat süresince ön-muamele edilmiş, ardından kuyucuklardan RSV ve NaHS içeren besiyerleri çekilerek, 50 μ M 6-OHDA içeren besiyeri ile 24 saat süresince muamele edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 6-OHDA, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır ($p < 0.01$), RSV ve NaHS'ın birlikte uygulandığı konsantrasyonların hücre canlılığını anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür ($p < 0.05$), 25 μ M RSV + 25 μ M NaHS 4 saat ön uygulamasının, 6-OHDA ile muamele edilmiş hücreler ile

karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil q 4.3.).

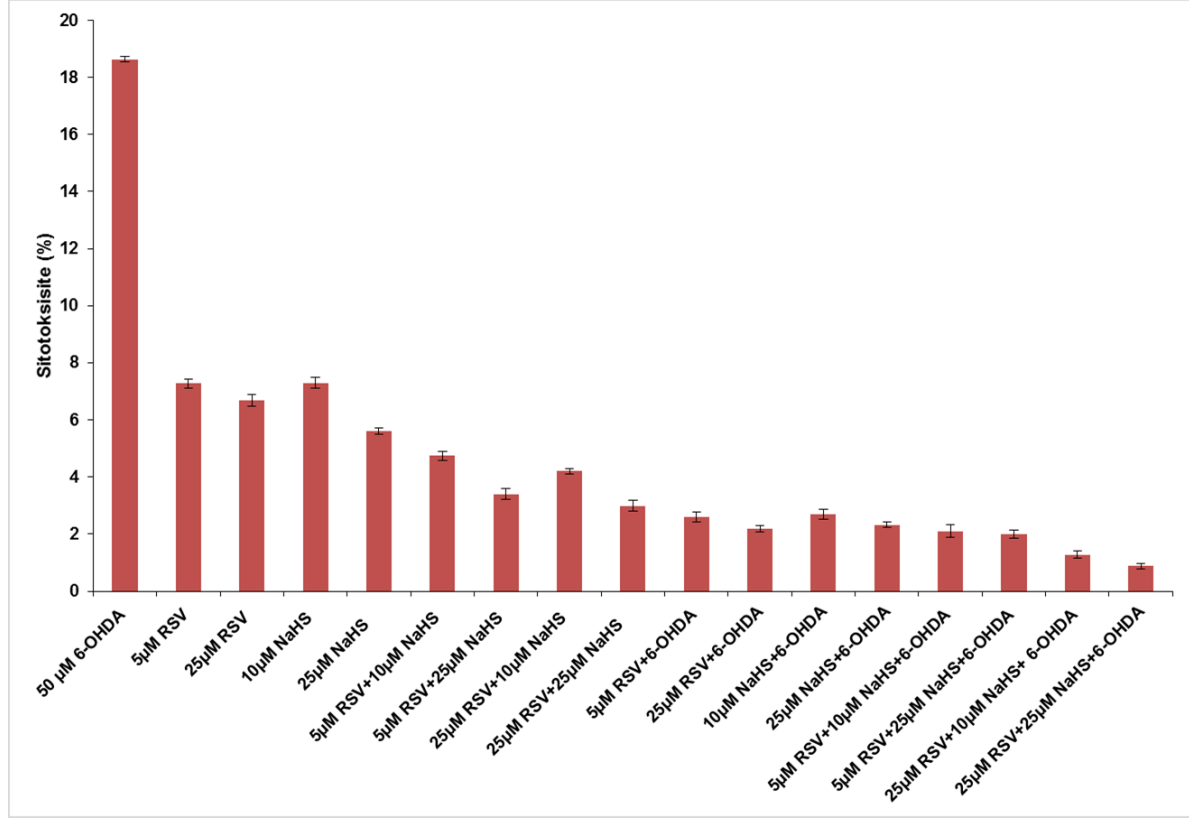


Şekil 4.3. 6-OHDA indüklü sitotoksositeye karşı RSV ve NaHS'in nöroprotektif etkisi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p<0.05$; ## $p<0.01$; ### $p<0.001$; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

4.4. 6-OHDA-indüklü sitotoksositeye karşı RSV ve NaHS'in sitotoksik etkisi

RSV ve NaHS'in SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 6-OHDA, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitotoksik etkisinin anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür ($p<0.001$). SH-SY5Y hücrelerinin 5 ve 25 µM RSV ile tek başına ön-uygulaması sonucunda ise, 6-OHDA ile indüklenen LDH salınımını azalttığı görülmüştür ($p<0.001$). Yine SH-SY5Y hücrelerinin 10 ve 25 µM NaHS ile tek başına ön-uygulama sonucunda ise, 6-OHDA ile indüklenen LDH salınımını azalttığı görülmüştür ($p<0.001$). Ancak kombine uygulamaların tek başına uygulamalardan daha etkili olduğu görülmüştür. SH-SY5Y

hücrelerinin RSV ve NaHS ile ön-muamelesi sonucunda ise, 6-OHDA ile indüklenen LDH salınımını anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür ($p<0.001$).

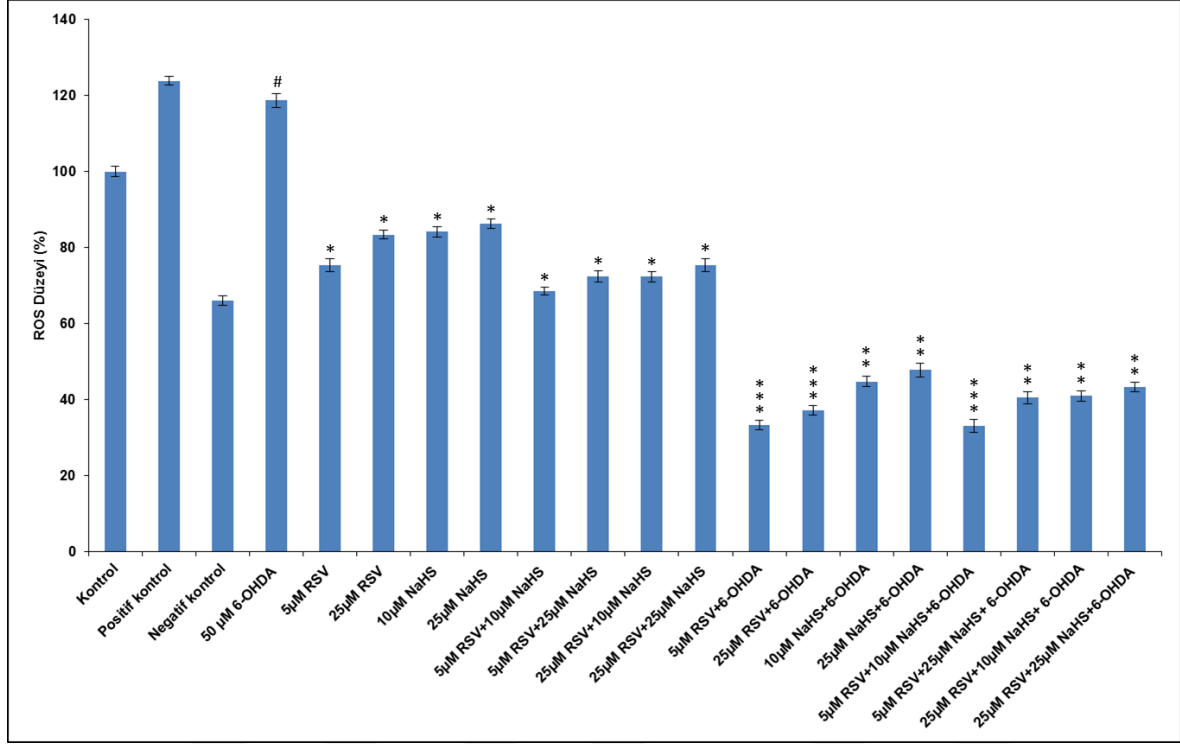


Şekil 4.4. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in LDH salınımı ile belirlenen sitotoksiste üzerindeki etkisi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $^{\#}p<0.05$; $^{##}p<0.01$; $^{###}p<0.001$; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

4.5. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in ROS seviyesi üzerine etkisi

ROS analiz sonuçlarına göre, 6-OHDA uygulaması SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ROS seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0.05$). 5 ve 25 μ M RSV ile tek başına ön-uygulama sonucunda, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, ROS seviyesinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0.01$). Yine 10 ve 25 μ M NaHS ile tek başına ön-uygulama sonucunda ise, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, ROS seviyesinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0.01$). RSV ve NaHS'in kombine konsantrasyonlarının ön-uygulama sonucunda 6-OHDA ile muamele

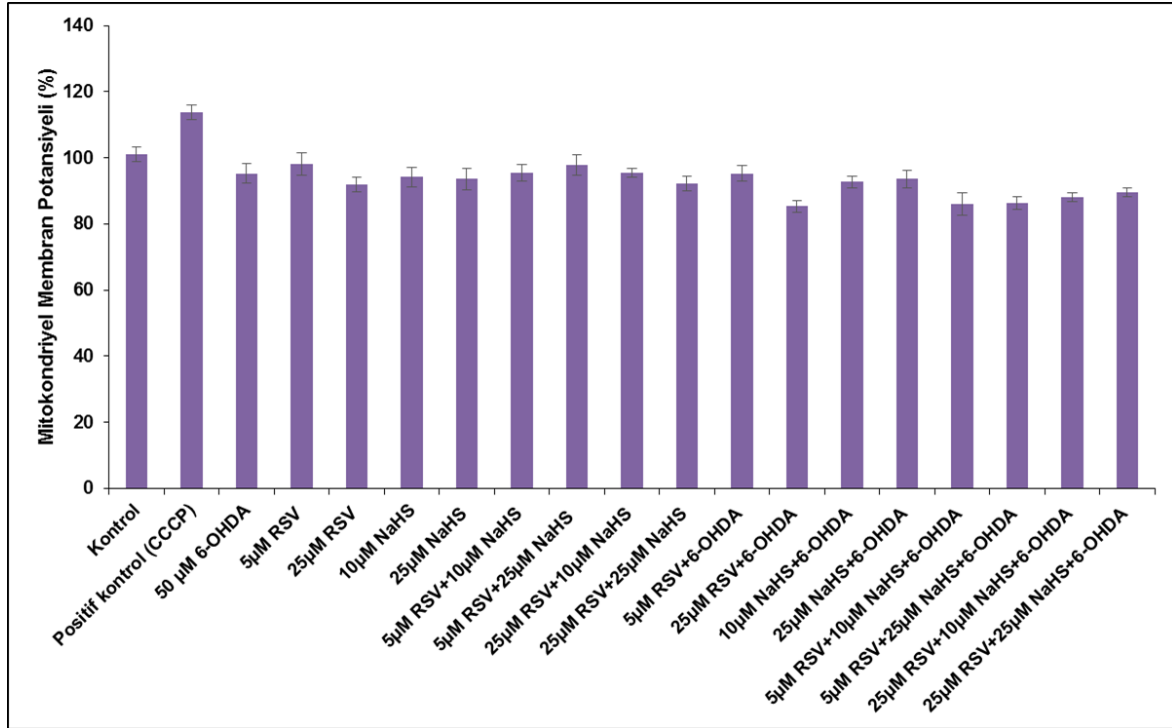
edilmiş hücre grubunda ise 6- OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, ROS seviyesinde anlamlı düzeyde bir azalma meydana gelmiştir ($p<0.01$)



Şekil 4.5. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in ROS seviyesi üzerine etkisi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p<0.05$; ## $p<0.01$; ### $p<0.001$; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

4.6. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in MMP üzerine etkisi

MMP analizi sonuçlarına göre, 6-OHDA uygulaması SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP seviyesinde artış görülmesine rağmen bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bununla birlikte RSV ve NaHS'in tek başlarına ve kombine önuygulamaları sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre gruplarında, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, MMP seviyesinde belirgin bir değişiklik görülmemiştir ($p>0.05$)



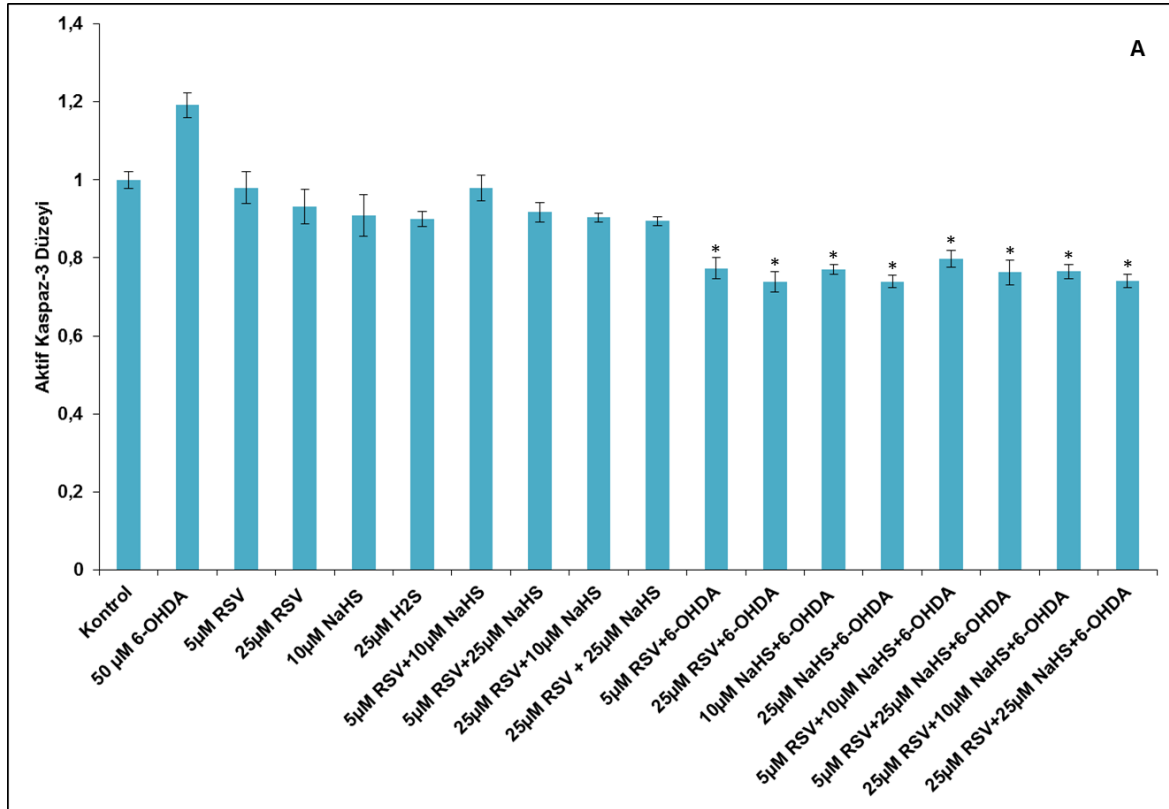
Şekil 4.6. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın MMP üzerine etkisi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

4.7. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-3, -8 ve 9 düzeyleri üzerine etkisi

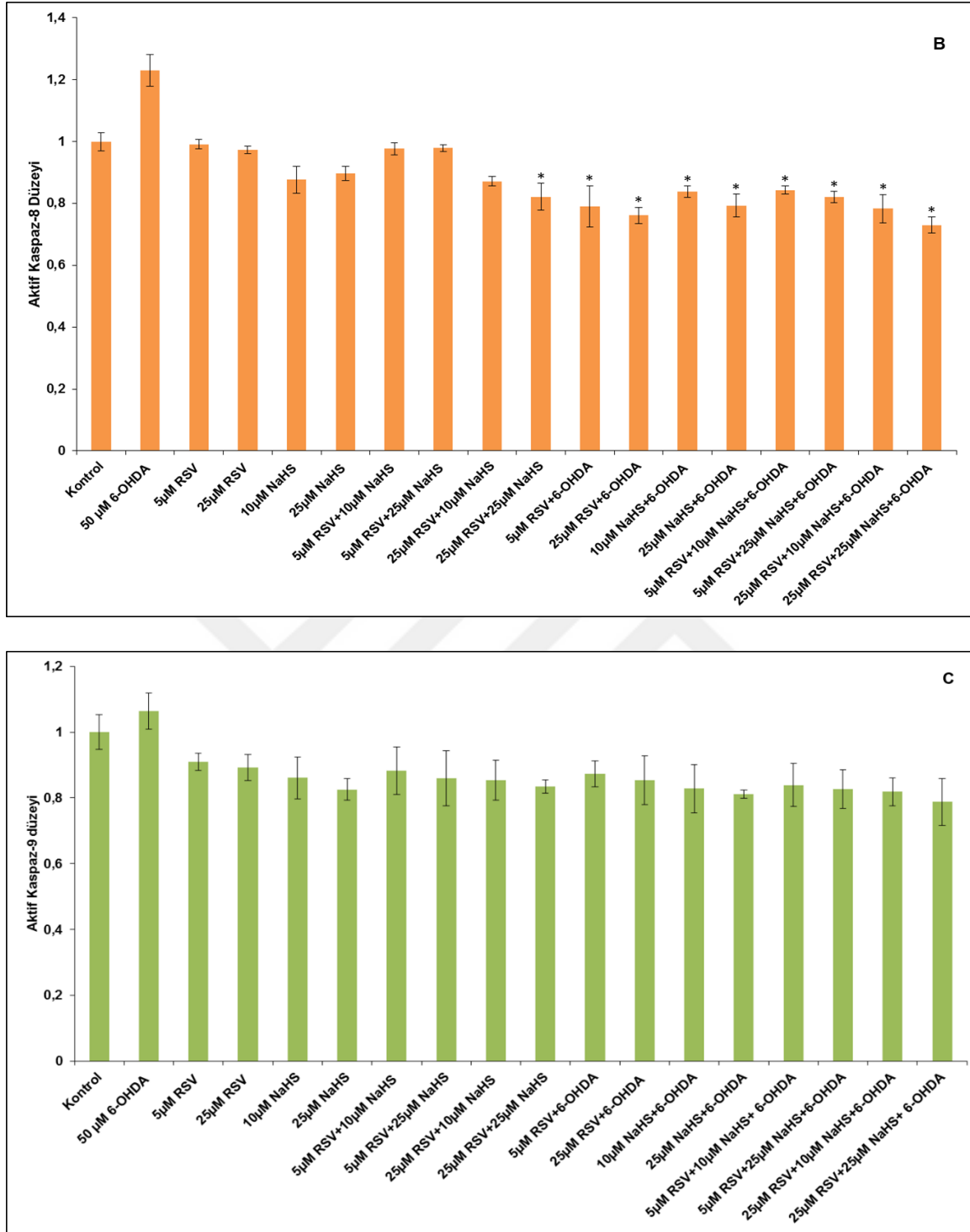
Kaspaz-3, -8 ve -9 aktivite düzeyi sonuçlarına göre, 6-OHDA uygulaması SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz-3 düzeyinde artış görülmesine rağmen bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Bununla birlikte RSV ve NaHS'ın tek başlarına ve kombine ön-uygulamaları sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre gruplarında, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Kaspaz-3 seviyesinde anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.7.A).

6-OHDA uygulaması SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz-8 seviyesinde artış görülmesine rağmen bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Bununla birlikte RSV ve NaHS'ın tek başlarına ve kombine ön-uygulamaları sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre gruplarında, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Kaspaz-8 seviyesinde anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.7.B).

6-OHDA uygulaması SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz-9 seviyesinde artış görülmesine rağmen bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bununla birlikte RSV ve NaHS'in tek başlarına ve kombine ön-uygulamaları sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre gruplarında, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Kaspaz-9 seviyesinde azalma görülmesine rağmen bu azalışın anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.7.C).



Şekil 4.7. (A) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, (B) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in Kaspaz-8 aktivitesi üzerine etkisi, (C) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'in Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkisi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p<0.05$; ## $p<0.01$; ### $p<0.001$; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

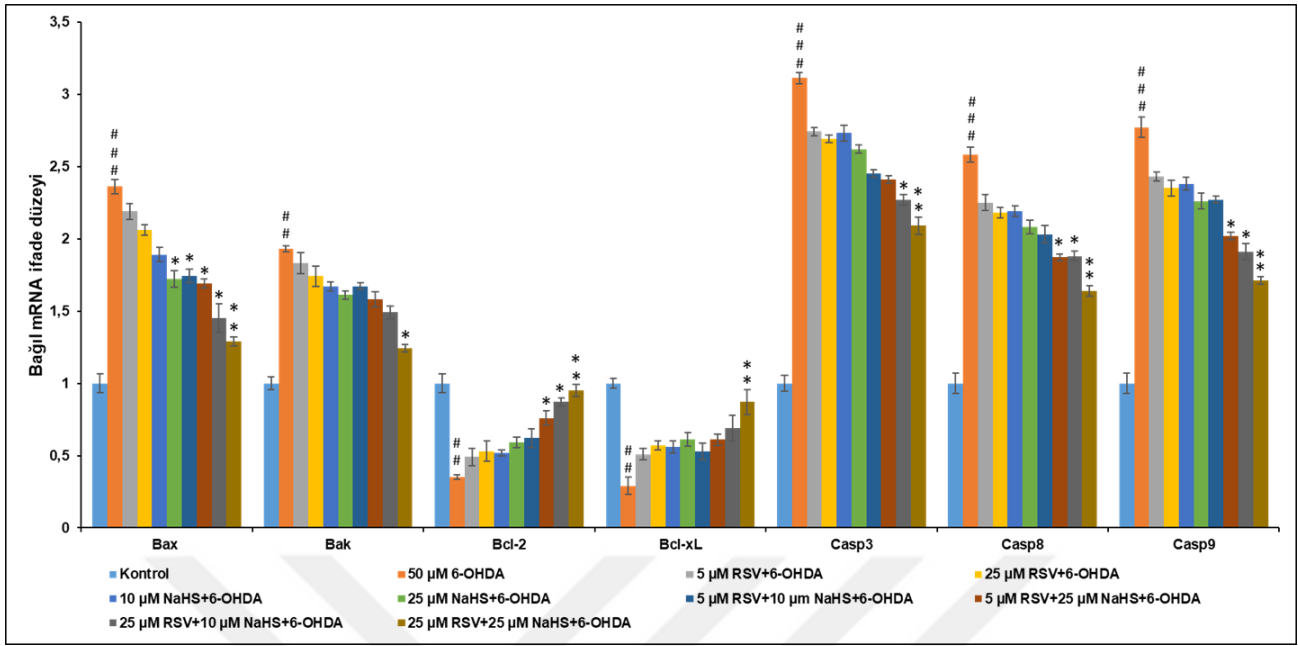


Şekil 4.7. (devam) (A) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, (B) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-8 aktivitesi üzerine etkisi, (C) 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkisi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, RSV: Resveratrol, NaHS: Sodyum hidrosülfür.

4.8. 6-OHDA-indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerine etkisi

Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3, Casp8 ve Casp9 genlerinin mRNA seviyeleri qPCR ile değerlendirilmiştir. 6-OHDA grubunda Bax, Bak, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde bir artış olduğu görülmüştür ($p<0.001$, $p<0.01$). 5 ve 25 μM RSV ile tek başına ön-uygulama sonucunda, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Bax, Bak, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA seviyelerinde azaldığı ancak bu azalışın anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Yine 10 ve 25 μM NaHS ile tek başına ön-uygulama sonucunda ise, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, benzer şekilde Bax, Bak, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA seviyelerinde azaldığı ancak bu azalışın anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). RSV ve NaHS'ın kombine konsantrasyonlarının ön-uygulama sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre grubunda ise 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Bax ve Bak mRNA seviyelerinde anlamlı düzeyde bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ancak RSV ve NaHS'ın kombine konsantrasyonlarının ön-uygulaması sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre grubunda ise 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA seviyelerinde azaldığı ancak bu azalışın anlamlı düzeyde bir azalış olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$).

6-OHDA grubunda Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). 5 ve 25 μM RSV ile tek başına ön-uygulama sonucunda, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA seviyelerinde arttığı ancak bu artışın anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Yine 10 ve 25 μM NaHS ile tek başına ön-uygulama sonucunda ise, 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, benzer şekilde Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA seviyelerinde arttığı ancak bu artışın anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). RSV ve NaHS'ın kombine konsantrasyonlarının ön-uygulama sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre grubunda ise 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA seviyelerinde anlamlı düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$).



Şekil 4.8. 6-OHDA indüklü SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS'ın inkübasyonu sonunda Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. 4 saat RSV ve NaHS ön-uygulamasının ardından 24 saat 6-OHDA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında [#]p<0.05; ^{##}p<0.01; ^{###}p<0.001; 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001. Casp3: Kaspaz 3, Casp8: Kaspaz 8, Casp9: Kaspaz 9, GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, 6-OHDA: 6-Hidroksidopamin, NaHS: Sodyum hidrosülfür, RSV: Resveratrol.



5. TARTIŞMA

PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda semptomları hafifletebilecek, hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilecek veya durdurabilecek yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun nedeni, PH'nın geleneksel tedavilere dirençli olması ve bu durumun uzun yıllardır klinik bir zorluk olarak devam ettiği literatürde vurgulanmasıdır [160].

Tıbbi bitkilerin tedavi amaçlı kullanımında kabuk, tohum ve meyveler de dahil olmak üzere çeşitli bitki bileşenlerinden yararlanılmaktadır [161]. Araştırmalar, bitkisel ilaçlar ve doğal ürünlerin PH tedavisinde yeni ve etkili ilaç adayları olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu doğal bileşikler, enflamasyon, mitokondriyel fonksiyon kaybı ve lizozomal hasar gibi PH'nin patogeneze katkıda bulunan süreçleri hedef alarak nörotoksiteyi azaltma yeteneğine sahiptir. Ayrıca, bu bileşiklerin, PH'na bağlı motor ve motor dışı semptomların tedavisinde önemli bir destekleyici rol oynayabileceği düşünülmektedir [162]. Alkaloidler, terpenoidler, saponinler ve fenolik kimyasallar gibi doğal tıbbi bileşiklerin umut verici nöroprotektif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu bileşikler, PH'nın ilerlemesini yavaşlatabilecek veya hastalıkla ilişkili semptomların kontrol altına alınmasına katkı sağlayabilecek yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır [163].

Yüksek lisans tez çalışmamızda, dopaminerjik nöron kaybıyla karakterize edilen bir nörodejeneratif hastalık olan PH modeli *in vitro* olarak uygulanmıştır. Bu modelde, birçok bitkide doğal olarak bulunan ve güçlü antioksidan özelliği sayesinde nöroprotektif etkiler gösterebilen bir polifenolik bileşik olan RSV ile başlıca endojen gaz ileticilerinden biri olarak bilinen H₂S donörü olan NaHS'in, nörotoksik 6-OHDA kaynaklı nörodejenerasyona karşı potansiyel bir nöromodülatör etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, RSV ve NaHS'in, 6-OHDA ile indüklenmiş SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki nöroprotektif etkileri değerlendirilmiştir.

PH tedavisinde polifenolik bileşiklerin terapötik potansiyelini değerlendirmek amacıyla PubMed, ScienceDirect, Scopus ve Google Scholar veri tabanlarında kapsamlı bir literatür taraması sonucunda, elde edilen bulgular, polifenolik bileşiklerin PH tedavisinde kullanıldığında daha etkili sonuçlar sağladığını ve geleneksel tedavilere kıyasla daha az yan etki gösterdiğini ortaya koymuştur [164, 165, 166, 167]. Oksidatif stres,

nöroinflamasyon, anormal protein birikimi, mitokondriyal fonksiyon kaybı, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz gibi PH patogenezinin katkıda bulunan çeşitli süreçler, fitokimyasalların terapötik etkilerinin odak noktasıdır. Flavonoidler ve polifenolik bileşikler gibi antioksidanlar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stresi azaltma kapasitesine sahiptir ve bu sayede uzun vadede nörodejeneratif hastalıkların gelişme riskini düşürebilir. Bu bağlamda, polifenollerin, nörolojik bozukluklardan etkilenen bireylerin yaşam kalitesini iyileştirmede önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir [168]. Özellikle RSV gibi doğal polifenolik bileşiklerin, Parkinson hastaları için koruyucu ve tedavi edici bir potansiyele sahip olduğu ileri sürülmektedir [169].

NaHS, anti inflamatuvar, bağışıklık düzenleyici ve antibakteriyel savunmayı güçlendirici özellikleriyle dikkat çeken bir biyomoleküldür. Bu özellikleri sayesinde, PH dahil olmak üzere nörodejeneratif bozukluklara karşı korunmada önemli rol oynayabilir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, PH modelinde NaHS'ın anti inflamatuvar, anti apoptotik ve antioksidan özellikler sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgular, NaHS'ın nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yenilikçi bir terapötik ajan olarak değerlendirilme potansiyelini ortaya koymaktadır [101].

Araştırmalar, PH'da yalnızca mitokondriyal fonksiyon kaybının değil, aynı zamanda proteinlerin yanlış katlanması ve dopamin nöronlarının dejenerasyonuna yol açan ubiquitin-proteozom sistemi (UPS) fonksiyon kaybının da önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, nörodejenerasyonun ilerleyişini açıklayan kritik moleküler mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır. Diğer yandan, RSV'nin PH'nın seyrini durdurmada ve kalsiyum artışını önlemede faydalı olduğu bir araştırmada gösterilmiştir. RSV'in periferik sinir hasarını takiben hızlı sinir rejenerasyonunu ve motor iyileşmeyi destekleme mekanizması incelendiğinde, düzenli RSV tedavisine başlandıktan 10 gün sonra, siyatik sinir sıkışması hasarının neden olduğu motor bozuklukların iyileştiği ve hasarlı sinirin distal kısmında RSV'nin akson sayısını artırarak sinir rejenerasyonunu desteklediği görüldü [170]. Yine omurilik hasarı hayvan modeli üzerinde yapılan bir başka çalışmaya göre, RSV omurilik fonksiyonunun yenilenmesinde düzenleyici bir role sahip olduğu, RSV, Wnt/ β -katenin sinyal sistemini kontrol ederek, omurilik hasarını takiben doku hasarını, aksonal rejenerasyonu ve fonksiyon iyileşmesini artırdığı, apoptoz düzeyini azalttığı görüldü [171].

Hücre ve hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalar, RSV'nin terapötik etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu etkinin, RSV'nin antioksidan, anti inflamatuvar ve hücre koruyucu özelliklere sahip bileşikler içermesi sayesinde, mitokondri dinamiklerini düzenleyerek nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki olumlu etkileriyle ilişkili olduğu belirtilmektedir [172-173]. Çalışmamızda RSV ve NaHS'ın 4 saat süreyle ayrı ayrı ve birlikte ön uygulanmasının ardından hücreler 24 saat süre ile 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmiştir. RSV'nin SH-SY5Y hücrelerine tek başına uygulandığında hücre canlılığını 6-OHDA grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttırdığı ve sitotoksisiteyi anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Sonuçlarımız ile uyumlu olacak şekilde yapılan bir çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 30 dakika süre ile RSV ön uygulamasının ardından 24 saat süre boyunca 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda hücre canlılığını benzer şekilde arttırdığı ve sitotoksisiteyi azalttığı görülmüştür [174]. Yine benzer şekilde bir başka çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 2 saat süre ile RSV ön uygulamasının ardından 20-24 saat süre 60 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda hücre canlılığını sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde arttırdığı ve sitotoksisiteyi azalttığı görülmüştür [175]. Yapılan bir araştırmada RSV'nin sıçanlarda 6-OHDA ile oluşturulan PH üzerindeki nöroprotektif etkileri incelenmiştir. Sıçanlarda 6-OHDA'nın neden olduğu PH modeli oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon kaybı SN'de dopaminerjik hücre ölümü ile karakterizedir. Çalışmaya göre RSV, sıçan substantia nigrasında 6-OHDA ile indüklenen kromatin yoğunlaşmasını, mitokondriyal genişlemeyi ve dopaminerjik nöron vakuolasyonunu inhibe etti. Ayrıca, gerçek zamanlı PCR, substantia nigrada TNF-alfa ve COX-2 mRNA seviyelerinde önemli bir azalma olduğunu ortaya koydu [176].

Çalışmamızda NaHS'ın SH-SY5Y hücrelerine tek başına uygulandığında hücre canlılığını 6-OHDA grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttırdığı ve sitotoksisiteyi anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Sonuçlarımız ile uyumlu olacak şekilde yapılan bir çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 10 dakika ve 1 saat süre ile NaHS ön uygulamasının ardından 12 saat süre boyunca 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda hücre canlılığını arttırdığı ve sitotoksisiteyi azalttığı görülmüştür [177]. Yine benzer şekilde bir başka çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 10 dakika süre ile NaHS ön uygulamasının ardından 12 saat süre 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda hücre canlılığını sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde arttırdığı ve sitotoksisiteyi azalttığı görülmüştür [178].Yapılan bir başka çalışmada H₂S'in PH üzerindeki terapötik etkisi incelendiğinde, 6-OHDA kaynaklı PH sıçan modelinde SN'de endojen H₂S düzeyinin belirgin şekilde azaldığı, H₂S donörü olan

NaHS'in sistemik uygulanmasının ise, 6-OHDA kaynaklı PH modelinde hareket bozukluğu ilerlemesini, SN'deki tirozin-hidroksilaz pozitif nöronların kaybını ve hasarlı striatumdaki yüksek malondialdehit seviyesini önemli ölçüde tersine çevirdiği görülmüştür [179]. NaHS, oksidatif stres, anti inflamatuvar ve metabolik inhibisyon gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla nörotoksin kaynaklı nörodejenerasyonu önlemek için nöroprotektif bir ajan olarak hareket ederek PH için olası bir tedavi olarak kullanılabilir.

Yapılan literatür taramasında, RSV ve NaHS'ın etkilerinin SH-SY5Y hücrelerine veya farklı hücre hatlarında birlikte araştırıldığı *in vitro* Parkinson modeli ve *in vivo* deneysel hayvan modelleri üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yüksek lisans tez çalışmamız SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde bu iki ajanın nöroprotektif etkilerinin birlikte değerlendirildiği ilk özgün çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu, RSV ve NaHS'ın kombine konsantrasyonlarının, 6-OHDA'nın ROS seviyesindeki artışını daha etkin şekilde baskılamasıdır. Hem 5 μ M ve 25 μ M RSV, hem de 10 μ M ve 25 μ M NaHS ön-uygulamalarının 6-OHDA tarafından indüklenen ROS seviyelerinde anlamlı bir azalma sağladığı görülmüştür. Benzer şekilde, RSV ve NaHS birlikte ön-uygulanmasının ardından 6-OHDA ile indüklenen ROS seviyelerindeki artışı belirgin düzeyde baskılamıştır. Bu bulgular, RSV'nin güçlü antioksidan özelliklerini ve NaHS'ın reaktif oksijen türlerini baskılama yeteneğini vurgulamaktadır [180]. Daha önce yapılan çalışmalar, RSV'nin antioksidan savunma mekanizmalarını destekleyerek hücre hasarını önlediğini ortaya koymuştur [181, 182]. Bu bulgu, oksidatif stresin nörodejeneratif süreçlerdeki merkezi rolüne dikkat çeken önceki araştırmalarla uyum göstermektedir [183]. Oksidatif stresin hücre içi dengenin bozulmasına yol açarak mitokondriyal fonksiyon kaybını ve apoptozu tetiklediği belgelenmiştir [184, 185]. Bu çalışmalardan birinde MPP ile indüklenen MES23.5 DA hücrelerine L-Dopa ve RSV'nin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucunda ROS düzeyinde belirgin bir azalma görülmüştür [186]. NaHS'ın ise başka bir çalışmada mitokondriyal işlevleri koruyucu etkiler gösterdiği ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir [187]. Bu sonuç, RSV ve NaHS'ın sinerjik etkilerinin, hücresel düzeyde oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [188, 189]. Kombine uygulamaların etkileri, her iki molekülün farklı biyokimyasal yollardan etki ederek hücresel stres yanıtlarını modüle edebileceğini göstermektedir. RSV ve NaHS'ın

nöroprotektif özelliklerinin, oksidatif stres ve apoptozun önlenmesinde potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilmesi gerektiği açıktır [190, 191].

Çalışmamızda PH oluşturmak için kullandığımız 6-OHDA hücrelerde serbest oksijen radikallerinin seviyesini ciddi oranda artırmaktadır. Bu mekanizma, hücreyi P-38 MAPK yoluyla doğrudan apoptoza yönlendirebilir veya Bax ve Bcl-2 proteinleri ile etkileşime girerek mitokondriyal fonksiyon kaybına yol açabilir. Mitokondriyal düzeyde Bax/Bcl-2 dengesinin bozulması, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını artırarak pro-apoptotik kaspazlardan biri olan kaspaz-9'un aktivitesini yükseltebilir. Sitoplazmada kaspaz-9 aktivitesinin artışı ise kaspaz-3'ün aktive olmasını teşvik ederek apoptozun ilerlemesini sağlar. Çalışmamızda RSV ve NaHS'ın ROS üzerine etkilerinin yanı sıra, mitokondriyal fonksiyon kaybı ve apoptoz üzerine etkilerini de araştırdık.

Ragonese ve ark., yapmış oldukları bir çalışmada RSV'nin mitokondriyal aktiviteyi doza bağımlı bir şekilde artırarak ATP üretimi ve hücrel farklılaşmayı teşvik ettiği, aynı zamanda mitokondriyal biyogenezi desteklediği rapor edilmiştir. Ancak, *in vitro* modelimizde yaptığımız MMP analizleri, 6-OHDA uygulamasının kontrol grubuna kıyasla MMP seviyesini arttırdığını göstermiştir. RSV ve NaHS'ın tek başına veya kombinasyon halinde uygulanmasının ise, 6-OHDA ile muamele edilen hücrelerde MMP seviyesinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu farklılıklar, çalışmamızda kullanılan 6-OHDA ile indüklenmiş nörotoksik modelinin spesifik özelliklerinden ve RSV'nin etkisinin nörodejeneratif bir ortamda farklı şekilde ortaya çıkmasından kaynaklanabilir. Literatürde, RSV'nin mitokondriyal biyogenezi destekleyen etkilerinin genellikle sağlıklı hücre modellerinde daha belirgin olduğu bildirilmiştir, ancak nörotoksik ajanlarla önceden muamele edilmiş hücrelerde RSV'nin etkisinin, hücre içi redoks dengesi ve mitokondriyal dinamikler gibi faktörlerden etkilenebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalardan birinde MMP ile indüklenen MES23.5 DA hücrelerine L-Dopa ve RSV'nin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucunda 6-OHDA grubuna kıyasla MMP düzeyinde anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür [186]. Benzer şekilde, NaHS'ın mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkileri, konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu bağlamda, bulgularımız, RSV ve NaHS'ın MMP üzerindeki etkilerinin belirli hücrel koşullarda sınırlı olabileceğini ve bu tür ajanların terapötik etkinliğini değerlendirmek için daha kapsamlı çalışmaların gerekli olduğunu göstermektedir [192].

Çalışmamızda RSV ve NaHS'in apoptoz mekanizması üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Bulgularımız, 6-OHDA uygulamasının Kaspaz -3, -8 ve -9 aktivitelerinde artışa neden olduğunu, ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, RSV ve NaHS'in tek başına veya kombine ön-uygulamalarının, Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 aktivitelerinde anlamlı azalma sağladığı ve böylece apoptozu baskıladığı, ancak kaspaz-9 aktivite düzeyindeki azalma ise anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Aynı zamanda RSV ve NaHS'in kombine konsantrasyonlarının ön-uygulaması sonucunda 6-OHDA ile muamele edilmiş hücre grubunda ise 6-OHDA grubu ile karşılaştırıldığında, Bax, Bak, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA seviyelerinde anlamlı düzeyde bir azalış olduğu ve Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA seviyelerinde anlamlı düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda RSV ve NaHS'in Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 seviyelerindeki anlamlı düşüşe olan etkileri, RSV'nin literatürde bildirilen dışsal apoptoz yolağındaki koruyucu etkileri ile tutarlıdır. Ancak, Kaspaz-9 üzerindeki sınırlı etkiler, mitokondriyal apoptoz yolağında RSV ve NaHS'in daha az belirgin etkiler gösterebildiğini veya bu etkilerin zaman ve doz bağımlı olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlarımız ile uyumlu olacak şekilde yapılan bir çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 10 dakika ve 1 saat süre ile NaHS ön uygulamasının ardından 12 saat süre boyunca 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda apoptozu azalttığı görülmüştür [177]. Yine benzer şekilde bir başka çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 10 dakika ve 1 saat süre ile NaHS ön uygulamasının ardından 12 saat süre boyunca 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda apoptozu azalttığı görülmüştür [177]. Yine benzer şekilde bir başka çalışmada SH-SY5Y hücre hattına 10 dakika süre ile NaHS ön uygulamasının ardından 12 saat süre 50 μ M 6-OHDA ile inkübe edilmesi sonucunda apoptoz düzeyini azalttığı görülmüştür [178]. Ayrıca bir başka çalışmada MPP⁺ ile indüklenen MES23.5 DA hücrelerine L-Dopa ve RSV'nin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucunda 6-OHDA grubuna kıyasla apoptoz düzeyinde anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür [186].

Sonuç olarak çalışmamız, SH-SY5Y hücre hattında RSV ve NaHS'in 6-OHDA'nın zararlı etkilerine karşı düşük konsantrasyonlarda nöroprotektif özelliğini gösteren ilk çalışmadır. Bulgularımız diğer prelinik *in vitro*, *in vivo* modeller ve klinik araştırmalar ile doğrulanırsa, PH ile ilişkili nörodejenerasyona karşı daha etkin terapötik stratejiler geliştirmek için umut verici bir araç olabileceği özelliği gösterebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda 6-OHDA ile oluşturulmuş *in vitro* PH modelinde RSV ve NaHS'ın olası nöroprotektif etkisini açığa çıkarmak amaçlandı. Bu amaçla SH-SY5Y hücre hattında, çeşitli konsantrasyon ve sürelerde RSV ve NaHS'ın tek başlarına ve birlikte ön uygulamasının ardından 6-OHDA ile *in vitro* PH modeli oluşturulan hücreler üzerindeki nöroprotektif etkilerini araştırmak ve RSV ile NaHS'ın terapötik potansiyelini ortaya çıkarmaktır.

6-OHDA indüksiyonu, çözeltinin farklı konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde belirgin bir hücre canlılığı kaybına, LDH salınımında anlamlı artışa, kaspaz-3, -8 ve -9 protein aktivitelerinin yükselmesine, ROS oluşumunda artışa ve mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir bozulmaya yol açmıştır. Bu bulgular, 6-OHDA'nın hücre hasarını tetiklediği ve oksidatif stresle ilişkili mekanizmalar üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

RSV ve NaHS'ın eş zamanlı olarak uygulanması, hücre canlılığında anlamlı bir iyileşme sağlamıştır. Ayrıca, bu kombinasyonun LDH salınımını azaltarak hücre zar bütünlüğünü koruduğu, kaspaz -3, -8 ve -9 aktivitelerindeki artışı az da olsa baskıladığı, ROS üretimini önemli ölçüde düşürdüğü, mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulmayı engellediği ve apoptozda görevli genler olan Bax, Bak, Casp3, Casp8 ve Casp9 mRNA seviyelerini azaltırken, Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA seviyelerini arttırdığı görülmüştür. Bu durum, RSV ve NaHS'ın apoptoz, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon kaybı gibi hücresel süreçler üzerinde koruyucu etkiler sergileyebileceğini göstermektedir. Çalışmamız, SH-SY5Y hücrelerinde RSV ve NaHS ön uygulamasının ardından, 6-OHDA ile *in vitro* PH modeli oluşturulması sonucu nöroprotektif etkilerini gösteren ilk çalışma niteliğindedir.

Elde edilen sonuçlar, düşük konsantrasyonlarda RSV ve NaHS'ın, 6-OHDA'nın toksik etkilerine karşı nöroprotektif bir potansiyel taşıdığını desteklemektedir. Bu bulgular, PH gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili hücresel hasar mekanizmalarının yönetiminde NaHS'ın terapötik uygulamalar için umut vaat eden bir yaklaşım olabileceğini önermektedir. Dahası, bu kombinasyonun oksidatif stres ve apoptozun inhibisyonunda sinerjik bir etki yaratma potansiyeli, nörodejeneratif süreçlere karşı geliştirilecek yenilikçi stratejiler için dikkate değer bir temel oluşturabilir.



KAYNAKLAR

1. Austin, C. P., Cutillo, C. M., Lau, L. P., Jonker, A. H., Rath, A., Julkowska, D., Thomson, D., Terry, S.F., de Montleau, B., Ardigò, D. and Hivert, V., and International Rare Diseases Research Consortium. (2017). Future of rare diseases research 2017–2027: an IRDiRC perspective. *Clinical and translational science*, 11(1), 21.
2. Rauf, A., and Rahman, M. M. (2022). Potential therapeutics against neurological disorders: Natural products-based drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 950457.
3. Awuchi, C. G. (2023). Plants, phytochemicals, and natural practices in complementary and alternative system of medicine for treatment of central nervous system disorders. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 1190-1213.
4. Cristina Campos, H., Divino da Rocha, M., Pereira Dias Viegas, F., Carolina Nicastro, P., Calve Fossaluzza, P., Alberto Manssour Fraga, C., J Barreiro, E. and Viegas, C. (2011). The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders I: Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 10(2), 239-250.
5. Parkinson, J. (1969). An essay on the Shaking Palsy. *Archives of Neurology*, 20(4), 441-445.
6. Houghton, P. J., and Howes, M. J. (2005). Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals*, 14(1-2), 6-22.
7. Rahman, M. M., Wang, X., Islam, M. R., Akash, S., Supti, F. A., Mitu, M. I., Harun-Or-Rashid, M., Aktar, M.N., Khatun Kali, M.S., Jahan, F.I. and Sharma, R. (2022). Multifunctional role of natural products for the treatment of Parkinson's disease: at a glance. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 976385.
8. Przedborski, S. (2017). The two-century journey of Parkinson disease research. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(4), 251-259.
9. Sharma, R., Kabra, A., Rao, M. M., and Prajapati, P. K. (2018). Herbal and holistic solutions for neurodegenerative and depressive disorders: leads from Ayurveda. *Current pharmaceutical design*, 24(22), 2597-2608.
10. Li, J., Long, X., Hu, J., Bi, J., Zhou, T., Guo, X., Han, C., Huang, J., Wang, T., Xiong, N. and Lin, Z. (2019). Multiple pathways for natural product treatment of Parkinson's disease: A mini review. *Phytomedicine*, 60, 152954.

11. Safiri, S., Noori, M., Nejadghaderi, S. A., Mousavi, S. E., Sullman, M. J., Araj-Khodaie, M., Singh, K., Kolahi, A.A. and Gharagozli, K. (2023). The burden of Parkinson's disease in the Middle East and North Africa region, 1990–2019: results from the global burden of disease study 2019. *BMC Public Health*, 23(1), 107.
12. Ou, Z., Pan, J., Tang, S., Duan, D., Yu, D., Nong, H., and Wang, Z. (2021). Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. *Frontiers in public health*, 9, 776847.
13. Rocca, W. A. (2018). The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *The Lancet Neurology*, 17(11), 928-929.
14. Ferrazzoli, D., Carter, A., Ustun, F. S., Palamara, G., Ortelli, P., Maestri, R., Yücel, M. and Frazzitta, G. (2016). Dopamine replacement therapy, learning and reward prediction in Parkinson's Disease: implications for rehabilitation. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10, 121.
15. You, H., Mariani, L. L., Mangone, G., Le Febvre de Nailly, D., Charbonnier-Beaupel, F., and Corvol, J. C. (2018). Molecular basis of dopamine replacement therapy and its side effects in Parkinson's disease. *Cell and tissue research*, 373, 111-135.
16. Wu, C., Wu, H., Zhou, C., Guan, X., Guo, T., Cao, Z., Wu, J., Liu, X., Chen, J., Wen, J. and Qin, J., (2023). Normalization effect of dopamine replacement therapy on brain functional connectome in Parkinson's disease. *Human Brain Mapping*, 44(9), 3845-3858.
17. Eriksen, J. L., Wszolek, Z., and Petrucelli, L. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson disease. *Archives of neurology*, 62(3), 353-357.
18. Jankovic, J., and Hurtig, H. (2023). Epidemiology, pathogenesis, and genetics of Parkinson disease. *UpToDate*. Waltham (MA): UpToDate.
19. Alexander, G. E. (2004). Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in clinical neuroscience*, 6(3), 259-280.
20. Lee, F. J., and Liu, F. (2008). Genetic factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain research reviews*, 58(2), 354-364.
21. Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 139, 318-324.

22. Bonnet, A. M., Jutras, M. F., Czernecki, V., Corvol, J. C., and Vidailhet, M. (2012). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinson's disease*, 2012(1), 198316.
23. De Lau, L. M., and Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(6), 525-535.
24. Polymeropoulos, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., Johnson, W. G., Ide, S. E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A. and Lazzarini, A.M., (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, 274(5290), 1197-1199.
25. Hernandez, D. G., Reed, X., and Singleton, A. B. (2016). Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *Journal of neurochemistry*, 139, 59-74.
26. Billingsley, K. J., Bandres-Ciga, S., Saez-Atienzar, S., and Singleton, A. B. (2018). Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Cell and tissue research*, 373, 9-20.
27. Zilocchi, M., Colugnat, I., Lualdi, M., Meduri, M., Marini, F., Corasolla Carregari, V., Moutaoufik, M.T., Phanse, S., Pieroni, L., Babu, M. and Garavaglia, B., (2020). Exploring the impact of PARK2 mutations on the total and mitochondrial proteome of human skin fibroblasts. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 504405.
28. Kalia, L. V., and Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896-912.
29. Gorell, J. M., Johnson, C. C., Rybicki, B. A., Peterson, E. L., and Richardson, R. J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, 50(5), 1346-1350.
30. Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
31. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
32. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
33. Frei, B., Birlouez-Aragon, I., and Lykkesfeldt, J. (2012). Authors' perspective: What is the optimum intake of vitamin C in humans?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(9), 815-829.

34. Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, 4(2), 89.
35. Lindahl, T., and Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897-1905.
36. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89-116.
37. Aydemir, B., ve Sarı, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
38. Sen, S., and Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. In *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy* (pp. 1-37). American Chemical Society.
39. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
40. McGregor, J., Cody, V., Middleton, E., and Liss, A. R. (1986). Plant flavonoids in biology and medicine.
41. Brouillard, R., and Cheminat, A. (1988). Flavonoids and plant color. *Progress in clinical and biological research*, 280, 93-106.
42. Kuhnau, J. (1976). A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Reviews Nutrition and Dietetics*, 24, 117-191.
43. Huyut, Z., Beydemir, Ş., and Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry research international*, 2017(1), 7616791.
44. Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*, 5(6), 493-506.
45. Pervaiz, S., and Holme, A. L. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2851-2897.
46. Ungvari, Z., Labinskyy, N., Mukhopadhyay, P., Pinto, J. T., Bagi, Z., Ballabh, P., Zhang, C., Pacher, P. and Csizsar, A., (2009). Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(5), H1876-H1881.

47. Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellierino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current biology*, 16(3), 296-300.
48. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P. and Geny, B., (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127(6), 1109-1122.
49. Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K. and Pistell, P.J., (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342.
50. Guarente, L. (2013). Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes & development*, 27(19), 2072-2085.
51. Donmez, G. (2012). The sirtuin 1 mechanism in aging and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 11(8), 837-843.
52. Wenzel, P., Schuhmacher, J., Kienzle, J., Müller, A., Schulz, N., Oelze, T., Schuler, A., Hortmann, A., Wallrapp, K. M., Münzel, H., Münzel, T., and Daiber, A. (2005). Resveratrol improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats through the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Hypertension*, 47(5), 1182-1188.
53. Asiful Islam, M., Saif Khandker, S., Alam, F., Ibrahim Khalil, M., Amjad Kamal, M., and Hua Gan, S. (2017). Alzheimer's disease and natural products: Future regimens emerging from nature. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1408-1428.
54. Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.
55. Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., and Tillement, J. P. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research*, 25(2-3), 87-97.
56. Karuppagounder, S. S., Pinto, J. T., Xu, H., Chen, H. L., Beal, M. F., and Gibson, G. E. (2009). Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 54(2), 111-118.
57. Marambaud, P., Zhao, H., and Davies, P. (2005). Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37377-37382.

58. Jiang, H., Shang, X., and Su, J. (2016). Resveratrol alleviates dopaminergic neuron damage and α -synuclein accumulation in Parkinson's disease models. *Neuroscience Letters*, 633, 161-167.
59. Lu, X., Yang, X., and Li, S. (2017). Resveratrol protects against dopaminergic neuron loss in a Parkinson's disease model by inhibiting oxidative stress. *Molecular Neurobiology*, 54(1), 750-762.
60. Bhat, K. P., Kosmeder, J. W., and Pezzuto, J. M. (2001). Biological effects of resveratrol. *Antioxidants and redox signaling*, 3(6), 1041-1064.
61. Yang, H., Zhang, W., Pan, H., Feldser, H. G., Lainez, E., Miller, C., Leung, S., Zhong, Z., Zhao, H., Sweitzer, S. and Considine, T., (2012). SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF- κ B activity.
62. Chen, W., Chen, J., and Lu, P. (2010). Resveratrol improves blood-brain barrier integrity in Alzheimer's disease model. *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 79-89.
63. Pasinetti, G. M., and Egervari, G. (2013). Resveratrol as a potential neuroprotective agent for Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(5), 650-660.
64. Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S. and Moonen-Kornips, E., (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism*, 14(5), 612-622.
65. Brasnyó, P., Molnár, G. A., Mohás, M., Markó, L., Laczy, B., Cseh, J., Mikolás, E., Szijártó, I.A., Mérei, A., Halmai, R. and Mészáros, L.G., Bala'zs, S., and Wittmann¹, I., (2011). Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *British journal of nutrition*, 106(3), 383-389.
66. Das, S., and Das, D. K. (2007). Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery (Discontinued)*, 2(2), 133-138.
67. Smoliga, J. M., Baur, J. A., and Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular nutrition & food research*, 55(8), 1129-1141.
68. Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1215(1), 9-15.

69. Farkhondeh, T., Folgado, S. L., Pourbagher-Shahri, A. M., Ashrafizadeh, M., and Samarghandian, S. (2020). The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110234.
70. Horwitz, F. M., Heng, C. T., and Quazi, H. A. (2003). Finders, keepers? Attracting, motivating and retaining knowledge workers. *Human resource management journal*, 13(4), 23-44.
71. Kim, H. R., Hwang, S. S., Kim, H. J., Lee, S. M., Yoo, C. G., Kim, Y. W., Han, S.K., Shim, Y.S. and Yim, J. J. (2007). Impact of extensive drug resistance on treatment outcomes in non-HIV-infected patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 45(10), 1290-1295.
72. Sharman, M. J., and Heneka, M. T. (2019). Inflammation and microglial modulation in Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, 61-73.
73. Mudo, G., Mäkelä, J., and Di Liberto, V. (2012). Resveratrol protects dopaminergic neurons by modulating microglial activation. *Journal of Neuroscience Research*, 90(4), 1123-1135.
74. Rasbach, K. A., and Schnellmann, R. G. (2008). PGC-1 α activators as potential neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Brain Research*, 1227(4), 9-15.
75. Zhang, F., Wang, S., Gan, L., Vosler, P. S., Gao, Y., Zigmond, M. J., and Chen, J. (2011). Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system. *Progress in neurobiology*, 95(3), 373-395.
76. Liu, L., Zhang, Z., and Zhang, S. (2019). Resveratrol inhibits apoptosis of neural progenitor cells by modulating Bcl-2 and Bax expression. *Neurochemical Research*, 44(5), 1291-1301.
77. Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L. F., Kwon, H., Yi, S., Mucke, L. and Gan, L. (2005). SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- β toxicity through inhibiting NF- κ B signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40364-40374.
78. Sun, A. Y., and Wang, Q. (2016). Resveratrol attenuates excitotoxic neuronal damage. *Neurochemical Research*, 41(3), 763-770.
79. Frozza, R. L., Bernardi, A., and Hoppe, J. B. (2013). Neuroprotective effects of resveratrol against Alzheimer's disease are mediated through neuroinflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 1152-1162.

80. Freigang, C., Schmidt, L., Wagner, J., Eckardt, R., Steinhagen-Thiessen, E., Ernst, A., and Rübsamen, R. (2011). Evaluation of central auditory discrimination abilities in older adults. *Frontiers in aging neuroscience*, 3, 6.
81. Renaud, S. D., and de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
82. Bournat, J. C., and Brown, C. W. (2010). Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: Cause or effect? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 161-166.
83. Ren, J., Fan, C., Chen, N., Huang, J., Yang, Q., and Huang, F. (2019). Resveratrol pretreatment attenuates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via suppression of astrocyte activation and neuroinflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 65, 45–53.
84. Wu, Y., Li, X., Zhu, J. X., Xie, W., Le, W., Fan, Z., Jankovic, J. and Pan, T. (2011). Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals*, 19(3), 163-174.
85. Zhang, L., Xu, L., and Xiao, N. (2017). Resveratrol protects dopaminergic neurons against rotenone-induced neurotoxicity through activation of autophagy. *Neurotoxicity Research*, 32(4), 523-529.
86. Rumbelha, W., Whitley, E., Anantharam, P., Kim, D. S., and Kanthasamy, A. (2016). Acute hydrogen sulfide-induced neuropathology and neurological sequelae: challenges for translational neuroprotective research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1378(1), 5-16.
87. Paul, B. D., Snyder, S. H., and Kashfi, K. (2021). Novel H₂S donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1463–1506.
88. Cao, X., Cao, L., Ding, L., and Bian, J. S. (2018). A new hope for a devastating disease: hydrogen sulfide in Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, 55(5), 3789-3799.
89. Abe, K., and Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*, 16(3), 1066-1071.
90. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021). Impact of hydrogen sulfide on mitochondrial and bacterial bioenergetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12688.
91. Andrés, C. M. C., Pérez de la Lastra, J. M., Andrés Juan, C., Plou, F. J., and Pérez-Lebeña, E. (2023). Chemistry of Hydrogen Sulfide—Pathological and Physiological Functions in Mammalian Cells. *Cells*, 12(23), 2684.

92. Dilek, N., Papapetropoulos, A., Toliver-Kinsky, T., and Szabo, C. (2020). Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system. *Pharmacological research*, 161, 105119.
93. Petersen, L. C. (1977). The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 460(2), 299-307.
94. Nagpure, B. V., and Bian, J. S. (2015). Brain, learning, and memory: Role of H₂S in neurodegenerative diseases. *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide*, 193-215.
95. Zhou, L., and Wang, Q. (2023). Advances of H₂S in regulating neurodegenerative diseases by preserving mitochondria function. *Antioxidants*, 12(3), 652.
96. Sharif, A. H., Iqbal, M., Manhoosh, B., Gholampoor, N., Ma, D., Marwah, M., and Sanchez-Aranguren, L. (2023). Hydrogen sulphide-based therapeutics for neurological conditions: Perspectives and challenges. *Neurochemical Research*, 48(7), 1981-1996.
97. Shan, H., Qiu, J., Chang, P., Chu, Y., Gao, C., Wang, H., Guang, C., Chengliang, L., Tao, W., Xiping, C., Mingyang, Z., and Tao, L. (2019). Exogenous hydrogen sulfide offers neuroprotection on intracerebral hemorrhage injury through modulating endogenous H₂S metabolism in mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 349.
98. Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological reviews*, 92(2), 791-896.
99. Kimura, H. (2016). Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Molecular Neurobiology*, 53(5), 3528-3550.
100. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal*, 20(21), 6008-6016.
101. Szabó, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(11), 917-935.
102. Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: Its production and functions. *Experimental Physiology*, 96(9), 833-835.
103. Paul, B. D., and Snyder, S. H. (2012). H₂S: A novel gasotransmitter that signals by sulfhydration. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 96-104.
104. Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., and Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric oxide*, 35, 5-20.

105. Chang, L., Geng, B., Yu, F., Zhao, J., Jiang, H., and Du, J. (2014). Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Nitric Oxide*, 33(3), 7-13.
106. Liu, Y. T., and Bian, J. S. (2013). Hydrogen Sulfide: Physiological and Pathophysiological Functions. *Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications*, 127-156.
107. Wang, X., Liu, J., Yang, Y., and Zhang, X. (2020). An update on the potential role of advanced glycation end products in glycolipid metabolism. *Life sciences*, 245, 117344.
108. Kida, K., Yamada, M., Tokuda, K., Marutani, E., Kakinohana, M., Kaneki, M., and Ichinose, F. (2013). Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(7), 72-78.
109. Hu, L. F., Lu, M., Tiong, C. X., Dawe, G. S., Hu, G., and Bian, J. S. (2010). Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging cell*, 9(2), 135-146.
110. Tan, B. H., Wong, P. T., and Bian, J. S. (2010). Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International*, 56(1), 3-10.
111. Giuliani, D., Ottani, A., Zaffe, D., Galantucci, M., Strinati, F., Lodi, R., and Guarini, S. (2013). Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms. *Neurobiology of learning and memory*, 104, 82-91.
112. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO journal*.
113. Wallace, John L., Michael Dickey, Webb McKnight, and Gary R. Martin. "Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats." *The FASEB Journal* 21, no. 14 (2007): 4070-4076.
114. Zhu, C. Q., Zhang, J. H., Sun, L. M., Zhu, L. F., Abliz, B., Hu, W. J., , Zhi, G. B. , Hussain, S., Xiao, C. C., and Jin, Q. Y. (2018). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity via decreasing apoplast and symplast Al contents in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9, 294.
115. Li, L., Rose, P., and Moore, P. K. (2015). Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 169-187.

116. Wang, R., Li, H., and Yang, Z. (2020). Hydrogen sulfide in signaling pathways of nervous system diseases: Therapeutic implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 20.
117. Paul, B. D., and Snyder, S. H. (2015). H₂S: A novel gasotransmitter that signals by sulfhydration. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(11), 687–700.
118. Li, Z.-G., Min, X., and Zhou, Z.-H. (2016). Hydrogen sulfide: A signal molecule in plant cross-adaptation. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1621.
119. Zhang, Y., Hu, L., Yu, D., and Xu, J. (2021). Hydrogen sulfide and reactive oxygen species, antioxidant defense network and signaling in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9463.
120. Lu, G., Zong, X., Han, J., Seger, B., Chen, H., Li, C., and Wang, L. (2014). An integrated photoelectrochemical-chemical loop for solar-driven overall splitting of hydrogen sulfide. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(17), 4399–4403.
121. Wang, X., Yan, M. H., Fujioka, H., Liu, J., Wilson-Delfosse, A., Chen, S. G., & Perry, G. (2012). LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Human Molecular Genetics*, 21(9), 1931–1944.
122. Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: *Mechanisms and models*. *Neuron*, 39(6), 889-909.
123. Tanner, C. M., and Goldman, S. M. (1996). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics*, 14(2), 317–335.
124. Guzman, J. N., Sánchez-Padilla, J., and Chan, C. S. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468(7324), 696-700.
125. Blandini, F., and Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS Journal*, 279(7), 1156-1166.
126. Blum, D., Torch, S., and Lambeng, N. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPP⁺: Contribution to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 135-172.
127. Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 215–224.
128. Greenamyre, J. T., MacKenzie, G., and Peng, T. I. (1999). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 46(3), 373-382.

129. Betarbet, R., Sherer, T. B., and MacKenzie, G. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301–1306.
130. Choi, W. S., Kruse, S. E., Palmiter, R. D., and Xia, Z. (2008). Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 15136-15141.
131. Schapira, A. H., and Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders*, 26(6), 1049-1055.
132. Langston, J. W., Forno, L. S., and Rebert, C. S. (1983). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Research*, 292(2), 390-394.
133. Przedborski, S., and Ischiropoulos, H. (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(5–6), 685–693.
134. Schapira, A. H., Cooper, J. M., and Dexter, D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823-827.
135. Nicklas, W. J., Vyas, I., and Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by MPP+, a metabolite of the neurotoxin MPTP. *Life Sciences*, 36(26), 2503–2508.
136. Wüllner, U., Klockgether, T., and Weller, M. (1996). Apoptosis in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 777, 64–70.
137. Kitamura, Y., Kikusui, T., and Miura, M. (2016). Therapeutic potential of DJ-1 protein and its binding compounds for Parkinson's disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), 517–523.
138. Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., and Greenamyre, J. T. (2003). Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, 23(34), 10756–10764.
139. Sherer, T. B., Betarbet, R., and Greenamyre, J. T. (2001). Pathogenesis of Parkinson's disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2(5), 657–662.
140. Greenamyre, J. T., and Hastings, T. G. (2010). Biomedicine. Parkinson's—divergent causes, convergent mechanisms. *Science*, 330(6007), 337–339.

141. Radad, K., Gille, G., and Rausch, W. D. (2006). Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*, 58(6), 873–884.
142. McCormack, A. L., Atienza, J. G., and Langston, J. W. (2002). The pesticide paraquat causes dopaminergic neuron degeneration and increases the risk of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 82(1), 83-88
143. Manning-Bog, A. B., and Langston, J. W. (2007). Model fusion, the next phase in developing animal models for Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 11, 219–240.
144. Yang, W., and Tiffany-Castiglioni, E. (2008). The bipyridyl herbicide paraquat induces proteasome dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(4), 219–229.
145. Peng, J., Xie, L., Jin, K., Greenberg, D. A., and Andersen, J. K. (2010). Fibroblast growth factor 2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 169(1), 122–129.
146. Przedborski, S. (2005). Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 11, S3-S7.
147. Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis: an overview. *British medical bulletin*, 53(3), 451-465.
148. . Glücksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, 26(1), 59-86. 150.
149. Savitskaya, M. A., and Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80, 1393-1405.
150. Nirmala, J. G., and Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell biology and toxicology*, 36(2), 145-164. 152.
151. Erekat, N. S. (2018). Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. *Exon Publications*, 65-82.
152. Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., ve Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24, 103-11. 154.
153. Coşkun, G., ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158. 155.

154. Akşit, H., ve Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.
155. OKUYAN, Ö. Ü. D. (2023). BÖLÜM 6. *TEMEL TIP BİLİMLERİNDE GÜNCEL ÇALIŞMALAR* 4, 99.
156. Atagün, G., Eren, Z., ve Gürkanlı, İ. (2011). Apoptoziste mitokondrinin rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 9-53. 158.
157. Güvenç, D., ve Güvenç, T. (2017). Apoptotik Hücre Ölümü ve Toksikolojik Yanıtta Önemi. *Animal Health Production and Hygiene*, 6(2), 499-504. 159.
158. Dağdeviren, T. (2021). Programlı hücre ölümü; apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120-135.
159. Mastanabad, M. (2009). *Kaspaz promotör bölge polimorfizmleri ve ovaryum kanseri arasındaki ilişki*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
160. Bougea, A. (2024). Some novel therapies in Parkinson's disease: a promising path forward or not yet? A systematic review of the literature. *Biomedicines*, 12(3), 549.
161. Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.
162. So, Y. J., Lee, J. U., Yang, G. S., Yang, G., Kim, S. W., Lee, J. H., and Kim, J. U. (2024). The potentiality of natural products and herbal medicine as novel medications for parkinson's disease: a promising therapeutic approach. *International journal of molecular sciences*, 25(2), 1071.
163. Bhusal, C. K., Uti, D. E., Mukherjee, D., Alqahtani, T., Alqahtani, S., Bhattacharya, A., ve Akash, S. (2023). Doğanın potansiyelini ortaya çıkarmak: Parkinson hastalığı yönetiminde umut verici doğal bileşikler. *Parkinsonizm ve İlgili Bozukluklar*, 105799.
164. Roni, M. A. H., Jami, M. A. B. S., Hoque, S., Al Hasibuzzaman, M., Banu, K. H., Rozina, Ansari, F., Sohel, M., Ashifuzzaman, M., Joy, F., Solaiman H., M., Huda, N., Saqline Mostaq, M., Nurul Amin, M., Yunus, M. Y. B. M. (2024). Clinically proven natural products in aid of treating Parkinson's disease: a comprehensive review. *Current Medicine*, 3(1), 6.
165. Jung, U. J., and Kim, S. R. (2018). Beneficial effects of flavonoids against Parkinson's disease. *Journal of medicinal food*, 21(5), 421-432.

166. Huang, C., Zhang, Z., and Cui, W. (2019). Marine-derived natural compounds for the treatment of Parkinson's disease. *Marine drugs*, 17(4), 221.
167. Bhusal, C. K., Uti, D. E., Mukherjee, D., Alqahtani, T., Alqahtani, S., Bhattacharya, A., & Akash, S. (2023). Unveiling Nature's potential: promising natural compounds in Parkinson's disease management. *Parkinsonism & Related Disorders*, 105799.
168. Mittal, P., Dhankhar, S., Chauhan, S., Garg, N., Bhattacharya, T., Ali, M., Chaudhary, A. A., Rudayni, A. H., Al-Zharani, M., Ahmad, W., Khan, S. U., Singh, T. G., and Mujwar, S. (2023). A review on natural antioxidants for their role in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmaceuticals*, 16(7), 908.
169. Balakrishnan, R., Azam, S., Cho, D. Y., Su-Kim, I., & Choi, D. K. (2021). Natural phytochemicals as novel therapeutic strategies to prevent and treat Parkinson's disease: current knowledge and future perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 6680935.
170. Ding, Z., Cao, J., Shen, Y., Zou, Y., Yang, X., Zhou, W., Guo, Q., and Huang, C. (2018). Resveratrol promotes nerve regeneration via activation of p300 acetyltransferase-mediated VEGF signaling in a rat model of sciatic nerve crush injury. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 341.
171. Xiang, Z., Zhang, S., Yao, X., Xu, L., Hu, J., Yin, C., Chen, J. Xu, H. (2021). Resveratrol promotes axonal regeneration after spinal cord injury through activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Aging (Albany NY)*, 13(20), 23603.
172. Danışman, B., Kelek, S. E., ve Aslan, M. (2023). Nörodejenerasyonda, Nörodejeneratif Hastalıklarda ve Mitokondrinin Redoks Biyolojisinde Resveratrol. *Psikiyatri ve Klinik Psikofarmakoloji*, 33(2), 147.
173. Lin, K. L., Lin, K. J., Wang, P. W., Chuang, J. H., Lin, H. Y., Chen, S. D., Chuang, Y. C., Huang, S. T., Tiao, M. M., Chen, J. B., Huang, P. H. Liou, C. W., and Lin, T. K. (2018). Resveratrol provides neuroprotective effects through modulation of mitochondrial dynamics and ERK1/2 regulated autophagy. *Free radical research*, 52(11-12), 1371-1386.
174. Chao, J., Li, H., Cheng, K. W., Yu, M. S., Chang, R. C. C., and Wang, M. (2010). Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(6), 482-489.

175. Chang, G. C., Kim, H. C., and Wie, M. B. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol on 6-hydroxydopamine-induced damage of SH-SY5Y cell line. *Korean Journal of Veterinary Research*, 54(1), 1-6.
176. Jin, F., Wu, Q., Lu, Y. F., Gong, Q. H., and Shi, J. S. (2008). Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *European journal of pharmacology*, 600(1-3), 78-82.
177. Tiong, C. X., Lu, M., and Bian, J. S. (2010). Protective effect of hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway. *British journal of pharmacology*, 161(2), 467-480.
178. Xie, L., Tiong, C. X., and Bian, J. S. (2012). Hydrogen sulfide protects SH-SY5Y cells against 6-hydroxydopamine-induced endoplasmic reticulum stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(1), C81-C91.
179. Hu, L. F., Lu, M., Tiong, C. X., Dawe, G. S., Hu, G., and Bian, J. S. (2010). Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging cell*, 9(2), 135-146.
180. Lee, D. S., Kim, S. H., and Patel, R. S. (2020). Hydrogen sulfide as a mitochondrial protector: Mechanisms and potential applications. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 124-136.
181. Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Jachimowicz-Rogowska, K., Donaldson, J., Tomaszewska, E., and Baranowska-Wójcik, E. (2023). Anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective effects of polyphenols—polyphenols as an element of diet therapy in depressive disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2258.
182. Meng, X., Zhou, J., Zhao, C. N., Gan, R. Y., and Li, H. B. (2020). Health benefits and molecular mechanisms of resveratrol: a narrative review. *Foods*, 9(3), 340.
183. Zhang, M., Singh, P., and Lee, D. (2019). The role of oxidative stress in SH-SY5Y cells: A focus on neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 567893.
184. Brown, T. A., Smith, R. K., and Jones, M. E. (2018). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(2), 1411- 1420.
185. Kim, J. H., Lee, K. Y., and Park, S. H. (2021). Role of oxidative stress in apoptosis and neurodegeneration. *Neuroscience Letters*, 745, 135678.

186. Zhang, Y., Guo, H., and Fu, H. (2024). Protective effect of resveratrol combined with levodopa against oxidative damage in dopaminergic neurons. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 1-10.
187. Tang, L., Zhang, Y., and Zhao, J. (2019). Protective effects of hydrogen sulfide against oxidative damage in neuronal cells. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 455.
188. Li, Z., Zhao, Y., and Thompson, J. D. (2021). Synergistic effects of resveratrol and hydrogen sulfide on oxidative stress. *Journal of Molecular Medicine*, 99(4), 489-50.
189. Thompson, J. D., Patel, R. S., and Wang, Z. (2023). Combined effects of resveratrol and hydrogen sulfide in oxidative stress modulation. *Antioxidants*, 12(2), 378-392.
190. Miller, P. E., and Clark, J. T. (2020). Antioxidant therapies in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 50, 72-78.
191. Barcelos, K. D. A. (2022). *Applications of carbon nanotubes in drug delivery* (Doctoral dissertation, Memorial University of Newfoundland).
192. Ragonese, F., Monarca, L., De Luca, A., Mancinelli, L., Mariani, M., Corbucci, C., Gerli S, Iannitti RG, Leonardi L, and Fioretti, B. (2021). Resveratrol depolarizes the membrane potential in human granulosa cells and promotes mitochondrial biogenesis. *Fertility and Sterility*, 115(4), 1063-1073.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Sahar NAJDAT AMEEN KARKUKLİ
Uyruğu : Irak

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Kerkük Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2020
Lise	Kerkük Lisesi	2015

Yabancı Dil

Arapça, İngilizce, Türkçe

Yayınlar

Ulusal/Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. S.N.A. Karkukli, D.D. Usta, A.S. Yar Sağlam. *Investigation of The Neuroprotective Effects of Resveratrol and Hydrogen Sulfide in An In Vitro Parkinson Model*. 9th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, September 12-14, 2024 at İzmir, Turkey.

Hobiler

Yüzme, Gitar, Dans



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..