



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PARKİNSON HASTALIĞI DENEY MODELİNDE
PEROKSİZOM PROLİFERATÖR İLE AKTİVE EDİLEN
RESEPTÖR
GAMA AGONİSTİ AJANLARIN OKSİDATİF STRES İLE
İLİŞKİLİ
PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğçe BİLGİÇ

Fizyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARKİNSON HASTALIĞI DENEY MODELİNDE
PEROKSİZOM PROLİFERATÖR İLE AKTİVE EDİLEN
RESEPTÖR
GAMA AGONİSTİ AJANLARIN OKSİDATİF STRES İLE
İLİŞKİLİ
PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Tuğçe BİLGİÇ

Danışman
PROF. DR. TANER DAĞCI

Fizyoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr.

(Danışman)

Üye : Prof. Dr.

Üye : Prof. Dr.

Üye : Prof. Dr.

Üye : Prof. Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Özet

Parkinson Hastalığı Deney Modelinde Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptör Gama Agonisti Ajanların Oksidatif Stres ile İlişkili Proteinler Üzerine Etkisi

Parkinson Hastalığı Alzheimer Hastalığı'ndan sonra dünya popülasyonunun %0.1'inde ve 65 yaş üstü insanlarda %3 oranında görülen, dünyanın ikinci en yaygın hareket bozukluğu hastalığıdır. Birçok neden üzerinde durulmakla birlikte, hastalığın ortaya çıkış nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bunun yanında, hastalığın ortaya çıkış ve ilerlemesinde rol oynayan temel mekanizmalardan birinin oksidatif stres olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Oksidatif stres durumunda, transkripsiyon faktör NF-E2-ilişkili faktörün (Nrf2) antioksidan yanıt elementine (ARE) bağlanarak, antioksidan ve faz2 detoksifikasyon enzimlerini indüklediği bilinmektedir.

Bu projedeki amacımız, dopaminerjik nöronal hasarda peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama (PPAR γ) agonisti ajanların oksidatif stresle ilişkili proteinler üzerine etkisini incelemek ve oksidatif stresle ilişkili moleküler mekanizmaları (Nrf2-ARE yolağı) araştırmaktır. Proje kapsamında MPP⁺ ile indüklenen nöronal hücrelerde başta pioglitazon olmak üzere tideglusibin GSH ve GST, GR gibi glutatyonla ilişkili enzim aktivitesine etkisi ELISA testler kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca uygulamaların Nrf2 mRNA ve PPAR γ protein düzeyine etkisi sırasıyla real-time PCR ve Western Blot yöntemleriyle tespit edilmiştir.

PPAR γ agonisti uygulamasıyla sitotoksisite azalmış, antioksidan enzim aktivitesi anlamlı düzeyde artmıştır (p<0.05). Ayrıca dopaminerjik hasarda azalan Nrf2 mRNA düzeyinin pioglitazon uygulamasıyla arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, söz konusu reseptör aracılı nöroproteksiyonun gözlenmesinde hem glutatyonla ilişkili enzimlerin hem de Nrf2 yolağının etkin olduğunu; özellikle nöronal korumada reseptörlerin önemli bir rol aldığını desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: oksidatif stres, PPAR γ , Parkinson Hastalığı, Nrf2-ARE yolağı

Abstract

The Effects Of Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Agonists On Oxidative Stress Related Proteins In Parkinson's Disease Model

Parkinson's Disease is the second most common movement disorder in the world, effecting 0.1% of the world population and 3% of people over 65 years of age. Although many reasons are emphasized, the reason for the emergence of the disease is not known exactly. Besides, there are studies showing that one of the basic mechanisms that play a role in the emergence and progression of the disease is oxidative stress. In the case of oxidative stress, the transcription factor NF-E2-related factor (Nrf2) is known to bind to the antioxidant response element (ARE), inducing antioxidant and phase2 detoxification enzymes.

Our aim in this project is to investigate the effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonists on oxidative stress-related proteins and to investigate the molecular mechanisms associated with oxidative stress (Nrf2) in dopaminergic neuronal damage. Within the scope of the project, the effects of pioglitazone and tideglusib on glutathione-related enzyme activity such as GSH and GST, GR were measured using ELISA assays. In addition, the effects of treatments on Nrf2 mRNA and PPAR γ protein levels were determined by real-time PCR and Western Blot methods, respectively.

Cytotoxicity decreased and antioxidant enzyme activity increased significantly with PPAR γ agonist treatments ($p < 0.05$). In addition, decreased Nrf2 mRNA levels in dopaminergic damage has been shown to increase with pioglitazone. These results indicate that both glutathione-related enzymes and Nrf2 pathway are effective in observing receptor-mediated neuroprotection; it supports that receptors play an important role especially in neuronal protection.

Key Words: oxidative stress, PPAR γ , Parkinson's Disease, Nrf2-ARE pathway



İçindekiler

ÖZET	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
GRAFİKLER DİZİNİ	XI
KISALTMA LİSTESİ	XIII
GİRİŞ	16
1.1. ARAŞTIRMANIN PROBLEMİ	16
1.2. ARAŞTIRMANIN SORUSU	17
1.3. ARAŞTIRMANIN HİPOTEZLERİ	17
1.4. ARAŞTIRMANIN VARSAYIMLARI	17
1.5. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI	17
1.6. ARAŞTIRMANIN AMACI	17
GENEL BİLGİLER	19
2.1. NÖRODEJENERASYON - NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR	19
2.1.1. <i>Genetik</i>	19
2.1.2. <i>Çevresel Etkenler</i>	20
2.1.3. <i>Enerji, Metabolizma ve Yaşlanma</i>	20
2.1.4. <i>Oksidatif Stres</i>	20
2.2. PARKİNSON HASTALIĞI.....	21
2.2.1. <i>Parkinson Hastalığı Tanı Kriterleri</i>	24
2.2.2. <i>Parkinson Hastalığı'nda MPP⁺ - MPTP Mekanizması</i>	24
2.2.3. <i>Parkinson Hastalığı ve Tedavi Yöntemleri</i>	26
2.2.3.1. <i>Levodopa</i>	26
2.2.3.2. <i>COMT İnhibitörleri</i>	26
2.2.3.3. <i>Dopamin Agonistleri</i>	27
2.2.3.4. <i>MAO İnhibitörleri</i>	27
2.2.3.5. <i>Cerrahi Yöntem</i>	27
2.2.3.6. <i>Kök Hücre Tedavisi</i>	27

2.3. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES.....	27
2.3.1. <i>Glutasyon (GSH)</i>	28
2.3.2. <i>Glutasyon Sentezi</i>	29
2.3.3. <i>Glutasyon Metabolizması</i>	30
2.4. PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVATÖR RESEPTÖRLERİ (PPAR)	30
2.4.1. <i>PPARγ Agonistleri</i>	31
2.4.1.1. <i>Pioglitazon</i>	32
2.4.1.2. <i>Tideglusib</i>	32
2.5. NRF2-ARE YOLAĞI	33
2.6. PARKİNSON DENEY MODELİ OLUŞTURMA	34
2.6.1. <i>In Vitro Model SH-SY5Y Hücre Hattı</i>	34
GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN ARAÇLAR	36
3.2. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER	36
3.3. HÜCRELERİN ÇOĞALTILMASI	37
3.4. MPP ⁺ /TİDEGLUSİB, MPP ⁺ /PİOGLİTAZON DENEY PLANI	37
3.4.1. <i>Ajanlarla Muamele</i>	38
3.4.2. <i>Hücrelerin Toplanması</i>	38
3.5. HÜCRELERDEN LDH SALINIMININ ÖLÇÜLEREK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN TESPİTİ	39
3.6. HÜCRELERİN HOMOJENİZE EDİLMESİ VE PROTEİN MİKTARI TAYİNİ	40
3.6.1. <i>Hücrelerin Homojenizasyonu</i>	40
3.6.2. <i>Protein Miktarı Tayini</i>	40
3.6.2.1. <i>Standartların ve Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması</i>	40
3.7. GLUTATYON İLE İLİŞKİLİ PROTEİN ANALİZİ	41
3.7.1. <i>Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi</i>	41
3.7.2. <i>Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi</i>	41
3.7.3. <i>Toplam Glutasyon Miktarı değerlendirilmesi</i>	41
3.8. NRF2/ARE YOLAĞI İLE İLİŞKİLİ MRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMİN GÖZLENMESİ.....	42
3.8.1. <i>Grupların Oluşturulması</i>	42
3.8.2. <i>Total RNA İzolasyonu</i>	43
3.8.2.1. <i>Total RNA Konsantrasyonunun Ve RNA Saflığının Belirlenmesi</i>	43

3.8.2.2. Total RNA Konsantrasyonunun 1 µg/µl'ye Standardizasyonu	43
3.8.3. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemi İle cDNA Sentezi	43
3.8.4. Real-Time PCR Yöntemi ile cDNA Amplifikasyonu	44
3.9. PPAR γ PROTEİN DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMİN GÖZLENMESİ	44
3.9.1. Grupların oluşturulması.....	44
3.9.2. Western Blot Yöntemi.....	44
3.9.2.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	44
3.9.2.2. Transfer	45
3.9.2.3. Bloklama.....	45
3.9.2.4. Primer Ab ile İnkübasyon	45
3.9.2.5. Sekonder Ab İle İnkübasyon.....	45
3.9.2.6. Görüntüleme.....	45
BULGULAR	47
4.1. HÜCRELERDEN LDH SALINIMININ ÖLÇÜLEREK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN TESPİTİ	47
4.2. GLUTATYON İLE İLGİLİ PROTEİN ANALİZİ	47
4.3. NRF2/ARE YOLAĞI İLE İLİŞKİLİ MRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİM ANALİZİ	49
4.4. PPAR γ PROTEİN DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİM ANALİZİ	53
TARTIŞMA	55
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR.....	60
TEŞEKKÜR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	67

Şekiller Dizini

Şekil 1: Elektron eklenerek yapılarındaki oksijeni azaltmaları sonucu oluşan yaygın ROT molekülleri	5
Şekil 2: Substantia Nigra.....	6
Şekil 3: Dopamin metabolizması ve ROT üretimi.....	7
Şekil 4: MPTP'nin astrositlerin içine girmesinden sonra oluşan tepkimelerin şematik gösterimi.....	9
Şekil 5: Glutatyon yapısı.....	13
Şekil 6: Glutatyon sentez metabolizması.....	14
Şekil 7: PPAR izoformları.....	15
Şekil 8: NRF2 regülasyonu.....	17



Grafikler Dizini

Grafik 1: MPP ⁺ (2 mM) ve/veya tideglusib (2.5 µM) veya pioglitazon (5 µM) uygulamasının hücre membran bütünlüğü/laktat dehidrogenaz enzim salınımı üzerine etkisi (24 saat).....	33
Grafik 2: MPP ⁺ (2 mM) ve/veya tideglusib (2.5 µM) veya pioglitazon (5 µM) uygulamasının hücrenin antioksidan savunma sistemi/ GR enzim düzeyi, GST enzim düzeyi ve total glutatyon miktarı üzerine etkisi (24 saat).....	34
Grafik 3: MPP ⁺ 'nin SH-SY5Y hücrelerinde 3, 6, 12, 24 saat uygulama sonucunda Nrf2 mRNA düzeylerindeki değişime etkisi.....	35
Grafik 4: Altı saat süreyle MPP ⁺ uygulanan hücrelerde tideglusib ve pioglitazonun Nrf2, HO-1, NQO1 mRNA düzeylerine etkisi.....	37
Grafik 5: On iki saat süreyle MPP ⁺ uygulanan hücrelerde tideglusib ve pioglitazonun Nrf2, HO-1, NQO1 mRNA düzeylerine etkisi.....	38
Grafik 6: MPP ⁺ 'nin SH-SY5Y hücrelerinde 3, 6, 12, 24 saat uygulama sonucunda PPAR γ protein düzeyindeki değişime etkisi.....	39



Kısaltma Listesi

ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
α -Syn	: α -sinüklein
MPTP	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
GSH	: Glutasyon
PPAR	: Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptör
MPP ⁺	: 1-metil-4-fenil piridinyum iodid
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSTs	: Glutasyon S-Transferaz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
PH	: Parkinson Hastalığı
AH	: Alzheimer Hastalığı
MS	: Multipl Skleroz
HD	: Huntington Hastalığı
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
MAO	: Monoamin Oksidaz
DOPAC	: 3,4-dihidroksifenil asetik asit
OH	: hidroksil
LB	: Lewy Cisimcikleri
LN	: Lewy Nöritleri
LP	: Lewy Patolojisi
SNc	: Substantia Nigra Pars Kompakta
COMT	: Katekol-O-Metil Transferaz
ALDH	: Aldehit Dehidrojenaz
COX	: Siklooksijenaz
NMS	: Non-motor semptomlar
MPDP ⁺	: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropropiridinyum
DAT	: Dopamin Taşıyıcıları
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

MPPP	: 1-metil-4-fenil-4-propiyonoksipiperidin
GLL	: Glutamat Sistein Ligaz
γ GluCys	: γ -glutamil sistein
ATP	: Adenozin Trifosfat
GSSG	: Glutasyon Disülfit
TZDs	: Tiyozolidindiyon
CRP	: C-Reaktif Protein
GSK-3 β	: Glikojen Sentez Kinaz 3 β
Nrf2-ARE	: Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
Keap1	: ECH ilişkili protein 1
μ l	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
g	: Gram
μ M	: Mikromolar
M	: Molar
V	: Volt
mA	: Miliamper
PBS	: Fetal Bovin Serum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
BSA	: Bovin Serum Albümin



Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

İnsan ömrünün uzamasıyla birlikte Alzheimer, Parkinson, Huntington ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıklardaki artış ve bu hastalıklara dair kesin bir tedavi yöntemi bulunamaması, günümüzde bu hastalıkları en önemli sağlık sorunlarından biri haline getirmiştir. Parkinson Hastalığı, dünyada Alzheimer Hastalığı'ndan sonra ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Substantia nigra pars kompakta'daki dopaminerjik nöronların %50'den fazla kaybı ve striatum'daki dopaminin %80'den fazla azalması sonucu motor semptomlar görülmeye başlanır. Klinikteki motor bulgular arasında hareketlerin yavaşlaması, dinlenme halinde tremor, kas rijiditesi, postural reflekslerde kayıp ve duruş bozukluğu bulunmaktadır. Nörolojik bulgular arasında ise özellikle substantia nigra pars kompakta'daki dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak, α -sinüklein (α -Syn) ve übikütin gibi protein agregatları depolayan Lewy cisimciklerinin varlığı göze çarpmaktadır. Parkinson Hastalığı'na neden olan etkenler tam aydınlatılamamakla birlikte sebepler arasında 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), ağır metaller, organik soluanlar ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) gibi toksinlerin de Parkinson Hastalığı'na sebep olabildiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Parkinson Hastalığı'ndaki dopaminerjik nöron dejenerasyonunda oksidatif stresin temel rol oynadığı gösterilmiştir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) yapımı ile bu ara maddelerin detoksifike edilmesini sağlayan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar ve hücreler için geri dönüşümsüz dejenerasyonlara sebep olur. Parkinson Hastalığı olan bireylerde okside lipitler ve DNA düzeyleri artmış ve detoksifikasyon sistem enzim ve protein miktarları (glutatyon (GSH)) düşmüştür. Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama (PPAR γ), oksidatif stres ve inflamatuvar cevap mekanizmalarına katılan nükleer bir reseptördür. PPAR γ agonisti ajanlar, Parkinson hastalığı dahil olmak üzere pek çok nörolojik bozukluğun tedavisi için umut verici bir yaklaşım olmaktadır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

In vitro Parkinson deney modelinde tideglusib ve pioglitazonun oksidatif stres ile ilişkili proteinler üzerinde etkili midir?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Hipotez 1: 1-metil-4-fenilpiridinyum iodid (MPP⁺), SH-SY5Y hücresinde oksidatif strese bağlı nörotoksisite oluşturmaktadır.

Hipotez 2: Oluşan oksidatif strese karşı PPAR γ agonistleri tideglusib ve pioglitazon hücre koruyucu etki göstermektedir.

Hipotez 3: MPP⁺, SH-SY5Y hücresinde apoptoza neden olmaktadır.

Hipotez 4: Tideglusib ve pioglitazon, oksidatif stresin, hücrelerin ölümüne yol ağtığı yolakları inhibe etmektedir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

1. Tez çalışmasında insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır.
2. Tez çalışmasında hücre ölümünün belirlenmesinde kullanılan LDH Sitotoksisite Kiti araştırmanın amacını gerçekteşirecek özelliktedir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez çalışması yürütülürken hiçbir güçlük yaşanmamıştır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Tez çalışmasının amacı, in vitro Parkinson Hastalığı deney modeli oluşturulmuş hücrelerde PPAR γ agonisti olduğu bilinen tideglusib ve pioglitazonun, oksidatif stresle ilişkili proteinler düzeylerindeki değişim etkisinin araştırılması ve yeni teropötik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktır.

Genel Bilgiler

2.1. Nörodejenerasyon - Nörodejeneratif Hastalıklar

Chen ve diğeri (2015), nörodejenerasyonu Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde meydana gelen ve nöronal yapı ile fonksiyon kaybının ayırıcı özellik olduğu bir fenomen olarak tanımlamıştır. Nörodejenerasyonun nedenleri tam olarak anlaşılamamakla birlikte nörodejenerasyon görülme sıklığı yetişkinliğin orta ve geç dönemlerine doğru, yaşın ilerlemesi ile artar ve daha çok yaşlı nüfusta görülen Parkinson Hastalığı (PH), Alzheimer Hastalığı (AH) gibi nörodejeneratif hastalıklar, virüslerin, nöronları direkt öldürme ya da apoptozu indüklemeye gibi yollarla nöronlara doğrudan zarar vererek nörodejenerasyona yol açmasıyla ortaya çıkar (Chen vd., 2015). Przedborski ve diğeri (2003), nörodejenerasyondaki hücre ölümü tiplerinin çoğunlukla ihmal edilmekte ve yazarların genellikle apoptoz ve nekroz üzerinde yoğunlaşmakta olduğunu belirtmiştir. Artmış oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıkların yaygın sebeplerinden biri olarak belirtilmiştir. Gittikçe artan oksidatif stres, hücre hasarı, DNA onarımında bozulmayı ve mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyebilir ki bunlar nörodejeneratif hastalıkların gelişmesinde ve yaşlanma sürecinin hızlanmasında anahtar faktörlerdir (Ciccone vd., 2013). Nörodejeneratif hastalıklar, en zayıflatıcı hastalıklardan olup düşünmeyi, becerisel hareketleri, zihinsel fonksiyonları ve hafızayı etkiler. Klinik teşhislerindeki farklılıklara rağmen yaşamın geç evrelerinde ortaya çıkma, geniş çaplı nöronal kayıp ve beyinde protein agregatlarının ve plakların birikimi, nörodejeneratif hastalıkların ortak özelliklerindedir (Chowhan vd., 2013). Nörodejeneratif hastalıklar, yüzyılın en büyük sağlık sorunları arasındadır. En çok karşılaşılanlar AD ve PD'dir. Bunların dışında ALS, MS ve HD de önemli nörodejeneratif hastalıklardandır (Buendia vd., 2015).

Nörodejeneratif hastalıkların sebepleri arasında genetik, çevresel etkenler, yaşlanma ve oksidatif stres en yaygın olan faktörlerdir.

2.1.1. Genetik

Son 20 yılda, genetik keşiflerin nörodejeneratif hastalıkların anlaşılmasındaki etkisi büyüktür (Pihlstrom vd., 2017). Bu keşiflerden birisi olan gen terapisi ile

nörodejeneratif hastalıkların erken teşhisi ve tedavisinde büyük ilerleme kaydedilmekte, hücre kaybı çok ileri seviyelere ulaşmadan müdahale edilebilmektedir (O'Connor & Boulis, 2015).

2.1.2. Çevresel Etkenler

Nörodejeneratif hastalıkların, demasın birçok türü de dahil olmak üzere çevresel etkenlere maruziyet sonucu oluşabildiği düşünülmektedir. Bazı çalışmalar kırsal alanda yaşayan, zirai ilaçlara ve bakır sülfata maruz kalan kişilerde Parkinson Hastalığı ile ilişkili risk faktörleri oluştuğunu göstermiştir (Migliore & Coppede, 2002). Bir opioid analjezik ilaç olan 1-metil-4- fenil-4-propionokspiperidinin sentezi sırasında açığa çıkan bir yan ürün olarak MPTP'ye maruz kalınması da PH'nin risk faktörleri arasında gösterilmektedir (Cannon & Greenamyre, 2011).

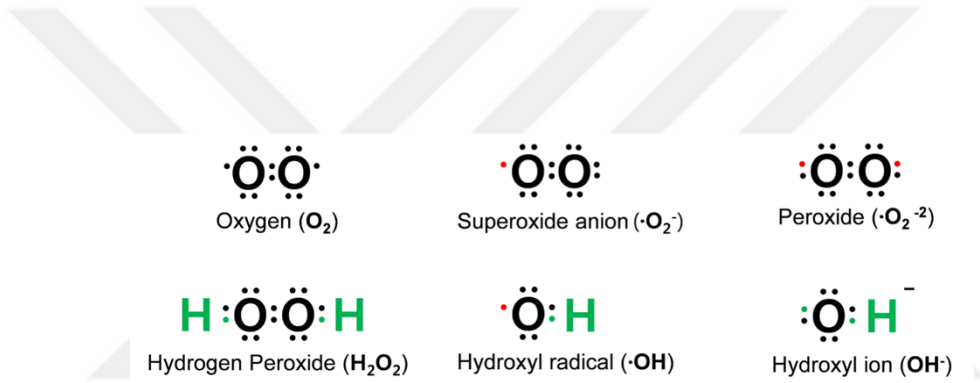
2.1.3. Enerji, Metabolizma ve Yaşlanma

Parkinson hastalarının enerji metabolizmaları, yaşlarına göre çok daha fazla bozukluk gösterebilir. Nöronal dejenerasyonda metabolizmadaki bozuklukların etkisi ile ilgili önemli kanıtlar istemeden MPTP'ye maruz kalan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. İlacın kullanımı ciddi ve dönüşümsüz parkinsonizm belirtileri ile sonuçlanmaktadır. Takip eden çalışmalar, MPTP'nin metabolitinin PH'de nöronların dejenerasyonunu tetiklediği ve bu dejenerasyonun etki mekanizmasının dopaminerjik nöronlarda mitokondriyal solunum metabolizmasını bozduğunu göstermektedir (Langston, 2017).

2.1.4. Oksidatif Stres

Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi tamamen bilinmemekle birlikte artan oksidatif stresin çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ortak rol oynadığı bilinmektedir. Sinir hücreleri yaşamlarını devam ettirebilmek için oksidatif metabolizmaya gereksinim duyarlar. Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijenden köken alan, genellikle kısa yaşam süreli ve son derece yüksek reaktif özelliklere sahip moleküllerdir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH) ve serbest radikaller (O_2) bu moleküllere örnektir (Kim vd., 2015). Bu türevler DNA hasarı, hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonu,

protein oksidasyonunu takiben nöronal ölüme sebep olabilmektedir. Dopamin metabolizması tarafından uyarılan oksidatif stres sonucunda dopaminerjik nöronlar hasara uğramaktadır. Dopaminin 3,4-dihidroksifenilasetik asite (DOPAC) yıkım yolağı monoamin oksidaz (MAO) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Bu tepkime hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. Hidrojen peroksit bazal ganglionlarda fazla bulunan ferröz demir (Fe^{+2}) iyonlarının varlığında hidroksil ($OH\cdot$) radikali oluşturabilir (Fenton reaksiyonu). Bu hipotez PH'de tedavi yaklaşımlarında da yenilikler sağlamıştır (Singh A vd., 2019).

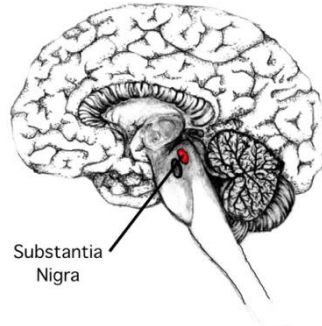


Şekil 1. Elektron eklenerek yapılarındaki oksijeni azaltmaları sonucu oluşan yaygın ROT molekülleri. Kırmızı noktalar eşlenmemiş elektronları gösterir (Kim vd., 2015).

2.2.Parkinson Hastalığı

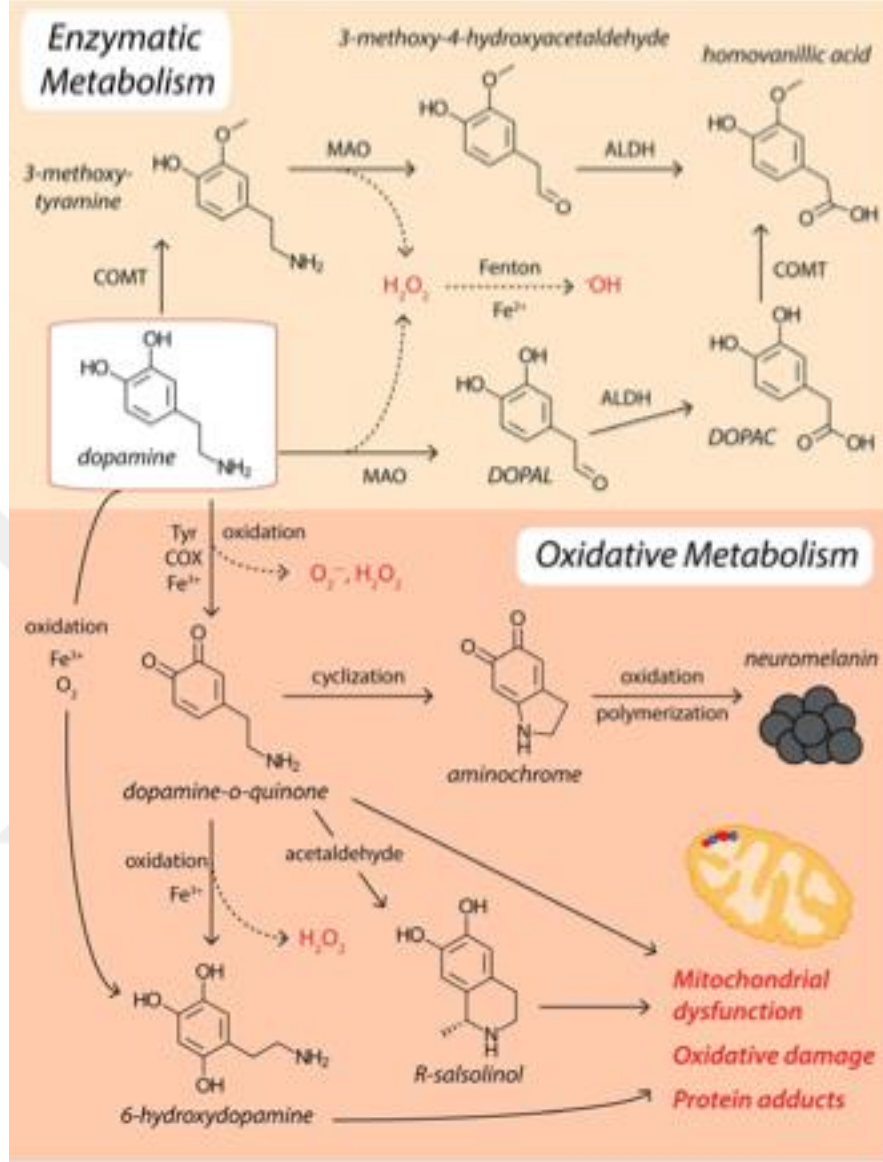
Parkinson Hastalığı'nın detaylı ilk tanımının yaklaşık iki yüzyıl önce yapılmasına rağmen, hastalığın kavramsallaştırılması günümüzde de devam etmektedir (Kalia & Lang, 2015). James Parkinson, semptomlara ve otopsi sonuçlarına bakarak primer lezyonun medullada olduğunu tanımlamıştır. Fritz Jacob Lewy, intrasellüler protein agregatları olan Lewy cisimciklerini keşfetmiştir. Bu agregatlar Lewy cisimcikleri (LB) ve sinir hücrelerinin oluşturduğu akson benzeri sitoplazmik uzantılar olan Lewy nöritleri (LN) olarak da bilinmektedir. Alfa-sinüklein (α -SYN), Lewy Patolojisi (LP)'nin ana bileşenidir (Sulzer & Surmeier, 2013). Parkinson Hastalığı, yaşla birlikte ilerleyen kronik bir hastalık olup erkeklerde daha sık görülmektedir.

Parkinson Hastalığı'ndaki hareket disfonksiyonu, substantia nigra pars kompakta (SNc) bölgesindeki dopaminerjik nöronların ölümü sonucu oluşur. Araştırmalar Parkinson Hastalığı'nın tüm formlarındaki dopaminerjik nörodejenerasyonda oksidatif stresin ana rol oynadığını göstermektedir (Trist vd., 2019). Dopamin, vücut hareketlerini kontrol eden, beyin bölgeleri arasında mesajlar ileten bir kimyasaldır. Hareketlerin akıcı ve birbiri ile uyumlu olmasını sağlar. Dopamin üreten hücrelerin kaybı sonucu yeterli miktarda dopamin üretilemez ve Parkinson hastalığının motor belirtileri olan titreme, kas sertliği, yürüme bozukluğu, düşme eğilimi, vücut hareketlerinin yavaşlaması ortaya çıkar. Substantia nigra orta beyinde bulunur. Beyinde motor hareketin düzenlenmesi görevini üstlenmiş olan bazal ganglia ile yakından ilişkilidir. Substantia nigradaki hücrelerin zamanından önce ölmesi sonucunda bazal gangliaya yeterli dopaminerjik sinyal gitmez. Buna bağlı olarak bazal ganglianın beyin korteksindeki uyarıcı etkisi azalır ve hareketlerin yavaşlaması, titreme, denge kayıpları gibi durumlar oluşur.



Şekil 2. Substantia Nigra

Dopamin beyin sapının üst kısımlarında merkezi hareket kontrolünün yapıldığı bölgelerdeki aksonlarda transmitter olarak görev yapan ve tirozin amino asidinden sentezlenen bir hormondur. Öğrenmeyi pekiştirme, davranışı, bilişsel işlevleri, duyu durumunu, uykuyu ve dikkati kontrol etme ve motor kontrol gibi görevleri vardır. Merkezi hareket kontrolünün yapıldığı bölgelerde dopamin fonksiyonlarının bozulmasıyla Parkinson hastalığı ortaya çıkmaktadır (Birtwistle & Baldwin, 1998).



Şekil 3. Dopamin metabolizması ve ROT üretimi. Dopaminin homovanilik aside enzimatik bozunumu, monoamin oksidaz (MAO), katekol-o-metil transferaz (COMT) ve aldehid dehidrojenaz (ALDH) ile düzenlenir. Diğer taraftan dopamin, kararsız demir iyonu (Fe³⁺), siklooksijenaz (COX) ya da tirozinaz (Tyr) tarafından dopamin-o-kinona okside edilir. Dopamin-o-kinon, Fe³⁺ tarafından okside edilerek 6-hidroksidopamine, asetaldehit tarafıdan R-salsolinole dönüştürülür ki bu moleküller daha zararlı bileşenlerdir. H₂O₂, dopamin ve dopamin-o-kinon oksidasyonu, Fenton reaksiyonuna katılabilir ve kararsız Fe²⁺ ile tepkimeye girip oksidatif strese neden olan hidroksil radikallerini (OH) üretir (Trist vd., 2019).

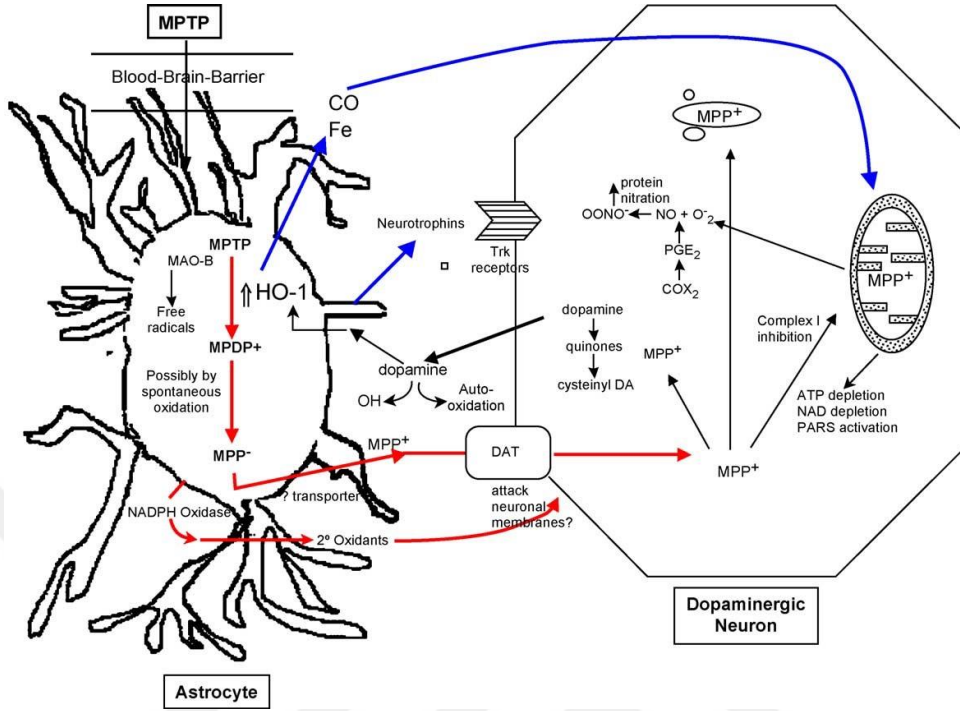
2.2.1. Parkinson Hastalığı Tanı Kriterleri

Son yıllarda Parkinson Hastalığı'nın motor olmayan belirtileri (NMS), sağlık hizmetlerinde ön plana çıkmıştır. Motor belirtilerin daha ön planda olmasına karşın, 1817 yılında James Parkinson motor olmayan belirtileri tanımlamıştır. Yorgunluk, anksiyete, bacak ağrısı, uykusuzluk, idrar kaçırma ve geceleri daha sık idrar yapma, aşırı tükürük salgısı, konsantrasyon güçlüğü ve depresyon motor olmayan belirtilerin en yaygın olanlarıdır (Costa vd., 2011).

Parkinson Hastalığı'nda primer motor belirtiler ise akinezi ve bradikinezidir. Akinezi hareketi başlatmada zorluk çekme, bradikinezi ise yavaş hareket etme demektir. Rijidite ise hastanın kaslarında sertlik hissetmesidir. Motor belirtilerden bir diğeri olan tremor (titreme) dinlenmede, postüre bağlı olarak ya da harekete bağlı ortaya çıkar. Parkinson Hastalığı'nda görülen en yaygın tremor çeşidi dinlenme tremorudur (Moustafa vd., 2016).

2.2.2. Parkinson Hastalığı'nda MPP⁺ - MPTP Mekanizması

MPP⁺ (1-metil-4- fenilpiridinyum)- MPTP mekanizması, Parkinson Hastalığı deney modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. MPTP insanlarda ve primatlarda neredeyse Parkinson Hastalığından ayırt edilemeyen parkinsonizm sendromunun oluşmasına neden olmaktadır. MPTP, yüksek oranda lipofilik olan ve kan beyin bariyerini kolayca geçebilen bir protoksindir. Beyne ulaştığı anda bir nörotoksin olan MPP⁺'ye dönüşür (Serge vd., 2004).



Şekil 4. MPTP'nin astrositlerin içine girmesinden sonra oluşan tepkimelerin şematik gösterimi. Kırmızı oklar glial hücrelerin toksifikasyondaki rolünü göstermektedir (Smeyne & Lewis, 2005).

MPTP, glia hücreleri aracılığıyla kan beyin bariyerini aşar ve astrosite girer. MPPD⁺'ye dönüşür ve proton kaybederek MPP⁺ halini alır. MPP⁺ tek başına hücre dışına çıkamaz ama bu molekülü hücre dışına taşıyan sistem henüz bilinmemektedir. MPP⁺, ekstrasellüler alana çıktıktan sonra dopamin taşıyıcıları (DAT) tarafından dopaminerjik hücrelere taşınır ve difüzyon yolu ile mitokondriye girer. Kompleks I ile birleşir ve NADH enzimini bloke ederek hücre solunumunu engeller (Smeyne & Lewis, 2005). Oksidatif fosforilasyonun engellenmesi sonucu mitokondri oksijen radikallerinin üretimine başlar (Eberhardt & Schulz, 2003) ve hücre ölümlerine neden olur. Dopaminerjik nöronların azalması sonucu hareketlerin kortikal kontrolü bozulur ve insanlarda parkinson belirtileri ortaya çıkar (Langston, 2017). 1976'da 23 yaşındaki kimya öğrencisi Barry Kidston, bir analjezik olan 1-metil-4-fenil-4-propiyonoksipiperidin (desmetilpirodozin, MPPP) sentezlemeye çalışırken yanlışlıkla

MPTP'yi de sentezler. Bunu kendine enjekte ettikten sonra Parkinson benzeri semptomlar gösterir. Böylece çeşitli kimyasal maddelerin de bu tip semptomlara neden olabileceği anlaşılmıştır. Levodopa ile tedavi edilen öğrenci uyuşturucu nedeniyle öldüğünde, otopsisinde substantia nigra dopaminerjik nöronların hasar gördüğü fark edilmiştir (Fahn, 1996).

2.2.3. Parkinson Hastalığı ve Tedavi Yöntemleri

Parkinson Hastalığı'nın tedavisinde kullanılan başlıca ilaçlar levodopa, COMT inhibitörleri, dopamin agonistleri ve monoamin oksidaz B enziminin inhibitörleridir. Ayrıca cerrahi yöntem ve kök hücre tedavisi de tedavi yöntemleri arasındadır.

2.2.3.1. Levodopa

Levodopa, Parkinson Hastalığı'nın motor bulgularının tedavisinde kullanılan ana ilaçtır. Dopamin nöronlarını dopamine çevirir ve zamanla sinaps boşluğuna salınmasını sağlar. Ancak nöron hasarı ilerledikçe bu yolak da etkinliğini kaybeder ve sinapstaki dopamin seviyesi levodopa seviyesini göstermeye başlar ve bu durum levodopayı kullanan hastanın ilaca bağımlı olmasına sebep olmaktadır. Ayrıca bradikinezi dahil olmak üzere çeşitli motor fonksiyonlar üzerinde ağır yan etkilere sebep olmaktadır (Hauser, 2009). Levodopa, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisindeki ana ilaç olmasına rağmen, Parkinson Hastalığı için sadece semptomlar üzerinde etki göstermektedir ve hastalığın seyri üzerinde yavaşlatıcı etkisi olmamaktadır (Korczyń, 2022).

2.2.3.2. COMT İnhibitörleri

COMT (katekol-O-metiltransferaz), levodopanın etkinliğini artıran ve dopamine dönüşmesini engelleyen bir enzimdir. Dopamin inhibitörleri, levodopanın yan etki oluşturduğu hastalarda kullanılmaktadır (Korczyń, 2022). COMT inhibitörleri levodopa ile kullanılır ve beyne ulaşma miktarını artırarak levodopanın etkinlik süresini uzatmaktadır (Kaakkola, 2000). COMT inhibitörleri diskinezi riskinin artması, hipotansiyon ve birçok yan etkiye neden olmakla birlikte, COMT inhibitörlerinden tolkapon, ileri derecede hepatotoksisiteye sebep olmaktadır (Çakmur, 2010).

2.2.3.3. Dopamin Agonistleri

Dopamin agonistleri, antiparkinsonizm etkilerini direkt dopaminergic reseptörler üzerinde gösterir ve oksidatif yollarla metabolize olmadıkları için dopamin metabolizmasını da etkileyen serbest radikal oluşumunu tetiklemezler. Eğer ortamda yüksek konsantrasyonda ekzojenik dopamin varsa endojenik dopamin salınımını baskıladıkları için dopaminergic nöronların hasar almasını önleyebilirler. Parkinson Hastalığı'nın tedavisinde etkin olmalarına karşın kusma, mide bulantısı, ortostatik hipotansiyon ve halüsinasyon gibi yan etkileri vardır (Brooks, 2000).

2.2.3.4. MAO İnhibitörleri

Monoamin oksidaz (MAO) enzimi, nöronların ve nöron olmayan hücrelerin mitokondrilerinin dış membranında bulunur ve iki formu vardır: MAO-A ve MAO-B. MAO inhibitörleri psikiyatride depresif hastalıkların ve nörolojide Parkinson Hastalığı'nın tedavisinde kullanılmaktadır. Dopamin, MAO-B tarafından deamine edilir. Bazı kimyasallar ile inhibe edilen MAO-B, beyinde dopaminin deaminasyon mekanizmasını olumsuz etkileyerek dopamin miktarının artmasına neden olmaktadır (Yamada & Yasuhara, 2004).

2.2.3.5. Cerrahi Yöntem

Ciddi derecede motor fonksiyon kaybı olan hastalara cerrahi tedavi yöntemi de uygulanmaktadır ama bu yöntem hastanın levodopaya olan cevabını önemli ölçüde artırmamaktadır (Walter ve Vitek, 2004).

2.2.3.6. Kök Hücre Tedavisi

Parkinson Hastalığı'nın bir diğer tedavi yöntemi de kök hücre tedavisidir. Dopaminergic prekürsörlerin transplantasyonu ile motor fonksiyonlarda ilerleme gözlenebilir kök hücre tedavisi, kök hücrelerin henüz farklılaşma yeteneği olmadığı için karmaşık ve uygulanması zor bir yöntemdir (Pradhan vd., 2022).

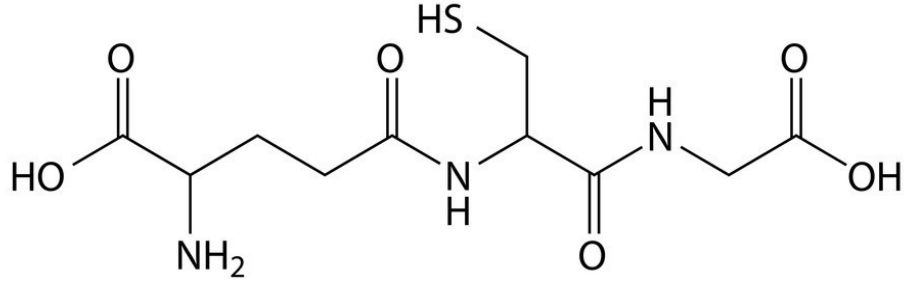
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle beraber artmış oksidatif stresin potansiyel sebepler arasında olduğu açıklanmıştır. Biriken oksidatif

stres, hücresel hasara, DNA onarım sisteminde bozukluklara ve mitokondriyel disfonksiyona sebep olur ki bu belirtiler de yaşlanmada ve nörodejeneratif hastalıkların oluşmasında büyük rol oynamaktadır (Kim vd., 2015).

2.3.1. Glutasyon (GSH)

1960'larda superoksitin keşfi ile reaktif oksijen türlerinin biyolojik önemi de artmaya başlamıştır. Bu durum bitkilerdeki glutatyona ilgiyi tetiklemiştir. Glutasyon bitkilerde strese dayanıklılıkta önemli rol oynamaktadır. Görüşler glutasyonun gelişmeye başlayan oksidatif stres sinyallerinin iletilmesinde rol aldığı yönündedir. Günümüzde glutasyonun bitkilerde redoks reaksiyonlarında, hücre homeostasisinde ve hücre savunma mekanizmasında önemli rol oynadığı çok açıktır (Noctor vd., 2011). Nöronlar vücuttaki en aktif hücrelerdir ve sağlıklı çalışabilmeleri için yeterli miktarda oksijene ve glukoza ihtiyaç duymaktadırlar. Ancak serbest oksijen radikallerinin miktarı hücrelerin yok edemeyeceği kadar artarsa, oksidatif stres meydana gelir ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna katkı sağlanır. Serbest oksijen radikalleri lipid membranlara, DNA bütünlüğüne ve hücre solunumuna negatif etki etmektedir. Sinir sisteminin diğer bölgelerindeki kayıplarla beraber özellikle substantia nigra pars compactadaki dopaminerjik nöronların kaybı Parkinson Hastalığı'nın ana sebebidir. Substantia nigranın neden bu kadar etkilendiği bilinmemekle birlikte, substantia nigrayı oksidatif strese karşı savunmasız yapan birçok özelliği vardır (Smeyne vd., 2013). Hidrojen peroksit (H_2O_2), superoksit anyonu ve hidroksil radikali ($HO\cdot$) reaktif oksijen türlerinin örneklerindedir (Imlay & Linn, 1988). Beyindeki serbest radikallerin uzaklaştırılmasında GSH önemli bir yere sahiptir. Glutasyon ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görevli bir antioksidan olup izomerizasyon reaksiyonlarında kofaktör olarak görev yapmakta, sistenin depolanmasında ve taşınmasında görev almaktadır. Hücre sayısının artmasında önemlidir ve ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesini sağlamaktadır. Hücre içerisinde glutasyonun yüksek konsantrasyonları, reaktif oksijen türlerine karşı hücrenin savunma sisteminde oldukça önem arz etmektedir. GSH, enzimatik olmayan yollar ile radikallerle etkileşime girmekte ve peroksitlerin indirgenmesinde elektron vericisi olarak görev yapmaktadır (Poole, 2015).

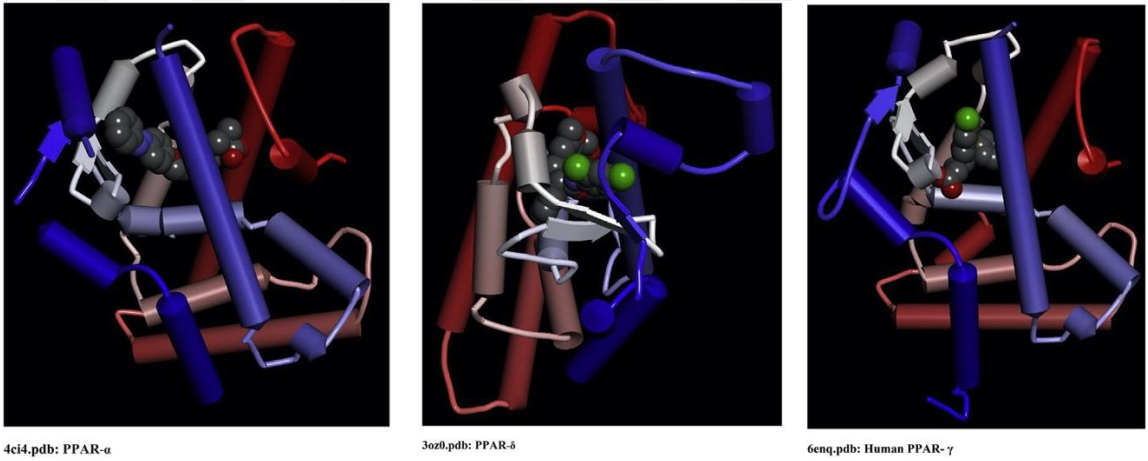


Şekil 5. Glutasyon yapısı

2.3.2. Glutasyon Sentezi

Glutasyon, glutamat sistein ligaz (γ -glutamilsistein sentaz) ve glutasyon sentaz (γ -L-glutamil-L- sistein: glisin ligaz) enzimlerinin katalizlediği iki aşamalı bir mekanizmayla glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir (Sekhar vd., 2011). Glutasyonun büyük bir kısmı hücre sitoplazmasında, 5%-15%'lik kısmı da glutamat sistein ligaz (GCL) enzimi yeterli olmadığı için kendisi sentezleyememesine rağmen mitokondride bulunmaktadır. GCL, glutamat ve sisteinin γ -glutamilsistein (γ GluCys) dipeptidini oluşturduğu ilk aşamayı düzenlemektedir. γ -glutamil-sistein, GSH sentetaz enziminin katalizlemesiyle glisin ile tepkimeye girer ve glutasyonu oluşturur. Glutasyon GCL'nin feedback inhibisyonu sayesinde kendi sentez tepkimelerini düzenleyebilmektedir. İkinci tepkimede ise EAAC1 enzimi glutamat ve sisteini birleştirmekte ve γ -glutamilsistein oluşturmaktadır. Sonrasında γ -glutamilsistein, glisin ile tepkimeye girmekte ve glutasyon oluşmaktadır. Bu tepkimeler ATP kullanılarak devam etmektedir. Beyin, vücut ağırlığının 2%'sini oluşturmakla birlikte vücudun ürettiği ATP'nin 20%'sini kullanmaktadır (Aoyama vd., 2008).

PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ olmak üzere üç formu vardır. Tüm PPAR'lar homeostazi, lipid ve glikoz metabolizması, hücrel farklılaşma gibi metabolik olaylarda rol almaktadırlar. PPAR'lar ligand bağlanmasıyla bazı reseptörler ile etkileşerek gen ekspresyonunu düzenlemektedirler (Mirza vd., 2019). PPAR γ adipoz dokuda, endotel hücrelerde ve dolaşım sistemindeki düz kas hücrelerinde bulunmakta ve inflamasyon ile ateroskleroza azaltmaktadır. PPAR γ lipid ve glikoz metabolizmasını düzenlemekte ve glitazonlar grubundan sentetik ligandları, insülin ve glikoz verilerini iyileştirmektedir (Janani & Kumari, 2015).



Şekil 7. PPAR izoformları. Mavi ile gösterilen PPAR'lar N-terminusu, beyaz ve kırmızı ile gösterilenler C-terminusu göstermektedir (Mirza vd., 2019).

2.4.1. PPAR γ Agonistleri

PPAR γ moleküler sensör gibi davranmaktadır. Yapılan son çalışmalarda PPAR γ 'nın, beyinde antiinflamatuvar görev yaptığı ve daha çok mikroglia ve astrositlerde bulunduğu gösterilmektedir. Son yıllarda yapılan hayvan deneylerinde nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda PPAR γ 'nın koruyucu etkileri dikkat çekmektedir. Romatoid artrit sebep olduğu inflamasyon, hastaların ilerleyen dönemlerde aterogeneze bağlı koroner hastalığa sahip olma riskini artırmaktadır. PPAR γ agonistlerinin romatoid artrite bağlı inflamasyonu azalttığı saptanmıştır. Koroner

arterlerdeki hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltmaktadır. Aynı zamanda Parkinson Hastalığı'na bağlı semptomlarda azalma ve dopaminerjik nöronların korunmasının iyileşmesi de bulgular arasındadır (Kapadia vd., 2009).

2.4.1.1. Pioglitazon

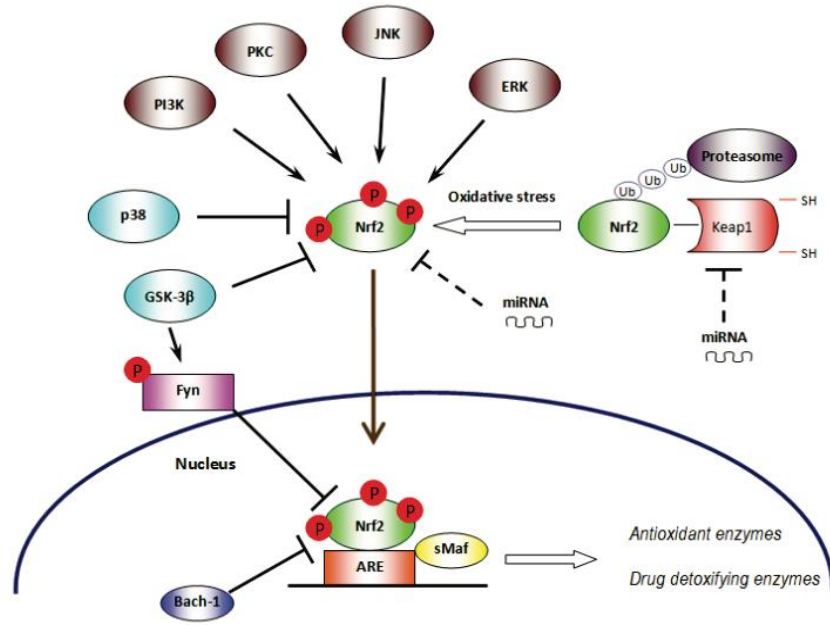
PPAR γ agonisti tiyazolidindiyon (TZDs) grubu ilaçlar, diyabet tedavisinde insülin direnci üzerinde kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda aterosklerotik plakların oluşumunu baskılayıcı özellikleri vardır. C- reaktif proteinler (CRP) gibi inflamatuvar işaretleyici molekülleri azaltarak inflamasyonu azaltırlar (Xu vd., 2018). Son yıllarda, PPAR γ agonistlerinin inflamasyonu azaltıcı, oksidatif stresi ve apoptozu önleyici özelliklerinden dolayı nörolojik hastalıklar umut vermektedirler. MS, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı ve serebral iskemi üzerindeki nöroprotektif özellikler yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Laloux vd., 2012). Lipopolisakkaritler kullanılarak oluşturulan bir nöroinflamasyon modelinde pioglitazon, glia aktivitesini azaltmış, mitokondri aktivitesini artırmış, striatal dopamini eski düzeyine getirmiş ve oksidatif stresi azaltmıştır. MPTP ile oluşturulan in vivo Parkinson Hastalığı modelinde, pioglitazon ağız yoluyla kullanıldığında substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöron kaybını azalttığı görülmüştür (Swanson vd., 2011). In vitro ve prelinik çalışmalarda glitazonların nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Buna rağmen hangi PPAR gama agonistinin daha etkin olduğu ve söz konusu reseptör harici farklı koruyucu mekanizmaları da kullananların olabileceği belirsizliğini korumaktadır.

2.4.1.2. Tideglusib

Tideglusib tiyazolidinyon ailesinden bir glikojen sentez kinaz 3 β (GSK-3 β) inhibitörüdür. GSK-3, α ve β olarak iki izoformu olan ve hücre ölümünde önemli rol oynayan bir pleiotropik kinazdır. GSK-3 β inhibisyonu Parkinson tedavisinde potansiyel bir seçenek olarak görülmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada tideglusibin nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2-ARE)'nin hücre yaşamını artırabildiği ve Parkinson etkenlerinin zıttı şeklinde davranabildiği gösterilmiştir (Li vd., 2020). Ancak bu konuda henüz yeteri kadar çalışma yapılmadığı için tideglusibin hücre canlılığını artırmadaki rolü tam olarak bilinmemektedir.

2.5. Nrf2-ARE Yolağı

Hücrelerin oksidatif strese verdiği tepkiler farklı savunma sistemleri ile düzenlenmektedir. Faz II antioksidan tepkisi, bu savunma yolaklarının en önemlisi olarak kabul edilmektedir ve transkripsiyon faktör (Nrf2) ile düzenlenmektedir. Nrf2, GR, GST, γ -glutamilsistein sentetaz (γ -GCS) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi birçok enzimin kurucu ve indükleyici genlerinden sorumlu bir yolaaktır (Buendia vd., 2016). Normal şartlarda Nrf2, Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap1) tarafından inhibe edilir ve sitoplazmada tutulur ancak hücreler ROT benzeri oksidatif strese maruz kaldıkları zaman Keap1 bloke edilir ve Nrf2'yi inhibe edemez ve Nrf2 hücre çekirdeğine girer. Küçük Maf proteini (sMaf) antioksidan cevap elementine (ARE) bağlanır ve ARE genleri aktive edilerek antioksidan cevap ortaya çıkar. GSK-3 β , Nrf2'nin çekirdekteki inhibisyonunu sağlar (Barancik vd., 2016).



Şekil 8. NRF2 regülasyonu (Barancik vd., 2016)

2.6. Parkinson Deney Modeli Oluşturma

Parkinson Hastalığı sadece semptomatik tedavisi olan ve hastaların günlük yaşamlarını olumsuz etkileyen ilerleyici bir hastalıktır. Günümüzde uygulanan tedavilerin ve hastalığı tedavi edici ilaçların geliştirilebilmesi için in vivo ve in vitro modeller üzerinde çalışma yapılması gerekmektedir.

2.6.1. In Vitro Model SH-SY5Y Hücre Hattı

SH-SY5Y hücre hattı, nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili hüresel düzeyde çalışmalarda kullanılan ve SK-N-SH hücre hattının bir alt hattı olan nöroblastoma hücre hattıdır. 1970 yılında metastatic nöroblastoma hastası olan bir kız çocuğunun kemik iliği biyopsisi alınması ile keşfedilmiştir (Xicoy vd., 2017). SH-SY5Y hücreleri dopamine üretme özelliğine sahiptir ve sadece dopaminerjik nöronlarda bulunan dopamine taşıyıcılarını (DAT) bulundurur. Son olarak SH-SY5Y hücreleri sadece düşük seviyedeki dopamin reseptörlerini gösterir bu nedenle dopamin agonistlerinin nöroprotektif özellikleri gösterilebilir. Yukarıda sayılan özellikler ile SH-SY5Y hücreleri dopaminerjik nöronlara çok benzemekte ve Parkinson Hastalığı in vitro deney modellerinde en çok kullanılan hücre hattı olmaktadır (Xie vd., 2010).

Gereç ve Yöntem

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Araçlar

- MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinyum) (Sigma)
- LDH (Sigma)
- DMEM-F12 besiyeri (Sigma)
- FBS (fetal sığır serumu) (Biowest)
- Tripsin
- PBS
- Tideglusib (NP-12, NP031112) (Sigma)
- Pioglitazon (Sigma)
- Antikorlar (anti Nrf2, anti-HO-1, anti-NQO1, anti-GSK-3 β) (Cell Signaling)
- Revers Transkriptaz PCR (cDNA sentezi) Kiti (Thermo Scientific)
- Glutasyon Redüktaz Kit (ECGR-100) (EnzyChrom)
- Glutasyon S-Transferaz Aktivite Kalorimetrik Tayin Kiti (Biovision®, ABD)
- Glutasyon GSH/GSSG Tayin Kiti (Biovision®, ABD)
- LDH Sitotoksisite Kiti (88953) (Pierce)
- BCA Protein Miktar Tayin Kiti (Thermo)
- MasterPure RNA İzolasyon Kiti (Epicentre)
- LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche)

3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

20mM MPP⁺ (MA= 297.13):

29.71mg MPP⁺ tartıldı. DMEM (FBS ve L-glutamin içermeyen) besiyeri içerisinde 5ml olacak şekilde hazırlandı. İstenen konsantrasyonlar besiyeri içinde seyreltilerek hazırlandı. Karanlıkta muhafaza edildi.

25 μ M Tideglusib (MA= 334.39):

1.5mg tideglusib tartıldı ve 8.89ml DMSO içerisinde çözündürülerek 500 μ M olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışımdan 50 μ l, içerisinde 950 μ l DMEM besiyeri bulunan başka bir ependorfa aktarılarak 25 μ M tideglusib hazırlandı. İstenen

konsantrasyonlar, kullanılacağı zaman stok çözeltiden besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

50µM Pioglitazon (MA= 392.90):

1mg pioglitazon.HCl tartıldı ve 10.18ml DMSO içerisinde çözündürülerek 250µM olarak hazırlandı. Hazırlanan karışımdan 200µl, içerisinde 800µl DMEM besiyeri bulunan başka bir ependorfa aktarılarak 50µM pioglitazon hazırlandı. İstenen konsantrasyonlar, kullanılacağı zaman stok çözeltiden besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

100mM tBHQ:

1,66 mg tBHQ, 1ml DMSO içerisinde çözündürüldü. 100µl 100mM tBHQ üzerine 9.9ml FBS içermeyen DMEM eklenerek 1mM olacak şekilde hazırlandı.

3.3. Hücrelerin Çoğaltılması

Yapılan deneylerde E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Çığır Biray Avcı'dan temin edilen insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) kullanıldı. Glutamaterjik ve dopaminerjik reseptörlere sahip olan bu hücre serileri, hücresel düzeyde Parkinson hastalığı deney modeli oluşturmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Çalışma süresince hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), 2mM L-glutamin, 100U/ml steril besi yeri kullanılarak hücre kültür kaplarına ekildi, %5 CO₂ ile 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı ve besiyeri uygun aralıklarla değiştirilerek çoğaltıldı, 1:4 oranında pasajlandı. Deneyler sırasında hücre serilerinin kullanımı 20 pasajlama ile sınırlandırıldı. İstenilen hücre sayısı elde edildikten sonra, hücreler tripsin (%0.25) ile kültür kaplarından kaldırıldı ve santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı. Thoma lamına yerleştirildi ve invert mikroskop ile sayıldı. Çalışma için gereken hücre sayısını içeren miktarlar, deneyden 24 saat önce FBS içermeyen besiyeri ile 6- ya da 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi.

3.4. MPP⁺/Tideglusib, MPP⁺/Pioglitazon Deney Planı

MPP⁺ için IC₅₀ değeri ve süre, tideglusib ve pioglitazon için doz-yanıt eğrileri “1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP⁺) ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Deney Modelinde Tideglusib ve Pioglitazonun Nrf2/ARE Yolağı Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı

projenin ilk kısmında belirlenmiştir. Belirlenen dozlarla, çalışmanın geri kalanında oluşturulan deney planı ve hücrelerin toplama yöntemi aşağıdaki gibidir: 3, 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalar yapıldı. Her saat için 2'şer kültür kabı ile çalışıldı. Her kuyucuğa 1×10^6 hücre ekildi. Hücreler çalışma saatinden 24 saat önce ekildi. 100X konsantrasyonda hazırlanan ajanlardan gerekli dozlarda seyreltmeler yapılarak kullanıldı.

3.4.1. Ajanlarla Muamele

6 kuyucuklu kültür kaplarında her kuyucuğa 1×10^6 hücre ve 1ml/kuyucuk DMEM ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklendi. Ajan uygulamaları aşağıdaki dozlarla yapıldı:

- Sadece MPP⁺ li gruplara, 150µl 20mM MPP⁺ + 350µl besiyeri
- MPP⁺ + tideglusib gruplarına, 150µl 20mM MPP⁺ + 150µl 25µM tideglusib + 200µl besiyeri
- MPP⁺ + pioglitazon gruplarına, 150µl 20mM MPP⁺ + 150µl 50µM pioglitazon + 200µl besiyeri
- Sadece tBHQ gruplarına, 150µl 1mM tBHQ + 350µl besiyeri

Hücreler ekildikten sonra 3, 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalar için pre-treatment uygulaması yapıldı. Pre-treatment uygulamada sadece MPP⁺ li gruplara 350µl besiyeri, MPP⁺ + tideglusib gruplarına 150µl 25µM tideglusib ve 200µl besiyeri, MPP⁺ + pioglitazon gruplarına 150µl 50µM pioglitazon ve 200µl besiyeri, sadece tBHQ gruplarına, 150µl 1mM tBHQ ve 350µl besiyeri eklendi. %5 CO₂ ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda kontrol ve tBHQ grupları hariç 150µl MPP⁺ eklendi ve 3, 6, 12, 24 saat karbondioksit inkübatöründe beklendi.

3.4.2. Hücrelerin Toplanması

6-kuyucuklu plakalar buz üzerine alındı. Bu aşamadan sonra işlemlere kabin dışında devam edildi. Plakalardaki besiyerleri pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 1ml soğuk 1XPBS konuldu ve 10 kez pipet ucu ile çek-bırak yapılarak hücrelerin kalkması sağlandı. Her grup kendi adının yazılı olduğu ependorflara alındı. Kuyucuklara tekrar 1ml soğuk 1XPBS konuldu ve buz zerinde bekletildi. Ependorflar 10.000rpm×1dk.

süreyle +4°C’de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Kuyucuklardaki PBS tekrar 10 kez çek-bırak yapılarak aynı ependorflara aktarıldı. Kuyucuklara tekrar 1ml soğuk PBS konuldu. Bu işlem toplam 3 kez tekrarlandı. En son üstteki sıvı alındıktan sonra hücreler tekrar santrifüj edildi. Hücrelerin üzerinde hiç sıvı kalmamasına dikkat edilerek kalan sıvı toplandı ve hücreler -80°C’ye kaldırıldı.

3.5. Hücrelerden LDH Salınımının Ölçülerek Hücre Ölümünün Tespiti

LDH, birçok farklı hücre tipinde bulunan sitozolik bir enzimdir. Hücre membranı hasarlandığında, sitozoldeki LDH hücre dışına salınır. Bu yöntemle uygulanan ajanların hücre ölümüne katkısı veya hücre ölümünü azaltıcı etkilerini belirlemek üzere laktat dehidrogenaz enziminin sitoplazmadan kültür ortamına geçişine bakıldı. LDH salınımı LDH Sitotoksinite Kiti (Pierce, 88953) kullanılarak belirlendi. Tideglusib, pioglitazon, tBHQ ile MPP⁺ ajanları uygulandı. Reaksiyon karışımı hazırlamak için 1şişe substrat karışımı 11.4ml distile suda çözündürüldü. 1 şişe deney tamponu (assay buffer) (0.6ml) oda sıcaklığında, ışıktan korunarak bekletildi. Reaksiyon karışımı değerlendirme tamponu ve substrat karışımı kullanılarak hazırlandı ve ışıktan korundu. Pozitif kontrol için, 1µl LDH Positive Control 10ml PBS ile karıştırılarak hazırlandı.

Ajanların uygulandığı kuyucukların her birisine 10µl lizis tamponu (10X) eklendi ve hafifçe çalkalandı. %5 CO₂, 37°C’de 45dk. inkübe edildi. Kuyucuklardan 50µl medium alınarak temiz 96-kuyucuklu plakaya aktarıldı. Üzerine 50µl reaksiyon karışımı ilave edildi. Plaka, 30dk. boyunca ışıktan korunarak oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyon, kuyucuklara 50µl durdurma çözeltisi eklenerek durduruldu. 490nm dalga boyunda, mikropilaya okuyucuda (Multiscan Go, Thermo Scientific) absorbanslar ölçüldü.

Referans dalga boyu olarak 680nm kullanıldı. Ayrıca ajan uygulanan örneklerle birlikte sadece lizis çözeltisi ve hücre içeren bir pozitif kontrol grubu ile herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu kullanıldı. Hesaplama kontrolüne göre değişim (%) olarak ifade edildi.

3.6. Hücrelerin Homojenize Edilmesi ve Protein Miktarı Tayini

3.6.1. Hücrelerin Homojenizasyonu

6-kuyucuklu petri kaplarına ekilen ve ajanlar uygulandıktan sonra tripsin yardımıyla kaldırılan ve -80°C 'de saklanan hücre pelletleri çıkarıldı, 30dk. buzda bekletildi. Üzerlerine 1X halt proteaz inhibitör kokteyli içeren ve deney günü hazırlanan soğuk lizis tamponundan $80\mu\text{l}$ eklendi. Ependorflar önce 20sn. vortekslenildi ve 5dk. buzda bekletildi. Daha sonra 10sn. vortekslenildi ve 5dk. buzda bekletildi. En son 5'er sn. vortekslenip 5'er sn. buzda bekletilerek 30dk. tamamlandı. 30dk. sonunda ependorflar, $14.000\text{rpm} \times 15\text{dk.} +4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Ependorflardaki supernatant, pelletlenmemesine dikkat edilerek temiz ependorflara alındı. Bu kısım sitoplazmik ekstraktı içeren supernatanttır. Hücre pelletleri -80°C 'ye kaldırıldı. Supernatantlar protein miktar tayini için kullanıldı.

3.6.2. Protein Miktarı Tayini

Bikinkoninik asit (BCA) Protein Assay Kiti, total proteinin miktarının ya da kalorimetrik olarak belirlenmesini esas alır. Bu yöntemin aslı, Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi ile ortamda artan Cu^{+1} 'in kalorimetrik olarak ölçülmesine dayanır. BCA'nın, 562nm 'de koyu mor renk vermesiyle karakterize olur. BCA ile birlikte dört amino asit (sistein, sistin, triptofan, tirozin) bu tepkimede görev alır. Bu yöntemle birlikte glutasyon ile ilişkili protein (GR, GSTs, GSH) analizi yapıldı. PPAR γ ve Nrf2 ile Keap1 yollarındaki değişimler gösterildi.

3.6.2.1. Standartların ve Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

Standart olarak kullanılacak olan sığır serum albümini (BSA), çalışma çözeltisine göre oranı (sample to WR ratio) 1:8 olacak şekilde distile su ile seyreltildi. Çalışma çözeltisi olarak 50:1 oranında Reagent A:B hazırlandı (Örnek sayısı $\times 200\mu\text{l}$). 6ml Reagent A ve $120\mu\text{l}$ Reagent B kullanıldı.

Örneklerden $25\mu\text{l}$ elde edebilmek için protein konsantrasyonlarındaki farklılığa göre 1:5 oranında lizis tamponu ile seyreltildi ($5\mu\text{l}$ örnek + $20\mu\text{l}$ lizis tamponu). Mikroplakaya

25µl örnek/standart konuldu. Körlere, için sadece 25µl lizis tamponu kullanıldı. Üzerlerine 200µl WR ilave edildi ve çalkalayıcıda 30sn. çalkalandı. Mikroplakanın üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak, mikroplaka 37°C'de 30dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığına (25°C) getirilerek 562nm dalga boyunda, mikroplaka okuyucu (Multiskan Go, Thermo Scientific) ile absorbans ölçüldü. Bilinen BSA konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak çizilen standart eğri grafiği yardımı ile örneklerdeki protein miktarı tayin edildi.

3.7. Glutatyon ile İlişkili Protein Analizi

3.7.1. Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışma çözeltisi (WR), 15 örnek olacak şekilde hazırlandı. Çözeltiye; 120µl substrat, 120µl co-substrat, 15µl GDH, 7.5µl DTNB ve 1050µl Assay Buffer konuldu. 96-kuyucuklu kültür plakasında körlere 20µl lizis tamponu ve kalibratörlere 100µl kalibratör ve 100µl assay buffer konuldu. Kuyucuklara her örnekten 20µl konuldu ve üzerine 80µl WR eklendi. Plaka 25°C'de 10 dk inkübe edildikten sonra 412nm ile okundu. 30 dk sonra okuma işlemi tekrarlandı.

3.7.2. Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Her kuyucukta son hacim 200µl olacak şekilde kör gruplar için, 3 kuyucuğa 170µl assay buffer ve 20µl glutatyon eklendi. Pozitif kontrol grupları için, 3 kuyucuğa 150µl assay buffer, 20µl glutatyon ve 20µl seyreltilmiş GST konuldu. Örnek kuyucukları için, 150µl assay buffer, 20µl glutatyon ve 20µl örnek konuldu. Kuyucuklara eklenen örnek miktarları her zaman 20µl'dir. Daha sonra her bir kuyucuğa 10µl CDNB ekleyerek tepkime başlatıldı. 96-kuyucuklu plaka hafifçe çalkalanarak karıştırıldı ve 10dk boyunca her dakikada 340nm ile okuma işlemi yapıldı.

3.7.3. Toplam Glutatyon Miktarı değerlendirilmesi

Scavenger, DTNB ve assay buffer oda sıcaklığında bekletildi. 2X assay buffer, 2X dH₂O ile seyreltildi.

Deproteinizasyon prosedürü:

0,1g TCA ve 1ml distile su kullanılarak MPA ayracı deney günü taze olarak hazırlandı. MPA ayracından 65µl alınarak 25µl'lik örneklerin üzerine eklendi ve vortekslendi. Daha sonra 14.000rpm'de 5dk santrifüj edildi. Her kuyucuğun toplam hacmi 200µl olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplandı ve yeni ependorflara alınan 12µl supernatant üzerine 488µl assay buffer eklendi. Bu işlemi takiben 96-kuyucuklu plakaya kullanılan her kuyucukta 200µl son hacim olacak şekilde örnekler paylaştırıldı.

Glutatyon değerlendirilmesi:

Standartları hazırlamak için 6µl 100µM standart, 1994µl dH₂O ile 300µM olacak şekilde seyreltildi. Daha sonra 3µM'lık premix hazırlamak için 10µl 300µM GSH ve 990µl assay buffer karıştırıldı. Standartlar dört ayrı ependorfta;

1. ependorfta 500µl premix ve 0µl assay buffer,
2. ependorfta 300µl premix ve 200µl assay buffer,
3. ependorfta 150µl premix ve 350µl assay buffer,
4. ependorfta 0µl premix ve 500µl assay buffer olacak şekilde seyreltildi.

Daha sonra her kuyucuğa 200µl son hacim olacak şekilde standartlardan konuldu.

Çalışma çözeltisi (WR) hazırlamak için; tüm örnek sayısına yetecek kadar hesaplanarak 2.625µl assay buffer, 25µl GR enzim, 6.25µl NADPH ve 12.5µl DTNB karıştırıldı.

Daha sonra kullanılan her kuyucuğa 100µl WR eklendi. Örneklerden 200µl ve standartlardan da 200µl eklenerek iyice karıştırıldı. 412nm okuyucuda başlangıçta ve 10.dk'da okuma işlemi yapıldı.

3.8. Nrf2/ARE Yolağı ile İlişkili mRNA Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimin

Gözlenmesi

3.8.1. Grupların Oluşturulması

Daha önceden belirtildiği gibi toplanan ve -80°C'ye kaldırılan nöroblastoma hücreleri kullanıldı. Nrf2 ile ilişkili genlerdeki değişim incelendiğinden karşılaştırmak amacıyla Nrf2 aktivatörü (indükleyicisi) olan tert-butilhidrokinon (tBHQ) uygulanan gruplar, pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı.

3.8.2. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için MasterPure RNA İzolasyon Kiti (Epicentre) kullanıldı. Hücre pelletinin üzerine 300µl hücre lizis tampon ve 1µl proteinaz K eklendi. Örnekler 65°C'de 15dk bekletildi ve üzerine 175µl protein presipitasyon çözeltisi eklendi, 15sn karıştırıldı. +4°C'de 12.000rpm'de 15dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant dikkatli bir şekilde alınarak yeni ependorflara konuldu. +4°C sıcaklıkta 12.000rpm'de 15dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Ependorfların dibinde kalan RNA'ların üzerine 500µl %70 konsantrasyonda soğuk etanol eklendi ve ependorflar 7.500rpm'de 10dk santrifüj edildi, etanol uzaklaştırıldı. Ependorflar ağız açık biçimde 10dk boyunca etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletildi. Üzerlerine 25µl Tris-EDTA ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Buz üzerinde iki dakika bekletildi.

3.8.2.1. Total RNA Konsantrasyonunun Ve RNA Saflığının Belirlenmesi

Spektrofotometreye 2µl total RNA örneği konuldu ve 260nm ile 280nm dalga boylarında ayrı ayrı absorbansları ölçüldü. A260/A280 oranı RNA'nın kalitesini belirler. İdeal olan, bu oranın 1.6-2 arasında olmasıdır.

3.8.2.2. Total RNA Konsantrasyonunun 1µg/µl'ye Standardizasyonu

Tüm örneklerdeki RNA içerikleri 1µg/µl olacak şekilde seyreltilme yapıldı. Bunun için 4µl'lik RNA örneği üzerine eklenecek DEPC-su hacmi hesaplandı ve böylece 1µg/µl konsantrasyonda RNA çözeltisi elde edildi.

3.8.3. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemi İle cDNA Sentezi

4µl 1µg/µl seyreltilmiş RNA örneği, 1µl random heksamer primer ve 6µl arirojen su (nükleaz içermeyen su) PCR tüpünde, buz üzerinde karıştırıldı. Mikrosantrifüjde 3-5sn karıştırılarak damlaların düşmesi sağlandı. Daha sonra tüpler, GC-zengin RNA'ların ve RNA'daki ikincil yapıların denatürasyonu için 75°C'de 5dk inkübasyona bırakıldı. PCR tüpleri buz üzerine alındı ve mikrosantrifüjde 3-5sn karıştırıldı. Bu işlemde sonra kaç örnekle çalışılacaksa o sayıya göre "havuz" hazırlandı: 100µl 5X reaksiyon tamponu, 25µl ribonükleaz inhibitör ve 50µl 10mM'lik dNTP mix kullanıldı. Havuzdan her örneğe 7µl ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı. 25°C'de 5dk inkübasyona bırakıldı. PCR

programı; enzimin etkili olduğu 42°C’de 1 saat, enzimin inaktive edildiği 94°C’de 7 dakika süreyle devam etti. Oluşan cDNA’lar -20°C sıcaklıkta saklandı.

3.8.4. Real-Time PCR Yöntemi ile cDNA Amplifikasyonu

Real-time PCR yöntemi ile mRNA analizi için LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) kullanıldı. Deneyden önce, kullanılan primerler 100µM olacak şekilde seyreltildi ve daha sonra 10µM’a getirildi. SYBR Green I Master Mix (2X) deneyden hemen önce eklendi. cDNA’lar 1:25 oranında seyreltildi. PCR tüpüne 5µl seyreltilmiş cDNA, üzerine 1µl ileri ve geri primerler ile 3µl nükleaz içermeyen su eklendi. Son olarak tüplere 10µl SYBR Green I Master Mix (2X) eklendikten sonra PCR cihazına (FABAL Roche-LightCycler 480 System (96-well)) yerleştirildi. Negatif kontrol tüplerinde sadece nükleaz içermeyen su kullanıldı.

3.9. PPARγ Protein Düzeyindeki Değişimin Gözlenmesi

3.9.1. Grupların oluşturulması

3, 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalar sonucunda, SH-SY5Y hücreleri önceden belirtildiği gibi toplanıp -80°C’de muhafaza edildi ve protein miktar tayini yapıldı. PPARγ protein düzeyindeki değişim Western Blot yöntemi ile belirlendi.

3.9.2. Western Blot Yöntemi

3.9.2.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

%10’luk ayırıcı jel için, 1.975ml dH₂O, 1.650ml akrilamid, 1.235ml 4X ayırıcı jel tamponu, 50µl %10’luk SDS solüsyonu karıştırıldı. Jel dökülmeden hemen önce karışımın içine 50µl %10’luk amonyum persülfat ve 4µl TEMED eklendi. %10’luk paketleyici jel için 1.700ml dH₂O, 0.425ml akrilamid, 0.312ml paketleyici jel tamponu ve 50µl %10’luk SDS solüsyonu karıştırıldı. 10 kuyucuk için uygun olan tarak kullanılarak örneklerin her biri 30µg protein içerecek şekilde 15µl yükleme tamponu ile birlikte 95°’de 5dk inkübe edildi. Yükleme tamponu, 360µl 3xCell Signaling Blue Loading Buffer ve 4µl β-ME karıştırılarak hazırlandı. Daha sonra, LB yazan kuyucuklara sadece yükleme tamponundan 15µl, örneklerin olduğu kuyucuğa

karışımdan 30'ar µl yüklendi. Yürütme tamponu 1X'e getirildi. Camların arası ve tank "2 gel" yazan yere kadar dolduruldu ve 200V'ta (12mA) yaklaşık 40dk yürütüldü.

3.9.2.2. Transfer

Transfer tamponu (LONZA) 1X'e seyreltildi. 3 ayrı kaba dH₂O, metanol ve transfer tamponu konuldu. Membranlar sırasıyla, 30sn metanol, 2dk dH₂O ve daha sonra transfer tamponuna aktarıldı. Kasette siyah olan tarafa 2 sünger, 2 ıslak whatman, jel, membran, 2 ıslak whatman ve 2 sünger konuldu. Tank, transfer tamponu ile dolduruldu ve buzun içinde 200mA (70V)'ta 1.5 saat bekletilerek transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.9.2.3. Bloklama

1X TBS-T hazırlandı. Membran, transfer sonrasında 5dk boyunca oda sıcaklığında, çalkalayıcıda TBS-T ile yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Daha sonra membran, 15ml bloklama tamponu ile çalkalayıcıda 2 saat bekletildi.

3.9.2.4. Primer Ab ile İnkübasyon

10ml bloklama tamponu ve 10µl PPAR γ antikor (1:1000, rabbit, Cell Signaling) hazırlandı. Membran, +4°C'de 1 gece boyunca antikorla inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, 1X TBS-T ile 3×10dk yıkandı.

3.9.2.5. Sekonder Ab İle İnkübasyon

Membran, yıkama sonunda 10ml bloklama tamponu ve 5µl sekonder Ab (1:2000, goat anti-rabbit IG, HRP-linked, Cell Signaling) içeren solüsyonda oda sıcaklığında, 1 saat inkübe edildi. 1X TBS-T ile 3×10dk yıkandı.

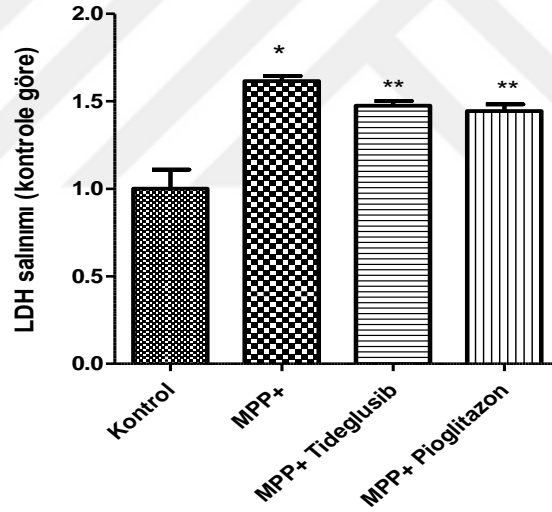
3.9.2.6. Görüntüleme

Thermo (34080) SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate ile kemigörüntüleme yapıldı. Membranın üzerine kitte bulunan 1ml peroksit tamponu ve 1ml kıvılcık ışığı artırıcı protein ile loş ışıkta yaklaşık 1dk beklendi. ECL görüntüleme cihazında Fusion FX programı kullanılarak görüntü alındı.

Bulgular

4.1. Hücrelerden LDH Salınımının Ölçülerek Hücre Ölümünün Tespiti

Deney sonuçlarımız, MPP⁺ uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde laktat dehidrogenaz (LDH) enzim salınımını arttırmak suretiyle hücre ölümünü tetiklediğini göstermiştir ($p < 0.001$). LDH salınımı MPP⁺ grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.001 ± 0.109), 1.601 ± 0.031 kat fazla bulunmuştur. Bununla birlikte hem tideglusib hem de pioglitazon uygulaması MPP⁺'nin neden olduğu LDH salınımını azaltmıştır ($p < 0.01$) (1.601 ± 0.031 ve sırasıyla, 1.475 ± 0.026 ve 1.443 ± 0.039) (Grafik 1).

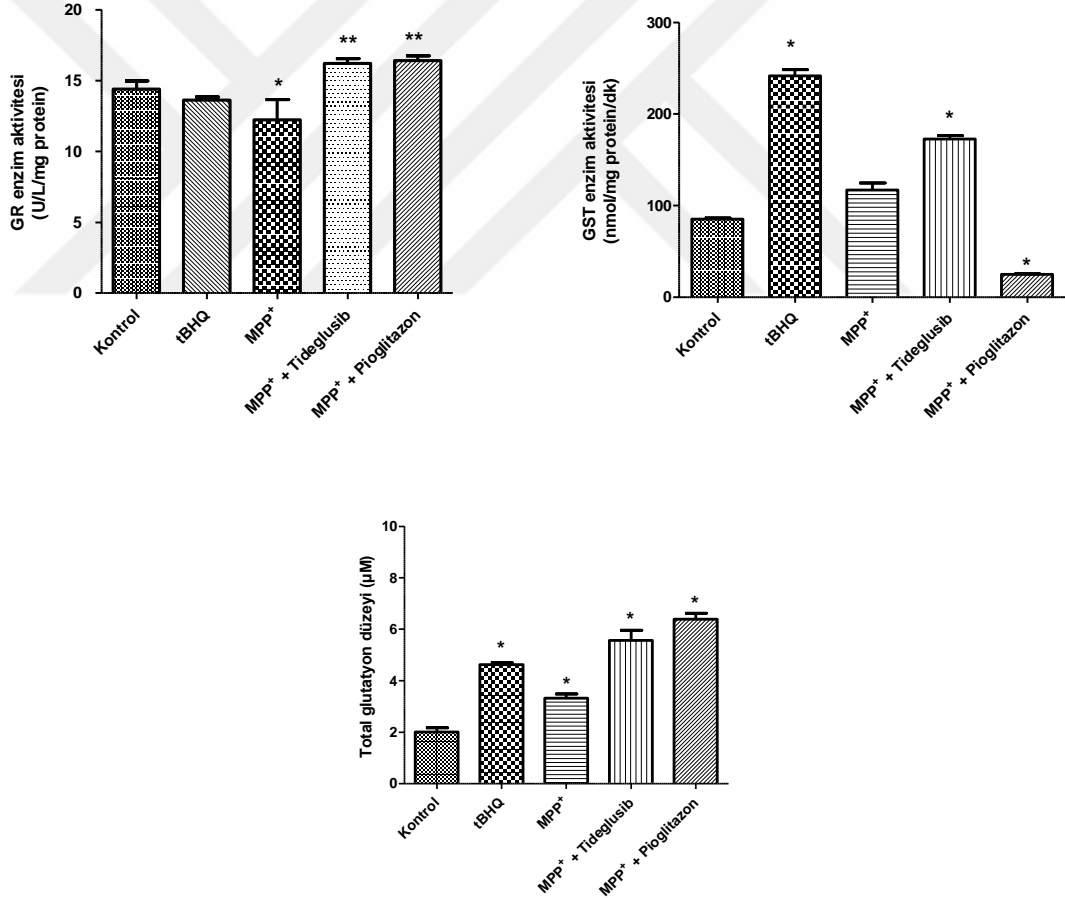


Grafik 1. MPP⁺ (2 mM) ve/veya tideglusib (2.5 µM) veya pioglitazon (5 µM) uygulamasının hücre membran bütünlüğü/laktat dehidrogenaz enzim salınımı üzerine etkisi (24 saat). * $p < 0.001$ MPP⁺ vs. kontrol grubu; ** $p < 0.01$ gruplar vs. MPP⁺ grubu.

4.2. Glutatyon ile İlgili Protein Analizi

MPP⁺ uygulamasını takiben hücrelerde glutatyon redüktaz ve glutatyon s-transferaz enzim aktivitesi ile glutatyon miktarı ölçülmüştür. MPP⁺ uygulaması, hücrelerde antioksidan enzim olan GR düzeyini kontrol gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde

azaltmıştır. Tideglusib ve pioglitazon uygulamaları, hücrelerdeki GR enzim düzeyini anlamlı bir şekilde artırmıştır. Aynı zamanda MPP⁺ uygulaması, tBHQ'lu gruba göre GST enzim aktivitesini azaltmış, toplam glutatyon düzeyini düşürmüştür. Bu sonuçlara bakarak MPP⁺'nin ROT üretimini artırarak, hücredeki antioksidan savunma sistemine zarar verdiği söylenebilir. Tideglusib (2.5µM) uygulanan gruplarda GST enzim aktivitesi 1.384 ± 0.03 kat ve total glutatyon düzeyi 1.571 ± 0.03 kat artmıştır ($p \leq 0.01$). Pioglitazon (5µM) uygulanan gruplarda, GST enzim aktivitesinde 0.272 kat düşüş, total glutatyon düzeyinde 1.444 kat artış gözlemlenmiştir (Grafik 2).

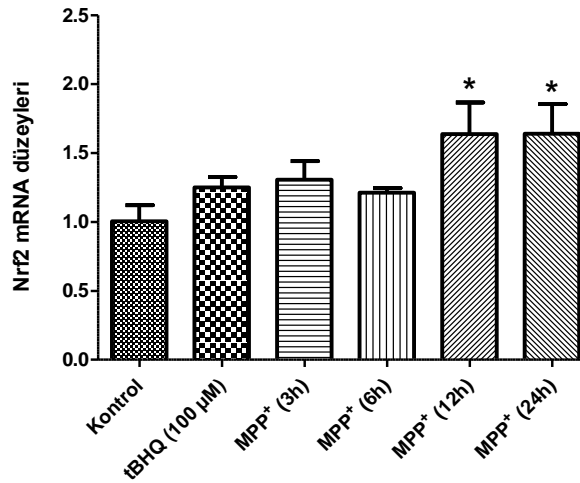


Grafik 2. MPP⁺ (2 mM) ve/veya tideglusib (2.5 µM) veya pioglitazon (5 µM) uygulamasının hücrenin antioksidan savunma sistemi/ GR enzim düzeyi, GST enzim

düzeyi ve total glutasyon miktarı üzerine etkisi (24 saat). * $p < 0.001$ MPP⁺ vs. kontrol grubu; ** $p < 0.01$ gruplar vs. MPP⁺ grubu.

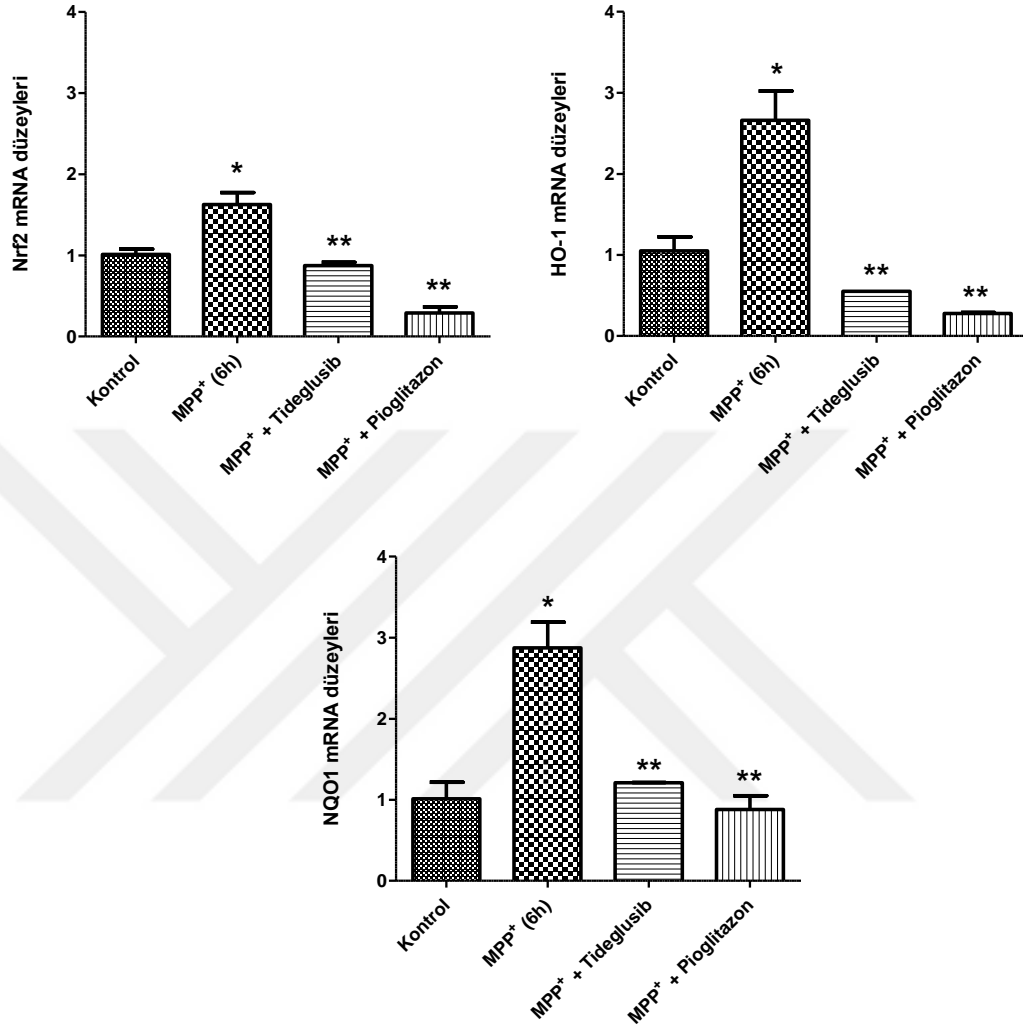
4.3. Nrf2/ARE Yolağı ile İlişkili mRNA Ekspresyon Düzeylerindeki Değişim Analizi

Nrf2/ARE, oksidatif hasara karşı hücresel savunma mekanizmalarına yardımcı olan bir yolaktır. Nrf2, normal fizyolojik şartlarda hücre sitoplazmasında bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrede ROT miktarında artış olması ve inflamasyon gibi durumlarda sitoplazmadan nukleusa geçmektedir. Nrf2 çekirdekte glutasyon sentezi ve elektrofillerin detoksifikasyonu için gerekli olan proteinleri kodlayan genlerin promoter bölgelerindeki antioksidan yanıt elementi adı verilen sekansa bağlanarak çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler. MPP⁺ uygulamasının Nrf2 mRNA düzeyini zamana göre farklı şekilde arttırdığı görülmüştür. Nrf2 gen ekspresyon düzeyleri endojen gen olarak seçilen GAPDH ile oranlanarak hesaplanmıştır. Buna göre farklı sürelerde uygulanan MPP⁺, Nrf2 mRNA düzeylerini kontrol grubuna göre 3 saatte 1.324 ± 0.081 , 6 saatte 1.213 ± 0.033 , 12 saatte 1.638 ± 0.228 ve 24 saatte 1.639 ± 0.216 kat arttırmıştır. Diğer taraftan, bir Nrf2 aktivatörü olan tBHQ ise Nrf2 mRNA düzeylerini 1.240 ± 0.050 kat arttırmıştır. Özellikle 12. saatten itibaren Nrf2 gen ekspresyonunun anlamlı şekilde artışı dikkat çekmektedir ($p < 0.001$) (Grafik 3).



Grafik 3. MPP⁺'nin SH-SY5Y hücrelerinde 3, 6, 12, 24 saat uygulama sonucunda Nrf2 mRNA düzeylerindeki değişime etkisi. *p<0.001 vs.kontrol ve MPP⁺ (6h) grubu.

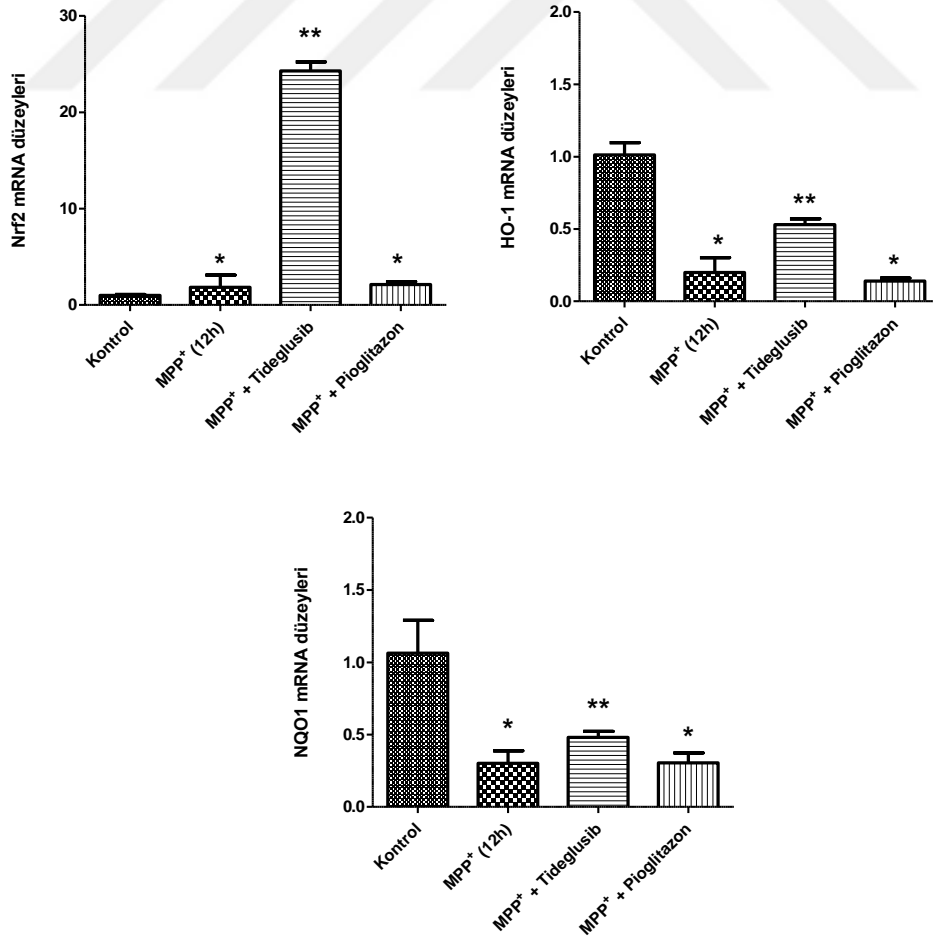
Nrf2'nin nukleusa geçişi, ARE'ye bağlanmasını ve dolayısıyla antioksidan ve faz II detoksifikasyon genleri gibi birçok genin ekspresyonunu sağlamaktadır. ARE bağlanma bölgesi taşıyan antioksidan genler arasında oksijenaz-1 (HO-1), NAD(P)H:kuinon oksidoredüktaz 1 sentezinde görevli enzimler bulunmaktadır. MPP⁺'nin Nrf2 gen ekspresyonunda anlamlı değişikliğe neden olduğu süre (12 saat) belirlendikten sonra tideglusib ve pioglitazon uygulanan gruplar oluşturulmuştur. Bu gruplarda Nrf2, HO-1 ve NQO1 mRNA düzeylerinin analizi hem 6. saat hem de 12. saat sonunda yapılmıştır (Grafik 3 ve 4). SH-SY5Y hücrelerine 6 saat MPP⁺ ve/veya tideglusib ve pioglitazon uygulamanın ardından yapılan ölçümlerde, MPP⁺'nin tek başına her üç genin de ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.3.2). MPP⁺ uygulamasının ardından 6 saatin sonunda Nrf2 mRNA düzeylerinin 1.620 ± 0.086 kat, HO-1 mRNA düzeylerinin 2.666 ± 0.363 kat, NQO1 mRNA düzeylerinin 2.875 ± 0.318 kat arttığı tespit edilmiştir ($p \leq 0.01$). Diğer taraftan, tideglusib ve pioglitazon uygulamalarının ise MPP⁺ grubuna kıyasla gen ekspresyonlarını 6. saatin sonunda azalttığı bulunmuştur (Şekil 4.3.2). Nrf2 mRNA düzeyi MPP⁺ + tideglusib uygulamasının ardından 0.875 ± 0.030 'a, MPP⁺ + pioglitazon uygulamasının ardından 0.309 ± 0.054 'e düşmüştür ($p \leq 0.05$). Benzer şekilde, MPP⁺ + tideglusib veya MPP⁺ + pioglitazon uygulamasının ardından HO-1 mRNA düzeyleri sırasıyla 0.551 ± 0.010 ve 0.276 ± 0.013 şeklinde tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$) (Grafik 4). İlaç uygulamalarının NQO1 mRNA düzeylerini kontrol grubunda elde edilen verilere yaklaştırdığı görülmüştür (MPP⁺ + tideglusib grubu için 1.210 ± 0.006 ; MPP⁺ + pioglitazon için 0.882 ± 0.168) ($p \leq 0.05$) (Grafik 4).



Grafik 4. Altı saat süreyle MPP⁺ uygulanan hücrelerde tideglusib ve pioglitazonun Nrf2, HO-1, NQO1 mRNA düzeylerine etkisi. *p≤0.01 gruplar vs.tüm gruplar; **p≤0.05 gruplar vs. MPP⁺ grubu.

Ancak, 12 saat uygulamanın sonunda elde edilen yanıtlar oldukça farklıdır. Özellikle MPP⁺'nin hücredeki Nrf2 mRNA düzeyini arttırırken (Nrf2 mRNA için 1.849 ± 0.400), HO-1 ve NQO1 mRNA düzeylerini azaltıyor olması (sırasıyla HO-1 mRNA için 0.199 ± 0.89 ve NQO1 mRNA için 0.302 ± 0.086) dikkat çekicidir ($p \leq 0.01$) (Grafik 5). Bu durum, protein şeklindeki Nrf2'nin nükleer transportunda bir sorun olabileceğini veya DNA bağlanma bölgesine bağlanmadan nukleusta degrade olabileceğini akıllara getirmektedir. mRNA düzeylerindeki değişim her zaman protein düzeylerindeki

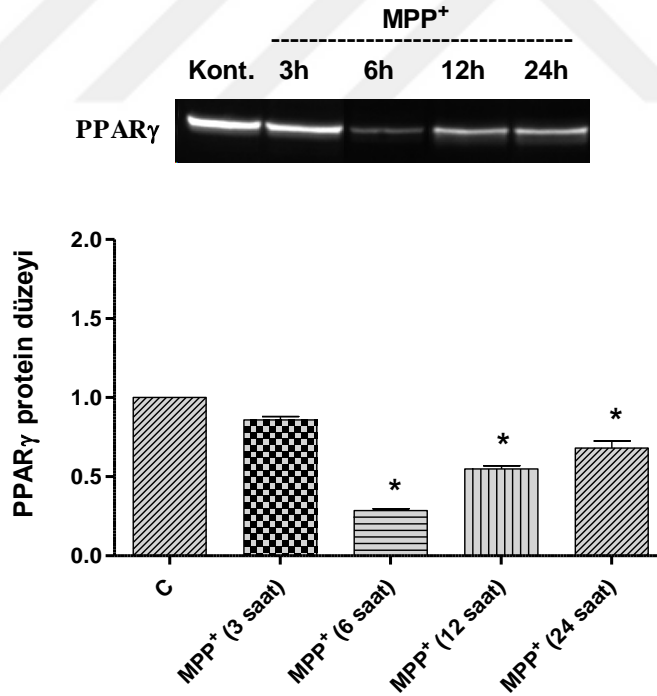
değişim ile ilişkili olmamaktadır. Elde edilen verileri ve hipotezimizi desteklemek için adı geçen genlere ait protein analizi de eş zamanlı olarak yapılmıştır. Ayrıca 12 saat süreyle tideglusib uygulamasının Nrf2 mRNA düzeyini kontrole göre yaklaşık 20 kat arttırıyor olması (1.002 ± 0.088 vs 23.119 ± 3.015 , $p \leq 0.05$), tideglusibin MPP⁺ toksisitesine karşı antioksidan sistemleri tetikliyor olduğunu göstermektedir (Grafik 5). Beraberinde, MPP⁺ grubu ile karşılaştırıldığı, HO-1 mRNA düzeylerinin 0.531 ± 0.040 'e, NQO1 mRNA düzeylerinin 0.481 ± 0.042 'ye ulaştığını gösteren anlamlı artışlar görülmektedir ($p \leq 0.05$). 12 saat süren pioglitazon uygulamasında ise, MPP⁺ grubu ile karşılaştırıldığında, her üç gen için de anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Grafik 5). MPP⁺ + pioglitazon uygulamasının ardından 12. saatin sonunda Nrf2 mRNA düzeyi 2.137 ± 0.272 ; HO-1 mRNA düzeyi 0.141 ± 0.021 ve NQO1 mRNA düzeyi ise 0.305 ± 0.021 olarak tespit edilmiştir ($p > 0.05$).



Grafik 5. On iki saat süreyle MPP⁺ uygulanan hücrelerde tideglusib ve pioglitazonun Nrf2, HO-1, NQO1 mRNA düzeylerine etkisi. *p≤0.01 gruplar vs kontrol grubu; **p≤0.05 gruplar vs. tüm gruplar.

4.4. PPAR γ Protein Düzeyindeki Değişim Analizi

MPP⁺ uygulamasının PPAR γ protein düzeylerine etkisi 3, 6, 12, 24 ve 48 saatlik uygulamalarla western blot yöntemi kullanılarak ölçülmüş ve incelenmiştir (Grafik 6). Proteine ait elde edilen bantlar Lamin A proteinine oranlanarak hesaplanmıştır (Grafik 6). Buna göre, MPP⁺ uygulaması ile PPAR γ protein düzeyleri kontrol grubuna göre 3 saat sonunda 0.859 ± 0.037 (p>0.05), 6 saat sonunda 0.286 ± 0.020 , 12 saat sonunda 0.550 ± 0.033 ve 24 saat sonunda 0.680 ± 0.078 kat azalmıştır (p≤0.001).



Grafik 6. MPP⁺'nin SH-SY5Y hücrelerinde 3, 6, 12, 24 saat uygulama sonucunda PPAR γ protein düzeyindeki değişime etkisi. *p≤0.001 MPP⁺ vs. kontrol grubu.

Tartışma

1958 yılında levodopa, keşfedildikten sonra Parkinson Hastalığının tedavisinde kullanılan ana ilaç olmuştur. Ancak bir süre sonra hastalarda diskinezi ile birlikte birçok yan etki görülmeye başlanmıştır. Günümüzde kullanılan ilaçlar etkili olmalarına rağmen sadece semptomatik tedavi sunmaktadır (Dauer & Przedborski, 2003). Parkinson Hastalığı'nın sebebi bilinmemekle birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarla dopaminerjik nöronların kaybında oksidatif stresin önemi vurgulanmaktadır. Oksidatif stres, biyolojik yapımızdaki oksidantlar ve antioksidantlar arasındaki dengenin bozulması ile aşırı ROT üretimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Beyin yüksek miktarda redoks aktif metabolitler içermektedir ve bu durum beyni ROT üretimine daha yatkın hale getirmektedir. Parkinson hastalarının beyinlerinde SNc bölgesinde oksitlenmiş lipitlere, proteinlere, DNA'ya ve azalan miktarda glutatyona rastlanmıştır (Singh vd., 2019). MPTP'nin PH'ye sebep olması, dehidrasyon, akut ölümler ve malnutrisyon olmadan nigrostriatal bölgede parkinsonian etkilerin görülmesini sağlaması in vivo deneylerde bu ajanın çokça kullanılmasında büyük rol oynamaktadır (Jackson-Lewis & Przedborski, 2007). MPTP'nin aktif metaboliti olan MPP⁺, substantia nigradaki dopaminerjik hücrelerin ölümüne sebep olduğu için parkinson benzeri belirtiler ortaya çıkarmakta (Braungart vd., 2004) ve bu nedenle in vitro deneylerde sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda MPP⁺ toksisitesini oluşturmak için 2 mM ve 24 saat olacak şekilde MPP⁺ uygulaması yaptık. Pioglitazonun potansiyel koruyucu etkinliği sözü edilen doz ve sürede MPP⁺'ye maruz kalmış hücrelerde denenmiştir. Bununla birlikte pioglitazonun hücre proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirmek ve optimum dozunu tespit etmek üzere 5 farklı konsantrasyon (0.1-15 µM), 2 farklı süre ile (24, 48 saat) aynı hücre hattına uygulanmıştır. Uygulanan ajanın hücrelerin proliferasyon hızında bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca pioglitazon için en uygun uygulama dozu olan 5 µM belirlenmiştir. Bilindiği üzere projemizde kullanılan esas ajan olan pioglitazon bir PPAR γ agonistidir. Pioglitazonun MPP⁺'ye karşı sitotoksitesiyi azaltıyor olması dopaminerjik hasarda etkin bir ajan olduğunu göstermekte ve mevcut literatürleri desteklemektedir (Dehmer, 2004; Laloux, 2012, Kumar, 2009). Diğer taraftan bu ajanın tam olarak hangi mekanizmaları kullanarak koruyucu etkiler oluşturduğuna dair verilere halen ihtiyaç bulunmaktadır. Glutasyon

vücudumuzdaki en önemli endojen, enzimatik olmayan antioksidandır. Hücrede milimolar konsantrasyonlarda bulunan glutatyon çoğunlukla redüce (GSH) haldedir. GSH'un hücresel düzeyi γ -glutamil transpeptidaz, glutatyon sentetaz (GS), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve aminoasit taşıyıcılarını içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunmaktadır (Liu & Gaston Pravia, 2010). Glutatyon ile ilişkili bir enzim olan GR, NADPH bağlı bir flavoenzimdir ve GSH'un devamlılığı açısından bu enzim oldukça önemlidir. Çalışmamıza PPAR γ 'ı hedef alan ajanların GSH'ın yanı sıra söz konusu enzim düzeylerini arttırıyor olması endojen antioksidan mekanizmanın kontrolü açısından oldukça değerlidir. Sözü edilen deneylerin yanı sıra, proje kapsamında, MPP⁺ uygulamasının Nrf2 gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. MPP⁺ uygulamasının Nrf2 mRNA düzeyini zamana göre farklı şekilde arttırdığı görülmüştür. Buna göre farklı sürelerde uygulanan MPP⁺ Nrf2 mRNA düzeylerini arttırmıştır. Nrf2/ARE, oksidatif hasara karşı hücresel savunma mekanizmalarına yardımcı olan bir yolaktır. Nrf2, normal fizyolojik şartlarda hücre sitoplazmasında bulunan bir transkripsiyon faktörü olup hücre içerisinde reaktif oksijen türlerinde artış olması ve inflamasyon oluşması gibi durumlarda sitoplazmadan nukleusa geçmektedir. Nrf2 çekirdekte glutatyon sentezi ve elektrofillerin detoksifikasyonu için gerekli olan proteinleri kodlayan genlerin promoter bölgelerindeki antioksidan yanıt elementi adı verilen sekansa bağlanarak çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler. Nrf2'nin aktivasyonunun, oksidatif strese bağlı görülen zararlı etkileri azaltan yollardan biri olduğu kabul edilmekte ve artış olduğu görülen zamanda hücre koruma mekanizmalarının daha fazla etkin olduğu düşünülmektedir.

Nrf2'nin nukleusa geçişi, ARE'ye bağlanmasını ve dolayısıyla antioksidan ve faz II detoksifikasyon genleri gibi birçok genin ekspresyonunu sağlamaktadır. ARE bağlanma bölgesi taşıyan antioksidan genler arasında oksijenaz-1 (HO-1), NAD(P)H:kuinon oksidoredüktaz 1 ve glutatyon sentezinde görevli enzimler bulunmaktadır. 12 saat süreyle pioglitazon veya tideglusib uygulamasının Nrf2 mRNA düzeyini kontrole göre sırasıyla yaklaşık 5 ve 15 kat arttırıyor olması ($p \leq 0.05$), pioglitazon ve tideglusibin MPP⁺ toksisitesine karşı antioksidan sistemleri tetikliyor olduğunu göstermektedir.

Pioglitazon Parkinson Hastalığı gibi mitokondriyal bozuklukla seyreden hastalıklar için koruyucu ajanlar arasında kendine yer bulma potansiyeli olan bir ajandır. Elde ettiğimiz

sonuçlar hastalığın tedavisiyle ilgili umut vaad etmekle birlikte bu ajanla ilişkili detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.



Sonuç ve Öneriler

Bu proje kapsamında dopaminerjik nöronal hasarda peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama (PPAR γ) agonisti ajanların oksidatif stresle ilişkili proteinler üzerine etkisi incelenerek oksidatif stresle ilişkili moleküler mekanizmaları (Nrf2-ARE yolağı) araştırılmıştır. Tüm bunların sonucunda; PPAR γ agonisti uygulamasıyla sitotoksisitenin azalıp, antioksidan enzim aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$) görülmüştür. Ayrıca dopaminerjik hasarda azalan Nrf2 mRNA düzeyinin pioglitazon uygulamasıyla arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, söz konusu reseptör aracılı nöroproteksiyonun gözlenmesinde hem glutatyonla ilişkili enzimlerin hem de Nrf2 yolağının etkin olduğunu; özellikle nöronal korumada reseptörlerin önemli bir rol aldığını desteklemektedir.

Dünyada her yıl milyonlarca kişi Alzheimer, Huntington, Parkinson, epilepsi, felç gibi nörolojik fonksiyonları etkileyen, nedeni kesin olarak bilinmeyen hastalıklardan dolayı yaşamını kaybetmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2040 yılında en fazla ölüme yol açacak ikinci hastalık grubunda yer almaktadır. Bu tip hastalıkların teşhis ve tedavi maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıkların teşhisi ve tedavisiyle ilgili genetik ve moleküler çalışmalara ihtiyaç artmakta, yeni tedavi alternatifleri aranmaktadır.

Günümüzde Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların terapötik etkileri hastalık sonucu ortaya çıkan motor semptomları ortadan kaldırmaya yöneliktir. Ancak, hastalığın erken aşamalarında tanı koyma ve gelişimini engellemeye yönelik henüz çok fazla ilerleme yoktur. Bu yönde yapılan çalışmalar halen tüm nörodejeneratif hastalıklar için devam etmektedir.

Tüm bunların ışığında proje kapsamında ulaştığımız olumlu sonuçlarla dopaminerjik hasara yönelik tedavide özellikle Nrf2 yolağını hedefleyen ilaç veya maddelerle deneysel hayvan araştırmaları planlanmaktadır. Bir sonraki aşama da insanlara yönelik ilaç araştırmalarına yönelmektir.

Kaynaklar

- Aoyama, K., Watabe, M., & Nakaki, T. (2008). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Journal of pharmacological sciences*, 0811120169-0811120169.
- Barancik, M., Gresova, L., Barteková, M., & Dovinová, I. (2016). Nrf2 as a key player of redox regulation in cardiovascular diseases. *Physiological Research*, 65, S1.
- Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., & Hoener, M. C. (2004). Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegenerative Diseases*, 1(4-5), 175-183.
- Brooks, D. J. (2000). Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*, 68(6), 685-689.
- Buendia, I., Michalska, P., Navarro, E., Gameiro, I., Egea, J., & Leon, R. (2016). Nrf2–ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 157, 84-104.
- Buendia, I., Michalska, P., Navarro, E., Gameiro, I., Egea, J., & Leon, R. (2016). Nrf2–ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 157, 84-104.
- Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2011). The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicological Sciences*, 124(2), 225-250.
- Chen, W. W., Zhang, X. I. A., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports*, 13(4), 3391-3396.
- Chowhan, R. K., Warepam, M., Dar, T. A., & Singh, L. R. (2013). Recent trends in treating neuronal proteinopathies. *Journal of Proteins & Proteomics*, 4(2).
- Ciccone, S., Maiani, E., Bellusci, G., Diederich, M., & Gonfloni, S. (2013). Parkinson's disease: a complex interplay of mitochondrial DNA alterations and oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 2388-2409.
- Costa, F. H. D. R., Rosso, A. L. Z., Maultasch, H., Nicaretta, D. H., & Vincent, M. B. (2012). Depression in Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 70, 617-620.
- Çakmur R. (2010). "Parkinson Hastalığı ve Medikal Tedavisi." *Klinik Gelişim* 1: 53-60.

- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
- Dehmer T., Heneka M.T., Sastre M., Dichgans J., & Schulz J. B. (2004). "Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B α induction and block of NF κ B and iNOS activation." *Journal of neurochemistry* 88(2), 494-501.
- Eberhardt, O., & Schulz, J. B. (2003). Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicology letters*, 139(2-3), 135-151.
- Fahn S. (1996). "Book Review -- The Case of the Frozen Addicts: How the Solution of an Extraordinary Medical Mystery Spawned a Revolution in the Understanding and Treatment of Parkinson's Disease". *The New England Journal of Medicine* 335 (26): 2002–2003.
- Hauser, R. A. (2009). Levodopa: past, present, and future. *European neurology*, 62(1), 1-8.
- Imlay J.A., Linn S. (1988). "DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity" *Science* 240(4857): 1302-1309.
- Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature protocols*, 2(1), 141-151.
- Janani, C., & Kumari, B. R. (2015). PPAR gamma gene—a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46-50.
- Kaakkola, S. (2000). Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*, 59(6), 1233-1250.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, 386(9996), 896-912.
- Kapadia, R., Yi, J. H., & Vemuganti, R. (2008). Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 1813.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325.
- Korczyn, A. D. (2022). Drug treatment of Parkinson's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*.

- Kumar P., Kaundal R.K., More S., & Sharma, S.S. (2009). "Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease." *Behavioural brain research* 197(2), 398-403.
- Laloux, C., Petrault, M., Lecointe, C., Devos, D., & Bordet, R. (2012). Differential susceptibility to the PPAR- γ agonist pioglitazone in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and 6-hydroxydopamine rodent models of Parkinson's disease. *Pharmacological Research*, 65(5), 514-522.
- Langston J. W. (2017). The MPTP Story. *Journal of Parkinson's disease*, 7(s1), S11–S19.
- Li, J., Ma, S., Chen, J., Hu, K., Li, Y., Zhang, Z., ... & Huang, Q. (2020). GSK-3 β contributes to parkinsonian dopaminergic neuron death: evidence from conditional knockout mice and tideglusib. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 81.
- Liu R.M., Gaston Pravia K.A. (2010). "Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis." *Free Radical Biology and Medicine* 48(1):1-15.
- Martin, H. L., & Teismann, P. (2009). Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. *The FASEB journal*, 23(10), 3263-3272.
- Migliore, L., & Coppedè, F. (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512(2-3), 135-153.
- Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamshad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 502-513.
- Moustafa, A. A., Chakravarthy, S., Phillips, J. R., Gupta, A., Keri, S., Polner, B., ... & Jahanshahi, M. (2016). Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 727-740.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- O'Connor, D. M., & Boulis, N. M. (2015). Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Trends in molecular medicine*, 21(8), 504-512.
- Pihlstrøm, L., Wiethoff, S., & Houlden, H. (2018). Genetics of neurodegenerative diseases: an overview. *Handbook of clinical neurology*, 145, 309-323.

- Poole, L. B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, *80*, 148-157.
- Pradhan, A. U., Uwishema, O., Onyeaka, H., Adanur, I., & Dost, B. (2022). A review of stem cell therapy: an emerging treatment for dementia in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Brain and behavior*, *12*(9), e2740.
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., & Vila, M. (2004). MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, *36*(4), 375-379.
- Sekhar, R. V., Patel, S. G., Guthikonda, A. P., Reid, M., Balasubramanyam, A., Taffet, G. E., & Jahoor, F. (2011). Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *The American journal of clinical nutrition*, *94*(3), 847-853.
- Serge, P., Miquel, V., & Vernice, J. (2003). Neurodegeneration: what is it and where are we. *J Clin Invest*, *111*(1), 3-10.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, *24*(8), 1583.
- Smeyne, M., & Smeyne, R. J. (2013). Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free radical biology and medicine*, *62*, 13-25.
- Smeyne, R. J., & Jackson-Lewis, V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular brain research*, *134*(1), 57-66.
- Sulzer, D., & Surmeier, D. J. (2013). Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *28*(6), 715-724.
- Swanson, C. R., Joers, V., Bondarenko, V., Brunner, K., Simmons, H. A., Ziegler, T. E., ... & Emborg, M. E. (2011). The PPAR- γ agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. *Journal of neuroinflammation*, *8*(1), 1-14.
- Trist, B. G., Hare, D. J., & Double, K. L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging cell*, *18*(6), e13031.
- Yamada, M., & Yasuhara, H. (2004). Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology*, *25*(1-2), 215-221.

- Walter, B. L., & Vitek, J. L. (2004). Surgical treatment for Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 3(12), 719-728.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 1-11.
- Xie, H. R., Hu, L. S., & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*, 123(08), 1086-1092.
- Xu, J., Nie, M., Li, J., Xu, Z., Zhang, M., Yan, Y., ... & Zhao, Q. (2018). Effect of pioglitazone on inflammation and calcification in atherosclerotic rabbits. *Herz*, 43(8), 733-740.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımı bu tez çalışmasıyla bitirirken bu süreçte:

Tezimde anlayışlı tavrı ve bilgisiyle bana destek olan, laboratuvar araç-gereçlerini kısıtlama olmaksızın benim kullanımına bırakan ve bana güvenen danışman hocam Prof. Dr. Taner DAĞCI'ya, bilgisi ve emeğiyle büyük yardımı dokunan ve laboratuvarını açan Doç. Dr. Güliz ARMAĞAN'a, çalışmada büyük emeği olan Biyokimya Anabilim Dalı asistanları Gizem KAFTAN ve Derviş BİRİM'e, deney sürecinde yardımını esirgemeyen Dr. Ufuk ŞAHBAZ'a ve Dr. Fulya TUZCU'ya, bana kattıkları ve emekleri için Ege Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

İzmir, 29.11.2022

Tuğçe BİLGİÇ

ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe BİLGİÇ

Eğitim:

İzmir Ekonomi Üniversitesi Hukuk Fakültesi (2021-)

Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans (2015-)

Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi Ve Rehabilitasyon Bölümü (2011-2015)

Manavgat Anadolu Lisesi (2006-2010)

Yabancı Dil:

İngilizce

Almanca

Rusça

İş Denevimi:

Özel Yeşilyurt Fizik Tedavi Ve Dal Merkezi (28.05.2018- 03.01.2019)

Özel Tolga Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi (10.08.2020- ...)

Kurs, Eğitim ve Seminerler:

Uluslararası Fizyoterapistler Derneği Body Awareness Semineri (4 Haziran 2014)

Türkiye Fizyoterapistler Derneği Fizyoterapi Kongresi (3-5 Nisan 2015)

International Physical Therapy and Professional Education Association Manuel ve Manipülatif Terapi Kursu (9-10 Ocak 2016)
