



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



Nöromelanin Aracılı Nörodejenerasyonda Terapötik Hedeflerin Araştırılması

Doktora Tezi

Gizem KAFTAN ÖCAL

Biyokimya Ana Bilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Nöromelanin Aracılı Nörodejenerasyonda Terapötik Hedeflerin Araştırılması

Gizem KAFTAN ÖCAL

Danışman
Prof. Dr. Güliz ARMAGAN

Biyokimya Ana Bilim Dalı
Biyokimya Doktora Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Güliz ARMAGAN

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK

Üye : Prof. Dr. Sibel KONYALIOĞLU

Üye : Prof. Dr. Yasemin ERAÇ

Üye : Prof. Dr. Sinem Ezgi TURUNÇ ÖZOĞLU

Üye : Doç. Dr. Fadime AYDIN KÖSE

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 25.07.2024

Önsöz

Doktora eğitimine başladığım zamandan bu yana sinirbilim ve yaşlanmaya bağlı gelişen nörodejenerasyon temelli hastalıkların patofizyolojisine karşı ilgim oldu. Tez çalışmamda, danışman hocam sayın Prof. Dr. Güliz ARMAGAN'ın rehberliğinde yaşlanma ile beyinde ilerleyici nöron kaybına sebep olarak hastaların hayat kalitesini olumsuz etkileyen Parkinson Hastalığında, beyinde birikim gösterdiği tespit edilen nöromelanin isimli koyu renkli pigmentin hastalık patofizyolojisine olan etkisi araştırılmıştır. Nöromelaninin etkisi yakın zamanda tanımlanmış yeni bir hücre ölüm tipi olan ferroptoz perspektifinden ele alınmaya çalışılmıştır. Doktora eğitimi benim en büyük hayal ve hedeflerimden biriydi. Bu süreci tamamlıyor olmak oldukça gurur verici. Bu yolda her zaman yanımda olup engin tecrübesi ile desteğini ve bilgi birikimini benden hiçbir zaman esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Güliz ARMAGAN'a sonsuz saygılarımı iletiyorum.

Doktora eğitimimin üç yılını geçirdiğim TÜBİTAK 2211 C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programına ve tez çalışmamın finanse edildiği Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür etmek istiyorum.

Doktora eğitimi süresince tez verilerimi kullanarak sunduğum sözlü bildirimler şu şekildedir;

- “In vitro Effect of Neuromelanin on Dopaminergic Cells”. Sözlü bildiri- Uluslararası Biyokimya Kongresi 2022 // 33.Ulusal Biyokimya Kongresi. 26-30 Ekim 2022 İzmir, Türkiye
- “Ferroptotic Activity of Synthetic Neuromelanin in Dopaminergic Cells”. Sözlü bildiri- International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD) 2023. 4-6 Mayıs 2023 İzmir, Türkiye.

İzmir, 27.06.2024

Gizem KAFTAN ÖCAL

Özet

Nöromelanin Aracılı Nörodejenerasyonda Terapötik Hedeflerin Araştırılması

Nöromelanin yaşla beraber beynin belirli bölgelerinde biriken, demir içeriği zengin, kahverengi veya siyah renkli çözünmeyen pigmentlerdir. Hücre içinde antioksidan özellik ve bazı ilaçlara karşı koruyucu etki gösteren bu pigment, zamanla birikerek serbest radikal kaynağı haline gelmekte ve hücre hasarını tetikleyebilmektedir. Parkinson Hastalığında dopaminerjik nöronların ölümü ile hücrelerden salınan nöromelaninin mikrogliaları etkileyerek nöroinflamasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Ferroptoz; demir iyonu varlığında tetiklenen lipid peroksidasyonda artış ve glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) aktivitesinde azalma ile karakterize hücre ölüm şeklidir. Parkinson hastalık modellerinde ferroptozun varlığı kanıtlanmış ancak ferroptozu açan faktörler net olarak tanımlanmamıştır. Tez çalışmasının amacı; nöromelaninle indüklenmiş nöronal hasarda demir metabolizmasındaki olası değişikliklerin araştırılması ve gelişmesi muhtemel ferroptotik ölümün değerlendirilerek terapötik hedeflerin ortaya konmasıdır. Çalışmamızda demir içeren ve içermeyen olmak üzere iki tip sentetik nöromelanin hazırlanmış ve bu nöromelaninler dopaminerjik hücrelere uygulanmıştır. Uygulamaları takiben lipid peroksidasyon ürünleri, glutatyon, hücre içi demir düzeyi, GPX4, uzun zincirli yağ asidi-KoA ligaz 4 (Acsl4) gibi ferroptoz ile ilişkili parametreler spektrofotometrik, mikroskopik ve moleküler teknikler kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca, nöromelaninin hücre içi demir tutulumuna etkisi transferrin reseptör-1, ferroportin, ferritin, IREB2 ve DMT1 gibi demir metabolizmasıyla ilişkili proteinler aracılığıyla değerlendirilmiştir. Nöromelanin uygulamasının, rotenon ve erastin (ferroptoz aktivatörü) uygulamasına benzer şekilde, hücre canlılığını azalttığı ve bu etkilerin ferroptoz inhibitörü varlığında geri döndüğü tespit edilmiştir. Yanı sıra, nöromelanin uygulaması sonrası artan lipid peroksidasyon, azalan GPX4 düzeyi ve değişen demir metabolizması dikkat çekicidir ($p<0.05$). Nöromelanin araştırmalarında kullanılacak deney modelinin projemiz kapsamında ilk kez ayrıntılı bir biçimde incelenmiş olması, nöromelaninin ferroptozdaki rolünün ortaya konarak olası terapötik hedeflerin belirlenmiş olması bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler; Nöromelanin; ferroptoz; demir metabolizması; Parkinson Hastalığı



Abstract

Investigation of Therapeutic Targets in Neuromelanin-Mediated Neurodegeneration

Neuromelanin is an iron-rich, brown or black insoluble pigment that accumulates in brain with age. This pigment, which has antioxidant properties and protective effects against some drugs, accumulates over time and becomes a source of free radicals. In Parkinson's Disease, neuromelanin releases from cells following dopaminergic neuronal death, affects microglia and causes neuroinflammation. Ferroptosis, a cell death type, has been shown in Parkinson's Disease. However, it is not clearly defined. In this study, we aimed to investigate the possible changes in iron metabolism in neuromelanin-induced neuronal damage and to determine therapeutic targets. In our study, synthetic neuromelanin-exposed cells were used. Following the applications, lipid peroxidation products, GSH, intracellular iron levels and ferroptosis parameters (GPX4, Acsl4) were measured using spectrophotometric, microscopic and molecular techniques. The effects of neuromelanin on intracellular iron uptake were evaluated through iron metabolism-related proteins such as transferrin receptor-1, ferroportin, ferritin, IREB2 and DMT1. It has been observed that the application of neuromelanin reduces cell viability, similar to the application of rotenone and erastin (a ferroptosis activator), and these effects can be reversed in the presence of a ferroptosis inhibitor. Additionally, notable changes have been observed in lipid peroxidation, decreased GPX4 levels, and altered iron metabolism following the application of neuromelanin ($p < 0.05$). The detailed examination of an experimental model that can be used in neuromelanin research, the elucidation of the role of neuromelanin in ferroptosis and the identification of the potential therapeutic targets will contribute to the scientific literature.

Keywords; Neuromelanin; ferroptosis; iron metabolism; Parkinson's Disease

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VI
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Kısaltma Listesi	XIII
1. Giriş	1
Araştırmanın Problemi.....	2
Araştırmanın Sorusu	2
Araştırmanın Hipotezleri	3
Araştırmanın Varsayımları.....	3
Araştırmanın Sınırlılıkları	3
Araştırmanın Amacı	3
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Nörodejenerasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar	4
2.2. Parkinson Hastalığı.....	4
2.2.1. Hastalığın Etiyolojisi.....	4
2.2.2. Hastalığın Patofizyolojisi.....	5
2.2.3. Parkinson Hastalığı ve Demir İlişkisi.....	6
2.3. Ferroptoz.....	6
2.3.1. Ferroptoz ve Lipid Peroksidasyon.....	7
2.3.2 Ferroptoz ve Demir Metabolizması.....	10
2.3.3. Parkinson Hastalığı ve Ferroptoz İlişkisi.....	12
2.4. Nöromelanin Yapısı ve Önemi	12
3. Gereç ve Yöntem	17
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	17
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
3.3. Deney Modelinin Hazırlanması	20
3.3.1. Demir İyonu İçermeyen Nöromelanin Hazırlığı (ifNM).....	20
3.3.2. Fe ⁺³ İçeren Nöromelanin Hazırlığı (Fe ⁺³ NM).....	20
3.3.3. Sentetik Nöromelaninlerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	21

3.3.4. Sentetik Nöromelaninlerin Hücre İçine Girişinin Gösterilmesi	21
3.3.5. ifNM ve Fe ⁺³ NM için IC ₅₀ Değerinin Hesaplanması.....	22
3.3.6. WST-1 Testi	22
3.3.7. LDH Aktivitesi Ölçümü	23
3.3.8. Antioksidan Varlığında ifNM ve Fe ⁺³ NM'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi	23
3.4. L-DOPA ile İndüklenmiş NM Deney Modeli Oluşturulması.....	24
3.5. Deney Modellerinde Ferroptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi	25
3.5.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	26
3.5.2. Lipid Peroksidasyon Ölçümü.....	27
3.5.3. GPX4 ve Acsl4 Düzeylerinin Ölçümü	29
3.5.4. GSH Seviyesinin Ölçümü	31
3.5.5. Hücre İçi Demir Düzeyinin Ölçümü.....	31
3.5.6. Hücre İçi Demir Tutulumunda Görevli Proteinlerin Ölçümü.....	32
3.5.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	32
4. Bulgular.....	33
4.1. Demir İyonu İçermeyen (ifNM) ve Demir İyonu İçeren (Fe ⁺³ NM) Nöromelanin Sentezi	33
4.2. Sentetik NM'lerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	33
4.2. Sentetik Nöromelaninlerin Hücre İçine Girişinin Gösterilmesi	37
4.3. ifNM ve Fe ⁺³ NM için IC ₅₀ Değerinin Hesaplanması	37
4.4. Antioksidan Varlığında ifNM ve Fe ⁺³ NM'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi	40
4.5. SH-SY5Y Hücrelerinin Retinoik Asit ile Farklaştırılması.....	42
4.6. Retinoik Asit ile Farklaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerine Uzun Dönem L-DOPA Uygulaması	43
4.7. Sentetik Nöromelaninlerin Farklı Hücre Ölüm Tipleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	44
4.8. Nöromelaninin Lipid Peroksidasyon Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi	46
4.9. GPX4 ve Acsl4 Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	49
4.10. GSH Düzeyinin Değerlendirilmesi	51
4.11. Hücre İçi Demir Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	52

4.12. Sentetik Nöromelanin Modellerinde Hücre İçi Demir Tutulumunun Değerlendirilmesi	52
5. Tartışma	55
Sonuç ve Öneriler	65
Kaynaklar	66
Teşekkür	77
Özgeçmiş	79



Tablolar Dizini

Tablo 1. Ferroptoz inhibitörleri ve indükleyici ajanlar (Seibt vd., 2019).....	10
Tablo 2. Hücre ölüm tiplerinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar	26
Tablo 3. Lipid peroksidasyon ürünlerinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar .	27
Tablo 4. Western Blot yönteminde kullanılan primer antikolar	29
Tablo 5. GPX4 ve Acs14 düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar.....	29
Tablo 6. Real time PCR yönteminde kullanılan primerler	30
Tablo 7. Hücre içi demir düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar.....	31
Tablo 8. Hücre içi demir tutulumunun değerlendirilmesinde kullanılan gruplar ve ölçümü yapılan parametreler.....	32



Şekiller Dizini

Şekil 1. Ferroptoz mekanizması (Mahoney-Sánchez vd., 2021).	9
Şekil 2. Hücre içi demir metabolizması.....	11
Şekil 3. Nöromelanin sentez mekanizması	13
Şekil 4. Sentetik NM (ifNM ve Fe ⁺³ NM) hazırlık aşamaları ve eldesi	33
Şekil 5. Sentetik NM'lerin (ifNM ve Fe ⁺³ NM) (C) yapısal benzerliklerini karşılaştırmak üzere dopamin (A) ve sistein (B) ile FT-IR analizlerinin sonuçları... 35	
Şekil 6. Sentetik NM'lerin (ifNM ve Fe ⁺³ NM) SEM görüntüleri.	36
Şekil 7. Sentetik NM'lerin (ifNM ve Fe ⁺³ NM) 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonda SH-SY5Y hücrelerine 48 saat uygulanmasını takiben NM pigmentlerinin hücre içine alındığını gösteren ışık mikroskobu görüntüleri.	37
Şekil 8. Sentetik NM'lerin (ifNM (A) ve Fe ⁺³ NM (B), 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL) ve rotenonun (1 ve 10 µM) SH-SY5Y hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanmasını takiben hücre canlılığındaki değişim. *p<0.05; Gruplar vs. kontrol grubu.	38
Şekil 9. ifNM (A) ve Fe ⁺³ NM (B) 24 ve 48 saat uygulanması sonrası hücre canlılığındaki değişim. NM'ler 1, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonda SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır. *p<0.05; gruplar vs. diğer gruplar.	39
Şekil 10. Sentetik NM'lerin (ifNM (A) ve Fe ⁺³ NM (B), 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL) ve rotenonun (1 ve 10 µM) SH-SY5Y hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanmasını takiben hücrelerden salınan LDH düzeyindeki değişim. *p<0.05; Gruplar vs. kontrol grubu.	40
Şekil 11. NAC (1 mM, 1 saat ön uygulama) varlığında sentetik NM'lerin (ifNM (50 µg/mL) ve Fe ⁺³ NM (70 µg/mL) hücre canlılığına etkisi.....	41
Şekil 12. Trolox (100µM, 1 saat ön uygulama) varlığında 24 saat ifNM (50 µg/mL) ve Fe ⁺³ NM (70 µg/mL) uygulamasının hücre canlılığına etkisi. *p<0.05; Grup vs. tek başına Fe ⁺³ NM uygulanan grup; **p<0.05; grup vs. tek başına rotenon uygulanan grup.	41
Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerine 10µM RA 5 gün boyunca uygulandıktan sonra hücrelerdeki morfolojik değişimin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi	42
Şekil 14. Beş gün boyunca 10µM RA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde TH ve MAP2 protein düzeyindeki değişim	43
Şekil 15. SH-SY5Y hücrelerine 100µM L-DOPA 6 gün boyunca 2 gün aralıkla uygulanması sonucu meydana gelen stres	44

- Şekil 16.** Sentetik NM'lerin apoptoz (A), otofaji (B), nekroptoz (C) ve ferroptoz (D) üzerine etkisinin incelenmesi. Z-VAD-FMK (20µM, 1 saat), 3-MA (5mM, 1 saat), nekrostatin-1 (50µM, 1 saat) ve ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) hücrelere uygulanmış, ardından hücreler NM (1/2IC₅₀, IC₅₀ ve 2xIC₅₀) ile 24 saat inkübe edilmiştir. *p<0.05; gruplar vs. tek başına NM uygulanan gruplar 46
- Şekil 17.** Sentetik NM'lerin C11-BODIPY 581/591 varlığında hücre içi lipid hidroperoksitlerin oluşumuna etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liprostatin-1 (50nM) uygulanan hücreler 1 saat liprostatin-1 ile muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; Liprostatin-1 ön uygulama yapılmış gruplar vs. tek başına NM veya erastin uygulanan gruplar 47
- Şekil 18.** Sentetik NM'lerin 4-HNE modifiye protein düzeyine etkisinin incelenmesi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liprostatin-1 (50nM) uygulanan hücreler 1 saat Lip-1 ile muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; ifNM+Liprostatin-1 grubu vs. ifNM grubu. **p<0.05; Fe⁺³NM+Liprostatin-1 grubu vs. Fe⁺³NM grubu..... 48
- Şekil 19.** Sentetik NM'lerin hücre içi MDA düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liprostatin-1 (50nM) uygulanan hücreler 1 saat liprostatin-1 ile muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir..... 49
- Şekil 20.** Sentetik NM'lerin GPX4 ve Acsl4 protein (A, B) ve mRNA (C) düzeylerine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liprostatin-1 (50nM, 1 saat), Ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) ve DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; gruplar vs. tek başına NM/erastin uygulanan grup 50
- Şekil 21.** Sentetik NM'lerin hücre içi GSH düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. Liprostatin-1 (50nM, 1 saat), ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) ve DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; gruplar vs. tek başına NM/erastin uygulanan grup 51

Şekil 22. Sentetik NM'lerin hücre içi Fe⁺² düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ile inkübe edildi. *p<0.05; Fe⁺³NM grubu vs. diğer gruplar. **p<0.05; gruplar vs. tek başına NM uygulanan gruplar 52

Şekil 23. Sentetik NM'lerin hücre içi ferroportin, TfR1, ferritin ve IREB-2 protein düzeylerine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ile inkübe edildi. *p<0.05; Fe⁺³NM ve erastin grubu vs. diğer gruplar. **p<0.05; gruplar vs. Fe⁺³NM ve erastin grupları 53

Şekil 24. Sentetik NM'lerin ferritin, ferroportin ve DMT-1 mRNA düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ile inkübe edildi. 54

Kısaltma Listesi

3-MA	:	3-Metiladenin
4-HNE	:	4-Hidroksinonenal
Acsl-4	:	Uzun zincir açıl koA sentaz 4
BDNF	:	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Cys	:	Sistein
DFO	:	Deferoksamin
DMT1	:	İki değerlikli metal taşıyıcı 1
Fe⁺³NM	:	Fe ⁺³ içeren nöromelanin
FSP1	:	Ferroptoz baskılayıcı protein 1
GPX4	:	Glutasyon peroksidaz 4
GSH	:	Glutasyon
IREB2	:	Demire duyarlı element bağlayıcı protein 2
ifNM	:	Demir iyonu içermeyen nöromelanin
NM	:	Nöromelanin
LC	:	Locus coeruleus
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
LOH	:	Lipid alkol
LOOH	:	Lipid hidroperoksit
MAP-2	:	Mikrotübül ilişkili protein 2
MDA	:	Malondialdehit

NAC	:	N-Asetilsistein
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PUFA	:	Çoklu doymamış yağ asidi
PVDF	:	Poliviniliden difluorid
RA	:	Retinoik asit
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
RSL-3	:	RAS seçici öldürücü küçük molekül 3
RSL-5	:	RAS seçici öldürücü küçük molekül 5
SH-SY5Y	:	İnsan nöroblastoma hücre hattı
SNPc	:	Substantia nigra pars compacta
TBH	:	t-butil hidroperoksit
Tf	:	Transferrin
TfR1	:	Transferrin reseptör 1
UPS	:	Ubikitin proteozomal sistem
Z-VAD-FMK	:	Pan-Kaspaz inhibitör

1. Giriş

Parkinson Hastalığı (PH) dünya genelinde 65 yaş üzeri nüfusun %2'sini etkileyen bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalıkta beynin substantia nigra (SN) pars compacta bölgesinde dopaminerjik nöronların ilerleyici kaybı söz konusudur. Bu durum motor hareketlerde ve duruşta bozukluk, kas sertliği, titreme gibi belirtilerle kendisini gösterir. PH'nın tedavisi semptomatiktir. Bu nedenle hastalığın patolojisini öğrenmek ve tedavisine yönelik seçenekleri genişletmek için ileri araştırmalar devam etmektedir. Dopaminerjik nöron kaybı oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, nöroinflamasyon, genetik ve çevresel faktörler, nitrik oksit toksisitesi, apoptoz gibi etkenlerden kaynaklanabilir. Bütün bu faktörler birbirleri ile etkileşime girerek nöronal işlev bozukluğuna, atrofiye ve hücre ölümüne sebep olur. Hastalığın karakteristik özelliği Lewy cisimciklerinin oluşumudur. Bu cisimcikler α -sinüklein isimli proteinin fazla miktarda birikimi sonucu oluşur ve hücreler için toksiktir. Özellikle elektron transport zinciri üzerinde bozucu etki göstermesi ile serbest radikallerin artmasına ve oksidatif strese sebep olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar bir diğer etkenin; fizyolojik koşullarda yaşla beraber oluşan nöromelanin (NM) pigmenti olduğunu göstermektedir. NM koyu renkli, çözünmeyen granüler yapıya sahip, beyinde SN ve locus coeruleus'un katekolaminerjik nöronlarında ve çeşitli hayvan türlerinin beyin bölgelerinde bol miktarda bulunan bir pigmenttir. Dopaminin oksidasyonu sonucu oluşan moleküller demir iyonu, protein ve lipidlerle birleşerek NM'i oluşturur. Metalleri bağlama kapasitesinin yüksek olması NM'nin fizyolojik koşullarda bir şelatör gibi davranarak hücre içi koruyucu etkiye sahip olduğunu gösterir. Diğer taraftan, hastalık koşullarında ve yüksek demir düzeylerinde demir iyonunu fazla miktarda bağlayarak redoks aktivite kazanır ve sitotoksik radikal oluşumuna sebep olur.

Ferroptoz son yıllarda keşfedilen, hücrede demir birikimi ve lipid peroksidasyon ile karakterize bir hücre ölüm şeklidir. Ferroptozu indükleyen faktörler glutatyon peroksidaz enzimini (özellikle GPX4) doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek antioksidan kapasitede bir azalmaya, hücrelerde lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesine ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. PH'de beyin hücrelerinde demir birikimi mevcuttur. Özellikle nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olan beyin bölgelerinde demir birikimi dikkat çekicidir. PH'de etkilenen en temel beyin bölgesi

olan SNPC; yaşa ve hastalığa bağlı olarak NM yoğunluğu açısından değişkenlik göstermektedir.

Tez çalışmasının amacı; beyin hücrelerinde NM kaynaklı ferroptotik hücre ölümünü değerlendirmek, NM'nin hücre içi demir metabolizmasına olan etkisini ve ferroptotik ölüm ile bağlantısını araştırmaktır. Hipotezimize göre NM; yapısında bol miktarda demir iyonları bulundurması nedeniyle ve yüksek miktarda bulunması durumunda nörodejenerasyonu tetiklemesi nedeniyle ferroptotik hücre ölümüne aracılık etmektedir. Çalışmadan elde ettiğimiz çıktılar; ferroptotik hücre ölümünün aydınlatılmasına, NM kaynaklı etkilerin gösterilmesine ve terapötik hedeflerin belirlenmesinde literatüre katkı sağlayacaktır.

Araştırmanın Problemi

PH'de etkilenen en temel beyin bölgesi olan SNPC; NM pigmenti yoğunluğu açısından yaşa ve hastalığa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. NM'nin yapısı ve PH patogenezindeki rolü ile ilgili *in vivo* çalışmalar literatürde mevcuttur, ancak NM'in etkilerinin ayrıntılı incelenmesine imkân sağlayan sentetik NM pigmentlerinin kullanıldığı *in vitro* çalışmalar sınırlıdır. NM'nin karmaşık ve heterojen yapısı nedeniyle laboratuvar ortamında sentezi güçtür. Ayrıca beyinde sentezlenmesini ve birikmesini sağlayan mekanizma ve koşullar tam olarak anlaşılamamıştır, bu da *in vitro* olarak sentezleme sürecini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, NM çoğu çözücüye ve kimyasal işlemlere dirençli, kararlı bir pigmenttir. NM'yi otopsi ile beyin dokusundan izole etme girişimindeki başarı sınırlı kalmış; elde edilen ürünler diğer hücrel bileşenler ve bozunma ürünleri ile kontamine olmuştur.

Bu zorluklara rağmen, araştırmacılar, nörodejeneratif hastalıklardaki rolüne dair yeni içgörüler elde etme ve tedavileri için yeni terapötik stratejiler geliştirme umuduyla, NM'nin beyindeki özelliklerini ve işlevlerini araştırmaya devam etmiştir. Bugün ise NM ile ilgili araştırmalar çoğalmakta ve devam edilmektedir. Hazırlanan bu tez çalışması NM ile ilgili sınırlılıkları gidermek amacıyla hazırlanmıştır.

Araştırmanın Sorusu

Araştırmanın sorusu NM'in oluşturduğu nörodejenerasyonun ferroptotik hücre ölümü aracılı olup olmadığının araştırılmasıdır.

Araştırmanın Hipotezleri

H0 hipotez: NM aracılı hücre ölümünde ferroptoz etkili değildir.

H1 hipotez: Hazırlanan sentetik NM'ler (ifNM ve Fe⁺³NM) beyinde zamanla oluşan ve birikim gösteren endojen kaynaklı NM'e benzer yapı ve özelliktedir. Sentetik NM'ler dopaminerjik hücelere uygulandığında nörodejenerasyona sebep olur. Meydana gelen nöron hasarı ve/veya nöron kaybı demir iyonunun aracılık ettiği bir hücre ölüm tipi olan ferroptoz kaynaklıdır.

Araştırmanın Varsayımları

Seçilen hücre hattında ferroptotik mekanizmalar aracılığıyla hücre ölümü gerçekleşebilir.

Araştırmanın Sınırlılıkları

Hazırlanan NM'lerin sıcaklık farklarından etkilenmesi, benzer çözücülerden yalnızca bir tanesi ile reaksiyona girmesi nedeniyle alternatif bir çözücünün bulunmaması sentez sürecini zorlamıştır.

Levodopanın (L-DOPA) hücelere uygulaması sonrası endojen NM sentezinin indüklenmesi beklenmiştir. L-DOPA, literatüre sadık kalınarak ve bir dizi farklı kombinasyonda uygulanmasına rağmen NM, hücelerde oluşmadığından "L-DOPA ile indüklenmiş nöromelanin deney modeli" kurulamamıştır.

Araştırmanın Amacı

Tezin amacı nöromelanin pigmentinin dopaminerjik hücelerde ferroptotik hücre ölümü üzerine etkisini değerlendirmektir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Nörodejenerasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejenerasyon, metabolik veya toksik etkilerden kaynaklı nöronların ilerleyici kaybıdır. Nörodejeneratif hastalıklar semptom ve patofizyolojilerine göre kliniğe çeşitli şekillerde yansımaktadır. En yaygın nörodejeneratif bozuklukların başında Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) gelmektedir. Semptomlar karmaşık ve kişiye özel olabilmektedir. Bu hastalıkların altında yatan nedenler spesifik protein birikimi veya anatomik hassasiyet gibi etkilerin yanında proteotoksik stres, ubiquitin-proteozomal ve otofaji mekanizmalarında bozukluk, oksidatif stres ve bunlara bağlı nöroinflamasyon ve nöron kaybı ile temellendirilmektedir (Dugger & Dickson, 2017).

2.2. Parkinson Hastalığı

2.2.1. Hastalığın Etiyolojisi

PH, AH'den sonra en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıktır (Barnham vd., 2004). Hastalığın oluşumunda etkili en güçlü faktör ileri yaştır. Avrupa'da 65 yaş ve üzeri yaklaşık 15bin katılımcının dahil olduğu bir araştırmada, 65-89 yaş aralığında parkinsonizm prevalansının %0,6'dan %3,5'e kademeli bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (Fahn & Sulzer, 2004). Klinik tanının konmasında motor fonksiyonlarda bozukluk aranmaktadır. Özellikle dinlenim halinde tremor, rijidite, istemli hareketlerin yavaşlaması veya olmayışı, duruş bozukluğu ve titreme en belirgin semptomlardır. Diğer motor özelliklerden festinasyon (yürürken öne doğru bükülmüş bir duruş ile hızlı ayak sürüyerek adımlar), konuşma ve yutkunma güçlüğü, maske benzeri yüz ifadesi semptomlar arasında yer almaktadır (Dexter & Jenner, 2013). Ayrıca hastalarda normal duruşsal refleksler kaybolabilmekte ve hastalar düşmeye bağlı tekerlekli sandalyeye mahkûm olabilmektedir. Hastalığın semptomları zaman ilerledikçe ağırlaşmaktadır. Bu etkenlere bağlı olarak özellikle yaşlı hastalarda yaygın olarak depresyon ve önemli ölçüde demans görülmektedir (Dauer & Przedborski, 2003).

2.2.2. Hastalığın Patofizyolojisi

PH'de meydana gelen semptomlar hastaların beynindeki birtakım biyokimyasal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. En kritik değişiklik bazal ganglionu oluşturan çekirdek bölgelerden biri olan SNpc'deki nöronların dejenerasyonudur. Normal koşullarda, buradaki nöronlar merkezi sinir sistemi nörotransmitteri olan dopaminin (DA) farklı bazal ganglion çekirdeklerine ve striatuma transferini sağlamaktadır. Dejenerasyon ile nöronlardan ilgili bölgelere yeterli DA ulaştırılmaz. Bu durum DA'nın aracılık ettiği motor kortikal alanları ve bazal ganglionu kapsayan geniş bir nöral devrenin işlevinde hasar meydana getirir (Lotankar vd., 2017).

Dopaminerjik nörodejenerasyona sebep olan birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunlar oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon, eksitotoksisite, kalsiyum toksisitesi, trofik faktör eksikliği, nöroinflamatuvar süreçler, genetik ve çevresel faktörler, nitrik oksit toksisitesi ve apoptozdur. Bütün bu faktörler birbirleri ile etkileşime girerek nöronal işlev bozukluğuna, atrofiye ve hücre ölümü ile sonlanan kısır bir döngüye sebep olur (Yuan vd., 2010).

PH'nin karakteristik özelliği Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin varlığıdır. Bunların ana bileşeni α -sinüklein proteindir (Starkov, 2008). α -sinüklein 14 kDa molekül ağırlığında katlanmamış bir proteindir. Beyinde fazla miktarda ifade edilir (Xu & Chan, 2015). α -sinüklein nörotransmitter salınımının, sinaptik fonksiyonun ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynar. Bugüne dek yapılmış çalışmalar, α -sinükleinin PH'nin patogenezinde rol aldığını net bir şekilde kanıtlamıştır. α -sinüklein, çevresel ve genetik faktörler nedeniyle yanlış katlanarak patolojik agregatlar oluşturur. Bunların oluşumu ve detoksifikasyonu arasındaki dengesizlik, α -sinükleinin daha fazla birikmesine yol açar. Dahası, hücreler arası ve sinaptik iletim yoluyla yayılarak nöronlar üzerinde sitotoksik etkilere ve en sonunda PH'nin başlangıcına sebep olur (Chen vd., 2022).

PH'de α -sinükleinin agregasyonuna bağlı bir takım istenmeyen etkiler oluşmaktadır. Bunlardan bazıları; dopaminerjik nöronların selektif işlev bozukluğuna veya dejenerasyonuna yol açması, mitokondriyal yapıyı bozup kompleks I aktivitesini inhibe etmesi, endoplazmik retikulum (ER)-golgi veziküler transportu bozarak ER strese neden olması, ubiquitin-proteazomal sistemi (UPS) ve otofaji-lizozom sistemi dahil olmak üzere protein yıkım sistemlerini inhibe etmesi, membranların geçirgenliğini artırarak hücrel homeostazı bozmasıdır (Xu & Chan, 2015).

2.2.3. Parkinson Hastalığı ve Demir İlişkisi

Beyinde en yüksek konsantrasyonda bulunan metal demirdir. Nörotransmitter sentezi, miyelin oluşumu ve mitokondrinin işlevini sağlaması gibi birçok kritik biyokimyasal süreçte rol almaktadır. Yaşamın başlaması ile beyinde demir birikimi yavaşça artar, yetişkinlikte ise hızlanır ve sabit kalır. Yaşlanmanın etkisi ile demir, çoğunlukla bazal ganglionlar gibi motor işlevlerin sürdürüldüğü bölgelerde yoğunluk kazanır. Özellikle SN'de birikim hızı oldukça yüksektir (Dusek vd., 2022). Yapılan bazı çalışmalar serebral demir regülasyonunun bozulması ile demirin farklı beyin bölgelerinde biriktiği ve çeşitli nörodejeneratif bozuklukların patogenezinde rol aldığını tespit etmiştir. Bu birikim, nöronların ve glial hücrelerin dejenerasyonuna, bağışıklık hücrelerinin lezyon bölgelerine geçişi ile nöroinflamasyona sebep olmaktadır (Xu & Chan, 2015).

İlerleyen yaşla birlikte beyinde biriken demire nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili beyin bölgelerinde daha fazla rastlanır (Masaldan vd., 2019). PH'de özellikle SNPc'nin glia ve dopaminerjik nöronlarında demir artışı gözlemlenmiş, hatta buradaki demir düzeyleri hastalık şiddeti ile ilişkili bulunmuştur (Mahoney-Sánchez vd., 2021).

Mochizuki ve arkadaşlarının (2000) Parkinson hastaları ile yaptıkları bir çalışmada, hastaların SN'sindeki demir yükünün gözlenen motor bozukluklar ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Mochizuki vd., 2020).

Dopaminerjik nöronal ölüm ve hücre içi α -sinüklein birikimi gibi özelliklerin yanı sıra demir birikimi, artmış oksidatif stres ve lipid peroksidasyon hasarı PH patofizyolojisinin göze çarpan diğer özellikleridir. Hücre ölüm şekillerinden biri olan ferroptoz ise PH'nin ilerlemesi ile karşımıza çıkan artmış demir düzeyi, tükenmiş glutatyon seviyesi, azalan glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) aktivitesi ve lipid peroksidasyonu ile doğrudan ilişkili bir durumdur (Xu & Chan, 2015).

2.3. Ferroptoz

Hücre ölümü organizmanın gelişimi, homeostazı ve hastalıkların seyri için kritiktir. Kaspaz bağımlı apoptoz, moleküler düzeyde karakterize edilen ilk düzenlenmiş ve programlanmış hücre ölümü formudur. Esas olarak hücre küçülmesi, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolması, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimler oluşturma şeklinde kendini gösterir. Hücre ölümünü kontrol eden moleküler süreçleri açıklamada apoptozun ötesinde farklı hücre ölüm mekanizmaları da kullanılmaktadır.

Otofaji hücrelerin hasarlı organelleri veya makromolekülleri parçalamak için lizozomları kullandığı bir süreçtir. Otofaji sürecine Golgi aygıtının ve ER'nin genişlemesi, nükleer yoğunlaşma ve otofagozom oluşumu eşlik eder. Nekroptoz fiziksel, kimyasal veya biyolojik faktörlerin neden olduğu hücre ölümünü ifade eder. Organellerin şişmesi, plazma zarının yırtılması ve hücrel içeriğin salınması ile karakterizedir (J. Lei vd., 2020).

Ferroptoz, ilk kez 2012 yılında Dixon ve arkadaşları tarafından demir bağımlı lipid peroksidasyonu ile tetiklenen bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanmıştır (Dixon vd., 2012). Ferroptoz morfolojik olarak bütünlüğünü yer yer korumuş bir hücre membranı, mitokondriyal hasar, oksitlenmiş çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ve artmış lipid peroksidasyon ürünleri ile karakterizedir (J. Lei vd., 2020). Metabolik yollar halen çalışılmakla birlikte son birkaç yıldır yapılan kapsamlı araştırmalar çeşitli düzenleyici mekanizmaların yanı sıra çok sayıda spesifik indükleyici ve inhibitör bileşiğin ortaya çıkmasını sağlamıştır (Han vd., 2020). Ferroptoz ölümcül lipid peroksidasyon sonucu meydana gelmektedir. Bu nedenle, demir şelatörleri, lipofilik antioksidanlar, lipid peroksidasyon inhibitörleri ve PUFA'ların azaltılması ile engellenebilir (Stockwell vd., 2017).

2.3.1. Ferroptoz ve Lipid Peroksidasyon

Lipid bazlı reaktif oksijen türleri (ROT) birikimi ferroptozun önemli bir belirtecidir (J. Lei vd., 2020). Lipid yapısını oluşturan karbon atomlarından hidrojen ile bağlı olanları (C-H) peroksidasyona duyarlıdır. Bu yapılarıdaki hidrojen atomu peroksil (O-O) grubu ile değiştirilerek peroksidasyona uğrar. PUFA'ların doymamışlık yapılarına (C=C) göre hidrojen ile bağlı (C-H) gruplarının oldukça zayıf olduğu, bu yüzden de peroksidasyona duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar lipid peroksidasyonuna uğramış PUFA'ları ferroptozun ateşleyici etkeni olarak tanımlamıştır (Stockwell, 2022).

ROT, lipid bazlı ROT oluşturmak için hücre membranındaki PUFA'larla etkileşime girer. Hücrede büyük miktarda lipid bazlı ROT biriktiğinde ferroptozu neden olur. Lipoksijenaz enzimi, PUFA'ların lipid hidroperoksitlere oksidasyonunu kataliz ettiği için demire bağlı lipid bazlı ROT oluşumunda rol oynar. Sitoplazmada çok sayıda demir iyonu bulunduğunda lipid hidroperoksitler, lipid serbest radikalleri oluşturarak hücrel hasara neden olur. Buna paralel olarak, bu serbest radikaller PUFA'ların

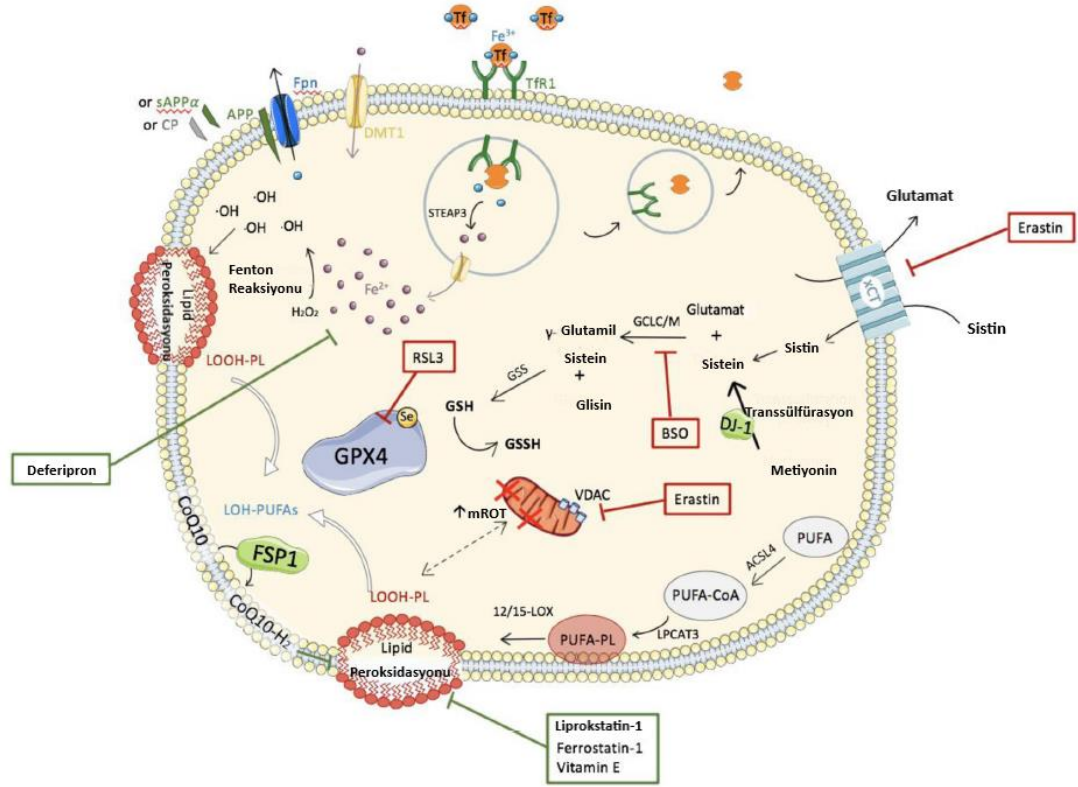
yakınına protonları transfer edebilir, bu da yeni bir lipid oksidasyon reaksiyonu döngüsü başlatır ve daha ciddi oksidatif hasara neden olur (J. Lei vd., 2020)

Lipid hidroperoksitleri (LOOH) fizyolojik konsantrasyonlarda tutmak ferroptozaya duyarlılığı en aza indirmede önemlidir. Lipofilik antioksidanlar lipid peroksidasyonunu önleyerek ferroptozu engelleyebilir. Fizyolojik koşullar altında LOOH'yi lipid alkollere (LOH) indirgeyen GPX4'e ihtiyaç vardır. GPX4, glutatyon peroksidaz ailesinin ferroptotik yoldaki merkezi enzimatik rolünü karşılayan, LOOH miktarını azaltan tek üyesidir (Han vd., 2020). Lipid peroksitleri nötralize ederek membran akışkanlığını koruyan bu antioksidan enzimin inhibisyonu kontrolsüz PUFA oksidasyonunu ve lipid radikal oluşumunu tetikler ve ferroptotik hücre ölümüne neden olur (Latunde-Dada, 2017).

Glutatyon (GSH), GPX4'ün işlevi için gerekli bir kofaktördür. Bu nedenle GSH sentezi doğrudan GPX4 aktivitesini etkiler (Wu vd., 2019). Hücre içi detoksifikasyon sırasında meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz ve NADPH/H⁺ tarafından GSH'ye indirgenerek tekrar kullanılabilir hale geçer. Hücre içi GSH seviyeleri aynı zamanda X_c⁻ SLC7A11 sistin-glutamat antiporter sisteminin fonksiyonundan etkilenir (Latunde-Dada, 2017). Hücre zarındaki sistin / glutamat antiport taşıyıcısı sistem X_c⁻, glutamatı hücrenin dışına sistini de hücre içine taşır. Sitoplazmaya girdikten sonra sistin, indirgenmiş GSH'nin sentezinde rol alan sisteine (Cys) dönüştürülür. Sistem X_c⁻ bloke edildiğinde, hücre içi Cys seviyeleri azalır, bu da GSH sentezinde bir azalma, GPX4 aktivitesi kaybı, hücre içi lipid bazlı ROT birikimi ve ferroptoz ile sonuçlanır.

GPX4 inhibisyonu kaynaklı ferroptozun gerçekleştiği hücrelerde, bir genin lipid metabolizması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Dixon vd., 2015). Açıl-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (Acsl4), 8-22 karbonlu doymuş ve doymamış yağ asitlerini yağ asidi açıl-KoA esterlerine dönüştürebilen enzim ailesinin (ACSL) bir üyesidir. Acsl4, lipid peroksitlerin oluşumunda anahtar bir enzimdir (Jia vd., 2023). Yapılan bir araştırmada Acsl4'ün, GPX4'ü inhibe ederek ferroptozu tetiklediği bildirilmiştir (Magtanong vd., 2022). Bu durumun artmış gen ekspresyonu veya enzim aktivitesine bağlı olarak Acsl4'ün PUFA'ların miktarını olumsuz yönde düzenlemesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Jia vd., 2023).

Birçok etken ve parametrenin yönettiği ferroptozun genel mekanizması **Şekil 1**'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Ferroptoz mekanizması (Mahoney-Sánchez vd., 2021).

Ferroptozun aydınlatılma süreci devam etmektedir ve tanımlanması için spesifik bir biyobelirteç bulunamamıştır. Genel olarak, ferroptozu tetikleyen mekanizmalar ve ilişkili proteinler aydınlatıldıkça bu yolağı düzenleyen bileşikler tanımlanmıştır. Pro-ve anti-ferroptotik moleküller farmakolojik etkilerine göre demir toksisitesi, GPX4, sistem X_c⁻ inaktivasyonu ve lipid peroksidasyonu üzerine gruplanmaktadır (Wu vd., 2019).

Ferroptozu indükleyen veya inhibe eden birtakım bileşikler **Tablo 1**'de sunulmuştur.

Tablo 1.Ferroptoz inhibitörleri ve indükleyici ajanlar (Seibt vd., 2019).

İnhibe edici Ajanlar				İndükleyici Ajanlar			
Lipid Peroksidasyon Engellevcileri	Glutaminaz İnhibitörü	ACSL4 İnhibitörleri	Antioksidan	Sistem X _c İnhibitörleri	GPX4 İnhibitörleri	Demir Oksidasyonu, koenzim Q10 eksikliği oluşturanlar	ROS/lipid peroksidasyonunu tetikleyenler
Liprokstatin-1	Aminooksiasetik asit	Rosiglitazon	E Vitamini	Erastin	RSL5	FINO2	t-butil hidroperoksit (TBH)
Ferrostatin-1		Pioglitazon		Sülfosalazin	RSL3	FIN56	
Nekrostatin-1		Troglitazon		Sorafenib	FIN56		
Nitrik oksit türevleri				L- bütivonin	Artemisinin		
				Sülfoksimin	ML210		

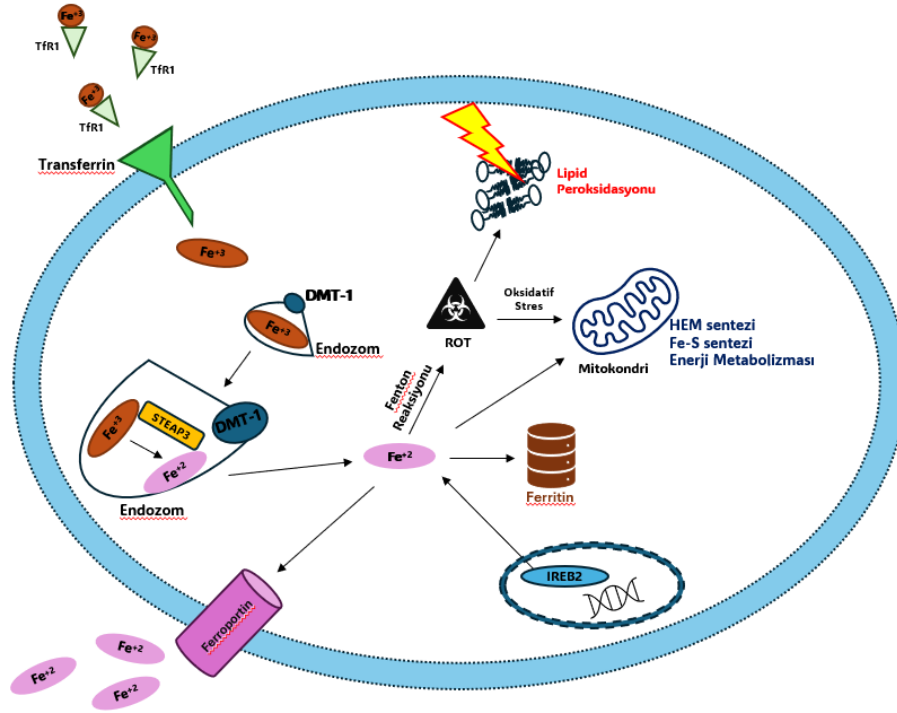
Ferroptoz indükleyici erastin hücre içi Cys seviyesini önemli ölçüde azaltır, GSH sentezini bloke eder ve ferroptozu neden olur (J. Lei vd., 2020). RAS seçici öldürücü küçük molekül 3 (RSL3) hücrede GSH sentezini etkilemeden GPX4'ü doğrudan inhibe ederek ferroptozu tetiklemektedir (J. Lei vd., 2020). Erastinin kullanımı ve GPX4'ün RSL3 tarafından doğrudan inaktivasyonu deneysel olarak ferroptozu indüklemek için kullanılan en yaygın stratejilerdendir (Han vd., 2020).

Tablo 1'de belirtilen ferroptoz aktivatörlerine ilaveten N-asetilsistein (NAC) gibi sistein öncülleri ile hücre içi GSH seviyelerini yükseltmek ferroptozu karşı koruma sağlayabilir. Ayrıca, ferroptoz baskılayıcı protein 1 (FSP1), koenzim Q10'u indirgenmiş formu olan ubikinol'e dönüşümünü sağlayarak ferroptozu baskılar, güçlü bir mitokondri ve lipid peroksil radikali yakalayan antioksidan özellik gösterir (Han vd., 2020).

2.3.2 Ferroptoz ve Demir Metabolizması

Diyetle alınan demir hücrelerde veya vücut sıvılarında ferrik (Fe^{+3}) ve ferröz (Fe^{+2}) olmak üzere iki farklı oksidasyon durumunda olur. Fe^{+3} kan dolaşımında transferrine bağlanarak dolaşır, membran proteini transferrin reseptörü (TfR) yoluyla hücre içine alınır. Daha sonra endozomlarda metaloredüktaz STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenir. Fe^{+2} endozomdan

sitoplazmaya DMT1 (çift değerli metal iyon taşıyıcı 1) ile taşınır. Sitoplazmadaki fazla demir, ferritinde depolanabilir veya membrana bağlı ferroportin aracılığıyla dolaşıma aktarılabilir (Zhou vd., 2020). Demirin hücre içi metabolik yolu **Şekil 2**'de sunulmuştur.



Şekil 2. Hücre içi demir metabolizması

Demirin ferroptozda birden fazla işlevi olduğuna inanılmaktadır: önerilen en yaygın işlev Fenton reaksiyonu yoluyla ya da demire bağlı oksidazların etkisiyle lipid bazlı ROT (özellikle lipid hidroperoksit) oluşumunda rol oynamasıdır (Hirschhorn & Stockwell, 2019). Hücrelerde fazla Fe⁺² üretildiğinde Fenton reaksiyonu ile lipid bazlı ROT üretilir ve hücre içinde sürekli lipid ROT birikmesine ve sonunda ferroptoz gelişmesine yol açar (J. Lei vd., 2020). Demir homeostazı karmaşık bir süreçtir ve demir metabolizmasında yer alan proteinlerin koordinasyonuna bağlıdır. Bu moleküllerin çeşitli sebeplerle ifadesi değiştiğinde ferroptoz tetiklenebilir (Yan & Zhang, 2020).

2.3.3. Parkinson Hastalığı ve Ferroptoz İlişkisi

PH patogenezinde rol oynayan çok sayıda hücre ölümü mekanizması vardır ve yakın zamanda ferroptoz bu hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Guiney vd., 2017). PH'nin ilerlemesi sırasında GSH'ı kullanan antioksidan enzimlerin azalmasıyla birlikte oksidatif stres, lipid peroksidasyon ve mitokondriyal disfonksiyonda artış meydana gelir. Tüm bu faktörler zamanla nöron ölümüne ve organizmanın işlevsel aksamalar yaşamasına yol açar. 2000'li yılların başından bu yana Parkinson hastalarının beyinde yüksek düzeyde demir bulunduğu bilinmektedir (Reichert vd., 2020). Ancak o zamanlar demire bağımlı bir hücre ölümü mekanizması henüz öne sürülmemiştir. Ferroptozun tanımlanması PH'de artan demir düzeyi ile nöron kaybı arasındaki ilişkinin altında yatan boşlukları doldurmaya yardımcı olmuştur.

Ölümsüzleştirilmiş insan dopaminerjik nöronal prekürsör hücrelerde (LUHMES) ve organotipik kültürlerde yapılan çalışmalarda erastin kaynaklı ferroptoz gösterilmiştir (Do Van vd., 2016). Ayrıca çalışma, ferroptoz inhibitörü ferrostatin-1'in 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) fare PH modelinde nöron kaybını ve davranışsal bozukluğu önleyebileceğini göstermiştir. LUHMES hücrelerinde sporadik PH ile ilişkili olan rotenon ve parakuat gibi çevresel nörotoksinler kullanılarak başlatılan hücre ölümü ferrostatin-1, liprostatin-1 ve demir şelatör deferipron tarafından geri döndürülmüştür (Masaldan vd., 2019). Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar ferroptoz inhibitörlerinin PH'de etkili olabileceğini göstermektedir.

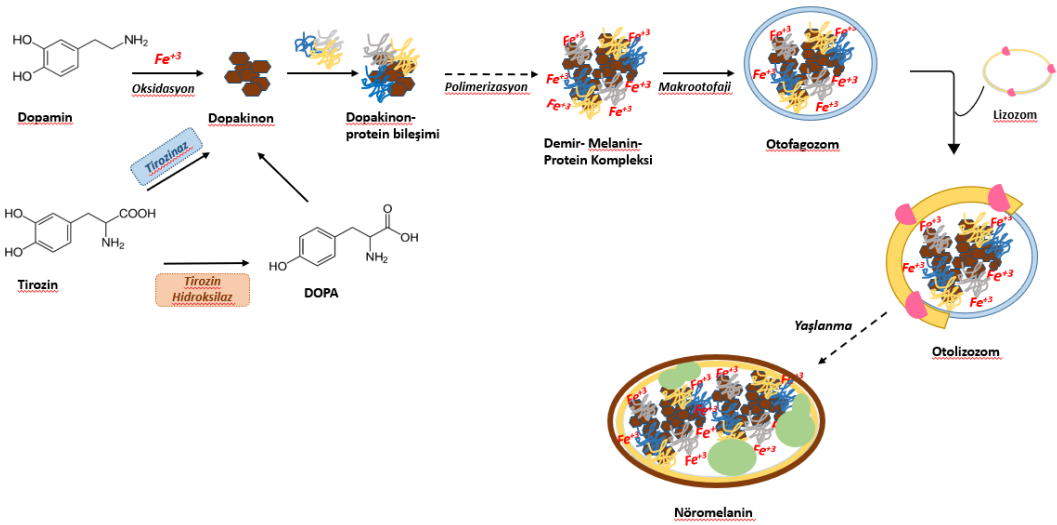
2.4. Nöromelanin Yapısı ve Önemi

Nöromelanin (NM) koyu renkli, çözünmeyen granüler yapıya sahip, beyinde SN ve locus coeruleus' un katekolaminerjik nöronlarında bulunan bir pigmenttir (Zecca vd, 2008). İlk yapılan tanımlama çalışmalarında nöronların çoğunun doğumda bu pigmenti içermediğini, ancak yaşamın 3. yılından itibaren NM pigmentinin SN'de saptanabildiğini göstermiştir (Fedorow vd., 2006). Bununla birlikte NM konsantrasyonunun yaşla birlikte arttığı ve optik yoğunluğunun ise 60 yaşına kadar yükselme gösterdiği tespit edilmiştir (Oberländer vd., 2011).

Histolojik çalışmalar NM granüllerinin nöronal perikaryonda bulunduğunu ve çift membranla çevrildiğini göstermiştir. X-ışını kırınımı çalışmaları NM'nin sentetik ve doğal melanine benzeyen çok katmanlı (grafit benzeri) üç boyutlu bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Xu & Chan, 2015). Yapısal olarak melanik, alifatik ve peptit

kalıntılarından oluşur. Melanik bileşen fenomelaninlere özgü benzotiyazini ve eumelaninlere özgü indol parçalarını 1/3 oranında benzotiyazin / indol olacak şekilde içerir. İzole edilmiş NM granülleri 30 nm çapında küresel bir yapıya sahiptir, çekirdekte feomelanin ve yüzeyde eumelanin yerleşmiş şekildedir (Zecca vd., 2008). Ek olarak, NM'nin kompleks yapısında protein, lipid ve metaller bulunduğu tespit edilmiştir. Kendi kütlelerinin yaklaşık %15'i protein bileşenleri içermektedir. Yapılan proteomik çalışmalarda NM'de beyin dokusunda sıklıkla bulunan ve çoğunluğu lizozomal olan 70 kadar protein tanımlanmıştır. Yapısında bulundurduğu lipid kapasitesi kendi ağırlığının %20 kadarı olduğu; içeriğinin ise 14 ve 18 karbonlu yağ asitleri ve dolikolden meydana geldiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte ağırlığının yaklaşık %1,5 kadarında demir, bakır ve çinko gibi metaller içermektedir (Naoi vd., 2008).

Hücrelerde NM oluşum süreci net olarak açıklanabilmiş değildir ancak enzimatik veya enzimatik olmayan dopamin oksidasyonunun NM oluşumuna katkısı olabileceği öne sürülmektedir (Şekil 3).



Şekil 3. Nöromelanin sentez mekanizması

Tirozinaz enzimi eumelanin sentezinde tirozinin DA oksidasyon ürünlerine (DOPA-kinon) dönüşümünü kataliz eder. DOPA-kinon, DOPA'nın redoks reaksiyonu ürünü olup siklik yapıya sahiptir. Bu reaksiyon insan SN bölgesinde tirozinaz mRNA'larının varlığının gösterilmesi ile desteklenmiştir (Zucca vd., 2004). Ancak

farklı çalışmalarda insan SN bölgesinde immünohistokimyasal boyama ve Western blot analizleri ile tirozinaz proteinin bulunmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, fonksiyonel tirozinaz enzimi içermeyen albino SN bölgelerinde NM varlığının gösterilmesi NM oluşumunda tirozinaz dışında başka faktörlerin olduğunu da doğrulamaktadır (Zucca vd., 2014). Bu nedenle NM sentezi için tirozin hidroksilaz (TH) aracılı DA oksidasyonu gibi başka enzimatik yollar da önerilmiştir. TH, Cys varlığında sentezin öncülleri olan DOPA'nın tiyoeter türevlerini oluşumunu katalizler. Bununla birlikte beyinde öne çıkan bir diğer enzim olan prostaglandin H sentaz, DA oksidasyonunu kataliz ederek DOPA-kinon meydana getirir. Bunlar proteinlerle reaksiyona girerek reaktif Cys-DA kalıntıları oluşturduğundan prostaglandin H sentaz enziminin NM sentezinde yer aldığı ileri sürülmüştür (Zucca vd., 2004).

SN'ye ismini ve rengini veren bu pigmentleri içeren nöronların kaybı ve beraberinde NM içeren nöronların sitoplazmasında gözlenen Lewy cisimcikleri PH tanısında kullanılmaktadır. Dopaminerjik nöron kaybına bağlı olarak gözlenen NM miktarının azalması nöropatolojik çalışmalarda bildirildiği gibi hastalık sırasında SN'deki nöronların kaybını doğrulamaktadır (Zucca vd., 2004). NM seviyelerindeki değişiklikler bu pigmentin hücresel koşullarda toksik veya koruyucu rolünü belirlemektedir. Hücrede nörotoksositeye neden olacak reaktif/toksik kinonları sitozolden uzaklaştırdığı, Fe, Zn, Cu, Al, Cr, Mo, Pb ve Hg dahil potansiyel toksik metalleri, ilaçlar ve organik toksik maddeleri şelatladığı için NM nöroprotektif bir bileşiktir (Zucca vd., 2018). Diğer taraftan, NM'nin proteazom fonksiyonunu doğrudan inhibe ettiği ve serbest radikallerin üretimini teşvik ederek dopaminerjik nöronlar için toksik olabileceği öne sürülmüştür (Xu & Chan, 2015). NM hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek bir serbest radikal kaynağı haline gelebilmektedir. Son zamanlarda, NM'nin yaşlanmada veya PH'de beyin SN'deki dopaminerjik nöronlarında α -sinüklein ekspresyonunu veya birikimini indüklediği ileri sürülmüştür (Xuan vd., 2011). Fasano ve arkadaşları (2003) NM'nin PH'nin SN nöronlarında doğrudan α -sinüklein ile bağlandığını bildirmiştir. Dahası, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında PH orta beyindeki NM içeren dopaminerjik nöronlarda α -sinüklein mRNA seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Xu & Chan, 2015).

NM güçlü bir metal bağlama kapasitesine sahiptir (Zucca vd., 2004). Demir, NM pigmentine iki farklı bölgeden bağlanır: birinci bölge NM pigmentinin melanik kısmının katekol grupları ile çevrili bir oksidasyon köprüsü demir (III) kümesidir.

İkinci bölge ise katekol birimlerinin oksijen atomları tarafından koordine edilen bir mononükleer demir bölgesidir. Bununla birlikte, bu bölgelerden hangisinin demir oranını yüksek veya düşük afinite ile koordine ettiği tam olarak açık değildir. 70-90 yaş arası sağlıklı bireylerde SN'deki NM'lerin demir içeriği, SN'de bulunan toplam demirin %10-20'sini oluşturmuş ve kalan miktar çoğunlukla glial hücrelerde H- ve L-ferritin olarak depolanmıştır (Zucca vd., 2004). Bu, demirin nörodejeneratif hastalıklardaki rolü için oldukça önemlidir, çünkü SN nöronlarında demir ve diğer metal toksisitesine karşı tek tampon sistemi NM gibi görünmektedir. NM, redoks aktif demiri ayırıp hidroksil radikallerinin oluşumunu azaltabilir. Yüksek demir seviyeleri varlığında, NM demiri ferritin benzeri bir demir oksihidroksit kluster formunda düzenlenmiş, düşük afiniteli bağlanma alanlarında biriktirir. Buradaki demirin redoks aktif olma kapasitesi yüksek olduğu için serbest radikaller üretir ve nörotoksositeye yol açar. Yapılan bir çalışmada, PH hastalarına ait NM agregatlarında gözlenen artmış redoks aktivitesinin NM içeren nöronların hemen yakınındaki dokularda bulunmadığını; buradaki Fe^{+3} miktarının NM redoks aktivite seviyeleri ile ilişkilendirilebileceğini göstermiştir. Aynı çalışma, NM içindeki redoks aktivitesinin çoğunun demir iyonları tarafından üretildiğini göstermektedir. Söz konusu nöronlarda demir homeostazına dahil olan moleküllerin belirlenmesi, PH hastalarının SN'sinde artmış demire yanıt olarak gelişen ferritin ifadesinin regülasyonundaki azalmanın aydınlatılması açısından önemli olacaktır. İleri sürülen hipoteze göre NM'nin redoks aktif metal iyonlarını bloke eden koruyucu bir ajan mı yoksa sitotoksik radikal oluşumunu teşvik eden bir bileşik mi olduğunu belirleyen bağlanan demir miktarıdır (Zucca vd., 2004). Erken PH'de NM'nin yapısı ve yoğunluğunda değişimler dikkat çekmektedir. PH hastalarının SN'sindeki NM analizi potansiyel olarak artmış oksidatif stresle sonuçlanabilen erken demir birikimi şeklindedir. Dahası, hasarlı nöronlardan salınan NM, mikrogliaları aktive ederek nörodejeneratif sürece katkıda bulunabilmektedir. Aktif mikroglia TNF- α , IL-6 ve NO gibi proinflamatuvar sitokinler üretir. Ek olarak SN'de NM içeren nöronların pigment içermeyenlere göre daha savunmasız olduğu ileri sürülmektedir (Xu & Chan, 2015). Çünkü NM pigmenti fazla miktarda metal bağlamakta ve NM'nin değişen yapım-yıkım döngüsü nedeniyle yaşlanmayla birlikte sürekli birikmektedir. Biyokimyasal özellikleri nedeniyle NM'nin PH'de nöral hassasiyetin altında yatan kritik bir faktör olabileceği kabul edilmektedir (Zucca vd., 2018).

NM pigmentinin demir elementi taşınması ve demir birikiminin ferroptoz için önemi göz önüne alındığında NM'nin ferroptoz indükleyici olma potansiyeli artmaktadır. Tez kapsamında sentez ürünü uygulaması aracılığıyla hücre içinde artışı sağlanan NM, ferroptotik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Böylece dopaminerjik hücrelerdeki ferroptotik hücre ölümüne NM'nin katkısı ve tetiklediği/inhibe ettiği muhtemel yollar ortaya konmuştur.



3. Gereç ve Yöntem

3.1. Kullanılan Cihazlar

Class II Tip A2 Biohazard steril kabin (Nuaire)
Su banyosu (Memmert)
Ultrasonik su banyosu (ISOLAB)
Faz kontrast mikroskop (Olympus CK2)
Ters floresan mikroskobu (Olympus)
Freezone liyofilizatör sistemi (Labconco)
Mikroplaka okuyucu (Multiskan Go, Thermo Scientific)
Real-time PCR cihazı (Roche LightCycler 480 II)
Soğutuculu santrifüj (Beckman Coulter, Sigma 3K30)
Karbondiyoksit inkübatörü (Nuaire)
Jel dökme aparatı, transfer modülü ve güç kaynağı (BIO-RAD)
Mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
Ultrasantrifüj (Beckman Coulter)
Çalkalamalı blok ısıtıcı (BOECO)
Vorteks (IKA)
Orbital karıştırıcılar (BOEKO, IKA)
Otomatik pipetör (Biohit)
Membran görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat)
Otomatik pipetler (Thermo)
-20°C derin dondurucu (Uğur)
-80°C derin dondurucu (Sanyo Ultra Low)
Kırık buz makinesi (Hoshizaki)
Otoklav (Hirayama, HV-80L)
DirectQ millipore su arıtma cihazı
pH metre (Hanna)
Orbital çalkalayıcı (Labnet)
Analitik teraziler (Sartorius)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Millipore)
- Magnezyum klorür
- Kalsiyum klorür
- 4-(2-hidroksietilpiperazin-1-etansulfonik asit) (HEPES) (Sigma)
- Fetal sığır serumu (FBS) (Biowest)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-F12 besiyeri (Biowest)
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) (Promega)
- Fenazin metosulfat (PMS, Sigma)
- Retinoik Asit (Sigma)
- Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) (Cayman)
- Fosfat tamponu (PBS, Gibco)
- Dopamin (Cayman)
- L-sistein (Sigma)
- FeCl₃.6H₂O (Sigma)
- Aquaguard-1 ve 2 (Biowest)
- Asetik asit (Carlo erba)
- N-asetil sistein (NAC) (Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Tic A.Ş)
- Trolox (Sigma)
- Rotenon (Sigma)
- Levodopa (L-DOPA) (Cayman)
- Erastin (Cayman)
- RSL-3 (Sigma)
- Ferrostatin-1 (Sigma)
- Liprostatin-1 (Sigma)
- Nekrostatin-1 (Sigma)
- Karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluoromethilketon (Z-VAD-FMK) (Sigma)
- 3- metiladenin (Sigma)
- C11-BODIPY 581/591 (Cayman)
- Deferoksamin (DFO) (Sigma)
- Laktat dehidrogenaz enzim kiti (Cayman)

1,2-bis(dimetilamino) etan (TEMED) (Sigma)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
Tween 20 (Sigma)
Amonyum persulfat (APS) (Sigma)
Triz baz (Sigma)
Glisin (Sigma)
Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi (Sigma-Aldrich)
Yükleme tamponu (Cell Signaling Technology)
Yürütme tamponu (LONZA)
1-Step transfer tamponu (Pierce)
Trizma hidroklorik çözeltisi (Sigma)
Tergitol çözeltisi (NP-40) (Sigma)
Halt proteaz inhibitör kokteyli (100x, Pierce)
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)(FLUKA)
Etanol
Trypsin (Gibco)
Tripan mavisi %0.5 (Biowest)
Malondialdehit (MDA) TBARS kolorimetrik ölçüm kiti (Cayman)
Glutasyon kolorimetrik ölçüm kiti (Elabscience®)
Demir ölçüm kiti (Sigma)
MasterPure RNA izolasyon kiti (Epicentre)
RevertAid cDNA sentez kiti (Thermo Scientific)
RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliçon)
RNaz/DNaz içermeyen su (A.B.T.)
Primer antikorlar (anti-4-HNE-modifiye protein, anti-Acsl4, anti-ferroportin, anti-TfR1; Cell Signaling, anti-DMT-1 ve anti-GPX4; Santa Cruz, anti-ferritin, anti-IREB-2, anti-STEAP3; Fine Test)
Sekonder antikorlar (Cell Signaling)
Primerler (GPX4, Acsl4, DMT-1, ferritin ve ferroportin) (B Oligo)
BCA protein miktar tayin kiti (Thermo Scientific)

3.3. Deney Modelinin Hazırlanması

Tez çalışmasında NM aracılı hücre ölümü ferroptoz açısından değerlendirilmiştir. Tezin ilk aşamasında sentetik NM sentezi gerçekleştirilmiş, ardından NM hücelere uygulanıp hücre ölümüne ilişkin analizler yapılarak “NM ile indüklenmiş deney modeli” oluşturulmuştur. Yanı sıra, L-DOPA kullanılarak hücre içinde NM sentezinin tetiklenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) kullanılmıştır. Tezin ikinci aşamasında ise oluşturulan deney modelinde ferroptoz parametreleri ile demir metabolizmasında görevli protein seviyeleri ölçülmüştür.

Sentetik NM ile indüklenmiş deney modeli oluşturulurken sırasıyla;

- ✓ Demir iyonu içermeyen (ifNM) ve demir iyonu içeren ($Fe^{+3}NM$) nöromelanin süspansiyonları hazırlanmış,
- ✓ Sentetik NM'lerin hücre içine girişi doğrulanmış,
- ✓ ifNM ve $Fe^{+3}NM$ için hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanmış,
- ✓ Antioksidanlar varlığında ifNM ve $Fe^{+3}NM$ 'nin hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiştir.

3.3.1. Demir İyonu İçermeyen Nöromelanin Hazırlığı (ifNM)

DA (1,5 g) ve Cys (232 mg) molar oranı 6:1 olacak şekilde 1000 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) çözündürülmüştür. Karışım 3 gün boyunca serbest hava erişimli, kuvvetli bir karıştırıcıda 37°C'de inkübe edilmiştir. Oluşan siyah renkli karışım 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlenip toplanmış ve bir kez %1'lik asetik asit çözeltisi ile, iki kez distile su ile yıkanmıştır. Son olarak NM, vakum altında kurutularak deney gününe kadar +4°C'de bekletilmiştir (Viceconte vd., 2015).

3.3.2. Fe^{+3} İçeren Nöromelanin Hazırlığı ($Fe^{+3}NM$)

DA (1,5 g) ve Cys (232 mg), molar oranı 6:1 olacak şekilde tartılıp 1000 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) çözündürülmüştür. Karışım 3 gün boyunca serbest hava erişimli, kuvvetli bir karıştırıcıda 37°C'de inkübe edildikten sonra karışıma demir iyonu son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ilavesi yapılmıştır. Elde edilen renkli karışım 10 dakika 10.000 rpm' de santrifüjlenip toplanmış, ardından bir

kez %1'lik asetik asit ve iki kez distile su ile yıkanmıştır. Son olarak, vakum altında kurutulup deney gününe kadar +4°C' de bekletilmiştir (Nguyen vd., 2002).

3.3.3. Sentetik Nöromelaninlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Oluşturulan sentetik NM'lerin yapısal özelliğini doğrulamak üzere Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntüleme ve IR spektrum ölçümleri yapıldı. Örnekler hazırlandıktan sonra kurutulmuş NM filmi içeren silikon levhalar, SEM odasına aktarılmadan önce çift çubuklu bakır bant kullanılarak paslanmaz çelik çivilere monte edildi. Monte edilen numuneler, bir Hummer V püskürtme kaplayıcı (Anatech, Springfield, VA) kullanılarak 10 mA'da 4 dakika boyunca argon plazması altında altın-paladyum sisi ile kaplandı. Numuneleri ultra yüksek çözünürlük modunda incelemek için geri saçılımlı ikincil elektron detektörü ve 3 nm çözünürlükle donatılmış bir Philips FEI XL30 SEM-FEG (FEI, Portland, OR) kullanıldı. Tipik elektron ışını koşulları, 3,0 nokta boyutu ve 4,0-6,0 mm çalışma mesafesi ile 3-5 kV idi. SEM görüntüleri, analySIS XL docu yazılımı (Soft Imaging Systems, Lakewood, CO) kullanılarak elde edildi ve analiz edildi. Tüm görüntüler TIFF dosyaları olarak kaydedildi (Bush vd., 2006). Oluşturulan sentetik NM'lerin yapısal özelliğini doğrulamak üzere IR spektrumları, Jasco FT/IR-400 spektrometresinde (Jasco, Tokyo, Japonya) potasyum bromür peletleri olarak kaydedilmiştir (Akgül vd., 2007).

3.3.4. Sentetik Nöromelaninlerin Hücre İçine Girişinin Gösterilmesi

Çalışma süresince insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin ve streptomisin içeren besi yeri (DMEM/F12) kullanılarak poli-L-lizin kaplı polistiren hücre kültür kaplarına ekilip %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilerek çoğaltılmış ve 1:4 oranında pasajlanmıştır. Deneyle devam ederken açılan her hücre hattının kullanım süresi 20 pasajlama sayısı ile sınırlandırılmıştır. Hücreler istenen oranda çoğaldıktan sonra tripsin (%0.25) yardımı ile flasklardan kaldırılarak santrifüj edilmiş, daha sonra 1:1 oranında hücre süspansiyonu ve %0.4 tripan mavisi solüsyonu ile karıştırılmıştır. Hemositometre lamına yerleştirilmiş, 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletilerek invert mikroskopta sayılmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarında 5x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerin adhere olmasını takiben liyofilize edilen sentetik NM'ler analitik terazide tartılıp ependorflara aktararak kültür ortamı ile uygulanacak en

yüksek konsantrasyonun 10 katı (10X) olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır (ana stok). Daha sonra ana stok üzerinden belirlenen konsantrasyonlara yine kültür ortamı ile seri olarak seyreltilmiştir. Her uygulamadan önce NM'lerin çökmesinin önüne geçilmesi için vorteks ile karıştırılmıştır. ifNM ve Fe⁺³NM süspansiyonları 0.1, 1, 10, 100 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde hücelere uygulanmıştır. 48 saat inkübasyonun ardından hücreler ışık mikroskobu ile görüntülenerek NM'lerin hücre içine girişi doğrulanmıştır. Karşılaştırma yapmak ve NM'nin kuyucuklara yapışmadığını doğrulamak için hücre içermeyen kuyucuklara NM uygulaması yapılmıştır.

3.3.5. ifNM ve Fe⁺³NM için IC₅₀ Değerinin Hesaplanması

Sentetik NM'ler için hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları (IC₅₀) hücre canlılığı analizi ile saptanmıştır. Hücre canlılığı; metabolik aktivite, ATP içeriği veya hücre proliferasyonunun ölçülmesi yoluyla analiz edilir. Ayrıca, membran bütünlüğünün kaybı gibi hücre ölümü belirteçleri üzerinde bir okuma sağlayan hücre toksisite deneyleri kullanılarak da hücre canlılığı değerlendirilebilir.

Hücre canlılığı/ölümü metabolik aktivitedeki değişim (WST-1 yöntemi) ve membran bütünlüğünün bozulması (LDH enzim salınımı) aracılığıyla iki farklı yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı şekilde hücreler deneye hazır hale getirilmiştir. 96 kuyucuklu kültür kaplarında 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerin adhere olmasını takiben aşağıdaki gruplar oluşturulmuş, 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından WST-1 ve LDH testi uygulanmıştır.

- ✚ Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler
- ✚ ifNM grupları: 0.1, 1, 10, 100 µg/mL konsantrasyonda ifNM uygulanmış hücreler
- ✚ Fe⁺³NM grupları: 0.1, 1, 10, 100 µg/mL konsantrasyonda Fe⁺³NM uygulanmış hücreler
- ✚ Rotenon grupları: 1 ve 10 µM rotenon uygulanmış hücreler (pozitif kontrol grubu)

3.3.6. WST-1 Testi

Uygulamaların sonunda her bir kuyucuğa 20 µL WST-1 eklenmiş ve 3 saat süre ile %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübe edilmiştir. Mikroplaka okuyucu

ile 440 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur. Okunan absorbans değerine göre hücre canlılığı belirlenmiştir. Referans dalga boyu olarak 650 nm kullanılmıştır.

Hücre canlılığı (%)= 1- (test kuyucuğunun absorbansı / kontrol kuyucuğunun absorbansı) x 100

3.3.7. LDH Aktivitesi Ölçümü

Uygulamaların sonunda besiyerinden 50 µL alınarak 50 µL LDH reaksiyon karışımı ile karıştırılmış ve 25 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Optik dansite mikropilaka okuyucu ile 492 nm/690 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Hücre canlılığı analizleri sonunda ifNM ve Fe⁺³NM için IC₅₀ değerleri GraphPad Prism deneme versiyonu kullanılarak hesaplanmış ve ileri çalışmalara bu konsantrasyonlarla devam edilmiştir.

3.3.8. Antioksidan Varlığında ifNM ve Fe⁺³NM'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi

Ferroptoz; oksidatif bir hücre ölümü olduğu ve serbest radikal üretimine ihtiyaç duyduğu için antioksidanların varlığından etkilenmektedir (Dixon vd., 2012). Bu nedenle, ileri çalışmalara geçmeden önce NM kaynaklı hücre ölümünün antioksidanlarla geri döndürülüp döndürülemediği değerlendirilmiştir. NM kaynaklı hücre ölümünün antioksidan varlığında geri döndürülüp döndürülemediği değerlendirmek üzere NAC ve E vitaminin suda çözünen türevi olan trolox kullanılmıştır (Dixon vd., 2012; Kunzler vd., 2017; Romero vd., 2017). Bunun için ifNM ve Fe⁺³NM için uygulama konsantrasyonları belirlendikten sonra aşağıdaki gruplar oluşturulup WST-1 ve LDH testi sırasıyla 3.3.6 ve 3.3.7'de belirtildiği şekilde uygulanmıştır:

- ✚ Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler
- ✚ ifNM grubu: ifNM (50 µg/mL) uygulanmış hücreler (24 veya 48 saat)
- ✚ Fe⁺³NM grubu: Fe⁺³NM (70 µg/mL) uygulanmış hücreler (24 veya 48 saat)
- ✚ Rotenon grubu: 10 µM rotenon uygulanmış hücreler (pozitif kontrol grubu) (24 saat)
- ✚ ifNM + NAC grubu: Bir saat NAC (1 mM) uygulaması sonrası 48 saat ifNM (50 µg/mL) ile muamele edilmiş hücreler

- ✚ Fe⁺³NM + NAC grubu: Bir saat NAC (1 mM) uygulaması sonrası 48 saat Fe⁺³NM (70 µg/mL) ile muamele edilmiş hücreler
- ✚ ifNM + Trolox grubu: Bir saat Trolox (100 µM) uygulaması sonrası 24 saat ifNM (50 µg/mL) ile muamele edilmiş hücreler
- ✚ Fe⁺³NM + Trolox grubu: Bir saat Trolox (100 µM) uygulaması sonrası 24 saat Fe⁺³NM (70 µg/mL) ile muamele edilmiş hücreler
- ✚ Rotenon + Trolox grubu: Bir saat Trolox (100 µM) uygulaması sonrası 24 saat rotenon (10 µM) ve ile muamele edilmiş hücreler

3.4. L-DOPA ile İndüklenmiş NM Deney Modeli Oluşturulması

Tez kapsamında, sentetik NM ile indüklenmiş deney modelinin yanı sıra hücre içinde NM sentezinin tetiklendiği deney modeli oluşturulması planlanmıştır. Buna göre sırasıyla;

- ✓ L-DOPA uygulaması sonrası hücrede nöromelanin oluşumu takip edilmiş,
- ✓ Hücre içinde oluşan NM'nin hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiştir.

L-DOPA ile indüklenmiş NM modeli oluşturmadan önce SH-SY5Y hücreleri retinoik asit (RA) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ile muamele edilmiştir. Endojen retinoid metaboliti olan RA, iskelet miyoblastları ve nöroblastlar gibi çeşitli hücrelerde farklılaşmayı indükler. SH-SY5Y hücreleri RA ile muamele edildiğinde morfolojilerinde değişimler meydana gelir ve nörit oluşumu gözlenir. Farklılaşma sırasında hücreler; nörofilamentleri, muskarinik ve sinir büyüme faktörü reseptörlerini eksprese etmeye başlar (Xun vd., 2012).

%80-%90 doluluk oranına ulaşan hücreler pasajlandıktan 24 saat sonra kültür ortamında hazırlanmış 10 µM all-trans RA ile 5 gün boyunca muamele edilmiştir. Bu süreçte kültür ortamı iki günde bir değiştirilmiştir. Süre sonunda RA'yı uzaklaştırmak için FBS içermeyen ortam ile hücreler üç kez yıkanmıştır. Ardından serum içermeyen kültür ortamında hazırlanmış 50 ng/mL BDNF 5 gün boyunca uygulanmıştır. Kültür ortamı iki günde bir değiştirilmiştir (Encinas vd., 2000; Xun vd., 2012). Retinoik asitle farklılaşma; olgun nöron belirteci mikrotübül ilişkili protein-2 (MAP-2) ve tirozin hidroksilaz (TH) protein ifadesinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi ile doğrulanmıştır.

Farklılaşmanın ardından aşağıdaki gruplar oluşturulmuş ve NM oluşumunu görüntülemek için ışık mikroskobu kullanılmıştır:

- ✚ Kontrol grubu: L-DOPA uygulanmamış hücreler
- ✚ L-DOPA ile indüklenmiş NM grubu: Hücrelere 100 µM L-DOPA uygulanmıştır. Hücre ortamı iki gün aralıkla ve üçte ikisi taze hazırlanmış 100 µM L-DOPA eklenmiş ortamla değiştirilmiştir. 30 gün boyunca düzenli olarak uygulamanın ardından; 2 ile 10 gün boyunca L- DOPA içermeyen taze kültür ortamı ile devam edilip iki günde bir ortam yenilenmiştir (Sulzer vd., 2008).
- ✚ L-DOPA grubu: 48 saat 100 µM L-DOPA uygulanmış hücreler. NM oluşan grupla karşılaştırmak amacıyla oluşturulmuştur.

3.5. Deney Modellerinde Ferroptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının ikinci aşamasında NM aracılığıyla tetiklenen ferroptoz, spesifik ferroptoz inhibitörleri varlığında ölçülerek değerlendirilmiştir. Bunun için aşağıdaki tablolarda (**Tablo 2,3,5,7,8**) yer alan gruplar ve herhangi bir uygulama yapılmamış hücre içeren gruplar (kontrol) oluşturulmuştur.

Hücreler analizi yapılacak parametreye göz önüne alınarak 6- veya 96-kuyucuklu kültür kaplarında sırasıyla 0.5×10^6 ve 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş, hücrelerin adhere olmasını takiben tabloda belirtilen ajanlarla veya NM ile hücreler 24 saat inkübe edilmiş; hücre canlılığı, 4-hidroksinonenal (HNE), malondialdehit (MDA), hidroperoksit kaynaklı reaktif türleri, GPX4, Acsl4 ve hücre içi demir düzeyi ölçümü yapılmıştır.

Bu gruplar ferroptoz aktivatörü ajan (erastin) uygulanmış hücrelerle karşılaştırılmıştır.

Hücre ölümü tipi spesifik inhibitörler [ferroptoz için ferrostatin-1 (Fer-1), otofaji için 3-metiladenin (3-MA), nekroptoz için nekrostatin-1, apoptoz için Z-VAD-FMK] varlığında değerlendirilmiştir.

NM'lerin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi lipid peroksidasyon önleyici ajan (liproksatin-1) varlığında ve erastin ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

NM'lerin GPX4, Acsl4, GSH düzeyleri üzerine etkisi çeşitli ferroptoz inhibitörleri (ferrostatin-1, liproksatin-1) varlığında ölçülmüş ve ferroptoz aktivatörü ajan (erastin) ile karşılaştırılmıştır.

NM'lerin hücre içi demir düzeylerine etkisi demir şelatörü (deferoksamin) varlığında ve ferroptoz aktivatörü ajanla (erastin) karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.5.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Farklı hücre ölüm tipleri sentetik NM'lerin uygulandığı hücrelerde spesifik inhibitörler varlığında değerlendirilmiştir. Bunun için **Tablo 2**'de yer alan gruplar oluşturulmuş ve 24 saat uygulamanın ardından hücre canlılığı MTS/PMS testi ile ölçülmüştür.

Tablo 2. Hücre ölüm tiplerinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar

	Ferroptozun değerlendirilmesinde kullanılan gruplar	Nekroptozun değerlendirilmesinde kullanılan gruplar	Apoptozun değerlendirilmesinde kullanılan gruplar	Otofajinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar
Erastin	Erastin + Ferrostatin-1			
ifNM	ifNM + Ferrostatin-1	ifNM + Nekrostatin-1	ifNM + Z-VAD-FMK	ifNM + 3-MA
Fe ⁺³ NM	Fe ⁺³ NM + Ferrostatin-1	Fe ⁺³ NM + Nekrostatin-1	Fe ⁺³ NM+Z-VAD-FMK	Fe ⁺³ NM + 3-MA
Rotenon	Rotenon + Ferrostatin-1	Rotenon + Nekrostatin-1	Rotenon + Z-VAD-FMK	Rotenon + 3-MA

Uygulanan konsantrasyonlar: ifNM (1/2IC₅₀, IC₅₀, 2xIC₅₀), Fe⁺³NM (1/2IC₅₀, IC₅₀, 2xIC₅₀), Ferrostatin-1 (5 µM), Erastin (30µM), Nekrostatin-1 (50µM) (Ma vd, 2016), Z-VAD-FMK (20µM) (Pyszko & Strosznajder, 2014), 3-MA (5mM) (McFarland vd., 2013) Rotenon (10 µM).

Ferrostatin-1 bilinen en güçlü ferroptoz inhibitörü ajanlardan biridir. Bu ajan, RSL-3 ve erastin aracılı ferroptotik ölümü inhibe etmekte fakat rotenon, H₂O₂ gibi bileşikler ile apoptozu indükleyen ajanların etkilerini geri döndürememektedir (Dixon vd., 2012). Bu nedenle ferroptozun değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Rotenon ferroptotik ölüme neden olmadığı için Fer-1 varlığında dahi farklı mekanizmalarla hücre ölümüne katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Bu sebeple rotenon grubu karşılaştırma grubu olarak ilave edilmiştir. Nekrostatin-1 nekrotik hücre ölümünü bloke eden bir ajandır (Vandenabeele vd., 2013). Z-VAD-FMK (karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-florometilketon), kaspaz proteazlarının katalitik bölgesine irreversibl bağlanan ve apoptozu inhibe eden bir kaspaz inhibitörüdür (Neumar vd., 2003). 3-metiladenin (3-MA), Sınıf III PI3K inhibitörü, otofajiyi seçici olarak bloke etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Heckmann vd., 2013).

3.5.2. Lipid Peroksidasyon Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde **Tablo 3**'te belirtilen gruplar oluşturulmuş ve 24 saat uygulamanın ardından hidroperoksit kaynaklı reaktif türler, 4-HNE ve MDA ölçümü yapılmıştır.

Tablo 3. Lipid peroksidasyon ürünlerinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar

Ferroptoz İndüklenen Gruplar	Lipid Peroksidasyon Önleyici Ajan Uygulanan Gruplar
ifNM	ifNM + Liproksatin-1
Fe ⁺³ NM	Fe ⁺³ NM + Liproksatin-1
Erastin	Erastin+ Liproksatin-1

Uygulanan konsantrasyonlar: ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), Erastin (30µM), Liproksatin-1 (50nM)

3.5.2.1. MDA Düzeylerinin Ölçümü

MDA düzeyi TBARS kolorimetrik kit kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre ölçülmüştür. Uygulamaların ardından toplanan hücreler hücre lizis tamponu ile homojenize edilmiştir. Hücre homojenatları (100 µL) ependorflara alınarak kit içeriğindeki 100 µL SDS ve 800 µL renk çözeltilisi ile karıştırılıp blok ısıtıcıda 95°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler buza alınmış ve 4°C 1600xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan renk değişimi 553 nm'de kolorimetrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyon değerlendirilmiştir. Yedi farklı konsantrasyonda (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50 µM) hazırlanan MDA standartları kullanılarak hazırlanan standart eğri grafiği ve denklemi yardımıyla örneklerdeki MDA konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.5.2.2. Hidroperoksit Kaynaklı Reaktif Türlerin Ölçümü

Lipid peroksidasyon, hidroperoksit kaynaklı reaktif türlere duyarlı boya C11-BODIPY 581/591 ile floresan mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulamaların ardından hücrelerden besi yeri uzaklaştırılarak yerine 1 µM C11- BODIPY 581/591 içeren taze besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler 30 dakika 37°C'de inkübasyonun ardından ortam uzaklaştırılıp 3 defa 1X PBS ile yıkanarak floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

3.5.2.3. 4-HNE Kantifikasyonu

4-HNE düzeyi 4-HNE-modifiye protein aracılığıyla ilgili primer antikör (anti-4-HNE-modifiye protein; 1:1000) kullanılarak Western Blot yöntemi ile tayin edilmiştir.

3.5.2.3.1. Western Blot Yöntemi

Gruplar oluşturulduktan sonra hücreler toplanmış, protein miktar tayini sonrası sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile proteinler jelde ayrılmış, Western Blot yöntemiyle ilgili antikörler kullanılarak proteinlerin analizi gerçekleştirilmiştir (Armagan vd., 2019). Toplanan hücreler proteaz inhibitör kokteyli içeren homojenizasyon tamponu ile soğukta homojenize edilmiştir. 15000xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj sonrası ayrılan supernatanlar protein miktar tayini için kullanılmıştır. Toplam protein düzeyi bikinkoninik asit (BCA) kiti kullanılarak 562 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda yapılmıştır. Proteinlerin elektroforez işlemi ile ayrılması için %10 ayırıcı jel ve %4'lük paketleyici jel hazırlanmıştır. Örnekler her biri 20 µg protein içerecek şekilde yükleme tamponuyla birlikte 95°C'de 5 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklara yüklenip paketleyici jeli geçene kadar 40 V'ta, ayırıcı jeli geçene kadar 150 V'ta yürütülmüştür. Proteinlerine ayrılan örnekler PVDF membrana transfer edilmek üzere transfer tankına alınmıştır. Transfer işlemi +4°C'de 200 mA'de 1.5 saat yapılmıştır. Membran primer antikör içeren çözelti (1:1000) ile bir gece boyunca +4°C'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Tez kapsamında kullanılan primer antikörlerin listesi **Tablo 4**'te verilmiştir. Membran 3 kez onar dakika 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır. HRP enzimi ile işaretlenmiş sekonder antikörler ile inkübe edilen membranların görüntülenmesi için kemilüminesans substratı kullanılmıştır. Fazla solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra membran protein kısmı yukarı bakacak şekilde Vilber Lourmat Fuxion-FX7 görüntüleme cihazı ile kemilüminesans görüntülemesi yapılmıştır. İlgili proteinlere ait bantlar dansitometrik olarak değerlendirilerek referans proteine (β -aktin) oranlanıp sayısal olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4. Western Blot yönteminde kullanılan primer antikolar

Anti GPX4 antikoru	Anti Acsl4 antikoru	Anti Tirozin hidroksilaz
Anti Transferrin reseptör 1 antikoru	Anti Ferritin antikoru	Anti IREB 2 antikoru
Anti Ferroportin antikoru	Anti 4-HNE antikoru	Anti MAP2

3.5.3. GPX4 ve Acsl4 Düzeylerinin Ölçümü

GPX4 kompleks hidroperoksitleri indirger ve böylece lipid peroksidasyonunun önüne geçer (Seibt vd, 2019). Bu nedenle GPX4 ferroptozda belirteç olarak kullanılmaktadır. Acsl4 ise hücre membranında daha fazla PUFA'ların kalmasını sağlayan bir enzimdir. Acsl4 geninin proferroptotik gen olduğu belirlenmiştir (Doll vd., 2017). Sentetik NM modelleri uygulaması sonrası hücrelerdeki GPX4 ve Acsl4 mRNA düzeyi real-time PCR yöntemi ile; protein düzeyi 3.5.2.3.1'de belirtildiği şekilde Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Ölçüm için **Tablo 5**'teki gruplar oluşturulmuştur.

Tablo 5. GPX4 ve Acsl4 düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar

Ferroptoz İndüklenen Gruplar	Ferroptoz İnhibitörü Uygulanan Gruplar	Lipid Peroksidasyon Önleyici Ajan Uygulanan Gruplar	Demir Bağlayıcı Ajan Uygulanan Gruplar
Erastin	Erastin + Fer-1	Erastin + Lip-1	Erastin + DFO
ifNM	ifNM + Fer-1	ifNM + Lip-1	ifNM + DFO
Fe ⁺³ NM	Fe ⁺³ NM + Fer-1	Fe ⁺³ NM + Lip-1	Fe ⁺³ NM + DFO

Uygulanan konsantrasyonlar: ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), Erastin (30µM), Liprostatin-1 (50nM), Ferrostatin-1 (5 µM), DFO (100 µM) (Dixon vd., 2012).

3.5.3.1. mRNA Analizi

Total RNA izolasyonu için Epicentre MasterPure RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. RNA konsantrasyonu, 260 nm'de absorbansları ölçülerek hesaplanmıştır. RNA izolasyonunun kalitesi ve saflığının belirlenmesinde A260/A280 oranı kullanılmıştır. RNA içeriği 1 µg/µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltilmiştir. Ardından cDNA sentez kiti kullanılarak revers transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezlenmiştir. Öncelikle örnekler 70°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmış, daha sonra reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve dNTP karışımı ilave edilmiştir. Primerin RNA kalıbındaki uygun bölgelere bağlanması amacıyla 25°C'de 5 dakika

inkübe edilmiştir. M-MuLV revers transkriptaz enzimi ilave edilerek PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Örnekler 42°C’de 1 saat, 94°C’de 7 dakika olacak şekilde termal döngü cihazında bekletilmiştir. Böylece 42°C’de 1 saat RNA’lar revers transkriptaz enzimi yardımı ile cDNA’ya dönüştürülmüştür. 94°C’de 7 dakika süreyle ortamdaki revers transkriptaz enzimi inaktive edilmiştir. Oluşan cDNA örnekleri -20°C’de saklanmıştır. İlgili genlere ait PCR ürününün miktarını saptamak üzere bir önceki basamakta sentezlenen cDNA’ların sekans-spesifik primerlerin yardımıyla amplifiye edilmesi planlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri (**Tablo 6**) web tabanlı Primer3 programı ile belirlenmiştir (Untergasser vd., 2012). Primerlerin her biri 15 pmol olacak şekilde hazırlanmıştır. GAPDH internal standart olarak kullanılmıştır.

Tablo 6. Real time PCR yönteminde kullanılan primerler

Gen	NCBI Referans Kodu	Baz çifti	İleri Primer	Geri Primer
<i>Gpx4</i>	NM_001039848.4	226	GAATGTCCCAA GTCCCAGGA	GCAAACCACACT CAGCGTAT
<i>Acs14</i>	NM_022977.3	249	GGTGGTTTTGC ACTGGTGAT	CCCCTTTCTGTTG TGCCAAA
<i>DMT-1</i>	NM_001174129.2	195	AAGCCACCTCTC AGCAGAAT	GCCCAGTTCAAC TTTGCTGA
<i>Ferroportin</i>	NM_014585.6	177	TACTTGTGCCTC CCAGATGG	ATGGAACCACTC AGTCCCTG
<i>Ferritin</i>	M97164.1	167	ACTTTGACCGCG ATGATGTG	GCTCTCCAGTC ATCACAGT

Real-time PCR yöntemi ile mRNA analizi için SYBR Green kiti kullanılmıştır. PCR tüpüne seyreltilmiş cDNA, ileri ve geri primerler (15 pmol), nükleaz içermeyen su, master mix eklenmiştir. Başlangıç denatürasyonu 95°C’de 5 dakika ve bunu takiben toplam 40 döngü; 95°C’de 10 saniye denatürasyon, 60°C’de 20 saniye bağlanma ve 72°C’de 10 saniye zincir uzaması gerçekleşecek şekilde PCR programı oluşturulmuştur. Örneklerle birlikte cDNA yerine nükleaz içermeyen suyun kullanıldığı negatif kontroller kullanılmıştır. Böylece hedef genin spesifik amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak izlenmesi (Light Cycler® 480, Roche) ve nicel analizinin yapılması mümkün olmuştur. PCR ürünlerinin varlığı ve saflık kontrolleri erime eğrisi analizleriyle yapılmıştır. Erime eğrisi analizi için 40. döngünün sonuna 95°C’de 1 dakika, 55°C’de 30 saniye ve 95°C’de 30 saniye olacak şekilde bir

segment daha eklenmiştir. Real-time PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kantifikasyonu için “Komperatif $\Delta\Delta CT$ ” yöntemi kullanılmıştır (Livak & Schmittgen, 2001).

3.5.4. GSH Seviyesinin Ölçümü

GSH düzeyi **Tablo 5**'teki gruplarda ve GSH Assay kit kullanılarak kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Kit içeriğinde bulunan GSH standart çözeltisi protokole göre hazırlanmıştır. Hücre homojenatları kit içeriğindeki 1 nolu çözelti ile 1:1 oranında seyreltilmiş ve 4500xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatant ile deneye devam edilmiştir. Süpernatantlarda protein miktar tayini yapılmıştır. GSH analizi için süpernatantlardan 100 μL başka bir tüpe alınıp sırasıyla kit içeriğinde bulunan 2 nolu çözeltilerden 125 μL , 3 nolu çözeltilerden 25 μL ve 4 nolu çözeltilerden 5 μL eklenmiştir. Ardından örnekler 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda renk değişimi 420 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmüştür. GSH düzeyi, mg GSH/g protein olarak hesaplanmıştır.

3.5.5. Hücre İçi Demir Düzeyinin Ölçümü

Hücre içi demir düzeyi **Tablo 7**'de belirtilen gruplar oluşturulup Iron Assay Kit kullanılarak tayin edilmiştir. Uygulamaların ardından toplanan hücreler hücre lizis tamponu ile homojenize edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan standart çözelti protokole göre hazırlanmıştır. Hücre homojenatlarından 10'ar μL alınıp 96 kuyucuklu plakaya eklenmiş, her bir kuyucuk kit içeriğindeki ölçüm tamponu ile 100 μL 'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dk ışıktan korunarak bekletilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa 100'er μL kit içeriğindeki Iron Probe çözeltisi eklenerek 60 dk oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda, kuyucuklardaki renk değişimi 593 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

Tablo 7. Hücre içi demir düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılan gruplar

Ferroptoz İndüklenen Gruplar	Demir Bağlayıcı Ajan Uygulanan Gruplar
Erastin	Erastin + DFO
ifNM	ifNM + DFO
Fe ⁺³ NM	Fe ⁺³ NM + DFO

Uygulanan konsantrasyonlar: ifNM (50 $\mu g/mL$), Fe⁺³NM (70 $\mu g/mL$), Erastin (30 μM), DFO (100 μM) (Dixon vd., 2012)

3.5.6. Hücre İçi Demir Tutulumunda Görevli Proteinlerin Ölçümü

Demir metabolizmasının ferroptozla ilişkisi bilindiği için sentetik NM uygulanmış hücrelerde hücre içi demir düzeylerinin kontrolünde görevli bir dizi protein (transferrin reseptör 1, ferritin, ferroportin, IREB-2, DMT1) mRNA ve protein açısından değerlendirilmiştir. **Tablo 8**'de belirtilen gruplar ve herhangi bir uygulama yapılmamış hücre içeren gruplar (kontrol) oluşturulmuştur. mRNA analizi 3.5.3.1.'de belirtilen şekilde real-time PCR yöntemi ile; protein analizi 3.5.2.3.1.'de belirtilen şekilde Western Blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8. Hücre içi demir tutulumunun değerlendirilmesinde kullanılan gruplar ve ölçümü yapılan parametreler

Ferroptoz İndüklenen Gruplar	Demir Bağlayıcı Ajan Uygulanan Gruplar	Ölçümü Yapılan Proteinler	Ölçümü Yapılan Genler
Erastin	Erastin + DFO	TfR1 Ferritin Ferroportin IREB-2	Ferritin Ferroportin DMT1
ifNM	ifNM + DFO		
Fe ⁺³ NM	Fe ⁺³ NM + DFO		

Uygulanan konsantrasyonlar: ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), Erastin (30µM), DFO (100 µM) (Dixon vd., 2012)

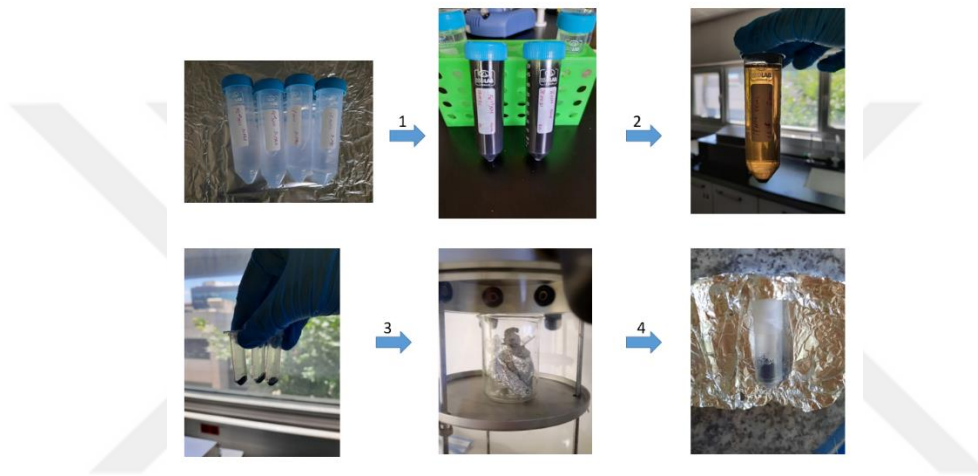
3.5.7. İstatistiksel Değerlendirme

Deney gruplarında her grup en az üçerli ve en az üç tekrarlı çalışılmıştır. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 4.03 for Windows Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA) bilgisayar yazılımı ile yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığı iki grup arasında Student's t-testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde çoklu karşılaştırmalarda çok değişkenli varyans analizleri (tek yönlü ANOVA) kullanılmıştır. Değişkenler arasında bir etkileşim saptandığında Post-Hoc Test olarak Tukey's testi uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki fark p<0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edilmiştir.

4. Bulgular

4.1. Demir İyonu İçermeyen (ifNM) ve Demir İyonu İçeren ($Fe^{+3}NM$) Nöromelanin Sentezi

Sentetik NM (demir iyonu içermeyen ifNM ve demir iyonu içeren $Fe^{+3}NM$) süspansiyonları 3.3.1. ve 3.3.2.'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve vakum altında kurutulup ışıktan korunarak muhafaza edildi (Şekil 4).



Şekil 4. Sentetik NM (ifNM ve $Fe^{+3}NM$) hazırlık aşamaları ve eldesi

4.2. Sentetik NM'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

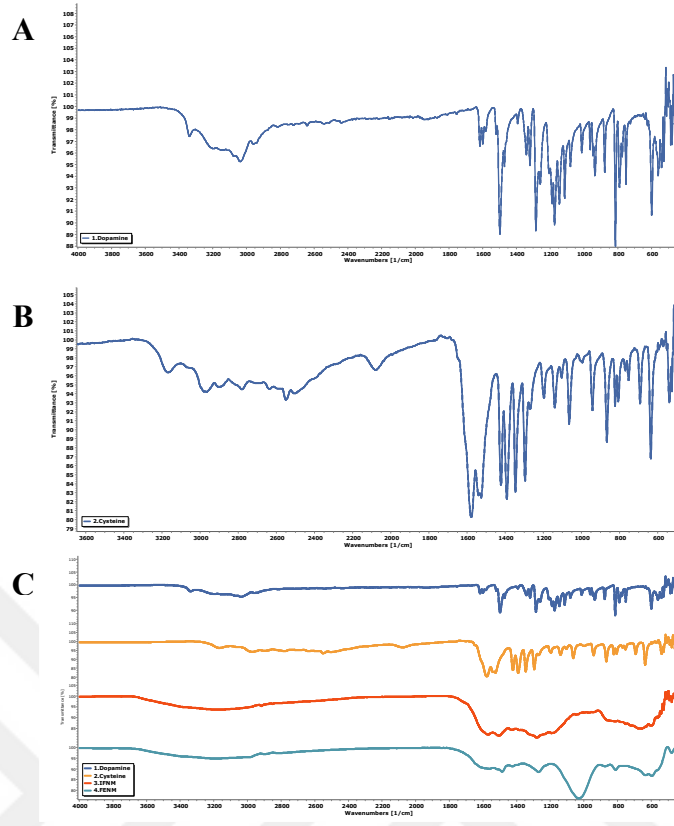
NM'lerin sentez aşamasında kullanılan DA ve Cys ile yapıları değerlendirilmek ve karşılaştırılmak amacıyla FT-IR deneyleri yapıldı (Şekil 5). DA'nın IR spektrumları dikkate alındığında; NH, OH ve C-O gerilme bantları sırasıyla 3338, 3202, 1284 cm^{-1} 'de gözlenirken, NH ve OH bükülme bantları sırasıyla 1616 ve 1393 cm^{-1} 'de tespit edildi (Şekil 5A). SH, C=O, C-O, NH'nin gerilme bantları ve OH ve NH gruplarının bükülme bantları sırasıyla 2550, 1576, 1295, 3170, 1421, 1525 cm^{-1} 'de gözlenerek sistein için doğrulayıcı olarak bulunmuştur (Şekil 5B).

ifNM'nin IR spektrumları dikkate alındığında; Cys için gözlenen SH germe bandı, SH grubunun benzotiazin halkası oluşumuna katılmasıyla ortadan kayboldu. Öte yandan DA ve Cys için gözlenen NH bükülme bantları, polimerizasyon işlemi sırasında halka oluşumu nedeniyle 1505 cm^{-1} 'e kaymıştır. ifNM'nin IR spektrumlarında; karboksilik

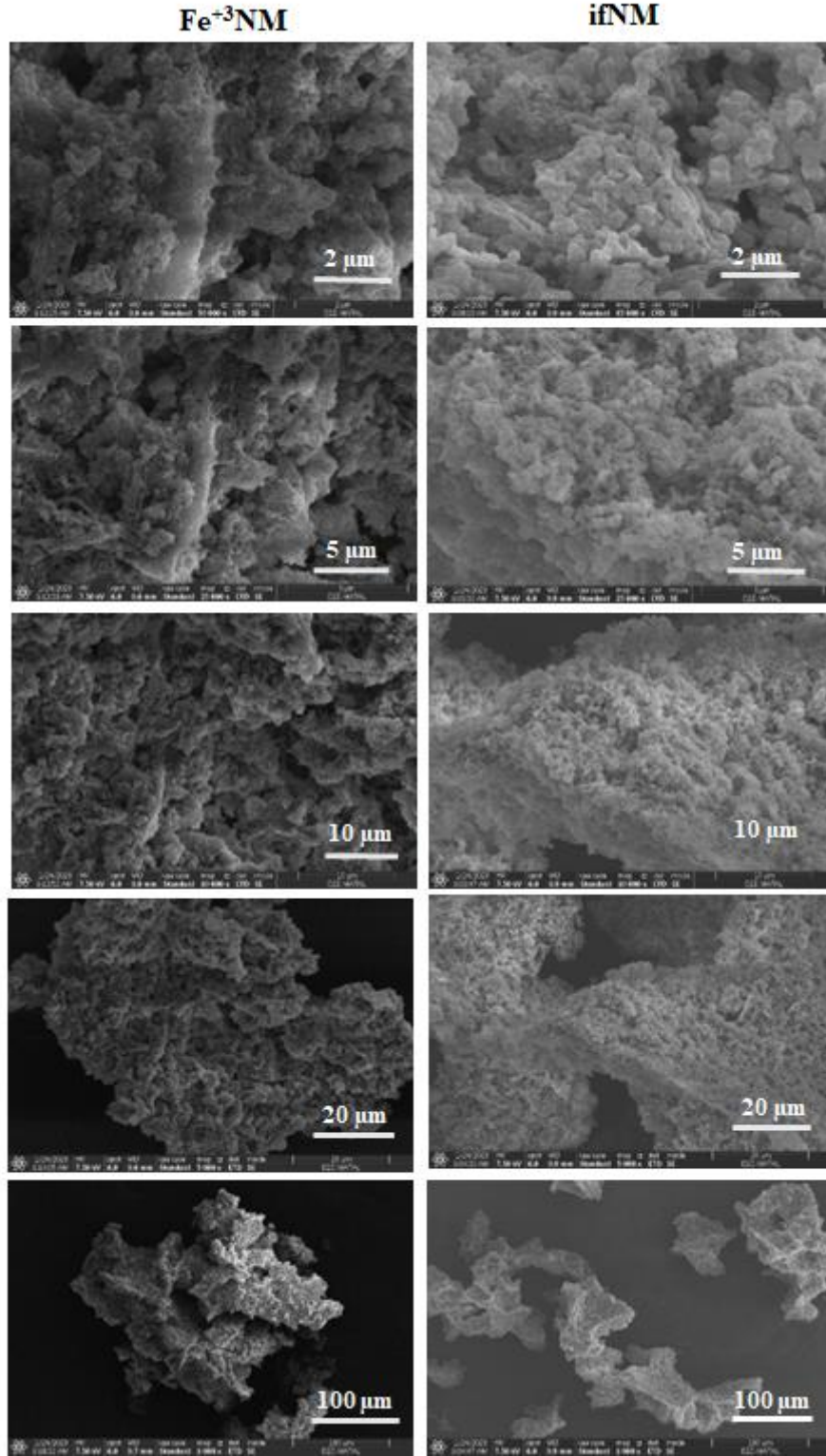
asit için C=O germe bantları ve düzlem dışı bükülme bantları, sistein için gözlemlenen bantlara kıyasla daha düşük frekanslara (1571 ve 1427 cm^{-1}) kaymıştır. Son olarak, NH ve OH gerilme bantları 3189 cm^{-1} 'de geniş bir bant olarak gözlenmiştir (**Şekil 5C**).

Fe^{+3}NM 'nin IR spektrumları dikkate alındığında; NH ve OH gerilme bantları, NM'de olduğu gibi 3200 cm^{-1} civarında geniş bir bant şeklinde gözlemlendi. ifNM'de gözlemlendiği gibi, Fe^{+3}NM spektrumunda fenolik OH gruplarına ait germe bantları çok zayıf olmasına rağmen, C-O germe bandı ifNM'de gözlemlenen bantlara göre daha düşük frekansa (1270 cm^{-1}) kaymıştır. Ancak Fe^{+3}NM spektrumlarında, karboksilik asit için C=O gerilme bantları, bantlara kıyasla daha düşük frekanslara (1561 cm^{-1}) kayarken, OH düzlem dışı bükülme bantları daha yüksek frekanslara (1486 cm^{-1}) doğru hareket etmiştir. Bu sonuç, karboksilik asit grubunun demir iyonu ile etkileşimine atfedilebilir (**Şekil 5C**).

DA, Cys ve ifNM spektrumlarında sırasıyla 1080, 1064 ve 1047 cm^{-1} 'de tespit edilen zayıf bantlar C-N bandının bükülmesine bağlanabilir. İlginç olarak, Fe^{+3}NM spektrumunda aynı bandın yoğunluğunun güçlenip, genişleyip ve daha düşük frekansa (1030 cm^{-1}) kayması, indol halkası ile demir iyonu arasındaki olası etkileşimi göstermiştir (Bridelli, Tampellini ve Zecca, 1999).



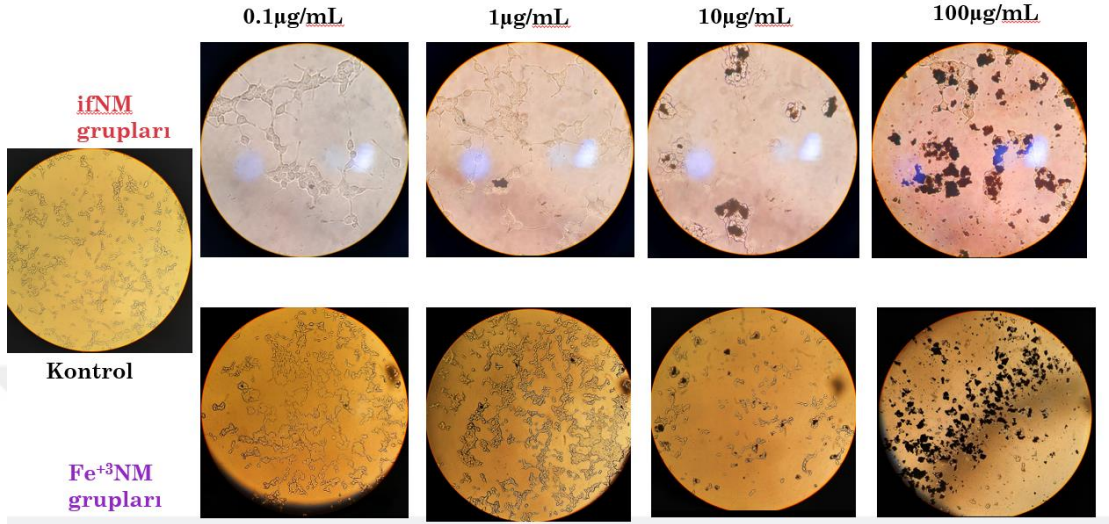
Şekil 5. Sentetik NM'lerin (ifNM ve Fe⁺³NM) (C) yapısal benzerliklerini karşılaştırmak üzere dopamin (A) ve sistein (B) ile FT-IR analizlerinin sonuçları.



Şekil 6. Sentetik NM'lerin (ifNM ve $Fe^{+3}NM$) SEM görüntüleri.

4.2. Sentetik Nöromelaninlerin Hücre İçine Girişinin Gösterilmesi

Sentetik NM'ler (0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL) ile 48 saat muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde NM'lerin hücre içine girişi ışık mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 7).



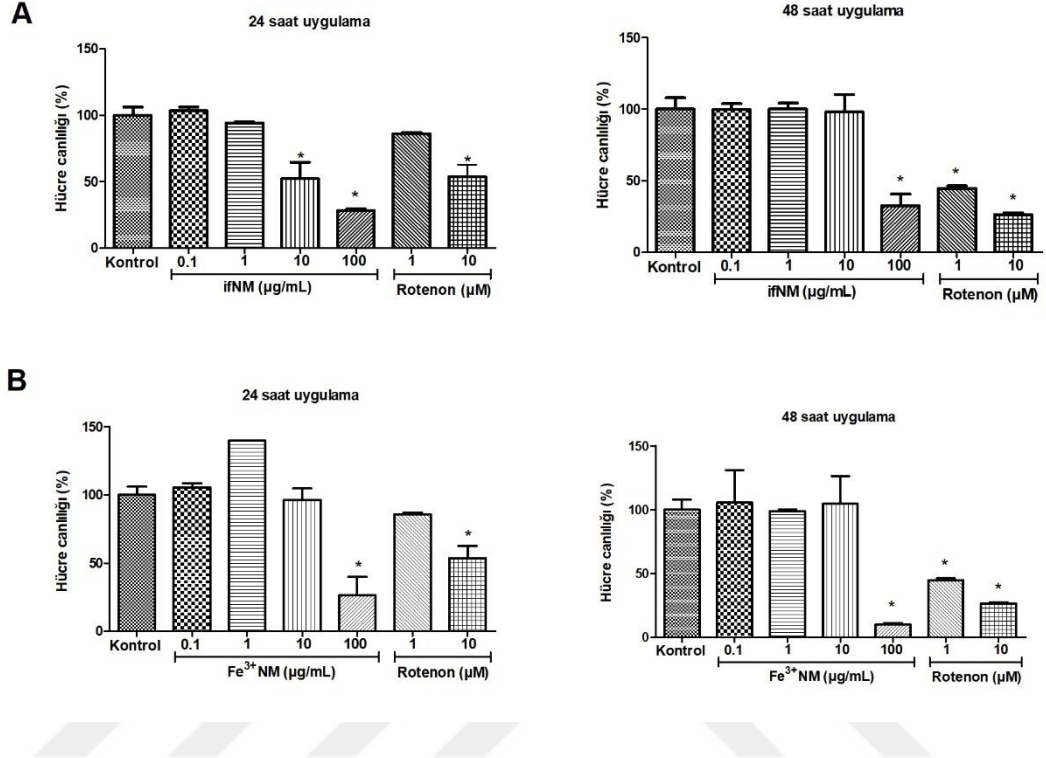
Şekil 7. Sentetik NM'lerin (ifNM ve Fe³⁺NM) 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonda SH-SY5Y hücrelerine 48 saat uygulanmasını takiben NM pigmentlerinin hücre içine alındığını gösteren ışık mikroskobu görüntüleri.

4.3. ifNM ve Fe³⁺NM için IC₅₀ Değerinin Hesaplanması

NM'lerin 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat boyunca hücrelerle muamele edilmesinin ardından NM'lerin hücre canlılığına etkisi araştırıldı. Hücre canlılığındaki değişim WST-1 testi ile ve hücre membranındaki harabiyet LDH testi ile belirlendi. Deney koşullarının doğrulanması için 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda rotenon uygulanan iki grup oluşturuldu. Rotenon dopaminerjik hücrelerde oksidatif stresi tetikleyerek hücre ölümüne sebep olan bir ajandır.

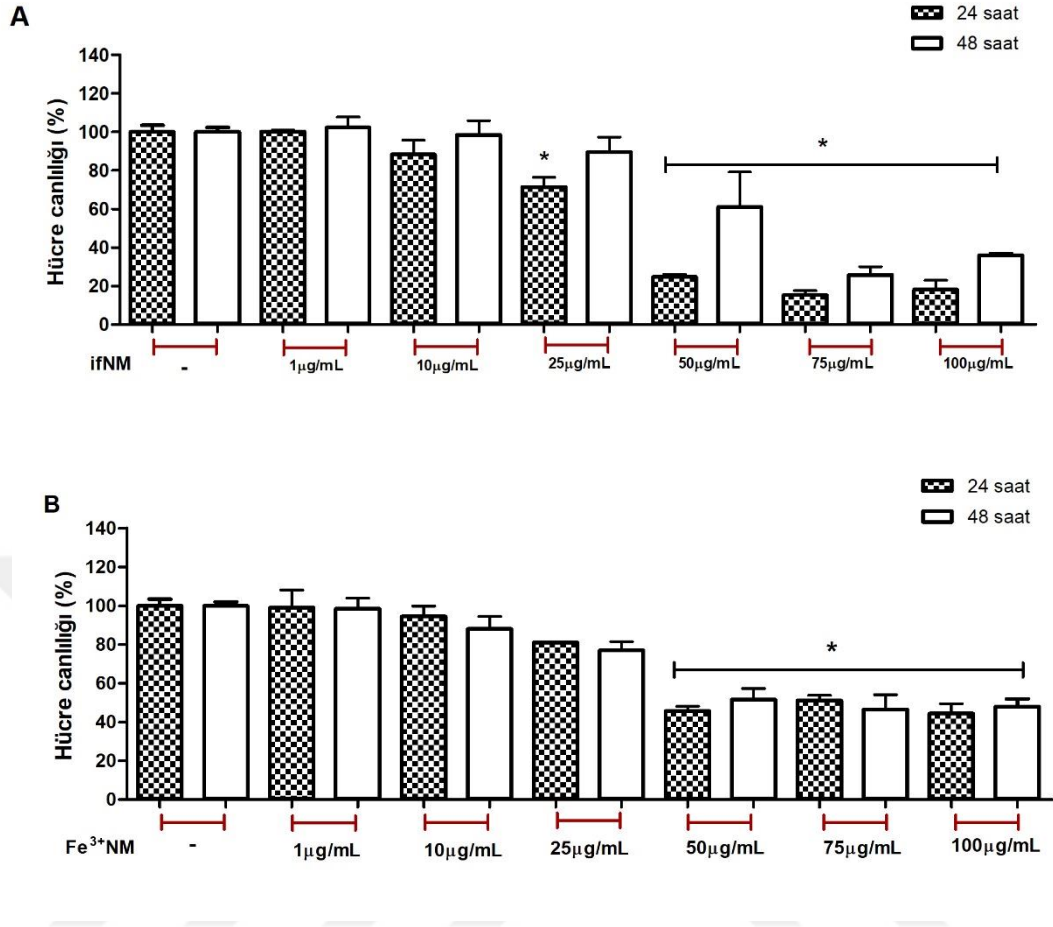
WST-1 testinden elde edilen verilere göre; her iki NM'nin 24 ve 48 saat sonunda 100 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltarak %50'nin altına düşürdüğü tespit edildi (*p<0.05). Ayrıca 24 ve 48 saat uygulama karşılaştırıldığında NM'ye maruziyet açısından hücre canlılığında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (Şekil 8). Yüksek konsantrasyon rotenon uygulamasının 24. saatte hücre canlılığını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli düzeyde azaltmasi belirlendi. Boylece hücrelerin nörotoksik ajan varliginda yanit olusturduğu dogrulanmış oldu.



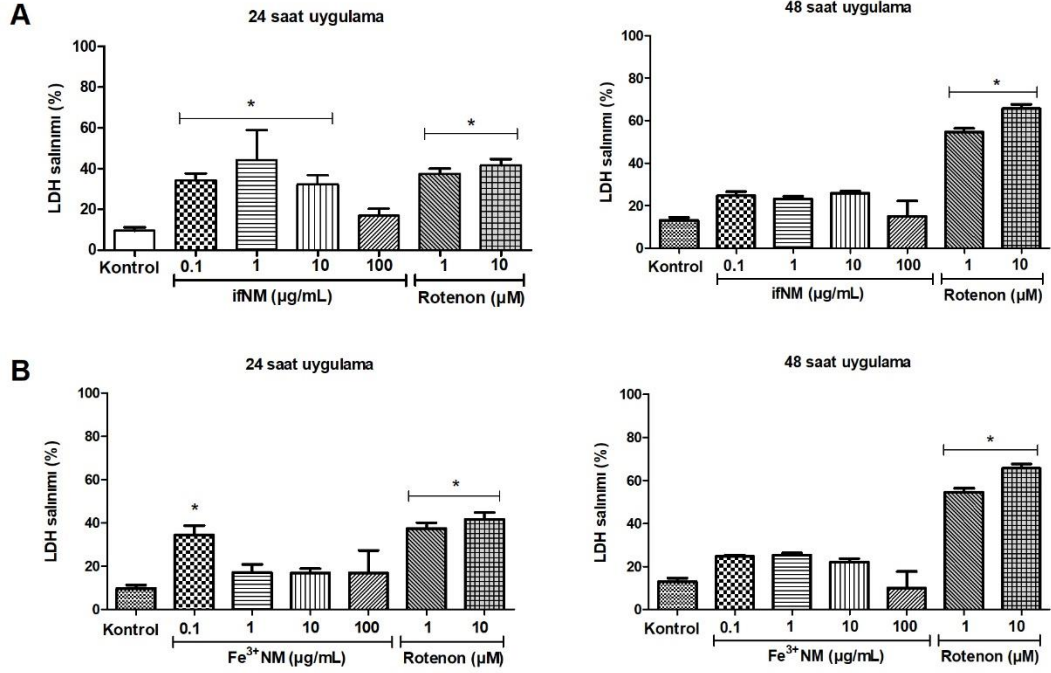
şekil 8. Sentetik NM'lerin (ifNM (A) ve Fe³⁺NM (B), 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL) ve rotenonun (1 ve 10 µM) SH-SY5Y hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanmasini takiben hücre canliligindaki değişim. *p<0.05; Gruplar vs. kontrol grubu.

NM'lerin IC₅₀ değerinin hesaplanmasi için hücre canlilik testleri tekrarlandi. Önceki hücre canlilik testi sonuçlarına göre NM'ler için IC₅₀ değerinin 10 ve 100µg/mL konsantrasyonları arasında olduğu belirlendi. Bunun üzerine çalışma konsantrasyonları 1, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL olacak şekilde yeniden düzenlenerek hücreler 24 ve 48 saat NM'ler ile inkübe edildi. Canlilik ölçümü WST-1 testi ile yapıldi. 24 saat ve 48 saat uygulanmış ifNM için IC₅₀ değeri sırasıyla 49,03 ± 4,61 ve 47,84 ± 4,53 µg/mL; Fe³⁺NM için 67,69 ± 3,13 ve 77,20 ± 2,59 µg/mL olarak hesaplandı (**şekil 9**).



Şekil 9. ifNM (A) ve Fe³⁺NM (B) 24 ve 48 saat uygulanması sonrası hücre canlılığındaki değişim. NM'ler 1, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonda SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır. *p<0.05; gruplar vs. diğer gruplar.

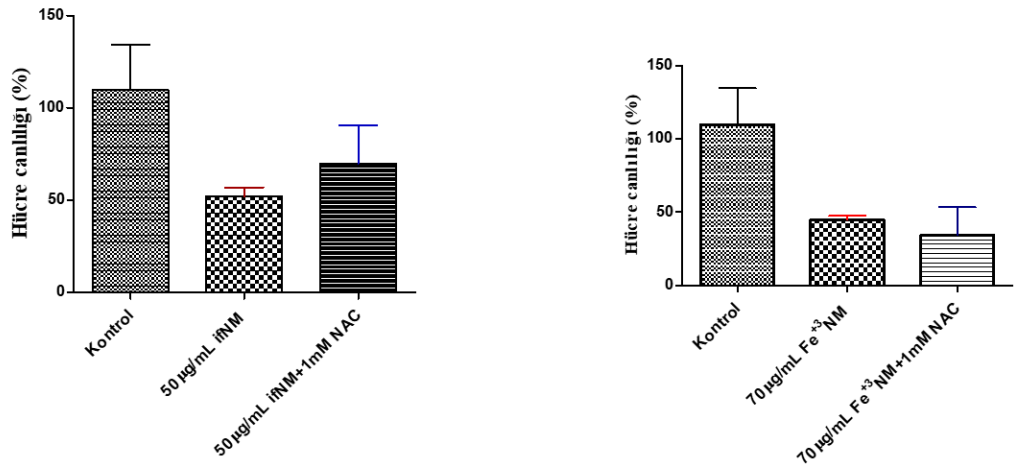
NM uygulaması daha önce belirlenen konsantrasyon (0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL) ve sürede (24 ve 48 saat) tekrarlanarak hücre membranı parçalanmasının belirteci olarak hücrelerden LDH salınımı ölçüldü. Buna göre 24 saat sonunda ifNM için 0.1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında; Fe³⁺NM için ise düşük konsantrasyon olan 0.1 µg/mL'de LDH salınımının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (p<0.05) (**Şekil 10**). Rotenon uygulamasıyla birlikte LDH salınımının her iki zaman aralığında ve her iki konsantrasyonda arttığı belirlendi.



Şekil 10. Sentetik NM'lerin (ifNM (A) ve Fe³⁺NM (B), 0,1, 1, 10 ve 100 µg/mL) ve rotenonun (1 ve 10 µM) SH-SY5Y hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanmasını takiben hücrelerden salınan LDH düzeyindeki değişim. *p<0.05; Gruplar vs. kontrol grubu.

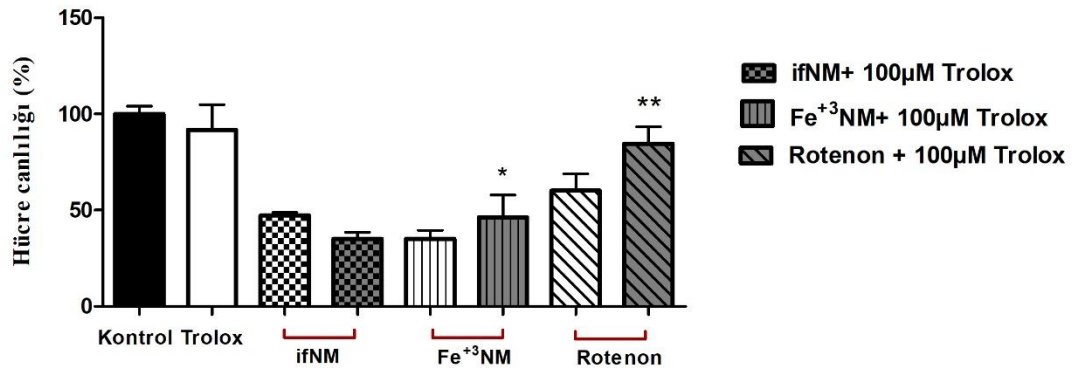
4.4. Antioksidan Varlığında ifNM ve Fe³⁺NM'nin Hücre Canlılığına Etkisinin Değerlendirilmesi

IC₅₀ değeri belirlenen sentetik NM'lerin antioksidan NAC ve trolox varlığında hücre canlılığına etkisi ölçüldü. NM uygulaması öncesinde hücreler 1 mM NAC veya 100 µM trolox ile 1 saat boyunca inkübe edildi. Ardından hücrelere 50 µg/mL ifNM veya 70 µg/mL Fe³⁺NM uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücre canlılığındaki değişim WST-1 testi ile ölçüldü. ifNM'nin sebep olduğu hücre ölümünün NAC varlığında engellendiği, hücre canlılığının tek başına ifNM uygulanan grupla karşılaştırıldığında NAC uygulanan grupta daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 11). NAC uygulamasının Fe³⁺NM aracılı hücre ölümünü ise engellemediği belirlendi.



Şekil 11. NAC (1 mM, 1 saat ön uygulama) varlığında sentetik NM'lerin (ifNM (50 µg/mL) ve Fe³NM (70 µg/mL) hücre canlılığına etkisi.

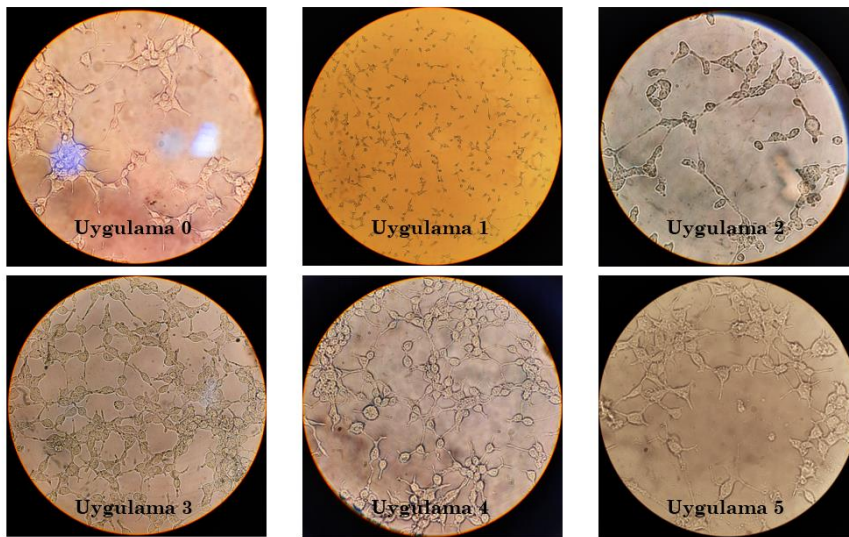
Diğer taraftan, Fe³NM'nin sebep olduğu hücre ölümünün trolox varlığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde engellendiği, hücre canlılığının trolox uygulanan grupta tek başına Fe³NM uygulanan grupla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05) (Şekil 12).



Şekil 12. Trolox (100µM, 1 saat ön uygulama) varlığında 24 saat ifNM (50 µg/mL) ve Fe³NM (70 µg/mL) uygulamasının hücre canlılığına etkisi. *p<0.05; Grup vs. tek başına Fe³NM uygulanan grup; **p<0.05; grup vs. tek başınan rotenon uygulanan grup.

4.5. SH-SY5Y Hücrelerinin Retinoik Asit ile Farklılaştırılması

L-DOPA ile indüklenmiş nöromelanin deney modeli oluşturulması kapsamında SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılması için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmaları için hücreler çoğaltıldıktan sonra 6 kuyucuklu kültür kaplarına 15×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek deney modeli kuruldu. Hücre ekiminden 24 saat sonra hücelere RA uygulaması yapıldı. RA ($10 \mu\text{M}$) %1 FBS içeren besi yerinde hazırlandı ve 5 gün boyunca hücelere uygulanması planlandı. Dördüncü gün, RA uygulamasının ardından hücelerde serum seviyesinin düşüklüğünden kaynaklı starvasyon ve stres gelişerek hücreler öldü. Bunun üzerine farklılaştırma protokolünde revizyon yapılarak RA ($10 \mu\text{M}$) %5 FBS içeren besiyerinde hazırlandı ve 5 gün boyunca hücelere uygulandı. Besi yeri iki günde bir yenilendi. Beşinci günün sonunda hücre ortamı serum içermeyen besi yerinde üç kez yıkanarak RA uzaklaştırıldı. Ardından serum içermeyen besi yerinde 100 ng/mL BDNF hazırlanarak 5 gün boyunca uygulama yapıldı. BDNF uygulamasının 2. gününde hücrelerin öldüğü tespit edildi. Bunun üzerine farklılaştırma protokolü tekrar revize edildi. Son değişikliklerle birlikte 5 gün boyunca %5 FBS içeren besi yerinde hazırlanmış $10 \mu\text{M}$ RA uygulandı. Besi yeri günden günde değiştirildi. Beşinci günün sonunda hücelerde nörit oluşumu gözlemlendi. Işık mikroskobu kullanılarak fotoğraf çekildi ve morfolojik farklılaşma takip edildi (Şekil 13).

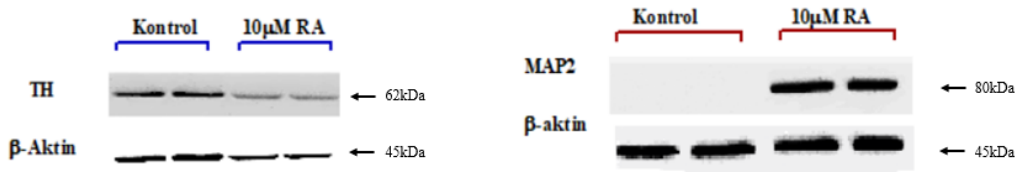


RA Uygulaması:

- ✓ $10 \mu\text{M}$ RA 5 gün boyunca hücelere uygulandı.
- ✓ Besiyeri iki günde bir değiştirildi.
- ✓ Uygulamalar ışıktan korunarak gerçekleştirildi.

Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerine $10 \mu\text{M}$ RA 5 gün boyunca uygulandıktan sonra hücelerdeki morfolojik değişimin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi

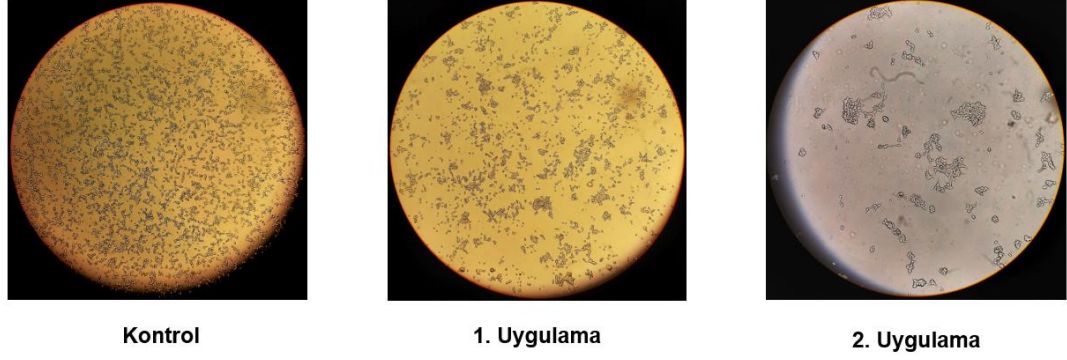
Mikroskopik incelemenin yanı sıra nöronal farklılaşma; nöron belirteçlerinden MAP2 ve dopaminerjik hücre belirteçlerinden TH ekspresyonunun gösterilmesiyle doğrulandı. Bunun için RA uygulamasının ardından hücreler toplandı ve protein analizi Western Blot yöntemi ile gerçekleştirildi. Dopaminerjik özelliğe sahip olduğu bilinen SH-SY5Y hücrelerinin RA uygulama öncesi ve sonrası TH protein ekspresyonunun değişmediği; RA uygulamasıyla birlikte hücrelerde MAP2 ifadesinin arttığı tespit edildi (**Şekil 14**).



Şekil 14. Beş gün boyunca 10µM RA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde TH ve MAP2 protein düzeyindeki değişim

4.6. Retinoik Asit ile Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerine Uzun Dönem L-DOPA Uygulaması

L-DOPA uygulaması ile indüklenmiş NM modeli için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Önçalışma için farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücreleri kullanıldı. Hücreler çoğaltılarak deney modeli oluşturuldu ve 24 saat sonra %10 FBS içeren besi yerinde hazırlanan 100 µM L-DOPA hücrelere uygulandı. Besi yeri iki gün aralıkla üçte ikisi taze hazırlanmış L-DOPA çözeltisi ile karıştırılarak hücrelere uygulandı. Üçüncü uygulamadan sonra hücrelerde artan proliferasyon sonucu stres meydana gelerek hücre kaybı yaşandı. Bunun üzerine literatür taraması yapılarak %5 FBS içeren besi yerinde L-DOPA hazırlanmasına karar verildi. Hazırlanan 100 µM L-DOPA hücrelere uygulandı; FBS miktarı azaltılmasına rağmen tekrar hücre kaybı söz konusu oldu. Bir sonraki aşamada farklılaştırılmış hücrelere %5 FBS içeren besi yerinde hazırlanan 100 µM L-DOPA uygulandı. Besi yeri iki gün aralıkla üçte ikisi taze hazırlanmış L-DOPA çözeltisi ile karıştırılarak hücrelere uygulandı. (**Şekil 15**).



Şekil 15. SH-SY5Y hücrelerine 100µM L-DOPA 6 gün boyunca 2 gün aralıklarla uygulanması sonucu meydana gelen stres

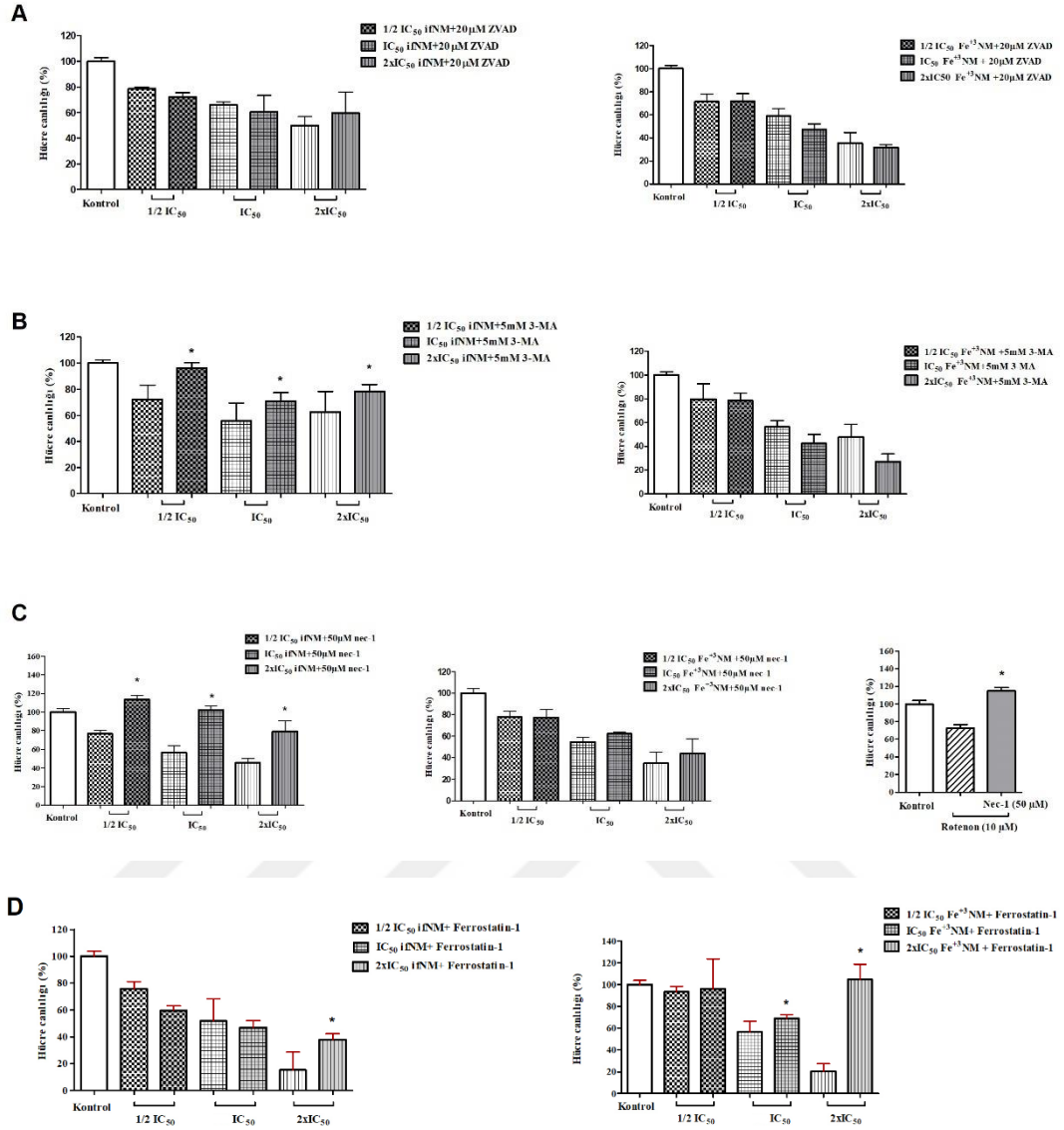
NM indüksiyonu için seçilen L-DOPA konsantrasyonunun değiştirilmesi amacıyla literatür taraması yapılarak uzun dönem L-DOPA uygulaması için kullanılacak doz 50 µM olarak belirlendi. Dopaminerjik özelliğe sahip olduğu bilinen SH-SY5Y hücre hattının RA uygulama öncesi ve sonrası TH protein ekspresyonunun değişmediği; RA uygulamasıyla birlikte MAP2 ekspre eden hücelere dönüştüğü daha önceki aşamalarda tespit edilmişti. Elde edilen sonuçlardan hareketle uzun dönem L-DOPA uygulamasında RA'nın olası hücrel etkilerinden kaynaklı sonuçları maskeleyememesi adına değişikliğe gidildi. Buna göre uygulama prosedürü 10 gün boyunca 250, 500 ve 1000 hücre/kuyu olacak şekilde güncellenerek ideal hücre sayısının tespiti için güncellendi. L-DOPA uygulaması sonrası stres kaynaklı hücre kayıpları yeniden gözlemlendi. Deney modelinin çeşitli sayı, konsantrasyon ve süre kombinasyonlarında denenmek suretiyle yeniden oluşturulması karşısında hücrelerde beklenen yanıt sağlanamadı. Tez kapsamında sentetik NM modelleri oluşturularak çalışmalara devam edilmesine karar verildi.

4.7. Sentetik Nöromelaninlerin Farklı Hücre Ölüm Tipleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Sentetik NM'lerin etkisinin farklı hücre ölüm tipleri açısından değerlendirilmesi kapsamında apoptoz inhibitörü Z-VAD-FMK (20 mM, 1 saat), otofaji inhibitörü 3-MA (5 mM, 1 saat), nekroptoz inhibitörü nekrostatin-1 (50 µM, 1 saat) ve ferroptoz inhibitörü ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) belirtilen sürede ön uygulama olacak şekilde hücelere uygulandı. Ardından hücreler sentetik NM'ler (1/2 IC₅₀, IC₅₀, 2xIC₅₀) ile 24 saat inkübe edilerek hücre canlılığındaki değişim ölçüldü (**Şekil 16**). Buna göre

sentetik NM'lerin hücrelerde apoptotik yolağa etki etmediği otofaji yolağına ise sadece ifNM'nin etki edebileceği gösterildi. ifNM uygulaması sonrasında azalan hücre canlılığının otofaji inhibitörü 3-MA ön uygulaması yapılmış ifNM gruplarında artış göstermesi ifNM'nin hücrelerde otofajiyi indüklemeye potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmüştür. Yanı sıra, nekrotoz inhibitörü nekrostatin-1 ön uygulaması yapılmış gruplardaki hücre canlılığının, tek başına ifNM uygulanmış gruplardaki hücre canlılığına kıyasla yüksek olması ifNM'nin hücrelerde nekrotik yolağa etki edebileceğini de göstermiştir. Ancak Fe⁺³NM varlığı hücrelerde anlamlı bir değışikliğe neden olmamıştır.

Ferroptozun değerlendirildiği gruplarda ise her iki NM tipinin tek başına uygulandığı gruplarda hücre canlılığı kontrole göre azalırken; özellikle ferostatın-1 ön uygulaması yapılmış ifNM'nin 2xIC₅₀ grubu ile Fe⁺³NM'nin IC₅₀ ve 2xIC₅₀ gruplarında hücre canlılığında artış gözlemlenmiştir. Buna göre ifNM'nin özellikle yüksek miktarlarda iken hücrelerde ferroptozu tetiklediği gözlenirken Fe⁺³NM IC₅₀ ve 2xIC₅₀ konsantrasyonlarda da etkili olarak hücreleri ferroptozu sürükleyebildiği tespit edilmiştir.

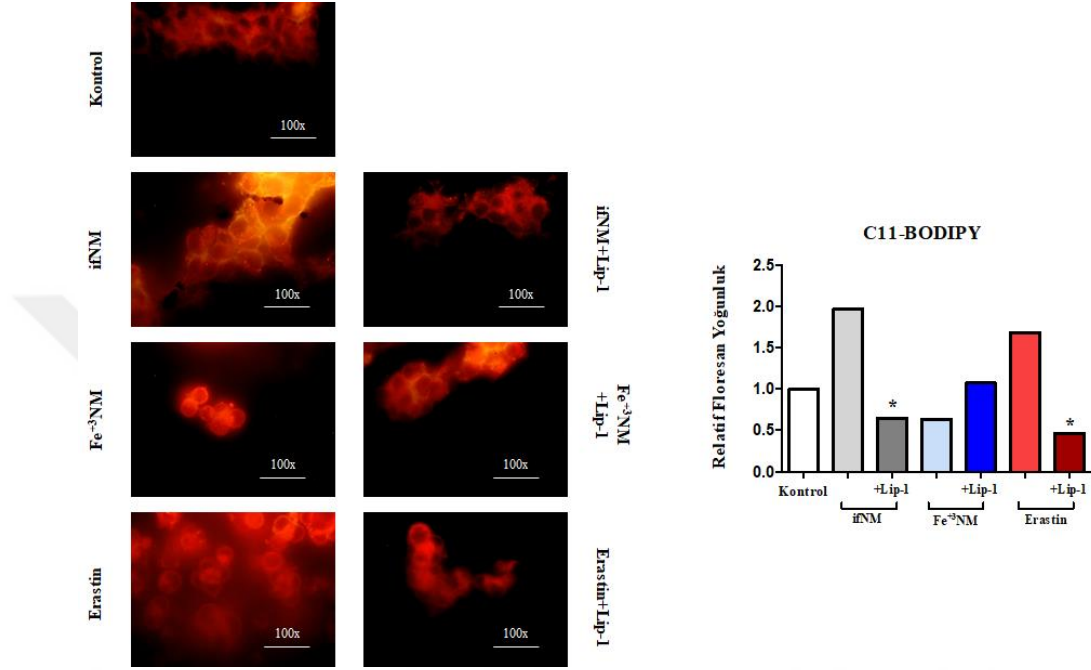


Şekil 16. Sentetik NM'lerin apoptoz (A), otofaji (B), nekroptoz (C) ve ferroptoz (D) üzerine etkisinin incelenmesi. Z-VAD-FMK (20µM, 1 saat), 3-MA (5mM, 1 saat), nekrostatin-1 (50µM, 1 saat) ve ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) hücelere uygulanmış, ardından hüceler NM (1/2IC₅₀, IC₅₀ ve 2xIC₅₀) ile 24 saat inkübe edilmiştir. *p<0.05; gruplar vs. tek başına NM uygulanan gruplar

4.8. Nöromelaninin Lipid Peroksidasyon Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi

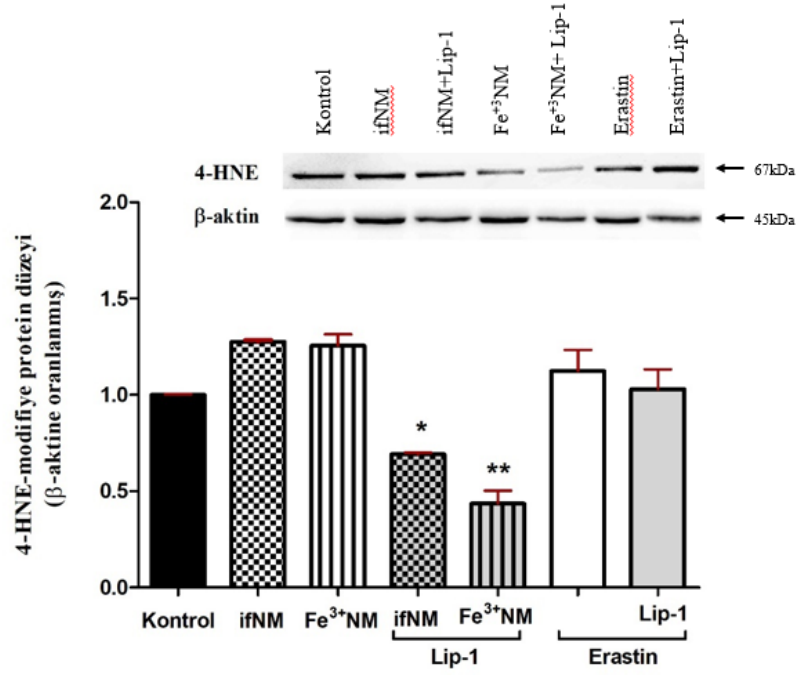
Sentetik NM'lerin lipid peroksidasyona etkisi değerlendirilirken lipid peroksidasyon inhibitörü liproksatin-1 (50 nM) varlığında sentetik NM'ler ve pozitif kontrol grubu olarak erastin hücelere uygulandı.

Lipid hidroperoksit ürünlerini tespit etmek üzere hidroperoksit kaynaklı reaktif türlerle duyarlı boya C11- BODIPY 581/591 kullanılarak floresan mikroskopta lipid peroksidasyonu değerlendirildi. Buna göre ifNM ve erastin uygulanan hücrelerde floresan yoğunluğunun kontrol grubuna göre fazla olduğu; liprostatin-1 uygulamasıyla birlikte bu gruplarda yoğunluğun azaldığı tespit edildi (Şekil 17).



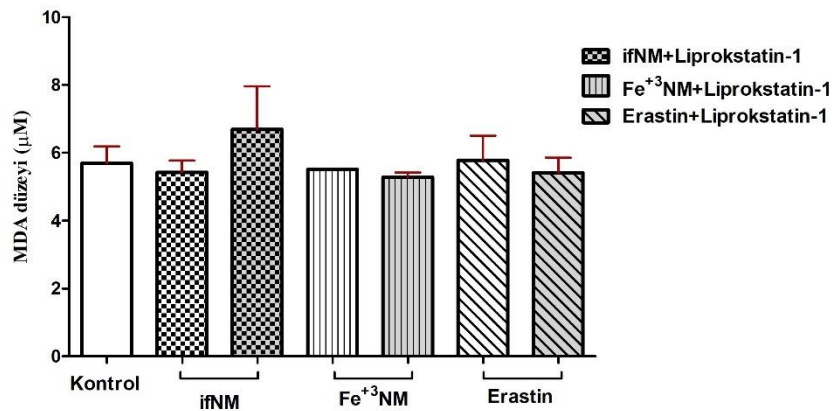
Şekil 17. Sentetik NM'lerin C11-BODIPY 581/591 varlığında hücre içi lipid hidroperoksitlerin oluşumuna etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liprostatin-1 (50nM) uygulanan hücreler 1 saat liprostatin-1 ile muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; Liprostatin-1 ön uygulama yapılmış gruplar vs. tek başına NM veya erastin uygulanan gruplar

Lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan 4-HNE düzeyini ölçmek için modifiye protein düzeyi incelendi (Şekil 18). ifNM ve Fe⁺³NM uygulamasıyla 4-HNE modifiye protein düzeyinin arttığı, liprostatin-1 uygulamasıyla protein miktarının anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi (p<0.05).



Şekil 18. Sentetik NM'lerin 4-HNE modifiye protein düzeyine etkisinin incelenmesi. ifNM (50 µg/mL), Fe³⁺NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liproksatin-1 (50nM) uygulanan hücreler 1 saat Lip-1 ile muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; ifNM+Liproksatin-1 grubu vs. ifNM grubu. **p<0.05; Fe³⁺NM+Liproksatin-1 grubu vs. Fe³⁺NM grubu.

Lipid peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biri olan MDA düzeyinde NM uygulamasıyla birlikte anlamlı bir değişim tespit edilmedi (Şekil 19).



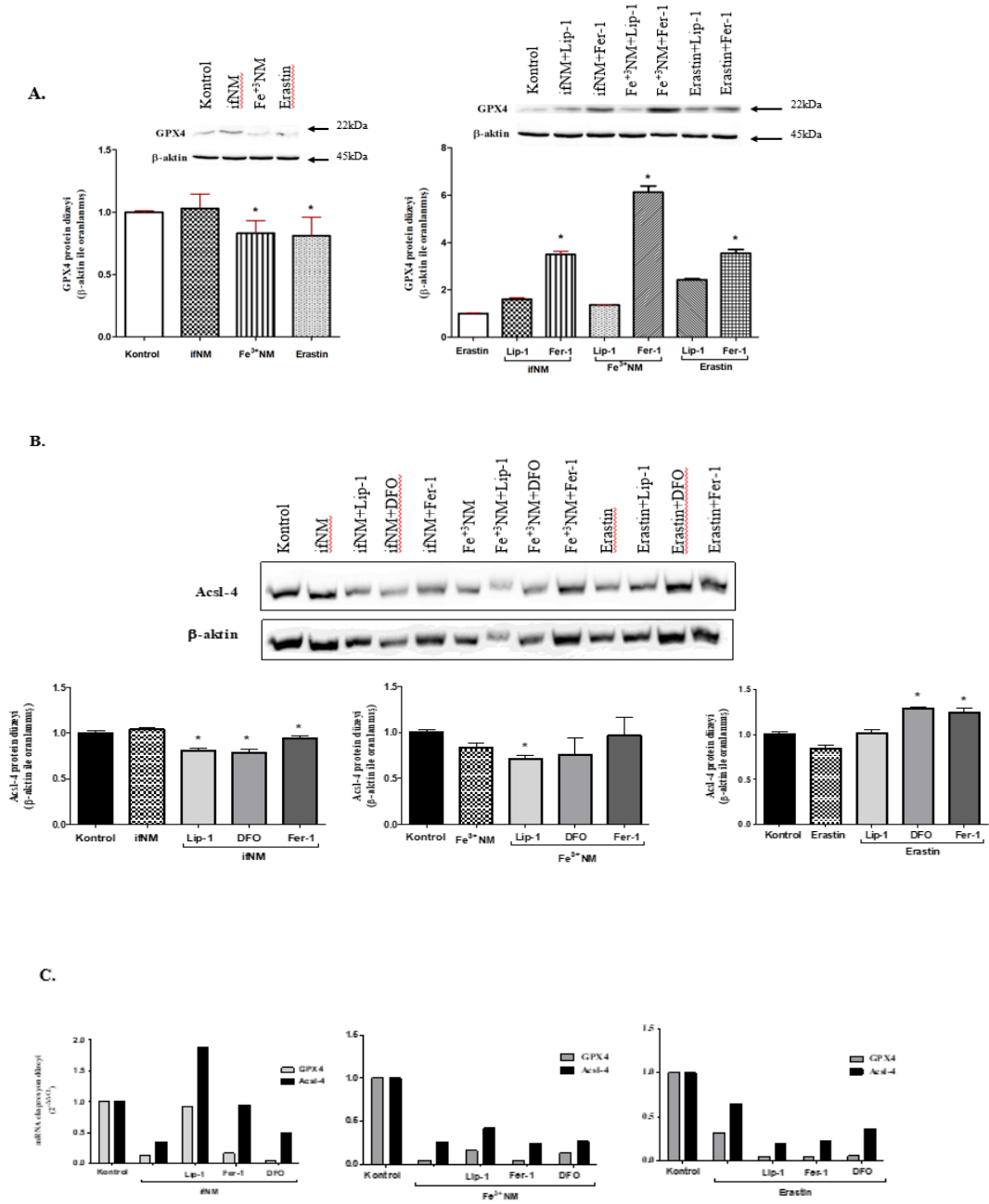
Şekil 19. Sentetik NM'lerin hücre içi MDA düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liproksatin-1 (50nM) uygulanan hücreler 1 saat liproksatin-1 ile muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir.

4.9. GPX4 ve Acs14 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Ferroptotik belirteçlerden biri olan GPX4 ve lipid peroksidasyonda önemli bir parametre olarak Acs14 protein düzeylerindeki değişimi incelemek için sentetik NM'ler belirlenen IC₅₀ değerleri ile ve pozitif kontrol grubu olarak erastin ise 30 µM konsantrasyonda 24 saat hücrelere uygulandı. İnhibitör uygulanan gruplarda; Liproksatin-1 (50 nM) 1 saat, Ferrostatin-1 (5µM) 2 saat ve DFO (100 µM) 1 saat ön uygulama yapıp 24 saat NM ve erastin ile inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerdeki GPX4 ve Acs14 protein ve mRNA düzeyi sırasıyla Western Blot ve real-time PCR tekniği ile ölçüldü (**Şekil 20**). Fe⁺³NM ve erastin gruplarında GPX4 protein ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. **Şekil 20A**'da belirtildiği üzere Ferrostatin-1 uygulamasıyla GPX4 protein ifadesinin NM ve erastin gruplarında arttığı görüldü (p≤0.05). Acs14 protein ifadesinin ifNM grubunda Liproksatin-1 ve DFO uygulamasıyla; Fe⁺³NM grubunda Liproksatin-1 uygulamasıyla azaldığı tespit edildi. (**Şekil 20B**).

Tek başına ifNM uygulaması GPX4 mRNA düzeyini kontrole göre 7,81 kat; Fe⁺³NM uygulaması ise 22,23 kat azalttığı tespit edildi (**Şekil 20C**). Liproksatin-1 ön uygulaması yapılmış Fe⁺³NM grubunda sadece Fe⁺³NM uygulanmış gruba kıyasla 3,47 kat ekspresyon artışı meydana gelirken; ifNM grubunda sadece ifNM uygulanmış gruba kıyasla 7,14 kat ekspresyon artışı meydana geldiği tayin edildi. Ferrostatin-1 ve DFO varlığında her iki NM aracılı GPX4 mRNA azalmasını geri dönmediği tespit edildi (**Şekil 20C**).

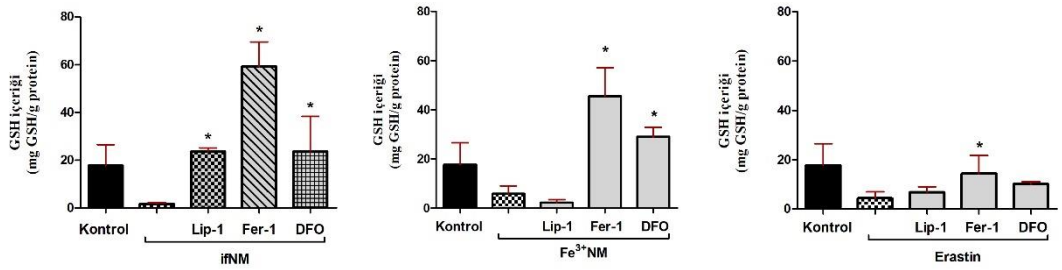
ifNM uygulaması Acs14 mRNA düzeyini kontrole göre 2,91 kat; Fe⁺³NM uygulaması ise 3,81 kat azalttı. Liproksatin-1 ön uygulaması yapılmış Fe⁺³NM grubunda sadece Fe⁺³NM uygulanmış gruba kıyasla 1,58 kat ekspresyon artışı meydana gelirken; ifNM grubunda sadece ifNM uygulanmış gruba kıyasla 5,46 kat ekspresyon artışı meydana geldi. Ferrostatin-1 ön uygulaması sadece ifNM grubuna kıyasla 2,74 kat; DFO ön uygulaması ise 1,42 kat artış meydana getirdi. Fe⁺³NM'li gruplarda Ferrostatin-1 ve DFO'nun anlamlı bir etkisi olmadığı tayin edildi (**Şekil 20C**).



Şekil 20. Sentetik NM'lerin GPX4 ve Acs14 protein (A, B) ve mRNA (C) düzeylerine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Liprostatin-1 (50nM, 1 saat), Ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) ve DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; gruplar vs. tek başına NM/erastin uygulanan grup

4.10. GSH Düzeyinin Değerlendirilmesi

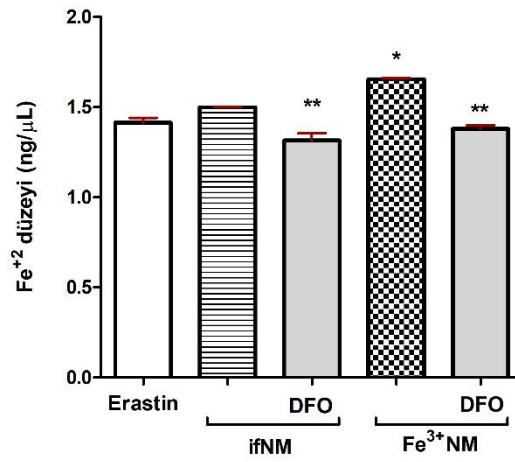
Hücre içi GSH düzeyini belirlemek için sentetik NM'ler IC₅₀ değerlerinde ve pozitif kontrol grubu olarak erastin ise 30 µM konsantrasyonda 24 saat hücrelere uygulandı. Erastinin hücre içi Cys seviyesini önemli ölçüde azalttığı, GSH sentezini bloke ettiği ve ferroptoza neden olduğu bilindiği için; NM grupları erastin grubu ile karşılaştırıldı. İnhibitör uygulanan gruplarda; Liproksatin-1 (50 nM) 1 saat, Ferrostatin-1 (5µM) 2 saat ve DFO (100 µM) 1 saat ön uygulama yapıp 24 saat NM ve erastin ile inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerdeki GSH düzeyi ölçüldü. Buna göre ifNM ve Fe⁺³NM uygulamasının, erastine benzer şekilde hücrelerdeki GSH içeriğini azalttığı tespit edildi. Yanı sıra, tüm inhibitörlerin ifNM grubunda GSH düzeyini arttırdığı; Fe⁺³NM grubunda Ferrostatin-1 ve DFO uygulamasının; erastin grubunda ise Ferrostatin-1 uygulamasının GSH düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21. Sentetik NM'lerin hücre içi GSH düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. Liproksatin-1 (50nM, 1 saat), ferrostatin-1 (5 µM, 2 saat) ve DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ve erastin ile inkübe edilmiştir. *p<0.05; gruplar vs. tek başına NM/erastin uygulanan grup

4.11. Hücre İçi Demir Düzeyinin Değerlendirilmesi

Hücre içi demir düzeyini belirlemek için sentetik NM'ler IC₅₀ değerlerinde hücrelere 24 saat uygulandı. Demir şelatörü DFO uygulanan gruplarda; hücrelere 1 saat DFO (100 µM) ile ön uygulama yapıp 24 saat NM ile inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerdeki demir düzeyi ölçüldü. Fe⁺³NM uygulaması sonrası hücre içi Fe⁺² düzeyi yüksek tespit edilmiştir. Diğer taraftan, bir demir şelatörü olan DFO varlığında hücre içi Fe⁺² düzeyi tek başına uygulanan ifNM ve Fe⁺³NM grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 22).



Şekil 22. Sentetik NM'lerin hücre içi Fe⁺² düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe⁺³NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ile inkübe edildi. *p<0.05; Fe⁺³NM grubu vs. diğer gruplar. **p<0.05; gruplar vs. tek başına NM uygulanan gruplar

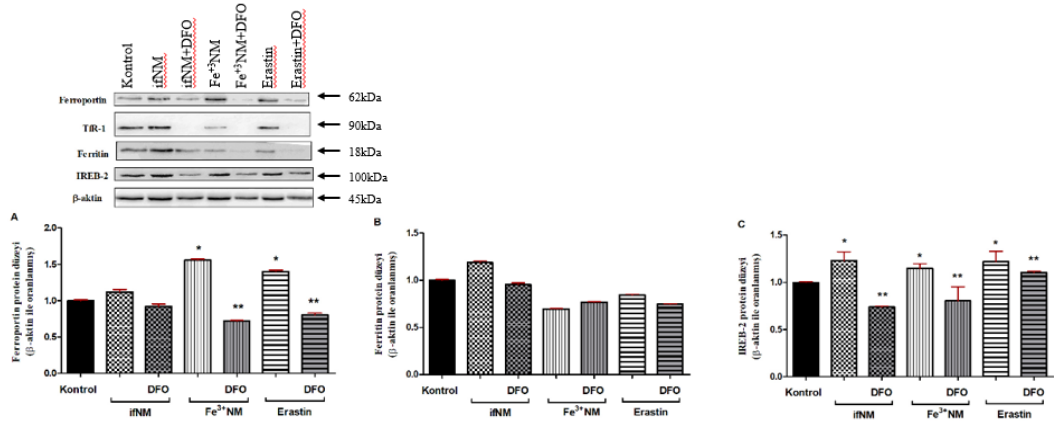
4.12. Sentetik Nöromelanin Modellerinde Hücre İçi Demir Tutulumunun Değerlendirilmesi

Hücreye demir alımı, demir iyonunu taşıyan transferrin molekülünün hücre yüzey reseptörü transferrin reseptör-1 (TfR1) ile etkileşip hücreye alınması ile gerçekleşir (Masaldan vd, 2019). Ferritinin işlevi sitozoldeki fazla demiri depolamaktır, bununla birlikte NM'nin de dopaminerjik nöronlarda önemli bir demir depolama proteini olarak hizmet eder. Demir için bilinen tek taşıma yolu, seruloplazmin gibi bir ferrokسيداز tarafından Fe⁺³'e oksitlenen demirin hücreden çıkabildiği transmembran

kanalı ferroportindir (FPN) (Hare vd, 2013). Hücrede Fe^{+3} , transmembran epitel antijeni (STEAP3) tarafından Fe^{+2} ye dönüştürülür ve endozom ile sitozole DMT1 yoluyla taşınır (Lei vd, 2020b). Bir transkripsiyon faktörü olan demir yanıt elemanı bağlayıcı protein 2 (IREB2), demir metabolizmasının devamlılığında görev almaktadır (Xie vd, 2016).

NM kaynaklı demir homeostazındaki değişimi değerlendirmek amacıyla TfR1, ferroportin, ferritin ve IREB-2 protein düzeyleri (Şekil 23) ve ferritin, ferroportin ve DMT-1 mRNA düzeyleri tayin edildi (Şekil 24).

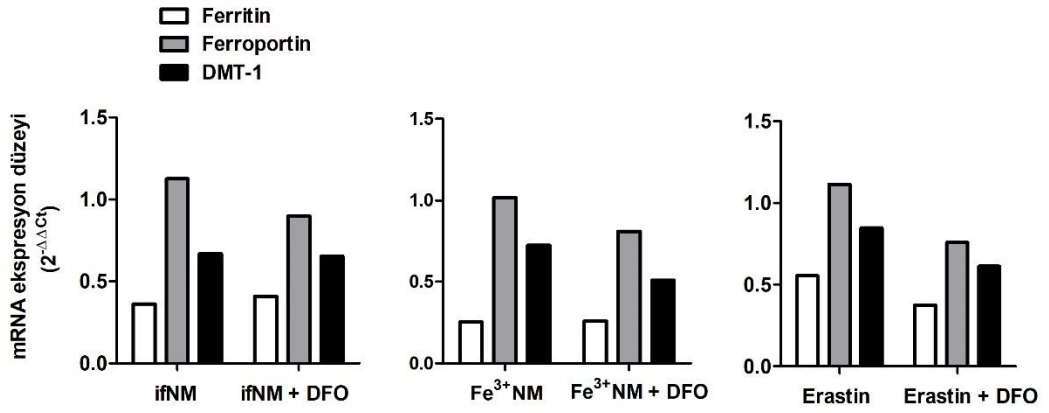
Şekil 23’de sentetik NM’lerin demir metabolizmasında görev alan protein seviyelerine etkisi görülmektedir. Ferroportin düzeyi ifNM uygulamasında değişmezken, Fe^{+3} NM, erastine benzer şekilde ferroportin düzeyini artırmıştır. Bununla birlikte DFO ön uygulaması tek başına Fe^{+3} NM’nin etkisini azaltarak ferroportin protein düzeyini anlamlı derecede düşürmüştür. Ferritin düzeyinde sentetik NM uygulaması ile anlamlı herhangi bir değişim gözlenmezken IREB-2 seviyeleri her iki sentetik NM uygulaması ile artış göstermiştir. DFO varlığında ise kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır. Fe^{+3} NM TfR1 düzeyinde artış meydana getirirken ifNM anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. DFO ön uygulama gruplarının tümünde ise TfR1 protein düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır.



Şekil 23. Sentetik NM’lerin hücre içi ferroportin, TfR1, ferritin ve IREB-2 protein düzeylerine etkisi. ifNM (50 μ g/mL), Fe^{+3} NM (70 μ g/mL), erastin (30 μ M) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. DFO (100 μ M, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ile inkübe edildi. *p<0.05;

Fe³⁺NM ve erastin grubu vs. diğer gruplar. **p<0.05; gruplar vs. Fe³⁺NM ve erastin grupları

Ferritin mRNA düzeyi ifNM varlığında kontrole göre 1,49 kat azalırken; Fe³⁺NM uygulanmış grupta 1,38 kat azaldı. DFO ön uygulaması ferritin mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmadı. Ferroportin mRNA düzeyleri, ifNM varlığında kontrole göre 1,125 kat artarken; Fe³⁺NM uygulaması ile 1,017 kat arttı. DFO ön uygulamasının ferroportin mRNA düzeyini ifNM ve Fe³⁺NM gruplarında kontrole göre sırasıyla 1,11 ve 1,23 kat azalttığı tespit edildi.



Şekil 24. Sentetik NM'lerin ferritin, ferroportin ve DMT-1 mRNA düzeyine etkisi. ifNM (50 µg/mL), Fe³⁺NM (70 µg/mL), erastin (30 µM) 24 saat süre ile hücrelere uygulandı. DFO (100 µM, 1 saat) uygulanan hücreler önce inhibitör ile belirtilen sürede muamele edilip ardından 24 saat NM ile inkübe edildi.

5. Tartışma

Parkinson Hastalığı, toplumda yaygın görülen ve substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize bir nörodejeneratif hastalıktır (Giordano vd., 2012). Dopaminerjik nöronal hasarın altında yatan olası mekanizmalar genetik ve çevresel faktörler, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, nöroinflamasyon ve apoptozdur (Yuan vd., 2010). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalar, demir birikimi ve lipid peroksidasyona bağlı hasarın PH patofizyolojisinde öne çıkan diğer özellikler olduğunu göstermektedir (Masaldan vd., 2019). Normal koşullarda demir enerji metabolizması, solunum, hücre büyüme ve farklılaşması gibi birçok fizyolojik reaksiyonda rol alır. Özellikle beyinde, sayılan bu özelliklere nörogenez, miyelinizasyon ve nörotransmitter sentezi gibi fonksiyonlar da eklenir (Ferreira vd., 2019). Gerçekleşen metabolik aksiyonlar, beyinde devamlı yüksek miktarda bir demir ihtiyacı oluşturmakta ve ihtiyacı karşılanmak üzere demir birikimini desteklemektedir. Böylelikle gelişen yaşla beraber beyinde demir birikimi kaçınılmaz olmaktadır. Mahoney-Sánchez ve ark. (2021) yaptığı bir çalışmada özellikle SNPC'nin glia ve dopaminerjik nöronlarındaki demir düzeylerinin hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Mahoney-Sánchez vd., 2021). Postmortem Parkinsonlu insan SN örneklerinde demir birikiminin PH'ye karşı hassasiyeti artırdığını gösteren bir çalışma bu fikri destekler niteliktedir (Ayton vd., 2015). Bu verilerden yola çıkarak, demir birikiminin PH patofizyolojisinde kritik bir role sahip olabileceği fikri öne çıkmaktadır.

Demirin hücrede depo edildiği yapı ferritindir. Özellikle dopaminerjik nöronlarda NM'nin de bir demir deposu gibi davrandığı gözlenmiştir. Beyinde SN ve LC'nin katekolaminerjik nöronlarında bulunan koyu renkli, çözünmez granüler bir pigment olan NM'nin toksik veya koruyucu rolü hücrelerdeki miktarına bağlıdır. Koruyucu olarak NM, toksik bileşikler ve ağır metalleri hücrelerden uzaklaştırır (Zucca vd., 2018). Toksik rolü ise proteazom fonksiyonunu doğrudan inhibe ederek (Xu & Chan, 2015) ve serbest radikallerin üretimini artırarak (Xuan vd., 2011) hücre hasarını tetikleyebilmesidir. Ek olarak, güçlü bir metal bağlama kapasitesine ve demir için özellikle yüksek bir afiniteye sahip olması NM'i önemli bir bileşik haline getirir. NM'nin yapısı ve PH patogenezindeki rolü ile ilgili *in vivo* çalışmalar literatürde mevcuttur, ancak NM'in etkilerinin ayrıntılı incelenmesine imkân sağlayan sentetik NM pigmentlerinin kullanıldığı *in vitro* çalışmalar sınırlıdır. NM'nin karmaşık

ve heterojen yapısı nedeniyle laboratuvar ortamında sentezi güçtür. NM'nin beyinde sentezlenmesini ve birikmesini sağlayan mekanizma ve koşullar tam olarak anlaşılammıştır, bu da in vitro olarak sentezleme sürecini zorlaştırır. NM, çoğu çözücüye ve kimyasal işlemlere dirençli, kararlı bir pigmenttir. NM'yi otopsi ile beyin dokusundan çıkarma ve izole etme girişimleri sınırlı bir başarı kazanmış ve elde edilen ürünler diğer hücrenel bileşenler ve bozunma ürünleri ile kontamine olmuştur. Bu zorluklara rağmen, araştırmacılar, nörodejeneratif hastalıklardaki rolüne dair yeni içgörüler elde etme ve tedavileri için yeni terapötik stratejiler geliştirme umuduyla, NM'nin beyindeki özelliklerini ve işlevlerini araştırmaya devam etmiştir.

Geçmişte yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak tez çalışması kapsamında hem metal içermeyen hem de demir yüklü formu taklit edecek sentetik NM (ifNM ve Fe⁺³NM) hazırlanmıştır (**Şekil 4**) NM'nin kimyasal yapısı hakkında bazı endişeler olmasına rağmen, raporlar dopaminin kendi başına veya sistein ile kopolimerizasyonunun esas olarak sırasıyla feomelanin ve eumelanin olmak üzere iki tip benzotiazin ve indol bazlı sentetik NM ile sonuçlandığını öne sürmektedir (Brooks vd., 2020; Haining vd., 2016). Buradan hareketle, hazırlanan NM'ler, başlangıç maddeleri dopamin ve sistein ile IR analizine tabi tutulmuştur (**Şekil 5**). Yapısal olarak karşılaştırılarak benzerlik ve farklılıklar değerlendirilmiştir. Moleküllerin IR spektrumları; SH germe bandının kaybolması ve NH bükülme bantlarının kayması, NM yapısında bulunan benzotiazin ve indol halkasının oluşumunu göstermiştir. ifNM'nin IR spektrumunda C=O germe bantları ve düzlem dışı bükülme bantlarının kayarak karboksilik asit ile demirin etkileşime girdiği görülmüştür. Ayrıca Fe-NM spektrumunda C-N bandının şiddetinin güçlenip genişlemesi ve daha düşük frekansa kayması, indol halkası ile demir iyonu arasındaki olası etkileşimi göstermiştir (Bridelli vd., 1999). Bununla birlikte Bush ve arkadaşlarının (2006) önceki çalışmasına paralel olarak SEM ile alınan görüntülerde NM granüllerinin farklı çaplarda daha küçük küresel yapılardan meydana geldiği gözlenmiştir (Bush ve ark. 2006). Benzer olarak **Şekil 6**'da elde edilen görüntüler, sentezlediğimiz her iki NM'nin de, daha önce sentetik NM'lerin yapısının incelendiği çalışmalara benzer şekilde, çok katmanlı grafit benzeri bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda sonuçlar sentetik NM'lerin kimyasal yapılarını literatüre paralel olarak doğrulamaktadır.

NM'lerin olası etkilerini incelemek için öncelikle elde edilen NM'lerin hücrelerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında hücrelere

sentetik NM'ler uygulandığında 24 saatin sonunda NM pigmenti hücrelerin içinde görüntülenmiştir (**Şekil 7**). Besiyeri hareket ettirilerek ve ortamdaki uzaklaştırılarak ortamda serbest NM olup olmadığı kontrol edilmiştir. Hücrelerin NM pigmentlerini içine aldığı ve ortamda serbest pigment bulunmadığı doğrulanmıştır.

Viceconte ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, sentetik NM uygulamasının mikrogial hücrelerde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Viceconte vd., 2015). Söz konusu çalışmaya benzer şekilde NM uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak dopaminerjik hücrelerde canlılığı azalttığı çalışmamızda saptanmıştır. Her iki NM tipi için IC₅₀ değerleri hesaplanmış, NM'lerin ileri çalışmalarda 50 µg/mL (ifNM) ve 70 µg/mL (Fe⁺³NM) konsantrasyonda ve 24 saat uygulanmasına karar verilmiştir (**Şekil 8**). Hücrelerin NM'lere yanıtı değerlendirilirken rotenon uygulanan hücrelerle deney koşulları doğrulanmıştır. Rotenon geniş spektrumlu bir insektisit ve pestisitir. Elektron transport zincirinde kompleks I inhibisyonu sağlar ve bu özelliği nedeniyle deneysel PH modeli oluşturmak üzere kullanılmaktadır (Ramalingam vd., 2019).

NM konsantrasyon seçimi ve hücre ölüm tipinin belirlenmesi ilerleyen deneysel aşamalar açısından belirleyici olduğundan NM'lerin sitotoksik potansiyeli farklı bir yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir (**Şekil 9**). Hücrelerden LDH salınımı nekrotik hücre ölümünün önemli bir göstergesidir. Hücrelerde lipid peroksidlerin birikmesi zar bütünlüğünün kaybına ve LDH dahil hücre içi içeriklerin hücre dışına salınmasına yol açar. Birçok çalışma LDH salınımını ferroptoz varlığında da göstermiştir. Örneğin, kanser hücrelerinin erastin veya RSL3 gibi ferroptozu indükleyen ajanlarla tedavisinin ferroptoz inhibitörlerinin eklenmesiyle veya önemli ferroptoz düzenleyicilerinin genetik olarak yıkılmasıyla bloke edilen LDH salınımını artırdığı gösterilmiştir (Dixon vd., 2014; Roh vd., 2018; Zhang vd., 2020). Çalışmamızda elde ettiğimiz LDH salımına ilişkin veriler, sentetik NM'lerin dopaminerjik hücreler için sitotoksik olabileceği fikrini desteklemiştir (**Şekil 10**). Özellikle demir içermeyen NM formunun LDH salımını tetikliyor olması dikkat çekicidir. Nekroptoz inhibitörü varlığında ifNM'nin sebep olduğu hücre ölümünün geri dönmesi LDH bulgusunu desteklemektedir (**Şekil 16C**). SN'den izole edilen NM'lerin nöron ve mikrogial hücre hatlarında LDH salımını artırmadığı, sentetik DA-melanin karışımının ise insan nöroblastoma hücre hattında (SK-N-SH) LDH salımının yanı sıra lipid peroksidasyonu artırdığı bir çalışmada gösterilmiştir (J. Li vd., 2005). Söz konusu etkinin izole NM

uygulamasý sonrası gözlenmemesinin muhtemel nedenleri; Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hücrelere uygulanmak üzere seçilen izole NM konsantrasyonunun (0.1 µg/mL) düşük olması ve NM eldesinde kullanılan kaynağın sağlıklı insana ait beyni dokusu olmasıdır.

LDH salımı nekrotik hücre ölümü ile yakından ilişkili olmakla birlikte LDH analizinin yanı sıra diğer hücre ölüm tiplerini doğrulamak için spesifik belirteçler ve inhibitörler kullanılmaktadır. Çalışmamızda NM'nin etkisi, antioksidan etkinliği iyi bilinen iki bileşik olan NAC ve trolox varlığından değerlendirilmiştir. NAC, sistein kaynağı olarak hücre içinde GSH prekürsörü olarak görev yapar. Böylece oksidan hasara karşı hücrenin antioksidan sistemine destek olur. Aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasını sağlayarak doğrudan antioksidan özellik gösterir. Guiney ve arkadaşlarının (2017) hazırladığı bir makalede, PH fare modellerinde NAC tedavisinin meydana gelen nörodejenerasyonu azalttığı rapor edilmiştir (Guiney vd., 2017). Buna ek olarak, Monti ve arkadaşlarının (2016) yaptığı klinik bir çalışmada, PH tanısı almış, 40-80 yaş aralığında ve en az bir aydır ilaç tedavisi gören hastalar 3 ay boyunca NAC ile tedavi edilmiş, süre sonunda hastaların motor işlevlerinde tedavi görmeyenlere göre iyileşme kaydedilmiştir (Monti vd., 2016). PH'de seviyesi artan ve tehlikeli bir profil kazanan demirin, demir aracılı bir hücre ölüm şekli olan ferroptozda rolünün olabileceği ihtimali oldukça yüksektir. Ferroptozun oluşumunda göze çarpan parametre azalmış GPX4 aktivitesidir. NAC'nin GPX4 ifadesini artırarak lipid peroksidasyonu azalttığı böylece ferroptozu geri çevirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Q. Li vd., 2022). NAC uygulamasının ifNM grubunda hücre canlılığını artırırken Fe⁺³NM grubunda etki göstermediği saptanmıştır (**Şekil 11**). NM'nin taşıdığı demir içeriğine bağlı olarak hücre canlılığını azaltması beklenmektedir. Diğer taraftan, söz konusu bu etkinin NAC varlığında geri döndürülemediği olması Fe⁺³NM'nin hücre içinde birden fazla mekanizmayı tetikliyor olma ihtimalini akıllara getirmektedir. Yüksek demir iyonu varlığında, NM'nin düşük afiniteli bağlanma bölgelerinde demir birikir. Buradaki demir redoks aktif hale geçerek serbest radikaller üretebilir ve böylece nörotoksik sonuçlara yol açabilir. Yapılan bir çalışmada PH hastalarının NM agregatlarında redoks aktivitesinin Fe⁺³ miktarına bağlı olarak arttığı bulunmuştur (Zucca vd., 2004). PH hastalarının SN'sindeki NM analizinde demir birikimi ve aşırı bağlanma görülmüştür (Xu & Chan, 2015). Bu durum potansiyel olarak oksidatif stresin artmasına neden olabilir şeklinde yorumlanmıştır.

Oksidatif stresle başa çıkma konusunda aktif olarak yer alan diğer bir molekül ise E vitamini analogu olan Trolox'tur. Atiq ve arkadaşları (2023), MPTP ile indüklenmiş parkinsonlu fare deney modellerine trolox tedavisi uygulamış ve tedavi gören farelerde oksidatif stres, nöroinflamasyon ve motor fonksiyon bozukluklarında azalma gözlemlemiştir (Atiq vd., 2023). Buna paralel olarak, **Şekil 12'de** görüldüğü üzere, trolox ile ön işleme tabi tutularak Fe⁺³NM uygulanmış hücrelerde, tek başına Fe⁺³NM uygulanmış hücrelerle karşılaştırıldığında, hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar sentetik NM'lerin (içeriğine bağlı olarak) oksidatif stresin indüklediği çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hücre ölümüne katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Oksidatif stres birçok hücre ölüm tipinde gözlenen bir durumdur. NM uygulamasının hangi hücre ölüm tipini, hangi mekanizmayla tetiklediği araştırmamızın temelini oluşturmaktadır. Çalışma kapsamında, bilinen inhibitörlerin varlığında NM uygulaması yapılarak apoptoz, nekroptoz, otofaji ve ferroptoz gibi farklı hücre ölüm tipleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, NM'nin demir ihtiva edip etmemesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. ifNM'nin nekroptoz, otofaji ve yüksek konsantrasyonda ferroptozu indüklediği, demir içeren Fe⁺³NM'nin ise ferroptotik hücre ölümüne sebep olduğu belirlenmiştir (**Şekil 16**). Görülmektedir ki, NM'deki demir içeriği hücreyi nekrotik hücre ölümünden korurken farklı bir hücre ölümünün tetiklenmesine zemin hazırlamaktadır. Ferroptoz inhibitörü olan ferrostatin-1 varlığında hücre ölümünün geri dönmesi, NM'nin demir varlığında ve artan konsantrasyonlarında ferroptozla ilişkili mekanizmaları kullandığını düşündürmektedir. Naoi ve ark. (2008) yaptığı bir çalışmada postmortem beyin dokularından izole edilen NM'nin (10 µg/mL) SH-SY5Y hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini rapor etmiştir (Naoi vd., 2008). Diğer taraftan, çalışmamızda pan-kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk varlığında NM'nin sebep olduğu hücre ölümü geri dönmediğinden sentezlediğimiz NM'lerin apoptotik hücre ölümünü tetiklemiyor olabileceği yönünde değerlendirilmiştir. DNA fragmentasyonu, kaspaz (-3, -8, -9) aktivitesindeki değişim, annexin V ile fosfatidilserin translokasyonunun gösterilmesi, PARP enziminin kesilmesi, pro ve antiapoptotik proteinler gibi apoptozu doğrulayacak bir dizi parametre vardır. Bu parametrelerin çalışmamız kapsamında çalışılmaması apoptozla ilgili bulguları tartışmamızı kısıtlamaktadır. Bu

nedenle, NM'lerin apoptotik etkilerini araştırmak ve verileri daha sağlıklı değerlendirmek için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücre ölüm tiplerinden biri olan ferroptoz PH'nin ilerlemesi ile ortaya çıkan artmış demir seviyesi, lipid peroksidasyon, azalmış glutatyon seviyesi ve GPX4 aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir (Xu & Chan, 2015). PH patogeneğinde ferroptozun araştırılmasıyla ilgili bir dizi *in vitro* alışma, 6-OHDA ve MPP⁺ gibi bazı nörotoksinlerin lipid peroksidasyonu yoluyla ferroptozu indüklediğini bildirmiştir (Liu vd., 2020; Sun vd., 2020). 2016 yılında yapılan bir çalışmada, PH hücre kültürü modelinde (LUHMES) ve organotipik kültürlerde erastin kaynaklı ferroptoz gösterilmiştir (Do Van vd., 2016). Ayrıca alışma, ferroptoz inhibitörü ferrostatin-1'in 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) fare Parkinson modelinde nöron kaybını ve davranışsal bozukluğu önleyebileceğini göstermiştir. LUHMES hücrelerinde, sporadik PH ile ilişkili olan rotenon ve paraquat gibi çevresel nörotoksinler kullanılarak başlatılan hücre ölümü ferrostatin-1, liproksatin-1 ve demir şelatörü deferipron tarafından geri döndürülmüştür (Masaldan vd., 2019). Oksidatif stres kaynaklı ferroptozun nörolojik bozukluklarda çok önemli bir rol oynadığı göz önüne alındığında, ferroptoz mekanizmaları hakkında daha fazla araştırma nörolojik bozuklukların tedavisi için yeni hedefler bulmaya yardımcı olacaktır. Buradan hareketle, NM uygulamasının ferroptotik hücre ölümünü tetiklerken kullandığı mekanizmaları aydınlatmak üzere çalışmamız tasarlanmıştır.

Lipid peroksidasyon ferroptozun en temel özelliklerinden biridir. Çeşitli ROT'lar arasında, lipid peroksil radikalleri dahil olmak üzere lipid peroksitler ferroptotik hücre ölümünün doğrudan indükleyicileridir (Dixon vd., 2012). Jiang ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, potansiyel antioksidan aktiviteye sahip gastrodin bileşiğinin nöronal C6 hücrelerinde H₂O₂ aracılı ferroptozu etkisini değerlendirmiştir. Çalışma kapsamında liproksatin-1, ferrostatin-1 ve DFO varlığında GPX4, Acs14, MDA, GSH ve C11-BODIPY düzeyleri üzerinden lipid peroksidasyon incelenmiştir (T. Jiang vd., 2020). Benzer şekilde, NM'nin hücrelerde meydana getirdiği lipid peroksidasyon birden çok parametre ile çalışmamız kapsamında ele alınmıştır. C11 BODIPY hücre membranlarında lipid ROT akışını incelemek ve ferroptozda lipid peroksidasyonu değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir boyadır. C11-BODIPY, canlı hücrelerdeki lipid membranların redoks durumunu değerlendirmek için özel olarak tasarlanmış ve floresan sinyali, akış sitometrisi,

floresan mikroskobu veya mikropilaka okuyucular ile tespit edilebilmektedir (Dai vd., 2023). **Şekil 17'**da görüldüğü üzere NM uygulaması ile hücrelerde lipid hidroperoksit düzeylerinde artış meydana gelmiştir. Liproksatin-1, prelinik çalışmalarda ferroptoz inhibitörü olarak sıklıkla kullanılan lipid peroksidasyonu önleyici bir ajandır. NM uygulamasına bağlı olarak hücrelerde artan lipid peroksitlerin liproksatin-1 varlığında azalması NM'nin ferroptozu tetiklediğini desteklemektedir.

MPTP ile indüklenmiş fare PH modelinin çalışıldığı bir araştırmada MPTP'ye bağlı gelişen lipid peroksidasyonu, 4-HNE-modifiye protein düzeyindeki artış ile tespit edilmiştir (Boonpraman vd., 2023). Benzer olarak Cai ve arkadaşları (2023), in vitro PH modelinde lipid peroksidasyonundaki artışı 4-HNE üzerinden değerlendirmiştir (Cai vd., 2023). Tez çalışması kapsamında 4-HNE düzeyleri 4-HNE-modifiye protein aracılığıyla tayin edilmiştir. NM uygulamasıyla artan 4-HNE düzeyinin liproksatin-1 varlığında her iki NM grubunda da anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (**Şekil 18**). Elde ettiğimiz sonuçlar NM'lerin hücrede çeşitli mekanizmalar yoluyla lipid peroksidasyonunu tetiklediğini göstermiştir.

GPX4, GSH'yi kofaktör olarak kullanan, membran lipid peroksitlerini azaltan temel enzim olup ferroptoz kaynaklı lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Nedeni açıktır ki, hücrede glutatyon azalması doğrudan GPX4 düzeyinin düşmesine sebep olur. GPX4 azlığı lipid peroksitlerin ve Fe⁺² aracılı Fenton radikallerinin birikmesine neden olur ve en sonunda hücreyi ferroptozla sürükler (Chu vd., 2023). Bellinger ve arkadaşları (2011) PH olan ve olmayan hastaların postmortem beyin dokularını incelediğinde Parkinsonlu beyin dokusunda, hasta olmayan gruba karşı belirgin oranda azalmış GPX4 düzeyi ile karşılaşmıştır. Normal koşullarda, PH ile ilişki beyin bölgesi olan SN'da GPX4 ifadesinin diğer beyin bölgelerine kıyasla fazla olması bu enzimi PH patogenezi açısından değerli kılmaktadır (Bellinger vd., 2011). MPP⁺ ile indüklenmiş SH-SY5Y in vitro PH modelinin çalışıldığı bir çalışmada da GPX4 ifade düzeyinde kritik azalmalar tespit edilmiştir (Y. Jiang vd., 2023) Çalışmamızda Fe⁺³NM ve erastin gruplarında GPX4 protein ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (**Şekil 20A**). Ayrıca ifNM uygulaması GPX4 mRNA düzeyini kontrole göre 7,81 kat; Fe⁺³NM uygulaması ise 22,23 kat azaltmıştır (**Şekil 20C**). GPX4 enzim miktarında azalma, hücrede lipid peroksitlerin birikmesine ve dolayısıyla deney modelimizde lipid radikal kaynaklı gelişen oksidatif strese bağlı hücre ölümünün tetiklenmesine

neden olmuş olabilir. Bu durum NM'lerin GPX4'ü inhibe edebileceğini göstermektedir. **Şekil 20C**'de NM aracılığıyla GPX4 mRNA azalması, liprostatin-1 varlığında geri dönmüş; GPX4 mRNA ifadesinin anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Glutasyon, GPX4'ün aktivite gösterebilmesi için gerekli olduğundan sistem X_c^- bloke edildiğinde, hücre içi Cys seviyeleri azalır. GSH sentezindeki azalma ise GPX4 aktivite kaybı, hücre içi lipid bazlı ROT birikimi ve ferroptoz ile ilişkilidir (C. Lei vd., 2020b). Bu nedenle, tez çalışması kapsamında GPX4'in yanı sıra bu enzimin kofaktörü olan GSH düzeylerindeki değişim araştırılmıştır. NM uygulamaları sonrası hücre içi GSH düzeyinin azaldığı; ferroptoz inhibitörleri varlığında ise arttığı görülmüştür (**Şekil 21**). Antiferroptotik ajan uygulamasıyla GPX4 protein ifadesinin ve GSH düzeylerinin artması NM'lerin ferroptotik etkisini destekleyen bulgular olarak karşımıza çıkmaktadır.

ACSL'ler, yağ asidi açıl-KoA esterlerini oluşturmak için uzun zincirli yağ asitlerini aktive etmede çok önemli rol oynar. Bu ailenin bir üyesi olan Acs14 beyin, adrenal bez, testis ve overde yüksek miktarda sentezlenir. Acs14, özellikle araşidonik asit ve adrenik asit olmak üzere 20 karbonlu çoklu doymamış yağ asitlerini substrat olarak kullanarak onları PUFA-KoA'ya dönüştürür. PUFA-KoA'lar oluştuktan sonra farklı lizofosfatidilkolin asiltransferazlar (LPCAT'ler) tarafından fosfolipitlere esterleştirilir. Bu durum, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin hücre membranının yapısına katılmasını ve dolayısıyla membran lipidlerinden radikal oluşumunu kolaylaştırır (Hou vd., 2022). Lipidomik analizler, Acs14'ün ferroptozun yürütülmesi için gereken lipid bileşimini etkilediğini göstermiştir. Acs14 overeksprese hücrelerde hücre membranındaki lipid kompozisyonunun değiştiği ve hücrelerin ferroptozu duyarlı hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir (Yi-di vd., 2020). GPX4–Acs14 double-knockout hücrelerin ferroptozu dirençli olduğunun gösterilmesi Acs14'ün ferroptoz için önemini doğrulamıştır (Doll vd., 2017). Acs14'ün GPX4 üzerine inhibitör etki göstererek ferroptozu düzenlediği gösterilmiştir (Magtanong vd., 2022). Dolayısıyla Acs14'teki artışın GPX4 inhibisyonuna neden olması beklenmektedir. Deneysel modelimizde Acs14 protein düzeyi incelendiğinde, NM uygulaması ile Acs14 protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş; hatta gen ifadesinde kontrole göre azalma tespit edilmiştir. Diğer taraftan antiferroptotik ajan uygulamasının Acs14 mRNA düzeyini artırırken protein düzeyini azalttığı görülmüştür. Acs14 protein miktarının azalması, GPX4 protein düzeylerindeki artış ile paralellik göstermekte ve

Acsl4'ün proferroptotik etkisini doğrulamaktadır. Diğer taraftan, mRNA ekspresyonunun protein düzeyine yansımadağı görülmektedir (**Şekil 20**). mRNA hücre içinde belirli bir yarılanma ömrüne sahiptir ve zamanla parçalanır. mRNA'nın hızlı bir şekilde parçalandığı durumlarda, yüksek seviyelerde transkript üretimine rağmen protein sentezi düşük saptanabilmektedir. Bazı durumlarda ise hücre içindeki çeşitli sinyal yolları veya moleküler mekanizmalar, mRNA'nın transkripsiyonunu inhibe edebilir. Bu durumda, mRNA düzeyi yüksek olsa bile protein sentezi düşük olabilir. Sayılan bu olasılıkların yanı sıra deney koşullarımızda mRNA ve protein analizlerinin tek bir zamanda (24 saat) yapılmış olması söz konusu sonuçların elde edilmesinden sorumlu olabilir. Elde ettiğimiz veriler NM'nin Acsl4 üzerindeki etkisini tartışmamızı kolaylaştıracak çeşitlilik ve yeterlilikte değildir. Bu nedenle Acsl4 ve ilişkili olduğu mekanizmalar, NM'lerin etkileri açısından ayrıntılı çalışılması gereken bir konudur.

Ferroptoz, demire bağımlı bir hücre ölüm tipidir. Lipid peroksidasyonuna zemin hazırlayan temel etmenlerden biri hücre içinde artmış demir düzeyleridir. Bu nedenle tez kapsamında, NM uygulaması sonrası değişen hücre içi demir düzeyi ve yanı sıra demir metabolizması ve demir taşınmasıyla ilişkili bir dizi protein araştırılmıştır. Beklendiği üzere, Fe⁺³NM uygulaması sonrası hücre içi Fe⁺² düzeyi yüksek tayin edilmiştir. Diğer taraftan, bir demir şelatörü olan DFO varlığında hücre içi Fe⁺² düzeyi tek başına uygulanan ifNM ve Fe⁺³NM grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (**Şekil 22**).

Fibroblast hücrelerinde erastin ile indüklenen ferroptozda TfR1'nin rolünü inceleyen bir çalışmada, erastin uygulaması sonrası hücrelerde TfR1 düzeyinin arttığı gözlenmiştir (Park & Chung, 2019). Demirin hücre içinde artması lipid peroksitlerin oluşumu açısından önemlidir. Dolayısıyla demiri hücre içine alan ve hücre dışına taşıyan taşıyıcıların miktarı NM uygulaması sonrası çalışmamız kapsamında değerlendirilmiştir. Bu bağlamda **Şekil 23**'de görüldüğü üzere TfR1 protein düzeyinin Fe⁺³NM varlığında kontrole göre artarken DFO ön uygulaması ile tüm gruplarda anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bu durum Fe⁺³NM'nin hücreye daha fazla Fe⁺³ alınmasını tetiklediğini göstermektedir. Ferroportin ise hücre içindeki Fe⁺²'nin hücre dışına aktarılmasını sağlayan bir membran reseptörüdür. Çalışmamızda ferroportin düzeyinin NM'lerin uygulanması ile arttığı; DFO varlığında ise ferroportin düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular, özellikle Fe⁺³NM'nin bir yandan TfR1 aracılığıyla hücreye Fe⁺³ girişini indükleyerek demir içeriğini

artırdığını bir yandan da hücreden Fe^{+2} çıkışını tetiklediğini göstermektedir. Ayrıca ifNM ve DFO varlığında azalan IREB2 düzeyi ifNM'nin hücrede demir iyonu açığı oluşturabileceğini dolayısıyla daha fazla demir iyonu alımının tetiklenebileceğini ve hücre içi demir düzeyinin kontrolsüz olarak arttığını başka bir açıdan desteklemektedir. ifNM uygulaması ile artan ferritin düzeyi DFO varlığında kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum ifNM'nin hücrede demir birikimini tetikleyebileceğini göstermiştir. Tian ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada ferritin proteininin PC12 hücrelerinde 6-OHDA ve erastin ile oluşturulmuş Parkinson modeli üzerinden ferroptozaya etkisi değerlendirilmiş ve erastin uygulamasının ferritin düzeylerini azalttığı rapor edilmiştir (Tian vd., 2020). Benzer şekilde çalışmamızda erastin uygulanmış hücrelerde ferritin protein düzeyinin azaldığı gösterilmiştir.

Sonuç ve Öneriler

Ferroptoz, hücre içinde artmış demir iyonları aracılı lipid peroksidasyonunu tetikleyen hücre metabolik aktiviteler ile onu baskılayan hücre antioksidan sistemler arasındaki bir antagonizmayı yansıtır. NM hem antioksidan hem de sitotoksik potansiyelinin olduğu ikili bir role sahip gibi düşünülse de, hastalığın ilerlemesi ve yaşla birlikte nörodejenerasyona etkisi, madalyonun karanlık yüzü hakkında fikir vermiştir. Özellikle demire olan yüksek afinite ve kapasitenin üzerinde demir bağlama eğilimi hücre için stres faktörlerini tetiklemektedir. Öyle ki, yüksek demir seviyelerinden bahsedilen bir koşulda, NM ve ferroptoz ilişkisinin akla gelmesi oldukça olasıdır. Bu bağlamda tez çalışması kapsamında NM pigmentinin hücrede lipid peroksidasyonunu tetiklediği ve hücre içi demir metabolizmasını etkileyerek ferroptotik hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığındaki azalma, hücre zarı bütünlüğünün hızlı ve geri döndürülemez bir şekilde kaybı ve hücre ölümü ile karakterize olan ferroptoz NM varlığında gösterilmiştir. Ayrıca NM aracılığıyla azalan GPX4 seviyesi, erastin tarafından indüklenen ferroptoz tablosuna benzerdir. Özetle, elde ettiğimiz bulgular, dopaminerjik nöronlarda biriken NM'nin oksidatif stresi indüklediğini desteklemekte; oksidatif stres aracılığıyla meydana gelen ferroptotik hücre ölümünün ise nörodejenerasyonda rolü olduğunu göstermektedir. Çalışmamız bulgularını destekleyecek ileri in vivo ve klinik çalışmaların NM'nin ferroptozdaki rolünü aydınlatarak hastalığın önlenmesine ve/veya tedavisine katkı sağlayacağı şüphesizdir.

Kaynaklar

- Akgul, O., Sultan Kilic, F., Erol, K., & Pabuccuoglu, V. (2007). Synthesis and anticonvulsant activity of some N-phenyl-2-phthalimidoethanesulfonamide derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 340(12), 656-660. <https://doi.org/10.1002/ardp.200700166>
- Armagan, G., Sevgili, E., Gürkan, F. T., Köse, F. A., Bilgiç, T., Dacı, T., & Saso, L. (2019). Regulation of the Nrf2 Pathway by Glycogen Synthase Kinase-3 β in MPP⁺-Induced Cell Damage. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7), 1377. <https://doi.org/10.3390/molecules24071377>
- Atiq, A., Lee, H. J., Khan, A., Kang, M. H., Rehman, I. U., Ahmad, R., Tahir, M., Ali, J., Choe, K., Park, J. S., & Kim, M. O. (2023). Vitamin E Analog Trolox Attenuates MPTP-Induced Parkinson's Disease in Mice, Mitigating Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Motor Impairment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9942. <https://doi.org/10.3390/ijms24129942>
- Ayton, S., Lei, P., Hare, D. J., Duce, J. A., George, J. L., Adlard, P. A., McLean, C., Rogers, J. T., Cherny, R. A., Finkelstein, D. I., & Bush, A. I. (2015). Parkinson's Disease Iron Deposition Caused by Nitric Oxide-Induced Loss of β -Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*, 35(8), 3591-3597. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3439-14.2015>
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(3), 205-214. <https://doi.org/10.1038/nrd1330>
- Bellinger, F. P., Bellinger, M. T., Seale, L. A., Takemoto, A. S., Raman, A. V., Miki, T., Manning-Boğ, A. B., Berry, M. J., White, L. R., & Ross, G. W. (2011). Glutathione Peroxidase 4 is associated with Neuromelanin in Substantia Nigra and Dystrophic Axons in Putamen of Parkinson's brain. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-8>
- Boonpraman, N., Yoon, S., Kim, C. Y., Moon, J.-S., & Yi, S. S. (2023). NOX4 as a critical effector mediating neuroinflammatory cytokines, myeloperoxidase and osteopontin, specifically in astrocytes in the hippocampus in Parkinson's disease. *Redox Biology*, 62, 102698. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102698>
- Bridelli, M. g., Tampellini, D., & Zecca, L. (1999). The structure of neuromelanin and its iron binding site studied by infrared spectroscopy. *FEBS Letters*, 457(1), 18-22. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01001-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01001-7)

- Brooks, J., Everett, J., Lermyte, F., Tjhin, V. T., Banerjee, S., O'Connor, P. B., Morris, C. M., Sadler, P. J., Telling, N. D., & Collingwood, J. F. (2020). Label-Free Nanoimaging of Neuromelanin in the Brain by Soft X-ray Spectromicroscopy. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 59(29), 11984-11991. <https://doi.org/10.1002/anie.202000239>
- Bush, W. D., Garguilo, J., Zucca, F. A., Albertini, A., Zecca, L., Edwards, G. S., Nemanich, R. J., & Simon, J. D. (2006). The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14785-14789. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604010103>
- Cai, B., Zhong, L., Liu, Y., Xu, Q., & Chen, T. (2023). δ -Opioid Receptor Activation Inhibits Ferroptosis by Activating the Nrf2 Pathway in MPTP-Induced Parkinson Disease Models. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2023, 4130937. <https://doi.org/10.1155/2023/4130937>
- Chen, R., Gu, X., & Wang, X. (2022). α -Synuclein in Parkinson's disease and advances in detection. *Clinica Chimica Acta*, 529, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.02.006>
- Chu, J., Li, J., Sun, L., & Wei, J. (2023). The Role of Cellular Defense Systems of Ferroptosis in Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms241814108>
- Dai, Z., Zhang, W., Zhou, L., & Huang, J. (2023). Probing Lipid Peroxidation in Ferroptosis: Emphasizing the Utilization of C11-BODIPY-Based Protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2712, 61-72. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3433-2_6
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
- Dexter, D. T., & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

Dixon, S. J., Patel, D. N., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E. D., Hayano, M., Thomas, A. G., Gleason, C. E., Tatonetti, N. P., Slusher, B. S., & Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *eLife*, 3, e02523. <https://doi.org/10.7554/eLife.02523>

Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., Superti-Furga, G., & Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chemical Biology*, 10(7), 1604-1609. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00245>

Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gelé, P., Pétrault, M., Bastide, M., Laloux, C., Moreau, C., Bordet, R., Devos, D., & Devedjian, J.-C. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiology of Disease*, 94, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.05.011>

Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Irmeler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Prokisch, H., Trümbach, D., Mao, G., Qu, F., Bayir, H., Füllekrug, J., Scheel, C. H., Wurst, W., Schick, J. A., ... Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>

Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>

Dusek, P., Hofer, T., Alexander, J., Roos, P. M., & Aaseth, J. O. (2022). Cerebral Iron Deposition in Neurodegeneration. *Biomolecules*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/biom12050714>

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., & Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991-1003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>

Fahn, S., & Sulzer, D. (2004). Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. *NeuroRx*, 1(1), 139-154.

Fedorow, H., Halliday, G. M., Rickert, C. H., Gerlach, M., Riederer, P., & Double, K. L. (2006). Evidence for specific phases in the development of human neuromelanin.

- Neurobiology of Aging*, 27(3), 506-512.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.02.015>
- Ferreira, A., Neves, P., & Gozzelino, R. (2019). Multilevel Impacts of Iron in the Brain: The Cross Talk between Neurophysiological Mechanisms, Cognition, and Social Behavior. *Pharmaceuticals*, 12(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/ph12030126>
- Giordano, S., Lee, J., Darley-USmar, V. M., & Zhang, J. (2012). Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death. *PloS One*, 7(9), e44610.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044610>
- Guiney, S. J., Adlard, P. A., Bush, A. I., Finkelstein, D. I., & Ayton, S. (2017). Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 104, 34-48. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.01.004>
- Haining, R. L., Jones, T. M., & Hernandez, A. (2016). Saturation Binding of Nicotine to Synthetic Neuromelanin Demonstrated by Fluorescence Spectroscopy. *Neurochemical Research*, 41(12), 3356-3363. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2068-9>
- Han, C., Liu, Y., Dai, R., Ismail, N., Su, W., & Li, B. (2020). Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00239>
- Hare, D. J., Adlard, P. A., Doble, P. A., & Finkelstein, D. I. (2013). Metallobiology of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 5(2), 91-109. <https://doi.org/10.1039/c2mt20164j>
- Heckmann, B. L., Yang, X., Zhang, X., & Liu, J. (2013). The autophagic inhibitor 3-methyladenine potently stimulates PKA-dependent lipolysis in adipocytes. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), 163-171. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02110.x>
- Hirschhorn, T., & Stockwell, B. R. (2019). The development of the concept of ferroptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 133, 130-143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043>
- Hou, J., Jiang, C., Wen, X., Li, C., Xiong, S., Yue, T., Long, P., Shi, J., & Zhang, Z. (2022). ACSL4 as a Potential Target and Biomarker for Anticancer: From Molecular

Mechanisms to Clinical Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 949863. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.949863>

Jia, B., Li, J., Song, Y., & Luo, C. (2023). ACSL4-Mediated Ferroptosis and Its Potential Role in Central Nervous System Diseases and Injuries. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms241210021>

Jiang, T., Chu, J., Chen, H., Cheng, H., Su, J., Wang, X., Cao, Y., Tian, S., & Li, Q. (2020). Gastrodin Inhibits H₂O₂-Induced Ferroptosis through Its Antioxidative Effect in Rat Glioma Cell Line C6. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 43(3), 480-487. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00824>

Jiang, Y., Xie, G., Alimujiang, A., Xie, H., Yang, W., Yin, F., & Huang, D. (2023). Protective Effects of Querectin against MPP⁺-Induced Dopaminergic Neurons Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(3), Article 3. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2803042>

Kunzler, A., Kolling, E. A., da Silva, J. D., Gasparotto, J., de Bittencourt Pasquali, M. A., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2017). Retinol (Vitamin A) Increases α -Synuclein, β -Amyloid Peptide, Tau Phosphorylation and RAGE Content in Human SH-SY5Y Neuronal Cell Line. *Neurochemical Research*, 42(10), 2788-2797. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2292-y>

Latunde-Dada, G. O. (2017). Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(8), 1893-1900. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019>

Lei, C., Huang, M., Li, N., An, J., Xiong, S., Li, X., & Wu, L. (2020a). IMRT and HDR-ICBT for Locally Advanced Clear Cell Adenocarcinoma of the Cervix in Uterus Didelphys Associated With Unilateral Renal Agenesis. *Frontiers in Oncology*, 10, 1136. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01136>

Lei, C., Huang, M., Li, N., An, J., Xiong, S., Li, X., & Wu, L. (2020b). IMRT and HDR-ICBT for Locally Advanced Clear Cell Adenocarcinoma of the Cervix in Uterus Didelphys Associated With Unilateral Renal Agenesis. *Frontiers in Oncology*, 10, 1136. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01136>

Lei, J., Chen, Z., Song, S., Sheng, C., Song, S., & Zhu, J. (2020). Insight Into the Role of Ferroptosis in Non-neoplastic Neurological Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.00231>

- Li, J., Scheller, C., Koutsilieris, E., Griffiths, F., Beart, P. M., Mercer, L. D., Halliday, G., Kettle, E., Rowe, D., Riederer, P., Gerlach, M., Rodriguez, M., & Double, K. L. (2005). Differential effects of human neuromelanin and synthetic dopamine melanin on neuronal and glial cells. *Journal of Neurochemistry*, *95*(2), 599-608. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03404.x>
- Li, Q., Liao, J., Chen, W., Zhang, K., Li, H., Ma, F., Zhang, H., Han, Q., Guo, J., Li, Y., Hu, L., Pan, J., & Tang, Z. (2022). NAC alleviates ferroptosis in diabetic nephropathy via maintaining mitochondrial redox homeostasis through activating SIRT3-SOD2/Gpx4 pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, *187*, 158-170. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.024>
- Liu, H., Wu, H., Zhu, N., Xu, Z., Wang, Y., Qu, Y., & Wang, J. (2020). Lactoferrin protects against iron dysregulation, oxidative stress, and apoptosis in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease in mice. *Journal of Neurochemistry*, *152*(3), 397-415. <https://doi.org/10.1111/jnc.14857>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neuroscience Bulletin*, *33*(5), 585-597. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>
- Ma, S., Henson, E. S., Chen, Y., & Gibson, S. B. (2016). Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, *7*(7), e2307. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.208>
- Magtanong, L., Mueller, G. D., Williams, K. J., Billmann, M., Chan, K., Armenta, D. A., Pope, L. E., Moffat, J., Boone, C., Myers, C. L., Olzmann, J. A., Bensinger, S. J., & Dixon, S. J. (2022). Context-dependent regulation of ferroptosis sensitivity. *Cell Chemical Biology*, *29*(9), 1409-1418.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.06.004>
- Mahoney-Sánchez, L., Bouchaoui, H., Ayton, S., Devos, D., Duce, J. A., & Devedjian, J.-C. (2021). Ferroptosis and its potential role in the pathophysiology of Parkinson's Disease. *Progress in Neurobiology*, *196*, 101890. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101890>

- Masaldan, S., Bush, A. I., Devos, D., Rolland, A. S., & Moreau, C. (2019). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*, 221-233. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.033>
- McFarland, A. J., Grant, G. D., Perkins, A. V., Flegg, C., Davey, A. K., Allsopp, T. J., Renshaw, G., Kavanagh, J., McDermott, C. M., & Anoopkumar-Dukie, S. (2013). Paradoxical role of 3-methyladenine in pyocyanin-induced toxicity in 1321N1 astrocytoma and SH-SY5Y neuroblastoma cells. *International Journal of Toxicology*, *32*(3), 209-218. <https://doi.org/10.1177/1091581813482146>
- Mochizuki, H., Choong, C.-J., & Baba, K. (2020). Parkinson's disease and iron. *Journal of Neural Transmission*, *127*(2), 181-187. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02149-3>
- Monti, D. A., Zabrecky, G., Kremens, D., Liang, T.-W., Wintering, N. A., Cai, J., Wei, X., Bazzan, A. J., Zhong, L., Bowen, B., Intenzo, C. M., Iacovitti, L., & Newberg, A. B. (2016). N-Acetyl Cysteine May Support Dopamine Neurons in Parkinson's Disease: Preliminary Clinical and Cell Line Data. *PLOS ONE*, *11*(6), e0157602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157602>
- Naoi, M., Maruyama, W., Yi, H., Yamaoka, Y., Shamoto-Nagai, M., Akao, Y., Gerlach, M., Tanaka, M., & Riederer, P. (2008). Neuromelanin selectively induces apoptosis in dopaminergic SH-SY5Y cells by deglutathionylation in mitochondria: Involvement of the protein and melanin component. *Journal of Neurochemistry*, *105*(6), 2489-2500. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05329.x>
- Neumar, R. W., Xu, Y. A., Gada, H., Guttmann, R. P., & Siman, R. (2003). Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(16), 14162-14167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212255200>
- Nguyen, A., Gille, G., Moldzio, R., Hung, S.-T., & Rausch, W.-D. (2002). Synthetic neuromelanin is toxic to dopaminergic cell cultures. *Journal of Neural Transmission*, *109*(5), 651-661. <https://doi.org/10.1007/s007020200054>
- Oberländer, U., Pletinckx, K., Döhler, A., Müller, N., Lutz, M. B., Arzberger, T., Riederer, P., Gerlach, M., Koutsilieris, E., & Scheller, C. (2011). Neuromelanin is an immune stimulator for dendritic cells in vitro. *BMC Neuroscience*, *12*, 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-116>

- Park, E., & Chung, S. W. (2019). ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death & Disease*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2064-5>
- Pyszko, J. A., & Strosznajder, J. B. (2014). The key role of sphingosine kinases in the molecular mechanism of neuronal cell survival and death in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Neuropathologica*, *52*(3), 260-269. <https://doi.org/10.5114/fn.2014.45567>
- Ramalingam, M., Huh, Y.-J., & Lee, Y.-I. (2019). The Impairments of α -Synuclein and Mechanistic Target of Rapamycin in Rotenone-Induced SH-SY5Y Cells and Mice Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 1028. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01028>
- Reichert, C. O., de Freitas, F. A., Sampaio-Silva, J., Rokita-Rosa, L., Barros, P. de L., Levy, D., & Bydlowski, S. P. (2020). Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms21228765>
- Roh, T., De, U., Lim, S. K., Kim, M. K., Choi, S. M., Lim, D. S., Yoon, S., Kacew, S., Kim, H. S., & Lee, B.-M. (2018). Detoxifying effect of pyridoxine on acetaminophen-induced hepatotoxicity via suppressing oxidative stress injury. *Food and Chemical Toxicology*, *114*, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.017>
- Romero, A., Ramos, E., Ares, I., Castellano, V., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A., & Martínez, M.-A. (2017). Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. *Archives of Toxicology*, *91*(5), 2151-2164. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1864-y>
- Seibt, T. M., Proneth, B., & Conrad, M. (2019). Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*, 144-152. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014>
- Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1147*, 37-52. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>
- Stockwell, B. R. (2022). Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell*, *185*(14), 2401-2421. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.003>

Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., ... Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, *171*(2), 273-285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>

Sulzer, D., Mosharov, E., Tallozy, Z., Zucca, F. A., Simon, J. D., & Zecca, L. (2008). Neuronal pigmented autophagic vacuoles: Lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. *Journal of Neurochemistry*, *106*(1), 24-36. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05385.x>

Sun, Y., He, L., Wang, T., Hua, W., Qin, H., Wang, J., Wang, L., Gu, W., Li, T., Li, N., Liu, X., Chen, F., & Tang, L. (2020). Activation of p62-Keap1-Nrf2 Pathway Protects 6-Hydroxydopamine-Induced Ferroptosis in Dopaminergic Cells. *Molecular Neurobiology*, *57*(11), 4628-4641. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02049-3>

Tian, Y., Lu, J., Hao, X., Li, H., Zhang, G., Liu, X., Li, X., Zhao, C., Kuang, W., Chen, D., & Zhu, M. (2020). FTH1 Inhibits Ferroptosis Through Ferritinophagy in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics*, *17*(4), 1796-1812. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00929-z>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Vandenabeele, P., Grootjans, S., Callewaert, N., & Takahashi, N. (2013). Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: Consequences for the study of cell death in experimental disease models. *Cell Death and Differentiation*, *20*(2), 185-187. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.151>

Viceconte, N., Burguillos, M. A., Herrera, A. J., De Pablos, R. M., Joseph, B., & Venero, J. L. (2015). Neuromelanin activates proinflammatory microglia through a caspase-8-dependent mechanism. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0228-x>

Wu, Y., Song, J., Wang, Y., Wang, X., Culmsee, C., & Zhu, C. (2019). The Potential Role of Ferroptosis in Neonatal Brain Injury. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00115>

- Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Ferroptosis: Process and function. *Cell Death & Differentiation*, 23(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
- Xu, S., & Chan, P. (2015). Interaction between Neuromelanin and Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Biomolecules*, 5(2), 1122-1142. <https://doi.org/10.3390/biom5021122>
- Xuan, Q., Xu, S.-L., Lu, D.-H., Yu, S., Zhou, M., Ueda, K., Cui, Y.-Q., Zhang, B.-Y., & Chan, P. (2011). Increased expression of α -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 118(11), 1575-1583. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0636-3>
- Xun, Z., Lee, D.-Y., Lim, J., Canaria, C. A., Barnebey, A., Yanonne, S. M., & McMurray, C. T. (2012). Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(4), 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.01.008>
- Yan, N., & Zhang, J. (2020). Iron Metabolism, Ferroptosis, and the Links With Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.01443>
- Yi-di, Z., Ya-xuan, R., Jun, Z., Chu-zhao, L., & Rui-hua, D. (2020). The Role and Research Progress of ACSL4 Gene. *China Cattle Sci*, 46, 52-58.
- Yuan, H., Zhang, Z.-W., Liang, L.-W., Shen, Q., Wang, X.-D., Ren, S.-M., Ma, H.-J., Jiao, S.-J., & Liu, P. (2010). Treatment strategies for Parkinson's disease. *Neuroscience Bulletin*, 26(1), 66-76. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0302-z>
- Zecca, L., Bellei, C., Costi, P., Albertini, A., Monzani, E., Casella, L., Gallorini, M., Bergamaschi, L., Moscatelli, A., Turro, N. J., Eisner, M., Crippa, P. R., Ito, S., Wakamatsu, K., Bush, W. D., Ward, W. C., Simon, J. D., & Zucca, F. A. (2008). New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17567-17572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808768105>
- Zhang, W., Cheng, H., Peng, S., Li, D., Gao, H., & Wang, D. (2020). Performance and mechanisms of wastewater sludge conditioning with slag-based hydrotalcite-like

- minerals (Ca/Mg/Al-LDH). *Water Research*, 169, 115265. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115265>
- Zhou, B., Liu, J., Kang, R., Klionsky, D. J., Kroemer, G., & Tang, D. (2020). Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 66, 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.03.002>
- Zucca, F. A., Basso, E., Cupaioli, F. A., Ferrari, E., Sulzer, D., Casella, L., & Zecca, L. (2014). Neuromelanin of the human substantia nigra: An update. *Neurotoxicity Research*, 25(1), 13-23. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9435-y>
- Zucca, F. A., Giaveri, G., Gallorini, M., Albertini, A., Toscani, M., Pezzoli, G., Lucius, R., Wilms, H., Sulzer, D., Ito, S., Wakamatsu, K., & Zecca, L. (2004). The neuromelanin of human substantia nigra: Physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Research*, 17(6), 610-617. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00201.x>
- Zucca, F. A., Vanna, R., Cupaioli, F. A., Bellei, C., De Palma, A., Di Silvestre, D., Mauri, P., Grassi, S., Prinetti, A., Casella, L., Sulzer, D., & Zecca, L. (2018). Neuromelanin organelles are specialized autolysosomes that accumulate undegraded proteins and lipids in aging human brain and are likely involved in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease*, 4, 17. <https://doi.org/10.1038/s41531-018-0050-8>

Teşekkür

Tüm lisans ve doktora eğitimimin içerisinde her zaman yanımda olan, merak, ilgi ve çabamı her an destekleyen doktora tez danışmanım sayın Prof. Dr. Güliz ARMAGAN'a sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Akademik hayata dahil olmaya gayret ettiğim bu uzun süreçte karşıma çıkan en iyi örnek olduğu için de kendisine minnettarım.

Tez izleme komitesinde yer alan çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK ve sayın Prof. Dr. Yasemin ERAÇ'a, toplantılar boyunca sağladıkları destek ve öneriler için çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca her anlamda destek aldığım başta Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Ayfer YALÇIN olmak üzere tüm öğretim üyesi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK 2211 C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programına teşekkürlerimi iletiyorum. Ayrıca tez çalışmamın finansal desteğini sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne sağladıkları Genel Araştırma Projesi (Proje No.22303) desteği için teşekkür ederim.

Araştırma görevlisi olarak çalıştığım Yükseköğretim Kurumu Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlık ve Biyokimya Ana Bilim Dalına sağladıkları destek ve yardımlar için teşekkür ederim.

Sentezini yaptığım nöromelaninin karakterizasyon çalışmalarında FT-IR analizinde yardımını esirgemeyen Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya anabilim dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Özlem AKGÜL'e, hücre kültürüyle ilgili sorularımı her zaman yanıtlayıp destek olan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç.Dr.M.Alper ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışması deneylerimi yürüttüğüm Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL) ve Biyokimya araştırma laboratuvarına teşekkür ederim.

Doktora eğitimi boyunca her türlü koşulda her sorumu yanıtlayıp bu süreçte bana yardımcı olan sayın Arş. Gör. Dr. Recep İLHAN, sayın Arş.Gör. Dr. Derviş BİRİM ve sayın Arş. Gör Dr. Sinem Yılmaz'a çok teşekkür ederim.

Bu sürecin daimi destekçileri olan, her zaman bana inanan ve desteklerini her an hissettiğim kıymetli ailem Esmâ Gül KAFTAN ve Önder KAFTAN'a ve her yolu birlikte aldığım değerli eşim Arş. Gör. Yusuf ÖCAL'a sonsuz teşekkür ederim.

İzmir, 27.06.2024

Gizem KAFTAN ÖCAL



Özgeçmiş

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 2018 yılında mezun oldum. Aynı yılın Eylül ayında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık-Biyokimya doktora eğitimine başladım. 7 Mart 2022 tarihinde Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya anabilim dalında araştırma görevlisi olarak işe başladım. Halen aynı kurumda çalışmaktayım.

