



**ANTI-OKSİDAN ETKİLİ OLAN DİACEREİN,
SİLAZAPRİL VE BENAZEPRİL'İN İN VİTRO
ANTI-PARKİNSON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Öznur ALTUNLU

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi-2022

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİ-OKSİDAN ETKİLİ OLAN DİACEREİN,
SİLAZAPRİL VE BENAZEPRİL'İN İN VİTRO ANTİ-
PARKİNSON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Öznur ALTUNLU

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

**ERZURUM
2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	10
2. GENEL BİLGİLER.....	12
2.1. Parkinson Hastalığı	12
2.1.1. Parkinson Hastalığı Tanımı ve Tarihçesi.....	12
2.1.2. Parkinson Hastalığı Epidemiyolojisi	12
2.1.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi	13
2.1.3.1. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Yaşlanmanın Rolü.....	13
2.1.3.2. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Cinsiyetin Rolü	13
2.1.3.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Genetik Yatkınlığın Rolü	14
2.1.3.4. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Çevresel Faktörlerin Rolü	15
2.1.4. Patogenez	16
2.1.4.1 Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon	17
2.1.4.2. Protein Agregasyonu ve Yanlış Katlanma	17
2.1.4.3. Nöroinflamasyon	18
2.1.4.4. Eksitoksisite	18
2.1.4.5. Apoptoz.....	18
2.1.4.6. Trofik Faktörlerin Kaybı.....	19
2.1.5 Semptomlar	19

2.1.5.1. Motor Semptomlar	19
2.1.5.2. Motor Olmayan Semptomlar	20
2.1.5.3. PH'nın Motor Semptomlarını Tedavi Etmek İçin Tedavi Seçenekleri.....	23
2.1.5.4. PH'nın Motor Semptomlarını Tedavi Etmek İçin Tedavi Seçenekleri.....	23
2.1.6 Tanı Yöntemleri	23
2.1.7. Güncel tedavi yaklaşımları	25
2.1.7.1. Onaylanmış Oral PH Tedavileri	25
2.1.7.2. Dopamin Agonistleri.....	25
2.1.7.3. Katekol-O-Metiltransferaz İnhibitörleri (COMT-I).....	26
2.1.7.4. Monoamin Oksidaz-B İnhibitörleri (MAO-B)	26
2.1.7.5. Antikolinergikler.....	26
2.1.7.6. Amantadin.....	27
2.1.7.7. α -2a antagonistleri	27
2.1.7.8. Diğer Tedavi Yöntemleri	27
2.1.7.8.1. İmmünoterapiler.....	27
2.1.7.8.2. Nörotrofik Faktörler.....	28
2.1.7.8.3 Rejeneratif Tedaviler	28
2.1.7.8.4. Derin Beyin Stimülasyonu.....	28
2.2. Anti-oksidan ve PH İlişkisi.....	29
2.3. Nöroprotektif ve PH İlişkisi.....	29
2.4. Diacerein.....	30
2.5. Silazapril	31
2.6. Benazepril-HCl	31
2.7. PH ve Deneysel Modeller	31
2.7.1. Nörotoksin modeli	32

2.7.1.1.6-Hidroksidopamin	32
2.7.1.2.Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).....	32
2.7.1.3.Diğer Nörotoksinler	33
2.7.2. Genetik Modeli.....	34
2.8. 6-OHDA ve PH Hücre Kültürü Modeli.....	35
3. MATERYAL VE METOT.....	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	38
3.1.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Kültürü	38
3.1.3. 6 Hidroksi Dopamin (6-OHDA) ile Parkinson Modeli Oluşturma.....	39
3.1.4. MTT Testi	39
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Deney Planı.....	40
3.2.2. Oksidan ve Antioksidan Aktivite Analizleri.....	40
3.2.2.1. Total Antioksidan Durum Testi (TAS) Aktivite Analizi	40
3.2.2.2. Total Oksidan Durum Testi (TOS)	40
3.2.2.3. IL-10 Testi	41
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	68

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmalarım süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, mesleğini hakkıyla yerine getiren öğrencisi ve asistanı olmaktan onur ve mutluluk duyduğum kıymetli hocam, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Tezimin oluşturulmasında deneysel tecrübeleriyle yol gösteren, engin bilgilerini aktaran değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ufuk OKKAY'a, bu yolculukta güler yüzünü, desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Fatma YEŞİLYURT'a ve tüm asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yoğun eğitim ve yaşamım boyunca her daim yanımda olarak gücünü hissettiğim biricik dostum Saadet Hilal ÖNDER'e de teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca bana her zaman destek olan, arkamda duran, varlıklarıyla hayatıma anlam katan, motivasyon ve desteklerini benden esirgemeyen ve üzerimde pek çok emek ve fedakârlıkları olan canım annem Güner ALTUNLU, babam Necmi ALTUNLU'ya ve ablam Özge ALTUNLU'ya çok teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasını TYL-2022-10746 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim

Öznur ALTUNLU

ÖZET

Anti-oksidan Etkili Olan Diacerein, Silazapril ve Benazepril'in İn Vitro Anti-Parkinson Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Parkinson hastalığının patogeneğinde ve semptomatolojisinde nöronal dejenerasyon, oksidatif stres ve glutamaterjik sistemin yer alması, nöroprotektif terapötik yeni hedefler için önemli katkı sağlar. Anti-oksidan ve anti-inflamatuar nitelikte olan diacerein; anormal seviyelerde artmış glutamaterjik iletimi inhibe eder ve proinflamatuar sitokinlerin salınımını ve üretimini azaltmaktadır. Silazapril ve Benazepril ise nöroprotektif, anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Bu çalışmanın amacı antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahip Diacerein, Silazapril ve Benazepril'in SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında 6-OHDA ile indüklenen in vitro Parkinson modelinde oksidatif hasar ve α -sinüklein agregat üzerine tedavi etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada, SH-SY5Y hücre hattında 6-OHDA ile Parkinson modeli oluşturuldu. 3 ayrı plate için 5 doz olacak şekilde deney düzeneği kuruldu. TAS-TOS, MTT ve IL-10 kitleri ile analizi yapıldı.

Bulgular: Kontrol gruplarında canlılık %100 olarak tanımlandı ve diğer gruplar buna göre derecelendirildi. Sadece 6-OHDA toksisitesine maruz kalan grupta canlılık oranları yaklaşık olarak bütün platelerde %70 olarak belirlendi. En yüksek canlılık oranları Diacerein 0.08 μ M, Silazapril 2.5 μ M ve Benazepril 0.16 μ M konsantrasyonlarında belirlenmiştir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. TAC, TOS ve IL-10 testlerimizde de benzer sonuçlar bulunmuştur.

Sonuç: Antioksidan etkileri bulunan 3 ilaçtan her birinin MTT testlerinde 6-OHDA'nın oluşturduğu deneysel Parkinson modeline karşı etkisi saptanmıştır. Bu etkilerin ise sadece antioksidan etkilerden kaynaklanmadığı IL-10 gibi bazı farklı parametreler üzerinden de faydalı etkilerini gösterebildikleri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Benazepril, Diacerein, Nörodejenerasyon, Oksidatif Stress, Parkinson Hastalığı, Silazapril

ABSTRACT

Investigation of In Vitro Anti-parkinsonian Effects of Diacerein, Cilazapril and Benazepril with Anti-oxidant Effects

Objective: The involvement of neuronal degeneration, oxidative stress and glutamatergic system in the pathogenesis and symptomatology of Parkinson's disease makes an important contribution to new neuroprotective therapeutic targets. Diacerein, which is anti-oxidant and anti-inflammatory drug; inhibits increased glutamatergic transmission at abnormal levels and reduces the release and production of proinflammatory cytokines. Cilazapril and Benazepril have neuroprotective, anti-oxidant and anti-inflammatory properties. The aim of this study is to investigate the treatment effects of Diacerein, Cilazapril and Benazepril, which have antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties, on oxidative damage in the in vitro Parkinson model induced by 6-OHDA in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line.

Materials and Methods: In this study, a Parkinson's model was created with 6-OHDA in the SH-SY5Y cell line. The experimental setup was set up to have 5 doses for 3 separate plates. Analysis was done with TAS-TOS, MTT and IL-10 kits.

Results: Viability was defined as 100% in the control groups and the other groups were graded accordingly. In the group exposed only to 6-OHDA toxicity, the viability rates were determined approximately 70% in all plates. The highest viability rates were determined in the concentrations of Diacerein 0.08 μ M, Cilazapril 2.5 μ M and Benazepril 0.16 μ M. These values were found to be statistically significant. Similar results were found in our TAC, TOS and IL-10 tests, as well.

Conclusion: The 3 drugs with antioxidant effects was determined found to have an effect effective against the experimental Parkinson model formed by 6-OHDA in MTT tests. It has been shown that these effects are not only due to antioxidant effects, but also show beneficial effects on some different parameters such as IL-10.

Keywords: Benazepril, Cilazapril, Diacerein, Neurodegeneration, Oxidative Stress, Parkinson's Disease

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DA	: Dopamin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ER	: Endoplazmik retikulum
FBS	: Fetal Bovin Serum
KOMT	: Katekol- o-metil transferaz
L-DOPA	: Levodopa
LN	: Lewy nöritleri
MAO	: Monoamin oksidaz
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MTT	: (3-(4,5-dimethyl thiazole 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide)
NE	: Norepinefrine
NMDA	: N-metil-D-aspartat
6-OHDA	: 6-hydroxydopamine
PH	: Parkinson Hastalığı
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SN	: Substantia Nigra
SNc	: Substantia nigra pars compacta
UPS	: Ubikuitin-proteazom sistem

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. PH'de oksidatif strese yol açan mekanizmalar	15
Şekil 2.2. Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronların nörodejenerasyonu ile ilişkili biyokimyasal olaylar.....	16
Şekil 3.1. Diacerein ilacının MTT sonuçları	43
Şekil 3.2. Diacerein ilacının TAS sonuçları	44
Şekil 3.3. Diacerein ilacınınTOS sonuçları	44
Şekil 3.4. Diacerein ilacının IL-10 sonuçları.....	45
Şekil 3.5. Silazapril ilacının MTT sonuçları.....	46
Şekil 3.6. Silazapril ilacının TAS sonuçları	47
Şekil 3.7. Silazapril ilacının TOS sonuçları	47
Şekil 3.8. Silazapril ilacının IL-10 sonuçları.....	48
Şekil 3.9. Benazepril ilacının MTT sonuçları.....	48
Şekil 3.10. Benazepril ilacının TAS sonuçları	49
Şekil 3.11. Benazepril ilacının TOS sonuçları	50
Şekil 3.12. Benazepril ilacının IL-10 sonuçları.....	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasallar ve çözücüler	38
--	----



1. GİRİŞ

Parkinson Hastalığı (PH), substantia nigra (SN)'daki dopaminerjik nöronların işlevsel bozukluğu sonucu ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır.¹ Parkinson Hastalığı (PH); tremor, bradikinezi, rijidite, postural instabilite ve konuşma güçlüğü gibi motor semptomlar; depresyon, demans ve uyku bozukluğu gibi motor olmayan semptomlar ile ilişkilidir.² Dünyadaki en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalık PH'dir. PH vakalarının %5-10'u genetik kökenli olup yaşlanmayla ilişkilidir. Genel nüfusun yaklaşık %0,3'ünü ve 65 yaş üstü nüfusun %1-3'ünü etkiler.³

PH patolojik olarak, sitoplazmik inklüzyonlar olarak tanımlanan Lewy cisimcikleri, SNC'deki dopaminerjik nöronların kaybı ve α -sinüklein yanlış katlanması ve agregasyonu ile ilişkilidir. Bunlara ek olarak mitokondriyal disfonksiyon, protein klirensinde bozulma (temel ubiquitin-proteazom ve otofaji-lizozomal sistemleri içerir), nöroinflamasyon ve oksidatif stresi gibi çeşitli patofizyolojik süreçler hücre hasarı nöronal eksitotoksisite ve nörodejenerasyon ile sonuçlanır.⁴

Günümüzde PH için hedefe yönelik tedavi yaklaşımları striatal dopaminerjik nörotransmisyonunu arttırmaya yöneliktir.⁵ Temel farmakolojik ajanlar: levodopa (L-3,4-dihidroksifenilalanin, L- dopa) ve dopamin (DA) agonistleri, monoamin oksidaz (MAO) ve katekol- o-metil transferaz (KOMT) inhibitörleri ve NMDA (N-metil-D-aspartat) antagonistleridir. Ancak bu tedavi yöntemleri yalnızca semptomları hafifletir, PH'nin ilerlemesini engelleyemez.^{2,7} PH'li hastaların çoğu, semptomların başlamasından sonraki 2 yıl içinde PH tedavisinde en etkili ilaç olan L- dopa tedavisine ihtiyaç duyar. PH'li hastalarda L-dopa'nın uzun süreli fayda sağlaması, düzenli kullanılmasıyla ilişkilidir. Buna rağmen L-dopa ile ilişkili motor komplikasyonlarının gelişmesi hastalarda endişe uyandırır.^{4,5}

Nöroprotektif ajanlar nörodejenerasyon ile ilişkili patolojik mekanizmaları azaltmayı veya önlemeyi amaçlar.⁶ Antioksidanlar ise merkezi sinir sisteminde redoks/oksidasyon dengesini korur ve oksidatif hasara karşı savaşıır. Antioksidan ve nöroprotektif özelliklere sahip ajanların PH'nin nörodejenerasyonunu önlenmesinde etkili ve büyük fırsatlar sunduğu düşünülmektedir.⁷

PH patogeneğinde glutamaterjik sinir terminallerinin hiperaktivitesi sonucu glutamat konsantrasyonlarında artış, nöronal hasara yol açabilir. Böylece PH ile ilişkili nörodejenerasyonda rol oynayabilir.¹⁰ Anti-oksidan ve anti-inflamatuar nitelikte olan diacerein; anormal seviyelerde artmış glutamaterjik iletimi inhibe eder.⁴ Silazapril ve Benazepril; nöroprotektif, anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir.^{8,9}

Bu tez çalışmasında, 6-OHDA (6-hydroxydopamine) kullanılarak SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında in vitro Parkinson modelinin oluşturulması ve Parkinson patogeneğinde önemli rol oynayan nörodejenerasyon ve oksidatif stres üzerinde daha önce etkileri araştırılmamış Diacerein, Silazapril ve Benazepril 'in nöroprotektif ve anti-oksidan etkinliğinin çeşitli testler ve parametreler aracılığıyla incelenmesi amaçlanmaktadır. Böylelikle hem PH'nin patogenizinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlanacaktır hem de tedavi amacıyla kullanılacak ilaçların tedavi edici etkileri ilk kez yine bu çalışmayla ortaya konulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Parkinson Hastalığı Tanımı ve Tarihçesi

MÖ 1000 yılına ait geleneksel Hint ve eski Çin kaynaklarında yer alan metinlerde PH'yi düşündüren açıklamalara sahiptir. James Parkinson 1817'de yayınladığı “Essay on the Shaking Palsy” makalesinde PH'yi ilk kez tıbbi terimle nörolojik bir sendrom olarak tanımladı.^{11,12} Shaking Palsy'nin yayınlanmasından elli yıl sonra Jean-Martin Charcot istirahatatta titreme, sertlik, yüz hareketsizliği ve bozulmuş yürüyüş ve duruş ile karakterize bir bozukluğu tanımlamak için ilk olarak 'Maladie de Parkinson' terimini kullandı.¹³ 1912'de Frederick Henry Lewy; PH'li bireylerin beyinde intranöronal inklüzyonların, tıbbi terimle “Lewy cisimciklerinin” varlığını bildirmektedir. 1919'da Konstantin Tretiakoff, PH'de SN'nin etkilenen ana yapı olduğunu bildirir. 1957'de Kathleen Monatgu ve Arvid Carlsson, birbirlerinden ayrı olarak dopamini bir nörotransmitter olduğunu, 1960' da Oleh Hornykiewicz, PH'li bireylerin beyinde DA konsantrasyonlarının azaldığını bildirdi. 1967 George Cotzias, L-dopa'yı oral olarak uyguladı. Hastalarda motor iyileşme görüldü. 1997' de PH'nin ilk genetik nedeni belirlendi. (SNCA).¹⁴ PH, DA eksikliğine yol açan substantia nigra pars compacta (SNc)'daki dopaminerjik nöronların nörodejenerasyonu ile ilişkilidir. PH esas olarak α -sinüklein kümelenmelerinden oluşan Lewy cisimcikleri (LB) veya Lewy nöritleri (LN) şeklinde birikmesidir. PH motor ve motor olmayan semptomlar ile kendini gösterir.^{15,16}

2.1.2. Parkinson Hastalığı Epidemiyolojisi

PH, ikinci en yaygın nörodejeneratif bozukluktur ve çoğu vakalarda nedeni tam olarak bilinmemektedir. PH vakalarının %5-10'u genetik kökenli olup yaşlanma ile yakından ilişkilidir.¹⁷ PH'nin dünya çapındaki insidansı tahmini olarak; yılda 100.000 kişi de 5 ila >35 arasında değişmektedir. 50 yaşından önce nadir görülür. 65 yaş üstü

nüfusun %1-3'ünü etkiler. Mortalite ise hastalığın başlangıcından sonraki ilk on yıldan sonra görülür. PH, çoğu popülasyonda erkeklerde kadınlara göre iki kat daha yaygındır. Gen-çevre etkileşimleri, sporadik Parkinson hastalığı riskini kesinlikle değiştirir. Birkaç kayda dayalı çalışma, Afrika kökenli Amerikalılarda Kafkasyalılara kıyasla daha düşük bir PH prevalansı bildirmiştir. Pestisitler ve travmatik beyin hasarı gibi belirli çevresel faktörlere maruz kalan bireylerde PH'nin görülme sıklığı önemli ölçüde fazladır ve sigara içenler veya kafein kullananlarda bu oran daha düşüktür.^{2,3}

2.1.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisi

PH, çok faktörlü nörodejeneratif bir hastalıktır. SNc'deki nöronların ilerleyici dejenerasyonu; motor kortikal alanları ve bazal gangliyonları içeren nöronal devrelerin işlev bozukluğuna yol açar. PH'nin başka önemli bir özelliği ise sinir hücrelerinin içinde gelişen anormal çözünmeyen Lewy cisimciklerinin varlığıdır. PH'de istemli motor kontrolün ilerleyici bozulmasına ek olarak motor olmayan nörodavranışsal anormallikler de bildirilmiştir.¹⁸

2.1.3.1. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Yaşlanmanın Rolü

PH prevalansı yaşla birlikte istikrarlı bir şekilde artar.¹⁸ Patolojik olarak yaşlanma ile SNc 'deki pigmentli nöronlar azalır. Dünya genelinde yaşlanan nüfus ve artan yaşam beklentisi ile Parkinson hastalığı olan kişilerin sayısının 2030 yılına kadar %50'den fazla artması beklenmektedir.¹⁹

2.1.3.2. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Cinsiyetin Rolü

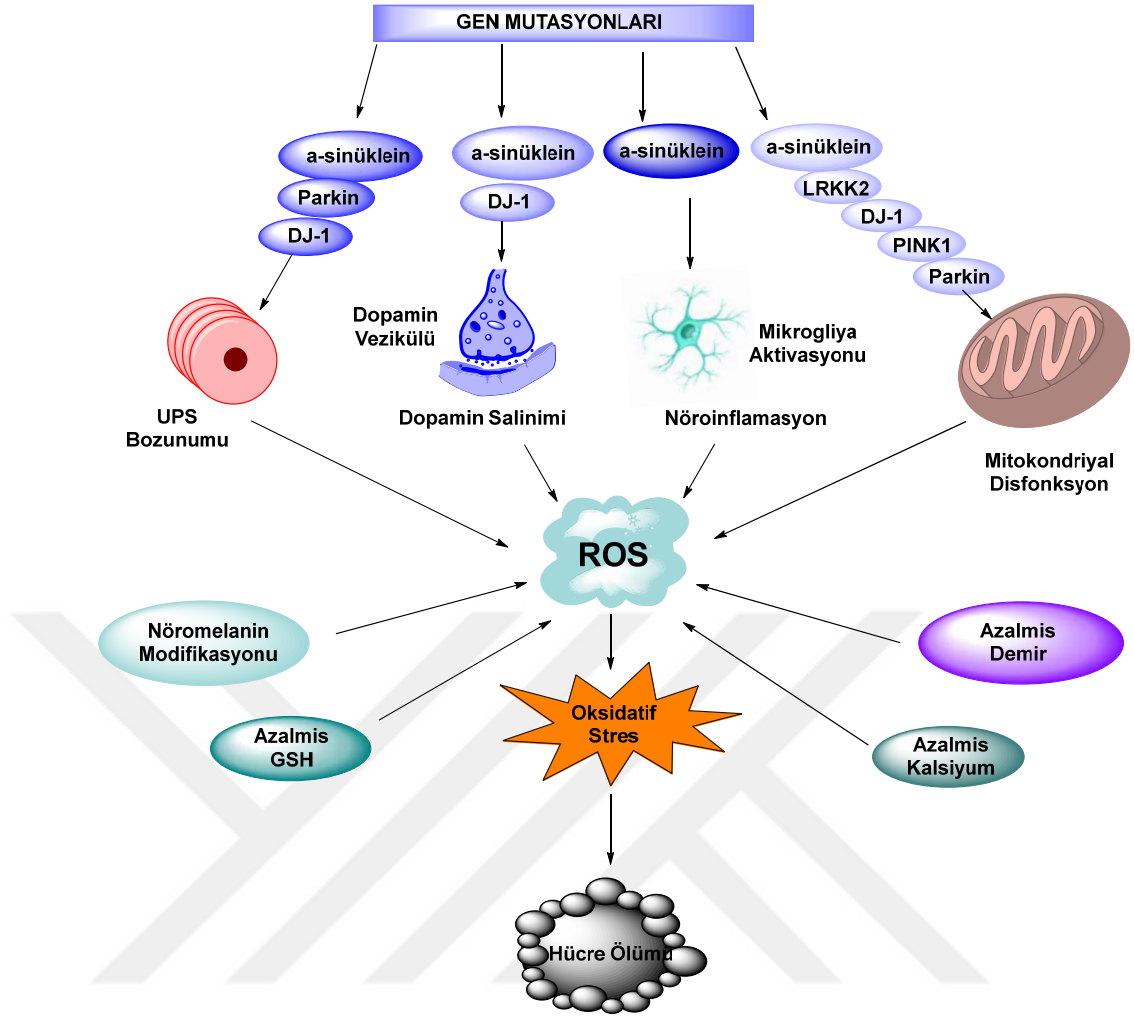
Son zamanlarda yapılan bir meta-analize göre, Parkinson hastalığı her iki cinsiyette yaşa bağlı olarak artmaktadır. 60-69 ve 70-79 yaş grubu erkeklerde bu artış daha fazladır.³ Cinsiyete özgü farklılıkların ortaya çıkmasında; kadın cinsiyet hormonlarının koruyucu etkisi, cinsiyetle ilişkili bir genetik mekanizma veya çevresel

risk faktörlerine maruziyet etkilidir. Cinsiyet farkı, Asya araştırmalarında daha az belirgindir.²

2.1.3.3. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Genetik Yatkınlığın Rolü

Ailesel veya kalıtsal PH formlarındaki gen mutasyonlarının keşfi ve sonrasında yapılan birçok çalışma ile erken başlangıçlı PH vakaların %50'sinden fazlası ve geç başlangıçlı PH formlarının yaklaşık %2-3'ünü PH'nin genetik faktörlerle bağlantılı olduğunu göstermektedir.^{20,21} PH gelişiminde rol oynayan etkili mekanizmalar arasında yanlış katlanmış protein kümelerinin birikmesi, protein klirens yollarının başarısızlığı, mitokondriyal hasar, oksidatif stres, eksitotoksisite, nöroinflamasyon ve genetik mutasyonlar yer alır.²⁰ PH ile ilgili en yaygın genler SNCA, parkin, DJ-1, PINK1 genleridir. Ek olarak PH gelişiminde artışla bağlantılı beş farklı kromozom (5, 6, 8, 9 ve 17)'unda etkili olduğunu göstermektedir.²¹

α -sinüklein geninin (SNCA) dozajı parkinsonizmden sorumludur. İlk olarak ailesel PH formuna *SNCA/PARK1* geni tarafından kodlanan α -sinüklein'deki yanlış anlamlı mutasyon (A53T)'u neden olmaktadır. Daha sonra, α -sinükleinin N-terminalinde bulunan A30P, E46K, H50Q, G51D ve A53E dâhil olmak üzere birden fazla hatalı nokta mutasyonları da tanımlanmaktadır. α -sinüklein mutasyonları, bir dizi hücre içi sinyal programını değiştirirler. Bu nedenle dopaminerjik nöronlar için toksiktir. Böylece α -sinüklein ekspresyonunun azaltılması potansiyel bir terapötik yaklaşım sağlayabilir.²¹



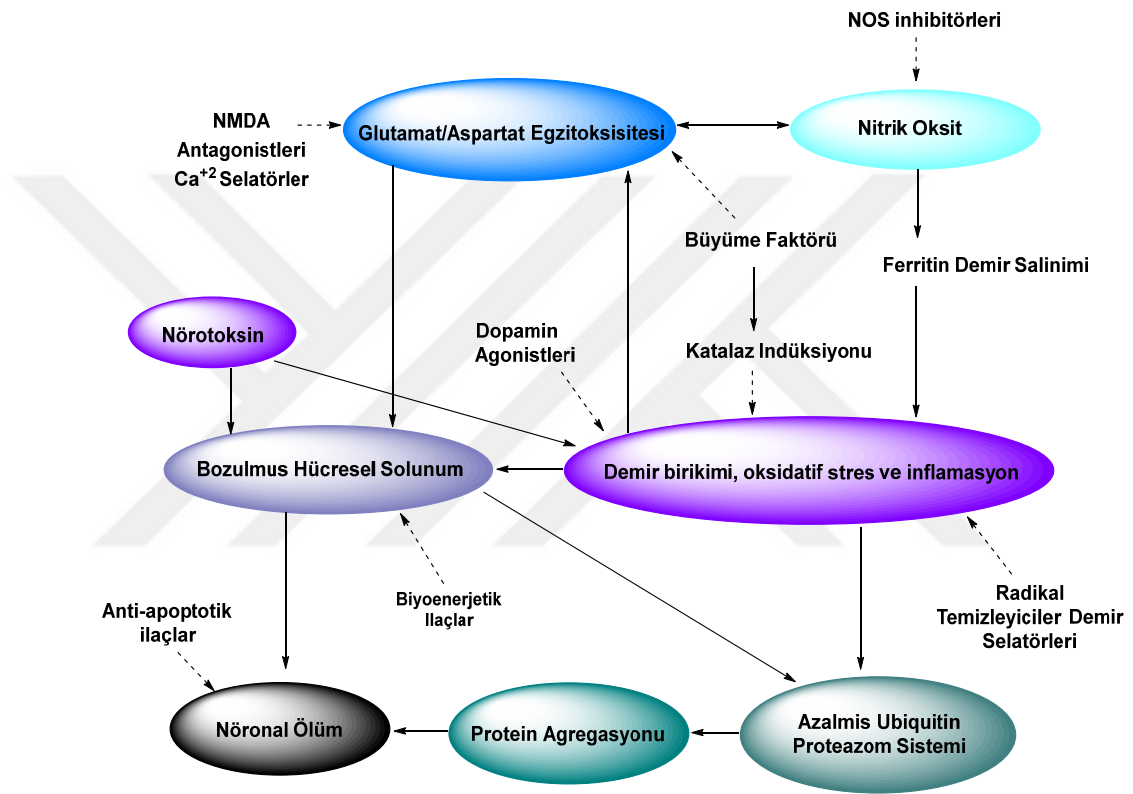
Şekil 2.1. PH'de oksidatif strese yol açan mekanizmalar

2.1.3.4. Parkinson Hastalığı Etiyolojisinde Çevresel Faktörlerin Rolü

MPTP, klinik olarak L-dopa'ya duyarlı parkinsonizm gelişimi ile doğrudan bağlantılı olan tek çevresel ajandır. Yanısıra pestisit maruziyeti, kırsal alanlarda (sanayileşmiş ülkelerde) yaşamak ve kuyu suyu içmek PH ile yakından ilişkilidir. 1918'de *Encephalitis lethargica* salgını, “influenza pandemisi” ile geçici olarak ilişkilendirilmektedir. Etkilenen bireylerin bir alt kümesi, ensefalitik sonrası parkinsonizm geliştirdi.^{22,23}

Çözücüler ve PH ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar az sayıdadır ve bulgular tutarsızdır. Birçok metalin ürettikleri reaktif oksijen türleri (ROS), dopaminerjik nöronlarda yoğunlaşarak nöromelanini bağlar. Veriler kurşun için güçlü olsa da metallere

maruziyetin PH riskini artırıp artırmadığı net değildir, Beyin sarsıntısına yol açan kafa travması ile sınırlı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir meta-analiz de pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir. Yaşam stresi nörotoksik etki göstererek PH ve diğer nörodejeneratif bozukluklar için bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür. Fiziksel aktivitenin bir dizi kronik hastalık için (kardiyovasküler hastalık, kanser ve diyabet gibi) koruyucu olduğu bilinmektedir, PH'ye karşı koruyucu etkisi son 10 yılda güçlenmiştir.²⁴



Şekil 2.2. Parkinson hastalığında dopaminerjik nöronların nörodejenerasyonu ile ilişkili biyokimyasal olaylar. (Noktalı çizgiler, ilaca bağlı nöroproteksiyon için potansiyel hedeflerdir. NOS = nitrik oksit sentaz.)

2.1.4. Patogenez

PH patogenezinin oluşmasında, genetik ve çevresel faktör ve bunların etkileşimi önemli rol oynar. PH patogenezine katkıda bulunabilecek temel mekanizmalar şunlardır: hücresel stres yoluyla ROS üretimi, mitokondri disfonksiyonu, endoplazmik retikulum (ER) stresine bağlı anormal protein katlanması, anormal sitoplazmik protein inklüzyonları, nöroinflamasyon, hücre ölümü ve trofik faktörlerin kaybıdır.²⁵

2.1.4.1 Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon

Reaktif oksijen türleri (ROS), düşük/orta konsantrasyonlarda hücre fonksiyonlarını düzenlemede önemli rol oynarlar. Ancak canlı organizmalar için serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas denge, çok önemlidir. Bu denge “redoks düzenlemesi” adı verilen mekanizmalarla sağlanır. Fazla üretildiği takdirde oksidatif strese neden olabilir. Toksik ROS, diğer hücresel bileşenlere bağlanabilir ve normal hücresel fonksiyonlarını yok edebilir. Cevap niteliğinde antioksidan savunmaları harekete geçerek mekanizmayı alt edebilir.

Beyin, yüksek ve önemli bir oranda sabit oksijen seviyesine ihtiyaç duyar. Bu nedenle, beyinde bulunan serbest radikallerin ve düşük seviyedeki antioksidan moleküllerin varlığı, beyni oksidatif hasara karşı savunmasız hale getirir. İnsan PH beynine bakıldığında artan miktarda lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresle ilgili moleküller gösterilmiştir.^{25,26}

2.1.4.2. Protein Agregasyonu ve Yanlış Katlanma

Memeli hücrelerinde ER, stoplazmada bir organel olup protein katlanmasında önemli rol oynar. Aşırı ekspresyon veya olağandışı post-translasyonel modifikasyonlar ve mutasyon, nedeniyle yanlış katlanmalar meydana gelebilir. Böylece ER'de stres oluşur. ER'de oluşan stres şiddetli olduğunda, hücre ölüm programı etkinleşir. Hücrede bulunan yanlış katlanmış proteinlerin veya diğer mutant proteinlerin etkilerine karşı diğer hücre elemanları gibi nöronlar da hassastır. PH gibi nörodejeneratif bozukluklarda, ER'de olağandışı kümelenme ve yanlış katlanmış protein birikimi gözlenir. Bu proteinler nöronlar için zararlıdır. PH'ye yol açan anahtar mekanizmalar arasında aşırı miktarda α -sinükleinin veya α -sinükleinin klirensinin eksikliğinin ve diğer yanlış katlanmış proteinlerin varlığı tespit edilmektedir.

2.1.4.3. Nöroinflamasyon

PH patolojisinin anahtar özelliklerinden birisi de nöroinflamasyondur. Yapılan birçok çalışma da PH'li insan beyinlerinde SN ve striatumda mikrogliya aktivasyonunu söz konusudur. Ek olarak IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin; BOS ve bazal ganglionlarında arttığı da bulunmuştur. Yakın zamanda yapılan *in vitro* çalışmalarda, nitratlanmış ve kümelenmiş α -sinüklein formları gibi farklı kimyasal konformasyonların mikrogliyal aktivasyonu indükleyebildiği ve hücreler için toksik olan daha fazla kimyasalı serbest bırakabildiği bildirilmiştir.²⁵

Nörodejeneratif hastalıklar hücre içi inklüzyon cisimciklerinin oluşumu, anormal protein-protein etkileşimleri, anormal protein katlanmasından ve/veya ubiquitin-proteazom sisteminin (UPS) düzensizliğinden kaynaklanabilir. 'Proteinopatiler' olarak adlandırılan bu yapılar şimdilerde nörodejeneratif hastalığında, nöronal disfonksiyon ve nöronların ölümünde temel bir rol oynadığı düşünülmektedir.²⁷

2.1.4.4. Eksitoksisite

Glutamat, memeli merkezi sinir sisteminde anahtar nörotransmitterdir. Eksitotoksik süreçte temel rol oynar. SN'nin dopaminerjik nöronlarında glutamat reseptörleri bol miktarda bulunur. Hücre ölümünü indüklemek için glutamat, NMDA reseptörünü aktive eder. Takiben peroksinitrit üretilir ve sonrasında hücre içi kalsiyum seviyesi artar. Bu nedenle, peroksinitrit anyonu olan 3-Nitrotirozinin, PH'nin SN'sinde anormal derecede yüksek bulunur.

2.1.4.5. Apoptoz

Apoptoz, nöral hasarda anahtar rol oynar. Apoptozun PH'deki rolü tartışmalı olmakla birlikte, yapılan birçok çalışmada hem apoptotik hem de otofajik hücre ölümü gösterilmektedir. Bu nedenle, apoptotik veya hücre ölümü yollarını inhibe edebilen ajanlar, PH'de nöroprotektif ajanlar olarak kullanılabilir.

2.1.4.6. Trofik Faktörlerin Kaybı

Son zamanlarda, nörotrofik faktörlerin hücrelerin hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı ve bu faktörlerin eksikliğinde PH'de hücre ölüm yollarının tetiklendiği tespit edilmiştir. PH'ye maruz kalmış insan beyninin nigrasında BDNF, GDNF ve NGF gibi faktörlerin hepsinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Büyüme faktörleri, dopaminerjik nöronların büyümesini ve çoğalmasını uyarabildikleri için, nöroprotektif ajanlar olarak ideal olabilirler.²⁵

2.1.5 Semptomlar

2.1.5.1. Motor Semptomlar

PH ilk olarak genellikle motor semptomlarla teşhis edilir.²⁸ Dopaminerjik nöronların striatumdaki seçici kaybı, motor kontrolün bozulmasına yol açar. PH' nin motor system yolağı; birincil motor korteks, ek motor alan, singulat motor korteks ve premotor korteksten gelen ve striatal orta dikenli nöronların dendritleri üzerinde sonlanan kortikostriatal projeksiyonlardan oluşur.²⁹

Bradikinezi

Anatomik olarak defisit putamen ve globus pallidus'ta lokalize gibi görünmektedir. Bradikinezinin patofizyolojisi iyi tanımlanmış olmamasına rağmen DA eksikliğinin derecesi ile ilişkili olan temel PH özelliğidir. Hareket etmenin başlangıcında gereken kas kuvvetinde bir azalma ile sonuçlanır.

Tremor

Dinlenme tremoru, PH'nin en yaygın semptomudur. Tremorlar tek taraflı olup çoğunlukla ekstremitenin distal kısmında belirgindir. Bir elden diğerine yayılan el titremeleri, "supinasyon-pronasyon ("pill-rolling")" titremeleri olarak tanımlanır. PH'li hastalarda dinlenme tremoru; dudakları, çeneyi ve bacakları etkiler. Bazı hastalarda bir "iç" sarsıntı şeklinde titreme ile ilişkili olmayan bulgulara görünür. İstirahat tremoruna

ek olarak, daha belirgin ve engelleyici olan postural tremor (“re-emergent tremor”)’ da vardır. Klasik dinlenme tremoru ile aynı frekansta meydana gelip dopaminerjik tedaviye yanıt verdiği için istirahat tremorunun bir varyantını temsil edebilir.

Rijidite

Rijidite, PH'nin en sık görülen ilk belirtilerinden biridir. Bir uzvun pasif hareketi (eklem etrafında fleksiyon, ekstansiyon veya rotasyon) boyunca mevcuttur. Proksimalde (örneğin boyun, omuzlar, kalçalar) ve distalde (örneğin bilekler, ayak bilekleri) ortaya çıkabilir. Ağrı ile ilişkili olabilir.

Postural instabilite

Genellikle PH'nin geç evrelerinde diğer klinik özelliklerin başlangıcından sonra ortaya çıkan bir semptomdur. Anormal eksenel duruşlara (anterokollis, skolyoz) neden olan boyun ve gövde sertliği (eksenel sertlik) meydana gelebilir. Boyun ve gövde duruşunun bükülmesine ve dirseklerin ve dizlerin bükülmesine neden olan postüral deformiteler genellikle rijidite ile ilişkilidir. PH'li hastalarda diğer parkinson semptomları, ortostatik hipotansiyon, yaşa bağlı duyuşal değışiklikler gibi başka faktörler de postüral instabilite oluşumunu etkilemektedir.³⁰

2.1.5.2. Motor Olmayan Semptomlar

Dopaminerjik kaynaklı olmayan hücre işlev bozuklukları motor olmayan semptomların gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. PH'deki motor olmayan semptom kompleksinin çoğusunun nöroanatomik ve nörokimyasal substratları bilinmemektedir.

Parkinson hastalığının motor olmayan semptom kompleksi

Nöropsikiyatrik semptomlar;

- Depresyon, ilgisizlik, kaygı
- Deliryum (ilaç kaynaklı olabilir)

- Bunama
- Dikkat eksikliği
- Saplantılı davranış (genellikle ilaca bağlı), tekrarlayıcı davranış
- Anhedonia
- Panik ataklar
- Bilinç bulanıklığı, konfüzyon
- Halüsinasyonlar, illüzyonlar, sanrılar

Uyku bozuklukları;

- Uykusuzluk hastalığı
- REM atoni kaybı ve uyku davranış bozukluğu
- Düzensiz solunum
- Canlı rüya
- REM uykusuna bağlı olmayan hareket bozuklukları
- Huzursuz bacaklar ve periyodik uzuv hareketleri
- Gündüz aşırı uyku hali

Otonom semptomlar;

Mesane bozuklukları

- Sıklık
- Terlemek
- Aciliyet
- Noktüri

Cinsel işlev bozukluğu

- Kuru gözler (kserostomi)
- Eretil disfonksyon
- Hiperseksüalite (ilaç kaynaklı olması muhtemel)

Ortostatik hipotansiyon

- Ortostatik hipotansiyona baęlı dűşmeler
- Elbise askısı ağrısı

Gastrointestinal semptomlar;

- Tűkűrűk damlaması
- Kabızlık
- Disfaji ve boęulma
- Fekal inkontinans
- Yetersiz bağırsak boşaltma
- Reflü, kusma
- Ageusia
- Mide bulantısı

Duyusal semptomlar;

- Koku alma bozukluğu
- Ağrı
- Parestezi

Diğer semptomlar;

- Bulanık ve çift görme
- Tűkenmişlik
- Kilo kaybı
- Sebore
- Kilo alımı.³¹

2.1.5.3. PH'nın Motor Semptomlarını Tedavi Etmek İçin Tedavi Seçenekleri

DA ve öncüllerinin yapıları ve bazı DA düzenleyici terapötikler motor semptomların tedavisi için kullanılmaktadır. DA agonistleri, MAO-B COMT inhibitörleri, Amantadin v.b.

2.1.5.4. PH'nın Motor Semptomlarını Tedavi Etmek İçin Tedavi Seçenekleri

Depresyon ve Anksiyete için;

- Benzodiyazepin,
- SSRI,
- SNRI,
- Trisiklik antidepresan (TAD),
- Ek Anksiyete ilaçları (Buspiron v.b.)
- Diğer antidepresanlar (Bupropion, Mirtazpin)

Aşırı salya için;

- Glikopirolat
- Botulinum toksin A/B

Gastrointestinal Sorunlar;

- Mide bulantısı ve kusma (Ondansetron)
- Kabızlık (Lubiproston)³²

2.1.6 Tanı Yöntemleri

PH; başlama yaşı, klinik prezentasyon, ilerleme hızı ve tedaviye yanıt açısından oldukça heterojen nörodjeneratif bir hastalıktır. PH için tanı koymak zordur. Çünkü tanı testleri ve biyobelirteçler hastalığın erken evrelerinden kesin bir tanıya izin vermemektedir.³³ Genellikle iki veya daha fazla motor bulgunun (bradikinezi içermesi gerekir) varlığı ve L-dopa'ya tutarlı bir yanıtı içermesi gerekmektedir. PH tanısı için popülasyona dayalı çalışmalarda hastaların %15'inin klinik kriterleri karşılamadığını ve

klirik bakıı altındaki hastaların %20'sinin ise tespit edilmediğini göstermiştir. Otopsi çalışmalarında progresif supranükleer felç (PSP), multisistem atrofi (MSA) veya kortikobazal dejenerasyon gibi dejeneratif parkinsonizmler gibi yaygın yanlış tanıları konulmaktadır.³⁴ Bu nedenle PH alt tiplerinin daha iyi tanımlanması gerekmektedir. PH'nin hastalık mekanizmaları farklılık gösterdiği için kişiye özgü tedavi yaklaşımları elzemdir.

Uluslararası Parkinson ve Hareket Bozukluğu Derneđi (MDS) son on yılda yaygın olarak kullanılan Queens Square Beyin Bankası (QSBB) bir dizi kriter önermiştir. Bu kriterler, bradikinezi ve en az bir ek kardinal motor özelliğin (rijidite) varlığı ile tanımlanan bir PH sendromunu gösteren uzman klinik nörolojik muayeneye ve ayrıca destekleyici ve dışlayıcı özelliklerin uygulanmasına dayanır. MDS kriterlerinin bir doğrulama çalışmasında, “klinik olarak olası PH” teşhisi için; duyarlılık (%96) ve özgüllük (%95) göstermiştir.

PH veya alternatif bir teşhisi desteklemek için oluşturulmuş yaygın yardımcı testler;

1. Ölçek

- a. Koku İşlevi (UPSIT; Sniffin Sticks)

2. Görüntüleme

- a. Yapısal MRG
- b. MR-DWI
- c. DAT-SPECT
- d. MIBG-SPECT
- e. FDG-PET

3. Transkraniyal Ultrason

4. Genetik test

Sonuç olarak, genetik, Parkinson hastalığı teşhisinin geleceğinde önemli bir rol oynayacaktır.³³

2.1.7. Güncel tedavi yaklaşımları

PH, birçok motor ve motor olmayan özellikten oluşan bir hareket bozukluğu ile karakterize yaygın bir nörodejeneratif hastalıktır. Motor özelliklerinin çoğu, SNc'deki dopaminerjik nöronların kaybından kaynaklanır: Bu nedenle, PH için mevcut farmakolojik tedavi yaklaşımlarının çoğu, striatumdaki dopaminerjik hasarı düzeltmeyi amaçlar.³⁵

2.1.7.1. Onaylanmış Oral PH Tedavileri

DA öncüleri PH semptomlarının tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir. L-amino asit dekarboksilaz (AADC) enzimi ile biyosentetik olarak dopamin'e dönüştürülen levodopa (L-dopa), PH hastalarında DA seviyelerini artırmak için yaygın olarak kullanılır. L-dopa, 1967'de piyasaya sürülmüştür. Sistemik yan etkileri (bulantı, hipotansiyon ve terleme)'ni önlemek amacıyla genellikle L-dopa karbidopa ile kombine edilmektedir.^{36,37} Motor dalgalanmalar PH'nin yaygın bir komplikasyonudur. L-dopa tedavisinden yaklaşık 5 yıl sonra hastalarda "On-Off" dönemi gelişir. "On-Off" fenomeninde, fonksiyonel dopamin (DA) seviyeleri striatumda dalgalanır. Dakikalar içinde bir kişiyi hareketlilik ve hareketsizlik döngüsü içerisinde bırakarak hastayı neredeyse hareketsiz konumda bırakır.³⁸

2.1.7.2. Dopamin Agonistleri

DA agonistleri DA reseptörlerini agonize ederek dopaminin etkilerini yükseltirler. Beyinde beş tip DA reseptörü vardır; D1, D2, D3 ve D4 ve D5. Bazal ganglionlarda var olduğu bilinen; D1 ve D2 reseptörleri istemli hareketten sorumlu olup D3 reseptörünün kesin işlevi bilinmemektedir. D3, D4 ve D5 reseptörleri, beynin limbik sistem gibi bölgelerinde bulunur. Bu nedenle PH'de görülen bilişsel ve duygusal değişikliklerde rol

oynayabilir. PH tedavisi için reçete edilen onaylanmış DA agonist ilaçları arasında; apomorfin, bromokriptin, ropinirol, pramipeksol ve rotigotin yer alır. Bu moleküllerin her biri en güçlü etkilerini D2 reseptörleri üzerinde gösterirler. En sık reçete edilen DA agonist ilaçları pramipeksol ve ropiniroldür. Yapılan son çalışmalara göre DA reseptör agonistleri; "nöro-koruyucu" veya hastalığı modifiye edici bir rol içerebilir. Böylece PH tedavisinde tercih edilebilirlikleri daha da artmaktadır.

2.1.7.3. Katekol-O-Metiltransferaz İnhibitörleri (COMT-I)

COMT, dopamini 3-metoksitiramine (3-MT) dönüşmesini katalize eden bir enzimdir. COMT'un inhibisyonu, beyinde DA seviyelerinin artmasına, motor semptomların azalmasını sağlar (Entakapon ve tolkapon). Entakapon kullanımı daha yaygındır. Yarı ömrü kısa olduğu için etkisi de kısa sürmektedir.

2.1.7.4. Monoamin Oksidaz-B İnhibitörleri (MAO-B)

Beyinde MAO-B'nin inhibe edilmesi sonucunda sinapta DA seviyeleri artırılarak semptomatik iyileşme sağlanır. PH tedavisi için onaylanan ilk MAO-B inhibitörü selegeline'dir. DA konsantrasyonlarını artırmak için PH tedavisi için terapötik rejime dâhil edilmiştir. Onaylı MAO-B inhibitörleri arasında rasagilin' de bulunur. Her iki ilaçta geri dönüşü olmayan inhibitörlerdir

2.1.7.5. Antikolinerjikler

Antikolinerjikler (Benzatropin, triheksifenidil), doğrudan dopaminerjik sistem üzerinde etki etmeyip asetilkolinin aktivitesini modüle ederek PH'de tremor ve distoni üzerinde faydalı etki gösterebilirler. Yan etki potansiyeli nedeniyle de genellikle dopaminerjik ajanlara dirençli tremor tercih edilirler. Antikolinerjik ajanların yan etkileri arasında bulanık görme, kuru mukus zarları , idrar retansiyonu ve bilişsel/zihinsel durum değişiklikleri yer alır.

2.1.7.6. Amantadin

Geçmişte anti-viral terapi olarak kullanılan, PH’de ise diskineziyi hafifletmek için reçete edilen bir NMDA tipi glutamat reseptör antagonistidir. PH’nin erken evrelerinde faydalıdır. Tremor üzerine büyük etki gösterir. Mental durum değişiklikleri, alt ekstremitte ödemi ve livedo retikularis ilacın yan etkileri arasındadır.^{36,37}

2.1.7.7. α -2a antagonistleri

α -2a reseptörleri, Striatopallidal nöronlarda lokalizedir. Daha çok D2 reseptörleri ile birlikte lokalize olurlar. α -2a antagonistleri, α -2a reseptörlerine etki ederek striatal pallidal nöronlarının aşırı aktivitesini azaltırlar. Böylelikle anti-parkinson etkilerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir.³⁶

2.1.7.8. Diğer Tedavi Yöntemleri

2.1.7.8.1. İmmünoterapiler

α -sinüklein, veziküler taşımanın işlev bozukluğunu, lizozom-otofaji sistemindeki bozulmaları, mitokondriyal işlev bozukluğunu ve oksidatif stress gibi patojenik mekanizmalara neden olur. α -sinükleinin yayılmasını engellemek için hücre dışı α -sinükleini hedef alacak ve parçalayacak özel antikorlar üretmek için deneysel bir yaklaşımlar düşünülmektedir. Böylece komşu hücrelerin enfekte edilmesi de önlenmektedir.

Faz I klinik deneylerinde olan α -sinükleinin (prasinezumab veya PRX002, Prothena) C-terminalini hedefleyen bir monoklonal antikorun, serbest serum α -sinükleini yaklaşık %97 oranında azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca α -sinükleinin N-terminal kısmını hedefleyen başka bir antikor şuan da faz II denemesinde olup, α -sinüklein patolojisinin yayılmasını azaltmaktadır.

Ancak hedef antikorların kullanımlarında; kan-beyin bariyerini geçme ve beyindeki α -sinüklein homeostazını etkileme yeteneği, işlevi tam olarak anlaşılmayan bol

miktarda bulunan α -sinüklein proteininin fizyolojik işlevinin baskılanmasının zararlı olabileceği gibi potansiyel bir takım engelleyiciler vardır. Bu nedenle güvenliğinin uzun vadeli değerlendirilmesi önemlidir.

2.1.7.8.2. Nörotrofik Faktörler

Glial hücre türevi nörotrofik faktör (GDNF), glial hücre dizisinden türetilir. Dopaminerjik nöronlar üzerinde faydalı etkileri olduğu için nöroprotektif tedavilerin geliştirilmesinde büyük ilgi odağıdır.

Bir GDNF analogu olan Neurturin de hastalarda denenmiştir. Yakın zamanda ajanın, hastalar için terapötik faydaları olup olmadığını söylemek için henüz çok erken olmasına rağmen, önemli yan etkiler olmaksızın verilebileceği bildirilmiştir.

2.1.7.8.3 Rejeneratif Tedaviler

Yukarıda açıklanan farmakolojik yaklaşımlarına ek olarak, kayıp dopaminerjik nöronlara yönelik hücre bazlı ve gen terapilerinin kullanımı büyük ilgi odağıdır. Bu tedavilerin amacı, mevcut dopaminerjik tedavilere nazaran daha hedefe yönelik olup önceki fizyolojik yapısına geri döndürmektir. Bu yaklaşımların birçoğu şuan klinik deneylere girmektedir.

Kök hücreler, hastalara dopaminerjik nöron progenitör hücre kaynağı sunar ve klinik denemeleri şu anda devam etmektedir. Partenogenetik kök hücre, türevli nöral kök hücreleri içerir. Denemeleri birkaç yıldır devam eder. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (iPSC'ler) üretilen dopaminerjik progenitörlerin Japonya'da klinik denemesi başlamıştır. Çin'de ise embriyonik kök hücre (ESC) türevli hücreleri içeren denemeler devam etmektedir.

2.1.7.8.4. Derin Beyin Stimülasyonu

Derin beyin stimülasyonu (DBS), subtalamik çekirdek ve globus pallidus internus dahil olmak üzere subkortikal yapıları uyaran elektrotların cerrahi implantasyonunu

içerir. Dopamine bağımlı motor semptomların tedavisinde ve levodopanının neden olduğu yan etkiler üzerine yararlıdır. Özellikle PH için bir başka yerleşik bir tedavidir. DBS, tremor dışındaki dopamine dirençli semptomlar (yürüme bozukluğu ve postural instabilite)'a karşı kötü yanıt verir.^{35,39}

2.2. Anti-oksidan ve PH İlişkisi

Redoks dengesinin korunması nöronal hayatta kalmak için önemli bir faktördür. PH'nin patogenezinde ve ilerlemesinde rol oynayan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da, dopaminerjik nöronlardaki dejenerasyonda oksidatif stres önemli bir rol oynar. ROS beyinde esas olarak; DA metabolizması, mitokondriyal disfonksiyon ve nöroinflamasyondan sorumludur. Böylece PH nörodejenerasyonuna katkıda bulunur. Bu nedenle koruyucu süreçlerin düzenlenmesinde yer alan mekanizmalar, önemli bir araştırma odağı olmuştur.

PH ile ilgili yapılan son deneysel çalışmalar, nöronal dejenerasyonun moleküler yollarına daha önce bilinmeyen mekanizmaların altını çizmiştir. Sonuçlar, şimdiye kadar elde edilen terapötik tasarımlardır (L-dopa, DA agonistleri, MAO-B ve KOMT inhibitörleri, NMDA antagonistleri v.b). Bugüne kadar hayvan modelleri ve klinik deneylerden alınan sonuçlara rağmen; hastalığın ilerlemesi üzerinde bir etki gösterilmemiştir.⁴⁰

2.3. Nöroprotektif ve PH İlişkisi

Nöroproteksiyon, oksidatif stresi, nöroinflamasyonu, mitokondriyal disfonksiyonu, eksitotoksisiteyi, protein yanlış katlanmasını, yıkıcı otofajiyi ve apoptoz gibi nörodejenerasyona sebebiyet verecek olayları sınırlayarak nöronal hasarı önlemede yetkindir. Böylece PH'nin ilerlemesini yavaşlatarak terapötik stratejiye öncülük etmektedir. Güvenilir bir nöroprotektif ajan; PH hayvan modellerinde ve daha sonra klinik deneylerde, fonksiyonel nigral dopaminerjik nöronların korunması, apoptotik

hücre ölümünü azaltarak ve glutasyon bağımlı antioksidan sistemleri aktive etmesi, motor disfonksiyonunu azaltması gibi niteliklere katkıda bulunması gerekir.⁶

PH'nin ilerlemesini yavaşlatmak için nöroprotektif ajanlar umut verici sonuçlar yansıtmaktadır. PH ve nöroprotektif çalışmalar incelendiğinde kafein, Koenzim Q10 (CoQ10), kreatin, minosiklin ve rasagilin, nörodejeneratif hastalıkları önlemede en iyi adaylar olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, mevcut araştırmalar PH'de nöroproteksiyon için en umut verici ajanların; minosiklin, kreatin ve rasagilin'in olduğunu ve üçünün de şu anda Faz III denemelerinde olduğunu göstermektedir. PH için umut verici diğer nöroprotektif ajanlar; nikotin, kafein, ibuprofen ve DHA, melatonin, D,E ve C vitamini, NSAID'ler, aspirin, GSH, CoQ10 olarak gösterilmektedir. Geriye kalan ajanlardan IP6, riboflavin, beta-karoten, Liraglutide, Ex-4, Phenylbutirate ve Isradipine, PH riskini azaltmada umut verici sonuçlar gösterir. Yine de insanlarda nöroprotektif olup olmadıklarını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.⁴¹

2.4. Diacerein

Dünya çapında 20 yıldır farklı endikasyonlarla ilgili birçok çalışma da umut verici farmakolojik etkiler göstermiştir. Nefrotoksisite ve böbrek hasarını koruyucu etki içerir, glisemik kontrol, insülin duyarlılığında ve glukoz toleransında iyileşme, anti-nöropatik ağrı, anti- inflamatuvar, anti-ülseratif kolit, testis hasarı koruyucu etki, servikal hiperkeratoz önleyici etki, kanser önleyici etki, hepatoprotektif etki, epidermolizis bülloza, tiroid disfonksiyonu ve intervertebral disk dejenerasyonu gibi bulgulara terapötik bir rol oynar.⁴² Ek olarak anti-osteoartrit,⁴³ anti-oksidan, anti-apoptoz ve glutamaterjik iletimi inhibe ederek antinöroseptif etki de gösterir.⁴² Parkinson hastalarından alınan serumda ve BOS'ta IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ ve TNF- α sitokin seviyeleri artar.⁴⁴ Yanısıra diacerein kullanım sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin

(interlökin-1 β [IL-1 β] ve tümör nekroz faktör alfa [TNF- α] gibi) salınımını ve üretimini azalttığı görülmüştür.⁴⁵

2.5. Silazapril

Güçlü ve uzun etkili ACE inhibitörü ilaçtır.⁴⁶ Anti-oksidan etkilidir.⁴⁷ Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör ilaçlarının, bradikinin yıkımını engellemesi sonucu mitokondriyal adenozin trifosfata duyarlı potasyum kanallarını açtıklarından dolayı nöroprotektif etkilerinin oldukları düşünülmektedir.⁴⁸ Ek olarak antioksidan etkilerinden dolayı da nöroprotektif etkileri olduğu düşünülmektedir.⁸

2.6. Benazepril-HCl

İntraserebral kanama, eksitotoksisite ve diyabetle ilişkili bilişsel hasarlar üzerindeki nöroprotektif etkilerine ek olarak melanom, renal iskemi-reperfüzyon hasarı ve pulmoner hipertansiyona karşı etkileri ile de doğrulanan antioksidan özellikler sergileyen ACE inhibitörü ilaçtır.⁹

Antioksidan, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bilinen Diacerein, Silazapril ve Benazepril 6-OHDA ile indüklenmiş SH-SY5Y hücre hattında etkinliğini araştıran herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir.

2.7. PH ve Deneysel Modeller

PH, SNc nörodejenerasyon sonucu dopaminerjik nöronların sayısının azalmasıyla karakterize, motor ve motor olmayan semptomları içeren en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir.

PH hayvan modellemeleri yöntemi dört kategoriye ayrılır;

1. Nörotoksin modeli,
2. Genetik model,
3. Nörotoksin ve genetik model
4. Diğer model grupları

Nörotoksin model grubu, herhangi ilaç enjeksiyonu kullanılarak yapılan hayvan modellerini içerir. Genetik model ise, herhangi bir gen manipülasyonu ile yapılan hayvan modelleridir.

2.7.1. Nörotoksin modeli

Dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna birçok farklı toksin sebep olabilir. Toksinlerin çoğusu, Kompleks I'ı güçlü bir şekilde inhibe edebilir veya mitokondri üzerindeki etkileri yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırabilir.

2.7.1.1. 6-Hidroksidopamin

Nörotoksin, 6-OHDA, yapısal olarak DA ve norepinefrine (NE) benzer. Nöronların içine girdikten sonra kolayca oksitlenir ve toksik olan hidrojen peroksit ve parakinon üretir. 6-OHDA, kan-beyin-bariyerini kolayca geçmez, ancak doğrudan beyne uygulandığında, spesifik olarak DA ve NE nöronlarını ve bunların terminallerini öldürür. 6-OHDA, enzimatik olmayan hızlı bir oto-oksidasyona uğrayarak; hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri, kinonlar ve hidroksil radikalleri üretir. Mekanizma tam olarak anlaşılmasa da, bu reaktif oksijen türlerinin neden olduğu stresin 6-OHDA'dan kaynaklandığı düşünülmektedir ve bu modelde Lewy ile ilişkili patoloji yoktur. Bazı bileşiklerin nöroprotektif işlevini incelemek için 6-OHDA modelleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır 6-OHDA modeli PH patolojisini mükemmel bir şekilde taklit ettiği bilinmektedir.^{49,50,51}

2.7.1.2. Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)

MPTP, dopaminerjik nöronları harabiyete uğratan nörotoksinlerden biridir. MPTP, lipofilik bir molekül olup kan beyin bariyerini kolayca geçer. Sistemik uygulamadan sonra MPTP, astrositlerde MAO-B tarafından MPDP⁺'ya dönüştürülür. Daha sonra DA taşıyıcı aracılığıyla dopaminerjik nöronlar tarafından

emilen toksik bir metabolit olan MPP⁺'a oksitlenir. A MPP⁺, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks-I'ini bozar, böylece oksidatif stres ve ATP oluşumunda azalmaya neden olur. MPTP'nin dopaminerjik nöronları dejenere ettiği mekanizma bu şekilde gerçekleşir. İnsanlarda MPTP tarafından indüklenen şiddetli parkinsonizm bu modelin geliştirilmesine yol açmıştır. PH için hayvan çalışmasındaki ana önemli sınırlamalardan biri, hızlı ve geçici nörodejenerasyondur. Ancak MPTP'nin neden olduğu semptomlar yavaş ortaya çıktığından, bu sınırlama MPTP modeli için geçerli değildir.

2.7.1.3. Diğer Nörotoksinler

PH hayvan modelleri yapmak için kullanılan diğer nörotoksinler; rotenon, parakuat, maneb ve trikloroetilen gibi bazı pestisitlerdir. , nörotoksinler olarak kullanılır. Pestisitlere maruziyet, PH için iyi bilinen bir risk faktörüdür.

Rotenon, lipofiliktir. Kan-beyin bariyerini ve hücre zarlarını kolayca geçer. Kronik rotenon uygulaması, striatumdaki DA terminallerinin kaybına ve ardından SN'deki dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna neden olur. Dezavantajları; yüksek mortalite, fenotipik değişkenlik ve PH ile ilişkili olmayan semptomlardır.

Paraquat, mitokondriyal kompleks I'in zayıf bir inhibitörüdür. SN'de DAerjik nöron kaybına neden olur. Kemirgen çalışmalarında Lewy benzeri yapılar gözlemlenmiştir.

Maneb, kompleks III'ün bir inhibitörü olan, nörotoksindir. Maneb ve parakuat kombinasyonu SN'de önemli bir nöronal kayıba neden olur.

Trikloroetilen, son zamanlarda kullanılmaya başlanan bir nörotoksindir. Trikloroetilen ile tedavi edilen kemirgenler, striatumda DA tükenmesi ve davranışsal eksiklikler gözlenmektedir.

Nörotoksin modellerinin neredeyse hiçbir PH'nin herhangi bir patolojik özelliğini taklit etmeyip, bunun yerine sadece semptomları taklit ederler. Ayrıca, nörotoksin modelleri geç, kronik, DA eksikliği durumunu yansıtır.^{52,53}

2.7.2. Genetik Modeli

PH'daki en önemli genetik faktörlerden biri, α -sinüklein (SNCA)' dir. SNCA, PH'nin önemli patolojik özelliği olan Lewy cisimciklerinin ana bileşeni olan α -sinükleni kodlar. SNCA'nın duplikasyonu ve triplikasyonu, ek olarak A53T ve A30P gibi nokta mutasyonları PH'ye neden olur. PH'de yapılan, genom çapında ilişkilendirme çalışması (GWAS), en yüksek riskli Single nükleotid P (SNP)'nin *SNCA*'da lokalize olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda PH'nin patolojisi ve tedavisinin aydınlatılmasına katkıda bulunan bir dizi α -sinüklein transgenik hayvan modeli oluşturulmuştur. α -sinüklein transgenik modeli, insan PH'sine benzer. Deneysel modelde yapılan fenotipler esas olarak α -sinükleni aşırı ifade etmek için kullanılan güçlü eksojen promotörlere bağlıdır. Ancak diğer yöntemlere kıyasla istenen fenotipleri elde etmek genellikle zaman alır ve bazen zordur.

Genetik modellemeli PH için; genlerin aşırı ekspresyonu veya silinmesiyle başka genetik modeller de oluşturulur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, α -sinüklenin prion benzeri özelliği ile PH'nin patolojik bir durumunu oluşturmak için katkıda bulunacağına dair yayılma hipotezleri dikkat çekmiştir. Eksojen olarak uygulanan α -sinüklein fibrilleri tarafından oluşturulan yayılma modeli hala geliştirme aşamasındadır, ancak bir fenotip elde etme; nispeten kolaydır ve transgenik modele göre deney için gereken süre daha kısadır. Böylece bu modelin insan dışı primatlara ve diğer hayvanlara uygulanabilmesi büyük bir avantaj sağlar. Ancak yayılma hipotezi doğru olsa bile, başlangıçtaki α -sinüklein kümelerinin nerede ve nasıl oluştuğuna dair eksik bilgiler yer alır. Yanısıra

fibrilleri hazırlama ve enjekte etme yöntemi, tesisler arasında farklılık gösterir, bu da bu modelde α -sinükleinin yayılma derecesini ve hücre kaybını etkiler.⁵⁴

2.8. 6-OHDA ve PH Hücre Kültürü Modeli

SH-SY5Y hücre dizisi, ilk olarak 1970'lerin başında sempatik adrenerjik gangliyal kökenli bir nöroblastom hastasının kemik iliği biyopsisinden oluşturulan SK-N-SH hücrelerinin üç kez klonlanmış bir alt dizisidir.

SH-SY5Y hücre dizisi, nöronal farklılaşma, metabolizma ve nörodejeneratif ve nöroadaptif süreçler, nörotoksisite ve nöroproteksiyon ile ilgili fonksiyon analizi dahil olmak üzere deneysel nörolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. SH-SY5Y hücreleri, Dopaminerjik nöronların birçok özelliğine sahip olduğundan, SH-SY5Y hücre çizgisi, son zamanlarda PH araştırmaları için bir dopaminerjik nöronal model olarak kullanılmıştır.

SH-SY5Y hücreleri, DA'yı sentezleme yeteneğine sahiptir, çünkü hücreler tirozin ve DA- β -hidroksilazlar eksprese eder. İkinci olarak, SH-SY5Y hücreleri, merkezi sinir sistemi içindeki sadece Dopaminerjik nöronlarda ifade edilen bir protein olan DA taşıyıcısını (DAT) ifade eder; Üçüncüsü, SH-SY5Y hücreleri sadece düşük seviyelerde DA reseptörü eksprese etmesine rağmen, nöroprotektif olabilen DA agonistleri SH-SY5Y hücrelerinde değerlendirilebilir. Son olarak, SH-SY5Y hücreleri, bazı ajanların varlığında daha belirgin bir dopaminerjik nöronal fenotipe farklılaştırılabilir ve bazı farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri, birincil mezensefalik nöronlara benzer.

Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin PH hücre modeli olarak kullanılması bazı dezavantajlar içermektedir. İlk olarak, sürekli bölünen bir hücre çizgisi olarak, farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin sayısı deney süresince artar, bu nedenle nöroprotektif veya nörotoksik ajanların proliferasyon hızını veya hücre ölüm oranını etkileyip etkilemediğini ayırt etmek zordur. İkincisi, kültürlerdeki SH-SY5Y hücreleri

senkronize değildir ve her zaman olgun nöronların tipik belirteçlerini sergilemez, bu da deneylerde belirsizliğe yol açar.⁵⁵

PH, SN dopaminerjik nöronların ölümü ile karakterize edildiğinden, bu hücre hattının bir dopaminerjik fenotip gösterme derecesi, modelin geçerliliği ile ilgili önemli bir husustur. Bu bağlamda 962 makaleden 392'si SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik bir fenotipe sahip olduğunu, ancak gerçekte destekleyici kanıt göstermediğini belirtmektedir.

SH-SY5Y hücreleri, PH ile ilgili bazı toksinlerin etkilerinin altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmaları incelemek, ailesel PH genleri üzerinde fonksiyonel çalışmalar yapmak ve PH tedavisi için varsayılan koruyucu bileşikleri test etmek için kullanılmıştır. Bu nedenle, bu hücre dizisi, PH'nin moleküler karmaşıklığını çözmeye yardımcı olmak için değerli bir varlık olmuştur.⁵⁶

6-OHDA, dopaminin oksidatif bir metabolitidir. Parkinson hastalığının deneysel modellerini oluşturmak için yaygın olarak kullanılan bir nörotoksindir. Farklı hücre tiplerinde 6-OHDA'nın sitotoksisiteyi indüklemeye yeteneği konusunda bir fikir birliği olmasına rağmen ilgili mekanizma hala tartışmalıdır

Mitokondriyal olayların fizyolojik önemi tam olarak anlaşılmassa da, elde edilen kanıtlar, fisyon ve füzyon yoluyla mitokondriyal morfolojiyi korumanın hücre fonksiyonu için kritik olduğunu göstermektedir. Bu fikir, fisyon/füzyon proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonları insan hastalıklarına bağlayan son bulgularla desteklenmektedir

6-OHDA'nın SH-SY5Y hücre kültürlerinde derin mitokondriyal fisyonu neden olduğu, mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesinden ve sitokrom c salınımından önce gelen bir olay olduğu gösterilmektedir.⁵⁷

Bu tez çalışmasının amacı antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahip Diacerein, Silazapril ve Benazepril'in SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında 6-OHDA ile indüklenen in vitro Parkinson modelinde oksidatif hasar üzerine tedavi etkilerinin araştırılmasıdır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi'nde Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji bünyesinde Aşı Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasalın Adı	Menşei
Silazapril	Saba
Benazepril	Meda
Diacerein	Bio-Gen
6-Hidroksidopamin	Sigma Aldrich
3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Thermo
DMSO	Merck

3.1.2. SH-SY5Y Hücre Kültürü

Yaptığımız çalışmada, SH-SY5Y Nöroblastoma adlı hücre hattı, Atatürk Üniversitesi (Erzurum, Türkiye) Tıbbi Farmakoloji bölümü Aşı Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden elde edildi. Hücre süspansiyonu, 5 dakika süresince 1200 rpm hızında santrifüjlendi. Hücrelerimizi, taze ortam DMEM F-12 medyum besiyeri, %10 Fetal bovin serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin, streptomisin ve amphotrisin B) ile yeniden süspanse edilerek, hücreler 25 cm²'lik flask içersinde toplandı. (Corning, ABD) Hazırlanan flask %5 CO₂ ve 37°C ortamına sahip inkübatörde depolandı. Flaskın %75-80'i kanser hücreleri ile kaplanınca Tripsin- Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (%0.25 tripsin-%0.02 EDTA) isimli enzim yardımıyla ile kaldırılarak santrifüj yapıldı.

Süpernatant kısmını atılarak hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarına 100 µl/kuyucuk (10.000 hücre / kuyucuk) dağıtıldı.

3.1.3. 6 Hidroksi Dopamin (6-OHDA) ile Parkinson Modeli Oluşturma

Yaptığımız deney platelerinde bulunan Nöroblastom hücreleri %80'lik bir yoğunluğa ulaştığı zaman çalışmada kullanılacak maddeleri için konsantrasyonlar belirlenerek deney tasarımı yapıldı. Kültür plaklarında mevcut ilaçlardan Silazapril için (0.32, 0.64, 1.28, 2.56 ve 5.12 µM), Benazepril için (0.04, 0.08, 0.16, 0.32 ve 0.64 µM) ve Diacerein için (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 ve 0.32 µM) dozları uygulandı. Sonrasında model oluşturulacak olan kuyucuklara 200 µM 6-OHDA eklenerek in vitro Parkinson hastalığı modeli oluşturuldu. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C şartlarında inkübasyona bırakıldı. Her konsantrasyon için 8 tekrar kullanılacaktır. 24 saat sonra 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) eklenip 4 saat inkübasyonda bekletildi ve 570 nm'de okutuldu. Sonuçlar SPSS, IBM 21.00 programı kullanılarak tek yönlü ANOVA yöntemiyle analiz edildi.

3.1.4. MTT Testi

Yaptığımız bu testin temelinde MTT adlı PBS'te çözünebilir bir madde bulunmaktadır. Canlı hücreler MTT'yi formazan kristallerine indirgerler. Ortaya çıkan mor renkli boya ile spektrofotometre cihazı yardımıyla ilgili dalga boylarında absorbans ölçülür.

MTT uygulandıktan sonra oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için her kuyucuğa 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi ve 4 saat boyunca tekrar inkübasyona bırakılacaktır. Daha sonra absorbans, 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede (µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek) ölçüldü. Veriler SPSS one way anova yöntemiyle ile analiz edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Deney Planı

Çalışma gruplarımız şu şekilde planlandı. Gerekli makale taramalarından; Silazapril için (0.32, 0.64, 1.28, 2.56 ve 5.12 μ M), Benazepril için (0.04, 0.08, 0.16, 0.32 ve 0.64 μ M) ve Diacerein için (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 ve 0.32 μ M) dozlarının kullanılması planlandı. Ayrıca kontrol, DMSO kontrol ve 6-OHDA grupları da deney gruplarına dâhil edildi.

3.2.2. Oksidan ve Antioksidan Aktivite Analizleri

3.2.2.1. Total Antioksidan Durum Testi (TAS) Aktivite Analizi

TAS analizi, 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sülfonat) radikal oluşumunu inhibe ederek antioksidan seviyesi ölçülmüştür. Analiz işleminde Rel Assay Diagnostics® (Gaziantep, Türkiye) firması ile üretilen TAS ticari kitleri kullanılmıştır.

TAS Ticari Kitinin İçerdikleri Bileşenler; 1. Reaktif Solüsyonu: 50 ml, 2. Reaktif Solüsyonu: 10 ml, 1. Standart Solüsyonu: 10 ml, 2. Standart Solüsyonu: 10 ml'dir.

Kuyucuklara ilk olarak 18 μ l Standart-1 solüsyonu ve örneklerden eklenerek sonrasında her kuyucuğa 300 μ l 1. Reaktif solüsyonundan ilave edilerek 660'nm absorbansta ilk kez okutulmuştur. Ardından aynı kuyucuklara 45 μ l 2. Reaktif eklendi ve 10 dk. süre boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 660'nmde ikinci absorbans değeri ölçüldü. Absorbans değerleri mmol Trolox equiv / mmol L⁻¹ olarak TAS düzeyleri tespit edilmiştir.

3.2.2.2. Total Oksidan Durum Testi (TOS)

Total Oksidan Durum Testi (TOS)'inde, spektrofotometrik olarak ölçülmesi numunede bulunan oksidantların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğuna göre değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda TOS kitleri Rel Assay Diagnostics® firmasından kullanılmıştır.

Kit Bileşenleri; 1. Reaktif Solüsyonu: 50 ml, 2. Reaktif Solüsyonu: 10 ml, 1. Standart Solüsyonu: 10 ml, 2. Standart Solüsyonu: 10 ml'dir.

Kuyucuklara ilk olarak 45 µl 1. Standart solüsyonu ve örneklerden eklenerek sonrasında her kuyucuğa 300 µl 1. Reaktif solüsyonundan ilave edildi. 530'nmde ilk absorbans okutulmuştur. Sonrasında aynı kuyucuklara 15 µl 2. Reaktif eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. 530'nmde ikinci absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen verilerde absorbans değerleri mmol TOS düzeyleri H₂O₂ equiv/ mmol L⁻¹ cinsinden hesaplandı. Çalışmamızda yer alan hücrelerdeki oksidatif stres, Toplam oksidant sayısının toplam antioksidan sayısına oranı alınarak hesap edilecektir.

3.2.2.3. IL-10 Testi

1. Test için gereken kuyucuk sayısını belirlendi.
2. Standart kuyucuğa 50 µl standart eklendi.
3. Numune kuyularına 40 µl numune eklendi.
4. Sonra numune kuyularına 10µl TIAF1(IL-10) antikoru eklendi.
5. Standart kuyulara ve numune kuyularına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra plaka bir kapatıcı ile örtüldü ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası plaka yıkama tamponu (wash buffer) ile 5 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 50 µl'şer substrat solüsyonu A ve B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plak inkübe edildi.
8. Son olarak her kuyucuğa 50 µl Stop Solüsyonu eklendi.
9. Stop solüsyonu eklendi ve 10 dakika içinde 450 nm'de OD değeri ölçüldü. Gereken kuyucuk sayısını belirlendi.

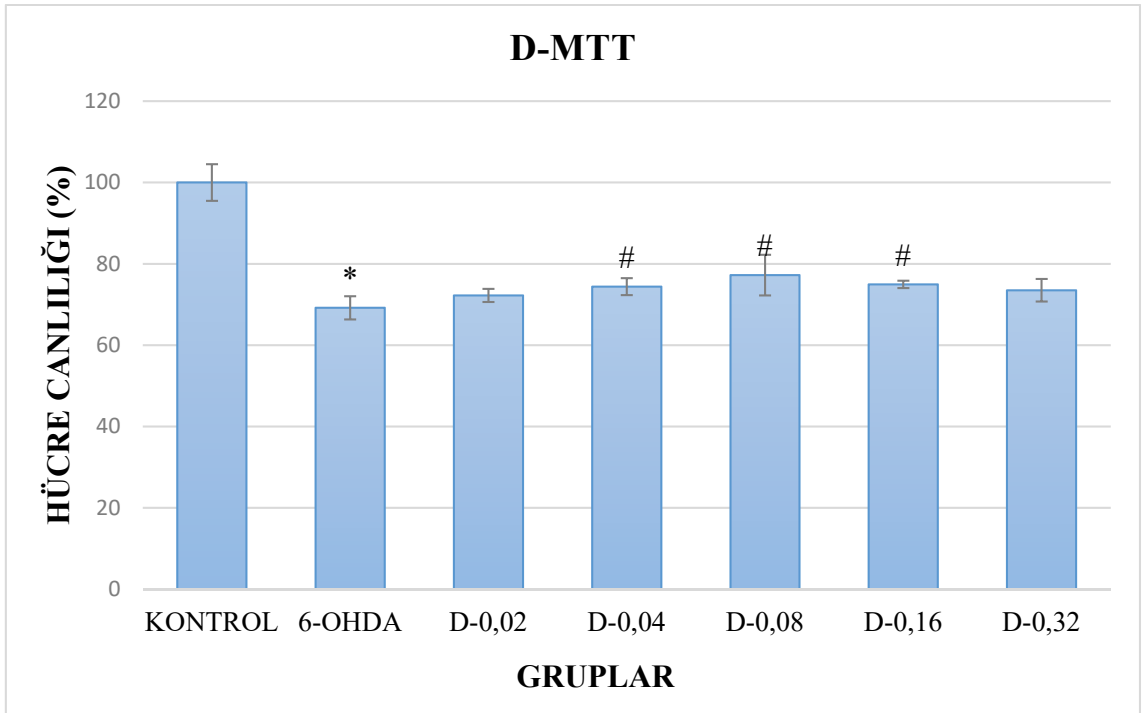
3.2.3. İstatistiksel Analiz

Hücre kültürü ile yapılan testlerin verilerinin istatistiksel olarak analizi IBM SPSS 20.0 software programı yardımıyla gerçekleştirildi. Deneysel çalışmaların sonuçları ortalama $\pm$ standart sapma olacak şekilde ifade edildi. P değerleri, 0.05'in altında ise istatistiksel bakımdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların önemlilik derecesi tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) testi aracılığıyla saptandı.



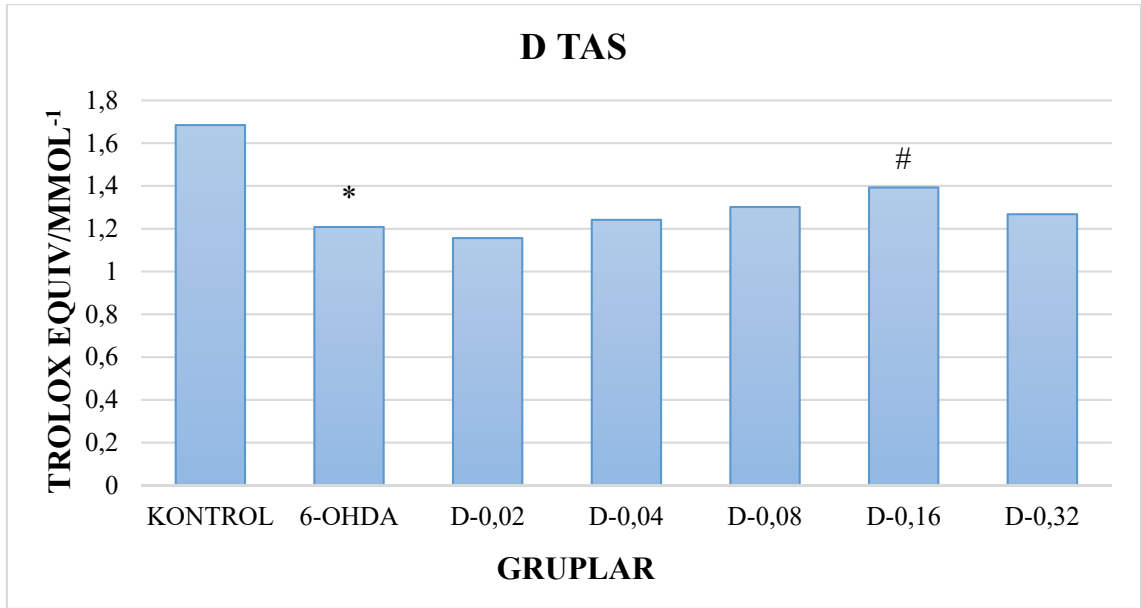
4. BULGULAR

Hücre kültüründe 6-OHDA ile Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuş hücrelere 24 saat boyunca Diacerein, Silazepiril ve Benazepril ilaçları ile muamele edilmiştir. 24 saat sonra her kuyucuktan toplanan süpernatantlara TAS, TOS ve IL-10 testleri yapılmıştır. Kuyucukların zemininde bulunan hücrelere de MTT verilerek canlılık testleri yapılmıştır.



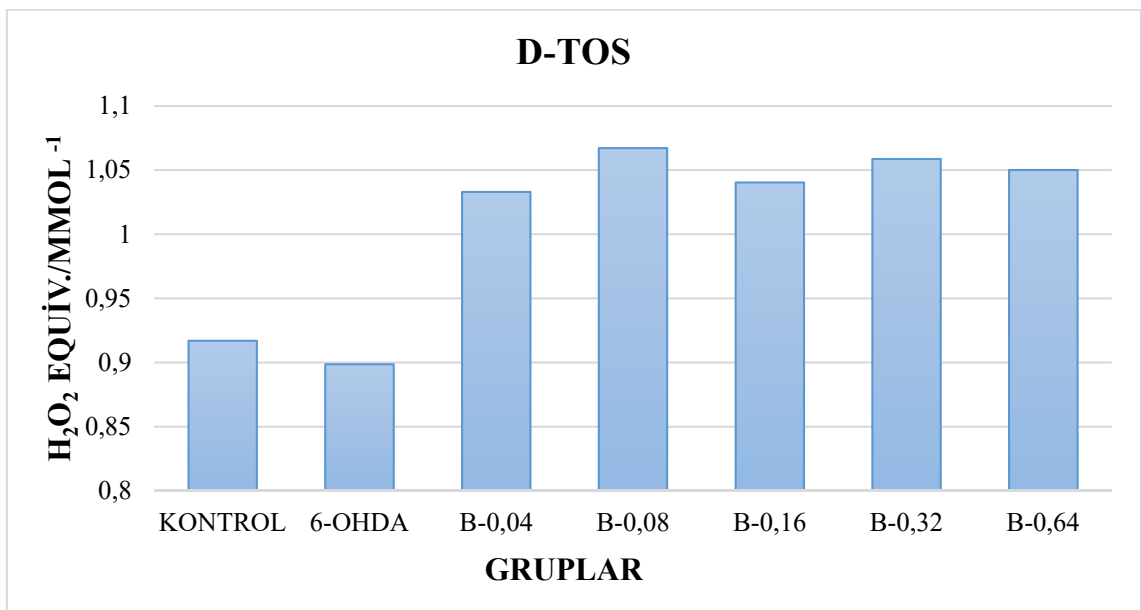
Şekil 3.1. Diacerein ilacının MTT sonuçları (* $p < 0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Diacerein ilacına ait MTT sonuçları şekil 3.1’de sunulmuştur. Yapılan çalışmada kontrol grubu ile 6-OHDA grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. 6-OHDA ve kontrol grubu karşılaştırıldığında 6-OHDA grubunda canlılık oranı %69,1 olarak tespit edilmiştir (* $P < 0.05$). Diacerein ve 6-OHDA grubu karşılaştırıldığında Diacerein’in 0.04, 0.08 ve 0,16 μM ’lık ilaç dozları sırasıyla %74.3, %77.2 ve %74.9 değerleri ile en yüksek canlılık oranları bulunmuştur (# $P < 0.05$).



Şekil 3.2. Diacerein ilacının TAS sonuçları (*p<0.05; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # p<0.05 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

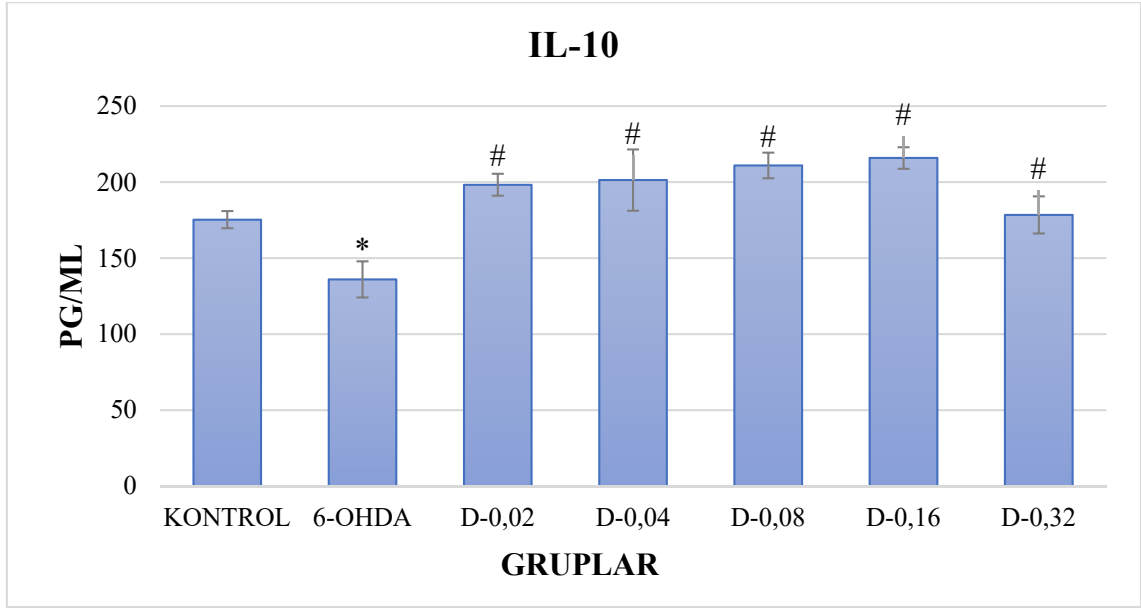
Diacerein ilacına ait TAS test sonuçları Trolox equiv / mmol L⁻¹'e dayanarak şekil 3.2’de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 1.68 ve 6-OHDA grubu 1.20 olarak antioksidan seviyesi bulunmuştur. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (*P<0.05). Diacerein ve 6-OHDA grubunun TAS sonuçları karşılaştırıldığında Diacerein’in 0,16 µM’lık ilaç dozu 1.39 değeri ile en yüksek antioksidan seviyesine sahiptir (#P<0.05).



Şekil 3.3. Diacerein ilacınınTOS sonuçları (*p<0.05; kontrol grubu ile 6-OHDA

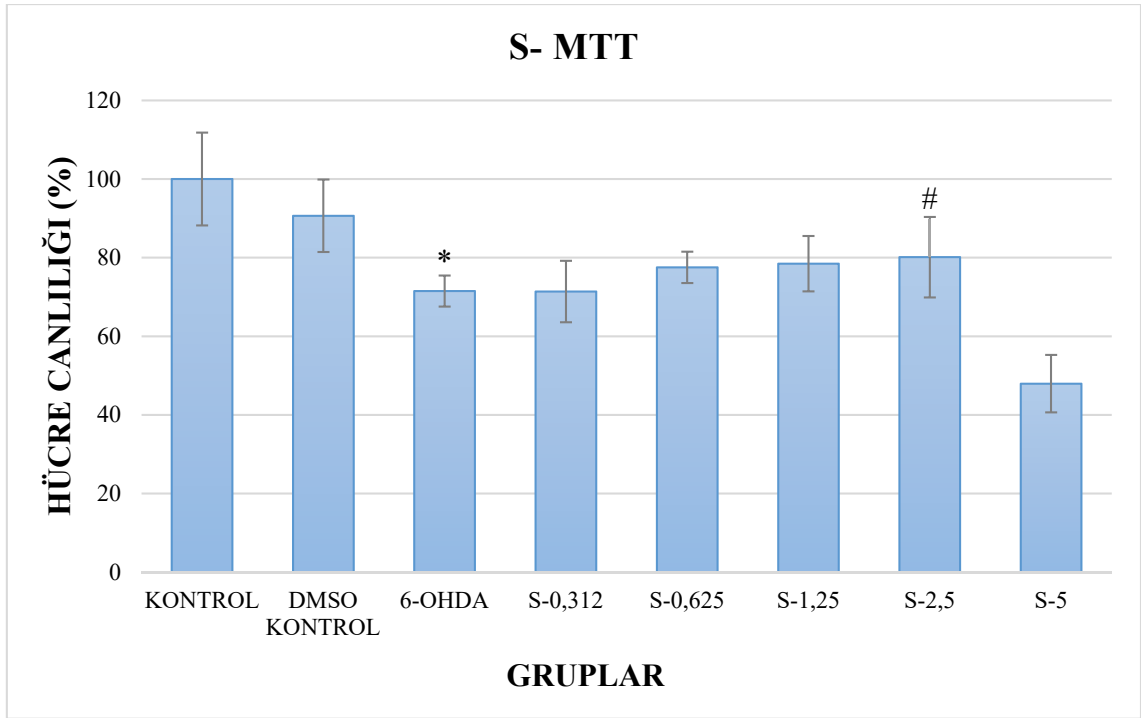
karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Diacerein ilacına ait TOS test sonuçlarımız H_2O_2 equiv/ mmol L^{-1} değerleri şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bulunan TOS sonuçlarına göre kontrol grubu 0.91 ve 6-OHDA grubu 0.89 oksidan seviyesine sahiptir. Bu değerler birbiriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



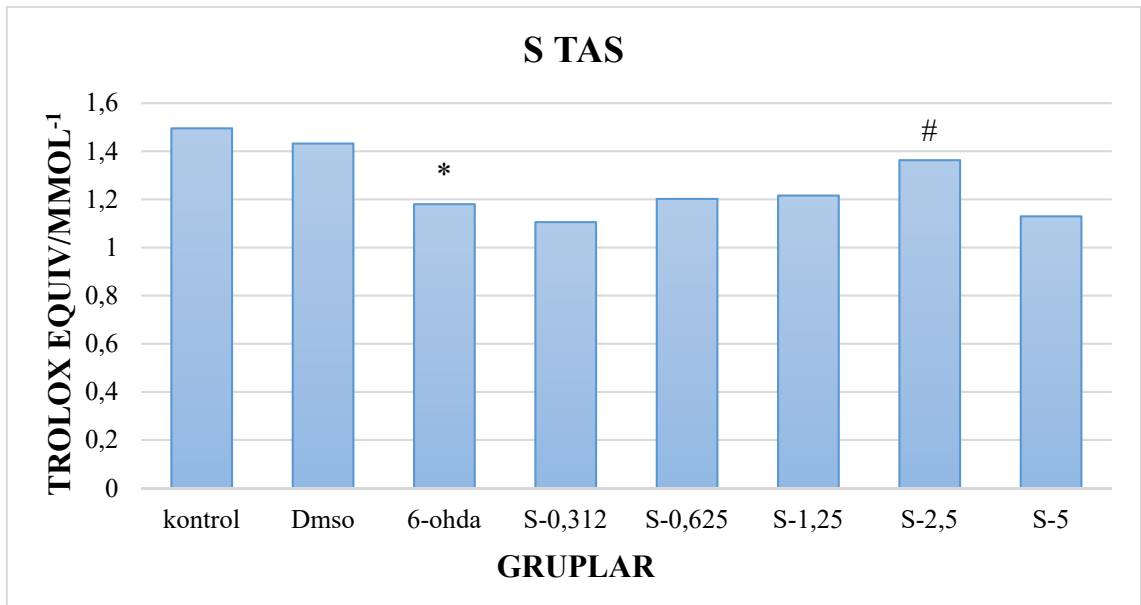
Şekil 3.4. Diacerein ilacının IL-10 sonuçları (* $p < 0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Diacerein ilacına ait IL-10 test sonuçları şekil 3.4’de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 175.2 ve 6-OHDA grubu 135.9 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (* $P < 0.05$). Diacerein’in ilaç dozları ve 6-OHDA grubunun IL-10 sonuçları karşılaştırıldığında Diacerein’in bütün dozları yüksek IL-10 seviyesine sahiptir (# $P < 0.05$).



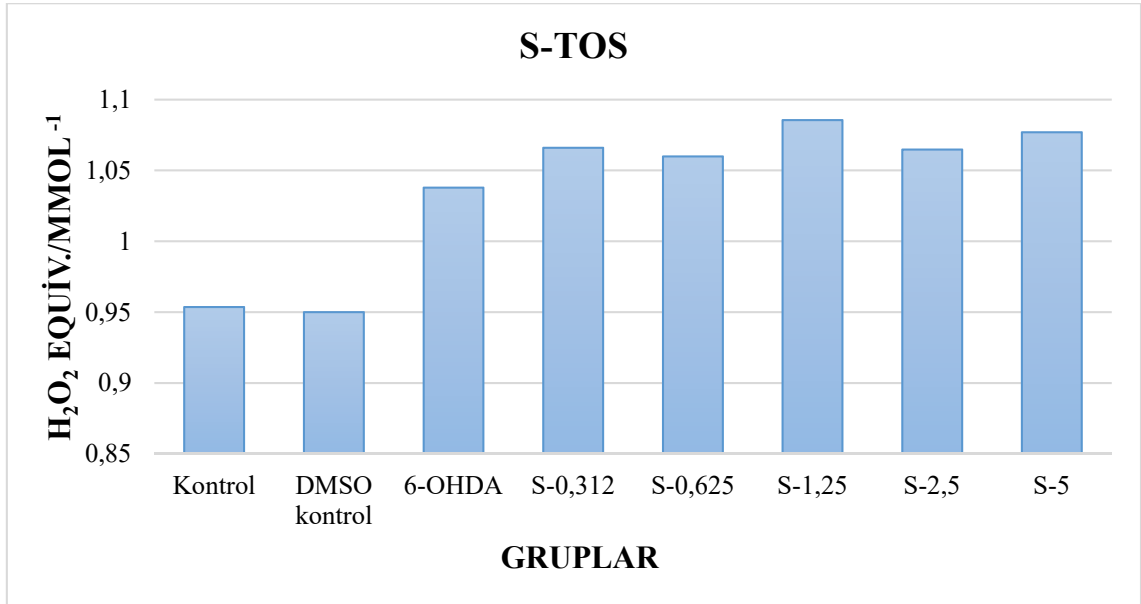
Şekil 3.5. Silazapril ilacının MTT sonuçları (* $p < 0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Silazapril ilacına ait MTT sonuçları şekil 3.5'te sunulmuştur. Yapılan çalışmada kontrol grubu ile 6-OHDA grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. 6-OHDA ve kontrol grubu karşılaştırıldığında 6-OHDA grubunda canlılık oranı %71,5 olarak tespit edilmiştir (* $P < 0.05$). Silazapril ve 6-OHDA grubu karşılaştırıldığında Diacerein'in 2.5 μM 'lık ilaç dozu %80.11 değerleri ile en yüksek canlılık oranı bulunmuştur (# $P < 0.05$).



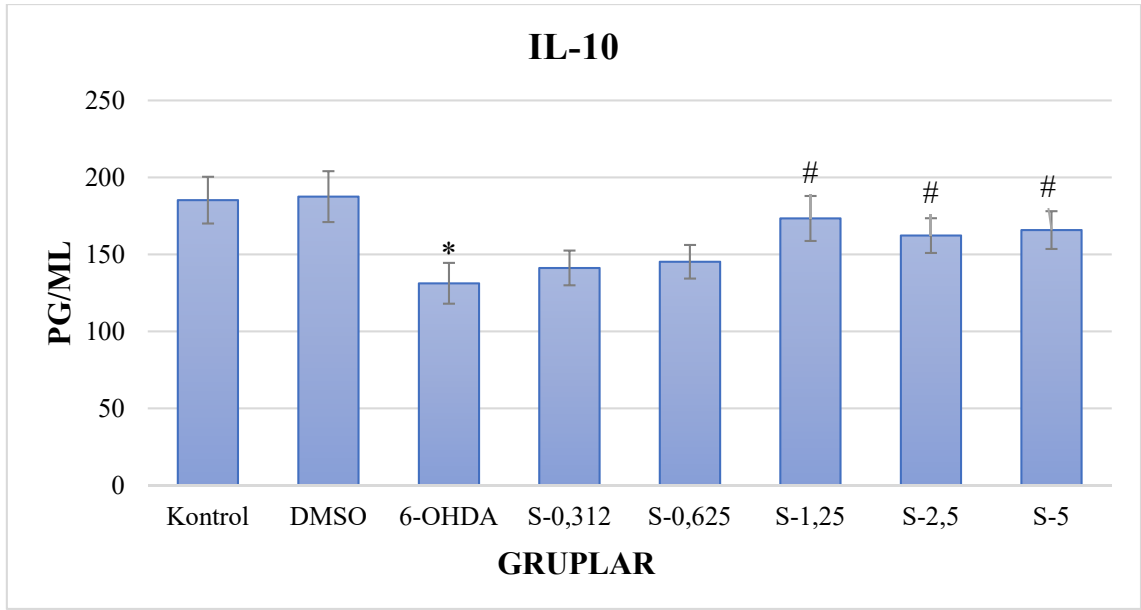
Şekil 3.6. Silazapril ilacının TAS sonuçları (* $p<0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p<0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Silazapril ilacına ait TAS test sonuçları Trolox equiv / mmol L⁻¹'e dayanarak şekil 3.2'de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 1.49 ve 6-OHDA grubu 1.17 olarak antioksidan seviyesi bulunmuştur. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (* $P<0.05$). Silazapril ve 6-OHDA grubunun TAS sonuçları karşılaştırıldığında Diacerein'in 2.5 µM'lık ilaç dozu 1.36 değeri ile en yüksek antioksidan seviyesine sahiptir (# $P<0.05$).



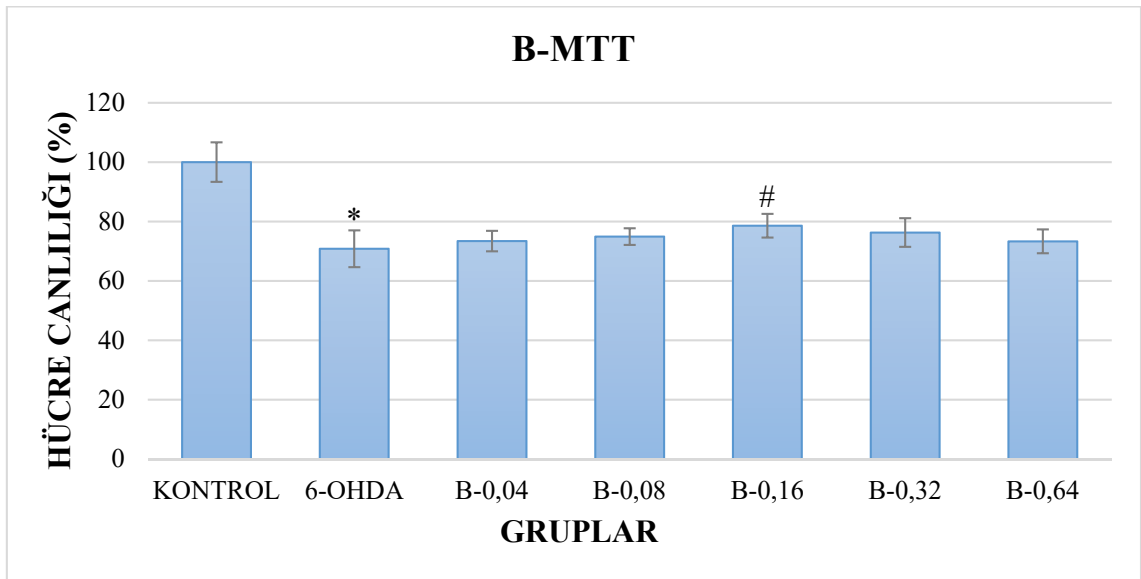
Şekil 3.7. Silazapril ilacının TOS sonuçları (* $p<0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p<0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Silazapril ilacına ait TOS test sonuçlarımız H₂O₂ equiv/ mmol L⁻¹ değerleri şekil 3.7'de gösterilmiştir. Bulunan TOS sonuçlarına göre kontrol grubu 0.95 ve 6-OHDA grubu 1.03 oksidan seviyesine sahiptir. Bu değerler birbiriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 3.8. Silazapril ilacının IL-10 sonuçları (* $p < 0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

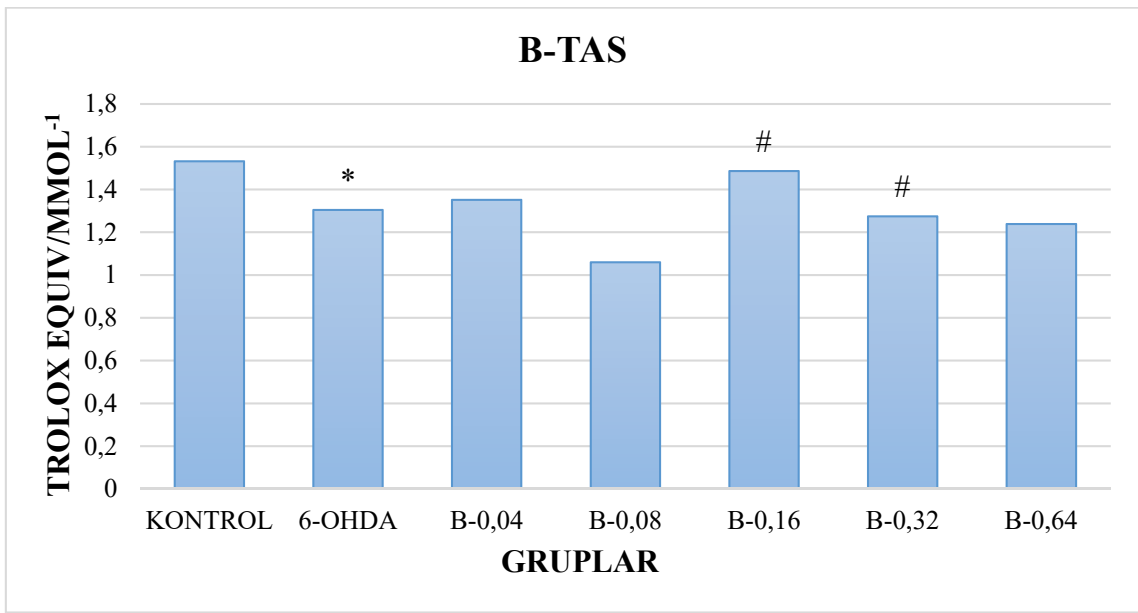
Silazapril ilacına ait IL-10 test sonuçları şekil 3.8’de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 175.2 ve 6-OHDA grubu 135.9 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (* $P < 0.05$). Silazapril’in ilaç dozları ve 6-OHDA grubunun IL-10 sonuçları karşılaştırıldığında Silazapril’in 1.25, 2.5 ve 5 μM ’lık dozları yüksek IL-10 seviyesine sahiptir ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır (# $P < 0.05$).



Şekil 3.9. Benazepril ilacının MTT sonuçları (* $p < 0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA

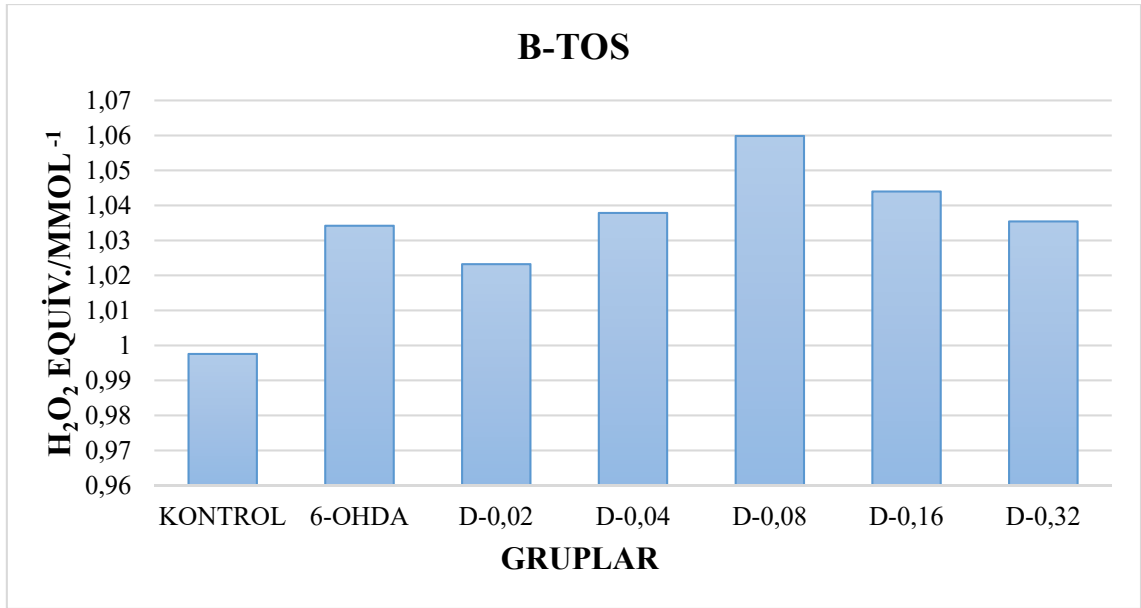
karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Benazepril ilacına ait MTT sonuçları şekil 3.9'te sunulmuştur. Yapılan çalışmada kontrol grubu ile 6-OHDA grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. 6-OHDA ve kontrol grubu karşılaştırıldığında 6-OHDA grubunda canlılık oranı %70,8 olarak tespit edilmiştir (* $P < 0.05$). Benazepril ve 6-OHDA grubu karşılaştırıldığında Benazepril'in 0.16 μM 'lık ilaç dozu %78.58 değerleri ile en yüksek canlılık oranı bulunmuştur (# $P < 0.05$).



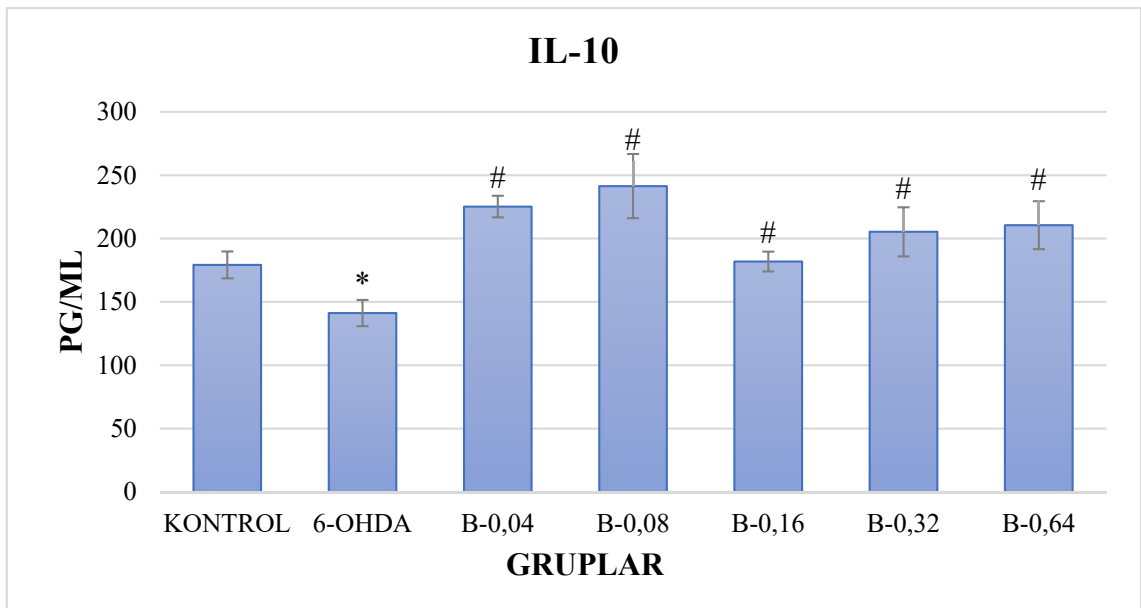
Şekil 3.10. Benazepril ilacının TAS sonuçları (* $p < 0.05$; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Benazepril ilacına ait TAS test sonuçları Trolox equiv / mmol L^{-1} 'e dayanarak şekil 3.2'de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 1.53 equiv / mmol L^{-1} ve 6-OHDA grubu 1.30 equiv / mmol L^{-1} olarak antioksidan seviyesi bulunmuştur. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (* $P < 0.05$). Benazepril ve 6-OHDA grubunun TAS sonuçları karşılaştırıldığında Benazepril'in 0.16 ve 0.32 μM 'lık ilaç dozları sırasıyla 1.48 ve 1.27 değerleri ile en yüksek antioksidan seviyelerine sahiptir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (# $P < 0.05$).



Şekil 3.11. Benazepril ilacının TOS sonuçları (*p<0.05; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # p<0.05 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Benazepril ilacına ait TOS test sonuçlarımız H₂O₂ equiv/ mmol L⁻¹ değerleri şekil 3.7’de gösterilmiştir. Bulunan TOS sonuçlarına göre kontrol grubu 0.99 ve 6-OHDA grubu 1.03 oksidan seviyesine sahiptir. Bu değerler birbiriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 3.12. Benazepril ilacının IL-10 sonuçları (*p<0.05; kontrol grubu ile 6-OHDA karşılaştırıldığında, # p<0.05 6-OHDA ile ilaç dozları karşılaştırıldığında)

Benazepril ilacına ait IL-10 test sonuçları şekil 3.8’de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 179.2 ve 6-OHDA grubu 141.2 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (* $P<0.05$). Benazepril’in ilaç dozları ve 6-OHDA grubunun IL-10 sonuçları karşılaştırıldığında Benazepril’in bütün dozları yüksek IL-10 seviyesine sahiptir ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır (# $P<0.05$).



5. TARTIŞMA

1855'te Dr. James, Parkinson'u ilk olarak tanımlamasından kırk yıl sonra İngiltere ve Galler'de yaklaşık 15 milyon kişi PH'den öldü. Nörolojik bozukluklar şu an dünya çapında önde gelen önemli engellilik kaynağıdır ve bu bozuklukların en hızlı büyüyenini ise PH'dir. Çeşitli belgelerin analizlerinden elde edilen verilere göre, Parkinson hastalığı insidansının giderek artmakta olduğunu göstermektedir.⁵⁸

Nörodejeneratif bir bozukluk olan PH, temel olarak birçok faktörle ilişkilidir. PH, substantia nigra pars compacta'nın dopaminerjik nöronlarının ve sitoplazmik alfa-sinüklein açısından zengin Lewy cisimcikleri kaybı ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. PH motor ve motor olmayan semptomlar barındırır. Motor olmayan semptomlar genellikle motor özelliklerden on yıldan fazla bir süre önce belirir. PH etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik varyantların çevresel risk faktörleri ile karmaşık etkileşimlerine dayanır.⁵⁹

PH, merkezi sinir sistemi enfeksiyonu ve kranioserebral travmanın etkisinin yanı sıra, rotenon ve parakuat gibi pestisitlere ve mantar öldürücülere maruz kalma ile de ilişkili görünmektedir. PH esas olarak 60 yaş ve üzeri bireylerde sık rastlanır ve erkeklerde görülme sıklığı daha yüksektir. PH dünya çapında en az 6 milyon insanı etkiler.

Klinik olarak PH için geçerli iki tip tedavi vardır: cerrahi tedavi (derin beyin stimülasyonu) ve ilaç tedavisi (levodopa, dopamin agonistleri). PH motor semptomları için altın standart ilaç olan l -dopa, kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen bir dopamin öncüsüdür. Yaygın olarak dopamin üretimini artırmak için L-Dopa kullanılır. Aynı amacı taşıyan başka ilaçlar da mevcuttur (COMT, MAO-B, dopaminerjik agonistler). Ancak bu tedavi yöntemleri yalnızca semptomları hafifletir, PH'nin ilerlemesini engelleyemez.^{7,59} Son yıllarda, PH hastaları için nörotrofik faktör tedavisi ve hücre transplantasyonu dahil

olmak üzere iki yeni tedavi yöntemi ortaya çıkmıştır, ancak bu iki strateji esas olarak güvenlik sorunları ve yan etkilerin eşlik ettiği oldukça invaziv stereotaksik cerrahiye dayanmaktadır.⁶⁰

Parkinson hastalığı (PH), Substantia Nigra'daki dopaminerjik (DAerjik) nöronların tercihli ölümü ile karakterize edilen dejeneratif bir nörolojik sendromdur. Bu bozukluğun patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır ve PH hala tedavi edilemez durumdadır. Mevcut ilaç tedavileri, yaşam kalitesini iyileştirmek için öncelikle semptomların tedavisine yöneliktir. Bu nedenle, sadece semptomatik rahatlama sağlamakla kalmayıp aynı zamanda PH ilerlemesini engelleyen nöronal hasarı durduran veya tersine çeviren yeni terapötik stratejiler bulmaya ihtiyaç vardır. Oksidatif stres, PH'nin hem sporadik hem de genetik formlarındaki nigral kaybın başlıca katkılarından biri olarak tanımlanmıştır.

Oksidatif stres, endojen antioksidan sistemlerin yeteneği reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi tarafından aşıldığında ortaya çıkar. ROS, hem süperoksit anyonu ($\bullet\text{O}_2^-$) hem de hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) gibi serbest radikal türlerinin yanı sıra hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi diğer radikal olmayan molekülleri de kapsar. Mitokondri, ROS'un ana kaynağı olarak kabul edilmektedir. Aslında ROS, aerobik solunumun ve özellikle mitokondriyal düzeyde meydana gelen oksidatif fosforilasyonun yan ürünleridir. Spesifik olarak, mitokondriyal süperoksit radikallerinin oluşumu, temel olarak elektron taşıma zincirindeki iki ayrı bölgede, kompleks I ve kompleks III seviyesinde gerçekleşir. $\bullet\text{O}_2^-$ üretildiğinde, H_2O_2 ve $\bullet\text{OH}$ gibi diğer ROS'ların üretimini indükleyebilir. İkincisi, hücre içi demir varlığında Fenton reaksiyonu yoluyla da üretilebilir veya Harber-Weiss reaksiyonu yoluyla oluşturulabilir. Ayrıca $\bullet\text{O}_2^-$ hücre içinde sentezlenen NO ile kendiliğinden birleşerek peroksinitrit (ONOO^-), oldukça reaktif bir azot türüdür. Nöronal hücreler, yüksek enerji talebiyle ilişkili büyük oksijen tüketimleri ve post-mitotik yapıları

nedeniyle düşük rejeneratif kapasiteleri nedeniyle ROS kaynaklı hasara karşı aşırı duyarlı olarak kabul edilir. Bu özellikler, nöronal dokuların PH dahil olmak üzere kronik ve dejeneratif hastalıklara karşı savunmasızlığını açıklayabilir. ROS, nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi çeşitli hücresel bileşenlerle etkileşime girebilen ve hücre hasarına neden olabilen oldukça reaktif moleküllerdir.

Oksidatif stres ve DAerjik nöronların dejenerasyonu arasındaki ilişki, analiz edilen dokularda güçlü bir oksidatif hasar kanıtının bulunduğu PH beyinlerinin ölüm sonrası incelemeleriyle vurgulanmıştır. Lipid peroksidasyonu, ROS'un aracılık ettiği hücre zarı bileşenlerinin bozulması olarak tanımlanır. Doymamış lipidler, 4-hidroksil-2,3-nonenal ve malondialdehit üretimine yol açan bir radikal zincir reaksiyonu oluşturan karbon-karbon çift bağları seviyesinde oksidatif modifikasyonlara karşı hassastır. Bu belirteçlerin her ikisi de PH beyinlerinin DAerjik hücrelerinde gözlenmiştir. ROS aracılı oksidasyonun diğer hedefleri proteinlerdir. Burada yine farklı araştırmalar, PH hastalarının beyinlerinde ROS tarafından indüklenen oksidatif protein hasarının bir özelliği olan yüksek protein karbonilasyon içeriğinin varlığını ortaya koydu. Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen gözlemlerden oksidatif stresin PH'nin desteklenmesinde bir rol oynayıp oynamadığını veya bunun sadece nöronal hücre kaybının bir sonucu olup olmadığını ayırt etmenin imkansız olduğunu belirtmekte fayda var. Oksidatif stres ve PH arasında önerilen bağlantı ile uyumlu olarak, erken ve ileri PH hastalarının SN'sinde GSH konsantrasyonunda daha fazla bir azalma tarif edilmiştir.⁶¹

PH'nin ilerlemesinde oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun oynadığı merkezi rolün yukarıda belirtilen kanıtları ışığında, antioksidan moleküllerin PH'yi tedavi etmek için çekici terapötik ilaçlar olduğu düşünülmüştür. PH patogenezinin mekanizmalarının incelenmesinde önemli bir rol oynayan birkaç nörotoksin bazlı hayvan modeli, sıklıkla çeşitli terapötik ajanların PH'deki etkinliğini değerlendirmek için

kullanılır. Bu hayvan modellerinde gözlemlenen dopaminerjik nöronların dejenerasyonu, PH hastalarında görülenlere benzer ciddi duyuşsal ve motor bozukluklarla ilişkilidir^{62,63}. Sıçanların veya farelerin striatumuna 6-OHDA enjekte edilerek veya rotenon veya parakuatın sistemik veya intraserebral uygulamasıyla elde edilir. MPTP'nin kullanıldığı hayvan modelleri de yaygındır. Fakat biz bu tez çalışmamızda Parkinson Hastalığı'nın hücre kültür modelini kullandık.

Parkinson hastalığı için yeni terapötik stratejiler geliştirmek, hücresel modeller gerektirir. Mevcut modeller, Parkinson hastalığı olan hastaların beyinlerinde bulunan en belirgin iki değışikliğı yeniden üretir: Dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve esas olarak a-sinükleinden oluşan protein kümelerinin oluşumudur. Kültürlenmiş hücreler, Parkinson hastalığını doğrudan hastalarda veya hayvan modellerinde incelemeye göre birçok avantaj sunar. Aynı zamanda, belirli bir hücresel modelin seçimi, diğerlerini göz ardı ederken, hastalığın bir yönüne odaklanmayı gerektirir. Hayvan modelleriyle karşılaştırıldığında, hücresel modeller patolojiyi daha hızlı geliştirir, daha az maliyetlidir ve çoğı zaman etik onay gerektirmez. Genetik veya farmakolojik manipölasyonlar ve hızlandırılmış görüntüleme daha kolay ve daha güvenilirdir. Bu özellikler, daha kısa sürede daha büyük ölçekli testlere izin verir. Ek olarak, PH patogenezinin katkılarını belirlemek için önemli olabilecek spesifik hücre tipleri (örn. dopaminerjik nöronlar) izolasyon içinde incelenebilir.⁶⁴ İlk olarak, locus coeruleus nöronları da dahil olmak üzere diğer nöron türleri de PH seyrinin başlarında dejenere olur.⁶⁵ MPTP ve 6-OHDA çalışmalarından elde edilen sonuçlar, oksidatif stres aracılı apoptotik hücre ölümünün, PH modelinde dopaminerjik nöronların seçici dejenerasyonuna önemli bir katkıda bulunan faktör olduğunu göstermektedir. 6-OHDA'nın çeşitli hücre dizilerinde ve birincil nöronal kültürlerde mitokondriyal işlev bozukluğu gösterilmiştir.⁶⁶

6-OHDA uygulaması, serbest radikal üretimi, mitokondriyal disfonksiyon,

sitokrom c salınımı, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu, PKCδ'nin proteolitik aktivasyonu ve DNA parçalanması yoluyla dopaminerjik nöronal hücrelerde apoptozun indüklediği bildirilmiştir.⁶⁷

Oksidatif stres, ROS üretimi, antioksidan seviyeleri ve/veya ROS'un enzimatik veya enzimatik olmayan temizleyicilerinin tükenmesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Dopaminin hidroksillenmiş bir analogu olan nörotoksin 6-OHDA, hücrelere dopamin taşıyıcı yoluyla girer. Hücre içinde Fe^{2+} ve H_2O_2 , dopaminin enzimatik olmayan hidroksilasyonu ile 6-OHDA oluşumunu artırır.⁶⁸

Bu çalışmada, 6-OHDA'ya maruz kalan N27 hücreleri, zamana ve doza bağlı bir şekilde sitotoksik hücre ölümüne neden oldu. Sitotoksikite deneylerine ve ayrıca literatür incelemesine dayanarak, sonraki tüm çalışmalar için 200 μ M 6-OHDA kullandık. Bu çalışmada, 200 μ M 6-OHDA ile uygulamanın, MTT tahlili ile belirlendiği gibi, hücre canlılıklarında değişikliği indüklediğini gösterdik.

6-OHDA ile indüklenen hücre ölümü sırasında oksidatif stres, önceki SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri çalışmalarla da uyumludur.⁶⁹

Diacerein antioksidan etkisini yanında glutamaterjik nörotransmisyonu azalttığına yönelik yayınlar da bulunmaktadır.⁴ Glutamat yüksekliğinin ve geri alımındaki yetersizliklerin Parkinson'un erken döneminde oluşan hücresel hasardan sorumlu tutulduğu düşünüldüğünde diacerein diğer antioksidan etkili ilaçlara göre daha etkili bulunmasının glutamat üzerinden de bir azaltıcı etkisi olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Diacerein apoptozdan koruyucu etkileri doz bağımlı bulunmuştur. Çok yüksek dozlarında ise yine bu faydalı etki azalmıştır. MTT sonuçları (Şekil 3.1) değerlendirildiğinde 6-OHDA ile oluşan nörotoksitenin Diacerein 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.16 dozlarında anlamlı şekilde azaltmıştır. Bu toksitenin 6-OHDA grubunda total antioksidan parametrelerle doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum

oksidan-antioksidan parametreler dışındaki faktörlerin de PH hücre kültür modelinde önemli olacağını göstermiştir. Örneğin Diacerein ilacına ait IL-10 test sonuçları şekil 3.4’de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu 175.2 ve 6-OHDA grubu 135.9 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur. Diacerein’in ilaç dozları ve 6-OHDA grubunun IL-10 sonuçları karşılaştırıldığında Diacerein’in bütün dozları yüksek IL-10 seviyesine sahiptir.

Oksidatif stresin birçok patoloji ve bozukluğun öncüsü olduğu bilindiğinden, ilaçların antioksidan aktivitesi farmakolojik olarak önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. ACE-I alımının nörodejeneratif bozuklukları olan hastaların şartları iyileştirdiğine ve inflamatuvar süreçleri yavaşlatabileceğine dair birçok klinik rapor vardır. Bir çalışmada silazapril, ramipril, imidapril, lisinopril, perindopril ve kinapriline antioksidan özelliklerinin karşılaştırmalı bir analizi yapılmış, Elektron paramanyetik rezonans, serbest radikal modeli ile seçilen ACE-I etkileşimlerini incelemek için kullanılmıştır. Test edilen tüm ilaçlar antioksidan özelliklere sahip bulunmuş, Silazapril, en güçlü etkileşime sahiptir ilaç olarak bulunmuştur.⁸ Silazapril ile yaptığımız MTT testinde 2,5 µg/mL dozu etkili bulunmuştur (Şekil 3.5). Bu sonucun oksidan parametrelerle ilişkisi incelenince yine aynı dozda total antioksidan parametrelerde farklılık olduğu ve ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 3.6). Total Oksidan parametreler ise bunu desteklememiş anlamlı bulunmamıştır. IL-10 seviyeleri de 6-OHDA grubunda görülen düşüş geri dönebilmiştir. IL-10’ın inflamasyonu sınırlamak ve dokulara olan hasarı azaltmak için üretildiği bilinmektedir. Bu çalışmada da IL 10 6-OHDA grubunda düşmüş, silazaprilin 1.25, 2.5 ve 5 µM’lık dozları istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

Benazepril, antioksidan etkili bir ACE inhibitörü ilaçtır. Çalışmamızda, kontrol grubu ile 6-OHDA grubu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. 6-OHDA ve kontrol

grubu karşılaştırıldığında 6-OHDA grubunda canlılık oranı %70,8 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise %100 olarak oranlanmıştır. Benazepril ve 6-OHDA grubu karşılaştırıldığında Benazepril'in 0.16 μ M'lık ilaç dozu %78.58 değerleri ile en yüksek canlılık oranı bulunmuştur. Benazepril ve 6-OHDA grubunun TAS sonuçları karşılaştırıldığında Benazepril'in 0.16 ve 0.32 μ M'lık ilaç dozları sırasıyla 1.48 ve 1.27 değerleri ile en yüksek antioksidan seviyelerine sahiptir. Yani benazepril 0,16 μ M'lık ilaç dozunda faydalı etki oluşturmuş ve bu etki antioksidan parametrelerle ilişkili bulunmuştur (Şekil 3.10). Benazepril'in bütün dozları yüksek IL-10 seviyesine sahiptir ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 3.12). Bu durum benazeprilin de antioksidan parametreler dışında da antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Özetle, bu çalışma oksidatif stresör 6-OHDA'nın hücre kültüründe PH hayvan modellerinde apoptotik yolu aktive ettiğini göstermektedir. Bu aktivasyonun yapılan tedaviler sonrası oksidan sistem dışındaki sistemleri de ilgilendirdiği tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Parkinson hastalığının patogeneğinde ve semptomatolojisinde nöronal dejenerasyon, oksidatif stres ve glutamaterjik sistemin yer alması, nöroprotektif terapötik yeni hedefler için önemli katkı sağlar. Anti-oksidan ve anti-inflamatuar nitelikte olan diacerein; anormal seviyelerde artmış glutamaterjik iletimi inhibe eder ve proinflamatuar sitokinlerin salınımını ve üretimini azaltmaktadır. Silazapril ve Benazepril ise nöroprotektif, anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Bu çalışmanın amacı antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahip Diacerein, Silazapril ve Benazepril'in SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında 6-OHDA ile indüklenen in vitro Parkinson modelinde oksidatif hasar üzerine tedavi etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma, SH-SY5Y hücre hattında 6-OHDA ile Parkinson modeli oluşturulmuş, TAS-TOS, MTT ve IL-10 kitleri ile analizi yapılmıştır. Antioksidan etkileri bulunan her 3 ilaçta MTT testlerinde 6-OHDA'nın oluşturduğu deneysel Parkinson modeline karşı etkili bulunmuştur. Bu etkilerin ise sadece antioksidan etkilerden kaynaklanmadığı IL-10 gibi bazı farklı parametreler üzerinden de faydalı etkilerini gösterebildikleri ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G. Missing Pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 2010, 16(6):653-61.
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 23;3:17013.
3. Raza C, Anjum R, Shakeel NUA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci*, 2019, 1;226:77-90.
4. Almezgagi M, Zhang Y, Hezam K, Shamsan E, Gamah M, Al-Shaebi F, Abbas AB, Shoaib M, SaifB, Han Y. Diacerein: Recent insight into pharmacological activities and molecular pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110594.
5. LeWitt PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mov Disord*, 2015, 30(1):64-72.
6. Carrera I, Cacabelos R. Current Drugs and Potential Future Neuroprotective Compounds for Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol*, 2019, 17: 295-306.
7. Ferah Okay I, Okay U, Cicek B, Yilmaz A, Yesilyurt F, Mendil AS, Hacimuftuoglu A. Neuroprotective effect of bromelain in 6-hydroxydopamine induced in vitro model of Parkinson's disease. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48: 7711-7717.
8. Juszczak A, Ramos P, Szczolko W. Evaluation of antioxidant properties of angiotensin- converting enzyme inhibitors-interactions with free radicals model examined by EPR spectroscopy. *Pharm Pharmacol Int J*, 2020, 8: 25-32.
9. Zhan L, Wang X, Zhang Y, Zhu G, Ding Y, Chen X, Jiang W, Wu S. Benazepril hydrochloride protects against doxorubicin cardiotoxicity by regulating the PI3K/Akt pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, 2021, 22: 1-9.

10. Pagonabarraga J, Tinazzi M, Caccia C, Jost WH. The role of glutamatergic neurotransmission in the motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: Clinical cases and a review of the literature. *Journal of clinical neuroscience*, 2021, 90:178-183.
11. Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011, 1(1):a008862.
12. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 2002, 14(2), 223–222.
13. McDonald C, Gordon G, Hand A, Walker RW, Fisher JM. 200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson. *Age and ageing*, 2018, 47(2), 209–214.
14. Rodríguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Fahn S, Tolosa E. Two-hundred Years Later: Is Parkinson's Disease a Single Defined Entity? *Revista de Investigación Clínica*, 2018, 69: 308-313.
15. Foffani G, Obeso JA. A Cortical Pathogenic Theory of Parkinson's Disease. *Neuron*, 2018, 99(6), 1116–1128.
16. Pajares M, Rojo AI, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, 2020, 9(7): 1687.
17. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of parkinson's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 2017, 124(8), 901–905.
18. Lotankar S, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull*, 2017, 33(5):585-597.
19. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 2015, 386(9996), 896–912.

20. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational neurodegeneration*, 2017 6, 28.
21. Zeng XS, Geng WS, Jia JJ, Chen L, Zhang PP. Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration in Parkinson Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 2018, 10: 109.
22. Foster HD, Hoffer A. The two faces of L-DOPA: benefits and adverse side effects in the treatment of Encephalitis lethargica, Parkinson's disease, multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Medical hypotheses*, 2004, 62(2): 177–181.
23. Ball N, Teo WP, Chandra S, Chapman J. Parkinson's Disease and the Environment. *Front Neurol*, 2019, 19;10:218.
24. Marras C, Canning CG, Goldman SM. Environment, lifestyle, and Parkinson's disease: Implications for prevention in the next decade. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 2019, 34(6): 801–811.
25. Sarkar S, Raymick J, Imam S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci*, 2016, 8;17(6): 904.
26. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007, 39(1): 44–84.
27. Tansey M G, McCoy M K, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology*, 2007, 208(1): 1–25.
28. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 2016, 139 Suppl 1: 318–324.

29. Radhakrishnan DM, Goyal V. Parkinson's disease: A review. *Neurology India*, 2018, 66: S26–S35.
30. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2008, 79(4), 368–376.
31. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH, National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet. Neurology*, 2006, 5(3): 235–245.
32. Church FC. Treatment options for motor and non-motor symptoms of Parkinson's Disease. *Biomolecules*, 2021, 20;11(4):612.
33. Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2021, 20(5): 385-397.
34. Macphee G, Stewart D. Parkinson's disease – pathology, aetiology and diagnosis. *Reviews in Clinical Gerontology*, 2012, 22(3): 165-178.
35. Stoker TB, Barker RA. Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease. *F1000Res*, 2020, 31: 9 -862.
36. Ellis JM, Fell MJ. Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27: 4247-4255.
37. Rezak M. Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease. *Disease-a-month: DM*, 2007, 53(4): 214–222.
38. Erdal KJ. Depression and anxiety in persons with parkinson's disease with and without “On–Off” phenomena. *Journal of Clinical Psychology in Medical Settings*, 2001, 8: 293–299.
39. Elkouzi A, Vedam-Mai V, Eisinger RS, Okun MS. Emerging therapies in Parkinson disease - repurposed drugs and new approaches. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(4):204-223.

40. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 2013, 3(4): 461-91.
41. Seidl SE, Potashkin JA. The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Front Neurol*, 2011, 21;2: 68.
42. Almezgagi M, Zhang Y, Hezam K, Shamsan E, Gamah M, Al-Shaebi F, Abbas AB, Shoaib M, Saif B, Han Y. Diacerein: Recent insight into pharmacological activities and molecular pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110594.
43. Pavelka K, Bruyere O, Cooper C, Kanis JA, Leeb BF, Maheu E, Martel-Pelletier J, Monfort J, Pelletier J-P, Rizzoli R. Diacerein: benefits, risks and place in the management of osteoarthritis. An opinion-based report from the ESCEO. *Drugs & aging*, 2016, 33: 75-85.
44. Pajares MA, Roja IR, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: mechanisms and therapeutic implications. *Cells*, 2020, 9.
45. Gadotti VM, Martins DF, Pinto HF, Oliveira G, Kaster MP, Quintão NLM, Santos ARS. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2012, 102: 549-554.
46. Kleinbloesem CH, van Brummelen P, Francis RJ, Wiegand UW. Clinical pharmacology of cilazapril. *Drugs*, 1991, 41 Suppl 1: 3-10.
47. Sonmez A, Yilmaz MI, Korkmaz A, Topal T, Caglar K, Kaya A, Eyileten T, Yenicesu M, Oguz Y, Basal S, Ipcioglu OM, Vural A. Hyperbaric oxygen treatment augments the efficacy of cilazapril and simvastatin regimens in an experimental nephrotic syndrome model. *Clin Exp Nephrol*, 2008, 12: 110-118.

48. Sengul G, Coskun S, Cakir M, Coban MK, Saruhan F, Hacimuftuoglu A. Neuroprotective effect of ACE inhibitors in glutamate - induced neurotoxicity: rat neuron culture study. *Turk Neurosurg.* 2011;21(3):367-71.
49. Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta neuropathologica*, 2008, 115(4), 385–398.
50. Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020, 21(7): 2464.
51. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 2001, 65(2): 135–172.
52. Kin K, Yasuhara T, Kameda M, Date I. Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5402.
53. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy*, 2014, 8: 155.
54. Taguchi T, Ikuno M, Yamakado H, Takahashi R. Animal Model for Prodromal Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1961.
55. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*, 2010, 123(8): 1086–1092.
56. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 2017, 12(1): 10.
57. Gomez-Lazaro M, Bonekamp NA, Galindo MF, Jordán J, Schrader M. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free radical biology & medicine*, 2008, 44(11): 1960–1969.

58. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2018, 8: 3-8.
59. Polissidis A, Petropoulou-Vathi L, Nakos-Bimpos M, Rideout HJ. The Future of Targeted Gene-Based Treatment Strategies and Biomarkers in Parkinson's Disease. *Biomolecules.* 2020, 10(6): 912.
60. Feng YS, Yang SD, Tan ZX, Wang MM, Xing Y, Dong F, Zhang F. The benefits and mechanisms of exercise training for Parkinson's disease. *Life sciences,* 2020, 245: 117345.
61. Filograna R, Beltramini M, Bubacco L, Bisaglia M. Anti-oxidants in Parkinson's Disease therapy: A Critical Point of View. *Curr Neuroparmacol,* 2016, 14(3): 260-71.
62. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Parkinson hastalığının toksin kaynaklı modelleri. *NöroRx.* 2005, 2(3): 484-494.
63. Terzioğlu M, Galter D. Parkinson hastalığı: genetik ve toksin kaynaklı kemirgen modelleri. *ŞUBAT J,* 2008, 275(7): 1384-1391.
64. Falkenburger BH, Dinter TSE, Cellular models for Parkinson's disease, *Journal of Neurochemistry,* 2016, 139: 121-130.
65. Espay AJ, LeWitt PA, Kaufmann H. Norepinephrine deficiency in Parkinson's disease: the case for noradrenergic enhancement. *Mov. Disord,* 2014, 29: 1710–1719.
66. Choi WS, Yoon SY, Oh TH, Choi EJ, O'Malley KL, Oh YJ. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res.* 1999, 57: 86–94.
67. Latchoumycandane C, Anantharam V, Jin H, Kanthasamy A, Kanthasamy A. Dopaminergic Neurotoxicant 6-OHDA Induces Oxidative Damage through Proteolytic Activation of PKC δ in Cell Culture and Animal Models of Parkinson's Disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011, 256(3): 314–323.

68. Linert W, Herlinger E, Jameson RF, Kienzl E, Jellinger K, Youdim MB. Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen--their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1996, 1316: 160–168.
69. Jordan J, Galindo MF, Tornero D, Gonzalez-Garcia C, Cena V. Bcl-x L blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2004, 89:124–133.



EK-2: ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Öznur ALTUNLU
Öğrencinin Numarası	20024002001
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 5	% 15
II. Genel Bilgiler	% 4	% 35
III. Materyal ve Metod	% 31	% 35
IV. Bulgular	% 6	% 15
V. Tartışma	% 1	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Öznur Altunlu	Prof. Dr Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU
5.8.2022	5.8.2022

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

EK-3: ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/155
Konu : Etik Kurul Kararı

24.02.2022

Sayın: Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz
"Anti-oksidan Etkili Olan Diacerein, Silazapril ve Benazepril'in *in vitro* Anti-Parkinson
Etkilerinin Araştırılması" isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı

Sorumlu Araştırmacı :
1. Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Yardımcı Araştırmacı :
1. Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur ALTUNLU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Anti-oksidan Etkili Olan Diacerein, Silazapril ve Benazepril'in <i>in vitro</i> Anti-Parkinson Etkilerinin Araştırılması
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 2 Karar No: 18	Tarih:24.02.2022
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	