



**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE KATEŞİNLERİN**  
**NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Uzman Diyetisyen Gülşen ÖZDURAN**

**Lefkoşa**  
**Ocak, 2022**

**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE KATEŞİNLERİN**  
**NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Uzman Diyetisyen Gülşen ÖZDURAN**

**Tez Danışmanı**

**Tez Eş Danışmanı**

**Prof. Dr. Sevinç YÜCECAN**

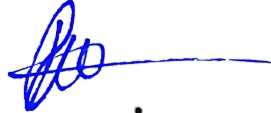





**Prof. Dr. Hafize Seda VATANSEVER**

**Lefkoşa**

**Ocak, 2022**

## Onay

Uzman Diyetisyen Gülşen Özduran tarafından hazırlanan “**Deneysel Parkinson Modelinde Kateşinlerin Nöroprotektif Etkileri**” başlıklı tez, kapsam ve nitelik açısından kalite standartlarına uygunluğu ile ilgili Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak 14/1/2022 tarihinde kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Adı – Soyadı	İmza
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hafize Seda Vatansever	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Aysel Kükner	
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Eda Becer	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Murat Sayan	
Danışman:	Prof. Dr. Sevinç Yücecan	

Anabilim Dalı Başkanı Onayı

14/1/2022

Prof. Dr. Adile Öniz Özgören

Anabilim Dalı Başkanı

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

14/1/2022

Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer

Enstitü Müdürü

## **Etik İkelere Uygunluk Beyanı**

Bu tezin içinde sunduğum verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallar gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

**Uzm. Dyt. Gülşen ÖZDURAN**

**14/1/2022**

## Teşekkür

Akademik hayata adım attığım ilk günden beri sonsuz destekleri, yardımları, pozitif enerjisi, sevgisi ve bana olan inancı için danışmanım sayın Prof. Dr. Sevinç Yücecan'a,

Doktora sürecinin tüm aşamalarında tecrübeleri ile katkılar koyan, daima güvenip bunu en güzel şekilde hissettiren, destekleyen ve yol gösterici olan eş danışmanım sayın Prof. Dr. Hafize Seda Vatansever'e,

Tez çalışmasının her aşamasına emek vererek deneyimlerini paylaşan, en zor şartlarda bile desteği ve inancı ile devam etmemi sağlayan, sonsuz desteği, özverisi, yol göstericiliği ve güveni için sayın Doç. Dr. Eda Becer'e,

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesinde destekleri ve sabrı için sayın Doç. Dr. Özgür Tosun'a ve Yakın Doğu Üniversitesi Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi (DESAM) Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndaki yardımları için Uzm. Nadir Kıyak'a,

Her zaman her koşulda yanımda olan, beni motive eden, yol gösteren, inanan, sonsuz yardımları ve desteği için dostum Yrd. Doç. Dr. Mustafa Hoca'ya,

Doktora sürecinin her türlü zorluğunu birlikte yaşayıp atlattığım, her zaman yanımda olan dostlarım Uzm. Dyt. Müjgan Kuşu'ya ve Uzm. Dyt. Fatma Hacet'e,

Sevgilerini, desteklerini, dualarını hiç eksik etmeyerek her zaman maddi ve manevi yanımda olan canımdan çok sevdiğim sevgili annem Hatice Özduran'a ve babam Emin Özduran'a, kardeşim Yalçın Özduran'a, babaannem Gülşen Özduran'a, manevi kız kardeşim Dilara Sak'a; hayatıma kattıkları önemi asla unutmayacağım ve her zaman kalbimde yaşayan dedem Yalçın Özduran'a ve anneannem Ayşe Balaban'a,

Çalışma süresince sabır ve anlayışları için başta Prof. Dr. Adile Öniz Özgören'e, Yrd. Doç. Dr. Günsu Soykut Çağsın'a, Dr. Dyt. Servet Madencioğlu'na, Uzm. Dyt. Burçin Karavelioğlu'na ve tüm çalışma arkadaşlarıma, Sadiye Güçhan ve ailesine, Neşe Polat ve ailesine, Zehra Güçhan Topçu'ya, Tuğçe Aydın'a, Aysu Akın'a, Gamze Öney'e, Başak Özmen'e, Meltem Küçük'e, Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğrencilerime ve adlarını buraya sığdıramadığım tüm sevdiklerime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Uzm. Dyt. Gülşen ÖZDURAN

## Özet

### Deneysel Parkinson Modelinde Kateşinlerin Nöroprotektif Etkileri

Uzm. Dyt. Gülşen Özduran

Danışmanı: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Eş Danışmanı: Prof. Dr. Hafize Seda Vatansver

Doktora, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı

Ocak 2022, 155

**Amaç:** Kateşinler, flavonoid ailesinden flavan-3-ol alt sınıflamasına ait, yeşil çayda bol miktarda bulunan biyoaktif besin bileşenleridir. Bu çalışmanın amacı, *in vitro* Parkinson modeli oluşturmak, yeşil çay kateşinlerinden kateşin ve epigallokateşin gallatın SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson model hücrelerinde hücre canlılığını, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik ve nöroprotektif etkilerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada SK-N-AS insan nöroblastom hücreleri kullanılmıştır. *In vitro* Parkinson modelini oluşturmak için SK-N-AS hücreleri, 24 saat ve 48 saat süresince 25 µM, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında 6-hidroksidopamin ile muamele edilmiştir. Model kontrolü, ELISA analiziyle kültür vasatlarındaki dopamin ve alfa-sinüklein düzeylerinin belirlenmesiyle yapılmıştır. Kateşin ve epigallokateşin gallat, SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerine 24 saat ve 48 saat süresince beş farklı konsantrasyonda (10 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM) uygulanmıştır. Hücre canlılığı, tiazolil mavi tetrazolyum bromür (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) (MTT) analizi ve tripan mavisini boyaması ile rutin protokol uygulanarak ölçülmüştür. Kateşin ve epigallokateşin gallatın, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteleri TNF-α, IL-1β ve kaspaz-3 antikorları kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** 50 µM konsantrasyonda 24 saat süresince 6-hidroksidopamin uygulamasından sonra, Parkinson model hücrelerinde SK-N-AS hücrelerine kıyasla daha yüksek alfa-sinüklein ve daha düşük dopamin seviyelerinin olduğu bulunmuştur. Hücre canlılığının, SK-N-AS ve *in vitro* Parkinson model hücreleri arasında benzer olduğu saptanmıştır. Ayrıca, hücre canlılığı analizlerinden sonra, her iki biyoaktif bileşenin (kateşin ve epigallokateşin gallat), *in vitro* Parkinson model hücrelerinin hücre canlılığını artırdığı görülmüştür. Kaspaz-3 immünoaktivitesi, epigallokateşin gallat uygulamasından sonra

hem SK-N-AS hücrelerinde hem de *in vitro* Parkinson model hücrelerinde önemli ölçüde azalırken, kateşin uygulamasından sonra sadece *in vitro* Parkinson model hücrelerinde azalma olduğu saptanmıştır. Ek olarak, *in vitro* Parkinson model hücrelerinde kateşin, SK-N-AS hücrelerinde ise epigallokateşin gallat uygulamasından sonra IL-1 $\beta$  yoğunluklarının zayıfladığı tespit edilmiştir. TNF- $\alpha$  boyamasının, her iki uygulamadan sonra iki grupta da benzer olduğu bulunmuştur.

**Sonuçlar:** Kateşin ve epigallokateşin gallatın, Parkinson model nöron hücrelerinde hücre canlılığını artırdığı sonucuna varılmıştır. Ek olarak, her iki biyoaktif bileşenin de anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkiler gösterdiği görülmüştür. Kateşinin, Parkinson hastalığında nöronların hasar görmesini önlemede daha etkili olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** SK-N-AS hücreleri, *In vitro* Parkinson modeli, 6-hidroksidopamin, epigallokateşin gallat, kateşin

## Abstract

### Neuroprotective Effects of Catechins in an Experimental Parkinson's Model

**MSc, Dietitian. Gülşen Özduran**

**Advisor: Prof. Dr. Sevinç Yücecan**

**Co-advisor: Prof. Dr. Hafize Seda Vatansever**

**Ph.D., Department of Nutrition and Dietetics**

**January 2022, 155**

**Objective:** Catechins are bioactive nutritional components abundantly found in green tea, belonging to the flavan-3-ols subclassification in the flavonoid family. This study aims to establish an *in vitro* Parkinson's model and investigate the cell viability, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neuroprotective effects of catechin and epigallocatechin gallate in SK-N-AS cells and *in vitro* Parkinson's model cells.

**Materials and Methods:** SK-N-AS human neuroblastoma cells were used in the study. To develop the *in vitro* Parkinson's model, SK-N-AS cells were exposed to 6-hydroxydopamine at concentrations of 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M for 24 and 48 hours. Model control was performed after ELISA analysis of dopamine and  $\alpha$ -synuclein levels in the culture medium. Catechin and epigallocatechin gallate were applied at five different concentrations (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M and 200  $\mu$ M) to SK-N-AS (control) and *in vitro* Parkinson's model cells for 24 and 48 hours. Cell viability was measured using the routine protocol with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and trypan blue staining. Anti-inflammatory and anti-apoptotic activities of catechin and epigallocatechin gallate were investigated by immunocytochemistry using TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and caspase-3 antibodies.

**Results:** After 24 hours of 6-hydroxydopamine administration at 50  $\mu$ M concentration, higher  $\alpha$ -synuclein and lower dopamine levels were found in Parkinson's model cells compared to SK-N-AS cells. Cell viability was similar between SK-N-AS and *in vitro* Parkinson's model cells. In addition, after cell viability analyzes, both bioactive components (catechin and epigallocatechin gallate) increased the cell viability of *in vitro* Parkinson's model cells. Caspase-3 immunoreactivity was significantly reduced in both SK-N-AS cells and Parkinson's model cells after epigallocatechin gallate administration, while it was decreased only in Parkinson's model cells after catechin administration. In



addition, IL-1 $\beta$  intensity weakened after catechin administration in Parkinson's model cells and after epigallocatechin gallate administration in SK-N-AS cells. TNF- $\alpha$  staining was similar in both cells after both administrations.

**Conclusions:** Catechin and epigallocatechin gallate increase cell viability in Parkinson's model neuron cells. In addition, both components showed anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. Catechin may be more effective in preventing damage to neurons in Parkinson's disease.

**Keywords:** SK-N-AS cells, *In vitro* Parkinson's model, 6-hydroxydopamine, epigallocatechin gallate, catechin

## İçindekiler

Onay .....	i
Etik İlkelerle Uygunluk Beyanı .....	ii
Teşekkür .....	iii
Özet .....	iv
Abstract .....	vi
İçindekiler.....	viii
Tablolar Listesi .....	xi
Şekiller Listesi .....	xii
Kısaltmalar .....	xv

## BÖLÜM I

Giriş.....	1
Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam.....	1
Amaç .....	3
Hipotezler .....	4

## BÖLÜM II

Genel Bilgiler.....	5
Parkinson Hastalığı ve Özellikleri .....	5
Parkinson Hastalığının Patogenezi .....	6
Parkinson Modeli Oluşturma Yöntemleri .....	7
<i>6-OHDA ve Özellikleri</i> .....	8
<i>6-OHDA ve Etki Mekanizması</i> .....	8
<i>Rotenon ve Özellikleri</i> .....	12
<i>Rotenon ve Etki Mekanizması</i> .....	13
<i>MPTP ve Özellikleri</i> .....	14
<i>MPTP ve Etki Mekanizması</i> .....	15
<i>Parakuat ve Özellikleri</i> .....	16
<i>Parakuat ve Etki Mekanizması</i> .....	16
Parkinson Hastalığı ve Polifoneller.....	17
Kateşinlerin Özellikleri.....	17
Kateşinlerin Kaynakları .....	19
Kateşinlerin Metabolizması.....	21
Kateşinlerin Hastalıklarla İlişkisi .....	22
Kateşinlerin Parkinson Hastalığındaki Potansiyel Etkileri.....	23

<i>Kateşinlerin Antioksidan Etkileri</i> .....	23
<i>Kateşinlerin Lipid Peroksidasyonundaki Etkileri</i> .....	25
<i>Kateşinlerin Metal İyonlarının Şelatlanmasındaki Etkileri</i> .....	26
<i>Kateşinlerin Anti-inflamatuar Etkileri</i> .....	27
<i>Kateşinlerin Anti-apoptotik ve Nöroprotektif Etkileri</i> .....	28

### BÖLÜM III

Gereç ve Yöntem.....	32
Malzemeler ve Reaktifler.....	32
Hücre Hattı ve Hücre Kültürü .....	32
<i>In vitro</i> Parkinson Modelinin Oluşturulması ve Analizi.....	33
ELISA Protokolleri .....	33
( <i>DA</i> ) Dopamine ELISA Kiti .....	34
Human SNC $\alpha$ (Synuclein Alpha) ELISA Kiti.....	35
Çalışma Grupları ve Kültürleri .....	36
Hücre Canlılığı ve Hücre Büyümesi Analizi .....	37
İmmünohistokimya Protokolü.....	38
Araştırma Türü ve Araştırma Yeri .....	39
İstatistiksel Analiz .....	39

### BÖLÜM IV

Bulgular .....	41
<i>In vitro</i> Parkinson Modeli Değerlendirmesi.....	41
Hücre Canlılığı ve Büyüme Analizi .....	43
Hücre Morfolojisi .....	49
İmmünohistokimyasal Değerlendirme .....	50

### BÖLÜM V

Tartışma.....	66
---------------	----

### BÖLÜM VI

Sonuç ve Öneriler .....	76
Sonuç.....	76
Öneriler .....	77
Kaynakça .....	78
EKLER .....	91

<b>Ek 1. Makale .....</b>	<b>91</b>
<b>Ek 2. Sözel Bildiri .....</b>	<b>117</b>
<b>Ek 3. Ödül .....</b>	<b>119</b>
<b>Ek 4. İntihal Raporu .....</b>	<b>120</b>
<b>Ek 5. Özgeçmiş.....</b>	<b>121</b>

## Tablolar Listesi

	Sayfa
<b>Tablo 1.</b> Bazı Besinlerin Kateşin İçerikleri ve Miktarları	20
<b>Tablo 2.</b> 100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve <i>in vitro</i> Parkinson Modeli Hücrelerinde TNF-α İçin H-SKOR Değerleri	52
<b>Tablo 3.</b> 100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve <i>in vitro</i> Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1β İçin H-SKOR Değerleri	56
<b>Tablo 3.a.</b> Kateşin Uygulanan, Epigallokateşin Gallat Uygulanan ve Kontrol Gruplarındaki <i>in vitro</i> Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1β Antikorumunun H-SKOR Değerleri Arasındaki Anlamlılık Dereceleri	57
<b>Tablo 4.</b> 100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve <i>in vitro</i> Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3 İçin H-SKOR Değerleri	62
<b>Tablo 4.a.</b> Kateşin Uygulanan, Epigallokateşin Gallat Uygulanan ve Kontrol Gruplarındaki SK-N-AS Hücrelerinde Kaspaz-3 Antikorumunun H-SKOR Değerleri Arasındaki Anlamlılık Dereceleri	63
<b>Tablo 4.b.</b> Kateşin Uygulanan, Epigallokateşin Gallat Uygulanan ve Kontrol Gruplarındaki <i>in vitro</i> Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3 Antikorumunun H-SKOR Değerleri Arasındaki Anlamlılık Dereceleri	63

## Şekiller Listesi

	Sayfa
Şekil 1. Parkinson hastalığının patogenezi	7
Şekil 2. 6-OHDA ve Dopaminin Kimyasal Yapıları	8
Şekil 3. 6-OHDA'nın Nörodejenerasyonu Başlatma Mekanizması	10
Şekil 4. 6-OHDA ile İndüklenen Mitokondri Dış Membranın Mekanizması	11
Şekil 5. Rotenonun Kimyasal Yapısı	13
Şekil 6. Parkinson Modeli Oluşturmak için Kullanılan Nörotoksinlerin Etki Mekanizmaları	14
Şekil 7. MPTP, MPDP <sup>+</sup> ve MPP <sup>+</sup> 'nin Kimyasal Yapıları	15
Şekil 8. Parakuatın Kimyasal Yapısı	16
Şekil 9. Kateşinlerin Kimyasal Yapıları	18
Şekil 10. Kateşinlerin Metabolizması	22
Şekil 11. Kateşinlerin Antioksidan Etki Mekanizmaları	24
Şekil 12. Kateşinlerin Anti-inflamatuar Etki Mekanizmaları	28
Şekil 13. Kateşinlerin Anti-apoptotik ve Nöroprotektif Etki Mekanizmaları	30
Şekil 14. 6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücrelerinde Alfa-sinüklein Düzeyleri	42
Şekil 15. 6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücrelerinde Dopamin Düzeyleri	43
Şekil 16. Farklı Konsantrasyonlarda 24 Saat (A-D) ve 48 Saat (E-H) İnkübasyon Sürelerinde 6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücreleri; Kontrol Grubu (A, E), 25 µM (B, F), 50 µM (C, G) ve 100 µM	44

(D, H). Ölçek: 200  $\mu\text{m}$

- Şekil 17.** 24 Saat Süresince 50  $\mu\text{M}$  6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücrelerinin Hücre Canlılığı 45
- Şekil 18.** Kateşinin SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri 47
- Şekil 19.** Epigallokateşin Gallatın SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri 48
- Şekil 20.** Kateşin (A,D), Epigallokateşin Gallat (B,E) ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) (C,F) Kültüre Edildikten Sonra SK-N-AS Hücreleri (A-C) ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinin (D-F) İverted Mikroskop Altındaki Görüntüleri. Ölçek: 200  $\mu\text{m}$  49
- Şekil 21.** 100  $\mu\text{M}$  Kateşin, 100  $\mu\text{M}$  Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde TNF- $\alpha$ 'nın İmmünoreaktivitesi. Ölçek: 100  $\mu\text{m}$  53
- Şekil 22.** SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde TNF- $\alpha$  İçin H-SKOR Değerleri Farkları 54
- Şekil 23.** 100  $\mu\text{M}$  Kateşin, 100  $\mu\text{M}$  Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1 $\beta$ 'nin İmmünoreaktivitesi. Ölçek: 100  $\mu\text{m}$  58
- Şekil 24.** SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1 $\beta$  İçin H-SKOR Değerleri Farkları 59
- Şekil 25.** 100  $\mu\text{M}$  Kateşin, 100  $\mu\text{M}$  Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3'ün İmmünoreaktivitesi. Ölçek: 100  $\mu\text{m}$  64
- Şekil 26.** SK-N-AS Hücreleri ve *in vitro* Parkinson Modeli Hücrelerinde 65

## Kaspaz-3 İçin H-SKOR Değerleri Farkları



## Kısaltmalar

<b>%:</b>	Yüzde
<b>-:</b>	Negatif
<b>~:</b>	Yaklaşık
<b>+:</b>	Pozitif
<b>&lt;:</b>	Küçüktür işareti
<b>&gt;:</b>	Büyüktür işareti
<b>±:</b>	Artı-eksi işareti
<b>≥:</b>	Büyük eşittir işareti
<b>°C:</b>	Santigrat
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µM:</b>	Mikromolar
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b>	Süperoksit radikali
<b>•OH<sup>-</sup>:</b>	Hidroksil radikali
<b>6-OHDA:</b>	6-hidroksidopamin
<b>Ab:</b>	Antikor
<b>ABD:</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>Akt:</b>	Protein kinaz B
<b>ARE:</b>	Antioksidan yanıt elemanı
<b>C:</b>	Kateşin
<b>Ca<sup>+2</sup> :</b>	Kalsiyum

<b>CAD:</b>	Katalaz
<b>CG:</b>	Kateşin gallat
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Karbondioksit
<b>COMT:</b>	Katekol-O-metiltransferaz
<b>COX-2:</b>	Siklooksijenaz-2
<b>Cu<sup>+2</sup>:</b>	Bakır
<b>ÇDYA:</b>	Çoklu doymamış yağ asitleri
<b>DAB:</b>	Diaminobenzidin
<b>DESAM:</b>	Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi
<b>dH<sub>2</sub>O:</b>	Distile su
<b>diğ.:</b>	Diğerleri
<b>DMEM:</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO:</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EC:</b>	Epikateşin
<b>ECG:</b>	Epikateşin gallat
<b>EDTA:</b>	Tripsin-etilendiamin tetraasetik asit
<b>EGC:</b>	Epigallokateşin
<b>EGCG:</b>	Epigallokateşin gallat
<b>ELISA:</b>	Enzim bağılı immünosorbent analizi
<b>ERK:</b>	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
<b>FBS:</b>	Fetal sığır serumu

<b>Fe<sup>+2</sup>:</b>	Demir
<b>GC:</b>	Gallokateşin
<b>GCG:</b>	Gallokateşin gallat
<b>GSH:</b>	Glutatyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Hidrojen peroksit
<b>HRP:</b>	Horseradish peroksidaz
<b>H-SKOR:</b>	Histolojik-skor
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	İnterferon-gama
<b>IL-1:</b>	İnterlökin-1
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	İnterlökin-1 beta
<b>IL-2</b>	İnterlökin-2
<b>IL-6:</b>	İnterlökin-6
<b>i:</b>	Yoğunluk
<b>iNOS:</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>JAK:</b>	Janus kinaz
<b>JNK:</b>	c-Jun-N terminal kinaz
<b>kg:</b>	Kilogram
<b>L:</b>	Litre
<b>LOO:</b>	Lipid peroksil radikali
<b>LPS:</b>	Lipopolisakkarit
<b>MAPK:</b>	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
<b>mcg:</b>	Mikrogram

<b>mg:</b>	Miligram
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>mM:</b>	Milimol
<b>MPDP<sup>+</sup>:</b>	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum
<b>MPP<sup>+</sup>:</b>	1-metil-4-fenilpiridinyum
<b>MPTP:</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
<b>mTOR:</b>	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
<b>MTT:</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
<b>n:</b>	Sayı
<b>NADH:</b>	Nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş formu
<b>NADPH-oksidad:</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidad
<b>NF-κB:</b>	Nükleer faktör kappa B
<b>nm:</b>	Nanometre
<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>Nrf2:</b>	Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2
<b>OD:</b>	Optik yoğunluğu
<b>p:</b>	Anlamlılık derecesi
<b>PBS:</b>	Fosfat tamponlu tuz
<b>p-EGCG:</b>	Asetillenmiş epigallokateşin gallat
<b>pg:</b>	Pikogram
<b>PI3K:</b>	Fosfotidil inositol 3 kinaz
<b>PKC:</b>	Protein kinaz C

<b>PTP:</b>	Geçirgenlik geçiş gözeneği
<b>ROT:</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SN</b>	Substantia nigra
<b>SNpc:</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SOD:</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SS:</b>	Standart sapma
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tümör nekroz faktör-alfa
<b>UPS:</b>	Ubikitin-proteozom sistemi
<b>vb.:</b>	Ve benzeri
<b><math>\Sigma</math>:</b>	Toplam simgesi
<b><math>\mu</math>:</b>	Her yoğunluktaki boyanmış hücrelerin yüzdesi

## BÖLÜM I

### Giriş

Bu bölümde araştırmanın problemine, amacına, önemine, hipotezlerine ve ilgili tanımlara yer verilmiştir.

#### **Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam**

Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar, yaşlı nüfusta sıklıkla görülen nörolojik bozukluklardır. 21. yüzyılda her iki hastalığın prevalansında da önemli ölçüde artışların olduğu görülmektedir (Velmurugan, & diğ., 2018). Parkinson hastalığı, son yıllarda nörodejeneratif hastalıklar arasında Alzheimer hastalığından sonra en yaygın görülen ikinci hastalıktır. Parkinson hastalığının prevalansı, insidansı, hastalığa bağlı oluşan sakatlık ve ölüm oranları giderek artmaktadır (Lama, & diğ., 2020; Dorsey, & diğ., 2018; Rocca, 2018).

Parkinson hastalığı patogenezi, mezensefalondaki substantia nigra (SN) pars compacta'daki (SNpc) dopaminerjik nöronların kaybı ile çözünmeyen ve yanlış katlanmış alfa-sinüklein agregatları içeren Lewy cisimciklerinin birikmesi ile karakterize edilmektedir. Parkinson hastalığı başlangıcı, azalmış striatal dopamin seviyeleri ve alfa-sinüklein agregatlarının artan birikimiyle ilişkilendirilmektedir (Lama, & diğ., 2020; Simon, & diğ., 2020). Parkinson hastalığında Lewy cisimlerinin birikmesi; reaktif oksijen türleri (ROT) ve nitrik oksit türlerinin üretimi, oksidatif stres, nöroinflamasyon, protein yıkım yollarının bozulması, mitokondriyal disfonksiyon, apoptoz ve nörodejenerasyon gibi çeşitli mekanizmaların indüklenmesine neden olmaktadır (Singh, & diğ., 2015).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) gibi nörotoksin bileşikler, *in vivo* ve *in vitro* Parkinson modellerinin oluşturulması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksidopamin olarak da bilinen 6-OHDA, kimyasal yapısı katekolaminlere (özellikle dopamin ve norepinefrin) benzeyen toksik bir oksidatif metabolit olup kan-beyin bariyerini az miktarda geçebilmektedir. 6-OHDA, SNpc'deki dopaminerjik nöronlar için yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu özelliği sayesinde, nigrostriatal sistemde oksidatif stres, nöroinflamasyon, apoptoz ve nörodejenerasyon süreçlerini indükleyebilmekte ve Parkinson modelinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Hernandez-Baltazar, & diğ., 2017; Galindo, & diğ., 2014). 6-OHDA'nın etki mekanizmalarına bakıldığında;

ilk olarak, OHDA'nın hücre içi ve hücre dışı oto-oksidasyonu, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit radikali ( $\bullet O_2^-$ ) ve hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) gibi ROT'ların üretimini artırmaktır. Daha sonrasında, ROT seviyelerindeki artış oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna, biyomembran, protein, ribonükleik asit ve deoksiribonükleik asit (DNA) hasarlarının meydana gelmesine neden olmaktadır. Hücre canlılığından sorumlu olan mitokondri de bu durumdan etkilenmektedir. ROT seviyelerindeki ve oksidatif stresteki artış; mitokondriyal kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) homeostazının bozulmasına, sitoplazmik serbest kalsiyum seviyesinin artmasına, mitokondriyal solunum zinciri kompleks I ve IV aktivitesinin azalmasına, mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasına ve mitokondriyal disfonksiyonun oluşmasına neden olmaktadır. Bu durumda, nöronlarda kaspaz-3 bağımlı apoptotik mekanizmaları indüklemektedir. Apoptozun gerçekleşmesiyle nöronal hücre kayıpları artmaktadır (Hernandez-Baltazar, & diğ., 2017; Galindo, & diğ., 2014; Alvarez-Fischer, & diğ., 2008).

Son on yılda, besinlerde bulunan polifenoller olarak bilinen çeşitli biyoaktif bileşiklerin nöroprotektif etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Khalatbary & Khademi, 2020). Kateşinler, polifenoller arasında flavonoid ailesinden flavan-3-ol sınıflandırılmasında yer alan, potansiyel nöroprotektif etkiye sahip olan bileşiklerdir (Pervin, & diğ., 2018). Kateşinlerin temel kaynağı olan besin, yeşil çaydır. ( $\pm$ )-kateşin (C), (-)-gallokateşin (GC), (-)-kateşin gallat (CG), (-)-gallokateşin gallat (GCG), (-)-epikateşin (EC), (-)-epigallokateşin (EGC), (-)-epikateşin gallat (ECG) ve (-)-epigallokateşin gallat (EGCG) yeşil çayda bulunan başlıca kateşinlerdir (Xu, & diğ., 2021). Yeşil çayda en fazla bulunan kateşin EGCG'dir. EGCG, kan-beyin bariyerini geçebilmekte ve çok düşük bir konsantrasyonda dahi nöronları etkileyebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı potansiyel nöroprotektif etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Khalatbary & Khademi, 2020).

Kateşinler, sinir sistemi ile nöronları serbest radikallere ve oksidatif strese karşı koruyan ana antioksidanlardandır. Yeşil çaydaki kateşinler, metal iyonlarını şelatlayarak, ROT'ları temizleyerek ve antioksidan enzim seviyelerini artırarak antioksidan özellikler göstermektedir. Ayrıca tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1), interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuvar mediatörlerin düzeylerini azaltıp; indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) gibi sinyal yollarını baskılayarak da anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir (Farkhondeh, & diğ., 2019; Bernatoniene & Kopustinskiene,

2018; Singh, & diğ., 2015; Mandel, & diğ., 2008). Kateşinler arasında özellikle EGCG, endojen antioksidanların düzeylerini artırıp ROT düzeylerini azaltarak oksidatif stresi baskılayıcı bir rol oynamakta ve nöron hücrelerini mitokondriyal disfonksiyona karşı korumaktadır. Bad, Bax, kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-1, TRAIL, gadd45, p21 gibi apoptotik proteinleri baskılayıp Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w gibi anti-apoptotik proteinleri indükleyerek anti-apoptotik etki göstermektedir. Ayrıca alfa-sinüklein agregatlarının birikmesini önleyerek de toksik etkileri ve hasarı engellemektedir. Katekol-O-metiltransferaz (COMT) enziminin aktivitesini baskılayarak da sinaptik dopamin seviyelerini yükseltmektedir (Malar, & diğ., 2020; Singh, & diğ., 2015; Mandel, & diğ., 2008). Önceki çalışmalarda kateşinlerin anti-inflamatuar, anti-apoptotik, antioksidan ve sinüklein agregasyonunu inhibe edici özelliklerinden dolayı Parkinson hastalığında nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Nan, & diğ., 2018; Zhao, & diğ., 2017a; Zhao, & diğ., 2017b; Xu, & diğ., 2016; Bitu Pinto, & diğ., 2015).

## Amaç

*In vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS insan nöroblastoma hücrelerinde kateşinlerin alt grubu olan epigallokateşin gallat ve kateşinin nöroprotektif etkilerinin incelenmesi çalışmanın amacıdır. Bu amaç doğrultusunda;

- *In vitro* Parkinson modelinin oluşturulması
- Epigallokateşin gallat ve kateşinin, *in vitro* Parkinson modelinde ve SK-N-AS hücrelerinde hücre canlılığı ve apoptotik etkilerinin incelenmesi
- Epigallokateşin gallat ve kateşinin, *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde inflammatuar belirteçler (TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi
- Epigallokateşin gallat ve kateşinin, *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde nöroprotektif etkilerinin belirlenmesi
- *In vitro* ortamda epigallokateşin gallat ve kateşinin Parkinson hastalığı üzerindeki etkilerini belirlenmesi, literatürdeki boşlukların doldurulması ve ileride yapılacak olan araştırmalara ön çalışma olması hedeflenmiştir.

Elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağı ve yeni araştırmalar için öncül olabileceği düşünülmektedir.



## Hipotezler

Kateşin için;

**H<sub>0</sub> hipotezi:** Kateşinin *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde hücre canlılığı, apoptoz, inflamasyon üzerinde etkisi yoktur.

**H<sub>1</sub> hipotezi:** Kateşin *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde etkin doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığını artırır.

**H<sub>2</sub> hipotezi:** Kateşinin *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde anti-apoptotik etkisi vardır.

**H<sub>3</sub> hipotezi:** Kateşinin *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde anti-inflamatuar etkisi vardır.

**H<sub>4</sub> hipotezi:** Kateşinin *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde nöroprotektif etkisi vardır.

Epigallokateşin gallat için;

**H<sub>0</sub> hipotezi:** Epigallokateşin gallatın *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde hücre canlılığı, apoptoz, inflamasyon üzerinde etkisi yoktur.

**H<sub>1</sub> hipotezi:** Epigallokateşin gallat *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde etkin doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığını artırır.

**H<sub>2</sub> hipotezi:** Epigallokateşin gallatın *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde anti-apoptotik etkisi vardır.

**H<sub>3</sub> hipotezi:** Epigallokateşin gallatın *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde anti-inflamatuar etkisi vardır.

**H<sub>4</sub> hipotezi:** Epigallokateşin gallatın *in vitro* Parkinson modeli ve SK-N-AS hücrelerinde nöroprotektif etkisi vardır.

## BÖLÜM II

### Genel Bilgiler

Bu bölümde araştırma ile ilgili kavramsal açıklamalara, tanımlamalara ve araştırma ile ilgili literatürde geçen ve daha önce yapılmış olan araştırmalara ilişkin bilgilere yer verilmiştir.

#### **Parkinson Hastalığı ve Özellikleri**

Nörodejeneratif hastalıklar, toksik veya metabolik nedenlere bağlı olarak nöron kayıplarıyla karakterize edilen nörolojik bozukluklardır. Artmış ROT üretimi, eksitotoksisite, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, protein metabolizmasındaki değişiklikler, yanlış katlanmış protein agregasyonu, nöroinflamasyon, sinaptik ve mitokondriyal disfonksiyon sonucu meydana gelen nöron kayıpları nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır (Farkhondeh, & diğ., 2019).

Parkinson hastalığı, özellikle yaşlı bireylerde Alzheimer hastalığından sonra ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır (Selvaraj & Piramanayagam, 2018; Coetzee, & diğ., 2016). Küresel Hastalık Yüğü Çalışması verilerine göre; 1990 yılında Dünya çapında 2.5 milyon, 2016 yılında ise 6.1 milyon Parkinson hastası bulunurken, 2050 yılında yaklaşık olarak 12 milyondan fazla kişinin Parkinson hastası olacağı bildirilmiştir (Dorsey, & diğ., 2018; Rocca, & diğ., 2018).

Parkinson hastalığı; aile öyküsü, cinsiyet, çevresel faktörler, toksinler ve yaş gibi karmaşık etiyolojisi olan uzun süreli ilerleyici sinir sistemi bozukluğudur. Yaş, Parkinson hastalığı için en önemli risk faktörü iken erkek cinsiyeti orta derecede risk taşımaktadır (Balestrino & Schapira, 2020). Parkinson hastalığı dinlenme tremoru, postüral refleks kaybı, rijidite, yürümede donma, fleksiyon postürü ve bradikinezi ile karakterizedir. Ayrıca otonomik disfonksiyon, nörodavranışsal bozukluklar ve bilişsel bozulma ile ilişkilidir (Selvaraj & Piramanayagam, 2018; Fahn, 2003). Hastalığın ilerleme süreci yavaş olmasına rağmen istemsiz titremeler, kişilerin günlük yaşam aktivitelerini bozmaktadır. Yürüme, konuşma ve yutma güçlükleri, bilişsel performansta azalma, duyuşsal anormallikler ve motor semptomlarda yavaşlama, davranış değişiklikleri, yorgunluk ve uyku bozuklukları gözlenmektedir (Alvarez-Fischer, & diğ., 2008). Hastalığın tedavisinde uygulanan mevcut tedaviler,

motor semptomların iyi bir şekilde kontrol edilmesini sağlarken nörodejenerasyonun ilerlemesini durduramamaktadır (Balestrino & Schapira, 2020).

Parkinson hastalığı ile ilişkili birçok anormal protein konformasyonu ve birikimi bulunmaktadır (Guo, & diğ., 2020; Selvaraj & Piramanayagam, 2018). SNpc'daki dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyonlarda bulunan çözünmeyen ve yanlış katlanmış alfa-sinüklein protein agregasyonu, Parkinson hastalığının patolojik özelliklerindedir. Hastalara ilk tanı konulduğunda, SNpc'daki dopaminerjik nöronların önemli bir kısmının kaybolduğu, nörodejenerasyonun diğer merkezi sinir sistemi bölgelerine yayıldığı ve belirtilerinin hastalık ortaya çıkmadan önce başladığı görülmektedir (Balestrino & Schapira, 2020). Parkinson hastalığının belirtilerinin görülebilmesi için SNpc'daki dopaminerjik nöronların ~%60-80'inin kayıp olması gerekmektedir. Post-mortem araştırmalarda, Parkinson hastalığı bulgusu olmayan farklı nedenlerden vefat eden bireylerin SN'daki nöronlarında %50 oranında kayıp olduğu bulunmuştur (Akbayır, & diğ., 2017).

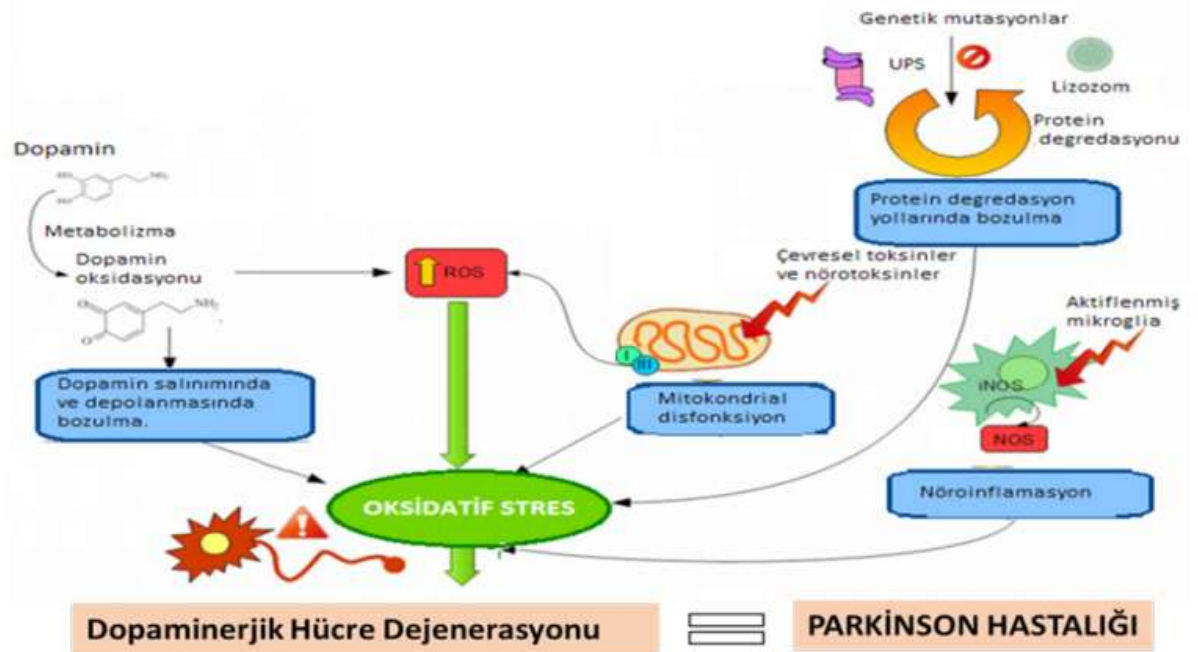
### **Parkinson Hastalığının Patogenezi**

Parkinson hastalığının patogenezinde mitokondri disfonksiyonu, oksidatif stres, ubiquitin-proteozom sistemi (UPS), mikroglial aktivasyonu, eksitotoksisite ve demir iyonu yer almaktadır. Parkinson hastalığında SN'daki artan ROT üretimine bağlı olarak mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I aktivitesinde azalma, mitokondriyal DNA da bozulmalar ve mitokondriyal disfonksiyon görülmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon, dopaminerjik nöronların apoptozuna yol açmaktadır. Özellikle ailesel ve çevresel faktörler mitokondriyal disfonksiyonun gerçekleşmesinde oldukça etkilidir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesi sonucu oluşan patolojik süreç olarak tanımlanmaktadır. Artan oksidatif stres, UPS'nin yüksek düzeyde uyarılmasına neden olurken, yanlış katlanmış protein agregasyonunu artırmakta ve nöronal hasara neden olmaktadır. UPS protein degradasyonunu sağlamaktadır. Mikroglia, merkezi sinir sistemi hücreleridir. Myeloid hücrelerinden köken alan mikroglia, hasarlı hücrelerin fagositozunu gerçekleştirmektedir. Mikroglia aktivasyonu inflamatuvar mediatörlerin üretimini artırmaktadır. Bu özelliğinden dolayı, aşırı mikroglia aktivasyonu nöroinflamasyonun oluşmasına neden olmaktadır. Artmış mikroglia aktivasyonu kaynaklı nöroinflamasyon, SN'da bulunan dopaminerjik nöronlarda nöronal hasarın

oluşmasına neden olurken, anti-inflamatuar etki gösteren tedavilerin nöronal kaybı azalttığı bilinmektedir. Eksitotoksisite, Parkinson hastalığının patogenezinde yer alan önemli bir faktördür. Glutatın aşırı uyarılması sonucu,  $Ca^{+2}$  metabolizmasının bozulması ve mitokondriyal disfonksiyonun gerçekleşmesi ile glutamata bağlı eksitotoksisite gerçekleşmekte ve nöronal hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Yaşa bağlı olarak beyinde SN olmak üzere birçok bölgesinde demir birikimi görülmektedir. Artmış demir birikimi, ROT üretiminde artışına neden olmakta ve dopaminerjik nöronlarda hasarların oluşmasına katkı sağlamaktadır. Şekil 1'de Parkinson hastalığının patogenezi görülmektedir (Aarsland, & diğ., 2021; Simon, & diğ., 2020; Akbayır, & diğ., 2017).

Şekil 1.

*Parkinson hastalığının patogenezi*



### Parkinson Modeli Oluşturma Yöntemleri

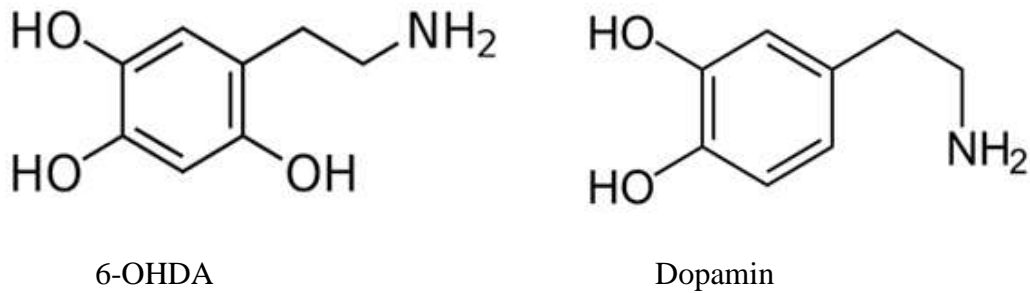
6-OHDA, rotenon, MPTP ve parakuat bileşikleri; yapısal olarak farklı olmalarına rağmen dopaminerjik hücrelerinin canlılığını değiştirerek, *in vivo* ve *in vitro* ortamda Parkinson modelinin elde edilmesinde kullanılan en yaygın toksin bileşikler olarak bilinmektedir (Carli, & diğ., 2021; Galindo, & diğ., 2014; Bové & Perier, 2012).

### **6-OHDA ve Özellikleri**

Oksidopamin veya 2,4,5-trihidroksifenetilamin ( $C_8H_{11}NO_3$ ) olarak bilinen 6-OHDA, dopaminin toksik bir oksidatif metaboliti olup Parkinson hastalığı hastalarının beyinlerinde ve idrarlarında saptanmaktadır (Galindo, & diğ., 2014). 6-OHDA'nın kimyasal yapısı dopamine ve nörepinefrin gibi çeşitli katekolaminlere benzemektedir. Bu özelliğinden dolayı, katekolaminerjik plazma membran taşıyıcılarına yüksek afinite göstermektedir. Yüksek afinitesi ile hem dopaminerjik hem de nöradrenerjik nöronlara girebilme özelliği bulunmaktadır (Galindo, & diğ., 2014; Bové & Perier, 2012). Şekil 2'de 6-OHDA ve dopaminin kimyasal yapıları görülmektedir (Bové & Perier, 2012).

Şekil 2.

#### **6-OHDA ve Dopaminin Kimyasal Yapıları**



6-OHDA ile oluşturulan Parkinson modelinin etiyojisi incelendiğinde, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen verilere göre hücre ölümlerinin olduğu görülmüştür. 6-OHDA, nöronal (serebellar granül hücreleri, birincil mezensefalik dopaminerjik hücreleri) ve nöronal olmayan (mezensefalik türevli dopaminerjik MN9D, NB41, SH-SY5Y hücreleri) hücre kültürlerinde apoptoz için karakteristik olan biyokimyasal, histokimyasal ve morfolojik değişiklikleri indüklemektedir (Galindo, & diğ., 2014).

### **6-OHDA ve Etki Mekanizması**

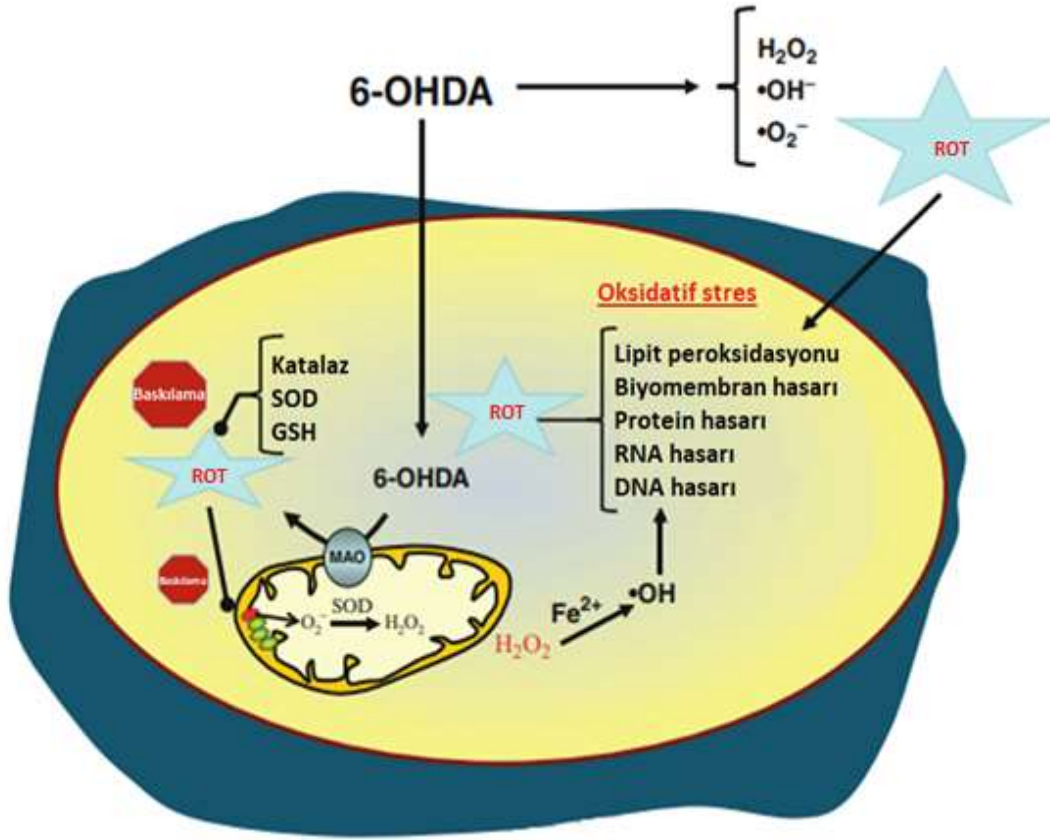
Fizyolojik fonksiyonların yürütülmesi için ROT'lar önemlidir. Bununla birlikte, aşırı ROT üretimi hücreye zarar vermektedir. ROT üretimindeki artış, hücrenin redoks dengesini değiştirerek farklı moleküllerin hem yapısını hem de işlevini etkilemekte ve oksidasyonunu artırmaktadır. Nöron hücrelerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), katalaz (CAD) gibi endojen

antioksidan enzimlerin düşük aktivitesi, hücrelerin oksidatif hasara duyarlılıklarını artırmaktadır (Galindo, & diğ., 2014). Ayrıca nöron hücreleri, hücre zarlarında yüksek seviyede çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) içermektedir. ÇDYA'lar, yapılarındaki karbon atomları arasında bulunan çoklu doymamış çift bağlardan dolayı yüksek oksidasyon riskine sahiptir (Bazinet, & diğ., 2014). Artan oksidatif stres ile endojen antioksidanlardaki azalma, Parkinson modelinin oluşumundaki önemli belirleyicilerdendir. 6-OHDA; monoamin oksidaz enzimini etkileyerek, •OH, •O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi serbest radikallerin üretimini artırarak, ROT seviyelerini artırmaktadır. Artan ROT seviyeleriyle oksidatif stres ile mitokondriyal disfonksiyon gelişmekte ve nörodejenerasyon başlamaktadır. Şekil 3'de 6-OHDA'nın nörodejenerasyonu başlatma mekanizması görülmektedir (Galindo, & diğ., 2014).

Mitokondri, hücresel canlılığın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondriyal Ca<sup>+2</sup> homeostazının bozulması nöronal hücre ölümünde rol oynamaktadır. Oksidatif strese maruz kalan mitokondride, Ca<sup>+2</sup> seviyesinde ve ROT üretiminde artış görülmektedir (Galindo, & diğ., 2014). Ca<sup>+2</sup> seviyesi ve ROT üretimindeki artış mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesine ve bozulmasına neden olmaktadır. Mitokondriyal membran geçirgenliği, apoptoz için önemli bir faktördür. Apoptozun intrinsik yollağında mitokondriyal disfonksiyon sonrası, mitokondriden sitozole anahtar apoptojenik faktör olan sitokrom C'nin salınması apoptozun geri dönüşümsüz olarak gerçekleşeceğini göstermektedir (Erekat, 2021; Hernandez-Baltazar, & diğ., 2017; Galluzzi, & diğ., 2009).

Mitokondriyal disfonksiyon, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen önemli bir faktördür (Jordan, & diğ., 2011). 6-OHDA, mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I ve IV ile doğrudan etkileşime girebilmek için antioksidan enzimlerin striatal seviyelerini kolayca azaltmaktadır. Bu durum, solunum inhibisyonuna ve oksidatif stresin daha çok artmasına neden olmaktadır. 6-OHDA ayrıca, mitokondriyal Ca<sup>+2</sup> seviyesini artırıp mitokondriyal dış zarının geçirgenliğini değiştirmekte ve sitokrom C'nin sitozole geçişini indüklemektedir. Bu durum apoptozun gerçekleşmesine ve nöron hücrelerinde kayıplarının meydana gelmesine neden olmaktadır (Galindo, & diğ., 2014; Guo, & diğ., 2005).

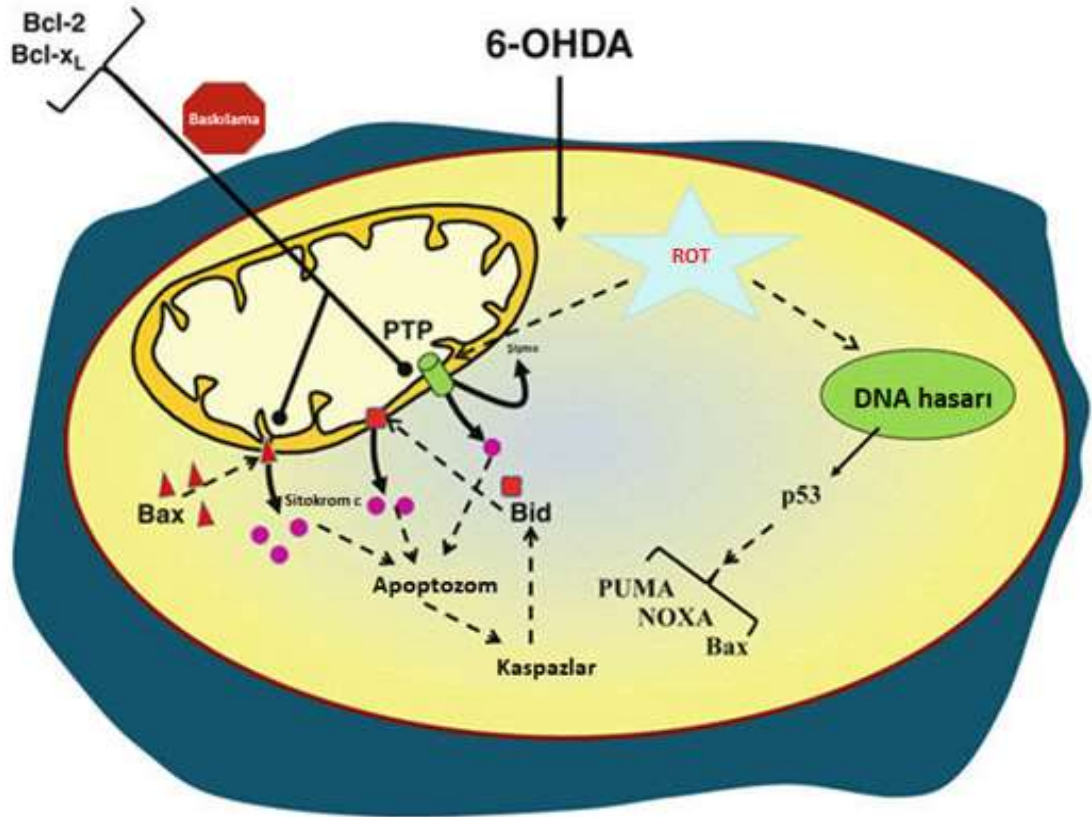
Şekil 3.

*6-OHDA'nın Nörodejenerasyonu Başlatma Mekanizması*

Mitokondriyal dış membran geçirgenliği, geçirgenlik geçiş gözenəğinin (PTP) oluşumu ya da Bcl-2 ailesi üyelerinin mitokondriyal dış membranına eklenmesiyle düzenlenmektedir. PTP, her iki mitokondriyal membranı kapsayan, spesifik olmayan büyük proteinli bir gözenektir. Mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına neden olma ihtimaline rağmen iyonların ve substratların geçişine izin vermektedir. PTP'ye bağlı mitokondriyal disfonksiyonun güçlü bir şekilde bozulması apoptozun gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. 6-OHDA, PTP ve mitokondriyal çoklu iletkenlik kanalını aktive ederek mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesine neden olmaktadır. Böylelikle, apoptotik süreçler aktifleşmekte ve hücre ölümünü meydana getirmektedir. Şekil 4'de 6-OHDA'nın nörodejenerasyonu başlatma mekanizması görülmektedir. Mitokondriyal çoklu iletkenlik kanalı, fizyolojik koşullar altında kapalı olup, Ca<sup>+2</sup> gibi farklı uyarılarla aktive edilebilen bir kanaldır (Galindo, & diğ., 2014).

Şekil 4.

## 6-OHDA ile İndüklenen Mitokondri Dış Membranın Mekanizması



Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptotik süreçlerde düzenleyici olarak görev alan ve mitokondriyal membranda lokalize halde bulunan fonksiyonel homologlardır. BH1-4 olmak üzere Bcl-2 yüksek homolojiye sahip dört bölgeye sahiptir. Yalnızca BH3 bölgesini içeren üyeler pro-apoptotik proteinlerdir. Bunların arasında Bax, Bak, BIM ve BID bulunmaktadır. Bax proteini inaktif halde sitozelde bulunmaktadır. Hücrede ölüm sinyali alındıktan sonra, Bax proteini homo-oligomerik bir şekil almakta ve dış mitokondriyal membrana yerleşmektedir. Böylelikle, mitokondri membran geçirgenliğini değiştirip apoptotik süreçlerin başlamasını tetiklemekte ve dopaminerjik nöronların ölümüne katkıda bulunmaktadır (Erekat, 2021; Galindo, & diğ., 2014).

BID proteini, hücre ölümü süreçleri sırasında mitokondriye göç eden başka bir Bcl-2 ailesi üyesidir. Bu protein, kaspaz-8 tarafından aktive edilmekte ve t-bid formuna dönüşmektedir. t-bid, mitokondri membran geçirgenliğini değiştirmekte ve bax proteini gibi apoptotik süreçlerin başlamasını tetiklemektedir. Bcl-2



mitokondriyal membranı stabilize eden,  $Ca^{+2}$ 'nin tamponlama kapasitesini arttıran ve mitokondriyal membran potansiyelini uyarılara karşı koruyan anti-apoptotik bir proteindir. Böylelikle Bcl-2, SN'da bulunan dopaminerjik nöronların sağkalımlarını artırmaktadır. Bcl-xL ise, Bcl-2 protein ailesine ait olup anti-apoptotik özellik göstermektedir. Bcl-xL'nin anti-apoptotik özelliği, ortak bir hücre ölüm yolunu bloke etmesiyle ilişkilendirilmektedir. Bcl-xL, 6-OHDA tarafından aktive edilen mitokondriyal çoklu iletkenlik kanalını inhibe etmekte ve apoptoza karşı nöron hücrelerini korumaktadır (Erekat, 2021; Galindo, & diğ., 2014).

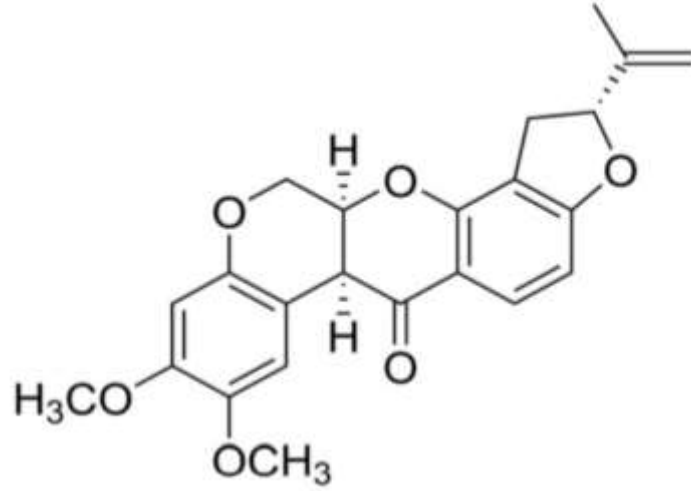
Sistein-aspartik proteazlardan olan kaspazlar, apoptotik sinyal yolağının temel bileşenidir. Apoptoz sırasında hücre ayrışmasına neden olan temel hücre içi substratları parçalayarak, belirli reaksiyonlarda peptit bağlarını hidrolize etmektedirler. Kaspazlar, inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz-1, -4, -5 ve -12) ve apoptotik kaspazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Apoptotik kaspazlarda çalışma mekanizmalarına ve apoptotik sinyal yolaklarındaki konumlarına göre başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve sonlandırıcı/efektör kaspazlar (Kaspaz-3, -6 ve -7) olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (Erekat, 2021). İntrensik yola kaspaz-9 aktivitesi aracılık ederken, ekstrinsik yola kaspaz-8 aktivitesi aracılık etmektedir. Nöron hücrelerinde ise, en çok kaspaz-3 aktivitesi görülmekle birlikte kaspaz-1, -8 ve -9 aktivite de bulunmaktadır (Erekat, 2021; Hernandez-Baltazar, & diğ., 2017; Galindo, & diğ., 2014). 6-OHDA ile muamele sonrası nöron hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu artmakta ve nörodejenerasyon gerçekleşmektedir. Parkinson hastalarında ve 6-OHDA ile muamele edilen *in vitro* çalışmalarda dopaminerjik nöron hücrelerinde aktif kaspaz-3 düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür (Chen, & diğ., 2015; Galindo, & diğ., 2014; Chao, & diğ., 2010).

### ***Rotenon ve Özellikleri***

Rotenon, hücre kültürü çalışmalarında prototipik bir mitokondriyal toksin olarak yaygın kullanılan, baklagillerden ekstrakte edilen bir insektisit ve piscisitir. Rotenon kan-beyin bariyerinden ve hücre zarından geçebilme özelliğine sahiptir (Carli, & diğ., 2021; Bové & Perier, 2012). Şekil 5'de rotenonun kimyasal yapısı görülmektedir (Bové & Perier, 2012).

Şekil 5.

*Rotenonun Kimyasal Yapısı*



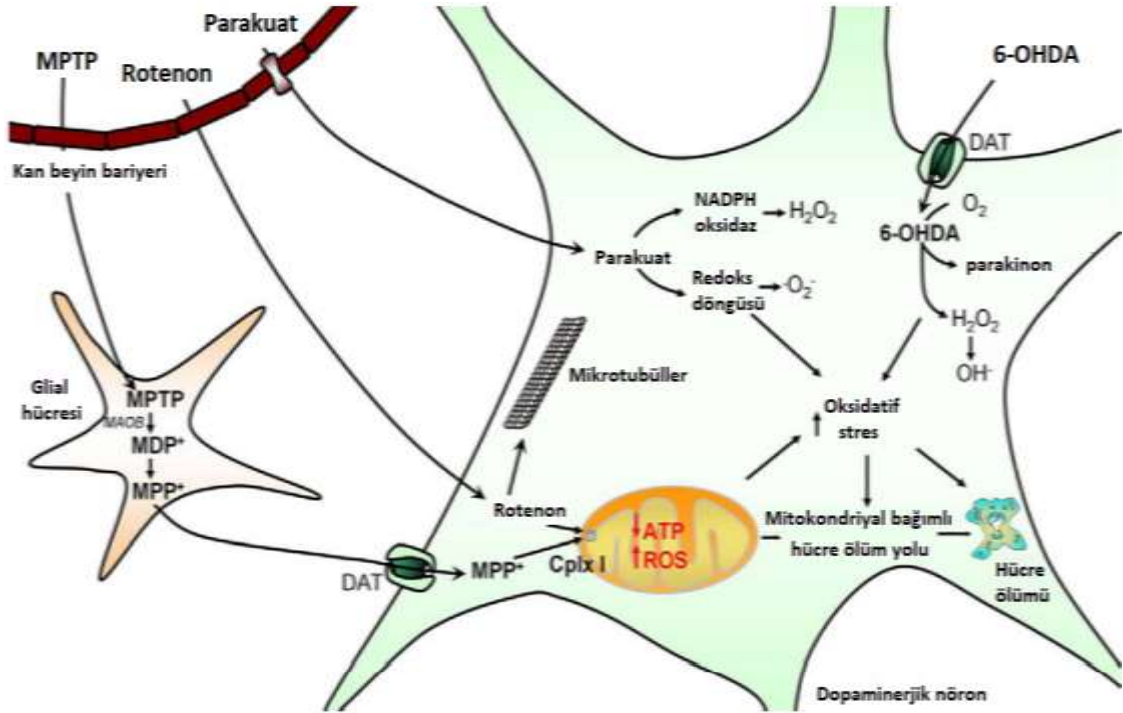
Rotenon

#### ***Rotenon ve Etki Mekanizması***

Rotenon, elektron taşıma zincirinin multipolipeptid enzim kompleksi I'in PSST alt birimine bağlanması yoluyla nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş formu (NADH)-ubikinon redüktaz aktivitesini inhibe ederek, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu bozmaktadır. Mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I'in inhibisyonunu tetikleyerek ROT üretimini artırmakta ve nöron hücrelerinin nörodejenerasyonunu sağlamaktadır. Rotenon, mitokondriyal solunum zinciri üzerindeki etkisinin yanı sıra tübülinden mikrotübül oluşumunu da engellemekte ve fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt)/Rapamisin protein kompleksinin memeli hedef (mTOR) yolağını etkilemektedir (Carli, & diğ., 2021; Bové & Perier, 2012). Şekil 6'da rotenonun dopaminerjik nöronlar üzerindeki etki mekanizmaları görülmektedir (Bové & Perier, 2012). Chou ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, rotenonun proteazom inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır. Proteazom aktivitesindeki rotenon kaynaklı inhibisyonun, oksidatif hasara ve mikrotübüler disfonksiyona bağlı olarak olduğu görülmüştür (Chou, & diğ., 2010).

Şekil 6.

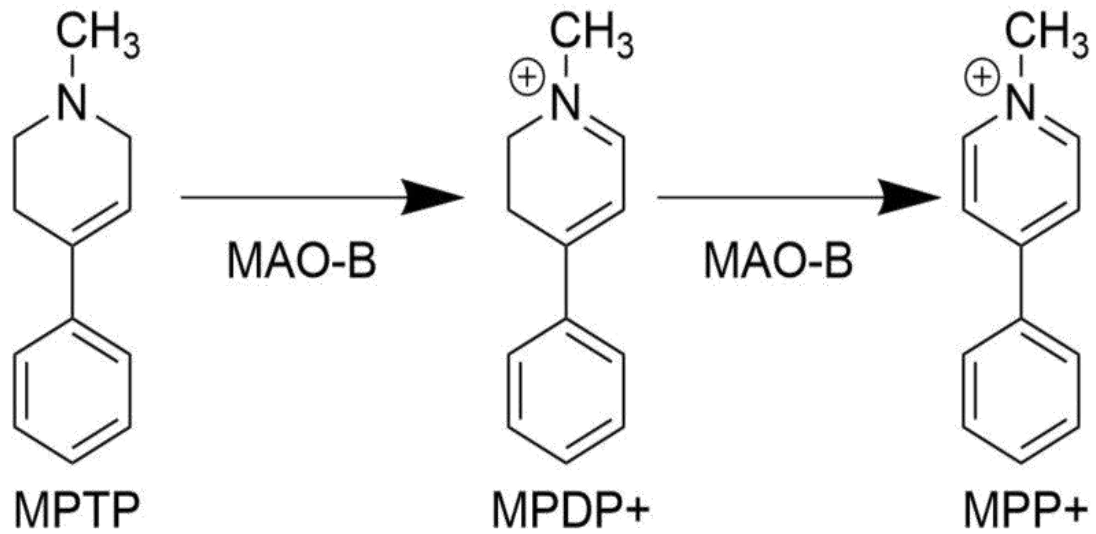
*Parkinson Modeli Oluşturmak için Kullanılan Nörotoksinlerin Etki Mekanizmaları*



### ***MPTP ve Özellikleri***

MPTP, Parkinson modeli oluşturmak için kullanılan, ventral orta beyindeki dopaminerjik nöronların nörodejenerasyonunu uyaran bir nörotoksindir. MPTP yüksek lipofilitesi nedeniyle kan-beyin bariyerinden hızlıca geçebilmektedir. MPTP, toksik metabolit 1-metil-4-fenilpiridinyuma ( $MPP^+$ ) yol açan karmaşık toksikokinetiği olan bir protoksindir (Carli, & diğ., 2021; Bové & Perier, 2012). Şekil 7'de MPTP ve  $MPP^+$ 'nin kimyasal yapıları görülmektedir (He & Nakayama, 2009; Bové & Perier, 2012).

Şekil 7.

*MPTP, MPDP<sup>+</sup> ve MPP<sup>+</sup>'nin Kimyasal Yapıları**MPTP ve Etki Mekanizması*

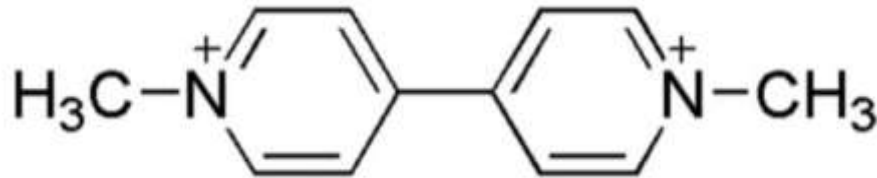
Kan-beyin bariyerinden hızlı bir şekilde geçen MPTP, iki aşamalı bir süreçle hızlıca MPP<sup>+</sup>'ya dönüştürülmektedir. MPTP ilk olarak, glial ve serotonerjik hücrelerde monoamin oksidaz B enzimi tarafından katalize edilerek 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinyum (MPDP<sup>+</sup>) ara maddesi üretilmektedir. MPDP<sup>+</sup>, MPP<sup>+</sup> ya da MPTP'ye kendiliğinden dönüşebilen kararsız bir moleküldür. Oluşan MPP<sup>+</sup> hücre dışı boşluğa salınmaktadır. Yüksek afinitesi sayesinde MPP<sup>+</sup>, plazma membranı dopamin taşıyıcısı aracılığıyla dopaminerjik nöronlara girmektedir. MPP<sup>+</sup> nöronlara girdikten sonra, sinaptik veziküllere ve pasif taşıma yoluyla mitokondri matrisine birikmektedir. MPP<sup>+</sup> mitokondriye girdikten sonra, adozin trifosfat seviyesinde geçici bir azalmaya ve ROT üretiminde artmaya neden olan mitokondriyal elektron zincirindeki kompleksi I'i inhibe ederek mitokondriyal solunum zincirinde disfonksiyona neden olmaktadır. ROT üretimi, kompleks I'in inhibisyonunun yanı sıra MPP<sup>+</sup> tarafından indüklenen veziküler dopaminin yoğun salınımından kaynaklanan dopamin oto-oksidasyonu da tetiklenmektedir. MPTP intoksikasyonundan sonra dopaminerjik nörodejenerasyon, mitokondriye bağımlı apoptotik moleküler yolların aktivasyonu ile meydana gelmektedir (Carli, & diğ., 2021; Bové & Perier, 2012). Şekil 6'da MPTP'nin dopaminerjik nöronlar üzerindeki etki mekanizması görülmektedir (Bové & Perier, 2012).

### ***Parakuat ve Özellikleri***

Parakuat (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinyum diklorür) zararlı etkilerini oksidatif stres yoluyla gösterdiği bilinen bir herbisittir. MPP<sup>+</sup> ile yapısal olarak benzerlikler göstermektedir. Her iki nörotoksik maddenin de bazı nörotoksisite mekanizmalarının ortak olduğu düşünülmektedir. Parakuat beyine nötr amino asit taşıyıcıları yoluyla ulaşmasına rağmen, rotenonun aksine hidrofilikliğı nedeniyle kan-beyin bariyerini serbestçe geçememektedir. Şekil 8'de parakuatın kimyasal yapısı görülmektedir (Bové & Perier, 2012).

Şekil 8.

*Parakuatın Kimyasal Yapısı*



Parakuat

### ***Parakuat ve Etki Mekanizması***

Parakuat, ROT üretimine yol açan nitrik oksit sentaz gibi bir hücresel diaforaz ile redoks döngüsünün indüklenmesini sağlamaktadır. Redoks döngüsünün indüklenmesi oksidatif stres düzeyinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, parakuat kaynaklı nörodejenerasyonda, mikroglial aktivasyonu önemli bir yere sahiptir. Parakuat, mikroglial aktivasyonu tetiklemekte ve dopaminerjik nöronların nörodejenerasyonunu sağlamaktadır. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidazın (NADPH-oksidad) farmakolojik veya genetik inhibisyonu, dopaminerjik nöronları parakuata karşı koruduğundan, mikroglial NADPH-oksidadın uyarılması ROT üretimi ve nörodejenerasyondan sorumlu olabilmektedir. Parakuat kaynaklı hücre ölümü, Bak'a bağımlı olup sitokrom C'nin neden olduğu hücre ölümünü tetiklemektedir. c-Jun-N terminal kinaz (JNK) yolu ve kaspaz-3'ün aktivasyonu da aracılık etmektedir. Şekil 6'da parakuatın dopaminerjik nöronlar üzerindeki etki mekanizması görülmektedir (Bové & Perier, 2012).

## **Parkinson Hastalığı ve Polifenoller**

Polifenolik bileşikler, besinlerde bulunan, bir (fenolik asit) veya daha fazla (polifenol) aromatik halka içeren ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlayan antioksidan özelliklere sahip doğal bileşiklerdir. Epidemiyolojik çalışmalar, polifenolik bileşiklerden biri olan flavonoidlerin güçlü antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik, oksidatif stresi azaltıcı, nöron hücre fonksiyonlarını düzenleyici, mitokondriyal disfonksiyonu ve nöronlardaki hasarı azaltıcı, lipid peroksidasyonunu inhibe edici, sinyal yollarını düzenleyici etkileri olduğunu bildirmiştir. Bu etkiler sayesinde, Parkinson hastalığının görülme sıklığının azaldığına dair güçlü kanıtlar sağlanmıştır (Airoldi, & diğ., 2018; Velmurugan, & diğ., 2018; Ascherio & Schwarzschild, 2016; Agim & Cannon, 2015; Gao, & diğ., 2012).

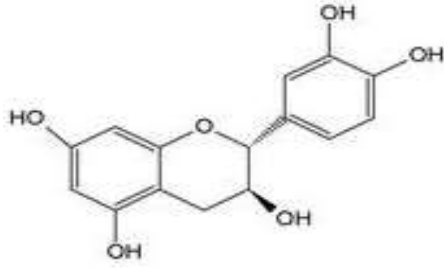
Flavonoidler, polifenol sınıflandırmasında bulunan ikincil bitki metabolitleridir. Çekirdek yapılarına göre; flavonoller (kersetin, kaempferol, mirisetin vb.), flavonlar (apigenin, luteolin vb.), flavanonlar (hesperidin, naringenin vb.), flavan-3-oller (kateşin, epikateşin, epigallokateşin vb.), izoflavonlar (genistein, daidzein, glisitein vb.) ve antosiyaninler (delfinidin, siyanidin, peonidin, malvidin, pelargonidin, petunidin) olmak üzere altı sınıfa ayrılmaktadır (Airoldi, & diğ., 2018; Bellik, & diğ., 2013). Çeşitli gözlem ve müdahale çalışmalarının sonuçlarına göre; flavan-3-oller alt sınıflamasındaki kateşinlerin, nörodejenerasyon üzerinde terapötik etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (Farkhondeh, & diğ., 2019; Airoldi, & diğ., 2018; Pervin, & diğ., 2018).

## **Kateşinlerin Özellikleri**

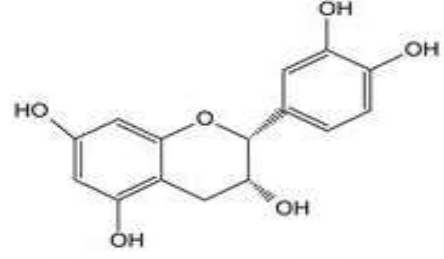
Kateşinler, flavonoid ailesindeki flavan-3-oller alt sınıflamasında bulunan polifenolik bileşiklerdir (Baldi, & diğ., 2019; Pervin, & diğ., 2018). Kateşinler; kateşin, gallokteşin, epikateşin ve epigallokteşin ile bu kateşinlere gallat gruplarının eklenmesiyle elde edilen kateşin gallat, gallokteşin gallat, epikateşin gallat ve epigallokteşin gallattan oluşmaktadır (Xu, & diğ., 2021; Baldi, & diğ., 2019). Şekil 9'da kateşinlerin kimyasal yapıları görülmektedir (Gadkari & Balaraman, 2015).

Şekil 9.

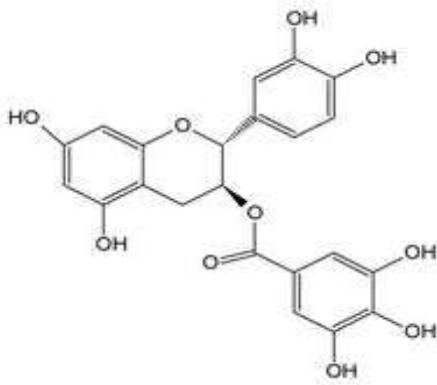
*Kateşinlerin Kimyasal Yapıları*



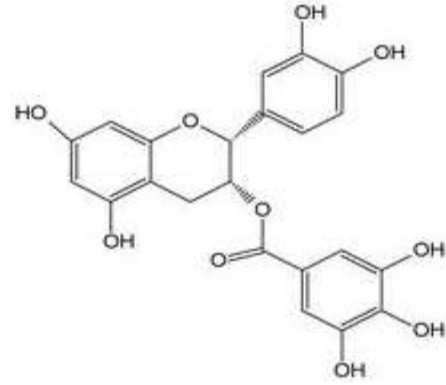
**Kateşin (C)**



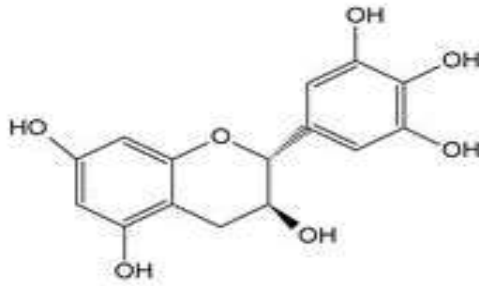
**Epikateşin (EC)**



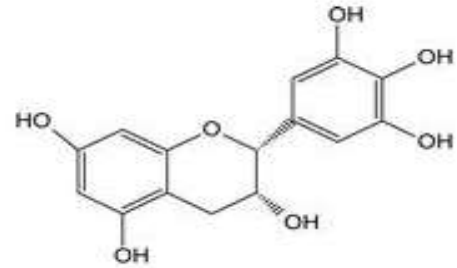
**Kateşin gallat (CG)**



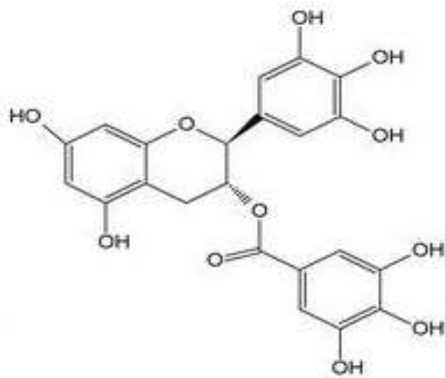
**Epikateşin gallat (ECG)**



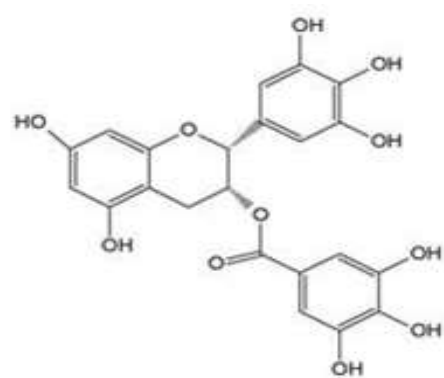
**Gallokateşin (GC)**



**Epigallokateşin (EGC)**



**Gallokateşin gallat (GCG)**



**Epigallokateşin gallat (EGCG)**

Kateşinler, hidroksile aromatik halkalar ile karakterize edilen üç halkalı fenolik bileşiklerdir. Hidroksillenmiş aromatik halkalardan oluşurlar. İki benzen halkası (A- ve B- halkaları) ile üçüncü karbon atomunda hidroksil grubu içeren dihidropiran heterosikl olan C- halkasını içermektedir. A-, B- ve C- halkalarında çoklu hidroksil grupları bulunmaktadır. A- halkası kaynaşmış aromatik halka, B- halkası fenil bileşeni ve C- halkası heterosiklik benzopiran halkası olarak da bilinmektedir. Kateşin ve epikateşin birbirlerinin epimerleridir. Epigallokateşinin B- halkasında 5' konumunda ek bir hidroksil grubu bulunduğundan epigallokateşin ve epikateşin arasında yapısal bir farklılık bulunmaktadır. Epigallokateşin gallat ise, epigallokateşinin ester türevi olup C- halkasında 3 hidroksil pozisyonunda bir gallatın esterifikasyonu ile oluşmaktadır (Khalatbary & Khademi, 2020; Baldi, & diğ., 2019; Airoidi, & diğ., 2018; Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018; Braicu, & diğ., 2011).

#### **Kateşinlerin Kaynakları**

Kateşinlerin temel kaynağı olan besin, yeşil çaydır. Yeşil çay dışında siyah çay, kakao, çilek, elma, üzüm, şarap gibi besinlerde de kateşinler doğal olarak bulunmaktadır. Tablo 1'de bazı besinlerin kateşin içerikleri ve miktarları verilmiştir (Xu, & diğ., 2021; Gadkari & Balaraman, 2015; Braicu, & diğ., 2011; Sutherland, & diğ., 2006). EGCG, toplam yeşil çay kateşinlerinin yaklaşık %65'ini oluşturmaktadır (Baldi, & diğ., 2019). Yeşil çay ekstraktının kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu ve demlenmiş bir fincan yeşil çayın ise %50-80'ini yani 200-300 mg'ını içermektedir (Singh, & diğ., 2015; Williamson, & diğ., 2011).



Tablo 1.

*Bazı Besinlerin Kateşin İçerikleri ve Miktarları*

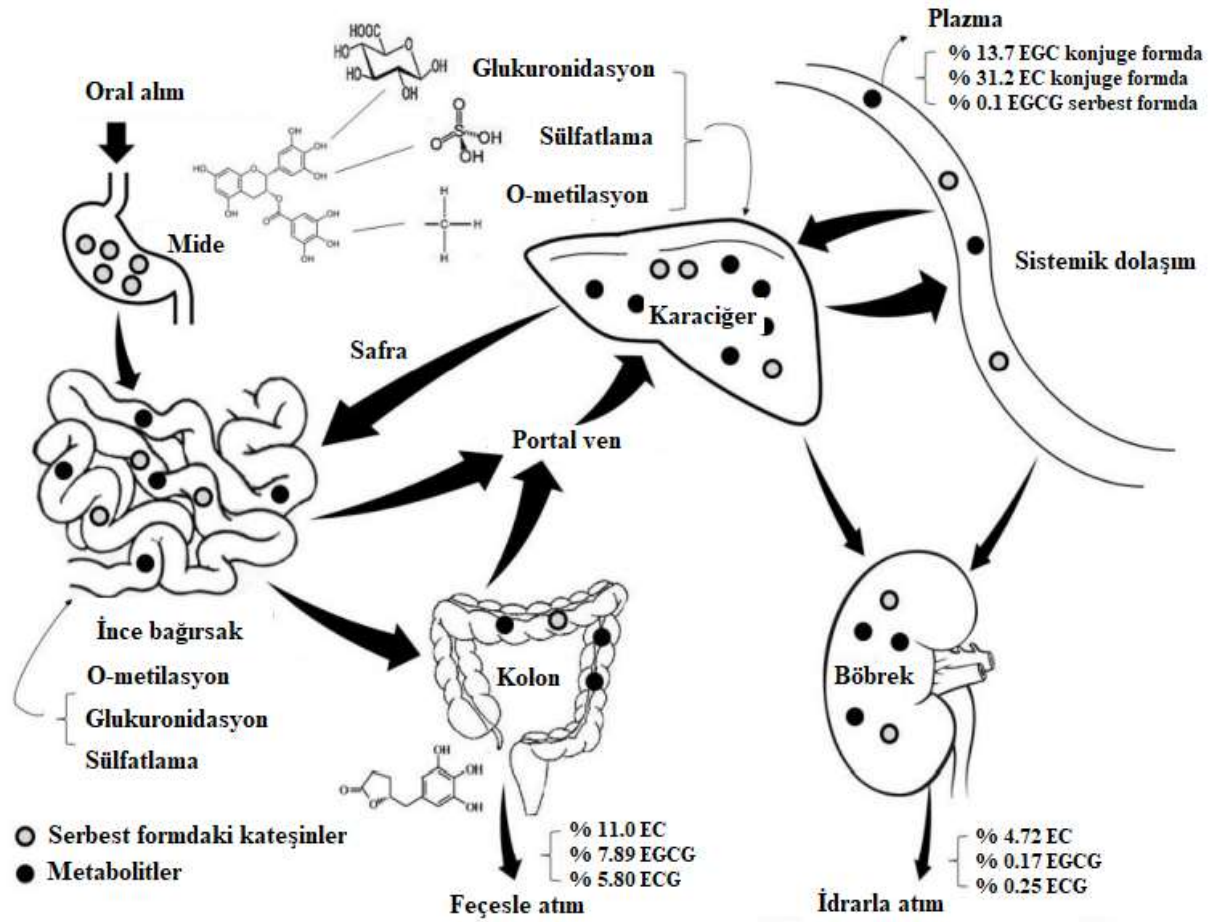
Besinler	Kateşin İçeriği ve Miktarı
Yeşil çay	21 mg/L C + 98 mg/L EC + 90 mg/L ECG + 411 mg/L EGC + 444 mg/L EGCG
Siyah çay	20 mg/L C + 37 mg/L EC + 73 mg/L ECG + 42 mg/L EGC + 128 mg/L EGCG
Kakao	78 mg/kg C + 132 mg/kg EC
Çikolata	610 mg/kg C + EC
Çikolata (bitter)	535 mg/kg
Çikolata (sütlü)	159 mg/kg C + EC
Elma	1000-7000 mg/kg EC
Kayısı	100-250 mg/kg
Şeftali	50-140 mg/kg
Yaban mersini	30 mg/kg'a kadar
Bektaşlı üzümü	30 mg/kg'a kadar
Siyah kuş üzümü	30 mg/kg'a kadar
Kırmızı kuş üzümü	30 mg/kg'a kadar
Beyaz kuş üzümü	30 mg/kg'a kadar
Çilek	10-70 mg/kg C + 1 mg/kg EC
Kiraz	50-220 mg/kg
Ahududu	20-480 mg/kg
Böğürtlen	90-100 mg/kg
Kivi	4.5 mg/kg C + EC
Üzüm çekirdeği	1892 mg/kg C + 988 mg/kg EC + 353 mg/kg ECG
Kırmızı üzüm	800-4000 mg/kg
Kırmızı şarap	80-300 mg/L

### **Kateşinlerin Metabolizması**

Diğer flavonoidlerin aksine, kateşinler aglikon formunda bulunmaktadır. Başta EGCG olmak üzere kateşinler, oral alım sonrası ince bağırsaktaki glikosidaz enziminden etkilenmeden ince bağırsakta bulunan villuslardan emilebilmektedir. İnce bağırsakta kateşinler çeşitli konjugasyonlara uğramaktadır. Kateşinlerin oral biyoyararlanımları düşüktür. Saflaştırılmış formda EGCG yarılanma ömrü ise yaklaşık 3 saattir. Emilemeyen kateşinler kolona geçmektedir. Kolona geçen kateşinler, kolondaki mikroorganizmalar tarafından farklı flavonoid halkalarına parçalanmaktadır. Katabolize edilmiş fenolik asitler, ya dolaşım ile geri emilmekte ya da idrarla atılmaktadır. Kateşinler esas olarak, oral alımdan sonra ince bağırsakta ve karaciğerde O-metilasyon, sülfatlama ve glukuronidasyon yoluyla faz 2 konjugasyon süreçleri ile metabolize edilmektedir. Glukuronidasyon ve sülfatlama, çözünürlüğü artırmak ve idrar yoluyla eliminasyonlarını kolaylaştırmak için kateşinlerin polaritesini artırmaktadır. EGCG, EGC ve EC glukuronid ile sülfat, plazmada yaygın olarak bulunmaktadır (Cai, & diğ., 2018; Chu & Pang, 2018; Hodgson, & diğ., 2013; Williamson, & diğ., 2011).

Kateşinler esas olarak idrar ve safra yolu olmak üzere iki şekilde atılmaktadır. Gallat grubu olmayan kateşinler, ana ve konjuge bileşikler şeklinde idrarla atılırken; gallat grubu içeren kateşinler safraya bağlanarak kolona geçer ve feçesle atılmaktadır (Chu & Pang, 2018). Şekil 10'da kateşinlerin metabolizması görülmektedir (Cai, & diğ., 2018). Kateşinler, kateşinlerin konjuge metabolitleri ve katabolize edilmiş küçük fenolik asitler; doku ve organlara (akciğer, göz, beyin, gastrointestinal sistem, böbrek, mesane ve hatta plasentadan fetal organlara kadar çeşitli doku ve organlar) taşınarak metabolize edilmekte ve biyolojik reaksiyonlarda kullanılmaktadır (Chu & Pang, 2018). Ayrıca EGCG, çok düşük konsantrasyonlarda kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Bir besin bileşeni olarak EGCG, sinir dokusunu etkileyebilmekte ve serebral kortekste nöroprotektif etkiler gösterebilmektedir (Lin, & diğ., 2007).

Şekil 10.

*Kateşinlerin Metabolizması***Kateşinlerin Hastalıklarla İlişkisi**

Kateşinlerin çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Bu aktiviteleriyle sağlığın geliştirilmesinde, hastalıkların önlenmesinde, oluşumunda ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır (Baldi, & diğ., 2019; Singh, & diğ., 2015).

Anti-diyabetik, anti-östrojenik, anti-obezite, anti-bakteriyel, anti-kardiyovasküler, anti-kanser, anti-mutajenik, antioksidan, antiviral, nöroprotektif, antifungal, anti-alerjenik, anti-inflamatuar, anti-osteoporoz, anti-proliferatif, anti-hipertansif, anti-platelet, hipokolesterolemik, hepatoprotektif ve diğerleri hastalıklar üzerindeki potansiyel etki mekanizmalarıdır. Bu potansiyel etkileri sayesinde kateşinler; obezite, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, inflamatuvar hastalıklar, metabolik hastalıklar, diyabet, inme, yaşlanma süreci, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel

etkiler göstermektedir (Baldi, & diğ., 2019; Farkhondeh, & diğ., 2019; Isemura, & diğ., 2019; Singh, & diğ., 2015; Braicu, & diğ., 2011; Sutherland, & diğ., 2006).

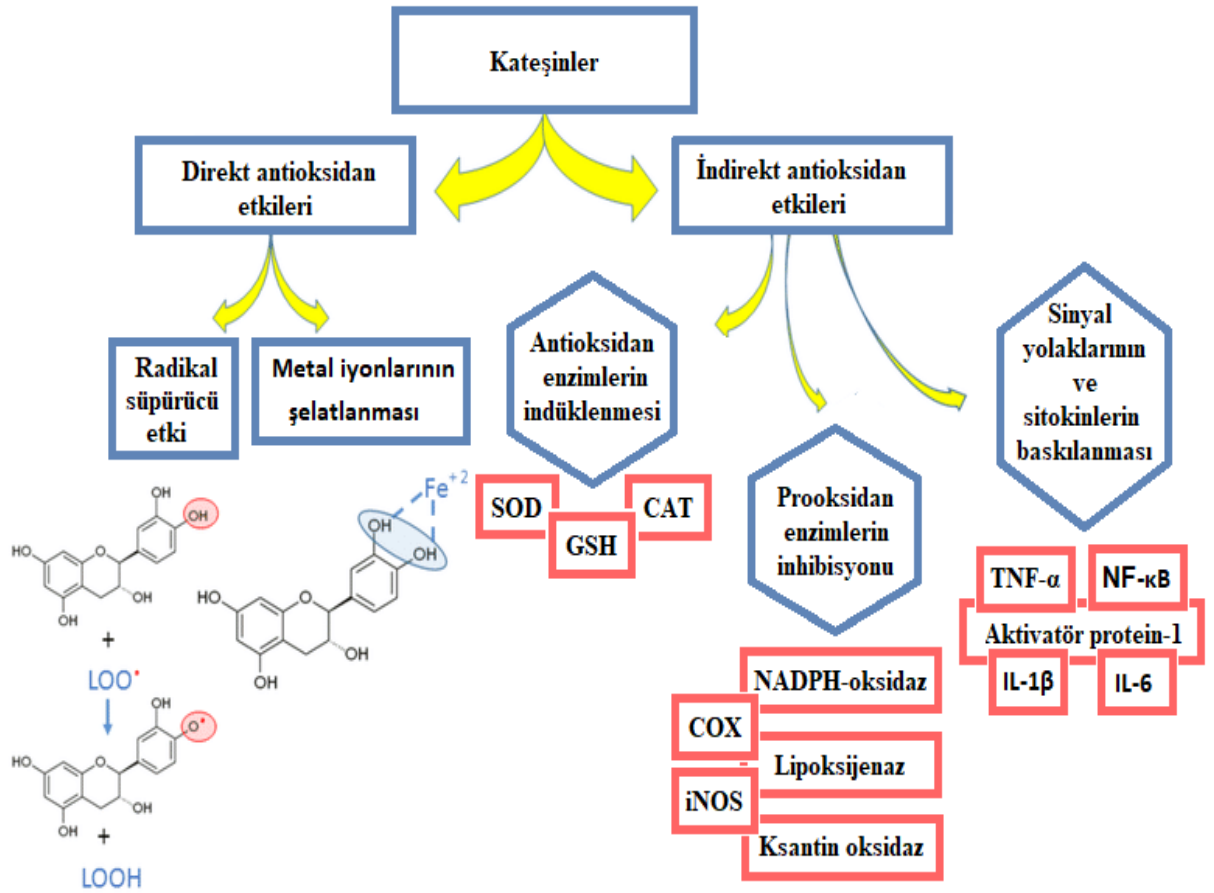
### **Kateşinlerin Parkinson Hastalığındaki Potansiyel Etkileri**

Kateşinler, antioksidan, anti-apoptotik, anti-inflamatuar, sinyal yollarının mitokondriyal fonksiyonlarının düzenlenmesi, lipid peroksidasyonunun önlenmesi gibi potansiyel etkiler göstererek nöron canlılığını ve nörorejenerasyonu indükleyip Parkinson hastalığına karşı nöroprotektif etkiler göstermektedir.

### ***Kateşinlerin Antioksidan Etkileri***

Antioksidanlar, nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Kateşinler yapılarında bulunan aromatik halkalar sayesinde, nöronları serbest radikallere karşı koruyan önemli antioksidanlardır (Farkhondeh, & diğ., 2019; Sutherland, & diğ., 2006). Kateşinler antioksidan etkilerini direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde göstermektedir. Serbest radikallerin süpürülmesi ve metal iyonlarının şelatlanması direkt etkileridir. Antioksidan enzimlerin indüklenmesi, prooksidan enzimlerin inhibisyonu, sinyal yollarının ve sitokinlerin baskılanması ise indirekt etkileridir. Kateşinler glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, CAD, SOD ve faz II detoksifikasyon enzimleri gibi antioksidan enzimlerin üretimini uyarırken; siklooksijenaz-2 (COX-2), iNOS, NADPH-oksidaz, lipoksijenaz ve ksantin oksidaz gibi prooksidan enzimlerin baskılanmasını sağlamaktadır. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , aktivatör protein-1 ve NF- $\kappa$ B gibi stresle ilişkili sinyal yollarının ve sitokinlerin inhibisyonuna neden olmaktadır. Şekil 11'de kateşinlerin antioksidan etki mekanizmaları görülmektedir (Khalatbary & Khademi, 2020; Farkhondeh, & diğ., 2019; Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018; Mandel, & diğ., 2008).

Şekil 11.

*Kateşinlerin Antioksidan Etki Mekanizmaları*

Kateşinlerin içerdikleri hidroksil grupları arttıkça, radikal süpürücü etkileri de artmaktadır. En yüksek hidroksil grubuna sahip kateşinler ise, EGCG ve ECG'dir (Sutherland, & diğ., 2006). Radikal süpürücü etkilerine göre kateşinlerin sıralaması; EGCG > ECG > EGC > EC > C şeklindedir (Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018; Braicu, & diğ., 2011). Özellikle EGCG, güçlü radikal süpürücü özelliği olan biyolojik bir antioksidandır. EGCG, B- ve D-halkalarında bulunan hidroksil gruplarıyla serbest radikalleri bağlayıp nötralize edebilmektedir (Zhu, & diğ., 2000). EGCG, üç olası moleküler mekanizmayla nitrik oksit, peroksil radikalleri, hidroksil serbest radikalleri, lipid içermeyen radikaller, süperoksit anyon radikalleri, singlet oksijen ve peroksinitriti temizleyebilmektedir. Birincisi, metal iyonlarının şelatlanarak inaktif hale getirilmesidir. İkincisi, EGCG'nin DNA zincirinin kırılmasını önlemek için hızlı bir elektron transferi mekanizması ile doğrudan peroksil radikaliyle etkileşime girmesidir. Üçüncüsü ise, EGCG'nin serbest

radikallerin deaminasyon yeteneklerini önlemek için kararlı yarı kinon serbest radikalleri oluşturmasıdır (Singh, & diğ., 2020; Young, & diğ., 2013; Sutherland, & diğ., 2006). EGCG ve EC, nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2)-antioksidan yanıt elemanı (ARE) yolağını aktive ederek, glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan savunma sisteminde yer alan antioksidan enzimlerin aktivasyonunu indüklemektedir. Böylelikle de, serbest radikallerin süpürülmesini sağlamaktadır (Farkhondeh, & diğ., 2019; Velmurugan, & diğ., 2018).

EGCG'nin oral alımı, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan seviyelerini artırıp lipid peroksidasyonunun azaltılmasını sağlamaktadır (Devika & Prince, 2008). Hem genç hem de yaşlı ratlarda uzun süreli EGCG uygulamasının, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı, malondialdehit ve protein karbonil seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Srividhya, & diğ., 2008). PC12 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, EGCG'nin Mangan-SOD aktivitesini arttırdığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azalttığı, MKK3-p38 $\alpha$  aktivitesini baskılayarak da mitokondriyal disfonksiyonu önlediği tespit edilmiştir (Chen, & diğ., 2016). Braicu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 10  $\mu$ M EGC ve EGCG ile müdahale sonrası reaktif oksijen türlerinde azalmanın olduğu bulunmuştur (Braicu, & diğ., 2011). EGCG ayrıca; iNOS aktivitesini, önemli ölçüde amiloid-beta üretimini ve oksidatif stresi azaltarak hipoksik iskemik kaynaklı beyin hasarını azaltabilmektedir (Zhang, & diğ., 2017).

### ***Kateşinlerin Lipid Peroksidasyonundaki Etkileri***

Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Aşırı ROT üretimi veya antioksidan eksikliği, DNA, proteinler ve lipidler gibi biyomoleküllere zarar veren oksidatif strese neden olmaktadır. Parkinson hastalığında oksidatif stresin varlığı, nöron hücrelerinde fonksiyon bozukluklarının olmasına neden olmaktadır (Singh, & diğ., 2020; Sutherland, & diğ., 2006).

ROT seviyelerdeki artış, hücre zarı fosfolipid çift katmanlarındaki ÇDYA'ları etkileyerek oksidasyona uğramalarına neden olmaktadır. Hücre zarlarında, ÇDYA'lardan gelen elektronlar hidroksil radikalleri, alkoksil radikalleri ve peroksil radikalleri tarafından kolayca alınarak, lipid radikalleri üretilmektedir. Lipid radikalleri, oksijen ile etkileşime giren ve kararsız lipid peroksil radikali (LOO) üreten radikallerdir. Sonuç olarak, LOO radikali diğer ÇDYA'lar ile etkileşime girmekte ve malondialdehit gibi lipid hidroperoksiti üretmektedir (Yin, & diğ.,

2011). Nörodejeneratif hastalıklarda, beyindeki ÇDYA seviyelerinde azalma ve malondialdehit seviyelerinde yükselme görülmektedir. Ayrıca, yanlış katlanmış alfa-sinüklein proteini tarafından uyarılan lipid peroksidasyonun da nöronal hücre kaybında çok önemli bir rol oynadığı gösterilmektedir (Angelova, & diğ., 2015).

EGCG'nin doğrudan veya dolaylı olarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını bloke ettiği, metal iyonlarını şelatladığı, hücre içi antioksidan enzim aktivitelerini uyardığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmektedir (He, & diğ., 2009). Ayrıca EGCG, nöronları oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne karşı da korumaktadır (Weinreb, & diğ., 2009). *In vivo* bir çalışma, EGCG'nin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve tiyobarbitürik reaktif madde düzeylerini de azalttığını bildirmektedir (Dobrzynska, & diğ., 2004). Ostrowska ve arkadaşları, EGCG'nin malondialdehit, lipid hidroperoksit ve 4-hidroksinoneal dahil lipid peroksidasyon belirteçlerini önemli ölçüde azalttığını ve glutatyon peroksidaz aktivitesini yükselttiğini göstermektedir (Ostrowska, & diğ., 2004). Elde edilen deneysel kanıtlarla, EGCG'nin nöronal hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı koruyabildiği gösterilmektedir.

### ***Kateşinlerin Metal İyonlarının Şelatlanmasındaki Etkileri***

Nörodejeneratif hastalıkların ana ve önemli patolojik özelliklerinden biri, nöron hücrelerinde metal (demir, bakır ve çinko) iyonlarının birikiminin olmasıdır (Barnham & Bush, 2014). Metal iyonları Alzheimer hastalığının gelişiminde, tau hiperfosforilasyonu ve amiloid-beta birikimi yoluyla amiloid plaklarına ve nörofibriler yumak oluşumuna neden olmaktadır (Wang & Wang, 2017). Parkinson hastalığında ise, dopaminerjik nöronlardan zengin olan SNpc'daki yüksek demir birikiminin bulunduğu görülmektedir (Jiang, & diğ., 2017). Parkinson hastalığı olan beyinde, demir birikiminden dolayı fenton reaksiyonları ve buna bağlı serbest radikal üretimi artmaktadır. Radikal üretiminin artması mikrogial aktivasyonuna ve inflamatuvar yolakların indüklenmesine neden olmaktadır. Bu durum, oksidatif stresin indüklenmesine, nöromelanin seviyelerinde azalmanın olmasına ve nöroinflamasyonun gerçekleşmesine neden olmaktadır (Nnah & Wessling-Resnick, 2018; Xu, & diğ., 2017; Berg, 2006).

EGCG, B- halkasındaki trihidroksil ve C- halkasındaki gallat gruplarına sahip olması nedeniyle metal şelatlama özelliği göstermektedir (Weinreb, & diğ., 2009; Avramovichtirosh, & diğ., 2007). Böylece, ferrik metalin nötralizasyonu

gerçekleşmekte ve nöron hücreleri oksidatif stres kaynaklı oluşabilecek hasarlara karşı korunabilmektedir. Rogers ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, EGCG'nin demir kaynaklı oluşan nörotoksikasyonu azalttığı gösterilmiştir (Rogers, & diğ., 2002). MPTP ile indüklenen Parkinson hastalığı olan farelerde EGCG'nin nöroprotektif etkilerini ve demirin rolünü inceleyen bir çalışmada, 25 mg/kg EGCG'nin demir homeostazında önemli rolü olan ferroportinin ekspresyonunu değiştirdiği ve oksidatif strese karşı koruyucu potansiyel etkilerinin görüldüğü bildirilmiştir (Xu, & diğ., 2017). Farklı bir çalışmada ise, EGCG'nin SN'da alfa-sinüklein seviyelerini ve metal şelatör olarak demir birikimini azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, MPTP ile oluşturulan nörotoksik hasardan da koruduğu görülmüştür (Mandel, & diğ., 2004). Chen ve arkadaşlarının Parkinson modeli üzerine yaptıkları bir çalışmada, EGCG'nin demir homeostazında yer alan genleri ve proteinleri düzenleyerek, 6-OHDA ile indüklenen hücre sitotoksitesine karşı koruyucu bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (Chen, & diğ., 2015).

### ***Kateşinlerin Anti-inflamatuar Etkileri***

Merkezi sinir sistemi, hasarlı dokuları ve ajanları ortadan kaldıran bir nöroinflamasyon mekanizması ile enfeksiyon, otoimmünite ve toksik metabolitlerden korunmaktadır. Mikroglia, nöroinflamasyon mekanizmasının temelinde yer alan, toksik metabolitlerin temizlenmesini sağlayan ve nöronların homeostazını modüle eden ana savunma hücreleridir (Farkhondeh, & diğ., 2019; Fischer, & diğ., 2015; Kim, & diğ., 2010). Normal koşullarda mikroglia hücreleri inaktif şekilde bulunmaktadır. Aktif mikroglia hücreleri; ROT'ları, reaktif nitrojen türleri ve sitokinleri serbest bırakarak nöroinflamatuvar kaskadları indüklemekte ve nörotoksik etki gösteren belirteçlerin salınmasına neden olmaktadır (Farkhondeh, & diğ., 2019; Kim, & diğ., 2010).

STAT3 sinyal yolu, inflamasyonun düzenlenmesinde ana rol oynamaktadır. STAT3 aktivasyonu özellikle Janus kinaz (JAK) ailesinden olan JAK1'in uyarılmasına, IL-6 gibi inflamatuvar mediatörler üreten NF- $\kappa$ B sinyal yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır. PI3K/Akt sinyal yolağı ise, inaktif halde bulunan mikrogliaları uyarak aktifleşmesine neden olmaktadır. EGCG, EGC, ECG ve EC gibi kateşinler, STAT3 sinyalini ve PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe etmektedir. Kateşinler ayrıca kan-beyin bariyerinden geçerek; iNOS, COX-2, IL-1, interlökin-2 (IL-2), IL-1 $\beta$ , interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), nitrik oksit (NO), TNF- $\alpha$ , ısı şoku proteini,

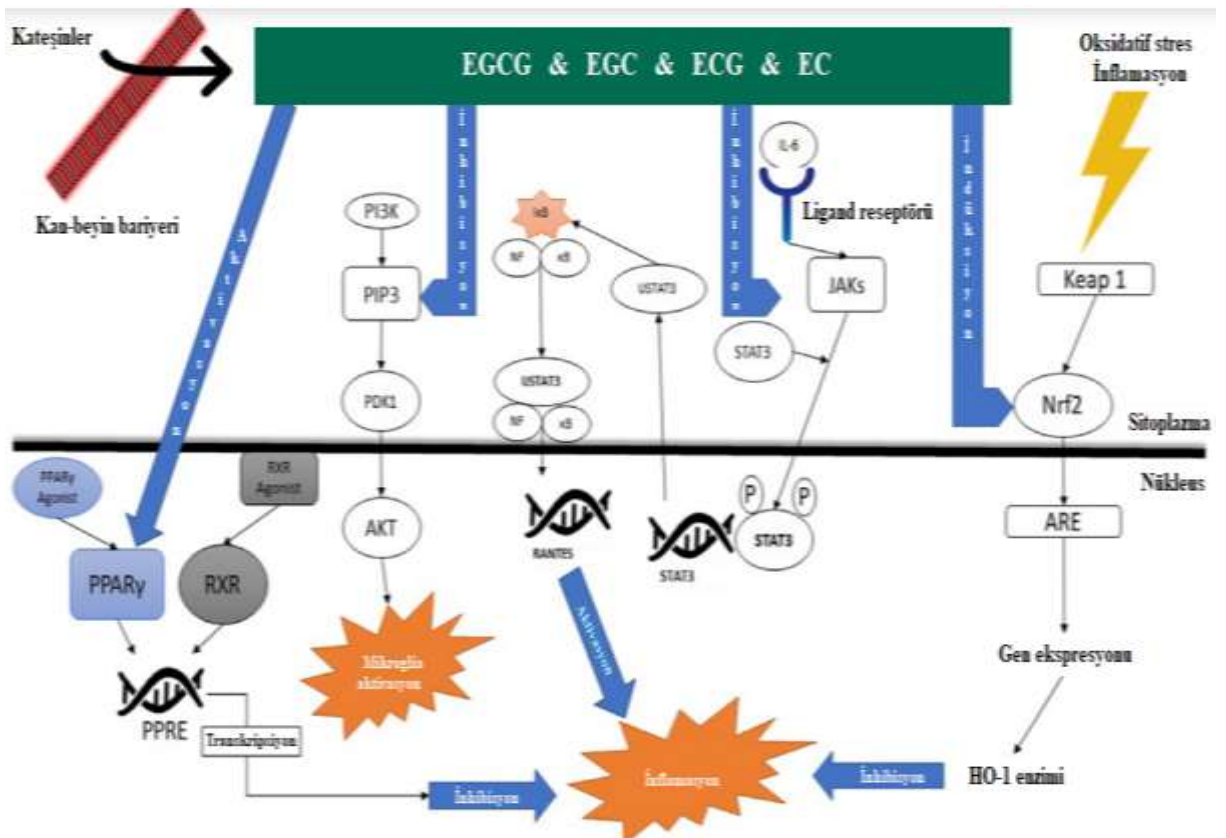


NF- $\kappa$ B, MAPK/JNK gibi inflamatuvar mediatörler ile yolakların ekspresyonunu ve aktivasyonu azaltarak mikroglia aktivasyonunu da baskılamaktadır (Khalatbary & Khademi, 2020; Farkhondeh, & diğ., 2019; Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018).

Kateşinler, peroksizom proliferasyonu ile aktive olan reseptör-gama yolu ve Nrf2-ARE yolagını uyararak hem oksijenaz-1 dahil olmak üzere birçok antioksidan molekülün aktivasyonunu sağlamakta, mikroglialdaki inflamatuvar sitokin üretimini modüle etmekte, oksidatif stresi ve nöroinflamasyonu azaltmaktadır. Şekil 12'de kateşinlerin anti-inflamatuvar etki mekanizmaları görülmektedir (Farkhondeh, & diğ., 2019). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, kateşinlerin inflamatuvar mediatörleri ve yollarını baskılayarak anti-inflamatuvar etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (Tseng, & diğ., 2020; Wei, & diğ., 2016; Bitu Pinto, & diğ., 2015).

Şekil 12.

*Kateşinlerin Anti-inflamatuvar Etki Mekanizmaları*



### *Kateşinlerin Anti-apoptotik ve Nöroprotektif Etkileri*

Lipopolisakkaritler (LPS) endotoksin olarak bilinmektedir. Mikroglia varlığında LPS'ler, nöroinflamasyona neden olarak dopaminerjik nöron kaybını

artırmaktadır (Farkhondeh, & diğ., 2019; Lama, & diğ., 2020; Al-Amri, & diğ., 2013). Kateşinler, LPS tarafından aktive edilen nöroinflamatuvar yolları baskılayarak potansiyel nöroprotektif etkiler göstermektedir. Al-Amri ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada; 10 mg EGCG verilen grupta TNF- $\alpha$  ve NO düzeylerinin düştüğü, LPS'nin neden olduğu nörotoksositeye karşı dopaminerjik nöronların korunduğu bulunmuştur (Al-Amri, & diğ., 2013).

Parkinson hastalığına dopamin üreten nöron hücrelerinin kaybı neden olmaktadır (Selvaraj & Piramanayagam, 2018). Parkinson hastalığında nöronal hücre ölümü ve serebral kortekste işlev bozukluğu ile ilgili olan alfa-sinüklein gibi anormal fibröz protein agregasyonu, artmış apoptotik protein ekspresyonu, inflamasyon ve oksidatif strese karşı kateşinlerin koruyucu potansiyel etkileri bulunmaktadır (Pervin, & diğ., 2018).

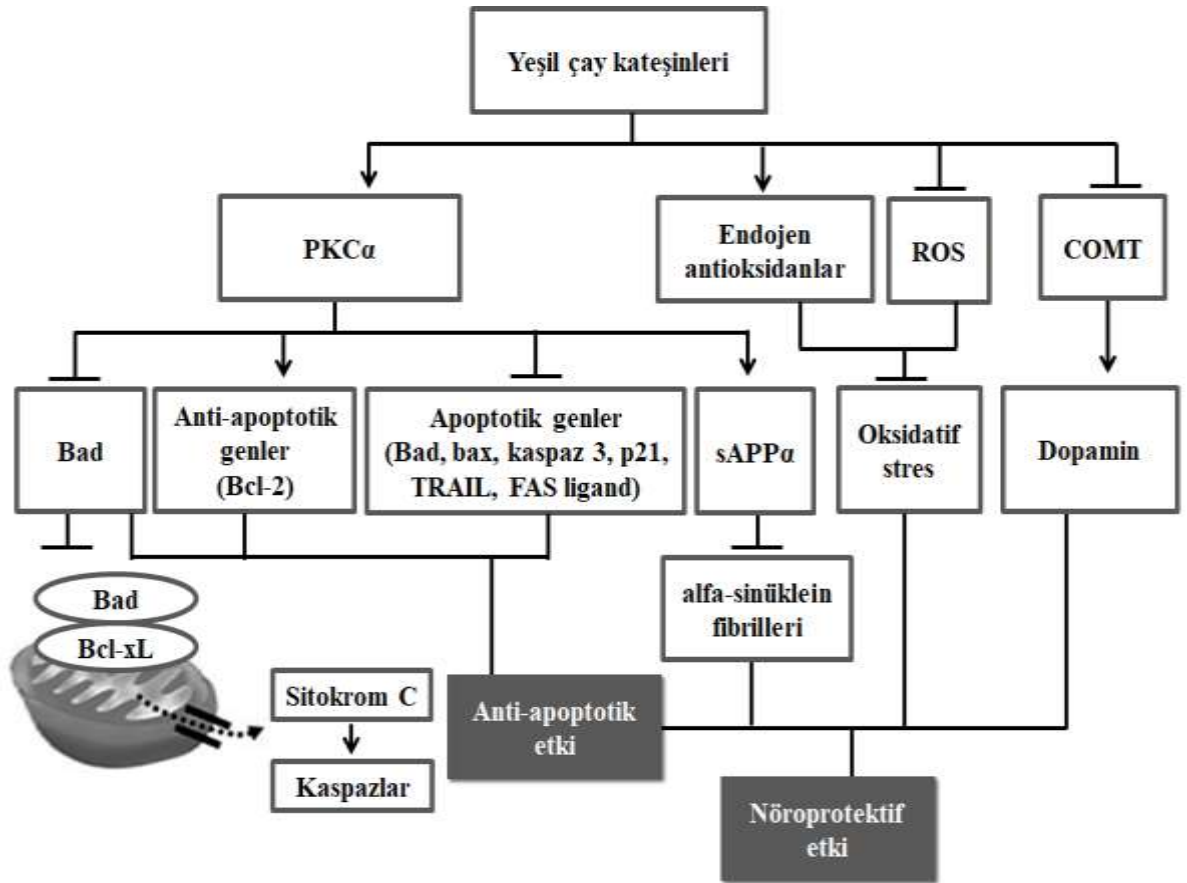
Yeşil çay kateşinleri protein kinaz C (PKC) yolunu aktive etmektedir. PKC aktivasyonu; mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenleyen bax, bad, kaspaz-3, p21, TRAIL ve FAS ligandı gibi apoptotik genlerin ekspresyonunu azaltırken, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Böylelikle, mitokondriden sitozole sitokrom C'nin salınımını ile JNK fosforilasyonu inhibe edilmekte ve kaspazların aktivasyonu baskılanmaktadır. Kateşinler bu etkileri ile nöronal hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelleri korumakta, apoptozu önlemekte ve hücrelerin sağkalımını arttırmaktadır (Khalatbary & Khademi, 2020; Farkhondeh, & diğ., 2019; Singh, & diğ., 2015; He, & diğ., 2015; Mandel, & diğ., 2008). Yapılan bir çalışmada, EGCG'nin oksidasyona bağlı oluşan nöronal nekrotik benzeri hücre ölümü ile apoptozu azalttığı ve böylece nörodejenerasyonu önlediği görülmüştür (Pogačnik, & diğ., 2016). Yapılan farklı çalışmalarda da benzer anti-apoptotik etkiler saptanmış ve nöron hücre sağkalımını arttırdığı bulunmuştur (Ortiz-López, & diğ., 2016; Chen, & diğ., 2015; He, & diğ., 2015; Siddique, & diğ., 2014).

Yeşil çay kateşinlerinden EGCG, dopamin metabolizmasını engelleyen ve katekolamin nörotransmitterlerinin inaktivasyonunda yer alan COMT enzimini inhibe etmektedir. COMT inhibisyonu, sinaptik dopamin seviyelerinde artışa neden olmaktadır (Velmurugan, & diğ., 2018; Mandel, & diğ., 2008). EGCG ayrıca, PKC yolunun aktivasyonunu sağlayarak çözünür amiloid öncü protein alfa seviyelerini artırıp alfa-sinüklein fibrillerinin oluşumunu, düzeylerinin ve agregasyonunu azaltmaktadır (Singh, & diğ., 2020; Singh, & diğ., 2015; Mandel, & diğ., 2008). Bu anti-fibriljenik etkisi ile EGCG, Parkinson hastalığına karşı nöroprotektif etki

göstermektedir (Lama, & diğ., 2020). Teng ve arkadaşlarının çalışmasında, EGCG'nin alfa-sinüklein ekspresyonunu ve fibrilasyonu baskıladığı, bakır iyonlarını şelatlayarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur (Teng, & diğ., 2019). Başka bir çalışmada da, EGCG'nin alfa-sinüklein fibrilasyonunu azalttığı saptanmıştır (Pogačnik, & diğ., 2016). Şekil 13'de kateşinlerin anti-apoptotik ve nöroprotektif etki mekanizmaları görülmektedir (Xu, & diğ., 2016; Singh, & diğ., 2015; Weinreb, & diğ., 2009; Mandel, & diğ., 2008).

Şekil 13.

*Kateşinlerin Anti-apoptotik ve Nöroprotektif Etki Mekanizmaları*



Gao ve arkadaşları tarafından yapılan 49.281 erkek ve 80.336 kadının katıldığı diyetle alınan flavonoidler ile Parkinson hastalığı riski arasındaki ilişkiyi inceleyen prospektif bir çalışmada; epikateşin dimerlerinin alınmasının Parkinson hastalığı riskini azalttığı sonucuna varılmıştır. Epikateşinin, sinaptik plastisite ve nöronal canlılığın düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü siklik adenosin monofosfat-yanıt element bağlayıcı protein fosforilasyonunu indüklediği ve

NADPH-oksidadın aktivitesini baskıladığı belirtilmiştir (Gao, & diğ., 2012). Parkinson hastası 278 kişi üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise, günde 3 fincandan fazla çay tüketiimi olduğunda Parkinson hastalığının başlangıcının yaklaşık 7.7 yıl geciktiği bildirilmiştir (Kandinov, & diğ., 2009). Barranco Quintana ve arkadaşları 12 çalışmanın analizi sonucunda, çay tüketiminin Parkinson hastalığının risklerini azaltıp koruyucu etkiler gösterdiğini bildirmiştir (Barranco Quintana, & diğ., 2009). Hosseini Tabatabaei ve arkadaşlarının yapmış oldukları vaka-kontrol çalışmasında ise, günde bir bardak çay ilavesinin Parkinson hastalığı riskini 0.8 kat azalttığı bulunmuştur (Hosseini Tabatabaei, & diğ., 2013).

## BÖLÜM III

### Gereç ve Yöntem

Bu bölümde araştırmanın modeline, araştırmanın çalışma grubuna, verilerin toplanması ve çözümlenmesine ve ortaya çıkan bulguların nasıl raporlaştırıldığına ilişkin bilgilere yer verilmiştir

#### Malzemeler ve Reaktifler

6-Hidroksidopamin hidroklorür (2,4,5-Trihidroksifenetilamin hidroklorür) (H4381;  $\geq$ %97 saflık), kateşin [(-)-trans-3,3',4',5,7-Pentahidroksiflavan) (C0567;  $\geq$ %97 saflık, yeşil çaydan)], epigallokateşin gallat [(-)-cis-2-(3,4,5-Trihidroksifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3,5,7-triol 3-gallat) (E4268;  $\geq$ %80 saflık, yeşil çaydan)], dimetil sülfoksit (DMSO) (D8418), tripan mavisi solüsyonu (T8154), tiazolil mavi tetrazolyum bromür (MTT) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) (M2128; %98 saflık), paraformaldehit (158127-25G; %95 saflık), metanol (34885,  $\geq$ %99.9 saflık) ve triton X-100 (T8532), Sigma-Aldrich'ten [St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)] satın alınmıştır. Kateşin ve epigallokateşin gallat, DMSO içerisinde çözdürülmüştür. DA (Dopamine) ELISA Kit (E-EL-0046) ve Human SNC $\alpha$  (Synuclein Alpha) ELISA Kiti (E-EL-H0983) Elabscience firmasından satın alınmıştır.

#### Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

Çalışmada, SK-N-AS insan nöroblastoma hücre hattı (ATCC: CRL-2137) kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri %10 ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI-11B), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B) ve %1 penisilin/streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-LPA) kültür vasatı içerisinde %5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) içeren nemli bir atmosferde 37°C'de kültüre edilmiştir. Kültürlenmiş hücreler ~%80 konfluent olduğunda, %0.25 tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Capricorn Scientific, TRY-1B) ile pasajlanarak sub-kültüre edilmiştir. Sub-kültüre edilen hücrelerin bir kısmı, %90 FBS ve %10 DMSO içeren hücre dondurma vasatı ile -80°C'de dondurularak saklanmıştır.

### ***In vitro* Parkinson Modelinin Oluşturulması ve Analizi**

Sub-kültüre edilen SK-N-AS hücreleri her bir kuyucukta yoğunluğu  $5 \times 10^3$  olacak şekilde 400  $\mu$ l kültür vasatı ile 24 kuyucuklu hücre kültür kabına ekilmiş ve 72 saat süresince %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. *In vitro* Parkinson modeli oluşumunda nörotoksik bir madde olan 6-OHDA kullanılmıştır. 6-OHDA'nın oto-oksidasyonunu engellemek için antioksidan özellik gösteren askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asidin fosfat tamponlu salin (Phosphate-buffered saline, PBS) içinde çözülmesiyle %0.1'lik askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır. 6-OHDA (2 mg/ml) hazırlanan askorbik asit çözeltisi içinde çözdürülmüştür. Stok çözelti taze hazırlanmış ve ışığa maruz kalmasını önlemek için alüminyum folyo ile sarılmıştır. 6-OHDA (10 mM) stok çözeltisi, kültür vasatı ile dilüe edilerek üç farklı konsantrasyonda (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M) hazırlanmıştır. Kontrol grubu 6-OHDA ile muamele edilmemiştir. 72 saat sonrasında 24 kuyucuklu hücre kültür kabındaki kültür ortamları toplanmış, kuyucuk başına toplam hacim 400  $\mu$ l olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki 6-OHDA solüsyonları eklenmiştir. SK-N-AS hücreleri, 24 saat ve 48 saat süresince %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde 37°C'de farklı konsantrasyonlardaki 6-OHDA ile muamele edilmiştir. *In vitro* Parkinson modeli oluşumunun kontrolü, 6-OHDA ile muamele edilen SK-N-AS hücrelerinin kültür vasatlarındaki dopamin ve alfa-sinüklein düzeylerinin enzim bağlı immünosorbent analiziyle (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) değerlendirilmesiyle belirlenmiştir. Dopamin ve alfa-sinüklein düzeylerini belirlemek için DA (Dopamine) ELISA kiti ve human SNC $\alpha$  (Synuclein Alpha) ELISA kiti kullanılmıştır. ELISA kitlerinde bulunan standart protokoller uygulanmıştır. Spektrofotometre kullanılarak 450 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Güvenilirliğini artırmak için tüm deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

### **ELISA Protokolleri**

6-OHDA ile muamele edilen SK-N-AS hücrelerinin kültür vasatlarındaki dopamin ve alfa-sinüklein düzeylerinin belirlenmesi amacıyla ELISA analizleri yapılmıştır. SK-N-AS hücreleri, farklı konsantrasyon ve sürelerde 6-OHDA ile muamele edildikten sonra kültür vasatları toplanarak ELISA analizlerinde değerlendirilmiştir. ELISA analizlerinde, DA (Dopamine) ELISA kiti (Elabscience, E-EL-0046) ve human SNC $\alpha$  (Synuclein Alpha) ELISA kiti (Elabscience, E-EL-H0983) kullanılmıştır.

***(DA) Dopamine ELISA Kiti***

Kit içerisinde bulunan tüm reaktifler kullanmadan önce oda sıcaklığına (18-25°C) getirilmiştir. Analiz öncesinde yıkama tamponu (wash buffer), standart çalışma solüsyonu (standard working solution), biyotinlenmiş deteksiyon antikor (Ab) çalışma solüsyonu [biotinylated detection antibody (Ab) working solution] ve konsantre horseradish peroksidaz (HRP) konjugat çalışma solüsyonu (concentrated HRP conjugate working solution) hazırlanmıştır.

Yıkama tamponu, 30 ml konsantre yıkama tamponu (concentrated wash buffer) 720 ml deiyonize ya da distile su ile dilüe edilerek 750 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Solüsyonda kristalizasyon gözlemlendiğinde 40°C'deki su banyosunda ısıtılıp kristaller çözülene kadar yavaşça karıştırılmıştır.

Standart çalışma solüsyonu hazırlanırken öncelikle standart 10.000xg'de 1 dakika süresince santrifüj edilmiştir. 1 ml referans standart & örnek sulandırıcısı (reference standard & sample diluent) eklenip 10 dakika bekletilmiş ve birkaç kere yavaşça ters çevrilmiştir. Tamamen eridikten sonra pipetle iyice karıştırılmış ve 2000 pg/ml'lik stok solüsyon elde edilmiştir. Önerilen dilüsyon konsantrasyonlarında (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml ve 0 pg/ml) seri sulandırmalar yapılmıştır.

Biyotinlenmiş deteksiyon Ab çalışma solüsyonu, 100x konsantre biyotinlenmiş deteksiyon Ab (concentrated biotinylated detection Ab) 1x biyotinlenmiş deteksiyon Ab sulandırıcılı çalışma solüsyonuna (working solution with biotinylated detection Ab diluent) dilüe edilmiştir. Her kuyucuğa 50 µl eklenmiştir.

Konsantre HRP konjugat çalışma solüsyonu, 100x konsantre HRP konjugatı (concentrated HRP conjugate) 1x konsantre HRP konjugat sulandırıcılı çalışma solüsyonuna (working solution with concentrated HRP conjugate diluent) dilüe edilmiştir. Her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.

ELISA kültür kabının ilk iki sütündeki kuyucuklara 50 µl standart çalışma solüsyonu, diğer kuyucuklara ise seri sulandırma sonucu elde edilen konsantrasyonlardaki solüsyonlar eklenmiştir. Üzerine 50 µl biyotinlenmiş deteksiyon Ab çalışma solüsyonu da eklenerek kültür kabının üzeri kapatılarak 45 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 3x2 dakika süresince yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında bir sonraki aşamaya geçmeden önce kurulanmıştır. 100 µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendikten

sonra kültür kabının üzeri kapatılarak 30 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 5x2 dakika süresince yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası, 90 µl substrat reaktifi (substrate reagent) eklenerek ışıktan korunması için üzeri kapatılarak 15 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. Her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu (stop solution) eklenmiştir. 450 nm'de mikro plate okuyucu ile her bir kuyunun optik yoğunluğu (Optical density, OD) ölçülmüştür. Elde edilen değerler ile dopamin için standart eğri grafiği ve denklemi oluşturulmuştur.

### ***Human SNCα (Synuclein Alpha) ELISA Kiti***

Kit içerisinde bulunan tüm reaktifler kullanmadan önce oda sıcaklığına (18-25°C) getirilmiştir. Analiz öncesinde yıkama tamponu (wash buffer), standart çalışma solüsyonu (standard working solution), biyotinlenmiş deteksiyon Ab çalışma solüsyonu (biotinylated detection Ab working solution) ve konsantre HRP konjugat çalışma solüsyonu (concentrated HRP conjugate working solution) hazırlanmıştır.

Yıkama tamponu, 30 ml konsantre yıkama tamponu (concentrated wash buffer) 720 ml deiyonize ya da distile su ile dilüe edilerek 750 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Solüsyonda kristalizasyon gözleendiğinde 40°C'deki su banyosunda ısıtılıp kristaller çözülene kadar yavaşça karıştırılmıştır.

Standart çalışma solüsyonu hazırlanırken öncelikle standart 10.000xg'de 1 dakika süresince santrifüj edilmiştir. 1 ml referans standart & örnek sulandırıcısı (reference standard & sample diluent) eklenip 10 dakika bekletilmiş ve birkaç kere yavaşça ters çevrilmiştir. Tamamen eridikten sonra pipetle iyice karıştırılmış ve 1000 pg/ml'lik stok solüsyon elde edilmiştir. Önerilen dilüsyon konsantrasyonlarında (1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml, 15.63 pg/ml ve 0 pg/ml) seri sulandırmalar yapılmıştır.

Biyotinlenmiş deteksiyon Ab çalışma solüsyonu, 100x konsantre biyotinlenmiş deteksiyon Ab (concentrated biotinylated detection Ab) 1x biyotinlenmiş deteksiyon Ab sulandırıcılı çalışma solüsyonuna (working solution with biotinylated detection Ab diluent) dilüe edilmiştir. Her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.

Konsantre HRP konjugat çalışma solüsyonu, 100x konsantre HRP konjugatı (concentrated HRP conjugate) 1x konsantre HRP konjugat sulandırıcılı çalışma



solüsyonuna (working solution with concentrated HRP conjugate diluent) dilüe edilmiştir. Her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.

ELISA kültür kabının ilk iki sütündeki kuyucuklara 100 µl standart çalışma solüsyonu, diğer kuyucuklara ise seri sulandırma sonucu elde edilen konsantrasyonlardaki solüsyonlar eklenmiştir. Kültür kabının üzeri kapatılarak 90 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklardaki sıvı toplanıp uzaklaştırılmıştır. 100 µl biyotinlenmiş deteksiyon Ab çalışma solüsyonu eklenerek üzeri tekrardan kapatılarak 60 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 3x2 dakika süresince yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında bir sonraki aşamaya geçmeden önce kurulanmıştır. 100 µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendikten sonra kültür kabının üzeri kapatılarak 30 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 5x2 dakika süresince yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası, 90 µl substrat reaktifi (substrate reagent) eklenerek ışıktan korunması için üzeri kapatılarak 15 dakika süresince 37°C inkübe edilmiştir. Her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu (stop solution) eklenmiştir. 450 nm'de mikro plate okuyucu ile her bir kuyunun OD'si ölçülmüştür. Elde edilen değerler ile alfa-sinüklein için standart eğri grafiği ve denklemi oluşturulmuştur.

### **Çalışma Grupları ve Kültürleri**

Toplamda altı adet çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma gruplarının oluşturulması için ilk olarak SK-N-AS hücreleri kültüre edilmiştir. Kültüre edilen SK-N-AS hücrelerinin yarısı, *in vitro* Parkinson modeli oluşturulması ve analizi aşamasında belirlenen konsantrasyon ve sürede 6-OHDA ile muamele edilmiştir. Elde edilen *in vitro* Parkinson modeli hücreleri ve SK-N-AS hücreleri kendi içerisinde kateşin uygulanan grup, epigallokateşin gallat uygulanan grup ve kontrol grubu (kateşin ya da epigallokateşin gallat uygulanmayan grup) olmak üzere üç farklı gruba bölünmüştür.

Çalışma grupları aşağıda belirtildiği gibidir:

1. Grup: *In vitro* Parkinson modeli hücreleri
2. Grup: *In vitro* Parkinson modeli hücreleri + Epigallokateşin gallat uygulaması
3. Grup: *In vitro* Parkinson modeli hücreleri + Kateşin uygulaması
4. Grup: SK-N-AS hücreleri
5. Grup: SK-N-AS hücreleri + Epigallokateşin gallat uygulaması

## 6. Grup: SK-N-AS HCN-2 hücreleri + Kateşin uygulaması

### Hücre Canlılığı ve Hücre Büyümesi Analizi

Hücre canlılığı, MTT analizi ve tripan mavisi boyaması ile belirlendi. Tiazolil mavi tetrazolyum bromür (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) (MTT) hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir analizdir. MTT analizi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesinin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik analiz, sarı tetrazolium tuzunun metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır.

SK-N-AS hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür kabına her kuyucukta  $5 \times 10^3$  yoğunluğunda hücre olacak şekilde 100  $\mu$ l kültür vasatıyla ekilmiş ve 24 saat süresince %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde 37°C'de kültüre edilmiştir. Uygulama sonrasında, SK-N-AS hücrelerinin yarısı *in vitro* Parkinson modeli oluşturulması ve analizi aşamasında belirlenen etkin konsantrasyon ve sürede 6-OHDA toksikasyonuna uğratılarak *in vitro* Parkinson model hücrelerine dönüştürülmüştür. Negatif kontrol grubu sadece kültür vasatı eklenirken, pozitif kontrol grubu çalışma gruplarına göre SK-N-AS hücrelerini ya da *in vitro* Parkinson model hücrelerini içermektedir. Kateşin ve epigallokateşin gallatın stok solüsyonları DMSO içerisinde hazırlanmış ve sonrasında kültür vasatıyla 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M olmak üzere beş farklı konsantrasyonda dilüe edilmiştir. Her iki çalışma grubundaki hücrelere (pozitif ve negatif gruplar hariç) farklı konsantrasyonlarda kateşin veya epigallokateşin gallat 100  $\mu$ l olacak şekilde eklenmiş, 24 saat ve 48 saat süresince %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, her kuyuya 10  $\mu$ l MTT solüsyonu eklenerek 4 saat süresince %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. 4 saat sonrasında, oluşan formazan tuzlarını çözmek için 50  $\mu$ l DMSO eklenmiştir. Absorbans ölçümü spektrofotometre kullanılarak dalga boyu 540-630 nm olacak şekilde ölçülmüştür. Güvenilirliğini artırmak için tüm deneyler dört kez tekrarlanmıştır.

Tripan mavisi boyaması, SK-N-AS hücrelerine 24 saat süresince 50  $\mu$ M 6-OHDA ile muamele edildikten sonra yapılmıştır. 1:1 oranında tripan mavisi boyaması eklenmiştir. Canlı (boyanmamış) hücrelerin membran bütünlüğü korunurken, membran bütünlüğü bozulan ölü (boyalı) hücrelerin sitoplazmaları tripan mavisi boyası ile mavi renge boyanmıştır. Thoma lamı ile inverted mikroya

canlı ve ölü hücrelerin sayımı yapılmıştır. Güvenilirliğini artırmak için tüm deneyler üç kez tekrarlanmıştır. Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Canlı Hücrelerin Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

(Canlı Hücre + Ölü Hücre)

### **İmmünohistokimya Protokolü**

Kültüre edilen *in vitro* Parkinson modeli hücreleri ve SK-N-AS hücrelerinde TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve kaspaz-3'ün dağılımları immünohistokimyasal analiz ile değerlendirilmiştir. Her iki gruptaki hücreler %4'lük paraformaldehit (Sigma-Aldrich, 158127-25G) içeren PBS ile 4°C'de 30 dakika süresince fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrasında 2x30 dakika süresince PBS ile yıkanmıştır. Membran ve antikor geçirgenliklerini artırmak için %0.1'lik Triton x100 (Sigma-Aldrich, T8532) ile 15 dk. buz üzerinde permeabilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Permeabilizasyon işlemi sonrasında hücreler 3x5 dakika süresince PBS ile yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 1:10 oranında metanolle ile dilüe edilmiş %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Riedel-de Haën, 70570) kuyucuk başına 10 damla eklenerek 10 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonrasında hücreler 3x5 dakika süresince PBS ile yıkanmıştır. Primer antikorun istenilen antijene bağlanması ve ortamda bulunan diğer proteinlerin bloke edilebilmesi için kuyucuk başına 10 damla bloklama tamponu (blocking buffer) (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) eklenerek 60 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bloklama tamponu uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-TNF- $\alpha$  (sc-52746, Santa Cruz Biotechnology), anti-IL-1 $\beta$  (sc-7884, Santa Cruz Biotechnology) ve anti-kaspaz-3 (sc-56053, Santa Cruz Biotechnology) PBS ile dilüe edilmiştir. Kontrol gruplarına 100  $\mu$ l PBS, diğer gruplara ise 100  $\mu$ l primer antikorlar eklenip üzerleri parafilmle kapatılarak 4°C'de nemli bir ortamda 24 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonrasında kuyucuklar 3x5 dakika süresince PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuk başına 5 damla biyotinlenmiş sekonder antikor (biotinylated secondary antibody) (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) eklenerek 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve sonrasında 3x3 dakika süresince PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuk başına 4 damla HRP-Streptavidin kompleksi (Protein Novex Life Technologies, 1666262A)

eklenerek 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Böylelikle, primer antikoron görünürlüğü artırılmıştır. 3x5 dakika süresince PBS ile yıkanmıştır. İmmünoetikleme ve görünürlüğün artması için sitoplazma boyaması yapılmıştır. 100 µl 3,3'diaminobenzidin (DAB) kromojen (ScyTek Laboratories, 38611) ilave edilerek 60 saniye inkübe edilmiştir. Kahverengi renk açılıp şeffaflaşana kadar PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında çekirdek boyaması için 100 µl Mayer's hematoksilin (Mayer's hematoxylin) (Merck Millipore, 109249) eklenerek 30 saniye inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası distile su (dH<sub>2</sub>O) ile yıkanmıştır. Lameller daha sonra çıkartılarak kapatma vasatı (mounting medium) (Merck Millipore, 1092490500, Almanya) ile lamaların üzerine ters çevrilerek kapatılmıştır. Işık mikroskopu (Olympus BX40, Tokyo, Japonya) kullanılarak örnekler değerlendirilmiştir.

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve kaspaz-3 boyanmaları Histolojik-skor (H-SKOR) yönetimi kullanılarak yarı kantitatif olarak derecelendirilmiştir. “H-SKOR=  $\sum \pi (i+1)$ ” denklemi kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Denklemdaki “i” boyama yoğunluğunu belirtmektedir. “i” 1, 2 ve 3 değerlerini alabilmekte, 1: zayıf (+), 2: orta (++) ve 3: güçlü (+++) boyama yoğunluğunu temsil etmektedir. “ $\pi$ ”, her yoğunlukta boyanan hücrelerin yüzdesini göstermektedir. %0 ile %100 arasında bir değer alabilmektedir. Güvenilirliğini artırmak için tüm deneyler dört kez tekrar edilmiştir.

### **Araştırma Türü ve Araştırma Yeri**

Çalışmada deneysel araştırma yöntemi kullanılmıştır. Deneylerin tamamı Yakın Doğu Üniversitesi Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi (DESAM) Hücre Kültürü Laboratuvarları'nda yürütülmüştür.

### **İstatistiksel Analiz**

Çalışma verileri, ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak sunulmuştur. Verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılmıştır. İmmünositokimya değerlendirme sonuçlarının istatistiksel analizlerinde, gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için İki Yönlü ANOVA analizi uygulanmıştır. Post-hoc analizlerde Tukey ve Sidak çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır.

Hücre canlılığı ve büyüme analizi ile *in vitro* Parkinson modeli değerlendirilmesi sonuçlarının istatistiksel analizlerinde, gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için ise Mann-Whitney U testi, Kruskal wallis testi ve Üç

Yönlü ANOVA analizi uygulanmıştır. Post-hoc analizlerde de Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi  $p<0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## BÖLÜM IV

### Bulgular

Bu bölümde çalışma sorularına yönelik toplanan veriler ışığında ulaşılan bulgulara değinilmektedir.

#### ***In vitro* Parkinson Modeli Değerlendirmesi**

SK-N-AS hücreleri, nörotoksitenin değerlendirilmesi ve *in vitro* Parkinson modelinin oluşturulması için 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde farklı konsantrasyonlarda (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M) 6-OHDA ile muamele edilmiştir. Alfa-sinüklein ve dopamin için elde edilen standart eğri grafikleri ve denklemleri Şekil 14A ve Şekil 15A'da gösterilmiştir. Protein konsantrasyonları alfa-sinüklein ve dopamin için oluşturulan standart eğri grafikleri ve denklemleri ile hesaplanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda 6-OHDA ile 24 saat inkübasyon süresinde muamele edilen gruplardaki alfa-sinüklein düzeyleri incelendiğinde, 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M konsantrasyonlarındaki alfa-sinüklein düzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca, 50  $\mu$ M konsantrasyondaki alfa-sinüklein düzeyinin 25  $\mu$ M konsantrasyondaki alfa-sinüklein düzeyinden daha da yüksek olduğu görülmüştür. Alfa-sinüklein düzeyinin 100  $\mu$ M konsantrasyonda 6-OHDA uygulaması sonrasında ise kontrol grubundan daha düşük olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte 48 saat inkübasyon süresinde ise tüm konsantrasyonlardaki alfa-sinüklein düzeylerinin kontrol grubundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14B).

Dopamin düzeyleri incelendiğinde, tüm inkübasyon sürelerinde ve konsantrasyonlarındaki dopamin düzeylerinin kontrol gruplarından daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 15B).

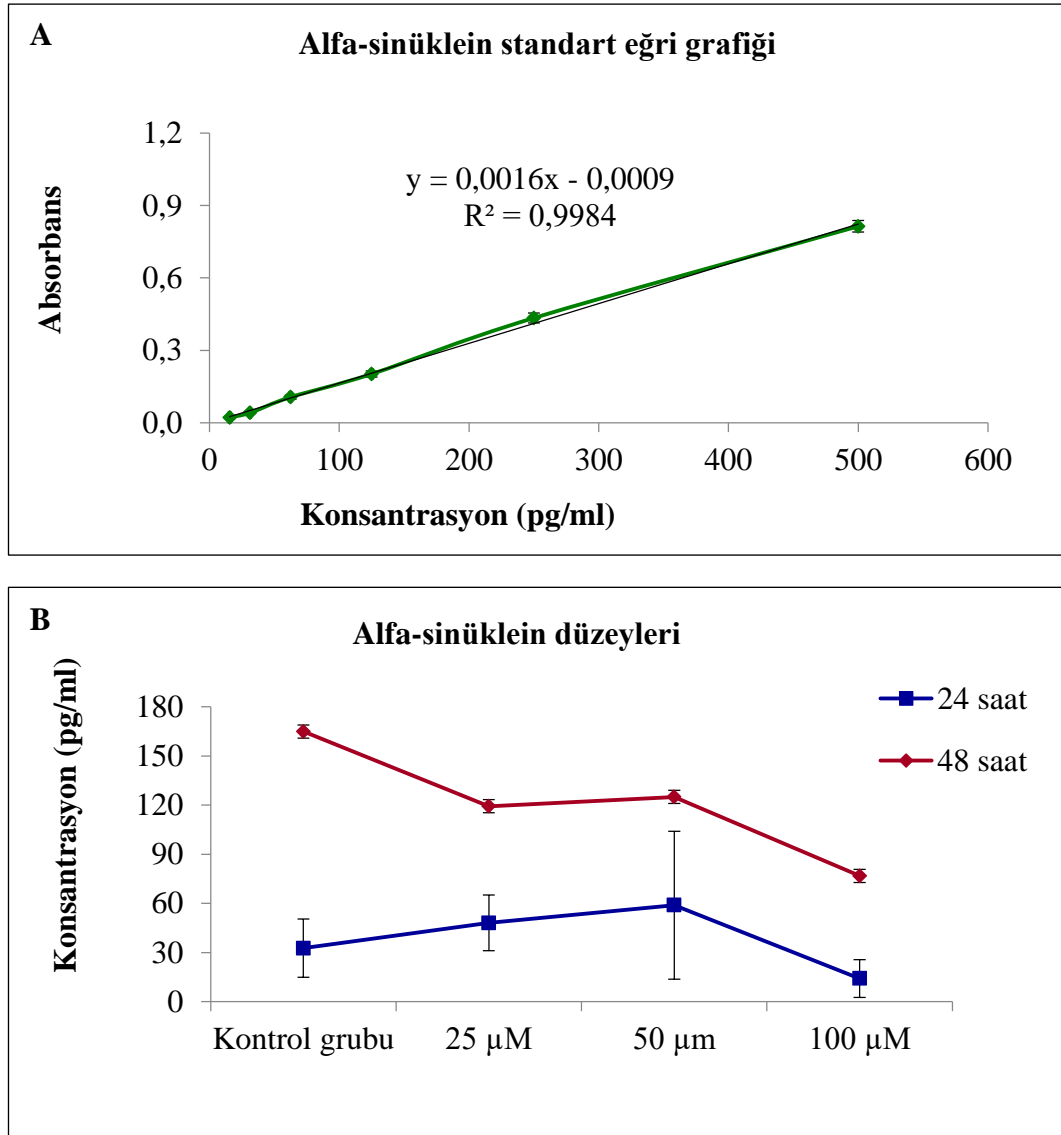
6-OHDA ile muamele edilen SK-N-AS hücrelerinde alfa-sinüklein düzeylerinin arttığı, dopamin düzeylerinin ise azaldığı görülmüştür. Böylelikle, dopaminerjik nöron kayıplarına bağlı olarak *in vitro* Parkinson modeli oluşmuştur. *In vitro* Parkinson modelinin oluşumu için etkin inkübasyon süresinin ve 6-OHDA'ya konsantrasyonunun, 24 saat inkübasyon süresinde 50  $\mu$ M 6-OHDA'ya olduğu belirlenmiştir.

24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde farklı konsantrasyonlardaki 6-OHDA ile muamele edilen SK-N-AS hücrelerinde, kontrol grubu ile alfa-sinüklein

düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Kontrol grubu ile dopamin düzeyleri arasında da önemli bir fark saptanamamıştır ( $p>0.05$ ).

Şekil 14.

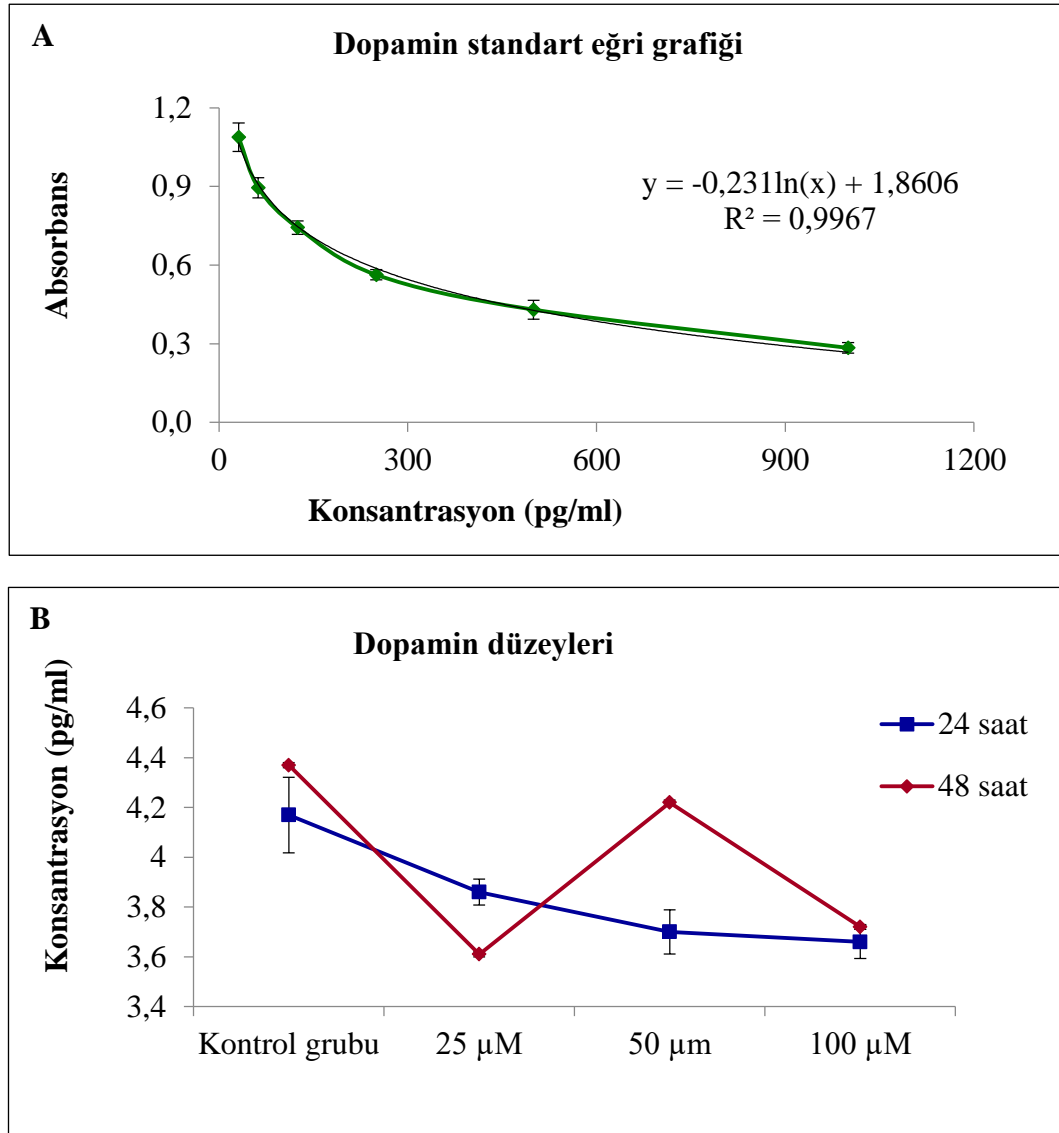
6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücrelerinde Alfa-sinüklein Düzeyleri



(A) Alfa-sinüklein için standart eğri grafiği ve denklemini. (B) Farklı inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlarda elde edilen alfa-sinüklein düzeyleri. SK-N-AS hücreleri, 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde farklı konsantrasyonlarda (25-100 µM) 6-OHDA ile muamele edildi. Alfa-sinüklein düzeyleri human SNC $\alpha$  (Synuclein Alpha) ELISA kiti kullanılarak değerlendirildi. Her değer ( $n=3$ ) ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur.

Şekil 15.

6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücrelerinde Dopamin Düzeyleri



(A) Dopamin için standart eğri grafiği ve denklemi. (B) Farklı inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlarda elde edilen dopamin düzeyleri. SK-N-AS hücreleri, 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde farklı konsantrasyonlarda (25-100 µM) 6-OHDA ile muamele edildi. Dopamin düzeyleri, DA (Dopamine) ELISA kiti kullanılarak değerlendirildi. Her değer (n=3) ortalama ± SS olarak sunulmuştur.

### Hücre Canlılığı ve Büyüme Analizi

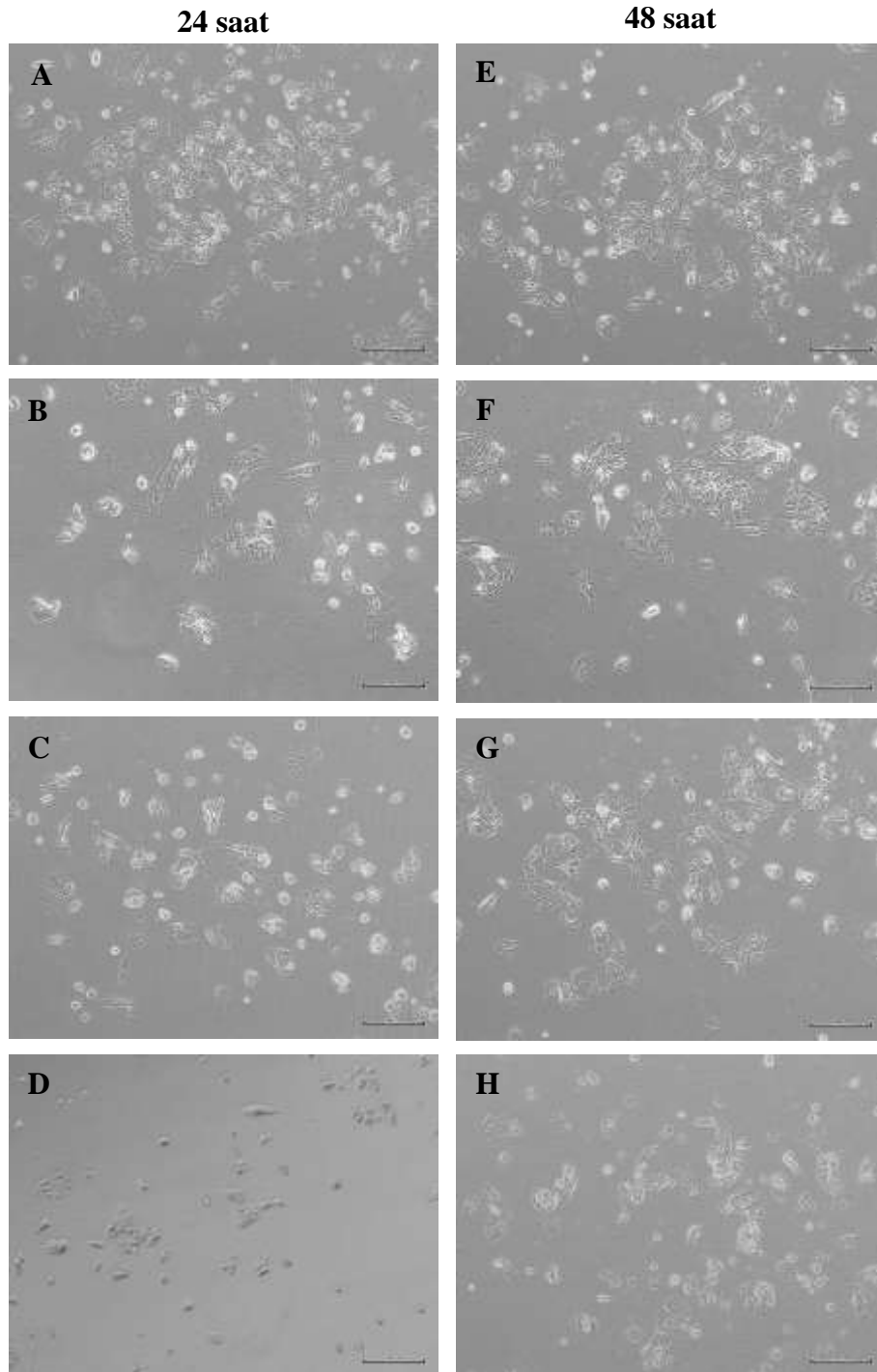
Hücre canlılığının, kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında 25 µM ve 50 µM 6-OHDA ile muamele edilen gruplarda benzer olduğu görülmüştür (Şekil 16).



100  $\mu$ M'da ise, diğer gruplara kıyasla daha az sayıda hücre gözlenmiştir (Şekil 16D ve Şekil 16H).

Şekil 16.

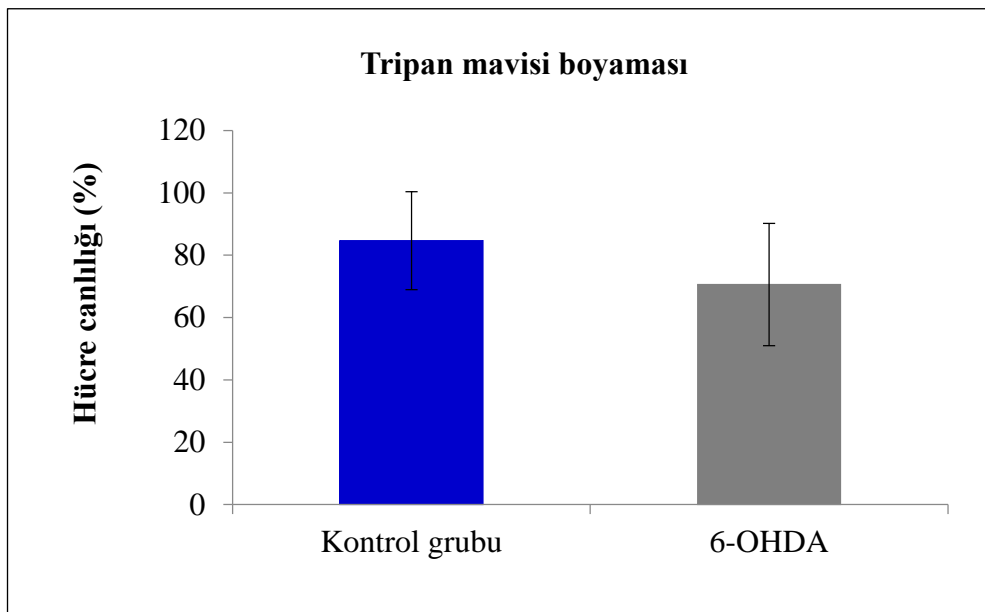
*Farklı Konsantrasyonlarda 24 Saat (A-D) ve 48 Saat (E-H) İnkübasyon Sürelerinde 6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücreleri; Kontrol Grubu (A, E), 25  $\mu$ M (B, F), 50  $\mu$ M (C, G) ve 100  $\mu$ M (D, H). Ölçek: 200  $\mu$ m*



Tripan mavisi boyamasından sonra, hücre canlılığı yüzdelерinin kontrol grubunda %84.7 ve 6-OHDA grubunda %70.6 olduğu saptanmıştır. İstatistiksel analizlerden sonra hücre canlılığının, kontrol grubu ve 6-OHDA grubu arasında benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olmadığı görölmüştür ( $p=0.374$ ) (şekil 17).

şekil 17.

24 Saat Süresince 50  $\mu\text{M}$  6-OHDA ile Muamele Edilen SK-N-AS Hücrelerinin Hücre Canlılığı



Hücre canlılığı, tripan mavisi boyama ile ölçölmüştür. Analizde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Her değer ( $n=3$ ) ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur.

Hücre canlılığının değerlendirilmesi için SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri farklı konsantrasyonlarda (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ ) kateşin ve epigallokateşin gallat ile 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı MTT analizi kullanılarak saptanmıştır.

*In vitro* Parkinson modeli hücreleri ile SK-N-AS hücreleri uygulanan kateşin ve epigallokateşin gallat konsantrasyonlarına ve inkübasyon sürelerine göre karşılaştırıldığında; kateşin ve epigallokateşin gallatın toksik olmayan, hücre canlılığını artırıcı ve koruyucu etkilerinin olduğu görölmüştür (şekil 18 ve şekil 19).

Kateşin (şekil 18) ve epigallokateşin gallat (şekil 19) uygulamalarının 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyondaki 24 saat uygulamaları sonrasında pozitif kontrolle

karşılaştırıldığında, hücre canlılıklarını diğer inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlara göre daha çok etkiledikleri ve artırdıkları tespit edilmiştir. Ayrıca, kateşin ve epigallokateşin gallat uygulanan grupların her ikisinde de hücre canlılıklarının *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde ve SK-N-AS hücrelerinde benzerlik gösterdiği görülmüştür. MTT analizi sonuçlarına göre, 100 µM konsantrasyonda 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan kateşin ve epigallokateşin gallatın her ikisi de nöroprotektif aktivite göstermiştir.

Kateşinin 50 µM ( $p=0.020$ ), 100 µM ( $p=0.013$ ), 150 µM ( $p<0.01$ ) ve 200 µM ( $p<0,001$ ) konsantrasyonları ile 48 saat inkübasyonu sonrasında SK-N-AS hücreleri ile pozitif kontrol arasında önemli bir fark tespit edilmiştir (Şekil 18A).

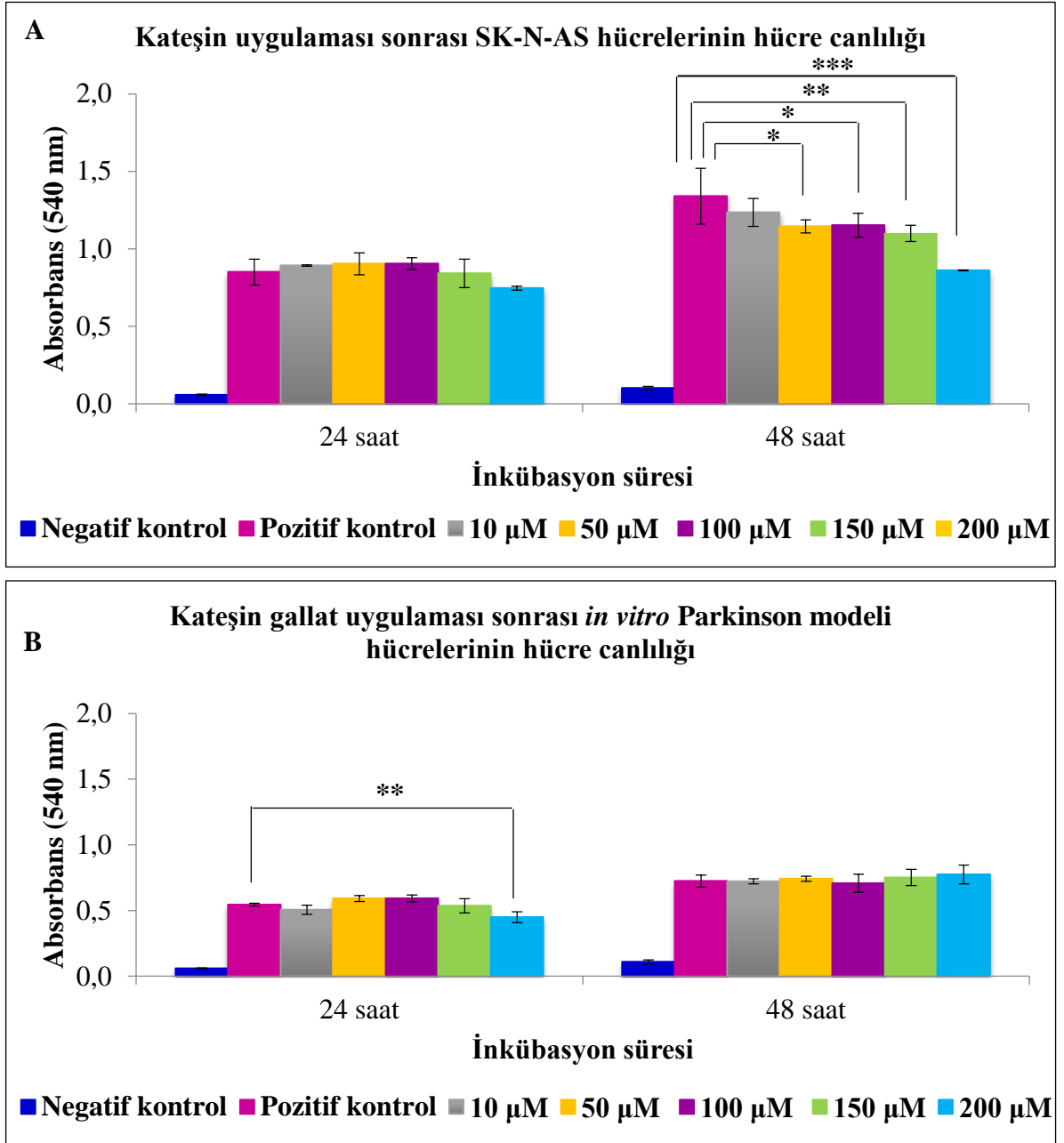
Kateşinin 200 µM konsantrasyonu ile 24 saat inkübasyonu sonrasında *in vitro* Parkinson modeli hücreleri ile pozitif kontrol hücreleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p=0.004$ ) (Şekil 18B).

EGCG'nin 200 µM ile 24 saat inkübasyonu sonrasında SK-N-AS hücreleri ile pozitif kontrol arasında istatistiksel olarak anlam saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Ayrıca, 48 saat inkübasyon sonrasında 150 µM ( $p<0.001$ ) ve 200 µM ( $p<0.001$ ) EGCG konsantrasyonları ile muamele edilen SK-N-AS hücreleri ile pozitif kontrol arasında da önemli bir fark olduğu görülmüştür (Şekil 19A).

EGCG'nin 200 µM ile 48 saat inkübasyonu sonrasında *in vitro* Parkinson modeli hücreleri ile pozitif kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p<0.001$ ) (Şekil 19B), pozitif kontrol ile benzer olması ise bileşenlerin toksik bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Şekil 18.

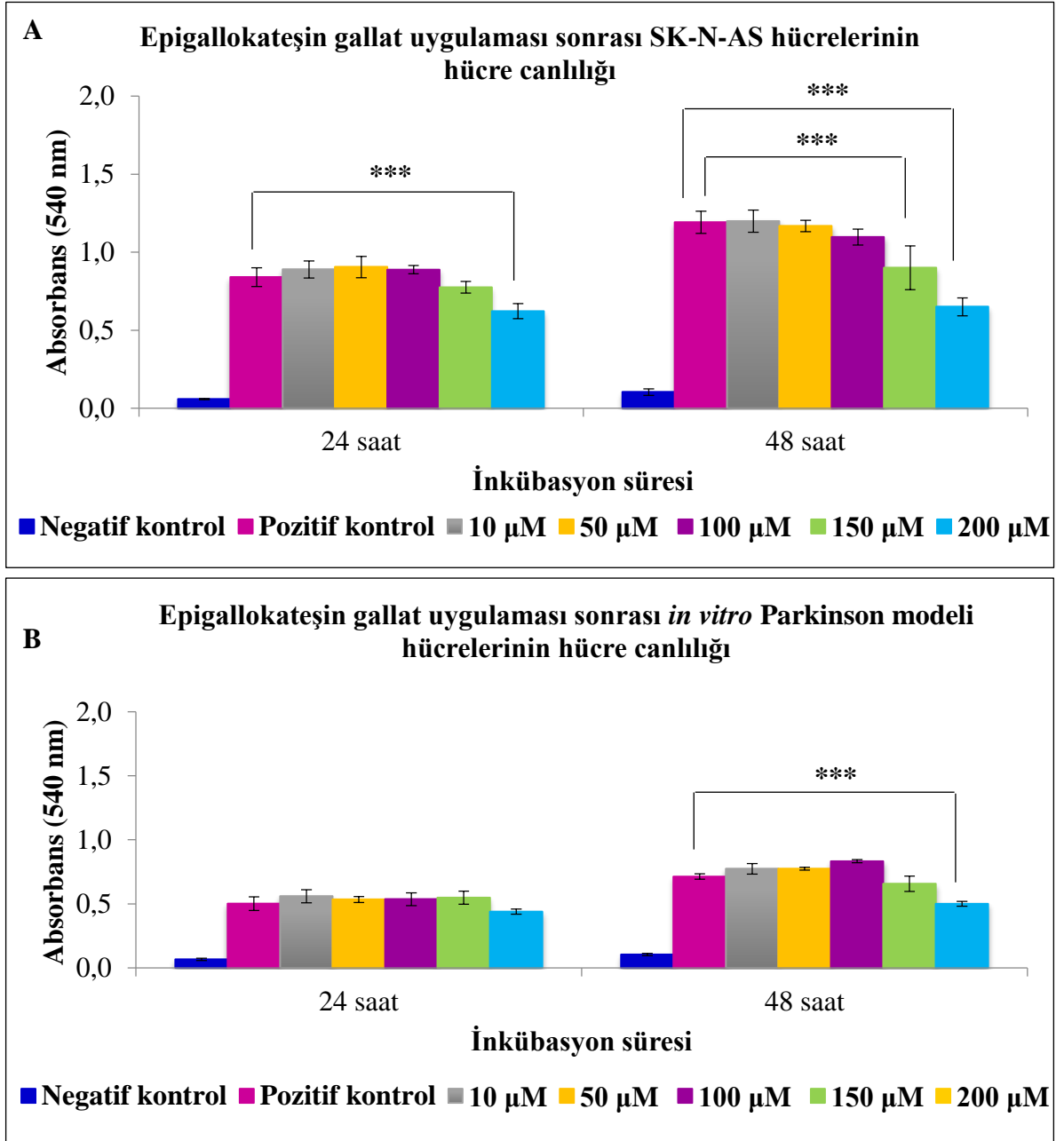
*Kateşinin SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri*



Hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. (A) SK-N-AS hücreleri ve (B) *in vitro* Parkinson modeli hücrelerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde farklı konsantrasyonlarda (10-200 µM) kateşin uygulanmıştır. Her değer (n=4) ortalama ± SS olarak sunulmuştur. Analizlerde Three-way ANOVA ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001.

Şekil 19.

*Epigallokateşin Gallatın SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri*



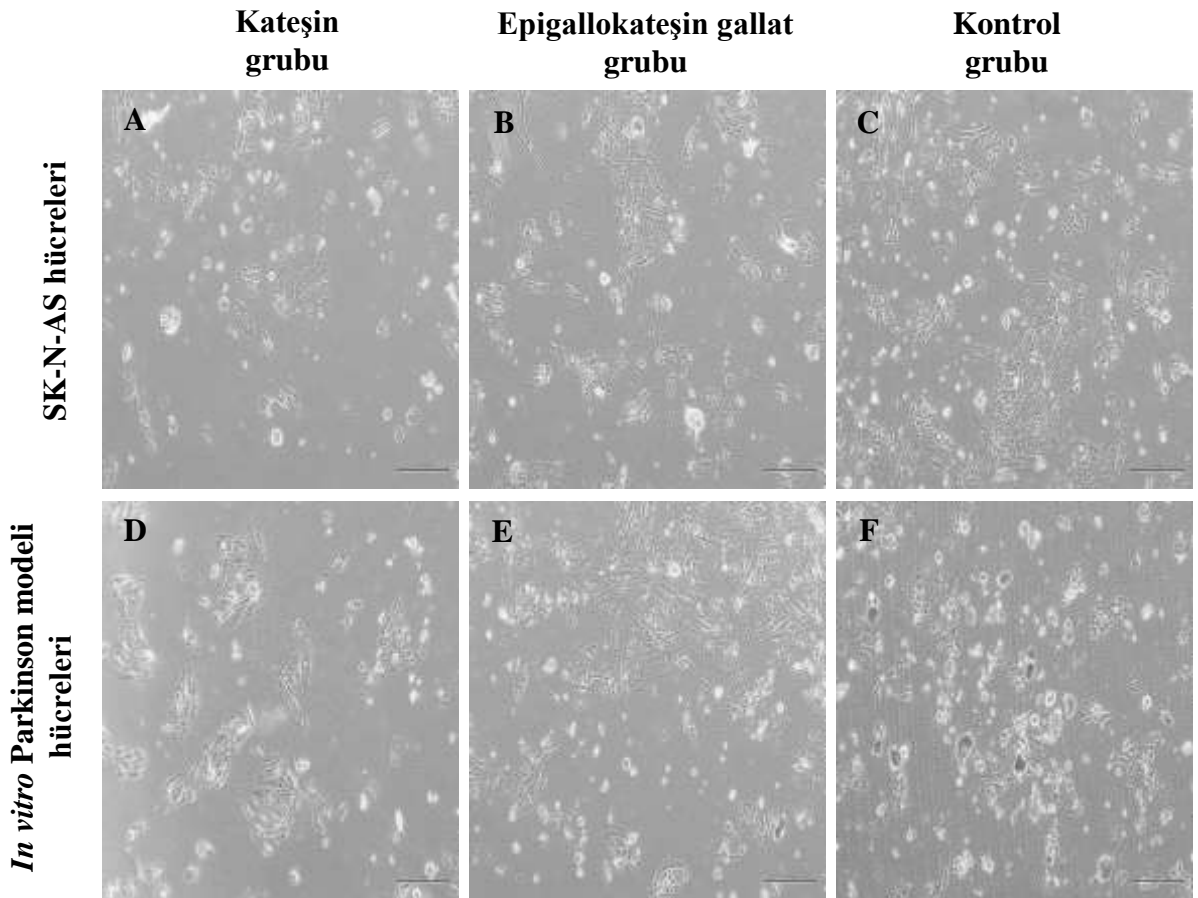
Hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. (A) SK-N-AS hücreleri ve (B) *in vitro* Parkinson modeli hücrelerine 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinde farklı konsantrasyonlarda (10-200 µM) kateşin uygulanmıştır. Her değer (n=4) ortalama ± SS olarak sunulmuştur. Analizlerde Three-way ANOVA ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001.

### Hücre Morfolojisi

Kateşin (Şekil 20A) veya epigallokateşin gallat (Şekil 20B) uygulandıktan sonra SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 20C) epitelyal özelliklerini koruduğu gözlenmiştir. *In vitro* Parkinson model hücrelerinde ise, kateşin (Şekil 20D) ya da epigallokateşin gallat (Şekil 20E) uygulanması sonrası epitelyal özelliklerini korudukları, kateşin (Şekil 20A) ya da epigallokateşin gallat (Şekil 20B) uygulanan SK-N-AS hücrelerine benzer olduğu bulunmuştur. Ancak, SK-N-AS hücreleri 6-OHDA ile muamele edildiklerinde şekillerinin değiştiği ve yuvarlak hale geldikleri görülmüştür (Şekil 20F).

Şekil 20.

*Kateşin (A,D), Epigallokateşin Gallat (B,E) ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) (C,F) Kültüre Edildikten Sonra SK-N-AS Hücreleri (A-C) ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinin (D-F) İverted Mikroskop Altındaki Görüntüleri. Ölçek: 200  $\mu$ m*



## İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Kateşin uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 21A) kateşin uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 21D) kıyasla TNF- $\alpha$  immün boyama yoğunluğunun zayıf olduğu bulunmuştur. Kateşin uygulanan SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde TNF- $\alpha$  için H-SKOR değerlerinin sırasıyla  $112.48 \pm 22.51$  ve  $123.06 \pm 24.89$  olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). *In vitro* Parkinson modeli hücrelerinin TNF- $\alpha$  immünoaktivitesi SK-N-AS hücrelerinden daha yüksek olmasına rağmen, iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p=0.815$ ) (Şekil 22, Tablo 2).

Epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerinin epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerine kıyasla TNF- $\alpha$  immün boyama yoğunluğunun güçlü olduğu görülmüştür (Şekil 21B ve Şekil 21E). Epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinde TNF- $\alpha$  için H-SKOR'u değeri  $107.27 \pm 6.39$ , epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde ise  $123.13 \pm 19.17$  olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). *In vitro* Parkinson modeli hücrelerindeki TNF- $\alpha$  immünoaktivitesinin SK-N-AS hücrelerinden daha yüksek olduğu görülürken, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0.565$ ) (Şekil 22, Tablo 2).

Kateşin veya epigallokateşin gallat uygulanmayan kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 21C) *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 21F) kıyasla TNF- $\alpha$  immün boyama yoğunluğunun zayıf olduğu belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  için H-SKOR değerleri sırasıyla SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson model hücrelerinde  $103.23 \pm 4.71$  ve  $117.06 \pm 22.54$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin TNF- $\alpha$  immünoaktivitesi *in vitro* Parkinson model hücrelerine göre daha düşük olmasına rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir ( $p=0.665$ ) (Şekil 22, Tablo 2).

Kateşin uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 21A) güçlü, epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 21B) orta ve kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 21C) ise zayıf düzeyde TNF- $\alpha$  immün boyama yoğunluğunun olduğu saptanmıştır. SK-N-AS hücrelerinde kateşin uygulanan, epigallokateşin gallat uygulanan ve kontrol gruplarındaki TNF- $\alpha$  için H-SKOR değerleri incelendiğinde, sırasıyla  $112.48 \pm 22.51$ ,  $107.27 \pm 6.39$  ve  $103.23 \pm 4.71$  olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Kateşin uygulanan ve epigallokateşin gallat uygulanan grubun TNF- $\alpha$  immünoaktivitelerinin kontrol grubundan biraz daha

yüksek olduğu görülmüştür. Üç grup arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlılık göstermemektedir ( $p>0.05$ ) (Tablo 2).

*In vitro* Parkinson modeli hücrelerindeki TNF- $\alpha$  immün boyama yoğunlukları incelendiğinde; kateşin uygulanan grup (Şekil 21D) ile epigallokateşin gallat uygulanan grubun (Şekil 21E) benzer yoğunluklara sahip oldukları ve her iki grubunda kontrol grubundan (Şekil 21F) daha güçlü TNF- $\alpha$  immün boyama yoğunluğunun olduğu bulunmuştur. *In vitro* Parkinson modeli hücrelerinde kateşin uygulanan grup, epigallokateşin gallat uygulanan grup ve kontrol grubundaki TNF- $\alpha$  için H-SKOR değerleri incelendiğinde; sırasıyla  $123.06\pm 24.89$ ,  $123.13\pm 19.17$  ve  $117.06\pm 22.54$  olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Kontrol grubundaki TNF- $\alpha$  immünoreaktivitesi diğer iki gruptan daha düşük olmasına rağmen, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ) (Şekil 22, Tablo 2).



Tablo 2.

*100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde TNF-α İçin H-SKOR Değerleri*

	<b>Kateşin grubu</b>	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	<b>Kontrol grubu</b>	<b>p<sup>1</sup></b>
<b>SK-N-AS hücreleri</b>	112.48±22.51	107.27±6.39	103.23±4.71	>0.05
<b><i>In vitro</i> Parkinson modeli hücreleri</b>	123.06±24.89	123.13±19.17	117.06±22.54	>0.05
<b>p<sup>2</sup></b>	0.815	0.565	0.665	

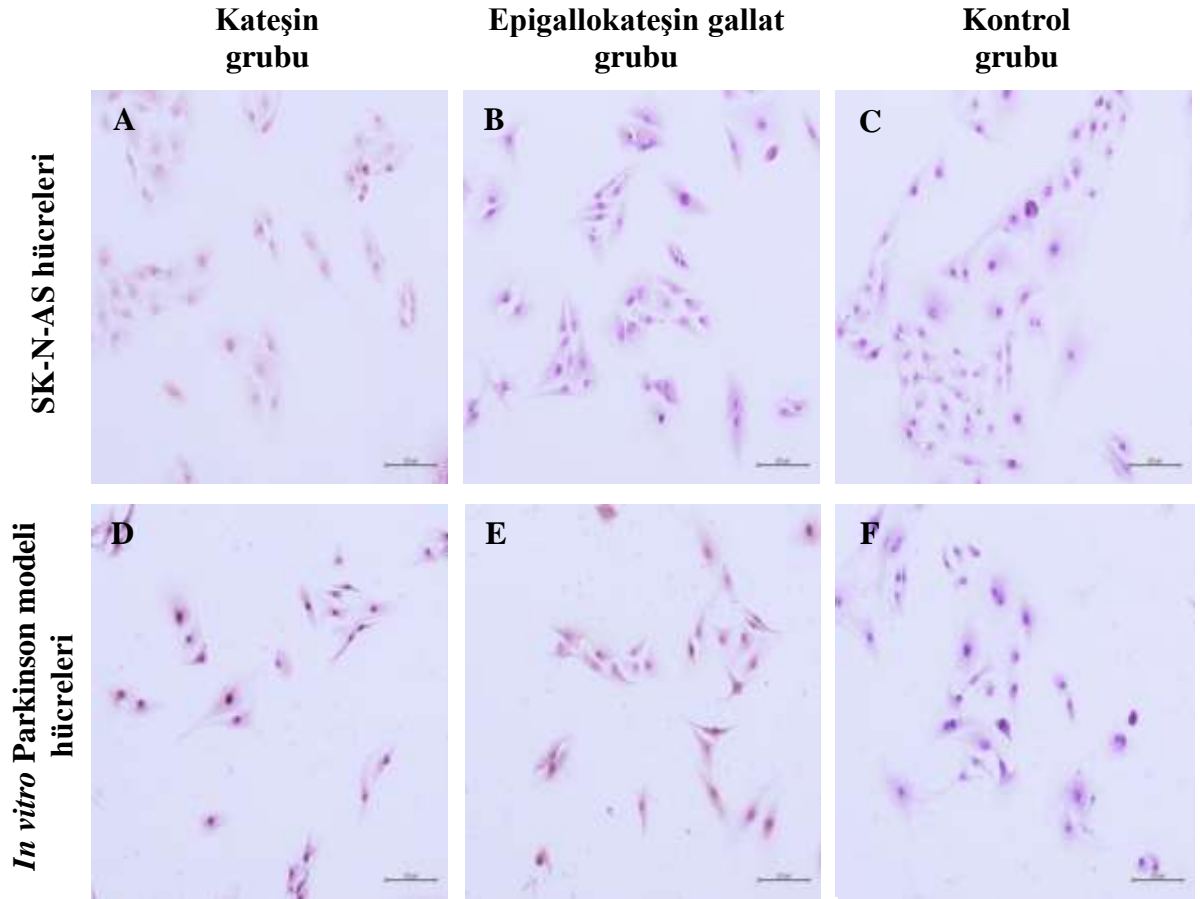
Two-way ANOVA (ortalama ± SS); \*p<0.05.

p<sup>1</sup>: SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde üç grup (kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasındaki fark.

p<sup>2</sup>: Kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri) arasındaki fark.

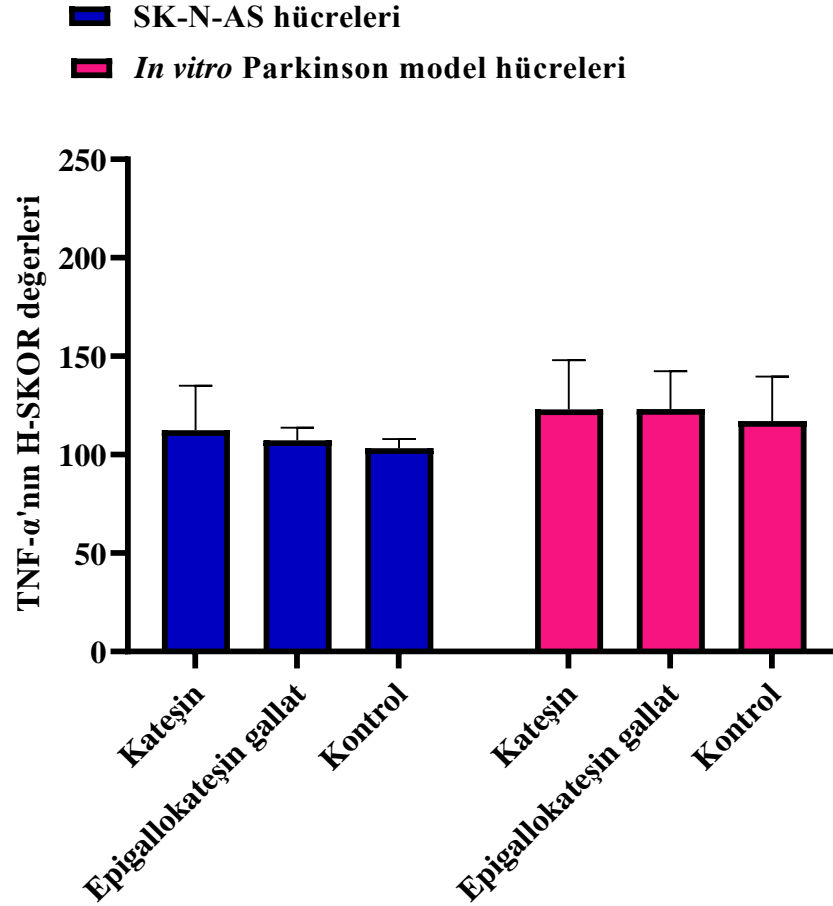
Şekil 21.

*100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde TNF-α'nın İmmünoreaktivitesi. Ölçek: 100 µm*



Şekil 22.

*SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde TNF- $\alpha$  İçin H-SKOR Değerleri Farkları*



Analizlerde Two-way ANOVA testi kullanılmıştır. Kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri) arasındaki farkların post-hoc analizlerinde Sidak çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde üç grup (kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasındaki farkların post-hoc analizlerinde ise Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri 100  $\mu$ M kateşin, 100  $\mu$ M epigallokateşin gallat ve standart kültür ortamında (kontrol) 24 saat inkübasyon süresinde kültüre edildi. Her değer (n=4) ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001.

Kateşin uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 23A) kateşin uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 23D) kıyasla IL-1 $\beta$  immün boyama yoğunluğunun güçlü olduğu bulunmuştur. Kateşin uygulanan SK-N-AS hücreleri ve kateşin uygulanan *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde IL-1 $\beta$  için H-SKOR değerlerinin sırasıyla 146.28 $\pm$ 32.87 ve 123.33 $\pm$ 18.27 olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). SK-N-AS hücrelerinin IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesi *in vitro* Parkinson model hücrelerinden daha yüksek olmasına rağmen, iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p=0.270$ ) (Şekil 24, Tablo 3).

Epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 23B) epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 23E) kıyasla IL-1 $\beta$  immün boyama yoğunluğunun zayıf olduğu görülmüştür. Epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinde IL-1 $\beta$  için H-SKOR değeri 117.99 $\pm$ 5.41, epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde ise 160.72 $\pm$ 19.70 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). *In vitro* Parkinson modeli hücrelerindeki IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesinin daha yüksek olduğu ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p=0.013$ ) (Şekil 24, Tablo 3).

Kateşin veya epigallokateşin gallat uygulanmayan kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 23C) *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 23F) kıyasla IL-1 $\beta$  immün boyama yoğunluğunun güçlü olduğu belirlenmiştir. IL-1 $\beta$  için H-SKOR değerleri sırasıyla SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson model hücrelerinde 145.52 $\pm$ 13.53 ve 141.96 $\pm$ 9.19 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Kontrol grubundaki *in vitro* Parkinson model hücrelerinin IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesi SK-N-AS hücrelerine göre daha düşük olmasına rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.990$ ) (Şekil 24, Tablo 3).

Kateşin uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 23A) güçlü, epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 23B) zayıf ve kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 23C) ise orta düzeyde IL-1 $\beta$  immün boyama yoğunluğunun olduğu saptanmıştır. SK-N-AS hücrelerinde kateşin uygulanan, epigallokateşin gallat uygulanan ve kontrol gruplarındaki IL-1 $\beta$  için H-SKOR değerleri incelendiğinde; sırasıyla 146.28 $\pm$ 32.87, 117.99 $\pm$ 5.41 ve 145.52 $\pm$ 13.53 olduğu bulunmuştur (Tablo 3). Üç grup arasında IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesi açısından farklılıklar olduğu görülmüştür. Buna rağmen, üç grup arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 3).

*In vitro* Parkinson model hücrelerinde kateşin uygulanan grup (Şekil 23D), epigallokateşin gallat uygulanan grup (Şekil 23E) ve kontrol grubunda (Şekil 23F) IL-1 $\beta$  immün boyama yoğunlukları sırasıyla zayıf, güçlü ve orta düzeyde tespit edilmiştir. IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesi *in vitro* Parkinson model hücrelerinde kateşin uygulanan grupta 123.33 $\pm$ 18.27, epigallokateşin gallat uygulanan grupta 160.72 $\pm$ 19.70 ve kontrol grubunda 141.96 $\pm$ 9.19 olduğu bulunmuştur (Tablo 3). Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05) (Şekil 24, Tablo 3). Gruplar arasındaki ikili farklılıklar incelendiğinde, kateşin uygulanan grup ile epigallokateşin gallat uygulanan grup arasındaki fark anlamlıdır (p=0.028). Bu farka göre, kateşin uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerinin IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesi epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerin daha düşüktür (Şekil 24, Tablo 3a).

Tablo 3.

*100  $\mu$ M Kateşin, 100  $\mu$ M Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1 $\beta$  İçin H-SKOR Değerleri*

	<b>Kateşin grubu</b>	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	<b>Kontrol grubu</b>	<b>p<sup>1</sup></b>
<b>SK-N-AS hücreleri</b>	146.28 $\pm$ 32.87	117.99 $\pm$ 5.41	145.52 $\pm$ 13.53	>0.05
<b><i>In vitro</i> Parkinson modeli hücreleri</b>	123.33 $\pm$ 18.27 <sup>a</sup>	160.72 $\pm$ 19.70 <sup>b</sup>	141.96 $\pm$ 9.19 <sup>ab</sup>	<0.05*
<b>p<sup>2</sup></b>	0.270	0.013*	0.990	

Two-way ANOVA [Tukey ve Sidak çoklu karşılaştırma testleri, (ortalama  $\pm$  SS)];  
\*p<0.05.

a-b: Aynı harfe sahip üç grup (kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasında anlamlı fark yoktur.

p<sup>1</sup>: SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde üç grup (kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasındaki fark.

p<sup>2</sup>: Kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri) arasındaki fark.

Tablo 3.a.

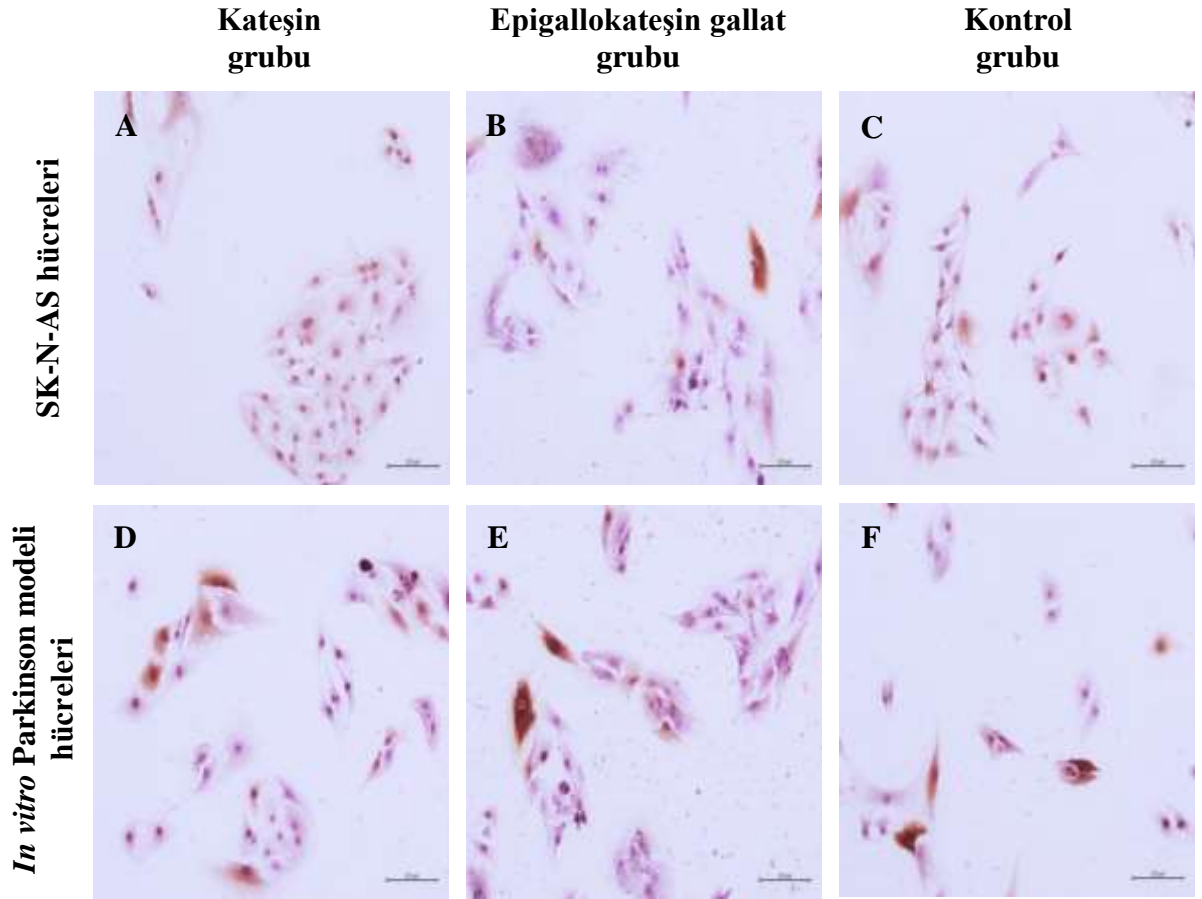
*Kateşin Uygulanan, Epigallokateşin Gallat Uygulanan ve Kontrol Gruplarındaki in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1 $\beta$  Antikoru'nun H-SKOR Değerleri Arasındaki Anlamlılık Dereceleri*

<b><i>In vitro</i> Parkinson modeli hücreleri</b>		<b>p</b>
<b>Kateşin grubu</b>	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	0.028*
	<b>Kontrol grubu</b>	0.357
<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	<b>Kateşin grubu</b>	0.028*
	<b>Kontrol grubu</b>	0.352
<b>Kontrol grubu</b>	<b>Kateşin grubu</b>	0.357
	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	0.352

Two-way ANOVA (Tukey çoklu karşılaştırma testleri); \*p<0.05.

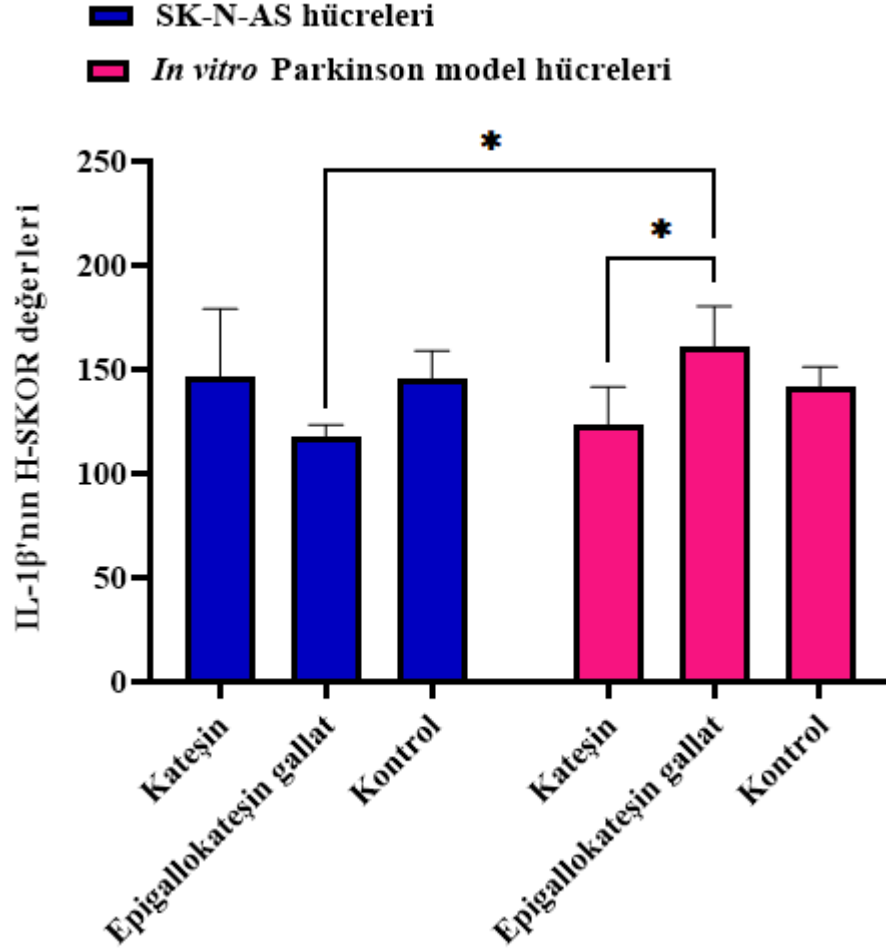
Şekil 23.

*100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1β'nin İmmünoreaktivitesi. Ölçek: 100 µm*



Şekil 24.

*SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde IL-1 $\beta$  İçin H-SKOR Değerleri Farkları*



Analizlerde Two-way ANOVA testi kullanılmıştır. Katesin, epigallokateşin gallat ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri) arasındaki farkların post-hoc analizlerinde Sidak çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde üç grup (katesin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasındaki farkların post-hoc analizlerinde ise Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri 100  $\mu$ M katesin, 100  $\mu$ M epigallokateşin gallat ve standart kültür ortamında (kontrol) 24 saat inkübasyon süresinde kültüre edildi. Her değer (n=4) ortalama  $\pm$  SS olarak sunulmuştur. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001.



Kateşin uygulanan SK-N-AS hücrelerinde (Şekil 25A), kateşin uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 25D) kıyasla kaspaz-3 immün boyama yoğunluğunun zayıf olduğu bulunmuştur. Kaspaz-3 için H-SKOR değerleri SK-N-AS hücrelerinde kateşin uygulanan grupta  $164.50 \pm 24.19$ , *in vitro* Parkinson model hücrelerinde ise  $130.29 \pm 12.85$  olduğu görülmüştür (Tablo 4). İki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p=0.048$ ) (Şekil 26, Tablo 4). Kateşin uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerindeki kaspaz-3 immünoreaktivitesinin kateşin uygulanan SK-N-AS hücrelerinden daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 26).

Epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 25B) epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 25E) kıyasla kaspaz-3 immün boyama yoğunluğunun zayıf olduğu görülmüştür. Epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinde kaspaz-3 için H-SKOR değeri  $139.15 \pm 9.49$ , epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde ise  $150.90 \pm 13.06$  olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Epigallokateşin gallat uygulanan *in vitro* Parkinson modeli hücrelerindeki kaspaz-3 immünoreaktivitesi epigallokateşin gallat uygulanan SK-N-AS hücrelerinden daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p=0.756$ ) (Şekil 26, Tablo 4).

Kateşin veya epigallokateşin gallat uygulanmayan kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin (Şekil 25C) *in vitro* Parkinson model hücrelerine (Şekil 25F) kıyasla kaspaz-3 immün boyama yoğunluğunun daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Kaspaz-3 için H-SKOR değerleri sırasıyla SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson model hücrelerinde  $139.15 \pm 9.49$  ve  $150.90 \pm 13.06$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 4). Kontrol grubundaki SK-N-AS hücrelerinin kaspaz-3 immünoreaktivitesinin *in vitro* Parkinson model hücrelerinden daha düşük olmasına rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.949$ ) (Şekil 26, Tablo 4).

SK-N-AS hücrelerinde kateşin uygulanan grubun kaspaz-3 immün boyama yoğunluğu orta (Şekil 25A), epigallokateşin gallat uygulanan grubun (Şekil 25B) zayıf ve kontrol grubunun (Şekil 25C) güçlü düzeyde olduğu görülmüştür. Kaspaz-3 için H-SKOR değeri SK-N-AS hücrelerinde kateşin uygulanan grupta  $164.50 \pm 24.19$ , epigallokateşin gallat uygulanan grupta  $139.15 \pm 9.49$  ve kontrol grubunda  $188.77 \pm 17.16$  olduğu bulunmuştur (Tablo 4). Üç grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ) (Şekil 26, Tablo 4). Gruplar arasındaki

ikili farklılıklar incelendiğinde sadece epigallokateşin gallat uygulanan grup ile kontrol grubu (kateşin veya epigallokateşin gallat verilmeyen grup) arasında istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p=0.003$ ). Bu farka göre, epigallokateşin gallat uygulanan grubun kaspaz-3 immünoreaktivitesi kontrol grubundan daha düşüktür (Şekil 26, Tablo 4a).

*In vitro* Parkinson model hücrelerinde kateşin uygulanan grup (Şekil 25D), epigallokateşin gallat uygulanan grup (Şekil 25E) ve kontrol grubunda (Şekil 25F) kaspaz-3 immün boyama yoğunlukları sırasıyla zayıf, orta ve güçlü düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Kaspaz-3 için H-SKOR değerleri *in vitro* Parkinson model hücrelerinde kateşin uygulanan grupta  $130.29 \pm 12.85$ , epigallokateşin gallat uygulanan grupta  $150.90 \pm 13.06$  ve kontrol grubunda  $195.11 \pm 26.44$  olduğu bulunmuştur (Tablo 4). Üç grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Şekil 26, Tablo 4). Ayrıca, kateşin uygulanan ( $p < 0.001$ ) ve epigallokateşin gallat uygulanan ( $p = 0.008$ ) gruplarda kaspaz-3 immünoreaktivitelerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu bulunmuştur. Özellikle kateşin uygulanan grupta önemli derecede bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 26, Tablo 4b).

Tablo 4.

*100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3 İçin H-SKOR Değerleri*

	<b>Kateşin grubu</b>	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	<b>Kontrol grubu</b>	<b>p<sup>1</sup></b>
<b>SK-N-AS hücreleri</b>	164.50±24.19 <sup>ab</sup>	139.15±9.49 <sup>a</sup>	188.77±17.16 <sup>b</sup>	<0.05*
<b><i>In vitro</i> Parkinson modeli hücreleri</b>	130.29±12.85 <sup>a</sup>	150.90±13.06 <sup>a</sup>	195.11±26.44 <sup>b</sup>	<0.05*
<b>p<sup>2</sup></b>	0.048*	0.756	0.949	

Two-way ANOVA [Tukey ve Sidak çoklu karşılaştırma testleri, (ortalama ± SS)];  
\*p<0.05.

a-b: Aynı harfe sahip üç grup (kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasında anlamlı fark yoktur.

p<sup>1</sup>: SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde üç grup (kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol grupları) arasındaki fark.

p<sup>2</sup>: Kateşin, epigallokateşin gallat ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri) arasındaki fark.

Tablo 4.a.

*Kateşin Uygulanan, Epigallokateşin Gallat Uygulanan ve Kontrol Gruplarındaki SK-N-AS Hücrelerinde Kaspaz-3 Antikorumunun H-SKOR Değerleri Arasındaki Anlamlılık Dereceleri*

<b>SK-N-AS hücreleri</b>		<b>p</b>
<b>Kateşin grubu</b>	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	0.150
	<b>Kontrol grubu</b>	0.174
<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	<b>Kateşin grubu</b>	0.150
	<b>Kontrol grubu</b>	0.003**
<b>Kontrol grubu</b>	<b>Kateşin grubu</b>	0.174
	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	0.003**

Two-way ANOVA (Tukey çoklu karşılaştırma testleri); \*\*p<0.01.

Tablo 4.b.

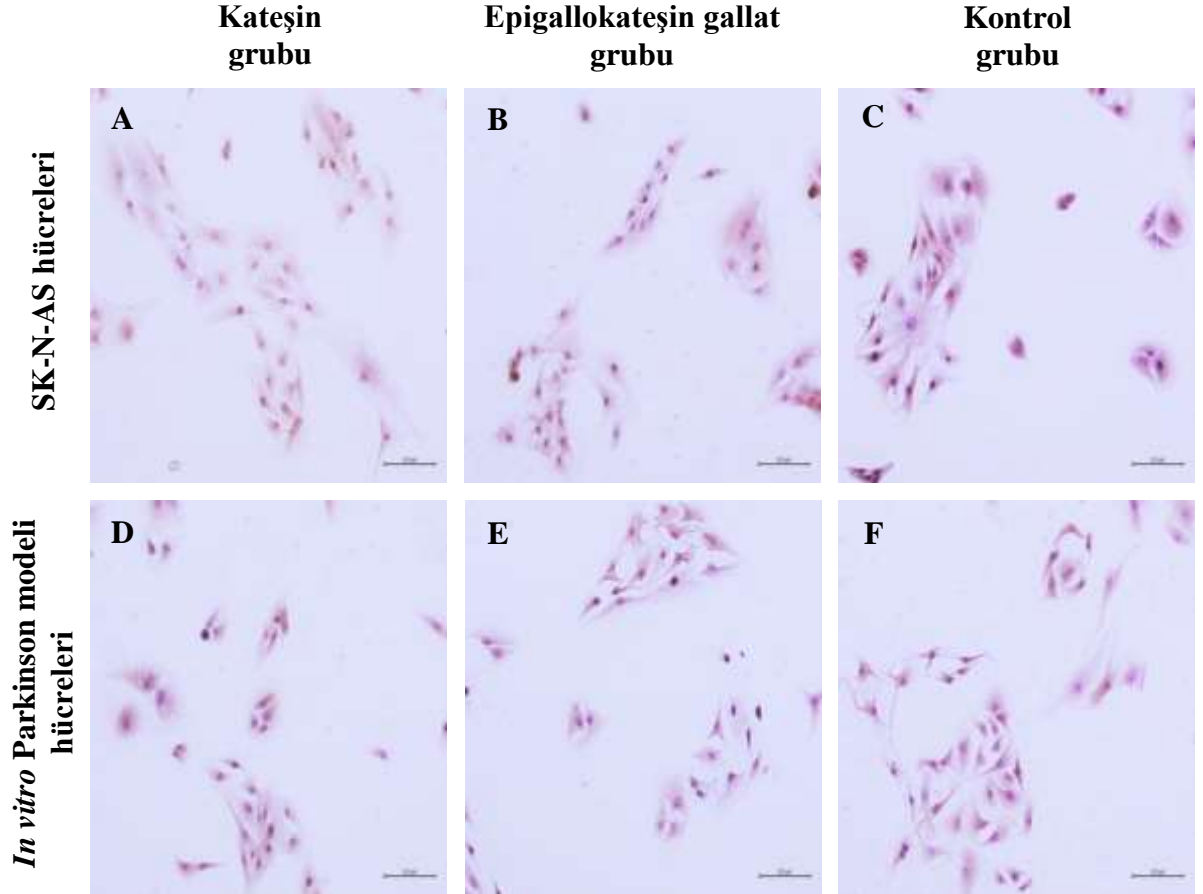
*Kateşin Uygulanan, Epigallokateşin Gallat Uygulanan ve Kontrol Gruplarındaki in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3 Antikorumunun H-SKOR Değerleri Arasındaki Anlamlılık Dereceleri*

<b>In vitro Parkinson modeli hücreleri</b>		<b>p</b>
<b>Kateşin grubu</b>	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	0.273
	<b>Kontrol grubu</b>	0.0003***
<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	<b>Kateşin grubu</b>	0.273
	<b>Kontrol grubu</b>	0.008**
<b>Kontrol grubu</b>	<b>Kateşin grubu</b>	0.0003***
	<b>Epigallokateşin gallat grubu</b>	0.008**

Two-way ANOVA (Tukey çoklu karşılaştırma testleri); \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

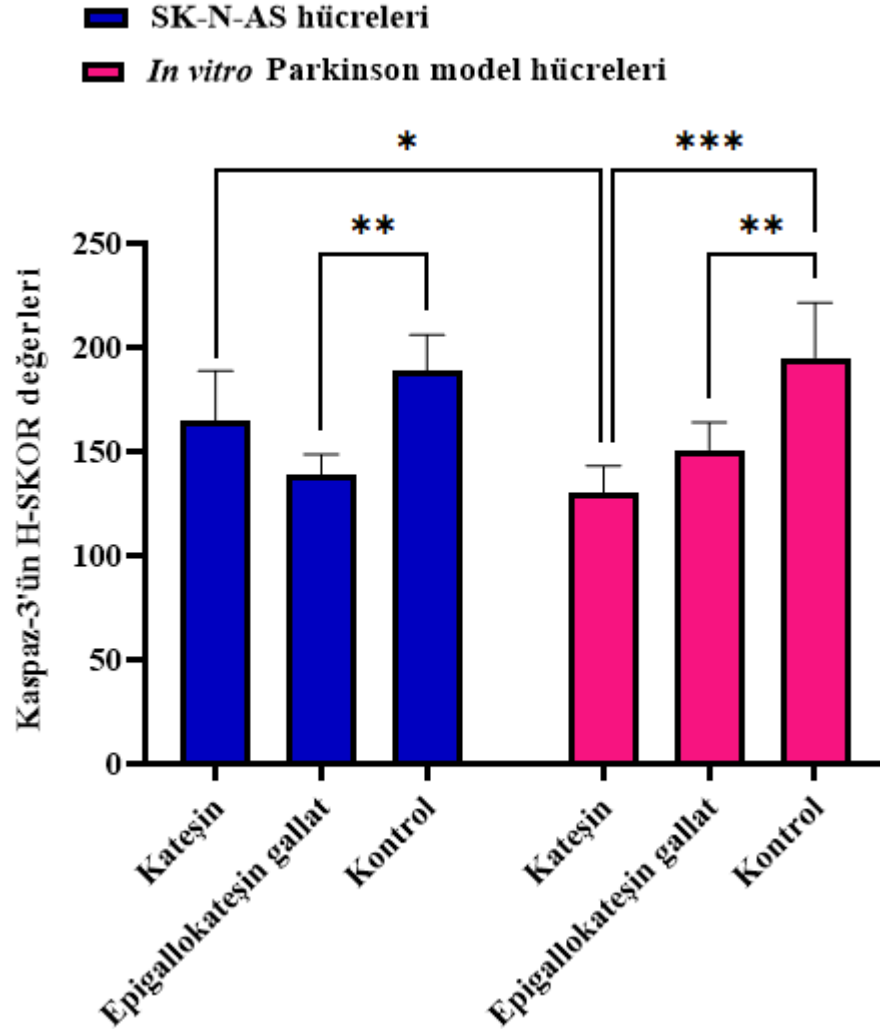
Şekil 25.

*100 µM Kateşin, 100 µM Epigallokateşin Gallat ve Standart Kültür Ortamında (Kontrol) 24 Saat İnkübasyon Süresinde Kültüre Edilen SK-N-AS hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3'ün İmmünoreaktivitesi. Ölçek: 100 µm*



Şekil 26.

*SK-N-AS Hücreleri ve in vitro Parkinson Modeli Hücrelerinde Kaspaz-3 İçin H-SKOR Değerleri Farkları*



Analizlerde Two-way ANOVA testi kullanılmıştır. Kateşin, epigallokatesin gallat ve kontrol gruplarında iki grup (SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri) arasındaki farkların post-hoc analizlerinde Sidak çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde üç grup (kateşin, epigallokatesin gallat ve kontrol grupları) arasındaki farkların post-hoc analizlerinde ise Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. SK-N-AS hücreleri ve *in vitro* Parkinson modeli hücreleri 100 µM kateşin, 100 µM epigallokatesin gallat ve standart kültür ortamında (kontrol) 24 saat inkübasyon süresinde kültüre edildi. Her değer (n=4) ortalama ± SS olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001.

## BÖLÜM V

### Tartışma

Bu bölümde, elde edilen bulgular literatürde yer alan araştırmalar çerçevesinde tartışılmıştır.

6-hidroksidopamin, Parkinson modelinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile oksidatif stresi indükleyerek nörotoksositeye neden olan bir nörotoksindir. 6-OHDA, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmasının yanı sıra kaspaz-3, p53, NF-κB ve c-Jun transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile SN'daki dopaminerjik nöronların apoptozunu indüklemektedir (Junior, & diğ., 2003). Ayrıca, mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I ve IV'ün inhibisyonuna da neden olmaktadır. Böylece, dopaminerjik nöronlarda sitotoksosite oluşup, nöronal hasar meydana gelmekte ve Parkinson modellemesi elde edilmektedir. Presinaptik bir nöronal protein olan alfa-sinükleinin agregasyonu, Parkinson hastalığının önemli patofizyolojik özelliklerinden biridir (Khalatbary & Khademi, 2020; Xu, & diğ., 2016). Artan alfa-sinüklein agregasyonu, Lewy cisimciklerinin intranöral birikimini de artırmaktadır (Lama, & diğ., 2020). Lewy cisimcikleri; mitokondriyal disfonksiyon, nitrik oksit türlerinin üretimi, serbest radikallerin salınımı, apoptoz, inflamasyon ve protein yıkım yollarının bozulması gibi çoklu mekanizmaları uyarmaktadır (Bossy-Wetzel, & diğ., 2004). Parkinson hastalığının bir diğer önemli patofizyolojik özelliği ise, SNpc'daki dopaminerjik nöronların kayıpları ve striatal dopamin seviyelerinin azalmasıdır (Lama, & diğ., 2020). Yapılan bu tez çalışmasında, *in vitro* Parkinson modelinin oluşturulması için nörotoksin bir bileşik olan 6-OHDA kullanılmıştır. Alfa-sinüklein ve dopamin düzeylerine bakılarak modelin kontrolü gerçekleştirilmiştir. Hücreler farklı sürelerdeki ve konsantrasyonlardaki 6-OHDA ile muamele edildikten sonra alfa-sinüklein seviyelerinde artma ve dopamin seviyelerinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 6-OHDA'nın 50 µM konsantrasyonda 24 saat uygulanmasından sonra dopaminerjik nöronlarda kayıplar meydana gelmiş, Parkinson hastalığı gelişmiş ve *in vitro* Parkinson modeli oluşturulmuştur.

Kateşinler, özellikle EGCG, antioksidan özelliği ile reaktif oksijen türlerinin temizlenmesini sağlamaktadır (Jin, & diğ., 2001). Ayrıca, EGCG hücre canlılığını ve nörit büyümesini artırmakta ve böylece nöroprotektif aktivite göstermektedir (Singh,

& diğ., 2015; Nan, & diğ., 2018). Wang ve arkadaşlarının EGCG'nin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri 24 saat süresinde farklı konsantrasyonlardaki (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M ve 400  $\mu$ M) 6-OHDA ile muamele edilmiştir. 6-OHDA ile muamele öncesinde hücelere farklı konsantrasyonlarda (0.1  $\mu$ M-400  $\mu$ M) 1 saat süresince EGCG uygulanmıştır. Hücre canlılığı analizleri sonucunda, 0.1  $\mu$ M-10  $\mu$ M konsantrasyonlardaki EGCG uygulamasının 6-OHDA ile muamele edilmesine bağlı SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığını artırdığı ve düşük dozlarda uygulanan EGCG'nin nörotoksositeye karşı koruyucu olabildiği saptanmıştır. Ayrıca, 1  $\mu$ M konsantrasyondaki EGCG uygulamasının en etkili doz olduğu da görülmüştür (Wang, & diğ., 2009). EGCG; PKC yolunu uyararak, NF- $\kappa$ B yolağını baskılayarak ve hücre döngüsündeki genleri modüle ederek 6-OHDA'nın neden olduğu nöronal hasarı önleyip, hücre sağkalımını artırmış olabileceği sonucuna varılmaktadır.

Junior ve arkadaşlarının primer kültüre edilen mezensefalik hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hücreler 24 saat süresinde 200  $\mu$ M 6-OHDA ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı analizleri sonucunda hücre ölümünün meydana geldiği, hücre sayısının ve hücre canlılığının %53 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Hücreler 6-OHDA ile muamele edilmeden önce farklı konsantrasyonlarda (3.4  $\mu$ M, 34  $\mu$ M ve 340  $\mu$ M) kateşin ile muamele edilmiştir. 6-OHDA ile muamele öncesi uygulanan kateşinin, 6-OHDA'dan kaynaklanan hücre ölümü üzerinde azaltıcı bir etkisinin olduğu görülmüştür. 3.4  $\mu$ M, 34  $\mu$ M ve 340  $\mu$ M konsantrasyonlarında uygulanan kateşinin hücre ölümü yüzdelerinin sırasıyla %37.64, %29.97 ve %9.55 olduğu tespit edilmiştir. 340  $\mu$ M konsantrasyondaki kateşinin 6-OHDA kaynaklı hücre ölümünü tamamen önlediği gözlenmiştir. 6-OHDA ile muamele edilmeyen hücrelerde ise kateşinin hiçbir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Junior, & diğ., 2003). Kateşinin hücre ölümündeki koruyucu etkisi; reaktif oksijen türlerini temizlemesi, lipid peroksidasyonunu düşürmesi, bakır ( $\text{Cu}^{+2}$ ) ve demir ( $\text{Fe}^{+2}$ ) gibi metal iyonlarını şelatlaması etkilerinden dolayı sahip olduğu antioksidan özelliğinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

PC12 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, hücrelerin 250  $\mu$ M 6-OHDA ile muamele edilmesi sonucu *in vitro* Parkinson modeli oluşturulmuştur. Oluşturan *in vitro* Parkinson modelinde, beş farklı kateşinin (EGCG, ECG, EGC, EC ve (+)-C) etkileri incelenmiştir. Hücreler 6-OHDA ile muamele edilmeden önce 30 dakika süresince farklı konsantrasyonlardaki (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M ve 400  $\mu$ M)



kateşinler ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı analizleri sonuçlarına göre; kateşinlerin farklı konsantrasyonlar da farklı etkilere sahip oldukları belirlenmiş ve 50  $\mu\text{M}$ -100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanan kateşinlerin hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte 200  $\mu\text{M}$ -400  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda, EGCG ya da ECG uygulanan hücrelerin hücre canlılıklarının  $>90\%$ , EC ya da (+)-C uygulanan hücrelerin ise hücre canlılıklarının  $\sim 70-80\%$  olduğu saptanmıştır. EGC uygulamasının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilirken, 400  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda hücre canlılığının  $\sim 50\%$ 'ye düştüğü görülmüştür. Ayrıca 200  $\mu\text{M}$ -400  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda, beş kateşinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin sınıflandırılmasının ECG > EGCG > EC > (+)-C > EGC olduğu bulunmuştur (Jin, & diğ., 2001). Guo ve arkadaşlarının SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerindeki yaptıkları bir çalışmada, hücreler 1  $\mu\text{M}$ -500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlardaki 6-OHDA ile 24 saat süresince muamele edilmeden önce 1 saat süresince 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında yeşil çay polifenolleri ile muamele edilmiştir. 6-OHDA ile muamele sonrası hücre canlılığının 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda sırasıyla  $60\%$  ve  $35\%$  olduğu gözlenmiştir. 24 saat süresince sadece yeşil çay polifenolleri uygulanan grupta hücre canlılığının düşük konsantrasyonlarda arttığı ve yüksek konsantrasyonlarda ise  $120\%$ 'ye ulaştığı görülmüştür. Ayrıca, 6-OHDA ile muamele edilmeden önce 1 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanan yeşil çay polifenolleri muamelesinin de hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde koruduğu saptanmıştır (Guo, & diğ., 2005). Tez çalışmamızın sonuçları, literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Hücre canlılığı analizlerinden sonra, 24 saat süresince 50  $\mu\text{M}$  6-OHDA ile muamele edilen SK-N-AS hücrelerinde hücre canlılığının  $50\%$ 'nin üzerinde olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda hem kateşin uygulamasının hem de epigallokateşin gallat uygulamasının, *in vitro* Parkinson model hücrelerinde hücre canlılığını kontrol grubuna göre daha fazla artırdığı görülmüştür. Bu nedenle, özellikle 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda 24 saatlik uygulamadan sonra Parkinson model nöron hücreleri üzerinde her iki biyoaktif bileşenin de potansiyel koruyucu etkilere sahip olabileceği görülmüştür.

Apoptoz, intrinsik yol ve ekstrinsik yol olarak adlandırılan iki sinyal yolunu içeren programlanmış hücre ölümüdür. İntrinsik yol mitokondriyal hasar, pro-apoptotik proteinlerin uyarılması ve sitokrom C'nin mitokondriden sitozole salınmasından oluşurken; ekstrinsik yol hücre zarındaki ölüm reseptörlerinin

aktivasyonu ile başlamaktadır. Birbirinden bağımsız olarak meydana gelen bu iki yol, kaspaz-3 ve -7 gibi efektör kaspazların aktivasyonu ile birleşmektedir. Apoptotik süreç kaspazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Kaspaz-3, nöronlarda en çok etkisi görülen kaspazdır. Nörotoksikasyon durumlarında, kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşmekte ve sekresyonu artmaktadır. Kaspaz-3 aktivasyonu, dopaminerjik nöronlardan zengin olan SNpc'da apoptozun indüklendiğini ve nöronal dejenerasyonun meydana geldiğini göstermektedir. SNpc'daki dopaminerjik nöronların artan apoptozu ve nöronal dejenerasyonu, Parkinson hastalığının en önemli belirtilerinden birisidir (Hernandez-Baltazar, & diğ., 2017).

6-OHDA, özellikle dopaminerjik hücrelerde apoptozu indükleyerek *in vitro* ve *in vivo* Parkinson modellerinin oluşturulmasında en sık kullanılan nörotoksinlerden biridir. 6-OHDA, ROT üretimini indükleyerek peroksinitrit düzeylerinin artmasına, stresle aktive edilen protein kinaz/JNK ile NF-κB yollarının aktive edilmesine ve böylece hücre ölümüyle ilgili pro-apoptotik genlerin aktifleşmesine neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, PKC ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) 1/2 sinyal yollarını inhibe ederek de hücre canlılığının sürdürülmesinde görevli olan anti-apoptotik genlerin baskılanmasını sağlamaktadır. Pro-apoptotik genlerdeki artış ve anti-apoptotik genlerdeki azalış, hücre sağkalımının azalmasına ve apoptozun indüklenerek nöron hücrelerinde kayıpların olmasına neden olmaktadır. Diğer yandan, 6-OHDA mitokondrideki kompleks I ve IV ile etkileşime girerek mitokondriyal membran potansiyelinde değişime neden olmakta ve bu da apoptozun gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır (Khalatbary & Khademi, 2020; Singh, & diğ., 2015; Guo, & diğ., 2005).

Yeşil çay bitkisinde yüksek miktarda bulunan kateşinlerin; ROT üretiminin baskılanması, PKC ve ERK1/2 sinyal yollarının ekspresyonunun indüklenmesi, fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt yolunun aktive edilmesi, pro-apoptotik genlerin ve proteinlerin düzeylerinin azaltılması, anti-apoptotik genlerin ve proteinlerin düzeylerinin artırılması, oksidatif stresin azaltılması gibi etkileri sayesinde anti-apoptotik ve nöroprotektif etkiler göstermektedir (Khalatbary & Khademi, 2020; Farkhondeh, & diğ., 2019; Singh, & diğ., 2015; Mandel, & diğ., 2008; Guo, & diğ., 2005). Jin ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, PC12 hücreleri 24 saat süresince 250 µM 6-OHDA ile muamele edilmiştir. Hücrelerin 6-OHDA ile muamele edilmesi sonrası %32.5'inde apoptoz gerçekleştiği görülmüştür. 6-OHDA ile muamele edilmeden önce farklı konsantrasyonlarda EGCG, ECG, EGC, EC ve

(+)-C uygulanmıştır. Buna göre; 200  $\mu\text{M}$ -400  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında uygulanan EGCG'nin apoptotik hücreleri inhibe etme oranları sırasıyla %88.3 ve %90.3 iken, ECG'nin %91.9 ve %90.5 olduğu görülmüştür. EGC, EC ve (+)-C'nin daha düşük anti-apoptotik etkilerinin olduğu bulunurken, EGCG ve ECG'nin Parkinson hastalığı için güçlü nöroprotektif ajanlar olabileceği düşünülmüştür (Jin, & diğ., 2001).

Chao ve arkadaşlarının Parkinson hastalığı belirtilerini gösteren bir model üzerinde yaptıkları çalışmada, retinoik asit ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlardaki EGCG veya asetillenmiş epigallokateşin gallat (p-EGCG) ile 30 dakika boyunca ön uygulaması sonrası 24 saat süresince 25  $\mu\text{M}$  6-OHDA ile muamele edilmiştir. 6-OHDA ile muamele edildikten sonra meydana gelen hücresel apoptoz durumu, kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi ile belirlenmiştir. 6-OHDA ile muamele edilmenin hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesini 2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. 10  $\mu\text{M}$  uygulanan p-EGCG'nin kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir azalma sağladığı fakat farklı dozlarda uygulanan EGCG'nin anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Akt yolu, apoptotik kaskada yer alan proteinlerin indirgenmesini sağlayarak hücre apoptozunu inhibe eden, proliferasyonu ve sağkalımını artıran bir yolaktır. Çalışmada, 6-OHDA ile muamelenin Akt yolunun fosforilasyonunu önemli ölçüde baskıladığı tespit edilirken, 10  $\mu\text{M}$  uygulanan p-EGCG'nin Akt fosforilasyonunu belirgin bir şekilde artırdığı gösterilmiştir. Bu etki, p-EGCG'nin Parkinson model hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini azaltıp anti-apoptotik etki gösterme mekanizmasını açıklayabilmektedir (Chao, & diğ., 2010). SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerindeki yapılan başka bir çalışmada ise, hücreler 100  $\mu\text{M}$  6-OHDA ile muamele edildikten sonra hücrelerin çekirdek yapılarında parçalanmaların olduğu ve apoptozun gerçekleştiği gözlenmiştir. 6-OHDA ile muamele edilmeden önce 50  $\mu\text{M}$ -200  $\mu\text{M}$  yeşil çay polifenollerini ile muamele edilen gruplardaki hücrelerin apoptozdan önemli ölçüde apoptoza uğramadığı saptanmıştır. 6-OHDA ile muamele edilmeyen, sadece yeşil çay polifenollerini uygulanan gruptaki hücrelerde ise yeşil çay polifenollerinin apoptoz üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca, 50  $\mu\text{M}$ -200  $\mu\text{M}$  yeşil çay polifenollerini ile ön uygulama yapılan grupta konsantrasyona bağlı olarak hücre içi ROT ve serbest  $\text{Ca}^{+2}$  birikiminin baskılandığı, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmanın önlendiği gözlenmiştir. Çalışmada sonucunda, yeşil çay polifenollerinin nöroblastoma hücreleri üzerinde apoptoza karşı koruyucu etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır (Guo, & diğ., 2005). Parkinson modelinde

yapılan bir çalışmada, 0.25 mcg/ml, 0.50 mcg/ml ve 1 mcg/ml epikateşin gallat verildiğinde doz artışına bağlı olarak oksidatif stres seviyesinin ve apoptozun azaldığı bulunmuştur (Siddique, & diğ., 2014).

EGCG, JNK fosforilasyonunu ve JNK inhibitörünü baskılayarak apoptozu ve hücre toksisitesini inhibe edebilmektedir. Bu etkisi sayesinde nöron hücrelerinin sağ kalımını artırıp hücre ölümlerini önleyebilmektedir (Farkhondeh, & diğ., 2019; Singh, & diğ., 2015; Mandel, & diğ., 2008). He ve arkadaşlarının çalışmasında, 25  $\mu$ M EGCG uygulamasının primer kortikal nöronal hücrelerde JNK fosforilasyonunu inhibe ettiği ve kaspaz-3 aktivasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Böylelikle, EGCG nöronal apoptotik aktiviteyi azaltıcı etki göstermiştir. Ayrıca çalışmada, EGCG'nin anti-apoptotik etki göstererek hücre canlılığını artırdığı da bulunmuştur (He, & diğ., 2015). Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, N27 hücreleri 2 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M) EGCG uygulaması sonrasında 6 saat süresince 100  $\mu$ M 6-OHDA ile muamele edilmiştir. 6-OHDA ile muamelenin hücre ölümünü 3 kat artırdığı ve hücre canlılığını %59 oranında düşürdüğü görülmüştür. 2 saat süresince 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M konsantrasyonlarında uygulanan EGCG uygulamasının hücre ölümünü sırasıyla %31 ve %55 oranında azalttığı görülürken, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M uygulanan EGCG uygulamasında hücre ölümünde herhangi koruyucu bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ayrıca, EGCG uygulamasının 6-OHDA ile muameleye bağlı oluşan toksisiteyi %21 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Kaspaz-3 aktivitesi ölçülerek hücre apoptozu belirlenmiştir. 6-OHDA ile muamelenin kaspaz-3 aktivitesini %12 artırdığı saptanmıştır. EGCG uygulamasının kaspaz-3 aktivitesini %49 oranında azalttığı bulunmuştur. En etkili dozun ise 100  $\mu$ M olduğu belirlenmiştir (Chen, & diğ., 2015). Pogačnik ve arkadaşlarının yapmış oldukları *in vitro* bir çalışmada, EGCG'nin oksidasyona bağlı nöronal nekrotik benzeri hücre ölümünü ~%40 ve apoptozu ~%30 oranında azalttığı bulunmuştur. Böylece, primer kortikal nöronal hücrelerin EGCG'nin nörodejenerasyonu önlediği görülmüştür (Pogačnik, & diğ., 2016). Benzer bir etki de Ortiz-López ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada görülmüştür. Hipokampal nörodejenerasyonu olan Balb/C erkek farelere iki hafta süresince farklı konsantrasyonlarda (0.625 mg/kg-10 mg/kg) EGCG uygulaması sonrasında 2.5 mg/kg uygulanan EGCG'nin nöron hücrelerinde apoptozu azaltıp hücre sağkalımını önemli derece artırdığı tespit edilmiştir (Ortiz-López, & diğ., 2016).

Zhang ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında bizim çalışmamızda olduğu gibi 6-OHDA ile muamele edilen SH-SY5Y insan dopaminerjik hücrelerinde alfa-sinüklein düzeylerinin arttığını belirtmiştir. Alfa-sinüklein düzeylerindeki artışın yanı sıra 6-OHDA ile muamele edildikten sonra hücrelerin mitokondriyal membran geçirgenliklerinin değiştiği, Bax düzeylerinin arttığı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 salınımlarının indüklendiği belirlenmiştir. Bu göstergeler, hücrelerde apoptozun meydana geldiğini ve dopaminerjik nöronlarda kayıpların olduğunu göstermiştir (Zhang, & diğ., 2016). Literatürdeki çalışmaların bulguları bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda da 6-OHDA ile muamele sonrası alfa-sinüklein düzeyleri ve kaspaz-3 aktivasyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca diğer çalışmalarda olduğu gibi apoptotik etki, kaspaz-3 yoğunluğu ile belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre, SK-N-AS hücrelerinde kateşin veya EGCG uygulaması sonrası kontrol grubuna kıyasla kaspaz-3 yoğunluğunun sadece EGCG uygulanan SK-N-AS hücrelerinde azaldığı belirlenmiştir. Ek olarak, *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde hem kateşin uygulanan grupta hem de EGCG uygulanan grupta azaltılmış kaspaz-3 yoğunluğu bulunmuştur. EGCG'nin her iki hücrede de anti-apoptotik etki gösterdiği tespit edilirken, kateşinin bu etkiyi sadece *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde gösterdiği görülmüştür. Buna göre, sağlıklı nöron hücrelerinde EGCG'nin, Parkinson hastalığı olan hücrelerde ise kateşinin anti-apoptotik etkisinin daha kuvvetli olduğu sonucuna varılabilmektedir. Çalışmamızda, kateşinin Parkinson hastalığı olan hücrelerde inflamatuvar bir sitokin olan IL-1 $\beta$  ekspresyonunu azaltıcı etkisinin bulunması, Parkinson hastalığında yaygın olarak görülen inflamasyonun da baskılandığını düşündürmektedir. Nöron hücrelerinde inflamasyon artışına bağlı olarak apoptotik süreçler tetiklenebilmekte ve apoptoz gerçekleşebilmektedir. Kateşinin *in vitro* Parkinson modeli hücrelerinde inflamasyonu baskılayıp anti-inflamatuvar etki göstermesi, inflamasyona bağlı meydana gelen apoptozun da azalmasını sağlamış olabileceğini düşündürmüştür.

Nöroinflamasyon, Parkinson hastalığının patogeneğinde yer alan önemli bir faktördür (Velmurugan, & diğ., 2018; Bitu Pinto, & diğ., 2015). Mikroglia, nöroinflamasyon durumunda beyindeki ana savunma hücreleridir (Fischer & Maier, 2015). Bu hücreler, merkezi sinir sistemindeki eksojen ve endojen maddelerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Mikroglialar normal sağlıklı bir beyinde inaktif halde bulunmakta ve nöropatolojik koşullarda aktive olmaktadır. Aktive olmuş mikroglia; COX-2, iNOS, IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-2 ve IFN- $\gamma$  gibi beyinde nörotoksik

etki gösteren inflamatuvar belirteçleri sentezlemektedir (Kim, & diğ., 2010). Orta beyin, diğer beyin bölgelerine göre çok sayıda mikroglia içermektedir. Bu nedenle dopaminerjik nöronlar, Parkinson hastalığında ilerleyici nöron kaybına yol açan oksidatif strese karşı daha savunmasız olabilmektedir (Qian, & diğ., 2010). Parkinson hastalığında, mikroglia aktivasyonu ve pro-inflamatuvar sitokin agregasyonu nöroinflamasyonu artıran önemli faktörlerdir (Farkhondeh, & diğ., 2019; Nnah & Wessling-Resnick, 2018; Xu, & diğ., 2017). Oksidatif stres, sitotoksisite, mitokondri disfonksiyonu ve ROT üretimindeki artış nöronlardaki inflamatuvar yanıtı artırıp, TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını indüklemektedir. Bu durumda apoptozun başlamasına ve nöronal hasarın meydana gelmesine neden olmaktadır (Tseng, & diğ., 2020; Farkhondeh, & diğ., 2019; Bitu Pinto, & diğ., 2015). Mortalite sonrası yapılan çalışmalarda, mikroglia aktivasyonu ile TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin agregasyonundaki artışın, Parkinson hastalarının beyinlerinde nöroinflamasyonu uyardığı gösterilmiştir (Calabrese, & diğ., 2018; Pal, & diğ., 2016). Bu nedenle, mikrogliyal aktivasyonu kontrol edilerek oksidatif stres seviyesinin azaltılması, Parkinson hastalığında dopaminerjik nöron dejenerasyonunu önlemenin önemli ve temel bir yolu olabilmektedir.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar kateşinlerin ROT üretimini azaltıp, radikal süpürücü etki gösterdiğini bildirmektedir. Kateşinler, moleküler yapılarında bulunan hidroksil ve galloil gruplarıyla metal iyonlarının da şelatlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca kateşinler; TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 ve iNOS gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltabilmekte, NF- $\kappa$ B ve COX-2 gibi inflamatuvar yolakları baskılayarak da anti-inflamatuvar etki gösterebilmektedir. İnflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak ve inflamatuvar yolakları baskılayarak oksidatif stresi azaltma gibi özellikle de bulunmaktadır. Bu etkilerinden dolayı, inflamasyona bağlı nörodejenerasyon ve nöroinflamasyona karşı koruyucu etkileri vardır. Diğer kateşinlere göre EGCG, moleküler yapısında daha fazla hidroksil ve galloil grubu içermektedir. Bu özelliği sayesinde, EGCG'nin anti-inflamatuvar aktivitesinin diğer kateşinlere göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Xu, & diğ., 2021; Khalatbary & Khademi, 2020; Farkhondeh, & diğ., 2019; Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018; Mandel, & diğ., 2008). EGCG; TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılamasının yanı sıra ERK ve NF- $\kappa$ B gibi yolakları inhibe ederek alfa-sekretaz ve beta-sekretaz düzeylerini de azaltmaktadır (Velmurugan, & diğ.,

2018). Serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması ve demir gibi iyonların şelatlanması da ayrı göstermiş olduğu diğer etkilerdir. Böylece nöronal hücre ölümünü önleyici potansiyel etki gösterebilmektedir (Xu, & diğ., 2017; Velmurugan, & diğ., 2018).

Wei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, EGCG'nin nöro-2a nöron hücrelerinde beta-amiloid kaynaklı artan TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  ve iNOS salınımını azalttığı, mikroglia kaynaklı nöroinflamasyon ve sitotoksiteyi baskıladığı bildirilmiştir (Wei, & diğ., 2016). *In vivo* Parkinson modelinde yapılan bir çalışmada, 30 mg/kg, 100 mg/kg ve 300 mg/kg EGCG uygulanmıştır. EGCG'nin 100 mg/kg uygulaması sonrası mitokondriyal disfonksiyonda önemli ölçüde azalmanın olduğu saptanmıştır. 100 mg/kg ve 300 mg/kg EGCG uygulaması sonrasında ise TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve kaspaz-3 seviyelerinde belirgin bir azalma olduğu bulunmuştur. Nöroinflamatuvar ve apoptotik belirteç seviyelerindeki azalma; EGCG'nin antioksidan, anti-apoptotik, mitokondriyal disfonksiyon inhibitörü ve anti-nöroinflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Tseng, & diğ., 2020).

Zhao ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, EGCG uygulamasının alfa-sinüklein fibrasyonunu ve aşırı ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Böylece, PC12 hücrelerinin alfa-sinüklein ile ilişkili hasara karşı korunabildiği gösterilmiştir (Zhao, & diğ., 2017a). Ayrıca, Zhao ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada, EGCG uygulamasının Wistar ratlarında PKC- $\alpha$  ile ERK1/2 fosforilasyonunu ve ekspresyonunu baskıladığı tespit edilmiştir (Zhao, & diğ., 2017b). Parkinson hastalığı oluşturulmuş ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise, 2 hafta süresince standart yeşil çay özütü (25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg), epikateşin (10 mg/kg) ve EGCG (10 mg/kg) uygulanmış ve bunların nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Kateşinlerin güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvar etkiler göstererek Parkinson hastalığının tedavisinde ve önlenmesinde olumlu etkilerinin olduğu bulunmuştur (Bitu Pinto, & diğ., 2015). Çalışmamızın sonuçlarına göre, kateşin ve EGCG uygulamasının TNF- $\alpha$  immünoreaktivitesi üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak EGCG uygulaması sonrası sağlıklı nöron hücrelerinde IL-1 $\beta$  yoğunluğunun Parkinson modeli hücrelerine göre anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilirken, kateşin uygulanan grupta anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. EGCG'nin sağlıklı nöron hücrelerinde inflamatuvar bir sitokin olan IL-1 $\beta$  ekspresyonunu azaltmadaki etkisi, sağlıklı nöron hücrelerinde oluşabilecek nöroinflamasyona karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. *In vitro* Parkinson

modeli hücrelerinde ise kateşin uygulamasının IL-1 $\beta$  ekspresyonunu EGCG uygulamasına göre anlamlı derecede daha çok azaltması, Parkinson hastalığında görülen inflamasyona karşı kateşinin daha etkili olabileceğini göstermektedir. Kateşinin bu etkisi, yapısında bulunan B- halkasındaki katekol ve C- halkasındaki C<sub>3</sub> pozisyonundaki OH grubundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.



## BÖLÜM VI

### Sonuç ve Öneriler

Bu bölümde araştırmanın amaç ve alt amaçları doğrultusunda ulaşılan sonuçlara ve bu sonuçlardan yola çıkarak geliştirilen önerilere yer verilmiştir.

#### Sonuç

Kateşin ve epigallokateşin gallatın hücre canlılığı, anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkileri, farklı konsantrasyonlar kullanılarak hem SK-N-AS hücreleri hem de *in vitro* Parkinson model hücrelerinde araştırılmıştır. SK-N-AS hücrelerinin 6-OHDA ile muamele edilmesi sonrası dopamin düzeylerinde azalma ve alfa-sinüklein düzeylerinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir. 24 saat süresince 50  $\mu$ M 6-OHDA uygulamasının *in vitro* Parkinson model oluşumunu sağladığı sonucuna varılmıştır.

İlginç bir şekilde, hem kateşin hem de epigallokateşin gallat, *in vitro* Parkinson model hücrelerinde hücre canlılığını artırmıştır. Her iki biyoaktif bileşenin de uygulanmasından sonra, *in vitro* Parkinson model hücreleri üzerinde potansiyel koruyucu etkilerinin olabileceği varsayılmıştır.

Epigallokateşin gallat, hem sağlıklı nöron hücrelerinde hem de *in vitro* Parkinson model hücrelerinde apoptoz ile ilişkili olan kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Kateşinin ise sadece *in vitro* Parkinson model hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. *In vitro* Parkinson model hücrelerinde, epigallokateşin gallatın anti-apoptotik etkisinin kateşinden daha düşük olduğu vurgulanabilir. *In vitro* Parkinson modelinde kateşinlerin daha etkili olduğu, sağlıklı nöron hücrelerinde ise epigallokateşin gallatın daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Her iki biyoaktif bileşeninde inflamasyonla ilişkili olan TNF- $\alpha$  ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisi bulunamamıştır. Epigallokateşin gallatın sağlıklı nöron hücrelerinde IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesini azalttığı, kateşinin ise *in vitro* Parkinson model hücrelerinde IL-1 $\beta$  immünoreaktivitesini azalttığı görülmüştür. Her iki biyoaktif bileşenin de anti-inflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur.

## Öneriler

Yapılan tez çalışmasının sonuçları doğrultusunda;

- Kateşin ve epigallokateşin gallatın Parkinson hastalığında anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve nöroprotektif etkilerini araştırarak *in vivo* çalışmaların yapılması
- Kateşin ve epigallokateşin gallatın Parkinson hastalığında anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve nöroprotektif etkilerini araştırarak klinik çalışmaların yapılması
- Kateşin ve epigallokateşin gallatın farklı doz ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak MTT ve immünotokimyasal analizlerinin yapılması
- Kateşin ve epigallokateşin gallatın Alzheimer hastalığı gibi farklı nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve nöroprotektif etkilerinin incelenmesi
- Parkinson hastalığında ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda kateşin ve epigallokateşin gallatın anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkileri ile ilgili sinyal yollarını belirlenmesi
- Kateşin ve epigallokateşin gallatan zengin olan yeşil çay gibi besinlerin, tıbbi beslenme tedavisindeki etkileri inceleyecek kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılması
- Kateşin ve epigallokateşin gallatan zengin olan besinlerin tüketim sıklıkları ve miktarlarına göre Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki terapötik etkilerinin araştırılması elde edilen verileri desteklenmesi ve geliştirilmesi için önerilmektedir.

### Kaynakça

- Aarsland, D., Batzu, L., Halliday, G., M., Geurtsen, G., J., Ballard, C., Ray Chaudhuri, K., & Weintraub, D. (2021). Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 1-21.  
<https://doi.org/10.1038/s41572-021-00280-3>
- Agim, Z., S., & Cannon, J., R. (2015). Dietary factors in the etiology of Parkinson's disease. *BioMed Research International*, 2015, 1-16.  
<https://doi.org/10.1155/2015/672838>
- Airoldi, C., La Ferla, B., D'Orazio, G., Ciaramelli, C., & Palmioli, A. (2018). Flavonoids in the treatment of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 25(27), 3228-3246.  
<https://doi.org/10.2174/0929867325666180209132125>
- Akbayır, E., Şen, M., Ay, U., Şenyar, S., Tüzün, E., & Küçükali, C., İ. (2017). Parkinson hastalığının etyopatogenezi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 1-23.  
<https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/371202>
- Al-Amri, J., S., Hagraş, M., M., & Mujallid, M., I. (2013). Effect of epigallocatechin-3-gallate on inflammatory mediators release in LPS-induced Parkinson's disease in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(5), 357-362.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23821823/>
- Alvarez-Fischer, D., Henze, C., Strenzke, C., Westrich, J., Ferger, B., Höglinger, G., U., Oertel, W., H., & Hartmann, A. (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and  $\alpha$ -synuclein-deleted mice. *Experimental Neurology*, 210(1), 182-193.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.012>
- Angelova, P., R., Horrocks, M., H., Klenerman, D., Gandhi, S., Abramov, A., Y., & Shchepinov, M., S. (2015). Lipid peroxidation is essential for alpha-synuclein-induced cell death. *Journal of Neurochemistry*, 133(4), 582-589.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13024>
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M., A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, 15(12), 1257-1272.

[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)

Avramovichtirosh, Y., Reznichenko, L., Mit, T., Zheng, H., Fridkin, M., Weinreb, O., Mandel, S., & Youdim, M., B., H. (2007). Neurorescue activity, APP regulation and amyloid-beta peptide reduction by novel multi-functional brain permeable iron- chelating- antioxidants, m-30 and green tea polyphenol, EGCG. *Current Alzheimer Research*, 4(4), 403-411.

<https://doi.org/10.2174/156720507781788927>

Baldi, A., Abramovič, H., Poklar Ulrih, N., & Daglia, M. (2019). Tea catechins. *Handbook of Dietary Phytochemicals*, 1-46.

[https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-981-13-1745-3\\_19-1](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-981-13-1745-3_19-1)

Balestrino, R., & Schapira, A., H., V. (2020). Parkinson disease. *European journal of neurology*, 27(1), 27-42.

<https://doi.org/10.1111/ene.14108>

Barnham, K., J., & Bush, A., I. (2014). Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chemical Society Reviews*, 43(19), 6727-6749.

<https://doi.org/10.1039/C4CS00138A>

Barranco Quintana, J., L., Allam, M., F., Del Castillo, A., S., & Navajas, R., F. (2009). Parkinson's disease and tea: A quantitative review. *Journal of American College of Nutrition*, 28(1), 1-6.

<https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719754>

Bazinet, R., P., & Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12), 771-785.

<https://www.nature.com/articles/nrn3820>

Bellik, Y., Boukraâ, L., Alzahrani, H., A., Bakhotmah, B., A., Abdellah, F., Hammoudi, S., M., & Iguer-Ouada, M. (2013). Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules*, 18(1), 322-353.

<https://doi.org/10.3390/molecules18010322>

Berg, D. (2006). In vivo detection of iron and neuromelanin by transcranial sonography - A new approach for early detection of substantia nigra damage. *Journal of Neural Transmission*, 113(6), 775-780.

<https://doi.org/10.1007/s00702-005-0447-5>

- Bernatoniene, J., & Kopustinskiene, D. (2018). The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules*, *23*(4), 965-975.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23040965>
- Bitu Pinto, N., da Silva Alexandre, B., Neves, K., R., T., Silva, A., H., Leal, L., K., A., & Viana, G., S. (2015). Neuroprotective properties of the standardized extract from *Camellia sinensis* (green tea) and its main bioactive components, epicatechin and epigallocatechin gallate, in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 1-12.  
<https://doi.org/10.1155/2015/161092>
- Bossy-Wetzell, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S., A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, *10*(7), 2-9.  
<https://www.nature.com/articles/nm1067>
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *211*, 51-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Braicu, C., Pilecki, V., Balacescu, O., Irimie, A., & Berindan Neagoe, I. (2011). The relationships between biological activities and structure of flavan-3-ols. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(12), 9342-9353.  
<https://doi.org/10.3390/ijms12129342>
- Cai, Z., Y., Li, X., M., Liang, J., P., Xiang, L., P., Wang, K., R., Shi, Y., L., Ynag, R., Shi, M., Ye, J., H., Lu, J., L., Zheng, X. Q., & Liang, Y., R. (2018). Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules*, *23*(9), 2346-2363.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23092346>
- Calabrese, V., Santoro, A., Monti, D., Crupi, R., Di Paola, R., Latteri, S., Cuzzocrea, S., Zappia, M., Giordano, J., Calabrese, E., J., & Franceschi, C. (2018). Aging and Parkinson's disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, *115*, 80-91.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.379>
- Carli, M., Vaglini, F., Risaliti, E., Citi, G., Masini, M., Kolachalam, S., Maggio, R., Umberto Corsini, G., Novelli, M., De Tatai V., & Scarselli, M. (2021).  $\beta$ -Cells Different Vulnerability to the Parkinsonian Neurotoxins Rotenone, 1-

Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) and 6-Hydroxydopamine (6-OHDA). *Pharmaceuticals*, 14(8), 767-780.

<https://doi.org/10.3390/ph14080767>

Chao, J., Lau, W., K., W., Huie, M., J., Ho, Y., S., Yu, M., S., Lai, C., S., W., Wang, M., Yuen, W., H., Lam, W., H., Chan, T., H., & Chang, R., C., C. (2010). A pro-drug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) prevents differentiated SH-SY5Y cells from toxicity induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience Letters*, 469(3), 360-364.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.028>

Chen, D., Kanthasamy, A., G., & Reddy, M., B. (2015). EGCG protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in a cell culture model. *Parkinson's Disease*, 2015, 1-11.

<https://doi.org/10.1155/2015/843906>

Chen, Y., Huang, L., Zhang, H., Sun, H., & Zhou, W. (2016). EGCG protective mitochondrial dysfunction after subarachnoid haemorrhage via inhibition p38  $\alpha$  pathway. *Journal of Functional Foods*, 23, 115-123.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.035>

Chou, A., P., Li, S., Fitzmaurice, A., G., & Bronstein, J., M. (2010) Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. *Neurotoxicology*, 31(4), 367- 372.

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.04.006>

Chu, K., O., & Pang, C., C. (2018). Pharmacokinetics and disposition of green tea catechins. *Pharmacokinetics and Adverse Effects of Drugs: Mechanisms and Risks Factors*, 17.

[https://books.google.com.cy/books?hl=tr&lr=&id=e2iQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA17&dq=Pharmacokinetics+and+disposition+of+green+tea+catechins&ots=79ki0BpwFT&sig=qFznnJB-9E3pCXgGahATHvdRXPk&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Pharmacokinetics%20and%20disposition%20of%20green%20tea%20catechins&f=false](https://books.google.com.cy/books?hl=tr&lr=&id=e2iQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA17&dq=Pharmacokinetics+and+disposition+of+green+tea+catechins&ots=79ki0BpwFT&sig=qFznnJB-9E3pCXgGahATHvdRXPk&redir_esc=y#v=onepage&q=Pharmacokinetics%20and%20disposition%20of%20green%20tea%20catechins&f=false)

Coetzee, S., G., Pierce, S., Brundin, P., Brundin, L., Hazelett, D., J., & Coetzee, G., A. (2016). Enrichment of risk SNPs in regulatory regions implicate diverse tissues in Parkinson's disease etiology. *Scientific reports*, 6, 30509.

<https://doi.org/10.1038/srep30509>

Devika, P., T., & Prince, P., S., M. (2008). Protective effect of (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG) on lipid peroxide metabolism in isoproterenol induced

- myocardial infarction in male Wistar rats: A histopathological study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(10), 701-708.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.011>
- Dobrzynska, I., Sniecinska, A., Skrzydlewska, E., & Figaszewski, Z. (2004). Green tea modulation of the biochemical and electric properties of rat liver cells that were affected by ethanol and aging. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9(4A), 709-721.  
<https://europepmc.org/article/med/15647793>
- Dorsey, E., R., Elbaz, A., Nichols, E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J., C., Ansha, M., G., Brayne, C., Choi, J., Y., J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H., P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S., M., Foreman, K., J., Gankpe, F., G., Gupta, R., ... Murray, C., J. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 17(11), 939-953.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Erekat, N., S. (2021). Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clinical Anatomy*. 1-14.  
<https://doi.org/10.1002/ca.23792>
- Farkhondeh, T., Yazdi, H., S., & Samarghandian, S. (2019). The protective effects of green tea catechins in the management of neurodegenerative diseases: a review. *Current Drug Discovery Technologies*, 16(1), 57-65.  
<https://doi.org/10.2174/1570163815666180219115453>
- Fischer, R., & Maier, O. (2015). Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: Role of TNF. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 2015, 610813.  
<https://doi.org/10.1155/2015/610813>
- Gadkari, P., V., & Balaraman, M. (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 93, 122-138.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004>
- Galindo, M., F., Saez-Atienzar, S., Solesio, M., E., & Jordan, J. (2014). 6-hydroxydopamine as preclinical model of parkinson's disease. In: Kostrzewa RM, editor. *In Handbook of Neurotoxicity* (pp. 639-651). Springer New York.

<https://www.researchwithrutgers.com/en/publications/6-hydroxydopamine-as-preclinical-model-of-parkinsons-disease>

- Galluzzi, L., Blomgren, K., & Kroemer, G. (2009). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(7), 481-494.  
<https://www.nature.com/articles/nrn2665>
- Gao, X., Cassidy, A., Schwarzschild, M., A., Rimm, E., B., & Ascherio, A. (2012). Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*, *78*(15), 1138-1145.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824f7fc4>
- Guo, S., Bezard, E., & Zhao, B. (2005). Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS–NO pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, *39*(5), 682-695.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.022>
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T., Y., Xu, H., & Zhao, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, *15*(1), 1-37.  
<https://doi.org/10.1186/s13024-020-00391-7>
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals-New York Academy of Sciences*, *991*, 1-14.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x>
- He, M., Zhao, L., Wei, M., J., Yao, W., F., Zhao, H., S., & Chen, F., J. (2009). Neuroprotective effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate on aging mice induced by D-galactose. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *32*(1), 55-60.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.32.55>
- He, Q., Bao, L., Zimering, J., Zan, K., Zhang, Z., Shi, H., Zu, J., Yang, X., Hua, F., Ye, X., & Cui, G. (2015). The protective role of (–)-epigallocatechin-3-gallate in thrombin-induced neuronal cell apoptosis and JNK-MAPK activation. *Neuroreport*, *26*(7), 416.  
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000363>
- He, X. J., & Nakayama, H. (2009). Neurogenesis in Neurotoxin-induced Animal Models for Parkinson's Disease-A Review of the Current Status. *Journal of Toxicologic Pathology*, *22*(2), 101-108.



<https://doi.org/10.1293/tox.22.101>

- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L., M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología (English Edition)*, 32(8), 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.06.019>
- Hodgson, A., B., Randell, R., K., & Jeukendrup, A., E. (2013). The effect of green tea extract on fat oxidation at rest and during exercise: evidence of efficacy and proposed mechanisms. *Advances in Nutrition*, 4(2), 129-140. <https://doi.org/10.3945/an.112.003269>
- Hosseini Tabatabaei, N., Babakhani, B., Hosseini-Tabatabaei, A., Vahabi, Z., & Soltanzadeh, A. (2013). Non-genetic factors associated with the risk of Parkinson's disease in Iranian patients. *Functional Neurology*, 28(2), 107-113. <https://doi.org/10.11138/FNeur/2013.28.2.107>
- Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease. *Molecules*, 24(3), 528-532. <https://doi.org/10.3390/molecules24030528>
- Jiang, H., Wang, J., Rogers, J., & Xie, J., X. (2017). Brain iron metabolism dysfunction in Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, 54(4), 3078-3101. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9879-1>
- Jin, C., F., Shen, S., R., & Zhao, B., L. (2001). Different effects of five catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 6033-6038. <https://doi.org/10.1021/jf010903r>
- Jordan, J., WJ de Groot, P., & F Galindo, M. (2011). Mitochondria: the headquarters in ischemia-induced neuronal death. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 11(2), 98-106. <https://doi.org/10.2174/187152411796011358>
- Junior, H., N., Cunha, G., M., A., Maia, F., D., Oliveira, R., A., Moraes, M., O., & Rao, V., S., N. (2003). Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(2), 175-180. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00198-4)

- Kandinov, B., Giladi, N., & Korczyn, A., D. (2009). Smoking and tea consumption delay onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *15*(1), 41-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.02.011>
- Khalatbary, A., R., & Khademi, E. (2020). The green tea polyphenolic catechin epigallocatechin gallate and neuroprotection. *Nutritional Neuroscience*, *23*(4), 281-294.  
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1500124>
- Kim, S., R., Chung, E., S., Bok, E., Baik, H., H., Chung, Y., C., Won, S., Y., Joe, E., Kim, T., H., Kim, S., S., Jin, M., Y., Choi, S., H., & Jin, B., K. (2010). Prothrombin kringle-2 induces death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro via microglial activation. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(7), 1537-1548.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.22318>
- Lama, A., Pirozzi, C., Avagliano, C., Annunziata, C., Mollica, M., P., Calignano, A., Meli, R., & Raso, G., M. (2020). Nutraceuticals: An integrative approach to starve Parkinson's disease. *Brain, Behavior, & Immunity-Health*, *2*, 100037.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100037>
- Lin, L., C., Wang, M., N., Tseng, T., Y., Sung, J., S., & Tsai, T., H. (2007). Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(4), 1517-1524.  
<https://doi.org/10.1021/jf062816a>
- Malar, D., S., Prasanth, M., I., Brimson, J., M., Sharika, R., Sivamaruthi, B., S., Chaiyasut, C., & Tencomnao, T. (2020). Neuroprotective properties of green tea (*Camellia sinensis*) in Parkinson's disease: a review. *Molecules*, *25*(17), 3926-3947.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25173926>
- Mandel, S., A., Amit, T., Kalfon, L., Reznichenko, L., & Youdim, M., B. (2008). Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins. *The Journal of Nutrition*, *138*(8), 1578S-1583S.  
<https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1578S>
- Nan, W., Zhonghang, X., Keyan, C., Tongtong, L., Wanshu, G., & Zhongxin, X. (2018). Epigallocatechin-3-gallate reduces neuronal apoptosis in rats after

- middle cerebral artery occlusion injury via pi3k/akt/enos signaling pathway. *BioMed Research International*, 2018, 1-10.  
<https://doi.org/10.1155/2018/6473580>
- Nnah, I., C., & Wessling-Resnick, M. (2018). Brain iron homeostasis: a focus on microglial iron. *Pharmaceuticals*, 11(4), 129-142.  
<https://doi.org/10.3390/ph11040129>
- Ortiz-López, L., Márquez-Valadez, B., Gómez-Sánchez, A., Silva-Lucero, M., D., C., Torres-Pérez, M., Téllez-Ballesteros, R., I., Ichwan, M., Meraz-Ríos, M., A., Kempermann, G., & Ramírez-Rodríguez, G. B. (2016). Green tea compound epigallo-catechin-3-gallate (EGCG) increases neuronal survival in adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Neuroscience*, 322, 208-220.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.040>
- Ostrowska, J., Łuczaj, W., Kasacka, I., Rózański, A., & Skrzydlewska, E. (2004). Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol*, 32(1), 25-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2003.11.001>
- Pal, R., Tiwari, P., C., Nath, R., & Pant, K., K. (2016). Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurological Research*, 38(12), 1111-1122.  
<https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1249997>
- Pervin, M., Unno, K., Ohishi, T., Tanabe, H., Miyoshi, N., & Nakamura, Y. (2018). Beneficial effects of green tea catechins on neurodegenerative diseases. *Molecules*, 23(6), 1297-1320.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23061297>
- Pogačnik, L., Pirc, K., Palmela, I., Skrt, M., Kim, K., S., Brites, D., Brito, M., A., Ulrih, N., P., & Silva, R., F. M. (2016). Potential for brain accessibility and analysis of stability of selected flavonoids in relation to neuroprotection in vitro. *Brain Research*, 1651, 17-26.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.020>
- Qian, L., Flood, P., M., & Hong, J., S. (2010). Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 971-979.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-010-0428-1>

- Rocca, W., A. (2018). The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *The Lancet Neurology*, *17*(11), 928-929.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30355-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30355-7)
- Rogers, J., T., Randall, J., D., Cahill, C., M., Eder, P., S., Huang, X., Gunshin, H., Leiter, L., McPhee, J., Sarang, S., S., Utsuki, T., Greig, N., H., Lahiri, D., K., Tanzi, R., E., Bush, A., I., Giordano, T., & Gullans, S., R. (2002). An iron-responsive element type II in the 50-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 45518-45528.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207435200>
- Selvaraj S, & Piramanayagam S. (2018). A review on factors causing Parkinson's syndrome. *MOJ Proteomics Bioinform*, *7*(4), 257-261.  
<https://doi.org/10.15406/mojpb.2018.07.00243>
- Siddique, Y., H., Jyoti, S., & Naz, F. (2014). Effect of epicatechin gallate dietary supplementation on transgenic Drosophila model of Parkinson's disease. *Journal of Dietary Supplements*, *11*(2), 121-130.  
<https://doi.org/10.3109/19390211.2013.859207>
- Simon, D., K., Tanner, C., M., & Brundin, P. (2020). Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, *36*(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Singh, A., Tripathi, P., Yadawa, A., K., & Singh., S. (2020). Promising polyphenols in Parkinson's disease therapeutics. *Neurochemical Research*, *45*, 1731-1745.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03058-3>
- Singh, N., A., Mandal, A., K., A., & Khan, Z., A. (2015). Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutrition Journal*, *15*(1), 1-17.  
<https://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12937-016-0179-4>
- Srividhya, R., Jyothilakshmi, V., Arulmathi, K., Senthilkumaran, V., & Kalaiselvi, P. (2008). Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *26*(2), 217-223.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.12.003>

- Sutherland, B., A., Rahman, R., M., Appleton, I. (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(5), 291-306.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.10.005>
- Teng, Y., Zhao, J., Ding, L., Ding, Y., & Zhou, P. (2019). Complex of EGCG with Cu (II) suppresses amyloid aggregation and Cu (II)-induced cytotoxicity of  $\alpha$ -synuclein. *Molecules*, 24(16), 2940-2957.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24162940>
- Tseng, H., C., Wang, M., H., Chang, K., C., Soung, H., S., Fang, C., H., Lin, Y., W., Li, K., Y., Yang, C., C., & Tsai, C., C. (2020). Protective Effect of (-) Epigallocatechin-3-gallate on Rotenone-Induced Parkinsonism-like Symptoms in Rats. *Neurotoxicity Research*, 37(3), 669-682.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12640-019-00143-6>
- Velmurugan, B., K., Rathinasamy, B., Lohanathan, B., P., Thiagarajan, V., & Weng, C., F. (2018). Neuroprotective role of phytochemicals. *Molecules*, 23(10), 2485-2499.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23102485>
- Wang, L., Xu, S., Xu, X., & Chan, P. (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced cell death through STAT3 activation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(2), 295-304.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1048>
- Wang, P., & Wang, Z., Y. (2017). Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 35, 265-290.  
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.003>
- Wei, J., C., C., Huang, H., C., Chen, W., J., Huang, C., N., Peng, C., H., & Lin, C., L. (2016). Epigallocatechin gallate attenuates amyloid  $\beta$ -induced inflammation and neurotoxicity in EOC 13.31 microglia. *European Journal of Pharmacology*, 770, 16-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.048>
- Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., & Youdim, M., B., H. (2009). Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: A reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes & Nutrition*, 4(4), 283-296.  
<https://doi.org/10.1007/s12263-009-0143-4>

- Williamson, G., Dionisi, F., & Renouf, M. (2011). Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(6), 864-873.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201000631>
- Xu, Q., Langley, M., Kanthasamy, A., G., & Reddy, M., B. (2017). Epigallocatechin gallate has a neurorescue effect in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Nutrition*, *147*(10), 1926-1931.  
<https://doi.org/10.3945/jn.117.255034>
- Xu, Y., Q., Gao, Y., & Granato, D. (2021). Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. *Food Chemistry*, *339*, 128060-128070.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128060>
- Xu, Y., Zhang, Y., Quan, Z., Wong, W., Guo, J., Zhang, R., Yang, Q., Dai, R., McGeer, P., L., & Qing, H. (2016). Epigallocatechin gallate (EGCG) inhibits alpha-synuclein aggregation: A potential agent for Parkinson's disease. *Neurochemical Research*, *41*(10), 2788-2796.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-016-1995-9>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N., A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, *111*(10), 5944-5972.  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr200084z>
- Young, Park., S., Jeong, Y., J., Kim, S., H., Jung, J., Y., & Kim, W., J. (2013). Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells. *The Journal of Toxicological Sciences*, *38*(3), 371-378.  
<https://doi.org/10.2131/jts.38.371>
- Zhang, Z., Hou, L., Li, X., Ju, C., Zhang, J., Li, X., Wang, X., Liu, C., Lv, Y., & Wang, Y. (2016). Neuroprotection of inositol hexaphosphate and changes of mitochondrion mediated apoptotic pathway and  $\alpha$ -synuclein aggregation in 6-OHDA induced parkinson' s disease cell model. *Brain Research*, *1633*, 87-95.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.035>
- Zhang, Z., X., Li, Y., B., & Zhao, R., P. (2017). Epigallocatechin gallate attenuates  $\beta$ -amyloid generation and oxidative stress involvement of PPAR in

N2a/APP695 cells. *Neurochemical Research*, 42, 468-480.

<https://doi.org/10.1007/s11064-016-2093-8>

Zhao, J., Liang, Q., Sun, Q., Chen, C., Xu, L., Ding, Y., & Zhou, P. (2017b). (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits fibrillation, disaggregates amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein, and protects PC12 cells against  $\alpha$ -synuclein-induced toxicity. *Rsc Advances*, 7(52), 32508-32517.

<https://doi.org/10.1039/C7RA03752J>

Zhao, X., Liu, F., Jin, H., Li, R., Wang, Y., Zhang, W., Wang, H., & Chen, W. (2017a). Involvement of PKC $\alpha$  and ERK1/2 signaling pathways in EGCG's protection against stress-induced neural injuries in Wistar rats. *Neuroscience*, 346, 226-237.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.025>

Zhu, N., Huang, T., C., Yu, Y., LaVoie, E., J., Yang, C., S., & Ho, C., T. (2000). Identification of oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 979-981.

<https://doi.org/10.1021/jf991188c>

**EKLER****Ek 1.****Makale****Neurological Research - Makale****Neuroprotective effects of catechins in an experimental Parkinson's disease model and SK-N-AS cells: Evaluation of cell viability, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects**

Gülşen Özduran<sup>a</sup>, Eda Becer<sup>b,c</sup>, Hafize Seda Vatansever<sup>c,d</sup>, Sevinç Yücecan<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Near East University, Nicosia, Cyprus

<sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Near East University, Nicosia, Cyprus

<sup>c</sup>DESAM Institute, Near East University, Nicosia, Cyprus

<sup>d</sup>Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

<sup>e</sup>Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Lokman Hekim University, Ankara, Turkey

\*Corresponding author: Gülşen Özduran

e-mail: glsn\_ozdrn@hotmail.com

**ABSTRACT**

**Objectives:** The aim of the study was to establish an *in vitro* Parkinson's disease (PD) model and to investigate the cell viability, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neuroprotective effects of catechin and EGCG in SK-N-AS and *in vitro* PD model cells.

**Method:** SK-N-AS human neuroblastoma cells were used. To develop an *in vitro* PD model, SK-N-AS cells were exposed to 6-hydroxydopamine. Model control was performed after ELISA analysis of dopamine and  $\alpha$ -synuclein levels in the culture



medium. Catechin and EGCG were administered to SK-N-AS and *in vitro* PD model cells. Cell viability was measured using MTT assay and trypan blue staining. Anti-inflammatory and anti-apoptotic activities of catechin and EGCG were investigated by indirect immunocytochemistry using anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  and anti-caspase-3 antibodies.

**Results:** After 24 hours of 6-hydroxydopamine administration at 50  $\mu$ M, higher  $\alpha$ -synuclein and lower dopamine levels were found in PD model than SK-N-AS cells. Cell viability was similar between SK-N-AS and *in vitro* PD model cells. Treatment with both bioactive components increased cell viability of *in vitro* PD model cells. Caspase-3 immunoreactivity was significantly reduced in SK-N-AS and PD model cells after EGCG administration, while it was decreased only in PD model cells after catechin administration. IL-1 $\beta$  staining intensity weakened after catechin administration in PD model cells, after EGCG administration in SK-N-AS cells. TNF- $\alpha$  staining intensity was similar in both cells.

**Conclusion:** Catechin and EGCG increased cell viability in PD model neuron cells. Both components showed anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. Catechin may be more effective in preventing damage to neurons PD.

**KEYWORDS:** SK-N-AS cells; *in vitro* Parkinson's disease model; 6-hydroxydopamine; epigallocatechin gallate; catechin

## Introduction

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease (PD) are neurological disorders that are more common in the elderly population and the prevalence of both conditions has risen dramatically in the 21<sup>st</sup> century [1]. Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease with projected prevalence figures of approximately 12 million people by 2050 [2,3]. The pathogenesis of PD is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) in the mesencephalon, and the accumulation of Lewy bodies containing insoluble and misfolded alpha-synuclein ( $\alpha$ -synuclein) aggregates. The onset of PD has been associated with decreased striatal dopamine levels and increased accumulation of  $\alpha$ -synuclein aggregates [2,4]. In PD, Lewy bodies induce various mechanisms such as production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide species, oxidative

stress, neuroinflammation, disruption of protein degradation pathways, mitochondrial dysfunction, apoptosis and neurodegeneration [5].

Neurotoxin compounds such as 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) are widely used to establish models of PD both *in vivo* and *in vitro*. 6-OHDA, also known as oxidopamine, is a toxic oxidative metabolite with a chemical structure similar to catecholamines (especially dopamine and norepinephrine) and can poorly cross the blood-brain barrier. 6-OHDA has a high affinity for dopaminergic neurons of SNpc. Thus, it induces oxidative stress, neuroinflammation, apoptosis and neurodegeneration processes in the nigrostriatal system and allows the development of PD models [6,7]. The mechanisms of action of 6-OHDA can be explained as follows: initially, intracellular and extracellular autoxidation of OHDA increases the production of ROS such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide radical ( $\bullet O_2^-$ ), and hydroxyl radical ( $\bullet OH^-$ ). Then, increased in ROS levels cause oxidative stress, lipid peroxidation, biomembrane and protein damage, and damage to ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. Mitochondria, which is responsible for cell viability, is also affected. When exposed to increased ROS levels and oxidative stress, deterioration of mitochondrial  $Ca^{2+}$  homeostasis, an increase in cytoplasmic-free calcium level, a reduction in mitochondrial respiratory-chain complex I and IV activity, increased permeability of mitochondrial membrane and mitochondrial dysfunction are observed. In that case, caspase 3-dependent apoptotic mechanisms are induced in neurons. Neuronal cell loss increases with the occurrence of apoptosis [6-8].

In the last decade, several bioactive compounds known as polyphenols found in foods have been reported to have neuroprotective effects [9]. Among polyphenols, catechins, which are flavan-3-ols, are compounds with a neuroprotective effect [10]. The main source of catechins is green tea. The primary catechins found in green tea are ( $\pm$ )-catechin (C), (-)-gallocatechin (GC), (-)-catechin gallate (CG), (-)-gallocatechin gallate (GCG), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) [11]. EGCG is the most abundant catechin in green tea. EGCG can cross the blood-brain barrier and affect nervous tissue at a very low concentration. Due to this feature, it has a neuroprotective effect against neurodegenerative diseases such as PD [9]. Catechins are one of the main antioxidants that protect the nervous system and neurons against free radicals. Catechins in green tea show antioxidant properties by chelating metal

ions, scavenging reactive oxygen derivatives and increasing the levels of antioxidant enzymes. In addition, they exert an anti-inflammatory effect by decreasing the levels of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and by suppressing signal pathways such as nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [5, 12-14]. Among the catechins, especially EGCG suppresses oxidative stress by increasing endogenous antioxidants and decreasing ROS levels. Thus, EGCG protects neuronal cells against mitochondrial dysfunction. In addition, EGCG shows an anti-apoptotic effect by suppressing apoptotic proteins such as Bad, Bax, caspase-3, caspase-6, caspase-1, TRAIL, gadd45, p21 and by inducing anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w. Also, it inhibits toxic effects and damage by preventing the accumulation of  $\alpha$ -synuclein aggregates and increases synaptic dopamine levels by suppressing the activity of catechol-O-methyltransferase enzyme [5,14,15]. Previous studies have reported that EGCG shows neuroprotective effects in Parkinson's disease due to its anti-inflammatory, anti-apoptotic, antioxidant, synuclein aggregation inhibitory properties [16-20].

This study aimed to develop an *in vitro* PD model and also examine the cell viability, anti-apoptotic, anti-inflammatory and neuroprotective effects of catechin and EGCG from green tea in SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells.

## **Materials and methods**

### **Materials and reagents**

6-Hydroxydopamine hydrochloride (2,4,5-Trihydroxyphenethylamine hydrochloride) (H4381;  $\geq 97\%$ ), catechin [(-)-*trans*-3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavane] (C0567;  $\geq 97\%$ , from green tea), epigallocatechin gallate [(-)-*cis*-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate] (E4268;  $\geq 80\%$ , from green tea), dimethyl sulfoxide (DMSO) (D8418), trypan blue solution (T8154), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (M2128; %98), paraformaldehyde (158127-25G; %95), methanol (34885,  $\geq 99.9\%$ ) and triton X-100 (T8532) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Catechin and EGCG were prepared in DMSO. DA (Dopamine) ELISA Kit (E-EL-0046) and Human SNC $\alpha$  (Synuclein Alpha) ELISA Kit (E-EL-H0983) were purchased from Elabscience company.

### ***Cell line and cell culture***

SK-N-AS human neuroblastoma cells (ATCC: CRL-2137) were grown in Dulbecco's modified Eagle Minimal essential medium (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-LPA) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI-11B), 1% L-glutamine (Capricorn Scientific, GLN-B) and 1% penicillin/streptomycin (Capricorn Scientific, PS-B). Cells were incubated in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air and a humidified atmosphere at 37°C. When the cultured cells had reached about 80% confluency, they were sub-cultured by passaging with 0.25% trypsin-EDTA solution (Capricorn Scientific, TRY-1B). Some of the cells were stored frozen at -80°C with a cell freezing medium containing 90% FBS and 10% DMSO (D8418, Sigma-Aldrich).

### ***In vitro PD modeling with 6-OHDA***

SK-N-AS cells at a density of  $5 \times 10^3$  per well were added to a 24-well plate and exposed to 25, 50 and 100  $\mu$ M concentrations of 6-OHDA (2 mg/ml) dissolved in 0.1% ascorbic acid solution in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 or 48 hours in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere at 37°C. The control group was not exposed to 6-OHDA. The levels of dopamine and  $\alpha$ -synuclein in the culture medium were measured using standard ELISA assay procedures. The absorbance was measured at 450 nm with a spectrophotometer (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA).

### ***Cell viability and growth assay***

Cell viability was determined by MTT assay and trypan blue staining. MTT assay was used to assess cellular metabolic activity as an indicator of cell viability and cytotoxicity. SK-N-AS cells at a density of  $5 \times 10^3$  per well were cultured into 96-well plates for 24 hours in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After half of the cells were transformed into *in vitro* PD model neuron cells by exposure to 6-OHDA toxicity, remaining cells were cultured with a culture medium for control. The negative control contained only a culture medium, while the positive control groups contained SK-N-AS cells or PD model neuron cells, depending on the study group. Catechin and EGCG were dissolved in DMSO and diluted with the culture medium to five different concentrations: 10, 50, 100, 150 and 200  $\mu$ M. The cells in both SK-N-AS and PD model groups (except positive and negative groups) were incubated with different concentrations of catechin or EGCG for 24 or 48 hours in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After

incubation, 10  $\mu$ L of MTT solution was added into each well and incubated for 4 hours in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Next, 50  $\mu$ l DMSO was added to dissolve formazan salts formed. The absorbance was measured at 540-630 nm with a spectrophotometer (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA). The trypan blue staining was performed after exposing SK-N-AS cells to 50  $\mu$ M 6-OHDA for 24 hours. Trypan blue staining was performed using the protocol described by Strober [21].

### ***Immunocytochemistry***

The distribution of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and caspase-3 in the cultured SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells was evaluated by indirect immunocytochemical analysis. The primary antibodies used were anti-TNF- $\alpha$  (sc-52746, Santa Cruz Biotechnology), anti-IL-1 $\beta$  (sc-7884, Santa Cruz Biotechnology) and anti-caspase-3 (sc-56053, Santa Cruz Biotechnology). Indirect immunocytochemical method was performed using the protocol described by Hoca et al. [22]. Staining intensity of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and caspase-3 was graded semi-quantitatively using the Histological-Score (H-SCORE). Calculations were made using the equation "H-SCORE =  $\Sigma \pi (i + 1)$ ". In this equation, "i" denotes the intensity of staining: 1, weak (+); 2, moderate (++) and 3, strong (+++). " $\pi$ " indicates the percentage of cells stained at each density and ranges between 0% and 100%.

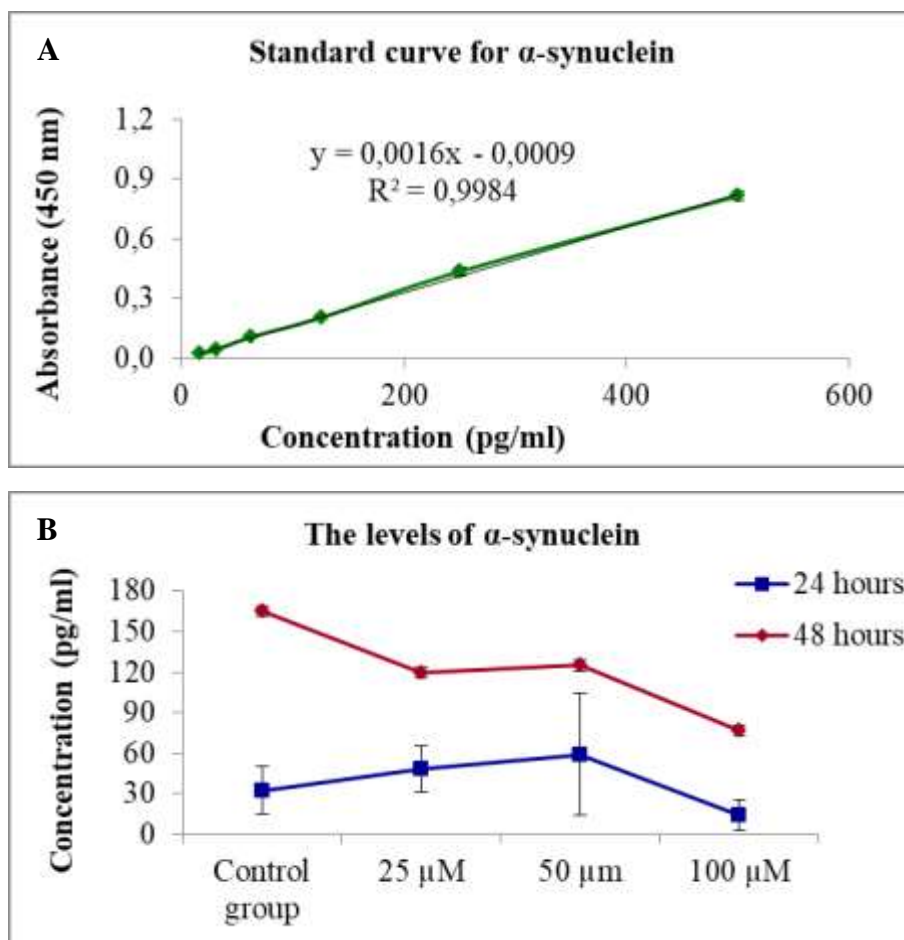
### ***Statistical analysis***

The study data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Two-Way ANOVA was used to determine the differences between the groups in statistical analyses of the values in the immunocytochemical evaluation. Tukey's and Sidak's multiple comparisons tests were used in post-hoc analyses. Kruskal wallis test and Three-Way ANOVA were used to determine the differences between the groups in statistical analyses of the values in the cell viability and growth assay evaluation and *in vitro* PD model assessments. Dunn's multiple comparisons test was used in post-hoc analyses. GraphPad Prism 9 software was used for statistical analysis of the data. Statistical significance level was accepted as  $p < 0.05$ .

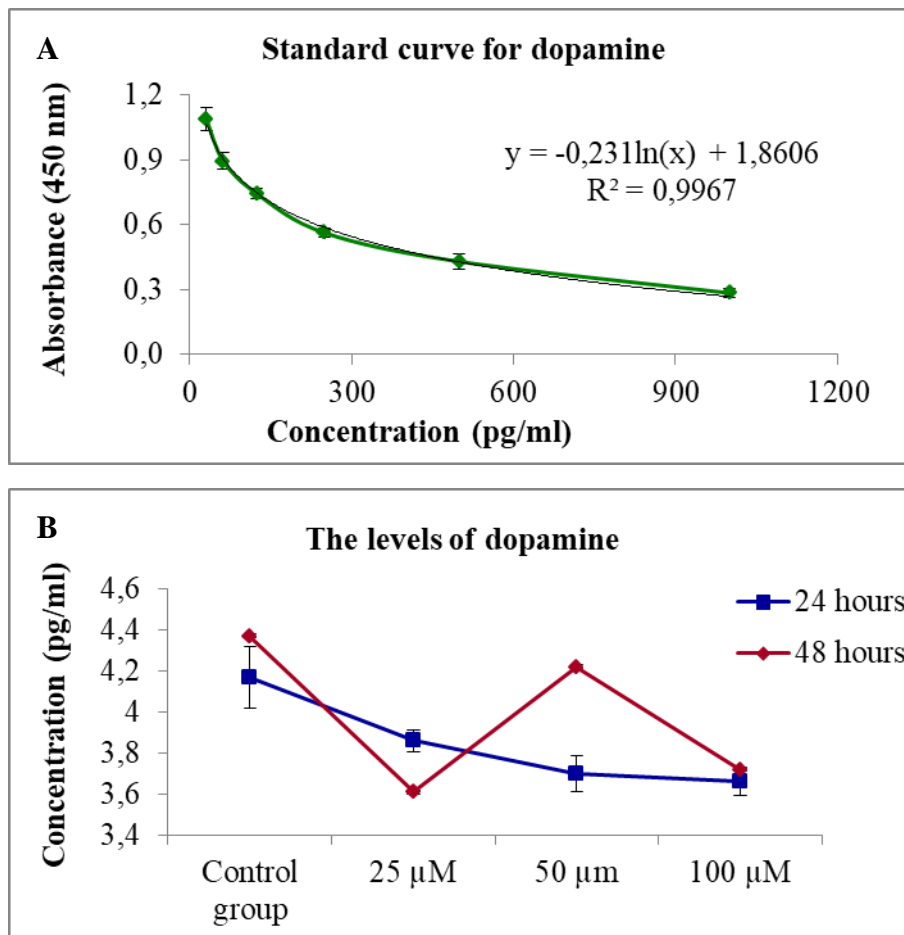
## Results

### *In vitro* PD model assessments

SK-N-AS cells were exposed to different 6-OHDA concentrations for 24 and 48 hours to assess neurotoxicity and to develop an *in vitro* PD model. Standard curve graphs and equations for  $\alpha$ -synuclein and dopamine are shown in Figures 1A and 2A. Higher  $\alpha$ -synuclein levels were found at 25 and 50  $\mu$ M concentrations of 6-OHDA at 24 hours compared to control group (Figure 1B). Dopamine levels were lower at all concentrations of 6-OHDA than the control group for 24 and 48 hours (Figure 2B).  $\alpha$ -synuclein levels increased and dopamine levels decreased in SK-N-AS cells following exposure to 6-OHDA. Thus, an *in vitro* PD model was formed upon loss of dopaminergic neurons. The effective 6-OHDA concentration and incubation time for *in vitro* PD model formation was determined as 50  $\mu$ M 6-OHDA for 24 hours. There was no statistically significant difference between  $\alpha$ -synuclein levels in SK-N-AS cells after exposure to different concentrations of 6-OHDA for 24 or 48 hours ( $p > 0.05$ ). Similar results were found for dopamine levels.



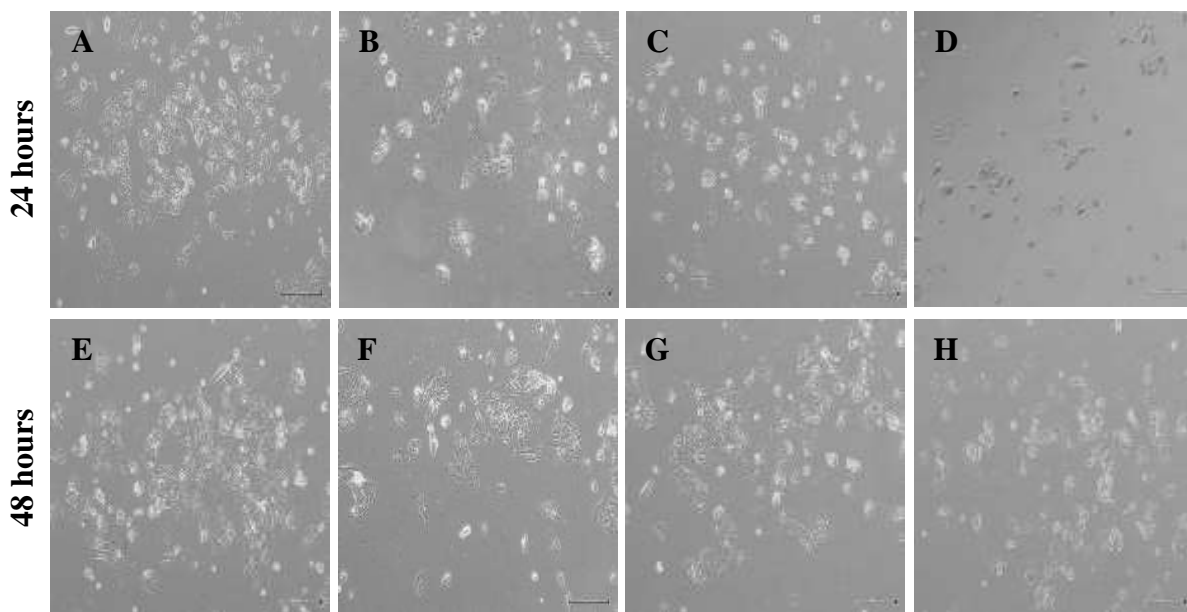
**Figure 1.** The levels of  $\alpha$ -synuclein in SK-N-AS cells after exposure to 6-OHDA. (A) Standard curve and equation. (B)  $\alpha$ -synuclein levels were obtained at different incubation times and different concentrations.



**Figure 2.** The levels of dopamine in SK-N-AS cells after exposure to 6-OHDA. (A) Standard curve and equation. (B) Dopamine levels were obtained at different incubation times and different concentrations.

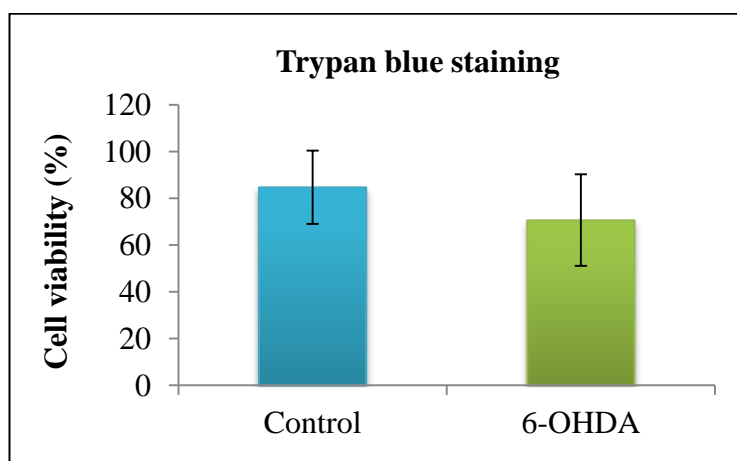
### **Cell viability and growth assay evaluation**

Cell viability was similar in the groups exposed to 25 and 50  $\mu$ M of 6-OHDA versus control cells (Figure 3). At 100  $\mu$ M, a lower number of cells was observed compared to other groups (Figures 3D and 3H).



**Figure 3.** SK-N-AS cells exposed to 6-OHDA for 24 (A-D) and 48 hours (E-H) at different concentrations; Control group (A,E), 25 μM (B,F), 50 μM (C,G) and 100 μM (D,H). Scale bars=200 μm.

After trypan blue staining, the percentages of cell viability were 84.7% in the control group and 70.6% in the 6-OHDA group. After the statistically analyses, the cell viability was similar between the control and the 6-OHDA groups and there was no statistically significant ( $p=0.374$ ) (Figure 4).



**Figure 4.** Cell viability of SK-N-AS cells exposed to 50 μM 6-OHDA for 24 hours. Cell viability was measured by the trypan blue staining.

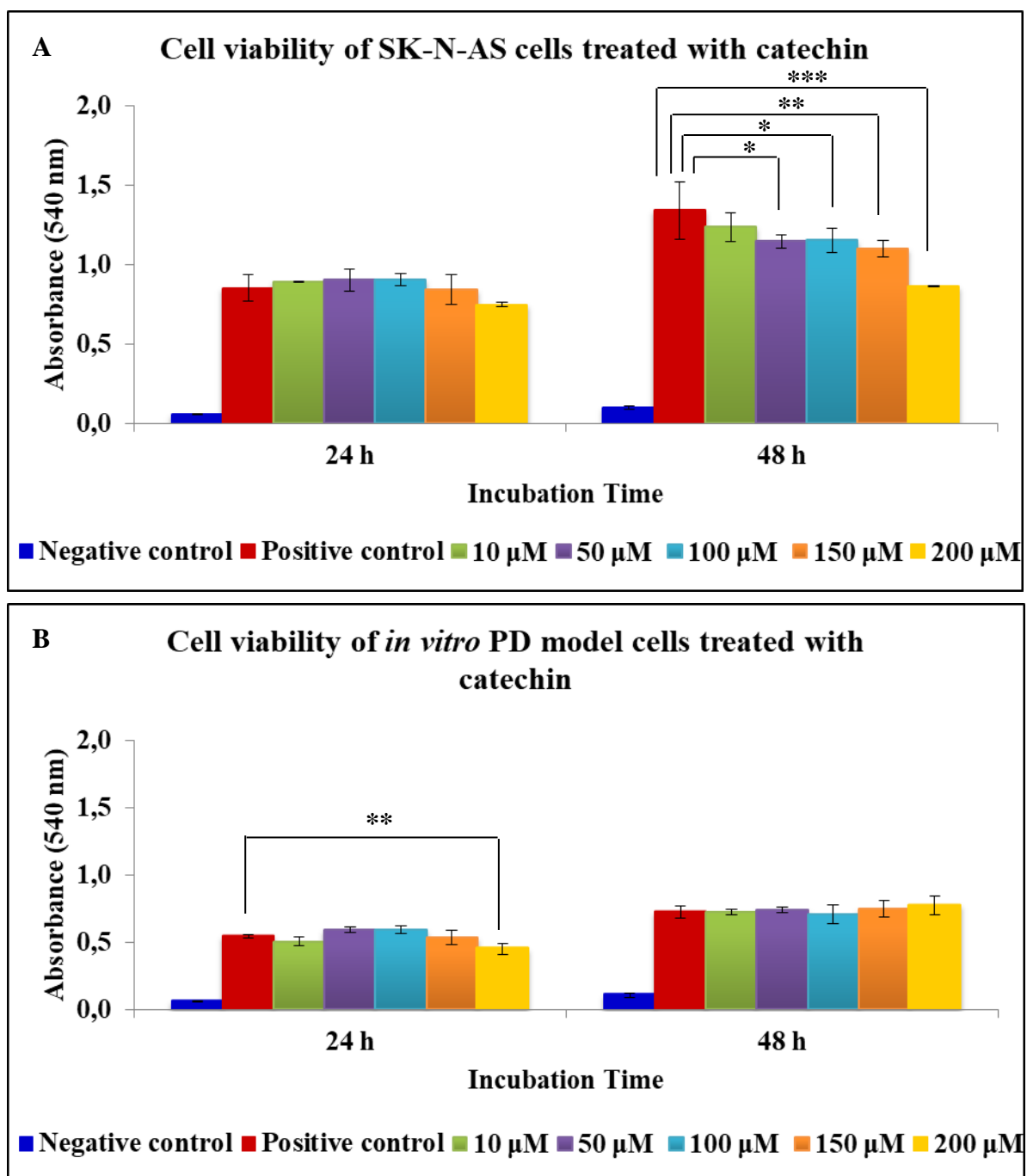
SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells were incubated with catechin and EGCG at different concentrations for 24 or 48 hours to determine cell viability.

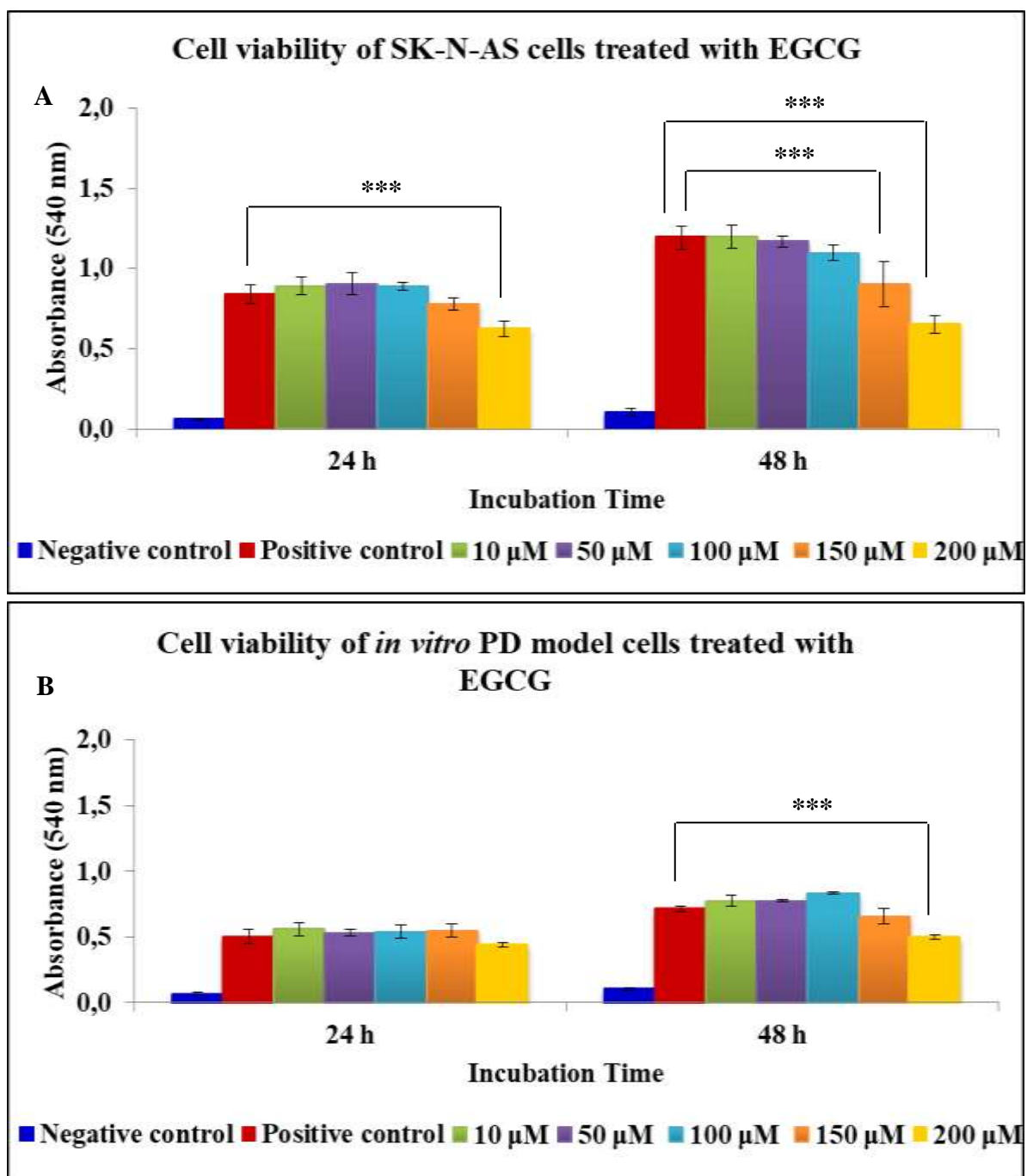


Comparing *in vitro* PD model cells and SK-N-AS cells, catechin and EGCG showed non-toxic, cell viability-enhancing and protective effects depending on the dose and incubation time. At a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , both catechin (Figure 5) and EGCG (Figure 6) were more effective in increasing cell viability when incubated for 24 hours compared to the positive control. Also, in both catechin and EGCG groups, cell viability was similar between SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells. Neuroprotective effects were observed at 100  $\mu\text{M}$  concentration when incubated for 24 hours.

There was a significant difference with the positive control in SK-N-AS cells treated with catechin concentrations of 50  $\mu\text{M}$  ( $p=0.020$ ), 100  $\mu\text{M}$  ( $p=0.013$ ), 150  $\mu\text{M}$  ( $p<0.01$ ) and 200  $\mu\text{M}$  ( $p<0.001$ ) for 48 hours (Figure 5A). There was a significant difference between the positive control and *in vitro* PD model cells treated with 200  $\mu\text{M}$  catechin for 24 hours ( $p=0.004$ ) (Figure 5B).

The significant difference was found between the positive control and SK-N-AS cells treated with 200  $\mu\text{M}$  EGCG for 24 hours ( $p<0.001$ ). Also, there was a significant difference with the positive control in SK-N-AS cells treated with EGCG concentrations of 150  $\mu\text{M}$  ( $p<0.001$ ) and 200  $\mu\text{M}$  ( $p<0.001$ ) for 48 hours (Figure 6A). There was a significant difference between the positive control and *in vitro* PD model cells treated with 200  $\mu\text{M}$  catechin for 48 hours ( $p<0.001$ ) (Figure 6B). The non-significant differences compared to the positive control indicates that the components did not have a toxic effect.



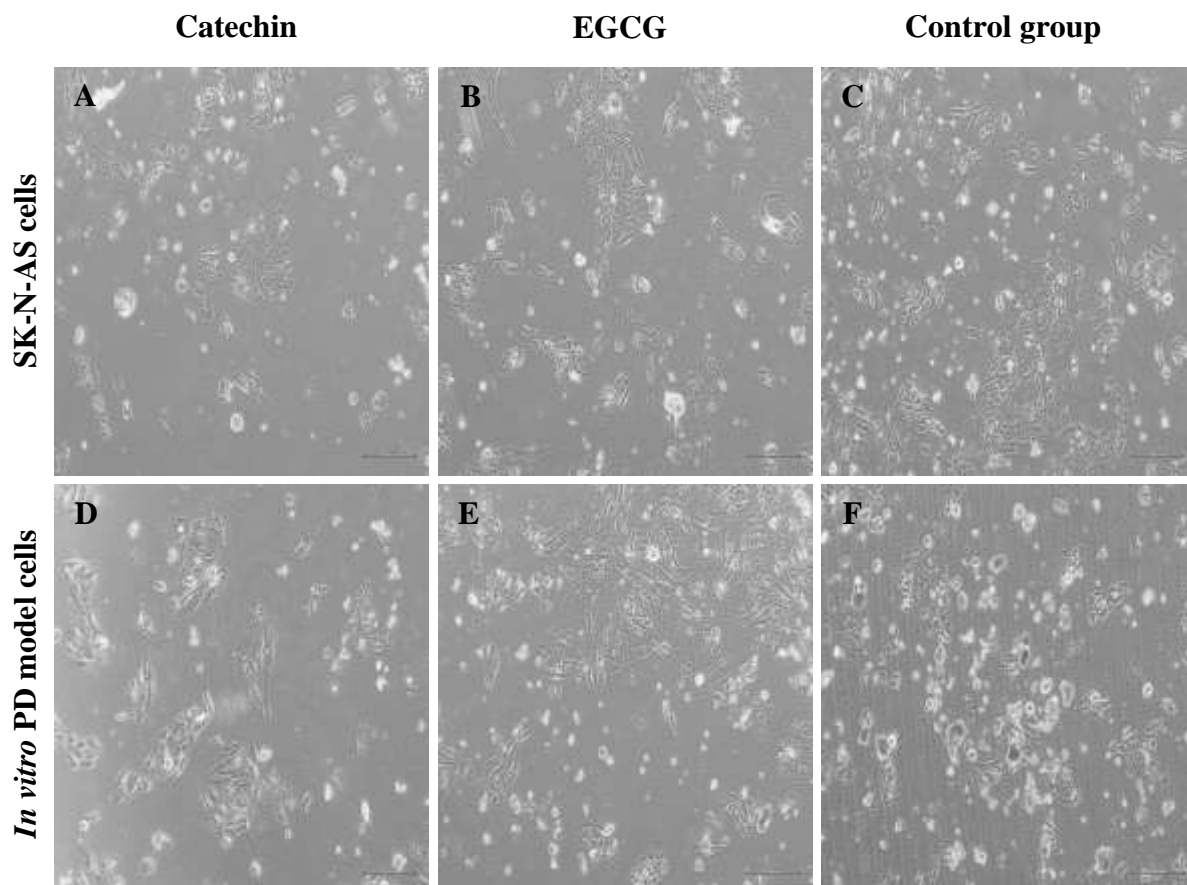


**Figure 6.** Effect of EGCG on the cell viability of SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells. (A) SK-N-AS cells and (B) *in vitro* PD model cells were treated with different concentrations of EGCG for 24 or 48 hours. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Cell morphology

After treatment with catechin (Figure 7A) or EGCG (Figure 7B), adherent epithelial morphology was retained in SK-N-AS cells (Figure 7C). In the *in vitro* PD model cells, the shapes of *in vitro* PD model cells exposed to catechin (Figure 7D) or

EGCG (Figure 7E) were similar to SK-N-AS cells exposed to catechin (Figure 7A) or EGCG (Figure 7B). However, when SK-N-AS cells were exposed to 6-OHDA, their shapes changed and became round (Figure 7F).

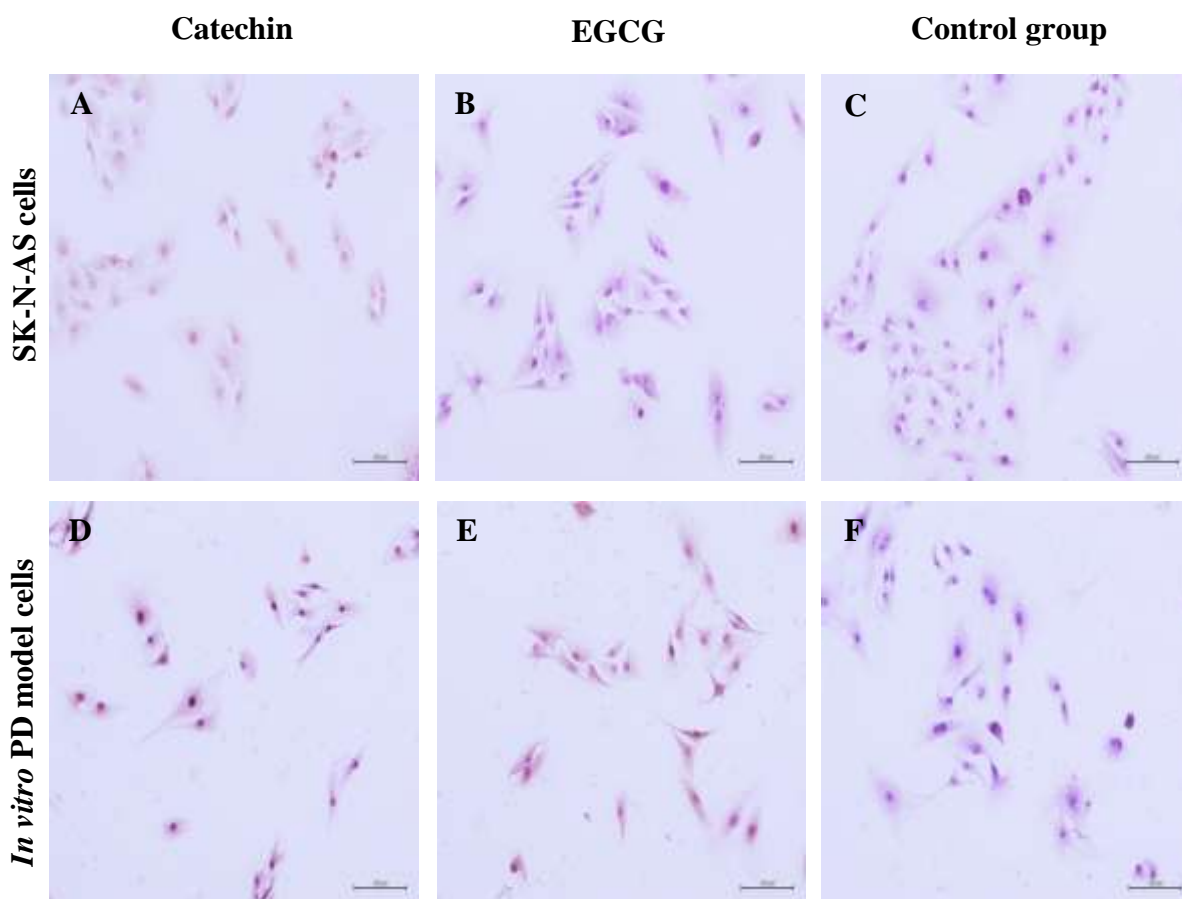


**Figure 7.** SK-N-AS cells (A-C) and *in vitro* PD model cells (D-F) viewed under the inverted microscope after treatment with catechin (A,D), EGCG (B,E) and control group (C,F). Scale bars=200  $\mu$ m.

### ***Immunocytochemical evaluation***

Weak TNF- $\alpha$  immunoreactivity was detected in catechin-treated SK-N-AS cells (Figure 8A) compared to catechin-treated *in vitro* PD model cells (Figure 8D). There was no significant difference between the two groups ( $p>0.05$ ) (Figure 11, Table 1).

In the *in vitro* PD model, TNF- $\alpha$  staining intensity was weak in control group than catechin-treated and EGCG-treated groups (Figures 8D, 8E and 8F). However, this difference was non-significant ( $p>0.05$ ) (Figure 11, Table 1).



**Figure 8.** Immunoreactivity of TNF- $\alpha$  in SK-N-AS cells (A-C) and *in vitro* PD model cells (D-F) after exposure to 100  $\mu$ M catechin (A,D) or 100  $\mu$ M EGCG (B,E) or standard culture conditions (C,F) for 24 hours. Scale bars=100  $\mu$ m.

**Table 1.** The H-SCORE values for TNF- $\alpha$  in SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells treated with catechin at 100  $\mu$ M concentration for 24 hours, EGCG at 100  $\mu$ M concentration for 24 hours and control group

	Catechin	EGCG	Control group	p <sup>1</sup>
<b>SK-N-AS cells</b>	112.48±22.51	107.27±6.39	103.23±4.71	>0.05
<b><i>In vitro</i> PD model cells</b>	123.06±24.89	123.13±19.17	117.06±22.54	>0.05
<b>p<sup>2</sup></b>	0.815	0.565	0.665	

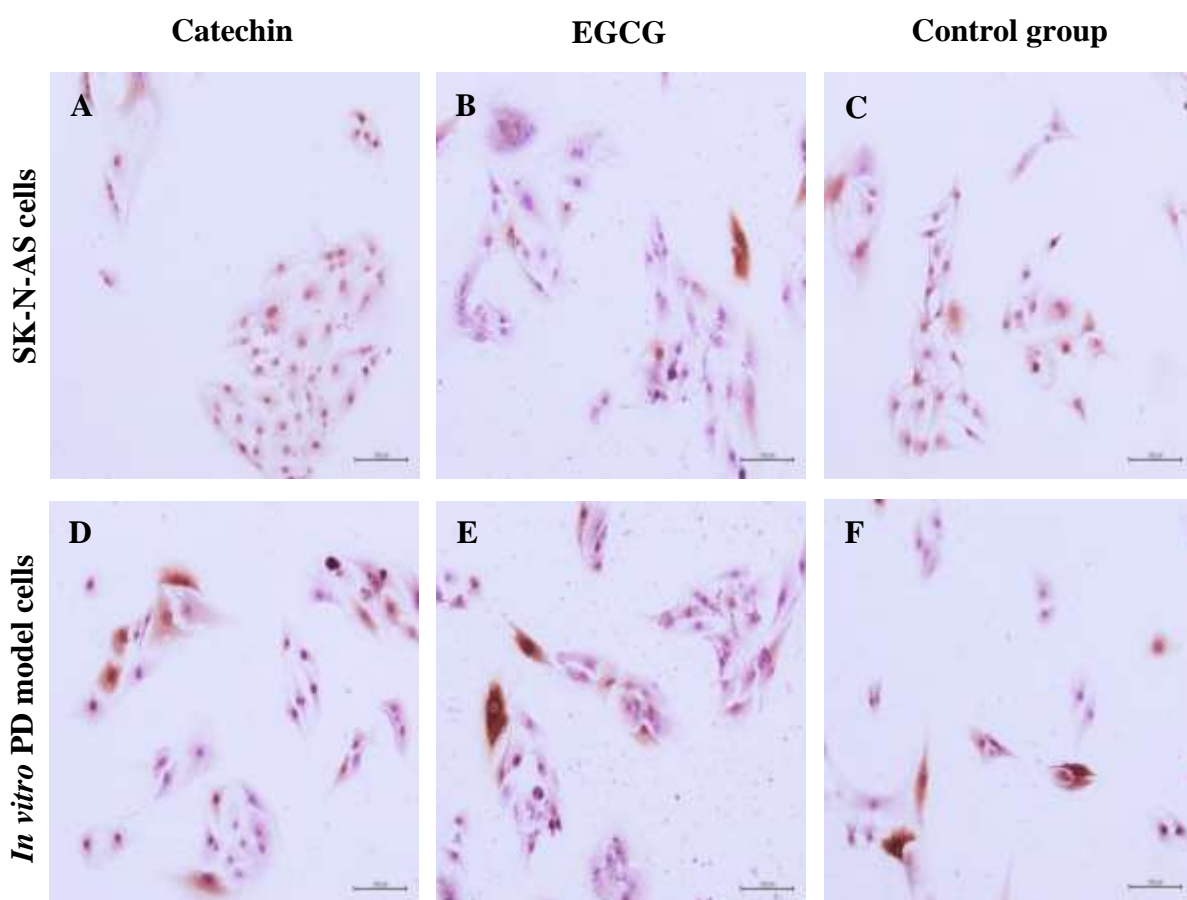
Two-way ANOVA (mean±SD); \*p<0.05.

p<sup>1</sup>: Difference among three groups in SK-N-AS cells or *in vitro* PD model cells.

p<sup>2</sup>: Difference between two groups in catechin-treated, EGCG-treated or control groups.

Strong IL-1 $\beta$  immunoreactivity was detected in catechin-treated SK-N-AS cells (Figure 9A) compared to catechin-treated *in vitro* PD model cells (Figure 9D) but this difference was non-significant ( $p>0.05$ ) (Figure 11). The H-SCORE of IL-1 $\beta$  was significantly lower in EGCG-treated SK-N-AS cells (Figure 9B) than EGCG-treated *in vitro* PD model cells (Figure 9E) ( $p=0.013$ ) (Figure 11, Table 2).

Weak, strong and moderate IL-1 $\beta$  immunoreactivity was detected in catechin-treated, EGCG-treated and control groups in the *in vitro* Parkinson's model cells, respectively (Figures 9D, 9E and 9F). In addition, the difference among the groups was found to be statistically significant ( $p<0.05$ ) (Figure 11, Table 2).



**Figure 9.** Immunoreactivity of IL-1 $\beta$  in SK-N-AS cells (A-C) and *in vitro* PD model cells (D-F) after exposure to 100  $\mu$ M catechin (A,D) or 100  $\mu$ M EGCG (B,E) or standard culture conditions (C,F) for 24 hours. Scale bars=100  $\mu$ m.

**Table 2.** The H-SCORE values for IL-1 $\beta$  in SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells treated with catechin at 100  $\mu$ M concentration for 24 hours, EGCG at 100  $\mu$ M concentration for 24 hours and control group

	Catechin	EGCG	Control group	p <sup>1</sup>
<b>SK-N-AS cells</b>	146.28 $\pm$ 32.87	117.99 $\pm$ 5.41	145.52 $\pm$ 13.53	>0.05
<b><i>In vitro</i> PD model cells</b>	123.33 $\pm$ 18.27 <sup>a</sup>	160.72 $\pm$ 19.70 <sup>b</sup>	141.96 $\pm$ 9.19 <sup>ab</sup>	<0.05*
<b>p<sup>2</sup></b>	0.270	0.013*	0.990	

Two-way ANOVA [Tukey's and Sidak's multiple comparisons test, (mean $\pm$ SD)];  
\*p<0.05.

a-b: There was no significant difference among three groups with the same letter.

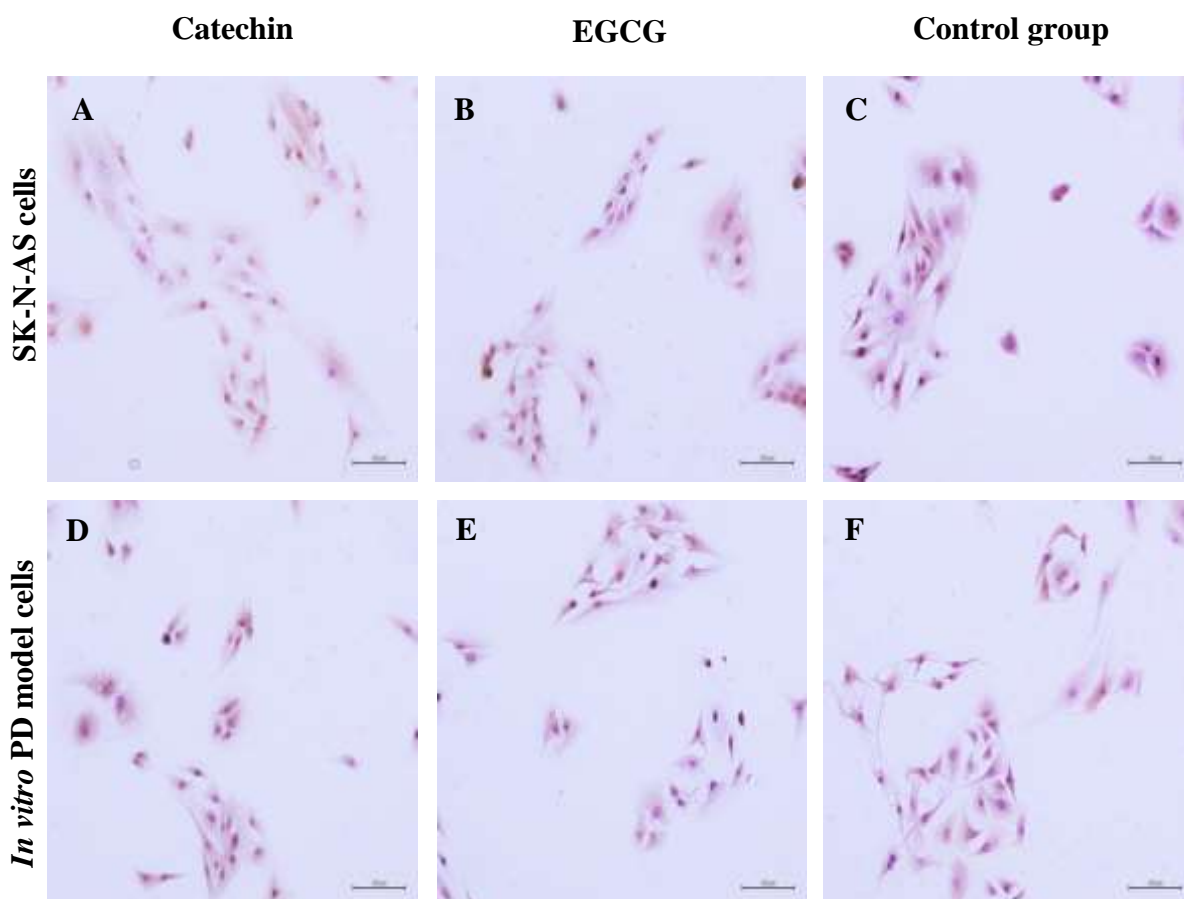
p<sup>1</sup>: Difference among three groups in SK-N-AS cells or *in vitro* PD model cells.

p<sup>2</sup>: Difference between two groups in catechin-treated, EGCG-treated or control groups.

In SK-N-AS cells, caspase-3 immunoreactivity of catechin-treated group was moderate (Figure 10A), while that of EGCG-treated group (Figure 10B) was weak when compared to control group (Figure 10C). In addition, SK-N-AS control group showed significantly greater immunoreactivity for caspase-3 than EGCG-treated SK-N-AS cells (p<0.05) (Figure 11, Table 3).

In the *in vitro* PD model cells, caspase-3 immunoreactivity was weak, moderate and strong in catechin-treated, EGCG-treated and control group, respectively (Figures 10D, 10E and 10F). The difference among three groups was statistically significant (p<0.05) (Table 3). Furthermore, the H-SCORE for caspase-3 revealed that there was a significant reduction in caspase-3 expression in catechin-treated (p<0.001) and EGCG-treated (p<0.01) groups than control group (Figure 11).

Strong caspase-3 immunoreactivity was detected in catechin-treated SK-N-AS cells (Figure 10A) compared to catechin-treated *in vitro* Parkinson's model cells (Figure 10D). The significant difference was found between the two groups (p=0.048) (Figure 11, Table 3).



**Figure 10.** Immunoreactivity of caspase-3 in SK-N-AS cells (A-C) and *in vitro* PD model cells (D-F) after exposure to 100  $\mu$ M catechin (A,D) or 100  $\mu$ M EGCG (B,E) or standard culture conditions (C,F) for 24 hours. Scale bars=100  $\mu$ m.

**Table 3.** The H-SCORE values for caspase-3 in SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells treated with catechin at 100  $\mu$ M concentration for 24 hours, EGCG at 100  $\mu$ M concentration for 24 hours and control group

	Catechin	EGCG	Control group	p <sup>1</sup>
<b>SK-N-AS cells</b>	164.50±24.19 <sup>ab</sup>	139.15±9.49 <sup>a</sup>	188.77±17.16 <sup>b</sup>	<0.05*
<b><i>In vitro</i> PD model cells</b>	130.29±12.85 <sup>a</sup>	150.90±13.06 <sup>a</sup>	195.11±26.44 <sup>b</sup>	<0.05*
<b>p<sup>2</sup></b>	0.048*	0.756	0.949	

Two-way ANOVA [Tukey's and Sidak's multiple comparisons test, (mean±SD)];

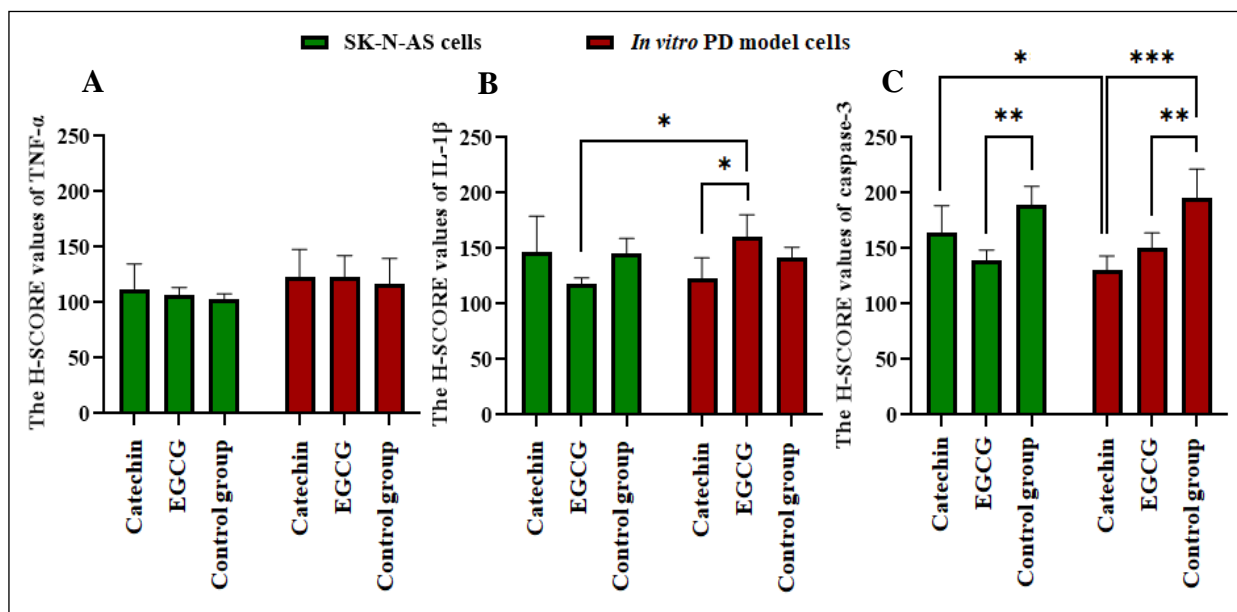
\*p<0.05.

a-b: There was no significant difference among three groups with the same letter.

p<sup>1</sup>: Difference among three groups in SK-N-AS cells or *in vitro* PD model cells.

p<sup>2</sup>: Difference between two groups in catechin-treated, EGCG-treated or control groups.





**Figure 11.** The difference in H-SCORE values for TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) and caspase-3 (C) between SK-N-AS cells and *in vitro* PD model cells. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## Discussion

6-hydroxydopamine is a neurotoxin that is widely used in the development of Parkinson's disease models and causes neurotoxicity by inducing oxidative stress with the production of reactive oxygen species [23]. In addition to increasing free radical production, it also causes inhibition of mitochondrial respiratory chain complexes I and IV. Thus, cytotoxicity occurs in dopaminergic neurons and neuronal damage ensues. The pathophysiological hallmark of PD is the aggregation of  $\alpha$ -synuclein, a presynaptic neuronal protein [9, 18]. Increased  $\alpha$ -synuclein aggregation also increases intraneural deposition of Lewy bodies. Another major pathophysiological feature of PD is the reduction of dopaminergic neurons in the SNpc, striatal dopamine levels and the synthesis of their transporter [2]. In the current study, 6-OHDA, a neurotoxic compound, was used to develop an *in vitro* PD model. We controlled the model by checking  $\alpha$ -synuclein and dopamine levels. It was found that after the cells were exposed to different concentrations of neurotoxic 6-OHDA, there was an increase in  $\alpha$ -synuclein levels and a reduction in dopamine levels. As a result, dopaminergic neurons were lost and PD developed after the administration of 6-OHDA at 50  $\mu$ M concentration for 24 hours.

Catechins, especially EGCG, induce scavenging of reactive oxygen derivatives through their antioxidant activities [24]. Also, EGCG can increase cell viability and neurite outgrowth. Thus, it shows neurorescue activity and has neuroprotective effects on nerve repair [5, 16]. In a study by Wang et al. investigating the protective effect of EGCG, SH-SY5Y human neuroblastoma cells were exposed to 6-OHDA. Before 6-OHDA incubation, cells were treated with different concentrations of EGCG. After cell viability analysis, it was observed that EGCG pretreatment at 0.1-10  $\mu\text{M}$  concentrations increased cell viability of SH-SY5Y cells despite 6-OHDA exposure, and 1  $\mu\text{M}$  EGCG was the most effective dose [25]. In a study examining the effects of five different catechins (EGCG, ECG, EGC, EC and (+)-C) at different concentrations in an *in vitro* PD model formed after exposure of PC12 cells to 6-OHDA, catechins at 50-100  $\mu\text{M}$  concentrations did not have any effect on cell viability. At 200-400  $\mu\text{M}$  concentrations, the cell viability of the cells treated with EGCG and ECG was >90% and that of the cells treated with EC and (+)-C was ~70-80% and EGC did not have any effect on cell viability. At 400  $\mu\text{M}$  concentration, cell viability was found to reduce by ~50% [24]. In a study by Junior et al. using primary cultures of mesencephalic cells, cells were exposed to 6-OHDA. In that study, catechin pretreatment at different concentrations (3.4, 34 and 340  $\mu\text{M}$ ) reduced 6-OHDA-induced cell death, but had no effect in the absence of 6-OHDA. Furthermore, catechin administration at 340  $\mu\text{M}$  concentration completely prevented 6-OHDA-induced cell death [23]. The results of our study are consistent with those reported by other studies in the literature. After cell viability analyses, it was observed that cell viability was above 50% in SK-N-AS cells exposed to 50  $\mu\text{M}$  6-OHDA for 24 hours. Catechin and EGCG increased cell viability to a greater extent in the *in vitro* PD model cells than in control cells. For this reason, it was thought that both bioactive components might have potential protective effects on PD model neuron cells, especially after 24 hours of administration at 100  $\mu\text{M}$ .

Apoptosis is programmed cell death that involves two signaling pathways designated as intrinsic and extrinsic pathways. While intrinsic pathway consists of mitochondrial damage, stimulation of proapoptotic proteins and release of cytochrome C from mitochondria to the cytosol, extrinsic pathway starts with the activation of death receptors in the cell membrane. These two pathways, which occur independently of each other, are combined with the activation of effector caspases such as caspase-3 and -7. The apoptotic process is carried out by caspases. The most

effective caspase in neurons is caspase-3. In cases of neurotoxication, caspase-3 is activated and its release is increased. Caspase-3 activation indicates that apoptosis is induced and neuronal degeneration occurs in the SNpc, which is rich in dopaminergic neurons. Increased apoptosis and neuronal degeneration of dopaminergic neurons in the SNpc is one of the most important signs of Parkinson's disease [6]. EGCG increases the survival of neuron cells and suppresses cell death by inducing the expression of the protein kinase C signaling pathway, activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, decreasing the levels of pro-apoptotic caspases and proapoptotic proteins, inhibiting c-Jun-N-terminal kinase (JNK) phosphorylation and JNK inhibitor. Therefore, EGCG provides anti-apoptotic and neuroprotective effects [5, 12]. In a study by Chao et al. using a cellular model mimicking PD, retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells were exposed to 25  $\mu$ M 6-OHDA for 24 hours after pretreatment with 0.1, 1 and 10  $\mu$ M concentrations of EGCG or acetylated EGCG (p-EGCG). In the study, apoptosis was determined by caspase-3 activity. While 10  $\mu$ M pEGCG caused a significant reduction in caspase-3 activity, EGCG administered at different doses did not have a significant effect [26]. In one study, He et al. showed that 25  $\mu$ M EGCG treatment inhibited JNK phosphorylation and reduced caspase-3 activation in primary cortical neuronal cells. EGCG has been found to increase cell viability by inducing an anti-apoptotic effect [27]. In a study by Chen et al., N27 cells were treated with EGCG and then exposed to 6-OHDA. Exposure to 6-OHDA increased caspase-3 activity by 12%, while EGCG treatment decreased caspase-3 activity by 49%. EGCG administration at 50 and 100  $\mu$ M concentrations reduced cell death by 31% and 55%. The most effective dose was identified as 100  $\mu$ M [20]. Zhang et al. also showed that exposure to 6-OHDA increased  $\alpha$ -synuclein levels in SH-SY5Y human dopaminergic cells, as in our study. In addition, it was reported that mitochondrial membrane permeability changed, Bax levels increased and caspase-3 and -9 releases were induced after exposure to 6-OHDA. Thus, apoptosis occurred and loss of dopaminergic neurons increased [28]. The findings of the aforementioned studies are similar to our results. In our study, the apoptotic effect was also determined by caspase-3 intensity. Our result demonstrated that caspase-3 intensity was only decreased in EGCG-treated SK-N-AS cells compared to control group after treatment with catechin or EGCG in SK-N-AS cells. Additionally, reduced caspase-3 intensity was found in the *in vitro* PD model cells in both catechin-treated group and EGCG-treated group. EGCG

showed an anti-apoptotic effect in both cells, while catechin showed this effect only in cells from Parkinson's disease. Therefore, it can be suggested that EGCG has a greater anti-apoptotic effect than catechin in healthy neuron cells.

Neuroinflammation plays a crucial role in the pathogenesis of Parkinson's disease [19]. Microglia activation and cytokine aggregation are important factors that induce neuroinflammation [29]. In addition, oxidative stress, excitotoxicity and increased ROS production cause neuronal damage by increasing the accumulation of oxidative products in neurons [12, 19]. Catechins reduce ROS production, have a radical scavenging effect and chelate metal ions with their hydroxyl and galloyl moieties in their molecular structures. Catechins also show an anti-inflammatory effect by decreasing the release of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS and by suppressing inflammatory pathways such as NF- $\kappa$ B and cyclooxygenase-2. Due to these effects, they confer protection against inflammation-related neurodegeneration and neuroinflammation. In particular, EGCG contains more hydroxyl and galloyl groups in its molecular structure than other catechins, and therefore its anti-inflammatory activity is higher than the others [11-13]. In a study conducted in an *in vivo* PD model, a significant reduction was found in the elevated TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and caspase-3 levels after treatment with 100 mg/kg EGCG. Reduced levels of neuroinflammatory and apoptotic markers shows that EGCG has antioxidative, anti-apoptotic, mitochondrial dysfunction inhibitory and anti-neuroinflammatory effects [30]. In a study using a rat model of PD, standard green tea extract (25, 50, 100 mg/kg), epicatechin (10 mg/kg), and EGCG (10 mg/kg) were administered for 2 weeks and their neuroprotective effects were investigated. Catechins were found to have positive effects in the treatment and prevention of PD by showing strong antioxidant and anti-inflammatory effects [19]. Based on our findings, neither catechin treatment nor EGCG treatment had an effect on TNF- $\alpha$  immunoreactivity. However, after EGCG treatment, IL-1 $\beta$  staining intensity was significantly lower in healthy neuron cells than in PD cells, while no significant effect was observed in the group treated with catechin. The effect of EGCG on reducing the expression of IL-1 $\beta$ , an inflammatory cytokine, in healthy neuron cells suggests that it may be protective against neuroinflammation that may occur in healthy neuron cells.

## Conclusion

Cell viability, anti-apoptotic, anti-inflammatory and neuroprotective effects of catechin and EGCG were investigated in both SK-N-AS and *in vitro* PD model cells using different concentrations. After 6-OHDA exposure, decreased dopamine and increased  $\alpha$ -synuclein levels were detected and administration of 50  $\mu$ M 6-OHDA for 24 hours provided the development of *in vitro* PD model. Interestingly, both catechin and EGCG increased cell viability in PD model cells. It was assumed that after treatment with both bioactive components, they might have potential protective effects on PD model cells. Neither bioactive component affected TNF- $\alpha$  expression. EGCG decreased IL-1 $\beta$  immunoreactivity in healthy neuron cells, while catechin decreased IL-1 $\beta$  immunoreactivity in PD model cells and showed an anti-inflammatory effect. EGCG downregulated the expression of caspase-3 in both healthy neurons and PD model cells, whereas catechin reduced it only in PD model cells. Of note, the anti-apoptotic effect of EGCG was lower than that of catechin in PD model cells. Catechins were more effective in the *in vitro* PD model, while EGCG was more effective in healthy neuron cells. Animal and clinical studies are needed to determine and further evaluate the anti-apoptotic, anti-inflammatory and neuroprotective effects and signaling pathways of catechin and EGCG in Parkinson's disease.

## Acknowledgments

The authors thank the Near East University Experimental Health Sciences Research Center (DESAM) Cell Culture Laboratory team for their support.

## Funding

This study was supported by the Scientific Research Project (BAP) unit of Near East University; [SAG-2019-1-047].

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Author contributions

All authors contributed equally to this work. G.Ö., E.B., H.S.V. and S.Y. designed the research study. E.B. performed the Parkinson's disease modeling, MTT assay and

immunocytochemistry analysis; G.Ö. analyzed the data; G.Ö. wrote the first draft of the manuscript; E.B., H.S.V. and S.Y. revised the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

### Notes on contributors

*Gülşen Özduvan* is a PhD student in the Department of Nutrition and Dietetics.

*Eda Becer* is an associate professor in the Department of Biochemistry with extensive clinical experience in cell culture, molecular biology and genetics.

*Hafize Seda Vatansever* is a medical doctor and professor in the Department of Histology and Embryology with long years of clinical and research experience in the fields of stem cells, cancer biology and treatment, apoptosis and neurodegenerative diseases.

*Sevinç Yücecan* is an experienced dietitian and professor in the Department of Nutrition and Dietetics, with a research focus on bioactive nutritional components.

### ORCID

Gülşen Özduvan <https://orcid.org/0000-0001-9406-3165>

Eda Becer <http://orcid.org/0000-0002-2378-128X>

Hafize Seda Vatansever <http://orcid.org/0000-0003-3619-5666>

Sevinç Yücecan <http://orcid.org/0000-0003-4751-0924>

### References

- [1] Velmurugan BK, Rathinasamy B, Lohanathan, BP, et al. Neuroprotective role of phytochemicals. *Molecules*. 2018;23(10):2485.
- [2] Lama A, Pirozzi C, Avagliano C, et al. Nutraceuticals: An integrative approach to starve Parkinson's disease. *Brain Behav Immun - Health*. 2020;2:100037.
- [3] Rocca WA. The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *Lancet Neurol*. 2018;17(11):928–929.
- [4] Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020;36(1):1–12.
- [5] Singh NA, Mandal AKA, Khan ZA. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutr J*. 2016;15(1):1–17.

- [6] Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología (English Edition)*. 2017;32(8):533–539.
- [7] Galindo MF, Saez-Atienzar S, Solesio ME, et al. 6-hydroxydopamine as preclinical model of parkinson's disease. In: Kostrzewa RM, editor. *Handbook of Neurotoxicity*. New York: Springer; 2014:639-651.
- [8] Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and  $\alpha$ -synuclein-deleted mice. *Exp Neurol*. 2008;210(1):182–193.
- [9] Khalatbary AR, Khademi E. The green tea polyphenolic catechin epigallocatechin gallate and neuroprotection. *Nutr Neurosci*. 2020;23(4):281–294.
- [10] Pervin M, Unno K, Ohishi T, et al. Beneficial effects of green tea catechins on neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2018;23(6):1297.
- [11] Xu YQ, Gao Y, Granato D. Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. *Food Chem*. 2021;339:128060.
- [12] Farkhondeh T, Yazdi HS, Samarghandian S. The protective effects of green tea catechins in the management of neurodegenerative diseases: a review. *Curr Drug Discov Technol*. 2019;16(1):57–65.
- [13] Bernatoniene J, Kopustinskiene D. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules*. 2018;23(4):965–975.
- [14] Mandel SA, Amit T, Kalfon L, et al. Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins. *J Nutr*. 2008;138(8):1578S–1583S.
- [15] Malar DS, Prasanth MI, Brimson JM, et al. Neuroprotective properties of green tea (*Camellia sinensis*) in Parkinson's disease: a review. *Molecules*. 2020;25(17):3926.
- [16] Nan W, Zhonghang X, Keyan C, et al. Epigallocatechin-3-gallate reduces neuronal apoptosis in rats after middle cerebral artery occlusion injury via pi3k/akt/enos signaling pathway. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
- [17] Zhao J, Liang Q, Sun Q, et al. (–)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits fibrillation, disaggregates amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein, and protects PC12 cells against  $\alpha$ -synuclein-induced toxicity. *Rsc Adv*. 2017;7(52):32508–32517.

- [18] Xu Y, Zhang Y, Quan Z, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) inhibits alpha-synuclein aggregation: A potential agent for Parkinson's disease. *Neurochem Res.* [2016](#);41(10):2788–2796.
- [19] Bitu Pinto N, da Silva Alexandre B, Neves KRT, et al. Neuroprotective properties of the standardized extract from *Camellia sinensis* (green tea) and its main bioactive components, epicatechin and epigallocatechin gallate, in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Evid Based Complementary Altern Med.* [2015](#);2015:1–12.
- [20] Chen D, Kanthasamy AG, Reddy MB. EGCG protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in a cell culture model. *Parkinsons Dis.* [2015](#);2015.
- [21] Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protocol Immunol.* [2015](#);111(1): A3-B.
- [22] Hoca M, Becer E, Kabadayı H, et al. The effect of resveratrol and quercetin on epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem cell. *Nutr Cancer.* [2020](#);72(7):1231–1242.
- [23] Junior HN, Cunha GMA, Maia FD, et al. Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* [2003](#);36(2):175–180.
- [24] Jin CF, Shen SR, Zhao BL. Different effects of five catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem.* [2001](#);49(12):6033–6038.
- [25] Wang L, Xu S, Xu X, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced cell death through STAT3 activation. *J Alzheimers Dis.* [2009](#);17(2):295–304.
- [26] Chao J, Lau WKW, Huie MJ, et al. A pro-drug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) prevents differentiated SH-SY5Y cells from toxicity induced by 6-hydroxydopamine. *Neurosci Lett.* [2010](#);469(3):360–364.
- [27] He Q, Bao L, Zimering J, et al. The protective role of (-)-epigallocatechin-3-gallate in thrombin-induced neuronal cell apoptosis and JNK-MAPK activation. *Neuroreport.* [2015](#);26(7):416.
- [28] Zhang Z, Hou L, Li X, et al. Neuroprotection of inositol hexaphosphate and changes of mitochondrion mediated apoptotic pathway and  $\alpha$ -synuclein aggregation



in 6-OHDA induced parkinson' s disease cell model. *Brain Research*. 2016;1633:87–95.

[29] Xu Q, Langley M, Kanthasamy AG, et al. Epigallocatechin gallate has a neurorescue effect in a mouse model of Parkinson disease. *J Nutr*. 2017;147(10):1926–1931.

[30] Tseng HC, Wang MH, Chang KC, et al. Protective Effect of (–) Epigallocatechin-3-gallate on Rotenone-Induced Parkinsonism-like Symptoms in Rats. *Neurotox Res*. 2020;37(3):669–682.

**Ek 2.****Sözel Bildiri****5. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi - Sözel Bildiri****Kateşin ve Epigallokateşin Gallatın *in vitro* Parkinson Modelindeki Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri**

Gülşen ÖZDURAN<sup>1</sup>, Sevinç YÜCECAN<sup>2</sup>, Eda BECER<sup>3,4</sup>, Hafize Seda VATANSEVER<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>*Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Lefkoşa, Kıbrıs*

<sup>2</sup>*Lokman Hekim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye*

<sup>3</sup>*Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kıbrıs*

<sup>4</sup>*Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa, Kıbrıs*

<sup>5</sup>*Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye*

**ÖZET**

**Amaç:** *In vitro* Parkinson modelinde kateşin ve epigallokateşin gallatın hücre canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

**Yöntem:** Çalışmada SK-N-AS insan nöroblastoma hücreleri *DMEM*, %10 fetal sıgır serum, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren kültür vasatı içerisinde 37°C’de %5’lik karbondioksitli ortamda kültüre edildi. *In vitro* Parkinson modeli için SK-N-AS hücreleri 24 ve 48 saat süresince 25 µM, 50 µM veya 100 µM konsantrasyonlardaki 6-hidroksi dopamine maruz bırakıldı. Model kontrolü kültür vasatlarındaki dopamin ve alfa-sinüklein düzeylerinin ELISA analizi sonrasında yapıldı. Kateşin ve epigallokateşin gallat beş farklı konsantrasyonda (10 µM, 50 µM,

100 µM, 150 µM, 200 µM) SK-N-AS (kontrol) ve *in vitro* Parkinson model hücelere 24 ve 48 saat uygulandı. Hücre canlılıkları, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile rutin protokol ile ölçüldü.

**Bulgular:** 6-hidroksi dopamin uygulaması sonrasında, alfa-sinüklein düzeylerinin Parkinson model hücelerde kontrol grubuna göre 24 saatlik uygulama sonrasında 50 µM konsantrasyonda daha yüksek olduğu saptandı. Dopamin düzeylerinin ise 24 saatlik uygulama sonrasında 50 µM uygulanan parkinson model hücelerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bulundu. Kateşin ve epigallokateşin gallatın 24 saat 100 µM konsantrasyondaki uygulamalarının *in vitro* Parkinson modelinde kontrol grubuna göre hücre canlılığını artırdığı saptandı.

**Sonuç:** Çalışmada 6-hidroksi dopamin maruziyeti sonrasında dopamin düzeyinin azalması, alfa-sinüklein düzeyinin artması ile 24 saatlik 50 µM 6-hidroksi dopamin uygulamasının *in vitro* Parkinson modeli oluşumunu sağladığı sonucuna varıldı. Bununla birlikte kateşin ve epigallokateşin gallat'ın hücre canlılığını parkinson model hücelerde kontrol hücelere nazaran daha fazla artırması üzerine, her iki biyoaktif bileşenin uygulama sonrasında parkinson model nöron hücelerde potansiyel koruyucu etkilerinin olabileceği düşünöldü.

**Anahtar kelimeler:** Kateşin, Epigallokateşin gallat, *In vitro* Parkinson modeli, 6-hidroksi dopamin

**Proje numarası:** SAG-2019-1-047

**Destekleyen kurum:** Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi (DESAM)

Ek 3.

Ödül

5. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi - Nitelikli Araştırma Ödülü



## Ek 4.

## İntihal Raporu

DOKTORA TEZİ			
ORJİNALLIK RAPORU			
% <b>8</b>	% <b>8</b>	% <b>4</b>	% <b>3</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİ KAYNAKLAR			
1	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı		% <b>1</b>
2	Submitted to Yakın Doğu Üniversitesi Öğrenci Ödevi		% <b>1</b>
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı		% <b>1</b>
4	www.jove.com İnternet Kaynağı		% <b>1</b>
5	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı		<% <b>1</b>
6	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı		<% <b>1</b>
7	Submitted to Ordu Üniversitesi Öğrenci Ödevi		<% <b>1</b>
8	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı		<% <b>1</b>
9	www.freepatentsonline.com İnternet Kaynağı		<% <b>1</b>

**Ek 5.****Özgeçmiş**

- 1. Adı - Soyadı** : Gülşen ÖZDURAN  
**Adres** : YDÜ, SBF, Beslenme ve Diyetetik Bölümü  
**Telefon** : 0533 849 50 67 / 0392 223 64 64 (3429 dahili)  
**E-posta** : glsn\_ozdrn@hotmail.com  
 gulsen.ozduran@neu.edu.tr
- 2. Doğum Tarihi ve Yeri** : 22.08.1990 Salihli / MANİSA
- 3. Unvanı** : Uzman Diyetisyen
- 4. Öğrenim Durumu** : Doktora

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Başkent Üniversitesi	2009 - 2014
Yüksek Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Yakın Doğu Üniversitesi	2014 - 2017
Doktora	Beslenme ve Diyetetik	Yakın Doğu Üniversitesi	2017 - 2022

**5. Akademik Unvanlar** : Araştırma Görevlisi, Uzman Diyetisyen

**6. Yüksek Lisans Tezi**

- Yakın Doğu Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğrencilerinin Besin Tüketim Örüntüsü İle Diyet Kalite İndeksi ve Uyku Kaliteleri Arasındaki İlişki

**7. Doktora Tezi**

- Deneysel Parkinson Modelinde Kateşinlerin Nöroprotektif Etkileri

**8. Yayınlar****8.1. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler**

- Hoca M, Özduran G. (2021). Physical activity levels and eating habits of students in different educational levels. *Progress in Nutrition*, 23(3).  
<https://doi.org/10.23751/pn.v23i3.10436>
- Özduran G., Yücecan S. (2021). Determining the diet quality, sleep quality and obesity status of undergraduate students: A cross-sectional study. *Progress in Nutrition*, 23(4).  
<https://doi.org/10.23751/pn.v23i4.11428>

- Özduran G, Becer E, Vatansever HS. (2021). The Role and Mechanisms of Action of Catechins in Neurodegenerative Diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 1-8.  
<https://doi.org/10.1080/07315724.2021.1981487>
- Özduran G, Becer E, Vatansever HS, Yücecan S. (2022). Neuroprotective effects of catechins in an experimental Parkinson's disease model and SK-N-AS cells: Evaluation of cell viability, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Neurological Research*.  
<https://doi.org/10.1080/01616412.2021.2024715>

## 8.2. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceeding) Basılan Bildiriler

- Yılmaz B, Sezer E, Türk ÖP, Semerci C, Özduran G, Özkan A, Yıldırım E, Petek N, Susuzlu M. Başkent Üniversitesi Öğrencilerinin Gıda Etiket Okuma Tutum ve Davranışları. IX. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi, Poster bildirisi, Ankara, 2 - 5 Nisan 2014.
- Özduran G, Kuşu M, Hacet F. Kadınlarda Ortoreksiya Nervoza Belirtileri, Yeme Tutum ve Davranışları, Obsesif Kompulsif Belirtileri ve Vücut Kompozisyonlarının İncelenmesi. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi: Gastrointestinal Hastalıklar Kongresi, Poster bildirisi, İzmir, 5 - 7 Ekim 2017.
- Hacet F, Özduran G, Kuşu M. Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğrencilerinin Besin Tüketim Örüntüleri İle BKİ'leri Arasındaki İlişki. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi: Gastrointestinal Hastalıklar Kongresi, Poster bildirisi, İzmir, 5 - 7 Ekim 2017.
- Özduran G, Yücecan S. Yakın Doğu Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğrencilerinin Besin Tüketim Örüntüsü İle Diyet Kalite İndeksi ve Uyku Kaliteleri Arasındaki İlişki. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi: Gastrointestinal Hastalıklar Kongresi, Sözel bildiri, İzmir, 5 - 7 Ekim 2017.
- Hacet F, Kuşu M, Özduran G. Nutrition and Dietetics Grade 1 Students and Their Correlation with Hellim Consumption, Calcium Intake And BMI's. The 4th International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus", Poster presentation, Kyrenia / Northern Cyprus, 19 - 21 April 2018.
- Madencioğlu S, Özduran G, Dayı T, Yücecan S. Adherence to Mediterranean Diet and International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) Scores of Nutrition and

Dietetic Students in Near East University. The 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Poster presentation, Kyrenia / Northern Cyprus, 19 - 21 April 2018.

- Özduran G., Kuşı M, Hacet F. Determination of Citrus Consumption of Near East University Students. The 4th International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus”, Poster presentation, Kyrenia / Northern Cyprus, 19 - 21 April 2018.
- Özduran G., Susever S, Hacet F, Dokuzlu S. Yakın Doğu Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü 1. ve 3. Sınıf Öğrencilerinin Süt ve Süt Ürünleri Tüketim Sıklıkları ile BKİ’leri Arasındaki İlişki. 2. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi, Poster bildirisi, Bafra / KKTC, 8 - 11 Kasım 2018.
- Hacet F, Susever S, Özduran G., Karamuk M. Yakın Doğu Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü 1. ve 3. Sınıf Öğrencilerinin Et ve Et Ürünleri Tüketim Sıklıkları ile Antropometrik Ölçümleri Arasındaki İlişki. 2. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi, Poster bildirisi, Bafra / KKTC, 8 - 11 Kasım 2018.
- Susever S, Kuşı M, Hacet F, Hoca M, Özduran G. Üniversite Öğrencilerinin Obezite Prevalansının ve Öğün Tüketim Alışkanlıklarının Belirlenmesi. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Poster bildirisi, Ankara, 29 Kasım - 1 Aralık 2018.
- Susever S, Özduran G., Hacet F. Eğitim Düzeyinin Ortoreksiya Nervoza ve Etiket Okuma Alışkanlığına Etkisi. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Poster bildirisi, Ankara, 29 Kasım - 1 Aralık 2018.
- Hacet F, Özduran G., Susever S. Üniversite Öğrencilerinin Beslenme Alışkanlıkları ve Antropometrik Ölçümlerinin Belirlenmesi. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Poster bildirisi, Ankara, 29 Kasım - 1 Aralık 2018.
- Özduran G., Yücecan S. Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğrencilerinin Besin Tüketim Örüntüleri ile Uyku Kaliteleri Arasındaki İlişki. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Sözel bildiri - Tam metinli, Ankara, 29 Kasım - 1 Aralık 2018.
- Özduran G., Yücecan S. Üniversite Öğrencilerinin Fiziksel Aktivite Düzeyleri, Uyku Kaliteleri ve Beden Kütle İndeksleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.



3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Sözel bildiri - Tam metinli, Ankara, 29 Kasım - 1 Aralık 2018.
- Hoca M, Özduran G, Susever S. Farklı Eğitim Düzeyindeki Öğrencilerin Fiziksel Aktivite Düzeyleri ve Beslenme Alışkanlıkları. 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Sözel bildiri - Tam metinli, Ankara, 29 Kasım - 1 Aralık 2018.
  - Özduran G, Yücecan S. Üniversite Öğrencilerinin Obezite Sıklığı, Uyku ve Uykululuk Durumlarının Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel bildiri - Tam metinli, İstanbul, 1 Mart 2019.
  - Özduran G, Hoca M, Susever S. Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışlarının Sağlıklı Yeme Takıntısıyla İlişkisinin Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel bildiri, İstanbul, 1 Mart 2019.
  - Özduran G, Yücecan S. Üniversite Öğrencilerinin Beslenme Durumlarının Sürdürülebilirliği ve Diyet Kalitelerinin Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi, Sözel bildiri, Ankara, 15 - 16 Mart 2019.
  - Hacet F, Özduran G, Kuşu M. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Mutfağına Özgü Hellimin Üniversite Öğrencilerindeki Tüketim Miktarlarının ve Sıklığının Değerlendirilmesi. 1. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi, Poster bildirisi, Ankara, 15 - 16 Mart 2019.
  - Hoca M, Özduran G, Susever S. Üniversite Öğrencilerinin Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışlarında Fiziksel Aktivitenin Sürdürülebilirliği. 1. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi, Poster bildirisi, Ankara, 15 - 16 Mart 2019.
  - Özduran G, Hoca M. Tip 2 Diyabet ve İnflamasyon. 2. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi-Endokrin Hastalıklar, Poster Bildirisi, Ankara, 10 - 12 Ekim 2019.
  - Özduran G, Yücecan S. Çevresel Faktörlerin Beden Kütle İndeksi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. 2. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi-Endokrin Hastalıklar, Sözel bildiri, Ankara, 10 - 12 Ekim 2019.
  - Koç P, Dericioğlu Bİ, Özduran G. Şizofrenili Bireylerde Günlük Yaşam Aktiviteleri Eğitiminin Aktivite Performansı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. 2. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve İnovasyon Kongresi, Sözel bildiri, Ankara, 27 - 28 Eylül 2020.

- Koç P, Dericioğlu Bİ, Özduran G. Şizofrenili Bireylerde Depresyon ve Anksiyete, Aktivite Performansını Etkiler Mi?. Uluslararası Farklı Boyutlarıyla Sağlık Konferansı, Sözel bildiri, Online, 12 - 14 Kasım 2020.
- Özduran G., Hoca M, Hacet F, Kuşu M. 18-65 Yaş Arasındaki Kadın Bireylerin Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışlarının Değerlendirilmesi. 4. Halk Sağlığı Günleri Kadın Sağlığı Sempozyumu, Sözel bildiri, Gaziantep, 19 - 20 Aralık 2020.
- Özduran G., Yücecan S. Farklı Eğitim Düzeyindeki Üniversite Öğrencilerinin Sağlıklı Yeme İndeksi ve Diyet Kalitelerinin Değerlendirilmesi. 5. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel bildiri, İstanbul, 19 - 20 Mayıs 2021.
- Özduran G., Yücecan S, Becer E, Vatanserver HS. Kateşin ve Epigallokateşin Gallatın in vitro Parkinson Modelindeki Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri. 5. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel bildiri, İstanbul, 19 - 20 Mayıs 2021.
- Hoca M, Özduran G. Üniversite Öğrencilerinin Ortoreksiya Nervoza Durumları İle Antropometrik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi. 5. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel bildiri, İstanbul, 19 - 20 Mayıs 2021.
- Güçhan Topçu Z, Özduran G. Özel Gereksinimli Çocuklar İle Tipik Gelişen Çocukların Pandemi Dönemindeki Fiziksel Aktivite Düzeyleri ve Yeme Davranışlarının Karşılaştırılması: Kantitatif ve Kalitatif Çalışma. II. Uluslararası Ankara Multidisiplinler Çalışmalar Kongresi, Sözel bildiri, Ankara, 7 - 8 Haziran 2021.
- Hoca M, Elmas C, Kabaran S, Özduran G. Yetişkin bireylerin pandemi öncesi ve pandemi dönemlerindeki sebze-meyve tüketimi ve vitamin-mineral kullanım durumlarının değerlendirilmesi. Uluslararası Gazi Sağlık Bilimleri Kongresi, Sözel bildiri, Ankara, 15 - 17 Aralık 2021.
- Özduran G. Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sürdürülebilir Yaşam için Akdeniz Diyeti Sempozyumu - Akdeniz Diyeti ve Nörodejeneratif Hastalıklar, Konuşmacı, Online, 9 Aralık 2021.

### 8.3. Yazılan Ulusal Kitaplar veya Kitaplarda Bölümler

- Özduran G., Hoca M, Hecer C. A'dan Z'ye Beslenme Kitabı - Diyet Türleri (Kitap Bölümü) - 2022

- Hoca M, Özduran G, Türker PF. Klinik Pediatrik Beslenme Kitabı - Çocukluk Çağında Obezite (Kitap Bölümü - Çeviri) - 2022

#### **8.4. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

- Özduran G, Özkan A. Yetişkin Kadınların Fonksiyonel Besinler Hakkındaki Bilgi Düzeyleri ve Tutumları. Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri V. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, Poster bildirisi, Ankara, 25 - 27 Haziran 2015.

#### **9. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler**

- Türkiye Diyetisyenler Derneği (2015)
- Kıbrıs Türk Diyabet Derneği (2014)

#### **10. Ödüller**

- Nitelikli Çalışma Ödülü [Özduran G, Yücecan S, Becer E, Vatansver HS. Kateşin ve Epigallokateşin Gallatın in vitro Parkinson Modelindeki Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri. 5. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi, Sözel bildiri, Online, 19 - 20 Mayıs 2021.]

#### **11. Bilimsel Kongreler ve Toplantılar**

- 1st International Physical Activity, Nutrition and Health Congress  
November 23 - 26, 2011 (Antalya)
- 2. Ulusal Sağlıklı Yaşam Sempozyumu  
Şubat 16 - 19, 2012 (Ankara)
- Onkoloji Diyetisyenliği Kursu  
Şubat 16 - 19, 2012 (Ankara)
- Hastalıklarda Diyet Tedavisinin Klinik Uygulamalara Yansıması Sempozyumu  
Kasım 16 - 17, 2012 (Ankara)
- 3. Ulusal Sağlıklı Yaşam Sempozyumu  
Mart 28 - 30, 2013 (Ankara)
- Kardiyoloji Diyetisyenliği Kursu  
Mart 28 - 30, 2013 (Ankara)
- Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri IV. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu  
Haziran 27 - 28, 2013 (Ankara)
- Çocuk Hastalıklarında Beslenme Sempozyumu  
Kasım 8 - 9, 2013 (Ankara)
- Temel Nütrisyon Güz Kursu

Kasım 22 - 24, 2013 (Antalya)

- Acıbadem Sağlıklı Yaşam Günleri Sporcu Performansında Beslenmenin Rolü

Şubat 20 - 23, 2014 (İstanbul)

- Spor Diyetisyenliği Kursu

Şubat 20 - 23, 2014 (İstanbul)

- ISO 9001: 2008 Kalite Yönetim Sistemi

Mart 15, 2014 (Ankara)

- ISO 14001: 2004 Çevre Yönetim Sistemi

Mart 16, 2014 (Ankara)

- OHSAS 18001: 2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi

Mart 17, 2014 (Ankara)

- ISO 10002: 2004 Kalite Yönetimi Müşteri Memnuniyeti

Mart 18, 2014 (Ankara)

- Çocukluk ve Ergenlik Döneminde Tip 1 Diyabette Beslenme ve Karbonhidrat Sayımı Kursu

Mart 22 - 23, 2014 (İstanbul)

- 2. Fetal Hayattan Çocukluğa İlk 1000 Gün Gebe ve Çocuk Beslenmesi Kongresi

Mart 27 - 29, 2014 (Ankara)

- IX. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi

Nisan 2 - 5, 2014 (Ankara)

- Gündemimiz Beslenme Semineri

Mayıs 9 - 10, 2014 (Konya)

- Uluslararası Kardiyometabolik Sendrom Doğu Akdeniz Kongresi ve Doğu Akdeniz Sağlık Bilimleri Öğrenci Sempozyumu

Kasım 5 - 9, 2014 (KKTC)

- 4. Ulusal Sağlıklı Yaşam Sempozyumu

Şubat 12 - 15, 2015 (İstanbul)

- Yeme Bozukluğu Diyetisyenliği Kursu

Şubat 12 - 15, 2015 (İstanbul)

- VII. Diyetisyenler Günü Etkinliği Kanserde Beslenme

Mayıs 30, 2015 (KKTC)

- Başkent Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Öğrenci Kolokiyumu

Mayıs 9 - 10, 2015 (Ankara)

- Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri V. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu  
Haziran 25 - 27, 2015 (Ankara)
- Harekete Geç AIDS Bitmedi  
Aralık 1, 2015 (KKTC)
- Süt Ürünlerinin Sağlık İçin Önemi  
Aralık 16, 2015 (KKTC)
- Egzersiz ve Spor Yapan Bireylerde Protein Alımı  
Mart 15, 2016 (KKTC)
- Savaşlar, Göçler ve Hastalıklar  
Mayıs 7, 2016 (KKTC)  
Bağımlı Olma Özgür Ol! Sempozyumu  
Aralık 3, 2016 (KKTC)
- Bilimsel Araştırma Proje Yazım Kursu  
Şubat 3, 2017 (KKTC)
- Besin - İlaç Etkileşimleri Kursu  
Şubat 25 - 26, 2017 (Ankara)
- Eğiticinin Eğitimi  
Haziran 12 - 16, 2017 (KKTC)
- Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi: Gastrointestinal Hastalıklar Kongresi  
Ekim 5 - 7, 2017 (İzmir)
- Önemli Bir İş; Doğru Beslenme  
Kasım 4, 2017 (KKTC)
- Yaşam Tarzı Değişikliği ile Diyabet Önlenebilir Mi?  
Kasım 4, 2017 (KKTC)
- Bir Akdeniz Gerçeği Talasemi Sempozyumu  
Aralık 9, 2017 (KKTC)
- International Congress on Multidisciplinary Approach to Elderly Health and Care  
March 22 - 23, 2018 (Ankara)
- Bariatrik Cerrahi ve Beslenme Sempozyumu  
Mart 24 - 25, 2018 (Ankara)
- The 4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus  
April 19 - 21, 2018 (TRNC)
- Gerçeklerin Işığında Gıdada Kirletilen Bilgiler

Nisan 27, 2018 (KKTC)

- Öğrenciler Konuşuyor 6: Güneşin Gölgesinde MAVİ

Mayıs 5, 2018 (KKTC)

- Diyabette Güncel Beslenme Tedavileri

Mayıs 26, 2018 (KKTC)

- Fiziksel Aktivite ve Mental Sağlık Sempozyumu

Kasım 3, 2019 (KKTC)

- Diyabet ve Mikrobiyota Konferansı

Kasım 12, 2018 (KKTC)

- 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi

Kasım 29 - Aralık 1, 2018 (Ankara)

- 1. Uluslararası Beslenme Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi

Mart 1, 2019 (İstanbul)

- 1. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi

Mart 15 - 16, 2019 (Ankara)

- Bilimsel Araştırma Projeleri Yazım Kursu

Mart 21, 2019 (KKTC)

- 11. Diyetisyenler Günü Etkinlikleri Beslenmede Probiyotikler

Mayıs 25, 2019 (KKTC)

- Bilimsel Makele Yazım Kursu

Haziran 20, 2019 (KKTC)

- 2. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi - Endokrin Hastalıklar

Ekim 10 - 12, 2019 (Ankara)

- Söyleşi: Uzmanıyla Tartışalım Makale Yazımında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Ekim 24, 2019 (Lefkoşa/KKTC)

- Bilimsel Yönleriyle Tamamlayıcı Tıp Yaklaşımları Sempozyumu

Ekim 25, 2019 (Lefkoşa/KKTC)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Sosyal Medya ve Online Diyetler

Ekim 27, 2019, (Girne/KKTC)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Vejetaryen ve Vegan Beslenme

Ekim 27, 2019, (Girne/KKTC)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Dayanıklılık ve Kuvvet Sporları İçin Beslenme ve Menü Planlama

Ekim 27, 2019, (Girne/KKTC)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Yeme Bozuklukları

Ekim 27, 2019, (Girne/KKTC)

- IBM SPSS Uygulamalı İstatistik Veri Analizi Eğitimi

Ocak 25 - 26, 2020 (Ankara)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Onkoloji Beslenme ve Vaka Analizi

Nisan 14, 2020 (Online)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Fitoterapi ve Sporcu Beslenmesi

Nisan 17, 2020 (Online)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Klinikte Beslenme ve Vaka Analizi

Nisan 19, 2020 (Online)

- Beslenme ve Diyetetik Zirvesi, Beyin Bağırsak İlişkisi ile Mikrobiyota

Nisan 19, 2020 (Online)

- Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, I. Bilim Günleri

Haziran, 2020 (Lefkoşa/KKTC-Online)

- Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, I. Kariyer Günleri

Haziran, 2020 (Lefkoşa/KKTC-Online)

- 2. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve İnovasyon Kongresi

Eylül 27 - 28, 2020 (Ankara-Online)

Uluslararası Farklı Boyutlarıyla Sağlık Konferansı

Kasım 12 - 14, 2020 (Online)

- 4. Halk Sağlığı Günleri: Kadın Sağlığı Sempozyumu

Aralık 19 - 20, 2020 (Gaziantep-Online)

- 2. Beslenme ve Diyetetik Sempozyumu

Aralık, 2020 (Online)

- Nutrigüncel Nütrisyon Timleri Dijital Buluşma Toplantısı

Nisan 11, 2021 (Online)

- Nutrigüncel Nütrigüncel Erişkin Nütrisyon Dijital Buluşma Toplantısı

Nisan 18, 2021 (Online)

- II. Aktif Yaşam, Gıda ve Beslenmede Güncel Yaklaşımlar Kongresi

Mayıs, 2021 (Online)

- 5. Uluslararası Beslenme, Obezite ve Toplum Sağlığı Kongresi  
Mayıs, 2021 (İstanbul-Online)
- Bilimsel Veriler Işığında Probiyotikler  
Mayıs 21, 2021 (Online)
- II. Uluslararası Ankara Multidisiplinler Çalışmalar Kongresi  
Haziran, 2021 (Ankara-Online)
- Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, II. Bilim Günleri  
Temmuz, 2021 (Lefkoşa/KKTC-Online)
- 6. Diyabet Tedavisi Sempozyumu, Diyabetik Hemşireliği Kursu ve Diyabetin  
Tıbbi Beslenme Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar Kursu  
Kasım, 2021 (Online)
- I. Ulusal Lokman Hekim Beslenme ve Diyetetik E-Öğrenci Sempozyumu  
Kasım, 2021 (Ankara-Online)

**12. Son İki Yılda Verdiği Lisans Düzeyindeki Dersler**  
**2020 - 2021 Akademik Yılı Güz Dönemi**

<b>Bölüm</b>	<b>Dersin Kodu</b>	<b>Dersin Adı</b>	<b>Kredi</b>	<b>AKTS</b>
Beslenme ve Diyetetik Türkçe	BES 105	Mesleki Oryantasyon I	1	1
	BES 113	Beslenme İlkeleri I	3	6
	BES 207	Beslenme ve Sağlıklı Yaşam	2	3
	BES 211	Afet ve Beslenme	1	3
	BES 231	Besin Kimyası ve Analizleri I	3	5
	BES 421	Besin İlaç Etkileşimi	2	4
Beslenme ve Diyetetik İngilizce	NAD 421	Nutrient Drug Interaction	2	4
Acil Yardım ve Afet Yönetimi	AAAY 309	Afetlerde Beslenme	2	3



Ergoterapi	ERG 105	Sağlıklı Yaşam Stratejileri	2	3
	ERG 403	Klinik Eğitim I	4	5
	ERG 405	Klinik Eğitim II	4	5
	ERG 419	Klinik Eğitim V	4	6
Ortak Dersler	SCM 120	Sağlıklı Yaşam Stratejileri	4	4
Beslenme ve Diyetetik Türkçe	YBD 105	Mesleki Oryantasyon I	1	1
	YBD 113	Beslenme İlkeleri I	3	6
	YBD 207	Beslenme ve Sağlıklı Yaşam	2	3
	YBD 211	Afet ve Beslenme	1	3
	YBD 231	Besin Kimyası ve Analizleri I	3	5
Hemşirelik Bölümü	BES 201	Beslenme İlkeleri	2	3

### 2020 - 2021 Akademik Yılı Bahar Dönemi

Bölüm	Dersin Kodu	Dersin Adı	Kredi	AKTS
Beslenme ve Diyetetik Türkçe	BES 106	Mesleki Oryantasyon II	1	1
	BES 114	Beslenme İlkeleri II	3	6
	BES 232	Besin Kimyası ve Analizleri II	3	5
	BES 356	Bilimsel Yayın Analizi	2	3
	BES 424	Besin İlaç Etkileşimi	2	4
Beslenme ve Diyetetik İngilizce	NAD 232	Food Chemistry and Analyses II	3	5
	NAD 424	Nutrient Drug Interaction	2	4

Ergoterapi	ERG 210	ERG Mesleki Uygulama I	6	6
	ERG 310	ERG Mesleki Uygulama II	6	6
	ERG 404	Klinik Eğitim III	4	5
	ERG 406	Klinik Eğitim IV	4	5
	ERG 416	Klinik Eğitim VI	4	6
Ortak Dersler	SCM 120	Sağlıklı Yaşam Stratejileri	4	4
Beslenme ve Diyetetik Türkçe	YBD 106	Mesleki Oryantasyon II	1	1
	YBD 114	Beslenme İlkeleri II	3	6
	YBD 232	Besin Kimyası ve Analizleri II	3	5
	YBD 356	Bilimsel Yayın Analizi	2	3
Hemşirelik Bölümü	BES 201	Beslenme İlkeleri	2	3

### 2021 - 2022 Akademik Yılı Güz Dönemi

Bölüm	Dersin Kodu	Dersin Adı	Kredi	AKTS
Beslenme ve Diyetetik Türkçe	BES 105	Mesleki Oryantasyon I	1	1
	BES 113	Beslenme İlkeleri I	3,5	6
	BES 207	Beslenme ve Sağlıklı Yaşam	2	3
	BES 211	Afet ve Beslenme	1	3
	BES 231	Besin Kimyası ve Analizleri I	3,5	5
	BES 421	Besin İlaç Etkileşimi	2	4
Beslenme ve	NAD 231	Food Chemistry and Analyses I	3,5	5

Diyetetik İngilizce	NAD 421	Nutrient Drug Interaction	2	4
Acil Yardım ve Afet Yönetimi	AA Y 309	Afetlerde Beslenme	2	3
Ergoterapi	ERG 105	Sağlıklı Yaşam Stratejileri	2	3
	ERG 403	Klinik Eğitim I	4	5
	ERG 405	Klinik Eğitim II	4	5
	ERG 419	Klinik Eğitim V	4	6
Ortak Dersler	SCM 120	Sağlıklı Yaşam Stratejileri	4	4
Beslenme ve Diyetetik Türkçe	YBD 105	Mesleki Oryantasyon I	1	1
	YBD 113	Beslenme İlkeleri I	3,5	6
	YBD 207	Beslenme ve Sağlıklı Yaşam	2	3
	YBD 211	Afet ve Beslenme	1	3
	YBD 231	Besin Kimyası ve Analizleri I	3,5	5
	YBD 421	Besin İlaç Etkileşimi	2	4
Hemşirelik Bölümü	BES 201	Beslenme İlkeleri	2	3

### 13. Projelerde Yaptığı Görevler

- 60 + Tazelenme Üniversitesi – Girne Üniversitesi dersleri kapsamında “Besin Grupları ve Optimal Beslenme” ve “Su ve Sağlık” konulu ders anlatımları - Konuşmacı (Mart ve Nisan 2019)