



**ALFA HUMULENİN SH-SY5Y HÜCRE HATTI ÜZERİNDE
OLUŞTURULMUŞ İN VİTRO KO-KÜLTÜR MODELİNDE NÖROPROTEKTİF
VE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Perihan Ezgi TUNCER

ESKİŞEHİR 2021

**ALFA HUMULENİN SH-SY5Y HÜCRE HATTI ÜZERİNDE
OLUŞTURULMUŞ İN VİTRO KO-KÜLTÜR MODELİNDE NÖROPROTEKTİF
VE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Perihan Ezgi TUNCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2021

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1905S070 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

ALFA HUMULENİN SH-SY5Y HÜCRE HATTI ÜZERİNDE OLUŞTURULMUŞ İN VİTRO KO-KÜLTÜR MODELİNDE NÖROPROTEKTİF VE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Perihan Ezgi TUNCER

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2021

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Latince ismi ile Humulus Lupulus'un şerbetçiotu bitkisinin majör etken maddesi olan Alfa Humulen, üç eşlenmemiş C=C çift bağ içeren üç izopren biriminden oluşan monosiklik bir seskiterpendir. Şerbetçiotundan başka kenevir, adaçayı, fesleğen ve ginseng bitkilerinde de yaygın olarak bulunur. Aynı zamanda Alfa humulen, Alfa karyofilen adıyla da bilinmektedir. Alfa humulenin; anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen ve lokal anestezi gibi birçok etkisi vardır. Bu tezde, kemik iliği kökenli insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücre hattında Alfa humulenin sitotoksik etkilerinin konsantrasyon aralığı belirlenebilmek için MTT testi kullanılmıştır. Buna ek olarak, H₂O₂ tarafından indüklenen nörotoksisite modelinde Alfa humulenin nöroprotektif etkileri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA-DP) ile farklılaşmamış SH-SY5Y üzerinde IC₅₀ değeri 221 µg/mL ve farklılaşmış SH-SY5Y üzerinde IC₅₀ değeri > 400 µg/mL'dir. AO/PI boyama yöntemi ile apoptotik etki seviyeleri belirlenmiştir. SH-SY5Y hücre hattı ve LPS ile stimüle edilmiş THP-1 hücre hattı birlikte inkübe edilerek *in vitro* ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan *in vitro* ko-kültür modelinde LPS stimülasyonu kullanılarak Alfa humulenin immünolojik etkilerini belirlemek amacı ile Cytation 3 Multi-Mode Reader'de floresans ölçümleri alınmış ve birden çok bağımsız görüntü çekilmiştir. Apoptotik etkide Alfa humulen H₂O₂'nin neden olduğu hücre hasarını azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Alfa Humulen, Nöroprotektif etki, ko-kültür model, RTCA-DP

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NEUROPROTECTIVE AND IMMUNOLOGICAL EFFECTS OF ALPHA HUMULENE *IN VITRO* CO-CULTURE MODEL ON SH-SY5Y CELL LINE

Perihan Ezgi TUNCER

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Alpha humulene, the major active ingredient of the *Humulus lupulus* hops plant with its Latin name, is a monocyclic sesquiterpene consisting of three isoprene units containing three unpaired C=C double bonds. Apart from hops, cannabis is commonly found in sage, basil and ginseng plants. Alpha humulene is also known as alpha-Caryophyllene. Alpha humulene; it has many effects such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, anticancer and local anesthetic. In this thesis, the MTT test was used to determine the concentration range of the cytotoxic effects of alpha humulene in the SH-SY5Y cell line, a bone marrow derived human neuroblastoma cell line. In addition, the neuroprotective effects of Alpha humulene in the model of neurotoxicity induced by H₂O₂, the IC₅₀ value of Alpha humulene on undifferentiated and differentiated SH-SY5Y was determined 221 µg / mL and > 400 µg / mL cells using the Real-time cell analysis system (xCELLigence RTCA-DP). Apoptotic effect levels were determined by AO / PI staining method. The SH-SY5Y cell line and the LPS stimulated THP-1 cell line were incubated together to establish an *in vitro* co-culture model. In the *in vitro* co-culture model established, fluorescence measurements were taken in Cytation 3 Multi-Mode Reader to determine the immunological effects of Alpha humulene using LPS stimulation and multiple independent images were taken. The apoptotic effect caused by cellular damage caused by H₂O₂ alpha humulene was reduced.

Keywords: Alpha Humulene, Neuroprotective effect, co-culture model, RTCA-DP

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesi için hayallerime dokunan, sonsuz güvendiğim bilgi birikimi ile bana ışık tutan, anlayışı ile her zaman desteğini hissettiğim ve hissedeceğim, akademisyenliği ve kişiliği ile örnek aldığım değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Hem deneyimleri hem de bilgi birikimi ile her zaman bana yardımcı olup desteğini hissettiğim sevgili hocam sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Her zaman desteği ve yardımlarıyla yanımda olan sayın hocam Araş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya; Araş. Gör. Dr. Elif KAYA TİLKİ'ye,

Adaptasyon sürecim ve sonrasında edindiği tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşan arkadaşım Nalan BİRİZ'e; pozitif enerjisi ile bana destek olan arkadaşım Fidan BAYRAMOVA'ya,

Maddi ve manevi desteklerini benden asla esirgemeyen sonsuz sabır ve karşılıksız sevgilerini her zaman hissettiğim annem Hülya; babam Vefa ve kardeşim Mert TUNCER'e,

Teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘bilimsel intihal tespit programı’yla tarandığını ve hiçbir şekilde ‘intihal içermediğini’ beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KAPAK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Oksidatif Stres	3
2.2. Nörodejenerasyon	5
2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları	5
2.3.1. Nekroz	6
2.3.2. Apoptoz	7
2.3.3. Otofaji	9
2.3.4. Piroptozis	10
2.3.5. Kaspaz-bağımsız hücre ölümü	10
2.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidatif Stres	10
2.4.1. Alzheimer hastalığı (AH) ve oksidatif stres	11
2.4.2. Parkinson Hastalığı (PH) ve oksidatif stres	12
2.4.3. Huntington hastalığı (HH) ve oksidatif stres	13
2.4.4. Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve oksidatif stres ...	14

	<u>Sayfa</u>
2.4.5. Spinoserebellar ataksi hastalığı (SAH) ve oksidatif stres	14
2.5. Kannabinoidler	15
2.5.1. Kannabinoidler ve immün sistem	15
2.5.2. Kannabinoidlerin nöroprotektif etkisi	16
2.6. Alfa Humulen (α -Humulen)	17
3. GEREÇLER	19
3.1. Hücre Hatları	19
3.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı	19
3.1.2. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattı	19
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Gereçler ve Cihazlar	19
3.2.1. Kimyasal maddeler, gereçler ve cihazlar	19
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanması	20
3.3.1. Retinoik asit (RA)	20
3.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	21
3.3.3. Alfa Humulen	21
3.3.4. <i>E.coli</i> 0111:B4 Lipopolisakkarit (LPS)	21
3.3.5. Akridin Oranj/ Propidyum İyodür	21
4. YÖNTEMLER	22
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	22
4.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının kültüre edilmesi	22
4.1.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının nöronal fenotipe farklılaştırılması	23
4.1.3. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattının kültüre edilmesi	23
4.2. MTT Yöntemiyle Antiproliferatif Etkinin Belirlenmesi	24
4.2.1. Alfa humulenin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi	25

	<u>Sayfa</u>
4.2.2. SH-SY5Y hücre hattı üzerinde H ₂ O ₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi	25
4.2.3. SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	26
4.2.4. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi	26
4.2.5. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde H ₂ O ₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi	27
4.2.6. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	27
4.2.7. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve <i>E.coli</i> LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	28
4.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y Hücre Canlılığının Belirlenmesi Çalışmaları	28
4.3.1. SH-SY5Y hücreleri üzerinde H ₂ O ₂ IC ₅₀ Değerlerinin Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) ile Belirlenmesi	28
4.3.2. SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin IC ₅₀ Değerlerinin Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) ile Belirlenmesi	30

	<u>Sayfa</u>
4.4. Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodür (PI) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi	30
4.5. İstatistiksel Analiz	31
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	32
5.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü ve Farklılaştırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi	32
5.2. MTT Yöntemiyle Antiproliferatif Etkilerin Değerlendirilmesi	33
5.2.1. MTT yöntemiyle SH-SY5Y hücreleri üzerinde antiproliferatif etkinin değerlendirilmesi	33
5.2.2. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve <i>E.coli</i> LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesi	39
5.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y ve Hücre Canlılığı Çalışmalarının Değerlendirilmesi	40
5.3.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle SH-SY5Y hücre canlılığının değerlendirilmesi	41
5.3.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre canlılığının değerlendirilmesi	45
5.4. Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodür Boyama ile Apoptozun Değerlendirilmesi	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKÇA	58
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Endojen Oksidanlar	4
Tablo 2.2. ROT ve RNT Listesi	4
Tablo 5.1. SH-SY5Y hücrelerin % canlılıkları	35
Tablo 5.2. SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları	35
Tablo 5.3. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları	37
Tablo 5.4. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları	37
Tablo 5.5. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları	40
Tablo 5.6. Alfa humulenin SH-SY5Y hücre hattındaki apoptotik etkilerinin % canlılıkları	49
Tablo 5.7. Alfa humulenin farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattındaki apoptotik etkilerinin % canlılıkları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Apoptoz ve nekroz geçiren hücrelerin yapısal değişiklikleri ...	9
Şekil 2.2. Amiloid- β 'nin etkileri	12
Şekil 2.3. PH'de Oksidatif stres	13
Şekil 2.4. Huntington hastalığında (HH) protein agregatları ve Oksidatif stres	14
Şekil 2.5. α -Humulenin kimyasal ve üç boyutlu kimyasal yapısı	18
Şekil 4.1. MTT boyasının kimyasal ve üç boyutlu kimyasal yapısı	24
Şekil 5.1. Alfa humulen ve H_2O_2 konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	34
Şekil 5.2. Alfa humulen ve H_2O_2 konsantrasyonlarının farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	36
Şekil 5.3. Alfa humulen ve H_2O_2 konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında ve <i>E.coli</i> LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	39
Şekil 5.4. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10, 100 ve 400 μM H_2O_2 'nin konsantrasyonlarının RTCA-DP analiz sistemi ile 24 saatlik hücre proliferasyon eğrileri	41
Şekil 5.5. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10, 100 ve 400 μM H_2O_2 'nin konsantrasyonlarının RTCA-DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri	41
Şekil 5.6. RTCA-DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10, 100 ve 400 μM H_2O_2 konsantrasyonlarının slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC_{50} değerleri	42
Şekil 5.7. RTCA-DP Sisteminde SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde H_2O_2 'nin Konsantrasyonlarının 24. saatteki Slope Grafiği	42

Şekil 5.8.	RTCA-DP Sisteminde SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde H_2O_2 'nin Konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatteki Slope Grafiği	43
Şekil 5.9.	SH-SY5Y hücrelerinde 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ Alfa humulenin konsantrasyonlarının ve 42 μM H_2O_2 'nin RTCA-DP analiz sistemi ile 24 saatlik hücre proliferasyon eğrileri ...	43
Şekil 5.10.	RTCA-DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ Alfa humulenin 42 μM H_2O_2 konsantrasyonlarının slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC_{50} değerleri	44
Şekil 5.11.	RTCA-DP Sisteminde SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Alfa humulenin Konsantrasyonlarının + H_2O_2 'nin 24. saatteki Slope Grafiği	44
Şekil 5.12.	RTCA-DP Sisteminde SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Alfa humulen Konsantrasyonlarının + H_2O_2 'nin 24. ve 48. saatteki Slope Grafiği	45
Şekil 5.13.	Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ Alfa humulen konsantrasyonlarının ve 42 μM H_2O_2 'nin RTCA-DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri	45
Şekil 5.14.	RTCA-DP sisteminde farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ Alfa humulenin 42 μM + H_2O_2 konsantrasyonlarının slope grafiği'ne göre hesaplanan 48. saat IC_{50} değeri	46
Şekil 5.15.	RTCA-DP Sisteminde farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Alfa humulenin Konsantrasyonlarının + H_2O_2 'nin Slope Grafiği	46
Şekil 5.16.	Alfa humulen ve H_2O_2 konsantrasyonlarının farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında AO/PI boyama yöntemine göre belirlenen floresans ölçümlerinin % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	49

Şekil 5.17. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve <i>E.coli</i> LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin AO/PI boyama yöntemine göre belirlenen floresans ölçümlerinin % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	52
---	----



GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 4.1. SH-SY5Y hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (20X)	23
Görsel 4.2. THP-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (20X)	24
Görsel 4.3. Gerçek zamanlı hücre analizi çalışmalarında kullanılan xCELLigence RTCA-DP cihazı	29
Görsel 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (10X)	33
Görsel 5.2. SH-SY5Y hücre hattı ve <i>E.coli</i> LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde AO / PI çift boyama kullanılarak apoptozun mikroskopik tespiti (10X)	50
Görsel 5.3. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve <i>E.coli</i> LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde AO / PI çift boyama kullanılarak apoptozun mikroskopik tespiti (Genel görüntü)	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTB	: Aktin-beta
AH	: Alzheimer hastalığı
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
AO	: Akridin oranj
APP	: Amiloid prekürsör proteini
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerika Tip Kültür Koleksiyonu)
ATP	: Adenozin trifosfat
ATXN1	: Ataksin 1
A β	: Amiloid beta
BDNF	: Beyin-türevli nörotrofik faktör
CB1	: Kannabinoid-1
CB2	: Kannabinoid-2
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FBS	: Fötal sığır serumu
GSK-3	: Glikojen sentaz kinaz-3
HCl	: Hidroklorik asit
HH	: Huntington hastalığı
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HOO [•]	: Hidroperoksil radikali
LOO [•]	: Lipit Peroksil radikali
LPS	: Lipopolisakkarit
LRRK2	: Lösin açısından zengin tekrar kinaz 2

mHTT	: Mutant huntingtin proteini
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NCCD	: Hücre ölümü isimlendirme komitesi
NFY	: Nörofibriler yumak
NK	: Doğal öldürücü hücreler
NO [•]	: Nitrik oksit
NO ₂ [•]	: Nitrojen oksit radikali
Nox2	: NADPH oksidaz 2
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit anyon radikali
OH [•]	: Hidroksil radikali
PBS	: Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PH	: Parkinson hastalığı
PI	: Propidium iyodür
PINK1	: PTEN ile indüklenen kinaz 1
RA	: Retinoik asit
ROO [•]	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
RNA	: Ribonükleik asit
RNT	: Reaktif nitrojen türevleri
RTCA-DP	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
RT-PCR	: Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyon

SAH	: Spinoserebellar ataksi hastalığı
SCA	: Spinoserebellar ataksi
SOD1	: Süperoksit dismutaz 1
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kannabinoidler, Cannabaceae familyasına ait *Eugenia caryophyllus*, *Humulus lupulus*, *Teucrium marum* ve *Lantana achyranthifolia* gibi türlerin uçuğu yağlarında bulunan kannabinoid reseptörleri aracılığıyla etki gösteren bir grup kimyasal bileşikler kapsayan metabolitlerdir. Kannabinoidler, sekonder metabolitlerden olan terpenlerle birlikte görev alırlar. Karyofilenler, beta karyofilen, alfa karyofilen (Alfa humulen) ve izokaryofilen içeren seskiterpenlerdir. Alfa humulen *Humulus lupulus* L. Şerbetçi otu bitkisinin uçucu yağlarında bulunan üç izopiren birimden oluşan monosiklik seskiterpendir (Neuenschwander vd., 2012). Alfa humulenin anti-inflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser, antioksidan ve lokal anestezik etkileri vardır (Legault ve Pichette, 2010).

Evrimsel süreçte insan ömrünün uzamasıyla birlikte nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığında da artış görülmektedir. Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH), Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Spinoserebellar ataksi hastalığı (SAH) yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklardır (Gitler vd., 2017). Gelişen teknoloji ile birlikte yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda bile maalesef bu hastalıklar üzerinde etkin bir tedavi bulunmamaktadır.

Organizmaların yaşamsal faaliyetleri açısından önemli olan O₂ mitokondriyal redoks tepkimelerinde kullanılır ve bu tepkimeler sonucunda reaktif oksijen türevleri oluşmaktadır. ROT üretiminin fazla olması durumunda oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stresin durumunda makromoleküler düzeyde hasarların meydana gelmesi sonucu nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

Literatürde kannabinoidlerin toksisitelerinin düşük olmasından ötürü yararlı bir terapötik ajan olduğu ve nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmasının uygun olduğu kabul edilmektedir (Olives vd., 2020, Scuderi vd., 2009).

Tez kapsamında Alfa humulenin antiproliferatif ve antiapoptotik etkilerini araştırmak amacıyla öncelikle SH-SY5Y hücreleri üzerinde MTT yöntemiyle toksik/toksik olmayan konsantrasyonlar belirlenmiştir. Daha sonra nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde H₂O₂ ile indüklenen nörotoksosite modeli oluşturulmuş ve Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin hücre canlılık değerleri hem MTT yöntemiyle hem de xCELLigence RTCA-DP gerçek zamanlı

hücre analiz sistemiyle belirlenmiştir. Nörotoksisite modeline ek olarak, SH-SY5Y hücre hattı ve LPS ile stimüle edilmiş THP-1 hücre hattı birlikte inkübe edilerek *in vitro* ko-kültür modeli oluşturulmuştur.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin antiproliferatif, nöroprotektif ve antiapoptotik etkileri belirlenmiştir.



2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Oksidatif Stres

Moleküler oksijenin (O_2), hücresel işleyiş ve organizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri açısından biyolojideki rolü çok önemlidir (Singh vd., 2019). Solunum yoluyla alınan O_2 'nin büyük bir kısmı besinlerden enerji eldesi için hücrelerde mitokondriyal redoks tepkimelerinde kullanılmaktadır. Mitokondriyal redoks tepkimeleri sonucunda yüksek enerji oluşumunun yanı sıra düşük miktarda reaktif oksijen türevleri (ROT) ve/veya reaktif nitrojen türevleri (RNT) gibi serbest radikal çeşitleri oluşmaktadır. Oksijen tüm canlı hücreler için hayati önem taşıyor olsa da diğer yandan potansiyel olarak aşırı derecede tehlikeli olabilmektedir (Uttara vd., 2009). Oksijenin zararlı etkilerinin nedeni olarak reaktif oksijen türevleri (ROT) olarak bilinen istenmeyen metabolik yan ürünlerin oluşumu olduğu düşünülmektedir (Chiurchiù vd., 2015). ROT'lar, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksil radikali ($HOO^{\bullet}$), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$), lipid peroksil radikali ($LOO^{\bullet}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi oksijen radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi O_2 'nin radikal olmayan türlerini içermektedirler (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Reaktif nitrojen türevleri (RNT) ise nitrik oksit ve ($NO^{\bullet}$) nitrojen oksit radikallerini ($NO_2^{\bullet}$) içermektedir. Reaktif oksijen türevlerinin üretimindeki fazlalık ile reaktif ara ürünleri detoksifiye etme ve çıkan hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. (Manke vd., 2013). Oksidatif stres makromoleküler hasara neden olarak ateroskleroz, diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklara ve yaşlanmaya yol açabilmektedir (Ray vd., 2012).

Tablo 2.1. Endojen Oksidanlar (Birben vd.,2012)

Oksidan	Formül	Reaksiyon Denklemi
Süperoksit anyon	$O_2^{\bullet-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\bullet-} + H^+$ $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$Hipoksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow Ksantin + H_2O_2$ $Ksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow \ddot{U}rik\ asit + H_2O_2$
Hidroksil radikal	$OH^{\bullet}$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$
Peroksil radikalleri	$ROO^{\bullet}$	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$
Hidroperoksil radikali	$HOO^{\bullet}$	$H_2O + O_2^- \leftrightarrow HOO^{\bullet} + OH^-$

Tablo 2.2. ROT ve RNT Listesi (Dasuri vd.,2013)

İsim	Sembol
Süperoksit anyon	$O_2^{\bullet-}$
Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\bullet}$
Peroksil	$ROO^{\bullet}$
Tekli Oksijen	1O_2
Nitrik Oksit	$NO^{\bullet}$
Peroksi Nitril	$ONOO^-$
Nitroksil	HNO
Nitrit	NO_2^-
Nitrat	NO_3^-
Karbon Monoksit	CO

2.2. Nörodejenerasyon

Beyin, işlevini gerçekleştirebilmek için devamlı olarak oksijen ve glikoza ihtiyaç duymaktadır (Nistico vd., 2008). Toplam vücut ağırlığının yaklaşık olarak %2'sini beyin oluşturmaktadır. Solunum yoluyla vücuda alınan total oksijenin yaklaşık %20'den fazlası ve glikoz tüketiminin büyük bir kısmı beyin tarafından kullanılmaktadır. Beyinde meydana gelen metabolik olaylarda çoğunlukla nöronlar ve astrositler sorumludur (Halliwell, 2006). Beynin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için fazla miktarda oksijen tüketilmektedir. Hiperoksi olarak adlandırılan oksijen zehirlenmesi meydana geldiğinde oksijen ROT artışına sebep olarak nöronlarda toksik etki oluşturmaktadır. ROT üretiminin artması, antioksidan sisteminin düzensiz işlemesi durumunda beyinde hücre ölümü ve nörodejenerasyon meydana gelmektedir (Angelova ve Abramov, 2018). Nörodejenerasyona neden olan ROT'lar, H_2O_2 , O_2^- ve yüksek oranda reaktif $OH^\bullet$ içermektedir. Reaktif oksijen türevlerinden yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ($^\bullet OH$), DNA bazlarıyla kolayca reaksiyona girmekte ve hasara yol açmaktadır (Cooke vd., 2003). DNA'da oluşan hasar onarılamayacak düzeye ulaştığında ise hücre ölüme gitmektedir. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre nekrozis ya da apoptozis olarak iki tip hücre ölümü meydana gelmektedir (Saito vd., 2009).

2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Organizmada tanımlanan 200'den fazla farklı tipte hücre bulunmaktadır. Tanımlanan hücrelerin her birinin yaşam süresi birbirinden farklılık göstermekle birlikte örneğin; nötrofiller için dokuda yaşam süreleri 4 gün, eritrositler için kanda yaşam süreleri 120 gün, sinir hücreleri için ise yaklaşık 50-100 yıldır. Organizmada, embriyonik gelişim ile birlikte önem taşıyan hücre ölümü erişkin süreçte de devam etmektedir. Programlanmış hücre ölümü farklı biyolojik yollarda rol oynayan bir mekanizmadır. Kanser, otoimmünite, nörodejenerasyon gibi farklı patolojik durumların meydana gelmesi hücre ölümünün az ya da fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Elmore, 2007). Yapılan çalışmalar ışığında yakın zamana kadar hücre ölümünün sadece iki yol ile meydana geldiği düşünülmekteydi. Birinci yol, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, ikinci yol ise raslantısal olarak ortaya çıkan, programlanmamış hücre ölümü olarak tanımlanan nekrozdur.

Teknolojinin gelişimi ve bilimin ilerlemesi ile birlikte, 1960 yılından itibaren programlı hücre ölüm mekanizması olarak adlandırılan apoptoza alternatif olarak başka hücre ölüm mekanizmalarının olduğu ortaya çıkmıştır (Elmore, 2007). Hücre ölüm mekanizmaları morfolojilerine, biyokimyasal yapılarına ve fonksiyonel özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Paraptozis, piroptozis, pronekrozis, onkozis gibi daha pek çok ölüm şekli ise ‘atipik hücre ölüm modelleri’ olarak tanımlanmıştır (Kroemer vd., 2009). Organizmada, morfolojik olarak üç tip hücre ölüm mekanizması tanımlanmaktadır. Bu mekanizmalar, apoptoz, nekroz ve nekroza benzer morfolojik özelliklere sahip olan non-lizozomal parçalanmadır (Elmore, 2007).

Yapılan çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre apoptoz, nekroz, otofajik hücre ölümü ve eksitotoksisite nöronal hücre ölümüne neden olan mekanizmalardır. Apoptoz, nekroz, otofajik hücre ölümü ve eksitotoksisitenin mekanizmaları haricinde paraptozis, piroptozis, pronekrozis, onkozis gibi hücre ölüm mekanizması da bulunmasına rağmen nöronlar üzerinde çok fazla çalışma yapılmadığı için nörodejenerasyondaki hücre ölümünde bu mekanizmaların henüz rolü bilinmemektedir (Bredesen vd., 2006).

2.3.1. Nekroz

Nekroz, hücrede meydana gelen yaralanmalar sonucu hasarlı hücrenin şişerek patlamasına neden olan hücre ölüm mekanizmalarından biridir. Nekroz sonucunda hücre içeriğinin dağılmasının çevre hücrelere zarar vermesi nedeniyle birlikte inflamasyon da bu duruma eşlik etmektedir. Nekrotik süreçte programsız ve kontrolsüz olarak hücre ölümüne gider; fakat nekrozdan farklı bir mekanizma olan apoptoz ise hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve bu süreci programlı, kontrollü ve düzenli bir biçimde sürdürmektedir. Nekrozun aksine apoptozda inflamasyon eşlik etmez ve çevre hücreler zarar görmeden fagositoz yoluyla hücre apoptotik cisimcikler halinde elimine edilmektedir (Lakna, 2017). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda nekrozun başlatılması ve kontrolünde de programlı kontrol mekanizmalarının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. 2005’de Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) tarafından nekroz olayında hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrede şişme ve organellerde parçalanmanın

görülmesinden ötürü bir terim olarak tanımlanması uygun görülmüştür (Kroemer vd., 2009).

Genellikle beyindeki akut iskemik veya travmatik hasarlar sonucu merkezi sinir sisteminde reaktif oksijen türevleri (ROT), glutamat, kalsiyum ve sitokinler gibi eksitotoksinlerin oluşumuna yol açarak nekrozu meydana getirmektedir (Delegge ve Smoke, 2008). Hücre hasarı sonucunda hücrede gelişen geri dönüşü olmayan hasar, hücre ölümüne neden olmaktadır. Nekrotik hücre ölümü veya nekrozun meydana gelmesinde tanımlanabilen bir biyokimyasal yolak olmadığından dolayı programlı bir hücre ölümü değildir. Nekrotik hücre ölümü, programlı bir hücre ölümü olmamasından dolayı genetik olarak belirleyici olmayan bir olay olarak kabul edilse de tümör nekroz faktörünün nekrozu indüklediğinin araştırılması bu düşüncenin aksini göstermektedir (Chi vd., 2018).

2.3.2. Apoptoz

Kerr ve diğerleri tarafından ilk kez 1972’ de nekrozdan morfolojik olarak farklılık gösteren hücre ölüm mekanizması olarak apoptozis terimi tanımlanmıştır (Kerr vd., 1972). Çok hücreli organizmaların normal gelişim sırasındaki programlanmış hücre ölüm mekanizması apoptoz olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz, reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ile birlikte meydana gelen pek çok hücrenin sitoplazmasında aktif halde bulunan kaspaz gibi enzimlerin aktiflenmesi ile tetiklenen durumlar sonrasında veya oksidatif strese hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik gövde oluşumu gibi karakteristik süreçler ile meydana gelmektedir (Sönmez vd., 2018). Memeli hücrelerinde kaspaz aktivasyonunu başlatan, tanımlanmış iki tane yolak vardır. Bunlar intrinsik (veya mitokondriyal) yolak ve ekstrinsik (veya ölüm reseptörü) yolaktır. Ekstrinsik yolakta, hücre dışı ligandların bağlanması ile ölüm reseptörleri aktive edilmektedir. Her iki yolakta da mitokondriyal membran geçirgenliği değişmektedir. Mikrotübül ile ilişkili olan Tau önemli bir patojenik proteindir, doğaları gereği yapılandırılmamış olan bu proteinler farklı hastalık durumlarında intrinsik yolak ile düzenli yapılar oluşturmak için birbirleriyle etkileşime geçmektedirler (Chang vd., 2018). Apoptoz süreci genel olarak dört aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak, büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör süpresör genler ile apoptozun başlatılması, hücre içi protezların aktivasyonu,

biyokimyasal ve morfolojik yapıda meydana gelen değişiklikler son aşama ise apoptotik cisimlerin fagositoz yoluyla eliminasyonudur (Kar ve Sivamani, 2015).

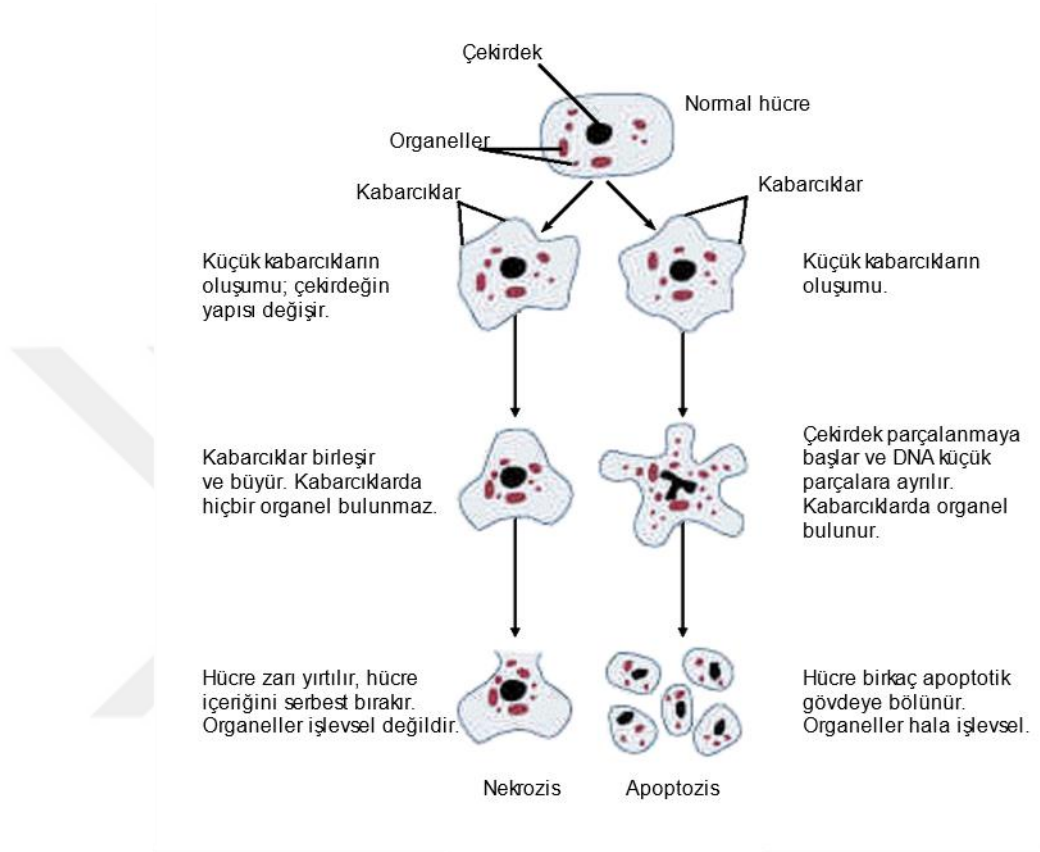
Hücreler fizyolojik ya da patolojik orijinli olarak apoptoza yönelmektedir (Savitskaya ve Onishchenko, 2015).

✓ **Fizyolojik nedenler:**

- Embriyonik gelişim
- Doku modellemesi
- İmmün hücre seleksiyonu

✓ **Patolojik nedenler:**

- Kronik viral hastalıklar
- Ateroskleroz
- Nörodejeneratif hastalıklar
- Tip I diyabet
- Akut miyokard infarktüsü
- Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı
- Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu (AIDS)
- Malign tümörler



Şekil 2.1. Apoptoz ve nekroz geçiren hücrelerin yapısal değişiklikleri (Lakna, 2017).

2.3.3. Otofaji

Hücre için alternatif diğer bir hücre ölüm modeli otofajidir. Kelime anlamı olarak kendi kendini (oto) yeme (faji) anlamına gelen, hücre kendi bileşenlerini kendi içinde sindirmekte olduğu için bu ölüm modeline otofaji adı verilmiştir. Otofaji hücre biyolojisinde hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal enzim aktivitesiyle yıkılma mekanizması olarak adlandırılmaktadır. Otofaji genetik olarak kabul edilmektedir. 1990 yılında Oshumi ve arkadaşlarının mayalarda yaptıkları bir çalışmada 30 ATG (otofaji ile bağlantılı genler) tanımlanmıştır (Gozuacik ve Kimchi, 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalarda hücrelerdeki otofaji bozukluklarının kas hastalıkları, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve Huntington, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisinden sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır

(Park vd., 2020) Hücrede "otofaji oluşum merkezi" (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde endoplasmik retikulum ile golgi cisimciğinin arasında olduğu düşünülen bölgelerdir (Abounit vd., 2012).

Nekroz, apoptoz ve otofaji dışında; diğer bir hücre ölüm mekanizması ise granzim ve kalpain yolağıdır. Kalsiyum bağımlı sistein proteaz enzim ailesinde yer alan kalpain kaspazların substratlarına benzer substratları ve prokaspazları keserek onların aktive olmasını sağlamaktadır. Granzimler ise T lenfosit ve NK (Doğal öldürücü hücreler) hücreleri virüsle enfekte hücreleri elemek amacıyla granülo-ekzositoz yolağında kullanılmaktadır.

2.3.4. Piroptozis

Kaspaz-bağımlı hücre ölüm yolaklarından birisi olan piroptozis, apoptozdan farklı özelliklere sahiptir. Piroptozis apoptoz gibi inflamasyon özelliği taşıyan hücre ölüm yolağı olduğu için bu ismi almıştır. Piroptozis hücre ölümünde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişimler apoptozdan farklıdır. Piroptozisin ana fonksiyonu konak hücreyi ortadan kaldırarak basit enfeksiyonun kontrol altında tutulmasıdır. Piroptozisde hücre şişerek aniden plazma membran permeabilizasyonu gerçekleşirken, apoptozda mitokondriyal permeabilizasyon görülür ve piroptoziste bu görülmez (Bergsbaken vd., 2009).

2.3.5. Kaspaz-bağımsız hücre ölümü

Kaspaz bağımsız hücre ölümü apoptozis ile benzerlikler gösterse de morfolojik ve biyokimyasal açıdan farklılıklar göstermektedir. Kaspaz-bağımsız hücre ölümünde kaspaz aktivitesi yoktur. Mitokondriyal permeabilizasyonun genellikle dönüşü yoktur. Bununla birlikte mitokodriyal dış membran permeabilizasyonu pro-apoptozla ilişkili olduğunda meydana gelen hücre ölümünde kaspaz aktivesinin olmamasından dolayı kaspaz bağımsız hücre ölümü olarak ifade edilmektedir (Tait ve Green, 2008).

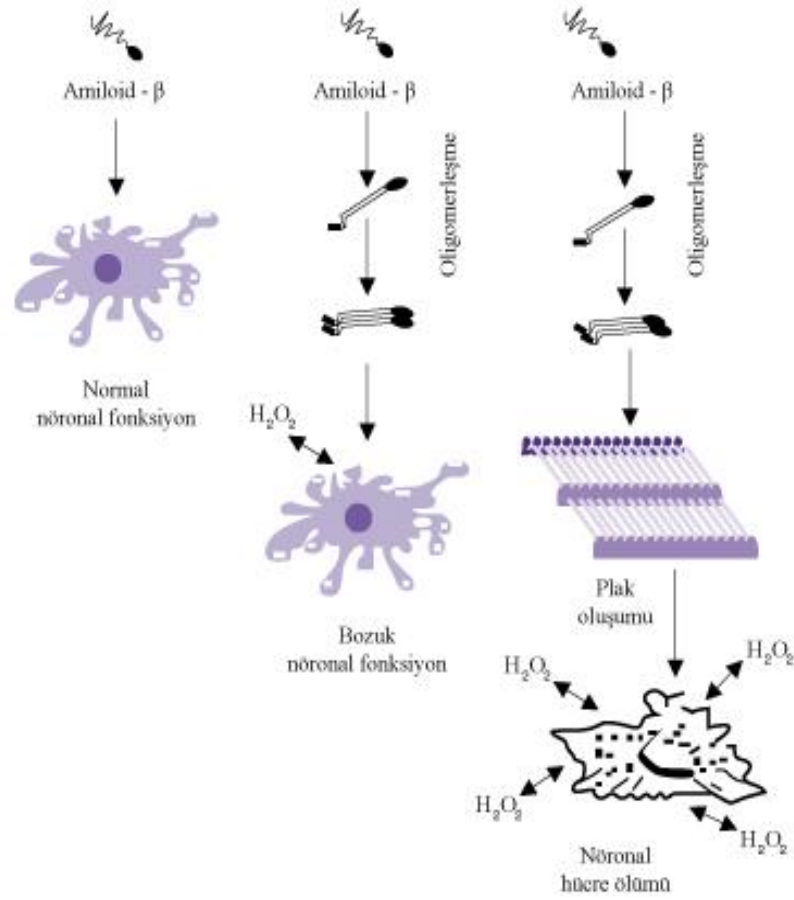
2.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidatif Stres

Bir yetişkin beyni yaklaşık olarak 10^{11} - 10^{12} nöron içermektedir (Emerit vd., 2004). Nörodejeneratif hastalıklar, nöronal hücrelerin disfonksiyonu ile spesifik olarak karakterize edilmektedir (Singh vd., 2019). Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH), Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Spinoserebellar ataksi hastalığı (SAH) yaygın olarak görülen

nörodejeneratif hastalıklardır. Serbest radikaller; DNA hasarı, enzim aktivitelerinde meydana getirdikleri değişiklikler, lipid metabolizmasında neden oldukları değişiklikler, lipid peroksidasyonu yoluyla zar yapısı ve fonksiyonlarının bozulması, zar proteinlerinin ve taşıyıcı proteinlerin deformasyonu sonucunda hücrelerde ve dokularda deformasyona yol açmaktadırlar. Serbest radikallerin yaşlanma, ateroskleroz, kanser, iskemi reperfüzyon, inflamasyon, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıkları gibi birçok patolojik durumda aktif rol oynadığı kabul edilmektedir. ROT miktarının artmasıyla birlikte oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıklarda nöronal kayıptan sorumlu ana faktörlerden biri olmaktadır. Genellikle ROT miktarının normalin üstünde olması durumunda meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon ile nörodejenerasyon birbiriyle ilişkilendirilmektedir (Lin ve Beal, 2006). Oksidatif stresin neden olduğu radyasyon, aşırı alkol, sigara tüketimi ve obeziteden kaçınılarak mitokondriyal kofaktörler olan riboflavin, koenzim Q yardımı ile mitokondriyal fonksiyonu korumak nörodejeneratif hastalıkları önlemek açısından önemlidir (Emerit vd., 2004).

2.4.1. Alzheimer hastalığı (AH) ve oksidatif stres

AH; yaşlanan nüfusun büyük bir bölümünü etkileyen, günlük yaşam aktivitelerini önemli ölçüde bozarak yaşam kalitesini düşüren, davranış, biliş ve işlevselliğin giderek kaybedilmesi ile ilişkili olarak yaygın görülen ilerleyici bir demanstır (Terracciano ve Sutin, 2019). AH'nin patolojisi H_2O_2 ve amiloid beta ($A\beta$) peptidinin nörotoksitesi nedeniyle oksidatif stres ile bağlantılıdır ve AH'deki histopatolojik değişiklikler hücre dışı $A\beta$ plaklarının ve hücre içi tau nörofibriler yumakların (NFY) birikiminden kaynaklanmaktadır (Gella ve Durany, 2009). Yapılan son çalışmalar $A\beta$ peptitlerinin H_2O_2 üretme yeteneğinden dolayı oksidatif stres mekanizmasında H_2O_2 'nin yüksek derecede toksik ROT oluşturarak AH ile ilişkisini ortaya koymuştur (Tabner vd., 2001; Milton, 2004). Kaspaz-3 ve kaspaz-9 kaspaz ailesinin hücre içi nöronal apoptotik sinyal proteinleridir (Jiao vd., 2018). Literatürde AH'de kaspaz-3'ün aktif olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. AH gelişimine $A\beta$ peptit üretimi kaspaz-3'ün amiloid prekürsör proteini (APP) γ -sekretaz aracılı bölünmesini artırmasıyla tetiklenerek, amiloid plaklarının oluşumunu glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) aktivitesiyle tau fosforilasyonunu arttırarak sebep olmaktadır (Snigdha vd., 2012).

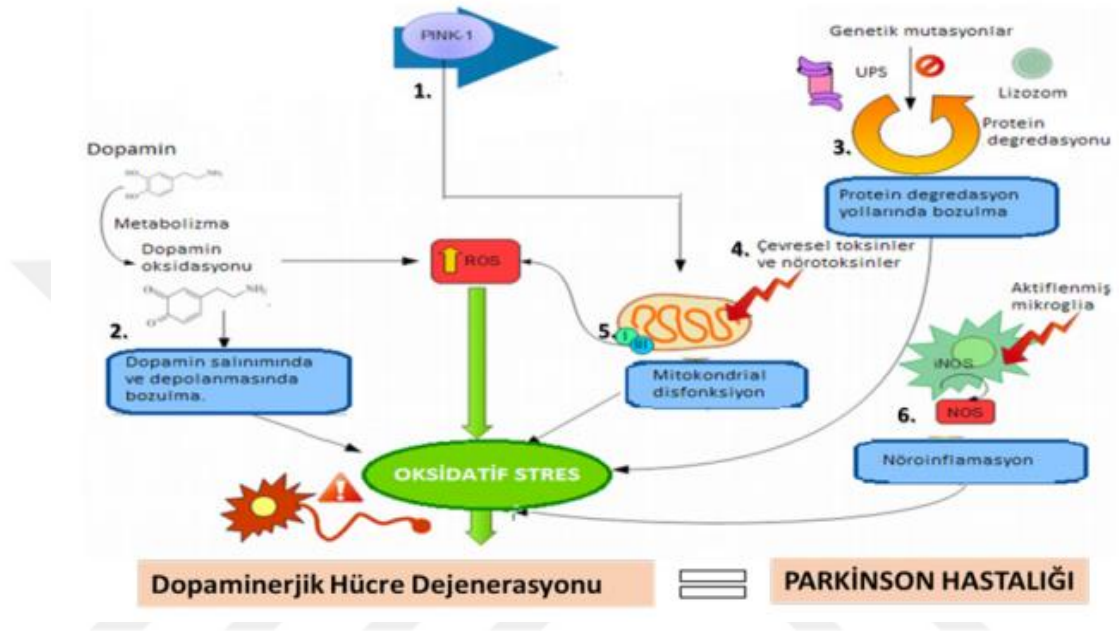


Şekil 2.2. Amiloid-β'nin etkileri (Milton, 2004)

2.4.2. Parkinson Hastalığı (PH) ve oksidatif stres

Parkinson hastalığı (PH), beynin substantia nigra'nın pars kompakta bölümünde dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterize olan ve yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklarda ikinci sırada yer almaktadır (Eriksen vd., 2005). Süperoksit anyon radikali (O_2^{2-}), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ROT örnekleridir ve dopaminerjik nöronların dejenerasyonundan kaynaklanan patolojik mekanizmalar, beyindeki aşırı ROT veya diğer serbest radikallerin üretimi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu veya inflamasyondan kaynaklanmaktadır (Hwang, 2013; Dias vd., 2014). Nöronal apoptozun büyük bir kısmını etkileyen ve PH ile ilişkilendirilen mitokondriyal kompleks I eksikliğinin nedeni, solunum zincirinde serbest radikal üretiminin artması, oksidatif fosforilasyon sistem bozukluğunun mitokondriyal disfonksiyonundan kaynaklı olmasıdır (Guo vd., 2018).

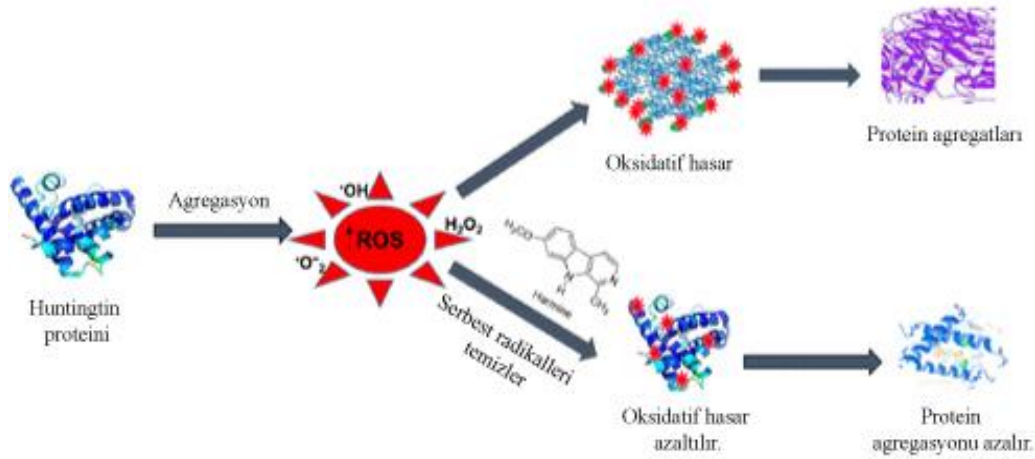
PINK1, parkin, α -sinüklein ve LRRK2 genlerinde mutasyonlar meydana geldiğinde, ROT artmasıyla oksidatif strese neden olduğu ve ROT'un α -sinüklein birikimini ile proteazomal bozulma meydana getirerek PH gelişiminde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Cookson, 2012; Ganguly vd., 2017).



Şekil 2.3. PH'de Oksidatif stres (Akbayır vd., 2017).

2.4.3. Huntington hastalığı (HH) ve oksidatif stres

Huntington hastalığı (HH), istemsiz hareketler, bilişsel bozulma, nöropsikiyatrik semptomlarla birlikte erken ölüm ile karakterize olan kalıtsal nörodejeneratif bir hastalıktır (Browne ve Beal, 2006; Fisher ve Hayden, 2014). HH'nin genetik olmasının nedeni, huntingtin geninin bir ekzonunda CAG (sitozin, adenin, guanin) dizisinin patojenik bir şekilde 35 tekrardan fazla olması durumunun mutasyona yol açması ile mutant huntingtin proteinin (mHTT) oluşması ve bunun beyinde birikmesi ile transkripsiyon sürecini bozmasıdır (Andrew vd., 1993). mHTT mitokondriyal membran ile temas ederek kalsiyum dengesini bozar ve bunun sonucunda mitokondriyal disfonksiyon meydana gelmesi ile ROT birikimine neden olarak ROT kaynaklı oksidatif stres ve apoptoz ile nörodejenerasyona neden olmaktadır (Shirendebvd., 2011).



Şekil 2.4. Huntington hastalığında (HH) protein agregatları ve oksidatif stres (Jain, 2020).

2.4.4. Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve oksidatif stres

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), motor nöronların kaybı ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (Kiernan vd., 2011). ALS hastalığı iki şekilde sınıflandırılır bunlar; ailesel ve sporadiktir. Ailesel ALS hastaları total ALS hastalarının ortalama %5-10'unu oluşturmaktadır (D'Amico vd., 2013). Sporadik ALS (sALS) sınıfı 50-60 yaşları arasında ortaya çıkarken, SOD1'deki mutasyonlardan kaynaklı olan ailesel sınıf ALS'nin yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır (Ingre vd., 2015; Kiernan vd., 2011). SOD1'in fonksiyonel olarak $O_2^{\bullet-}$ 'yi O_2 'ye ve H_2O_2 'e dönüştüren bir enzim olduğu düşünülmektedir ve SOD1, motor nöronların ölümüne neden olduğu düşünülen Nox2'ye bağlı ROT üretimini artırır ve mitokondriyal disfonksiyona yol açarak ALS'nin ilerlemesine neden olmaktadır (Li vd., 2011).

2.4.5. Spinoserebellar ataksi hastalığı (SAH) ve oksidatif stres

Spinoserebellar ataksi hastalığı (SAH), mutant ATXN1 (ataksin 1) proteininin aşırı ifadesi sonucu beyincik, beyin sapı ve omurilikte yavaş yavaş ilerleyen kusurlar ile baskın şekilde kalıtsal, ilerleyici dejenerasyon ile karakterize otozomal bir hastalıktır (Akbayır vd., 2017). SAH'a sahip bireylerin beyinde solunum kompleksi I eksikliği ile oksidatif strese bağlı mitokondriyal bozuklukların SAH'nin ilerlemesi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Hakonen vd., 2008).

2.5. Kannabinoidler

Kannabinoidler, kannabinoid reseptörleri aracılığıyla etki gösteren bir grup kimyasal bileşiği kapsayan bir sınıftır. Bu bileşiklerde kannabis bitkisinde de doğal olarak bulunan fitokannabinoidler, sentetik kannabinoidler ve endojen kannabinoidler bulunmaktadır (Ulugöl, 2014). Kannabinodler, yüzyıllardır rekreasyonel ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ağrıyı hafifletmek ve nörolojik hastalıkları tedavi etmek için kannabinoidlerin ilaç olarak kullanılması 600.000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Machado vd., 2018). Kannabinoidler çok sayıda terapötik etki göstermektedirler. Kannabinoidlerin analjezik, nöroprotektif ve anti-inflamatuar dışında psikiyatrik hastalıklara karşı da terapötik etkileri vardır (Grotenhermen ve Müller-Vahl, 2012). Kannabinoid reseptörlerinin, kannabinoid-1 (CB1) ve kannabinoid-2 (CB2) reseptörleri olarak iki tipi tanımlanmıştır (Wiley ve Martin, 2002). CB1 reseptörleri omurilikte bazal gangliya, dorsal hipokampus, amigdala, substantia nigra da dağıtılarak nöronların akson ve terminalleri üzerinde presinaptik olarak yer alırlar, adenilat siklazı inhibe ederler ve böylelikle nörotransmitterlerin salınımına aracılık etmektedirler (Lee, 2013). CB2 ise adenilat siklazı inhibe ederek hücrel inhibisyon yapan G proteini ile birlikte bulunan bir reseptördür ve CB2 reseptörleri immün fonksiyonlarla ilişkili periferik dokularda ve ayrıca nöronal hücrelerde de tespit edilmiştir (Battista vd., 2013). CB1 ve CB2 reseptörlerinin aktivasyonunu bloke eden seçici kannabinoid reseptör antagonistleri geliştirilmiştir ve kannabinoid reseptörlerinin antagonistleri klinikte obezitenin tedavisi için kullanılmaktadır (Pertwee, 2006; Van Gaal vd., 2005).

2.5.1. Kannabinoidler ve immün sistem

İmmün sistem, organizmanın zararlı olan mikroorganizma ya da hastalık yapan mikroorganizmalar olarak adlandırılan patojenler ile karşılaştığında reaksiyon gösteren savunma sistemidir. İmmün sistemin en önemli fizyolojik görevi enfeksiyonları engellemek veya meydana gelen enfeksiyonları ortadan kaldırmaktır. İmmün sistem, doğal ve edinsel bağışıklığı sağlayan faktörlerden oluşmaktadır (Goldman, 2002). Doğal immünite, sağlıklı bireylerde her zaman bulunan, doğuştan immünite olarak da adlandırılmaktadır. Edinsel immünite ise adaptif ya da sonradan kazanılmış immünite olarak adlandırılmaktadır. İmmün sistem elemanlarını; makrofajlar, mast hücreleri, lenfositler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreler) ve

sitokinler oluşturur. Sitokinler, immün sistemin düzenlenmesinde ve inflamatuvar durumlarında hücreler arası iletişime aracılık ederek immün sistemde önemli rol oynayan ve indüklenebilen proteinlerdir (Esquivel-Velázquez vd., 2015). İmmün sistemin en önemli sitokinlerini, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 gibi interlökinler oluşturmaktadır. İnflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1 β nörodejenerasyonda pro-apoptotik faktör olarak kabul edilmektedir (Fan vd., 2019). IL-1 β Alzheimer hastalığında (AH) nörofibriler patolojiye katkıda bulunmaktadır (L. Li vd., 2008). IL-6 yalnızca bağışıklık sisteminde değil aynı zamanda merkezi sinir sisteminde (MSS) nöronların endojen üretiminde görev almasıyla nöroimmün tepkide de önemli bir sitokindir (Peng vd., 2005). TNF- α , makrofajlar, beyinde astrositler ve bazı nöron popülasyonları tarafından sentezlenebilen ve salınabilen sitokinlerden biridir (Figiel, 2008). Kannabinoidler, bağışıklık hücrelerindeki DNA bağlanmasının düzenlenmesinde görev alarak immün sistemini etkileyebilirler ayrıca; bağışıklık hücreleri, endokannabinoidleri sentezleyebilmektedir. İmmün sistem içerisindeki CB2 seviyesi CB1 seviyesinden fazladır ve insan B lenfosit hücrelerinde, NK hücrelerinde, monositlerde, ve T lenfosit hücrelerinde CB2 azalan miktarlarda bulunmaktadır (Tanasescu ve Constantinescu, 2010). Dentritik hücrelerin antijen bulundurması ve bu hücrelerdeki CB2 varlığı, kannbinoidlerin antijen mekanizmasında rolü olduğunu göstermektedir (Matias vd., 2002). İmmün hücrelerinin sitokin salınımı ve merkezi sinir sistemi (MSS) içine veya dışına göçünü CB2'in immünitesini etkilemektedir (Cabral vd., 2015).

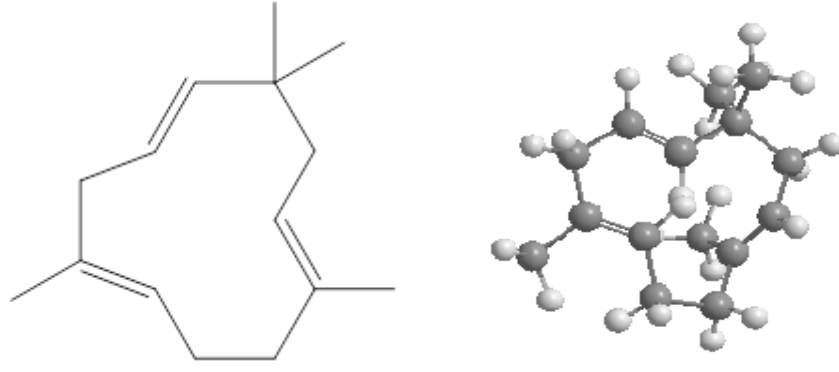
2.5.2. Kannabinoidlerin nöroprotektif etkisi

Kannabinoidler, psikotropik etkilerinin olmaması ve toksisitelerinin düşük olması nedeni ile ve merkezi sinir sistemindeki potansiyelinin tanımlanmasıyla birlikte yararlı bir terapötik ajan olarak kabul edilmiş ve bazı nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılabileceği görüşü kabul edilmiştir (Echeverry vd., 2021; Iuvon vd., 2009). Kemirgenlerde ve insanların merkezi sinir sistemindeki (MSS); hipokampus, amigdala, hipotalamus, beyincik, beyin sapı ve omurilikteki CB1 reseptörünün lokasyonu belirlenmiştir (Mechoulam vd., 2002). Kannabinoidler, reaktif oksijen türevlerinin (ROT) temizleyicileri olarak hareket ederek oksidatif hasarı azaltabilmektedirler (Kluger vd., 2015). Kannabinoidler, nörodejenerasyon ve nöroinflamatuvar durumlarında IL-1, TNF- α ve IL-6'yı modüle ederek makrofaj ve

mikroglial hücreler üzerinde bir etki yaratmaktadır (Lastres-Becker vd., 2005). Kannabinoidlerin, A β 'ye karşı nöroprotektif, anti-oksidatif ve anti-apoptotik etkileri vardır. Apoptotik bir enzim olan kaspaz-3 aktivitesinin inhibisyonunda sinyal yollarına dahil olarak nöroprotektif etki sağlamaktadır (Iuvone vd., 2004).

2.6. Alfa Humulen (α -Humulen)

Humulen veya α -Karyofilen olarak da bilinen Alfa humulen, 11 üyeli halkadan oluşan, üç konjuge olmayan C = C çift bağ içeren 3 izopren biriminden oluşan monosiklik bir seskiterpendir. Latince adı ile *Humulus lupulus L.* Şerbetçi otu bitkisinin olgun kozalaklarından elde edilen uçucu yağlarında bulunmaktadır (Neuenschwander vd., 2012). Alfa humulen, *Humulus lupulus*'un karakteristik bir terpeni olmasının yanı sıra kenevir, adaçayı ve ginsengde de bulunmaktadır (Hartsel vd., 2016). Şerbetçi otu polifenolik bileşikleri ve açıl filoroglukozitlerince zengin dişi çiçekleri bira koruyucu, biraya özgü tat ve aromayı vermek için ve tedavi edici amaçlar içinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Humulen ve oksidasyon ürünleri biranın aromasından sorumludur (Neuenschwander vd., 2012). Alfa humulen ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir *in vivo* çalışmada Alfa humulenin, anti-inflamatuar ilaç olarak kullanılan Deksametazon kadar etkili anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Fernandes vd., 2007). Alfa humulen topikal, oral veya aerosol yolu ile alındığında ise etkili bir analjezik olduğu yapılan başka bir çalışmada bildirilmiştir (Rogerio vd., 2009). Alfa humulen, β -Karyofilenin açık halkalı bir izomeridir ve yapılan çalışmalarla, Alfa humulen ve β -Karyofilenin sinerjistik etki gösterdikleri bildirilmiştir (Legault and Pichette, 2010). Ayrıca Alfa humulenin antimikrobiyal - antiviral ve antikanser etkisi olduğu da literatürde yer almaktadır (Legault ve Pichette, 2010).



Şekil 2.5. α -Humulenin kimyasal ve üç boyutlu kimyasal yapısı (PerkinElmer, 2011).

3. GEREÇLER

3.1. Hücre Hatları

3.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı

SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) hücre hattı 1970 yılında, 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliği dokusuna sıçramış SK-N-SH hücrelerinden elde edilmiş olan bir alt klondur (Xicoy vd., 2017). Hücre kültüründe; nöroprotektif etki çalışmalarında, dopaminerjik nöronlara farklılaşabilme benzerliğinden dolayı nöronal hücre modeli olarak kullanılan kemik iliği kökenli insan nöroblastoma hücre hattıdır. SH-SY5Y hücre hattı Amerika Tip Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattı

THP-1 (ATCC, TIB-202), monosit / makrofaj fonksiyon ve mekanizmalarını incelemek için yaygın olarak kullanılan, bir yaşındaki akut monositik lösemi hastası çocuğun periferik kanından elde edilip ölümsüzleştirilmiş monosit benzeri bir hücre hattıdır (Madeira vd., 2014). THP-1 hücre hattı, Amerika Tip Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Gereçler ve Cihazlar

3.2.1. Kimyasal maddeler, gereçler ve cihazlar

10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf	Kanada
10, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one	ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen	İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab	Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco	ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific	ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific	ABD
2 mL'lik Ependorf tüp	Greiner bio-one	ABD
5-10 ve 25 mL'lik cam pipet	Isotherm	Türkiye
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP	İsviçre
24 kuyucuklu ko-kültür plakası	Corning	ABD
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP	İsviçre
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	Almanya

Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma–Aldrich	Almanya
Cedex Smart Slide	Roche	Almanya
Parafilm	Pechiney	Fransa
Şarjlı pipetör	Starlab	Almanya
Trypsin-EDTA 10X	Pan Biotech	Almanya
Trypan mavisi	Roche	Almanya
Kryotüp (2mL)	Greiner Bio-One	ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One	ABD
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen	Almanya
Lipopolisakkarit (LPS)	Sigma–Aldrich	Almanya
HERAcell 150 Steril CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific	ABD
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf	Almanya
Inverted mikroskop	Leica	Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis	ABD
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek	ABD
xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP)	Roche	Almanya
Derin dondurucu buzdolabı	Altus	Türkiye
Hassas terazi	Ohaus	Avustralya
Inverted mikroskop	Leica	Almanya
Mikro santrifüj	Hettich	Almanya
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific	ABD
Otoklav	Alp	Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf	Almanya
Sterilizatör	Nüve	Türkiye
Su banyosu	Nüve	Türkiye

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

3.3.1. Retinoik asit (RA)

100 mg’lık renkli ampul içerisinde toz halde bulunan Retinoik asit, %95’lik etanol içerisinde çözülmüş olup 5 mM olarak ana stok hazırlanmıştır. Ana stok cam şişelerde -

20 °C’de saklanmış ve deney öncesinde 10 µM’a taze besiyeri içerisinde seyreltilerek kullanılmıştır (Shipley vd., 2016).

3.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Koyu renkli şişe içerisinde sıvı halde bulunan %30’luk hacimdeki Hidrojen Peroksit, steril su içerisinde 100 mM olarak ana stok hazırlanmıştır. Ana stok her deney sırasında taze olarak ve karanlık ortamda hazırlanmıştır. Ana stoktan 1 mM PBS (Fosfat tamponlu salin solüsyonu) içerisine alınarak 100 µM taze besiyeri içerisinde seyreltilerek kullanılmıştır.

3.3.3. Alfa Humulen

Koyu renkli şişe içerisinde sıvı halde bulunan Alfa humulen, %70’lik etanol çözeltisi içerisinde çözülmüş olup 100 mM olarak ana stok hazırlanmıştır. Ana stok ependorf tüpü içerisinde +4 °C’de saklanmış ve deney öncesinde 500 µM’a taze besiyeri içerisinde seyreltilerek kullanılmıştır.

3.3.4. *E.coli* 0111:B4 Lipopolisakkarit (LPS)

Liyofilize halde olan LPS, steril distile su ile çözülerek 1000 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmış ve aliquatlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Ana stok solüsyonundan, taze besiyeriyle çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak deneylerde kullanılmıştır.

3.3.5. Akridin Oranj/ Propidyum İyodür

Koyu renkli cam şişe içerisinde toz halde bulunan Akridin Oranj (AO) 1 M hacimdeki HCl içerisinde 1 mg/mL olarak ana stok hazırlanmıştır. Koyu renkli şişe içerisinde bulunan Propidyum İyodür (PI) PBS içerisinde çözülerek 1 mg/mL olarak stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stoklar 1000 µg/mL konsantrasyonda karıştırılarak 100 µg/mL konsantrasyon olacak şekilde PBS ile seyreltilerek kullanılmıştır.

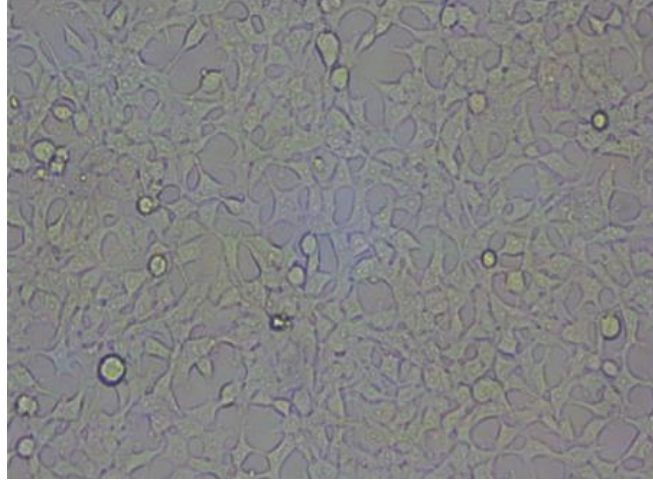
4. YÖNTEMLER

4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının kültüre edilmesi

SH-SY5Y, dopamin- β -hidroksilaz aktivitesine sahip olup dopamini nörepinefrine dönüştürebilen ve bu yüzden de genellikle hücre kültürü çalışmalarında insan nöronal hücre modeli olarak kullanılmakta olan insan kemik iliği kökenli nöroblastoma hücre hattıdır (Dwane vd., 2013).

Nöroblastoma hücreleri 37°C’de %95 bağıl nem ve %5 CO₂ içeren ortamda %10 FBS (Fötal sıgır serumu), %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM büyüme besiyerinde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin %70-80 oranında doluluğa ulaştığı inverted mikroskopta görüntülendikten sonra flasklardaki besiyeri atılmıştır ve kalan besiyerini uzaklaştırmak için 5 mL steril PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Flask tabanına tutunan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır. Tripsinizasyon işlemi 25 cm³’lük flaslara 1 mL 3 dakika, 75 cm³’lük flaslara ise 2 mL 5 dakika tripsin ilave edilerek 37°C’de inkübatörde inkübe edilerek yapılmıştır. Tabanda tutunmuş kalan hücrelerin de kalkmasını sağlamak için flask tabanına el ile birkaç kez vurularak mikroskopta kaldırma işlemi kontrol edilmiştir. Tüm hücreler kalktıktan sonra tripsin enziminin aktivitesini durdurmak için hızlı bir şekilde tripsin hacmi kadar besiyeri eklenmiştir ve 1-2 kez pipetaj yapıldıktan sonra hücre süspansiyonu 15 mL’lik falkon tüpüne alınmıştır. Falkon tüpü 1250 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve tripsinli medyum (süpenatant) uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 1 mL besiyerinde çözdürülmüştür. Hücre sayım cihazında 1×10^4 hücre sayılarak 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir (Cheung vd., 2009).



Görsel 4.1. *SH-SY5Y hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (20X)*

4.1.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının nöronal fenotipe farklılaştırılması

SH-SY5Y hücreleri, 47 kromozomdan oluşan stabil bir karyotipe sahiptir. Çeşitli farklı mekanizmalarla retinoik asit, forbol esterleri ve beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) gibi spesifik nörotrofinler dahil olmak üzere nöroblast benzeri bir durumdan olgun insan nöronlarına farklılaşabilmektedirler. SH-SY5Y hücreleri retinoik asit ile muamele edildiği zaman hücre bölünmesi durmakta ve böylece farklılaşma başlamaktadır (Pählman vd., 1995; Xie vd., 2010).

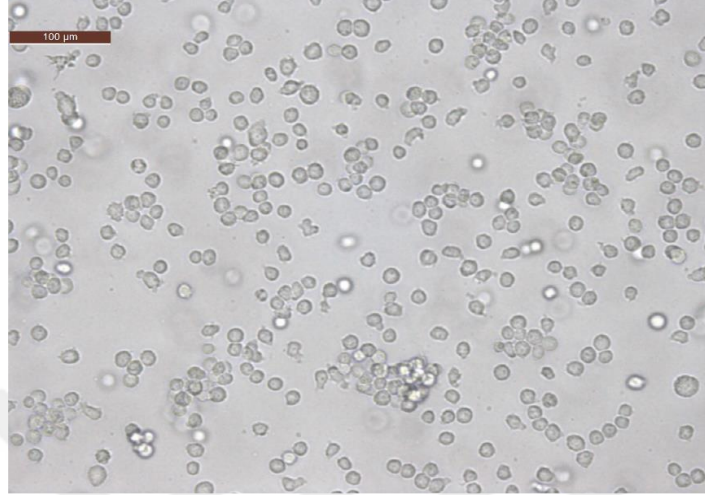
SH-SY5Y hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar büyütülmüş, sonrasında %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 μ M retinoik asit içeren farklılaşma besiyeri içerisinde 5 gün inkübasyona bırakılarak farklılaşmaları sağlanmıştır (Shiplely vd., 2016).

4.1.3. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattının kültüre edilmesi

THP-1 hücreleri, hem monosit- makrofaj farklılaşmasını araştırmada hem de makrofaj biyolojisini anlamada bir model olarak kullanılmaktadır (Bosshart ve Heinzelmann, 2016).

Çalışmalarda kullanılan TPH-1 insan akut monositik lösemi hücre hattı 37 °C’de %95 bağıl nem ve %5 CO₂ içeren ortamda %10 fetal sıgır serum (FBS), 0.05 mM 2-merkaptöetanol, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 (ATCC, 30-2001) besiyerinde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. THP-1 insan monosit hücreleri %70-80 oranında doluluğa ulaştığı inverted mikroskopta görüntülendikten sonra flasklardaki

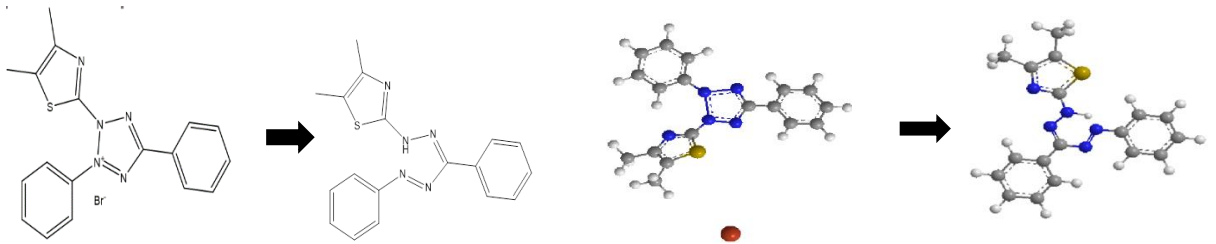
besiyeri 15 mL’lik falkon tüpüne alınmış, falkon tüpü 1100 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücre pelleti 1 mL besiyerinde çözündürülmüştür. Hücre sayım cihazında 5×10^3 hücre sayılarak 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir.



Görsel 4.2. THP-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (20X)

4.2. MTT Yöntemiyle Antiproliferatif Etkinin Belirlenmesi

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) yöntemi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapotik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir. Yöntem MTT ajanı ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır (Brand ve Nicholls, 2011).



Şekil 4.1. MTT boyasının kimyasal ve üç boyutlu kimyasal yapısı (PerkinElmer, 2011).

4.2.1. Alfa humulenin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde 37 °C’ de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Cedex XS (Innovatis, ABD) cihazında sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin plakalara yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Alfa humulenin stok solüsyonundan hazırlanan 50, 100, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlar, taze besiyeri içinde SH-SY5Y hücreleri üzerine uygulanmıştır. Kontrol grubu madde uygulanmamış sadece hücrelerden oluşan grup ve %0.1 oranında etanol içeren besiyeri ile uygulanmış çözücü kontrolünden oluşmaktadır. İnkübasyon süresi sonunda plakalardaki mevcut besiyerleri uzaklaştırılarak 9:1 oranında DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu ilave edilmiş hücreler 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve plakalara 100 µL DMSO verilmiştir. Plakaların absorbans değerleri Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader’da 540 nm dalga boyunda, her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde okunmuştur. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ortalaması %100 kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların % canlılık değerleri hesaplanmıştır (Kaya-Tilki vd., 2016).

$$\% \text{ Canlılık} = \left(\frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

4.2.2. SH-SY5Y hücre hattı üzerinde H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi

H₂O₂ nin stok solüsyonundan 1, 10, 100, 400 µM konsantrasyonlarda SH-SY5Y hücre hattı üzerine uygulanmış ve hücreler 2 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. H₂O₂’ye maruz bırakılmayan hücreler “kontrol grubu” olarak tanımlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakalardaki mevcut besiyerleri dökülerek uzaklaştırılmış 9:1 oranında DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu ilave edilerek hücreler 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri yine dökülerek uzaklaştırılmış 100 µL DMSO ilave edilerek plakaların absorbans değerleri her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader’da 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Kontrol grubunun absorbans

değerlerinin ortalaması %100 kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların % canlılık değerleri hesaplanmıştır (Kaya-Tilki vd., 2016).

4.2.3. SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

Çalışmamızın bu aşamasında SH-SY5Y hücre hattı üzerinde H_2O_2 ile oluşturduğumuz hücre hasarı üzerinde Alfa humulenin koruyucu etkisinin belirlenmesini amaçladık. SH-SY5Y hücreleri %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Cedex XS (Innovatis, ABD) cihazında sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin plakalara yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Alfa humulenin stok solüsyonundan 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarda hazırlanmış ve 100 μl besiyeri içinde yapışan hücreler üzerine uygulanmıştır ve hücreler 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Süreç bitiminde daha önce yine MTT yöntemiyle belirlenen H_2O_2 'nin toksik olmayan konsantrasyonun besiyerine eklenmesiyle mevcut olan besiyeri ile değiştirilmiş 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakalardaki mevcut besiyerleri uzaklaştırılmış ve 9:1 oranında DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu eklenen hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 μl DMSO ilave edilmiş, plakaların absorbans değerleri her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

4.2.4. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri hücreleri %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Cedex XS (Innovatis, ABD) cihazında sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 μM retinoik asit içeren besiyerinde her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin farklılaşmaları için 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İverted mikroskopta farklılaşmanın meydana geldiği saptandıktan sonra Alfa humulenin stok solüsyonundan besiyeri içinde yapılan seyreltmelerle hücrelere 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ konsantrasyonlar 100 μl farklılaşma besiyeri içinde uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelerden birine %0.1 oranında etanol içeren besiyeri kullanılmış ve hücreler 24 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plakalarda mevcut olan besiyerleri uzaklaştırılarak 9:1 oranında farklılaşma

besiyeri ve MTT solüsyonu eklenen hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl DMSO ilave edilmiş, plakaların absorbans değerleri her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

4.2.5. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının MTT yöntemi ile antiproliferatif etkisinin belirlenmesi

Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine H₂O₂'nin stok solüsyonundan farklılaşma besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılmış olan hücrelere konsantrasyonlar 1, 10, 100, 400 µM 100 µl farklılaşma besiyerinde uygulanmıştır ve H₂O₂'ye maruz bırakılmayan hücreler "kontrol grubu" olarak tanımlanmıştır. Hücreler 2 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakalardaki mevcut besiyerleri uzaklaştırılarak 9:1 oranında farklılaşma besiyeri ve MTT solüsyonu eklenen hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DMEM besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl DMSO ilave edilmiş, plakaların absorbans değerleri her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

4.2.6. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde farklılaşma besiyeri kullanılarak ekilmiştir ve 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Alfa humulenin stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılmış olan hücrelere uygulanan konsantrasyonlar 50, 100, 200 ve 400 µg/mL 100 µl farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir. İnkübasyon süreci sonunda daha önce yine MTT yöntemiyle belirlenen H₂O₂'nin toksik olmayan konsantrasyonun besiyerine eklenmesiyle mevcut olan besiyeri dökülerek 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Mevcut besiyerleri değiştirilerek 9:1 oranında farklılaşma besiyeri ve MTT solüsyonu ilave edilerek hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda farklılaşma besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri DMSO ile değiştirilerek plakaların absorbans değerleri her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode

Reader'da 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Kontrol grubunun absorbands değerlerinin ortalaması %100 kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların % canlılık değerleri hesaplanmıştır (Kaya-Tilki vd., 2016).

4.2.7. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde farklılaşma besiyeri kullanılarak ekilmiştir ve 5 gün süresince inkübasyona bırakılmış ve 3. gün besiyeri taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Alfa humulenin verileceği gün uygun yoğunluğa ulaşan THP-1 hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Süspansiyon halinde olan THP-1 hücrelerinin her kuyusuna 100 ng/mL oranında *E.coli* LPS'si ilave edilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. Süreç bitiminde her kuyucuktaki hücre-besiyeri aynı falkonda toplanarak 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda Alfa humulenin stok solüsyonundan hazırlanan 50, 100, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlar, elde edilen süpernatant içinde SH-SY5Y hücreleri üzerine uygulanmıştır. Kontrol grubu madde uygulanmamış sadece hücrelerden oluşan grup ve %0.1 oranında etanol içeren besiyeri ile uygulanmış çözücü kontrolünden oluşmaktadır. İnkübasyon süresi sonunda daha önce yine MTT yöntemiyle belirlenen H_2O_2 'nin toksik olmayan konsantrasyonun besiyerine eklenmesiyle mevcut olan besiyeri dökülerek 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakalardaki mevcut besiyerleri uzaklaştırılarak 9:1 oranında farklılaşma besiyeri ve MTT solüsyonu ilave edilmiş hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda farklılaşma besiyeri ve MTT solüsyonu içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve plakalara 100 µL DMSO verilmiştir. Plakaların absorbands değerleri her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

4.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y Hücre Canlılığının Belirlenmesi Çalışmaları

4.3.1. SH-SY5Y hücreleri üzerinde H_2O_2 IC₅₀ Değerlerinin Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) ile Belirlenmesi

Alfa humulenin ve H_2O_2 'nin MTT yöntemiyle belirlenmiş olan konsantrasyon aralığının xCELLigence RTCA-DP ile SH-SY5Y üzerinde IC₅₀ değeri belirleme çalışmaları yapılmıştır. xCELLigence RTCA-DP'de, elektriksel sinyalin ölçümü ile

hücre canlılığını tespit ederek gerçek zamanlı veriler oluşturur. E-plakadan belirlenen aralıklarla sistemden alınan değerler, literatürde kabul edilen birimsiz hücre indeksi (CI) değeri olarak hesaplanır. E-plaka kuyucuklarında hücrelerin proliferasyonu arttıkça verilen elektriksel yanıtla paralel olarak artmaktadır (Limame vd., 2012; Özkay vd., 2016).

xCELLigence RTCA-DP ile 16'lık altın elektrotlar içeren özel plakalara önce 100 µL besiyeri eklenmiş ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra E-plakalar cihazdan çıkarılıp 100 µL besiyeri üzerine 100 µL içinde her bir kuyucukta farklılaştırılmamış hücreler için 1×10^5 , farklılaştırılmış hücreler için 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 1 kuyu besiyeri kontrolü için ayrılmıştır ve bu kuyuya da 100 µL taze besiyeri ilave edilmiştir. E-plakanın tabanına SH-SY5Y hücrelerinin çökmesi için 15 dakika steril kabinde bekletilmiş daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte bir ölçüm alacak şekilde programlandıktan sonra cihazda deney başlatılmıştır ve farklılaştırılmamış hücreler için 24 saat, farklılaştırılmış hücreler için 5 gün beklenmiştir. Log fazına ulaşan SH-SY5Y hücreleri belirli bir hücre indeks değerine ulaşınca cihaz durdurulmuş ve besiyeri kısmından 100 µL çekilip atılmıştır. Hazırlanan H_2O_2 konsantrasyonları çift kat uygulanmış (1, 10, 100, 400 µM) ve program kaldığı yerden devam ettirilmiş hücre canlılığı gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. RTCA-DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre RTCA-DP Software 1.2.1 programında 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri analiz edilmiştir.



Görsel 4.3. Gerçek zamanlı hücre analizi çalışmalarında kullanılan xCELLigence RTCA-DP cihazı (A), E-plate (B) (<http-1>)

4.3.2. SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin IC₅₀ Değerlerinin Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) ile Belirlenmesi

xCELLigence RTCA-DP’de ölçüm için kullanılacak olan E-plakaların içine 100 µL temiz besiyeri eklenmiş ve cihazda ölçüm alınarak cihaz durdurulmuştur. 100 µL içinde her bir kuyucukta farklılaştırılmamış hücreler için 1×10^5 , farklılaştırılmış hücreler için 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. E-plakanın tabanına SH-SY5Y hücrelerinin çökmesi için 15 dakika steril kabinde bekletilmiş daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte bir ölçüm alacak şekilde programlandıktan sonra cihazda deney başlatılmıştır ve farklılaştırılmamış hücreler için 24 saat, farklılaştırılmış hücreler için 5 gün beklenmiştir. Log fazına ulaşan SH-SY5Y hücreleri belirli bir hücre indeks değerine ulaşınca cihaz durdurulmuş ve besiyeri kısmından 100 µL çekilip atılmıştır. Hazırlanan Alfa humulen konsantrasyonları çift kat uygulanmış (50, 100, 200, 400 µg/mL) ve program kaldığı yerden devam ettirilmiş hücre canlılığı gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucu daha önce RTCA-DP ile elde edilen hücre indeks değerine göre H₂O₂ uygulanmıştır. RTCA-DP Software 1.2.1 programında 24 ve 48. saatteki IC₅₀ değerleri analiz edilmiştir.

4.4. Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodür (PI) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi

Apoptotik ve nekrotik hücre aktivitesi, akridin oranj (AO) / propidium iyodür (PI) boyama ile değerlendirilmiştir. AO / PI boyama yeşil ve turuncu floresan dalga boylarının emisyonuna dayanan bir yöntemdir (Zahedifard vd., 2015). AO / PI hücre çekirdeği içindeki DNA’yı boyar ancak AO, canlı hücrelerin ve erken apoptotik hücrelerin çekirdeklerini floresan olarak işaretleyip yeşil floresan yayarken, PI nekrotik yani ölü hücreleri boyar ve kırmızı floresan yayarak hücre çekirdeklerini parlak kırmızı renge boyamaktadır (Ranjitha vd., 2019). AO/PI boyama için her bir kuyuda farklılaşmış hücreler için 2×10^5 , farklılaşmamış hücreler için 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Farklılaşmamış hücreler için 24 saat, farklılaştırma için 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Alfa humulenin verileceği gün uygun yoğunluğa ulaşan THP-1 hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Süspanse halde olan THP-1 hücrelerinin her kuyusuna 100 ng/mL oranında *E.coli* LPS’si ilave edilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. Süreç bitiminde kuyucuklardaki besiyeri aynı falkonda toplanarak 1100 rpm’de 5 dakika santrifüj

edilmiştir. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle ko-kültür modeli oluşturulmuştur. H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının, Alfa humulen ile inkübasyonu sonucu AO/PI boyama yöntemine ile apoptozun belirlenmesi için santrifüj sonunda elde edilen süpernatant ile 1 kuyu kontrol grubu olarak ayrılmış olan farklılaştırılmış SH-SY5Y içeren 6'lı kuyuya Alfa humulenin farklı konsantrasyonları (50, 100, 200, 400 µM) uygulanarak 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda AO / PI boyama ile apoptoz belirlenmesi için 2 saat H₂O₂ IC₅₀ değeri ile inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda boyama prosedürü uygulanmıştır. Uygulanan prosedür sonunda eksitasyon 525, emisyonu 617 nm dalga boyunda floresans ölçümleri alınarak Cytation 3 Multi-Mode Reader'de birden çok bağımsız görüntü çekilmiştir.

Akridin Oranj/Propidium İyodür (AO/PI) Boyama Prosedür

6'lık plaka içerisindeki her bir kuyudaki besiyeri uzaklaştırılmış ve her kuyu oda sıcaklığındaki PBS ile 1 kez yıkanmıştır. Her kuyu 5 dakika %70'lik etanol ile fikse edilmiştir. Etanolü uzaklaştırmak için kuyular önce 1 kez distile su ardından yine PBS ile 1 kez yıkanmıştır. Önceden hazırlanmış olan AO/PI karışımından 500 µL her kuyuya eklenmiş ve 15-20 dakika plakalar oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Eklenmiş olan AO/PI karışımı uzaklaştırılmış ve kuyular 1 mL PBS ile yıkanmıştır.

4.5. İstatistiksel Analiz

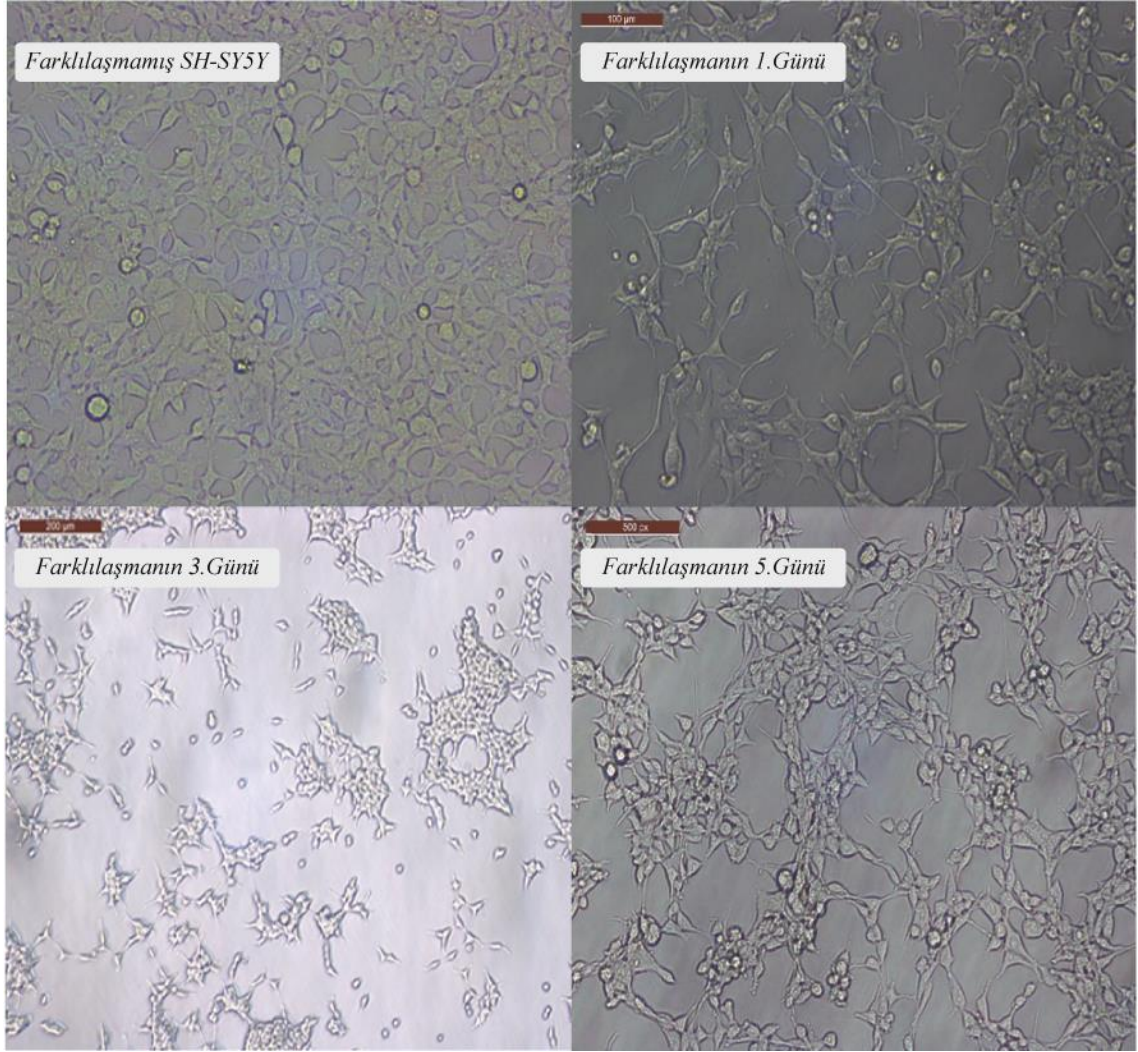
İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$ ve $p < 0.0001^{****}$ olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü ve Farklılaştırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücreleri nöron benzeri hücreler olarak hem farklılaştırılmamış hem de farklılaştırılmış olarak *in vitro* deneylerde kullanılmıştır. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri farklılaşmamış durumda iken kümeler halinde gelişerek olgunlaşmamış nöron belirteçlerini ifade ederler ve hızlı proliferasyona uğrarlar. Retinoik asit ile farklılaştıklarında ise proliferasyon azalmakta, kutuplaşma ve nörit oluşumu başlamaktadır. Farklılaştırılabilme durumundan ötürü SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı sinir-bilim araştırmalarının ilerlemesinde önemli katkı sağlamaktadır (Datta, 2013). İlk olarak, SH-SY5Y hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde %80 yoğunluğa ulaşana kadar büyütülmüş, daha sonra %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 µM RA bulunan besiyerinde 5 gün inkübe edilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinin kutuplaşma ve nörit gelişimi sonucunda farklılaşmalarının 5. günde olduğu **Şekil 5.1.**'de görülmektedir.

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, ana hücre hattı SK-N-SH'den türetilmiş bir alt klondur. Farklılaşmamış, bölünebilen epitel benzeri SH-SY5Y hücreleri serumun azaltılması ve RA eklenmesi ile yaklaşık olarak 3-10 günde terminal olarak farklılaşmaktadırlar. Terminal olarak farklılaşma hücrelerin artık bölünmediği ve artık bir nöronal fenotipe sahip olduğunu göstermektedir. Serumun azaltılması ile epitel hücrelerde apoptozun indüklendiği bildirilmiştir (Schamberger vd., 2005). RA eklenmesi ve serumun azaltılması durumunda epitel hücreleri azalır ya da yok olur bunun sonucunda da olgun insan nöronlarına benzeyen, farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattının primer nöron hücre kültür modeli olarak kullanılabilmesini sağlamaktadır.

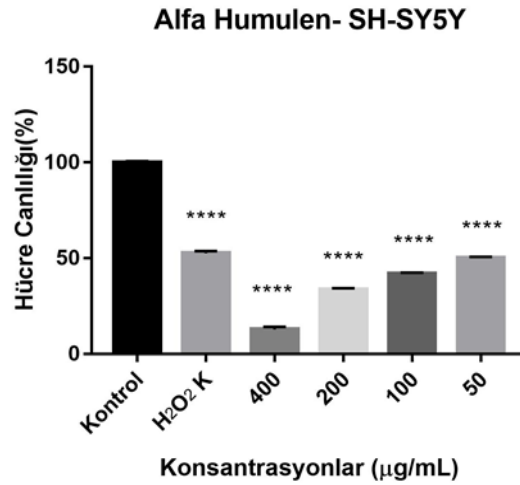
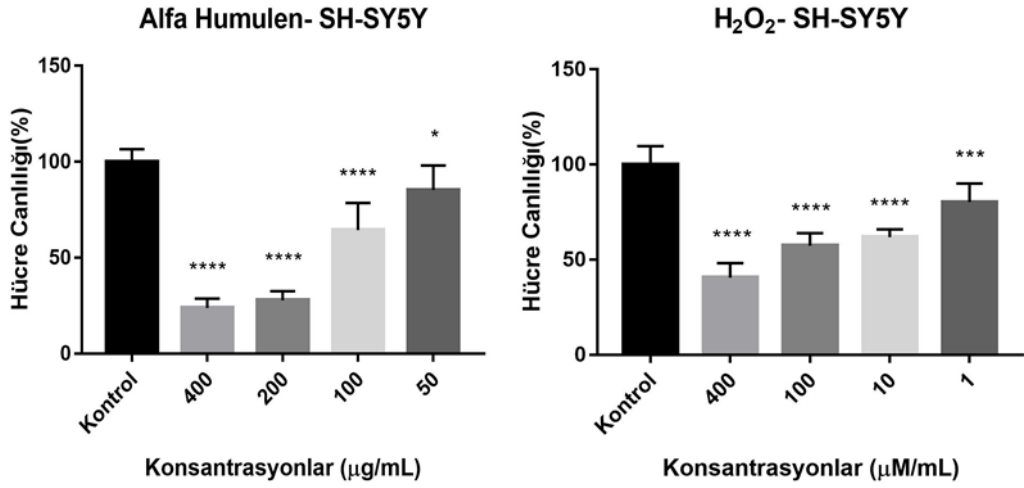


Görsel 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü (10X)

5.2. MTT Yöntemi ile Antiproliferatif Etkilerin Değerlendirilmesi

5.2.1. MTT yöntemi ile SH-SY5Y hücreleri üzerinde antiproliferatif etkinin belirlenmesi

MTT sitotoksosite deneyi sonuçlarına göre, farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücreleri için 50, 100, 200 ve 400 µg/mL Alfa humulen, 1, 10, 100, 400 µM H₂O₂, nöroprotektif etki için 50, 100, 200, 400 µg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerden oluşturulmuş grafikler **Şekil 5.1.**'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Alfa humulen ve H₂O₂ konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p < 0.1^*$, $p < 0.001^{***}$; $p > 0.0001^{****}$).

SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin 100, 200, 400 µg/mL ($p < 0.0001^{****}$) ve 50 µg/mL ($p < 0.1^*$) konsantrasyon gruplarında anlamlılık bulunmuştur. H₂O₂ için 10, 100, 400 µM ($p < 0.0001^{****}$) ve 1 µM ($p < 0.001^{***}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı olduğu görülmüştür. Nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM olarak kullanılmış olup 50, 100, 200, 400 µg/mL+ 42 µM H₂O₂ ($p < 0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

MTT yöntemiyle SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulen ve H₂O₂ gruplarında 400 µg/mL-50 µg/mL, 400 µM-1 µM ve IC₅₀ H₂O₂ Alfa humulen 400 µg/mL-50 µg/mL

aralığında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu verilere göre elde edilen hücre canlılıkları **Tablo 5.1.** ve **Tablo 5.2.**'de verilmiştir. SH-SY5Y hücre hattında uygulanmış olan Alfa humulenin 400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %24,52, %28,64, %66,48, %88,07'dir. SH-SY5Y hücre hattında uygulanmış olan H₂O₂'nin 400, 100, 10, 1 Mm konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %34,35, %53,15, %64,62, %75,01'dir. Nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM olarak kullanılmış olup Alfa humulenin 400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %12,83, %33,62, %41,85, %50,15'dir. Hücre canlılıkları, SH-SY5Y hücre hattında Alfa humulen ve H₂O₂ için artan konsantrasyonlarda azalmıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

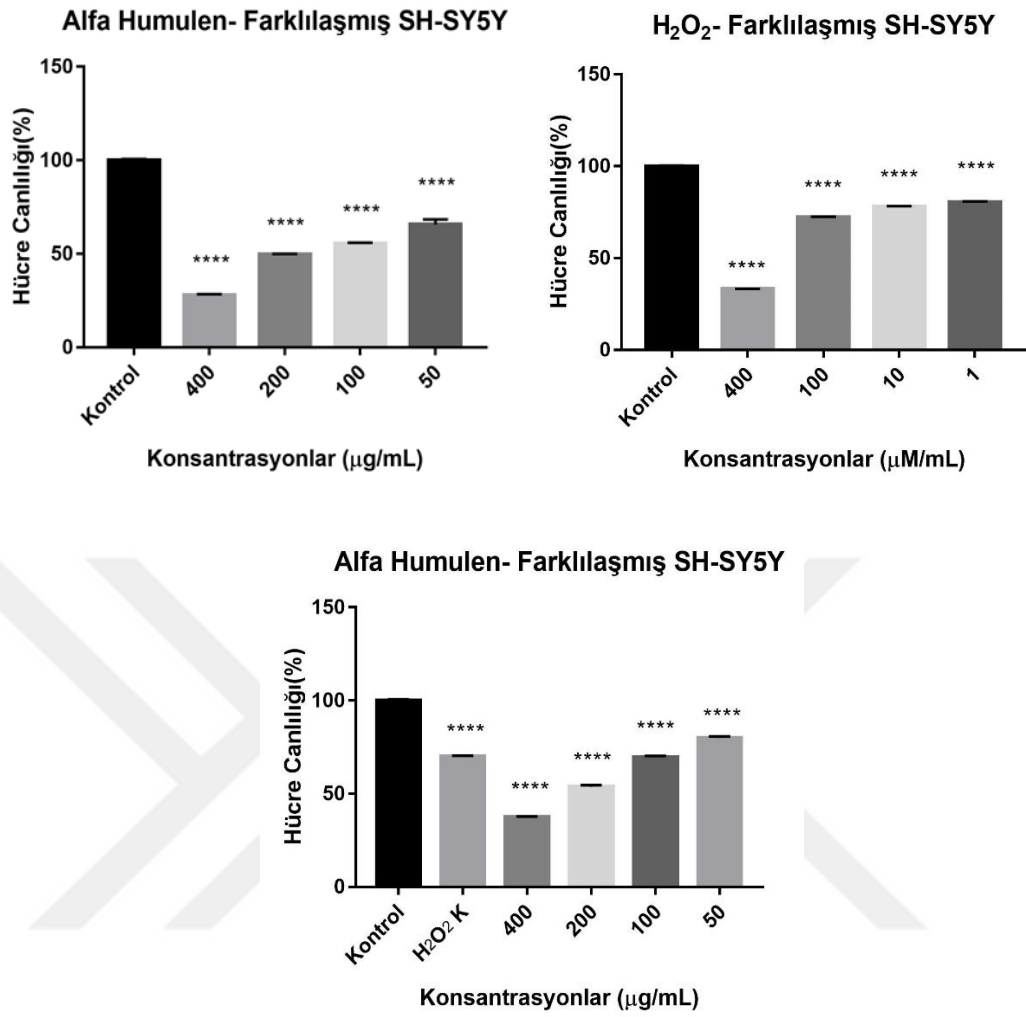
TABLO 5.1. SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları (kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)

<u>Konsantrasyonlar</u>		<u>Madde konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları</u>	
µg/mL	µM	Alfa humulen(%)	H ₂ O ₂ (%)
400	400	24,52	34,35
200	100	28,64	53,15
100	10	66,48	64,62
50	1	88,07	75,01

TABLO 5.2. SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları (Kontrolün Canlılığı %100 Olarak Kabul Edilmiştir.)

<u>Konsantrasyonlar</u>	<u>Madde Konsantrasyonlarının % Hücre Canlılıkları</u>
µg/mL	Alfa Humulen + IC ₅₀ H ₂ O ₂
400	12,83
200	33,62
100	41,85
50	50,15

MTT deneyi sonuçlarına göre, farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 50, 100, 200 ve 400 µg/mL Alfa humulen, 1, 10, 100, 400 µM H₂O₂, nöroprotektif etki için 50, 100, 200, 400 µg/mL konsantrasyonları ve H₂O₂'nin IC₅₀ değeri 42 µM kontrol grubuna göre 24 saatte hücre canlılığında azalmalar **Şekil 5.2.**'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. Alfa humulen ve H₂O₂ konsantrasyonlarının, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p>0.0001****).

Alfa humulen için 50, 100, 200, 400 µg/mL (p<0.0001****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur. H₂O₂ için 1, 10, 100, 400 µM (p<0.0001****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur. Nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM, Alfa humulen 50, 100, 200, 400 µg/mL+ 42 µM H₂O₂ (p<0.0001****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

MTT yönteminde Alfa humulen ve H₂O₂ gruplarında 400 µg/mL-50 µg/mL, 400 µM-1 µM ve IC₅₀ H₂O₂ Alfa humulen 400 µg/mL-50 µg/mL aralığında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu verilere göre elde edilen hücre canlılıkları **Tablo 5.3.** ve **Tablo 5.4.**'te verilmiştir. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında uygulanmış olan Alfa humulenin

400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası %27,97, %49,65, %55,38, %65,69'dur. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında uygulanmış olan H₂O₂'nin 400, 100, 10, 1 µM konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %33,00, %72,16, %77,92, %80,57'dir. Nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM olarak kullanılmış olup Alfa humulenin 400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %31,23, %55,73, %69,83, %79,96'dır. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında Alfa humulen ve H₂O₂ için artan konsantrasyonlarda azalmıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

TABLO 5.3. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları (kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)

Konsantrasyonlar		Madde konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları	
µg/mL	µM	Alfa humulen(%)	H₂O₂ (%)
400	400	27,97	33,00
200	100	49,65	72,16
100	10	55,38	77,92
50	1	65,69	80,57

TABLO 5.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları (kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)

Konsantrasyonlar	Madde konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları
µg/mL	Alfa humulen+ IC₅₀ H₂O₂ (%)
400	31,23
200	55,73
100	69,83
50	79,96

MTT çalışmamıza benzer şekilde, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde Alfa humulenin veya Alfa humulen ile sinerjistik çalışan β-karyofilenin sitotoksik etkilerini araştıran çalışmalara ilişkin literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Alfa humulen ile yapılan sitotoksikite çalışmasına paralel bulgular, Alfa humulenin, çeşitli insan tümör hücre hatları (MCF-7, DLD-1, L-929) üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada elde edilmiştir. Sitotoksik olmayan bir β-karyofilen

konsantrasyonun, Alfa humulenin ve izokaryofilenin önemli ölçüde antikanser aktivitesinin olduğu, Alfa humulen ve izokaryofilenin tek başlarına (32 mg/mL^{-1})’de hücre büyümesini %50-%69 oranında, 10 mg/mL^{-1} β -karyofilen ile kombine edildiğinde ise %75-%90 oranında inhibe ettiklerini bildirmişlerdir (Legault ve Pichette, 2010).

CBD’nin PC-12 ve SH-SY5Y hücre hatları ile birlikte nörit oluşumu ve toksisite çalışmasında PC-12 hücre hattında $1-10 \text{ }\mu\text{M}$ konsantrasyonlardaki CBD’nin düşük konsantrasyonlarda ($1 \text{ }\mu\text{M}$) daha etkili olduğu ve CBD, SH-SY5Y hücre hattı, PC-12’nin ekprese ettiği sinir büyüme faktörü (NGF)’nin trkA reseptörlerini ekprese etmediğinden dolayı nörit oluşumunu indüklediğini ve CBD’nin farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinde RA’nın indüklediği nörit oluşumunu azalttığı ileri sürülmüştür (Santos vd., 2015).

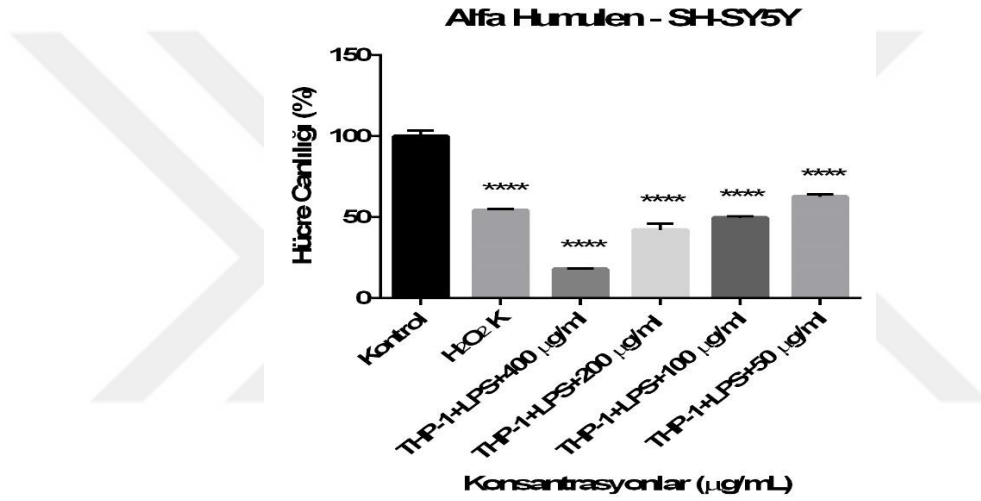
Salvia officinalis’ten elde edilen Alfa humulen ve trans-karyofilenin hayvan ve insan tümör hücrelerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle belirlendiği bir çalışmada Alfa humulenin HCT-116 ve MCF-7 hücrelerinde benzer şekilde etkili olduğu ve IC_{50} değerlerinin sırası ile $64,2 \text{ }\mu\text{g/mL}$, $81,9 \text{ }\mu\text{g/mL}$ olduğu belirlenmiştir. Alfa humulenin en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu RAW264.7 hücrelerinde ise IC_{50} değeri $38,4 \text{ }\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (El Hadri vd., 2010).

Labiatae ve Lauraceae familyalarından elde edilen esansiyel yağların *in vitro* insan tümör modellerine karşı sitotoksik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada Alfa humulenin LNCaP hücreleri üzerinde IC_{50} değerinin $11,24 \text{ }\mu\text{g/mL}$ olduğu, diğer hücre hatları ile kıyaslandığında en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak Alfa humulen LNCaP hücrelerinin aksine MCF-7, C32, ACHN hücre hatlarına karşı etkisiz olduğu ve IC_{50} değerinin $> 50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ olduğu belirlenmiştir (Loizzo vd., 2007).

Alfa humulen tarafından indüklenen reaktif oksijen türlerinin üretiminin Balsam köknar yağının antitümör aktivitesinin olası etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada Alfa humulen $50-200 \text{ }\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda MCF, PC-3, A-549, DLD-1, M4BEU, Fibroblast, L-929, CT-26 hücreleri üzerinde uygulanmış ve IC_{50} değeri sırasıyla $73 \text{ }\mu\text{M}$, $73 \text{ }\mu\text{M}$, $68 \text{ }\mu\text{M}$, $71 \text{ }\mu\text{M}$, $55 \text{ }\mu\text{M}$, $85 \text{ }\mu\text{M}$, $50 \text{ }\mu\text{M}$, $53 \text{ }\mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir (Legault vd., 2003).

5.2.2. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesi

MTT deneyi sonuçlarına göre, farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde nöroprotektif etki için Alfa humulenin 50, 100, 200, 400 µg/mL konsantrasyonları ve H₂O₂'nin IC₅₀ değeri 42 µM uygulanmış, kontrol grubuna göre 24 saatte hücre canlılığında azalmalar Şekil 5.4'de gösterilmiştir.



Şekil 5.3. Alfa humulen ve H₂O₂ konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamli farklılık var: $p > 0.0001$ ****).

Nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM, THP-1+ LPS ve Alfa humulen 50, 100, 200, 400 µg/mL+ 40 µM H₂O₂ ($p < 0.0001$ ****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

MTT yönteminde H₂O₂'nin IC₅₀ değeri ve Alfa humulen 400 µg/mL-50 µg/mL aralığında uygulanmış, anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM olarak uygulanmış olup Alfa humulenin 400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %17,96, %42,13, %49,70, %62,64 olarak belirlenmiştir. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında Alfa humulen ve H₂O₂ için artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı azalmıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

TABLO 5.5. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin % canlılıkları (kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.)

<u>Konsantrasyonlar</u>	<u>Madde konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları</u>
$\mu\text{g/mL}$	Alfa humulen + H_2O_2 (%)
400	17,96
200	42,13
100	49,70
50	62,64

Yapılan literatür taraması sonucunda Alfa humulenin farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde MTT yöntemi ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

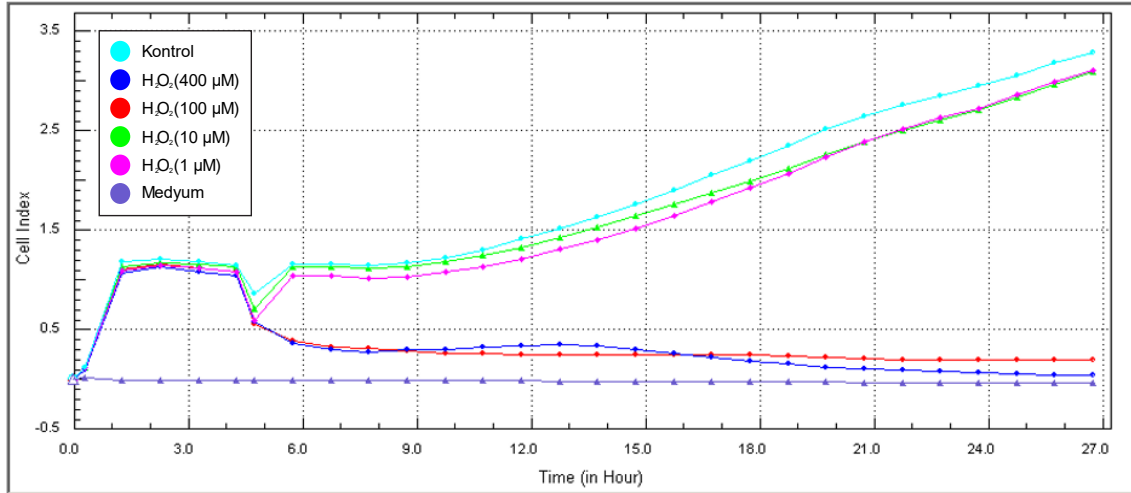
Literatürde, pirazol türevlerinin (100, 50, 10, 1,0 μM) konsantrasyonları uygulanmış ve LPS ile uyarılmış THP-1 süpernantı kullanılarak SH-SY5Y hücre hattı üzerinde oluşturulmuş anti-inflamatuar ve nöroprotektif etki modeli oluşturulmuş, pirazol türevlerinin yokluğunda THP-1 hücre canlılıkları %20- %30 oranında düştüğü bulunmuştur. Pirazol türevleri SH-SY5Y hücre hattına THP-1 süpernatantı ile birlikte verildiğinde 100 μM 'da $p < 0.01^{**}$ anlamlı bulunmuştur (McKenzie vd., 2019).

5.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y ve Hücre Canlılığı Çalışmalarının Değerlendirilmesi

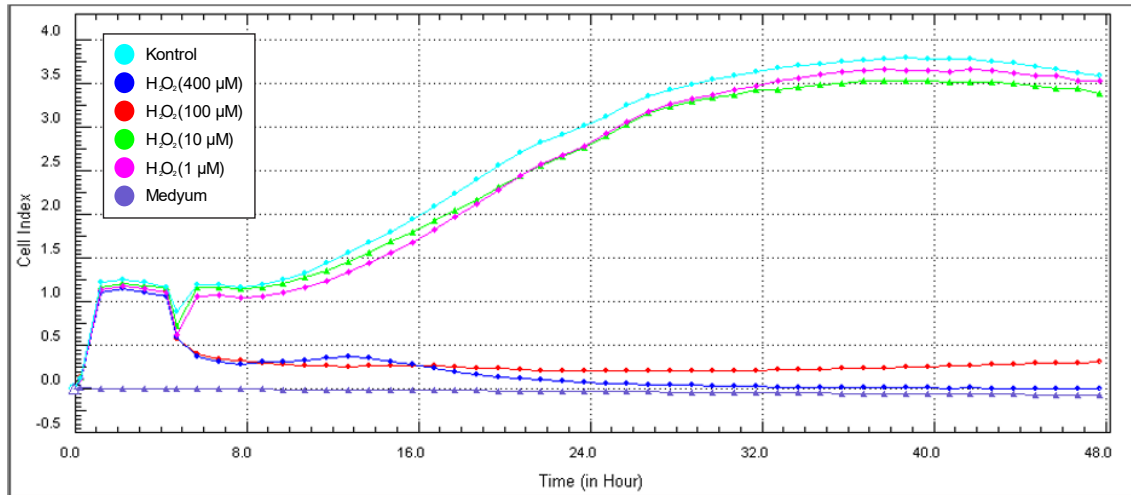
Sitotoksik olmayan dozları belirlemek üzere, 16'lık altın ve elektrot kaplı plakalara ayrı ayrı her bir kuyucukta farklılaştırma için 5×10^4 hücre, farklılaştırılmamış hücreler için 1×10^5 hücre olacak şekilde SH-SY5Y hücreleri ekilmiş ve hücreler logaritmik büyüme fazına ulaşınca kadar (24 saat-5 gün) inkübe edilmiştir. Daha sonra 1, 10, 100, 400 μM H_2O_2 , nöroprotektif etki için 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ Alfa humulen konsantrasyonları kullanılmıştır. H_2O_2 'nin IC_{50} değeri 42 μM olan konsantrasyonu hücrelere uygulanarak SH-SY5Y+ H_2O_2 nöroprotektif etki için SH-SY5Y (**Şekil 5.9.**) ve farklılaştırılmış nöroprotektif etki için SH-SY5Y (**Şekil 5.13.**) hücrelerinin hücre indeks değerlerine göre sitotoksosite eğrileri gerçek zamanlı olarak izlenmiş, slope grafikleri çizilmiş (**Şekil 5.7., 5.8., 5.11., 5.12., 5.15.**) ve RTCA-DP Software 1.2.1 programında IC_{50} değerleri analiz edilmiştir (**Şekil 5.6., 5.10., 5.14.**)

5.3.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle SH-SY5Y hücre canlılığının değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücreleri üzerinde, H_2O_2 sitotoksik etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre hücre canlılığı 1, 10, 100 ve 400 μM konsantrasyonlarda 24. saatte azalmıştır. Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 5.4. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10, 100 ve 400 μM H_2O_2 'nin konsantrasyonlarının RTCA-DP analiz sistemi ile 24 saatlik hücre proliferasyon eğrileri

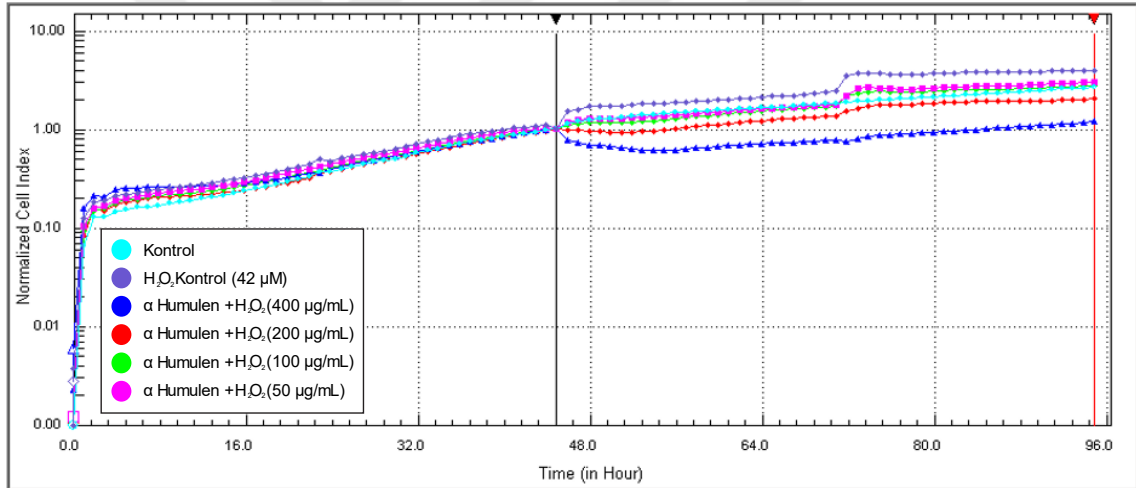


Şekil 5.5. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10, 100 ve 400 μM H_2O_2 'nin konsantrasyonlarının RTCA-DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri

SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 'nin gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 42 μM ve 38 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.8. RTCA-DP Sisteminde SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde H_2O_2 'nin Konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatteki Slope Grafiği



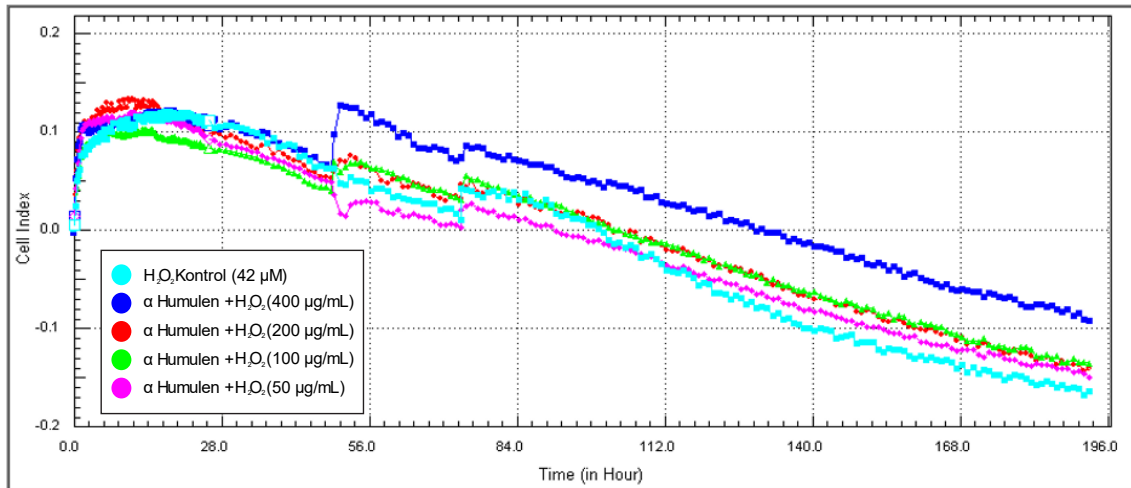
Şekil 5.9. SH-SY5Y hücrelerinde 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ Alfa humulenin konsantrasyonlarının ve 42 μM H_2O_2 'nin RTCA-DP analiz sistemi ile 24 saatlik hücre proliferasyon eğrileri



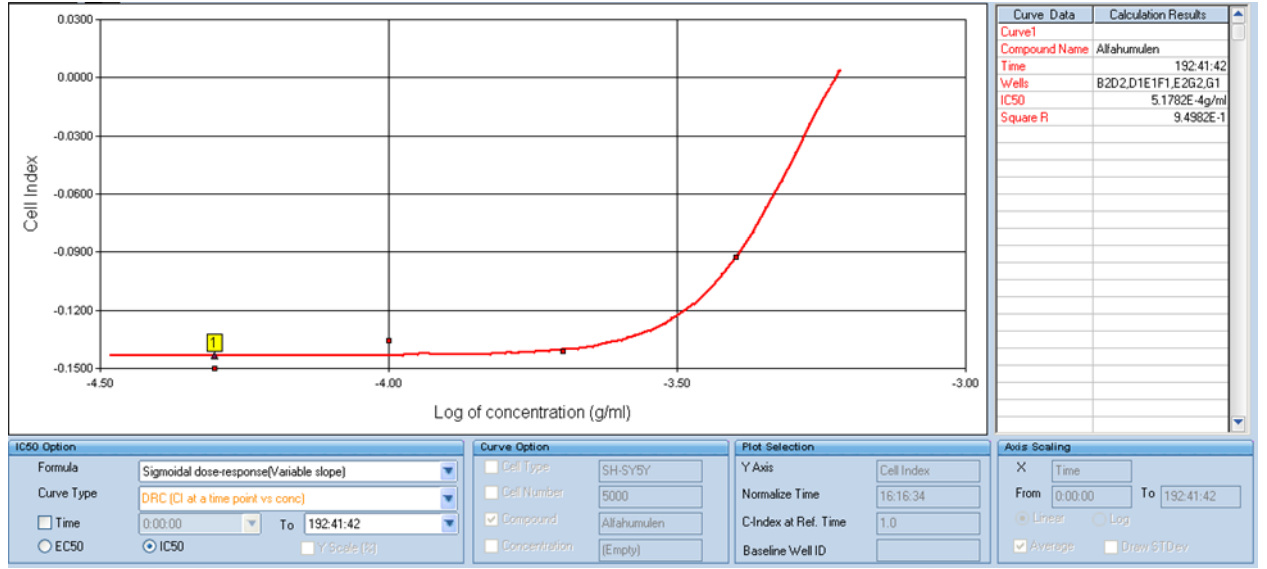
Şekil 5.12. RTCA-DP Sisteminde SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Alfa humulen Konsantrasyonlarının + H_2O_2 'nin 24. ve 48. saatteki Slope Grafiği

5.3.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre canlılığının değerlendirilmesi

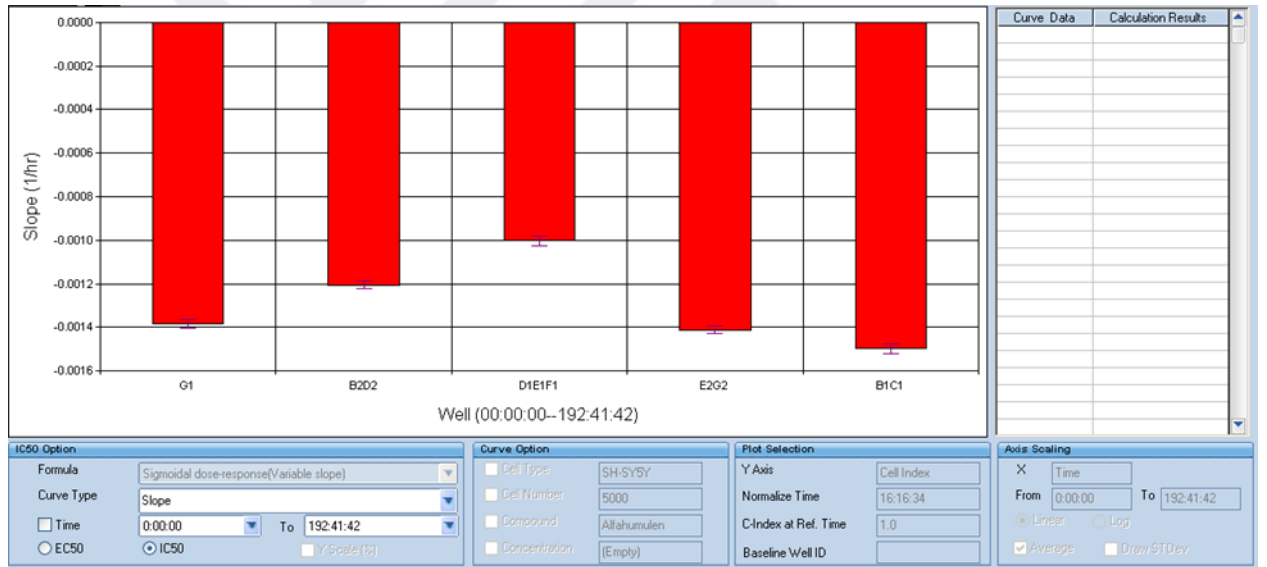
Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde, nöroprotektif etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde Alfa humulenin nöroprotektif etkisi gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 48. saatteki IC_{50} değeri $> 400 \mu g/mL$ 'dir.



Şekil 5.13. Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde 50, 100, 200 ve 400 $\mu g/mL$ Alfa humulenin konsantrasyonlarının ve 42 μM H_2O_2 'nin RTCA-DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri



Şekil 5.14. RTCA-DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 50, 100, 200 ve 400 µg/mL Alfa humulenin 42 µM H₂O₂ konsantrasyonlarının slope grafiği'ne göre hesaplanan 48. saat (>400 µg/mL) IC₅₀ değeri



Şekil 5.15. RTCA-DP Sisteminde farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Alfa humulenin Konsantrasyonlarının + H₂O₂'nin Slope Grafiği

Antiproliferatif etkinin belirlenmesinde MTT yöntemine ek olarak hücresel biyolojik olayları boya veya başka bir belirteç ile etiketlemeye gerek duymadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilen xCELLigence sistemi de kullanılmıştır.

Ayrıca xCELLigence sisteminde 16-kuyucuklu, tabanında hücre sayısındaki, canlılığındaki veya adezyondaki değişimleri anlık kaydeden altın mikroeletrotlar bulunan 3 adet plaka aynı anda kullanılabilir (Özdemir vd., 2014). Bu nedenle öncelikle MTT çalışmasıyla yüksek konsantrasyon aralıklarında Alfa humulen ve H₂O₂

için konsantrasyon taraması yapılmış ve xCELLigence sisteminde sitotoksosite analizi yapılarak 24 saatlik hücre indeksi değerlerine göre IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Elde edilen IC₅₀ değerleri ile sonraki deneylerde kullanılacak sitotoksik olmayan konsantrasyon belirlenmiştir.

Myrica rubra yapraklarından elde edilen uçucu yağların içerdiği Alfa humulen, β -Karyofilenin kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve bir çok insan bağırsak hattında apoptozu indüklediği xCELLigence sistemini kullanılarak belirlenen bir çalışmada Alfa humulen, β -Karyofilen içeren uçucu yağların HCT8, SW620, SW480, HT29 ve Caco2 hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin 1.5 μ g/mL olduğu belirlenmiştir (Langhasova vd., 2014).

5.4. Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodür Boyama ile Apoptozun Değerlendirilmesi

AO/PI boyama ile apoptozun belirlenmesi için her bir kuyuda farklılaşmış hücreler için 2×10^5 , farklılaşmamış hücreler için 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalarına ekim yapılmıştır. Farklılaşmamış hücreler için 24 saat, farklılaşma için 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda LPS ile uyarılmış THP-1 hücrelerinin süpernatantı ile Alfa humulenin (50, 100, 200, 400 μ M) konsantrasyonları verilerek 1 kuyu kontrol grubu olacak şekilde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda H₂O₂'nin IC₅₀ değeri verilerek 2 saat sonra floresans ölçümleri alınmış, Cytation 3 Multi-Mode Reader'de birden çok bağımsız görüntü çekilmiştir.

AO/PI boyama prosedürü uygulanan farklılaştırılmamış ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik değişiklikleri ve apoptotik özelliklerini gözlemlemek için floresan mikroskobu kullanılmıştır. AO hücre çekirdeklerini yeşile boyayarak canlı hücreleri gösterir, PI ise çekirdekleri kırmızıya boyayarak hasarlı ve nekrotik hücreleri gösterir (Nur Hanisah vd., 2013).

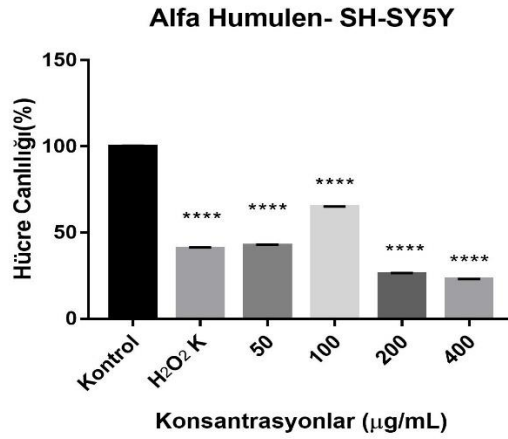
Literatür taraması yapılarak elde edilen verilere göre Alfa humulenin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde AO/PI boyaması yapılarak apoptozun belirlenmesine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Azmi ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, SH-SY5Y hücre hattı üzerinde H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının çimlendirilmiş kahverengi pirincin etil asetat ekstraktlarının nöroprotektif etkisinin incelenmesi ve apoptozun belirlenmesi amacı ile ekstraktlarının (1-30 ppm) konsantrasyonlarda ve 250 μ M H₂O₂ verilerek AO/PI boyama

yöntemi ile anti-apoptotik etkileri değerlendirilmiş ve bunun sonucunda çimlendirilmiş kahverengi pirincin etil asetat ekstraktlarının hücre canlılığını arttırarak hücrelerin anti-apoptotik etki gösterdiğini ve hücrelerin daha az apoptoza yöneldikleri bildirilmiştir (Nur Hanisah vd., 2013).

Literatür taraması sonucu Mohamed ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada ise 7-Gerani-loksisinamik'in H_2O_2 ile oluşturulmuş hücre hasarı ile SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmış, 7- Gerani-loksisinamik'in 1.04–16.67 μM konsantrasyonlarında sitotoksik etkisine bakılmış, ardından SH-SY5Y hücreleri 72 saat inkübe edilen 2.08 μM 7-Gerani-loksisinamik ile, 72 saat 2.08 μM 7-Gerani-loksisinamik ve 300 μM H_2O_2 , 72 saat 5.97 μM kurkumin ve 300 μM H_2O_2 4 saat inkübe edilmiş, AO/PI boyama prosedürü uygulanarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda 7-Gerani-loksisinamik ve kurkuminin koruyucu etkisi ile apoptozu önleme yeteneğinin ilişkili olabileceğini bildirmiştir (Mohamed vd., 2020).

Jaafaru ve diğerleri tarafından *Moringa oleifera* tohumlarından elde edilen glukomoringin izotiyosiyanatın (GMG-ITC) SH-SY5Y hücreleri üzerinde H_2O_2 ile oluşturulmuş hücre hasarının nöroprotektif etkisinin araştırıldığı çalışmada 1.25 $\mu g/ml$ GMG-ITC ile 72 saat ve IC_{50} değeri 300 μM H_2O_2 ile 4 saat muamele edilmiş olan SH-SY5Y hücreleri üzerindeki koruyucu etkisini AO/PI boyama yöntemi ile belirlemişlerdir. AO hücre zarından geçerek, hücre çekirdiğini yeşile boyayarak canlı hücreleri ortaya çıkarmıştır. PI ise hasarlı hücreler tarafından tutularak çekirdeklerini kırmızıya boyamıştır. Sonuç olarak, GMG-ITC, H_2O_2 ile oluşturulan hasara bağlı hücre ölümüne karşı yüksek nöroprotektif aktivite göstermiştir (Jaafaru vd., 2018).



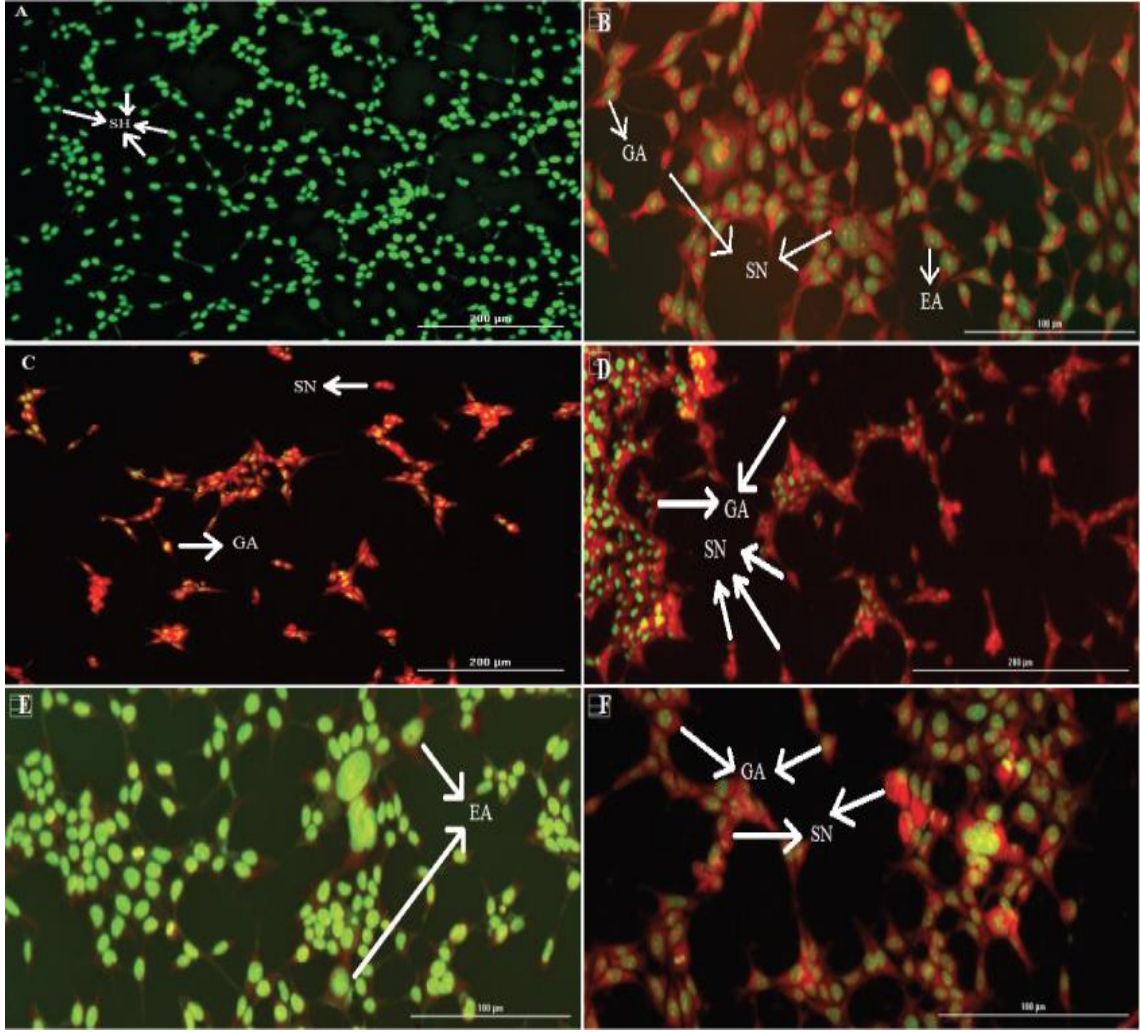
Şekil 5.16. Alfa humulen ve H₂O₂ konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında AO/PI boyama yöntemine göre belirlenen floresans ölçümlerinin % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p < 0.1^*$, $p < 0.001^{***}$, $p > 0.0001^{****}$)

Nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM konsantrasyonda Alfa humulen 50, 100, 200, 400 µg/mL+ 42 µM H₂O₂ ($p < 0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde antiapoptotik etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM olarak kullanılmış olup H₂O₂ kontrol grubu ve Alfa humulenin 400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %56,53, %42,70, %43,05, %77,64, %50,78'dir.

Tablo 5.6. Alfa Humulenin SH-SY5Y Hücre Hattındaki Apoptotik Etkilerinin % Canlılıkları (Kontrolin Canlılığı %100 Olarak Kabul Edilmiştir.)

<u>Konsantrasyonlar</u> µg/mL	<u>Madde konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları</u> Alfa humulen + H ₂ O ₂
IC ₅₀ H ₂ O ₂ Kontrol	56,53
400	42,70
200	43,05
100	77,64
50	59,78



Görsel 5.2. *SH-SY5Y hücre hattı ve E.coli LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde AO (Akridin oranaj, yeşil) / PI (Propidium İyodür, kırmızı) çift boyama kullanılarak apoptozun mikroskopik tespiti (10X) A)Kontrol B)H₂O₂ Kontrol C)400 µg / mL D)200 µg / mL E)100 µg / mL F)50 µg / mL SH:Sağlıklı hücre GA: Geç apoptoz SN:Sekonder nekrozis EA: Erken apoptoz*

Akridin Oranj (AO) / Propidium İyodür boyaları kullanılarak apoptozun belirlenmesinde floresans ölçümleri alınarak Cytation 3 Multi-Mode Reader'de çekilen görüntüler sonucunda Alfa humulen ve H₂O₂ ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerinin yeşil renkli, sağlıklı ve sağlam çekirdeklere sahip olduğu görüntülenmiştir. 2 saat 42 µM H₂O₂ ile muamele edilmiş H₂O₂ kontrol hücrelerinde yeşil renkli çekirdekler yaşayan hücreleri gösterirken aynı zamanda kırmızıya boyananlar H₂O₂ kaynaklı sitotoksistide apoptozu ifade etmektedir.

400 µg / mL konsantrasyonda Alfa humulen ile hücre muamelesinden sonra, nekroz hücreleri kırmızı renkte görüntülenmiştir.

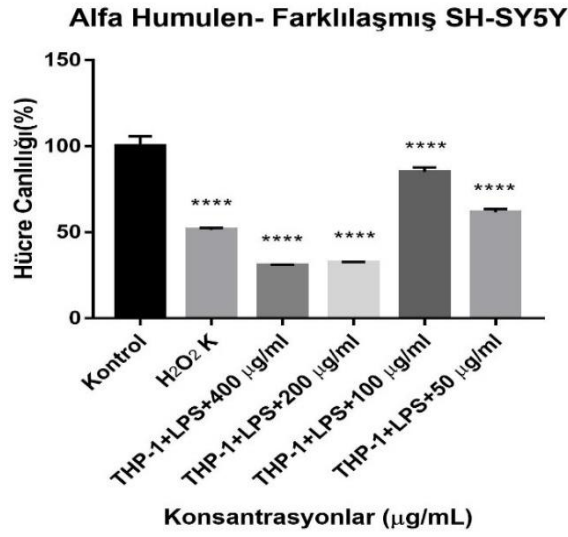
Alfa humulenin 200 µg / mL konsantrasyon ile hücre muamelesinde, turuncu renkli hücrelerle önemli ölçüde arttığı buna bağlı olarak da geç apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir.

Alfa humulenin 100 µg / mL konsantrasyon ile hücre muamelesinden sonra kromatin yoğunlaşmasını içeren erken apoptoz özellikleri gözlemlenmiştir.

Alfa humulenin 50 µg / mL konsantrasyon ile hücre muamelesinden sonra apoptoz kırmızı-turuncu renkli hücrelerle arttığı tespit edilmiştir.

Alfa humulen ve H₂O₂ ile muamele edilmeyen hücrelerin yeşil renkli sağlıklı çekirdeklere sahip olduğunu, erken apoptozun belirtileri olan 24 saat 100 µg / mL Alfa humulen ve 2 saat 42 µM H₂O₂ ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde membran kabarcıklaşması ve kromatin yoğunlaşmasının tespit edildiği belirlenmiştir. Apoptoz veya nekrozun geç aşaması olarak belirlenen yüksek ve uygulanan en düşük Alfa humulen konsantrasyonu (400 ve 200 ve 50 µg / mL) ile muamele edilen hücrelerde kırmızımsı-turuncu renk varlığı tespit edilmiştir.

Alfa Humulen ve H₂O₂ ile muamele SH-SY5Y hücrelerinde AO (Akridin oranj) / PI (Propidium İyodür) çift boyama kullanılarak apoptozun belirlenmesinde hem farklı konsantrasyonlara (400, 200, 100, 50 µg / mL) bağlı bir şekilde floresans ölçümlerinin % hücre canlılık değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle ve konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptozun morfolojik özelliklerini göstermiştir.



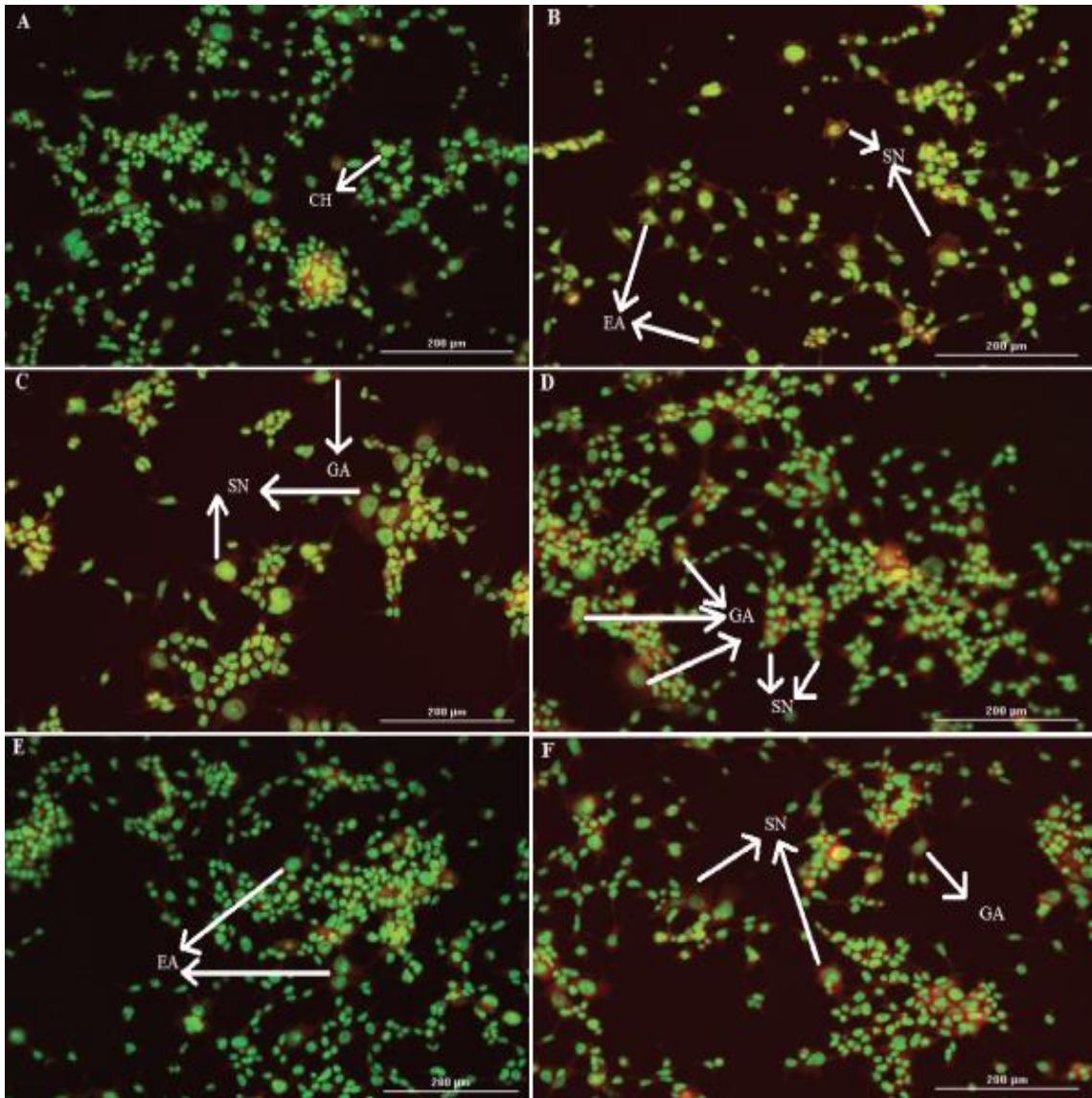
Şekil 5.17. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarının, Alfa humulen ile inkübasyonu sonucu AO/PI boyama yöntemine göre belirlenen floresans ölçümlerinin % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p < 0.1^*$, $p < 0.001^{***}$, $p > 0.0001^{****}$)

Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde nöroprotektif etki için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM kullanılmış olup, Alfa humulen 50, 100, 200, 400 µg/mL+ 42 µM H₂O₂ ($p < 0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde antiapoptotik etkileri için H₂O₂ IC₅₀ 42 µM konsantrasyonda kullanılmış olup H₂O₂ kontrol grubu ve Alfa humulenin 400, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları sırası ile %41,18, %22,91, %26,35, %64,96, %46,35'tir.

Tablo 5.7. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücre Hattındaki Apoptotik Etkilerinin % Canlılıkları
(Kontrolün Canlılığı %100 Olarak Kabul Edilmiştir.)

<u>Konsantrasyonlar</u> $\mu\text{g/mL}$	<u>Madde konsantrasyonlarının % hücre canlılıkları</u> Alfa humulen + H_2O_2
$\text{IC}_{50} \text{ H}_2\text{O}_2$ Kontrol	41,18
400	22,91
200	26,35
100	64,96
50	46,35



Görsel 5.3. Nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde AO (Akridin oranj, yeşil) / PI (Propidium İyodür, kırmızı) çift boyama kullanılarak apoptozun mikroskopik tespiti (Genel görüntü)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nörodejeneratif bozukluklar, beynin farklı bölgelerinde meydana gelen makro ve mikro değişikliklerle birlikte birçok hastalık ile karakterize edilmektedir (Fratiglioni ve Qiu, 2009). Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH), Huntington hastalığı (HH), Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Spinocerebellar ataksi hastalığı (SAH) yaygın olarak görülen nörodejeneratif hastalıklardır. AH, günlük yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren davranış, hafıza, biliş ve işlevselliğin giderek kaybedilmesiyle karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (Sutin vd., 2019). AH’de yaş, birincil risk faktörü olarak düşünülse de hastalığın patolojisi serbest radikallerden köken almaktadır (Clark vd., 2010). AH’deki histopatolojik değişiklikler hücre dışı amiloid beta ($A\beta$) plakların ve hücre içi tau nörofibriler yumakların (NFY) birikiminden kaynaklanarak AH’nin patolojisinin H_2O_2 ve $A\beta$ peptidinin nörotoksitesi ile birlikte oksidatif stres ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Gella ve Durany, 2009). Nörodejeneratif hastalıklarda yaygın olarak ikinci sırada yer alan Parkinson hastalığı ise beynin substantia nigra’nın pars kompakta bölümünde dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterize edilir (Eriksen vd., 2005). ROT ve dopaminerjik nöronların dejenerasyonundan kaynaklanan patolojik mekanizmalar, beyindeki aşırı ROT veya diğer serbest radikallerin üretimi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu veya inflamasyondan kaynaklı olmakla birlikte ROT artmasının oksidatif strese neden olduğu ve ROT’un α -sinüklein birikimini ile proteazomal bozulma meydana getirerek PH gelişiminde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Cookson, 2012; Ganguly vd., 2017; Guo vd., 2018). Nörodejeneratif hastalıklardan bir diğeri olan Huntington hastalığı (HH), istemsiz hareketler, bilişsel bozulma, nöropsikiyatrik semptomlar ile erken ölüm ile karakterize olan mitokondriyal disfonksiyon meydana gelmesi ile ROT kaynaklı oksidatif stres ve apoptoz ile nörodejenerasyon sonucu oluşan kalıtsal nörodejeneratif bir hastalıktır (Browne vd., 1999; Fisher and Hayden, 2014; Shirendeb vd., 2011). Nörodejeneratif hastalıklardan bir diğeri olan Amyotrofik lateral skleroz (ALS), motor nöronların kaybı ile karakterize edilen ROT üretiminin artmasıyla mitokondriyal disfonksiyon ile birlikte ilerleyen bir hastalıktır (Kiernan vd., 2011; Y. Li vd., 2011).

Spinocerebellar ataksi (SCA), mutant ATXN1 (ataksin 1) proteininin aşırı ifadesi sonucu beyincik, beyin sapı ve omurilikte yavaş yavaş ilerleyen kusurlar ile baskın

şekilde kalıtsal, ilerleyici dejenerasyon ile karakterize oksidatif strese bağlı mitokondriyal bozukluklar ile ilerleyen otozomal bir hastalıktır (Akbayır vd., 2017; Hakonen vd., 2008).

Kannabinoidlerin, literatürde toksisitelerinin düşük olmasından kaynaklı olarak yararlı bir terapötik ajan olduğu ve nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmasının uygun olduğu kabul edilmiştir (Iuvone vd., 2009; Petrosino vd., 2018). Tez kapsamında yapmış olduğumuz bu çalışmada *Humulus lupulus*'un karakteristik terpeni olan Alfa humulenin *in vitro* ko-kültür modelinde antiproliferatif, antiapoptotik ve nöroprotektif etkilerini araştırdık.

Yapılan literatür taraması sonucunda, insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y ve THP-1 monosit hücre hattında benzeri çalışmalara rastlanmakla beraber Alfa humulen ile yapılan *in vitro* ko-kültür çalışmasına rastlanmamıştır.

Alfa humulenin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak için öncelikle MTT testi kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri farklılaştırılmadan 24 saat, farklılaşmaları için 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. MTT testi SH-SY5Y hücreleri için konsantrasyon aralığı belirlenmesi amaçlı yapılmış olup, sitotoksikite sonuçlarından elde ettiğimiz IC₅₀ değerlerini xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi RTCA-DP kullanarak belirledik.

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde SH-SY5Y hücreleri 5 gün süreyle cihazın içerisinde farklılaştırılmış ve farklılaşma sürecinin bitiminde konsantrasyon gruplarıyla muamele edildikten sonra, deney öncesinde H₂O₂ ile hücre hasarı sağlanmıştır.

Elde ettiğimiz MTT sonuçlarına göre hem Alfa humulen hem de H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarında 400-50 µg/mL aralığında SH-SY5Y hücreleri üzerinde anlamlı sonuçlar vermiş olup, RTCA-DP'de H₂O₂ 400-1 µM aralığında, H₂O₂ ile oluşturulmuş hücre hasarında daha önce hesaplanan 42 µM H₂O₂ ve Alfa humulen 400-50 µg/mL aralığında çalışılmıştır. RTCA-DP ile elde edilen sonuçlar RTCA-DP Software 1.2.1 programı tarafından hesaplanmış olup H₂O₂ için SH-SY5Y'nin IC₅₀ değeri 24. Saatte 42 µM, 48. saatte IC₅₀ değeri 38 µM'dır. Nöroprotektif etki için Alfa humulen için farklılaştırılmamış SH-SY5Y'nin IC₅₀ değeri 24. saatte 221 µg/mL, 48. saatteki IC₅₀ değeri ise 209 µg/mL'dir. Nöroprotektif etki için Alfa humulen için nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y'nin IC₅₀ değeri > 400 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Alfa humulen ile yapılan sitotoksosite çalışmasına paralel bulgular, Alfa humulenin, çeşitli insan tümör hücre hatları (MCF-7, DLD-1, L-929) üzerindeki sitotoksik etkisinin Legault ve Pichette MTT yöntemi ile araştırdığı bir çalışmada elde edilen IC₅₀ değerleri Alfa humulenin MCF-7 hücre hattı için IC₅₀ değeri 10 mg/mL⁻¹, DLD-1 hücre hattı için IC₅₀ değeri > 40 µg/mL⁻¹, L-929 hücre hattı için IC₅₀ değeri > 40 mg mL⁻¹ olarak bulunmuştur (Legault ve Pichette, 2010)

Literatürde, LPS gibi indükleyici bir madde aracılığıyla aktive edilen mikrogliaların, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı ile *in vitro* ko-kültür modeli oluşturulan nöroprotektif etki çalışmaları yer almaktadır (DaSilva vd., 2019; Lo vd., 2011; Ma vd., 2015). *E.coli* lipopolisakkaritlerinden elde edilen ve nöroinflamasyon modellerinde sıklıkla kullanılan LPS, genellikle liyofilize halde ticari olarak satın alınabilmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada IC₅₀ değerlerini bulmuş olduğumuz Alfa humulenin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini de değerlendirdik. Bu kapsamda yapılan AO/PI boyama yöntemi ile nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş ko-kültür modelinde nöroprotektif etki için yapılan apoptozun belirlenmesinde floresans ölçümleri alınarak Cytation 3 Multi-Mode Reader'de birbirinden bağımsız görüntüler çekilmiştir. Floresans ölçümlerle elde edilen sonuçlara göre H₂O₂ IC₅₀ 42 µM, Alfa humulen 50, 100, 200, 400 µg/mL+ 42 µM H₂O₂ (p<0.0001****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur. Apoptozun belirlenmesinde floresans ölçümleri alınarak Cytation 3 Multi-Mode Reader'de çekilen görüntüler sonucunda Alfa humulen ve H₂O₂ ile muamele edilmeyen kontrol hücrelerinin yeşil renkli, sağlıklı ve sağlam çekirdeklere sahip olduğu belirlenerek görüntülenmiştir. 2 saat 42 µM H₂O₂ ile muamele edilmiş H₂O₂ kontrol hücrelerinde yeşil renkli çekirdekler yaşayan hücreleri gösterirken aynı zamanda kırmızıya boyananlar H₂O₂ kaynaklı sitotoksitede apoptozu ifade eder. Apoptoz veya nekrozun geç aşaması olarak belirlenen yüksek ve uygulanan en düşük Alfa humulen konsantrasyonu (400 ve 200, 50 µg / mL) ile muamele edilen hücrelerde kırmızımsı-turuncu renk varlığı tespit edilmiştir.

Literatür taraması yapılarak elde edilen verilere göre Alfa humulenin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde AO/PI boyaması yapılarak apoptozun belirlenmesine dair bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, Mohamed ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada 7-

Geraniloksisinamik'in (1.04–16.67 μM) konsantrasyonlarında sitotoksik etkisine bakılmış, 5.97 μM kurkumin ve 300 μM H_2O_2 4 saat inkübe edilmiş, AO/PI boyama prosedürü uygulanarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda 7- Geraniloksisinamik ve kurkuminin koruyucu etkisi ile apoptozu önleme yeteneğinin ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Mohamed vd., 2020).

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında literatür taraması sonucu elde edilen bilgiler ışığında antimikrobiyal, antikanser ve lokal anestezi özelliği olan Alfa humulenin H_2O_2 ile oluşturulmuş hücre hasarına karşı nöroprotektif özelliği olduğu ve *E.coli* LPS'si ile uyarılmış THP-1 hücreleriyle oluşturulmuş *in vitro* ko-kültür modelinde Alfa humulenin farklı konsantrasyon aralıkları ile meydana gelen etkilerinin apoptotik evreleri morfolojik olarak görülmüş ve floresans ölçümler ile elde edilen sonuçlara göre de Alfa humulenin koruyucu etkisi ile apoptozu önlediği tez kapsamında elde edilen bilgiler arasındadır. Literatürde Alfa humulenin nöroprotektif özelliği ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle özellikle Alfa humulenin nöroprotektif etkisi üzerine Western blot ve Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler biyoloji teknikleri ile moleküler düzeyde çalışma yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bu tezin Alfa humulenin nöroprotektif etkisi üzerine yapılacak olacak çalışmalara katkı sağlar nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

- Abounit, K., Scarabelli, T. M. and McCauley, R. B. (2012). Autophagy in mammalian cells. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(1), 1.
- Akbayır, E., Şen, M., Ay, U., Şenyer, S., Tüzün, E. and Küçükali, C. İ. (2017). PARKİNSON HastalığınınEtiyopatogenezi Etiopathogenesis of Parkinson'S Disease. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 1–23.
- Battista, N., Di Sabatino, A., Di Tommaso, M., Biancheri, P., Rapino, C., Giuffrida, P., Maccarrone, M. (2013). Altered Expression of Type-1 and Type-2 Cannabinoid Receptors in Celiac Disease. *PLoS ONE*, 8(4), 4–9.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. and Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 99–109.
- Bosshart, H. and Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, 4(21), 4–7.
- Brand, M. D. and Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312.
- Browne, S. E., Ferrante, R. J. and Beal, M. F. (1999). Oxidative Stress in HuntingtonÕs Disease, 163, 147–163.
- Cabral, G. A., Rogers, T. J. and Lichtman, A. H. (2015). Turning Over a New Leaf: Cannabinoid and Endocannabinoid Modulation of Immune Function. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10(2), 193–203.
- Cheung, Y. T., Lau, W. K. W., Yu, M. S., Lai, C. S. W., Yeung, S. C., So, K. F. and Chang, R. C. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology*, 30(1), 127–135.
- Clark, T. A., Lee, H. P., Rolston, R. K., Zhu, X., Marlatt, M. W., Castellani, R. J., Perry, G. (2010). Oxidative stress and its implications for future treatments and management of alzheimer disease. *International Journal of Biomedical Science*, 6(3), 225–227.

- Cookson, M. R. (2012). Parkinsonism Due to Mutations in PINK1., *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1–11.
- D’Amico, E., Factor-Litvak, P., Santella, R. M. and Mitsumoto, H. (2013). Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 509–527.
- DaSilva, N. A., Nahar, P. P., Ma, H., Eid, A., Wei, Z., Meschwitz, S., Seeram, N. P. (2019). Pomegranate ellagitannin-gut microbial-derived metabolites, urolithins, inhibit neuroinflammation *in vitro*. *Nutritional Neuroscience*, 22(3), 185–195.
- Datta, P. K. (2013). Neuronal Cell Culture. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 1078, 35–44.
- Dwane, S., Durack, E. and Kiely, P. A. (2013). Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC Research Notes*, 6(1).
- Echeverry, C., Prunell, G., Narbondo, C., de Medina, V. S., Nadal, X., Reyes-Parada, M. and Scorza, C. (2021). A Comparative *In Vitro* Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT_{1A} Receptors. *Neurotoxicity Research*, 39(2), 335–348.
- El Hadri, A., Del Río, M. Á. G., Sanz, J., Coloma, A. G., Idaomar, M., Ozonas, B. R., Reus, M. I. S. (2010). Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 76(3), 343–356.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Eriksen, J. L., Wszolek, Z. and Petrucelli, L. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 62(3), 353–357.
- Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M. I., Nava-Castro, K. E., Castro, J. I. and Morales-Montor, J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 35(1), 1–16.
- Fan, C., Song, Q., Wang, P., Li, Y., Yang, M. and Yu, S. Y. (2019). Neuroprotective

- effects of curcumin on IL-1 β -induced neuronal apoptosis and depression-like behaviors caused by chronic stress in rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(January), 1–17.
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 228–236.
- Figiel, I. (2008). Pro-inflammatory cytokine TNF- α as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68(4), 526–534.
- Fisher, E. R. and Hayden, M. R. (2014). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: Prevalence and population at risk. *Movement Disorders*, 29(1), 105–114.
- Fratiglioni, L. and Qiu, C. (2009). Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Experimental Gerontology*, 44(1–2), 46–50.
- Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U. and Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in alzheimer's disease and parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 797–810.
- Gella, A. and Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion and Migration*, 3(1), 88–93.
- Gitler, A. D., Dhillon, P. and Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(5), 499–502.
- Goldman, A. S. (2002). Evolution of the mammary gland defense system and the ontogeny of the immune system. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(3), 277–289.
- Grotenhermen, F. and Müller-Vahl, K. (2012). Das therapeutische Potenzial von Cannabis und Cannabinoiden. *Deutsches Arzteblatt International*, 109(29–30), 495–501.
- Guo, J. D., Zhao, X., Li, Y., Li, G. R. and Liu, X. L. (2018). Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 1817–1825.

- Hakonen, A. H., Goffart, S., Marjavaara, S., Paetau, A., Cooper, H., Mattila, K., Suomalainen, A. (2008). Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion. *Human Molecular Genetics*, 17(23), 3822–3835.
- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B. and Makriyannis, A. (2016). *Cannabis sativa and Hemp. Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier Inc.
- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F. and Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology*, 7, 181–193.
- Iuvone, T., Esposito, G., De Filippis, D., Scuderi, C. and Steardo, L. (2009). Cannabidiol: A promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 15(1), 65–75.
- Iuvone, T., Esposito, G., Esposito, R., Santamaria, R., Di Rosa, M. and Izzo, A. A. (2004). Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on β -amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), 134–141.
- Jaafaru, M. S., Nordin, N., Shaari, K., Rosli, R. and Abdull Razis, A. F. (2018). Isothiocyanate from *Moringa oleifera* seeds mitigates hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and preserved morphological features of human neuronal cells. *PLoS ONE*, 13(5), 1–17.
- Jain, S., Panuganti, V., Jha, S. and Roy, I. (2020). Harmine Acts as an Indirect Inhibitor of Intracellular Protein Aggregation. *ACS Omega*, 5(11), 5620–5628.
- Kar, B. and Sivamani, S. (2015). Apoptosis: Basic concepts, mechanisms and clinical implications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 940–950.
- Kaya-Tilki, E., Dikmen, M. and Öztürk, Y. (2016). Effects of DNMT and HDAC inhibitors (RG108 and trichostatin a) on NGF-induced Neurite outgrowth and cellular migration. *International Journal of Pharmacology*, 12(4), 351–360.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 377(9769), 942–955.
- Kluger, B., Triolo, P., Jones, W. and Jankovic, J. (2015). The therapeutic potential of

- cannabinoids for movement disorders. *Movement Disorders*, 30(3), 313–327.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Melino, G. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11.
- Lakna. (2017). Difference Between Apoptosis and Necrosis Main Difference Apoptosis vs Necrosis. *Pediaa*, (April). <https://pediaa.com/difference-between-apoptosis-and-necrosis/> from retrieved.
- Langhasova, L., Hanusova, V., Rezek, J., Stohanslova, B., Ambroz, M., Kralova, V., Skalova, L. (2014). Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Industrial Crops and Products*, 59, 20–26.
- Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J. A., Mechoulam, R. and Fernández-Ruiz, J. (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and *in vitro*: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 19(1–2), 96–107.
- Lee, H. (2013). Functional activity of the cannabinoid 1 receptor is not affected by opioid antagonists in the rat brain. *Korean Journal of Anesthesiology*, 64(3), 257–261.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A. and Madelmont, J. C. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, 69(5), 402–407.
- Legault, J. and Pichette, A. (2010). Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1643–1647.
- Li, L., Fei, Z., Ren, J., Sun, R., Liu, Z., Sheng, Z., Fei, J. (2008). Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice. *BMC Immunology*, 9, 1–9.
- Li, Q., Spencer, N. Y., Pantazis, N. J. and Engelhardt, J. F. (2011). Alsln and SOD1G93A proteins regulate endosomal reactive oxygen species production by glial cells and proinflammatory pathways responsible for neurotoxicity. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 286(46), 40151–40162.
- Li, Y., Bao, J., Khatibi, N. H., Chen, L., Wang, H., Duan, Y., Zhou, C. (2011). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation Into Spinal Cord Prolongs the Survival of Mutant SOD1G93A ALS Rats Through Neuroprotection and Remyelination. *Anatomical Record*, 294(5), 847–857.
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., Pauwels, P. (2012). Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *PLoS ONE*, 7(10).
- Lo, Y. C., Shih, Y. T., Chen, I. J. and Wu, Y. C. (2011). San-Huang-Xie-Xin-Tang protects against activated microglia- and 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A. and Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Research*, 27(5 A), 3293–3299.
- Ma, K., Wu, H. Y., Zhang, B., He, X. and Li, B. X. (2015). Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. *Molecular BioSystems*, 11(11), 2915–2924.
- Machado, K. da C., Islam, M. T., Ali, E. S., Rouf, R., Uddin, S. J., Dev, S., Melo-Cavalcante, A. A. de C. (2018). A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2376–2388.
- Madeira, J. M., Bajwa, E., Stuart, M. J., Hashioka, S. and Klegeris, A. (2014). Gold drug auranofin could reduce neuroinflammation by inhibiting microglia cytotoxic secretions and primed respiratory burst. *Journal of Neuroimmunology*, 276(1–2), 71–79.
- Matias, I., Pochard, P., Orlando, P., Salzet, M., Pestel, J. and Di Marzo, V. (2002). Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *European Journal of Biochemistry*, 269(15), 3771–3778.
- McKenzie, J. A., Barghash, R. F., Alsaggaf, A. T., Kulkarni, O., Boudreau, K., Menard, F., ... Klegeris, A. (2019). Synthesis and Evaluation of Novel Pyrazole

- Ethandiamide Compounds as Inhibitors of Human THP-1 Monocytic Cell Neurotoxicity. *Cells*, 8(7), 655.
- Mechoulam, R., Parker, L. A. and Gallily, R. (2002). Cannabidiol: An overview of some pharmacological aspects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42(11), 11–19.
- Mohamed, Z. A., Eliaser, E. M., Jaafaru, M. S., Nordin, N., Ioannides, C. and Razis, A. F. A. (2020). Neuroprotective Effects of 7-Geranyloxycinnamic Acid from *Melicope lunu ankenda* Leaves. *Molecules*, 25(16).
- Neuenschwander, U., Czarniecki, B. and Hermans, I. (2012). Origin of regioselectivity in α -humulene functionalization. *Journal of Organic Chemistry*, 77(6), 2865–2869.
- Nur Hanisah, A., Norsharina, I., Mustapha Umar, I. and Maznah, I. (2013). Ethyl acetate extract of germinated brown rice attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of anti-apoptotic, pro-survival and antioxidant genes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(177).
- Özdemir, A. and Ark, M. (2014). xCELLigence Real Time Cell Analysis System: A New Method for Cell Proliferation and Cytotoxicity. *Niche Journal*, 2(2), 15–17.
- Özkay, Y., Yurttaş, L., Dikmen, M. and Engür, S. (2016). Synthesis and antiproliferative activity evaluation of new thiazole-benzimidazole derivatives using real-time cell analysis (RTCA DP). *Medicinal Chemistry Research*, 25(3), 482–493.
- Påhlman, S., Hoehner, J. C., Nånberg, E., Hedborg, F., Fagerström, S., Gestblom, C., Söderholm, H. (1995). Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 31(4), 453–458.
- Park, H., Kang, J. H. and Lee, S. (2020). Autophagy in neurodegenerative diseases: A hunter for aggregates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 1–24.
- PerkinElmer (2011). Chemdraw Pro 15.0 .
- Peng, Y. P., Qiu, Y. H., Lu, J. H. and Wang, J. J. (2005). Interleukin-6 protects cultured cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters*, 374(3), 192–196.
- Pertwee, R. G. (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: An overview. *International Journal of Obesity*, 30, S13–S18.

- Petrosino, S., Verde, R., Vaia, M., Allará, M., Iuvone, T. and Di Marzo, V. (2018). Anti-inflammatory properties of cannabidiol, a nonpsychotropic cannabinoid, in experimental allergic contact dermatitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(3), 652–663.
- Ranjitha, V. R., Muddegowda, U. and Ravishankar Rai, V. (2019). Potent activity of bioconjugated peptide and selenium nanoparticles against colorectal adenocarcinoma cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(9), 1496–1505.
- Rogério, A. P., Andrade, E. L., Leite, D. F. P., Figueiredo, C. P. and Calixto, J. B. (2009). Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 158(4), 1074–1087.
- Santos, N. A. G., Martins, N. M., Sisti, F. M., Fernandes, L. S., Ferreira, R. S., Queiroz, R. H. C. and Santos, A. C. (2015). The neuroprotection of cannabidiol against MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. *Toxicology in Vitro*, 30(1), 231–240.
- Savitskaya, M. A. and Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80(11), 1393–1405.
- Schamberger, C. J., Gerner, C. and Cerni, C. (2005). Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 302(1), 115–128.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A. and Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(108), 1–11.
- Shirendeb, U., Reddy, A. P., Manczak, M., Calkins, M. J., Mao, P., Tagle, D. A. and Reddy, P. H. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: Implications for selective neuronal damage. *Human Molecular Genetics*, 20(7), 1438–1455.
- Sutin, A. R., Stephan, Y. and Terracciano, A. (2019). Verbal fluency and risk of dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 34(6), 863–867.

- Tanasescu, R. and Constantinescu, C. S. (2010). Cannabinoids and the immune system: An overview. *Immunobiology*, 215(8), 588–597.
- Ulugöl, A. (2014). The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Medical Journal*, 31(2), 115–120.
- Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O. and Rössner, S. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-Year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, 365(9468), 1389–1397.
- Wiley, J. L. and Martin, B. R. (2002). Cannabinoid pharmacology: Implications for additional cannabinoid receptor subtypes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 121(1–2), 57–63.
- Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 1–11.
- Xie, H. R., Hu, L. Sen and Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086–1092.
- Zahedifard, M., Faraj, F. L., Paydar, M., Looi, C. Y., Hajrezaei, M., Hasanpourghadi, M., Abdulla, M. A. (2015). Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Scientific Reports*, 5(February), 1–17.
- http1:**<http://www.arpege.cnrs.fr/wpcontent/uploads/2016/10/SystemexCELLigenceARPEGE.pdf> (Erişim Tarihi: 01.06.2016).

