



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÜYÜME HORMONUNUN PARKİNSON HÜCRE  
MODELLEMESİ ÜZERİNDE TERAPÖTİK VE KORUYUCU  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

KADİR SİNAN ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. AHMET ARMAN

2020-İSTANBUL



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı

Kadir Sinan ARSLAN

İmza



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam için bana daima yardımcı olan ve yol gösteren, ufkumu genişleten, yeni ve yüksek idealler aşılayan, her zaman kapısını açan ve her sorunumda yanımda olan yalnızca hocalık değil bana ustalık yapan, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Arman’a,

Tez çalışmam boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen, bütün problemlerde yanımda olan tezimin uygulama kısmında güler yüzle ve sabırla bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ayşegül Doğan’a,

Beni aralarına alan, kendimi yabancı hissetmeme sebep olmadan karşılaştığım büyük küçük her engelde canı gönülden yardımcı olan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Taha Bartu Hayal, Selinay Şenkal, Burcu Şişli, Derya Sağraç, Sevda Demir ve Binnur Kıratlı’ya,

Tezimi yürütebilmem için bana kapılarını açan ve bütün laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikrettin Şahin’e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana hep en yakın arkadaşlığı yapan Halil İbrahim Koç’a,

Ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman benden esirgemeyen bana herkesten çok güvenen ve beni herkesten çok seven aileme teşekkür,

Bana sahip olduğum her şeyi veren, faydasız ilimden ve ilim hamallığından ona sığındığım Allah’ıma ise hamdüsena ederim.

## İçindekiler

|                                                                       |                                     |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| BEYAN .....                                                           | Hata! Yer işareti tanımlanmamış.iii |
| TEŞEKKÜR .....                                                        | iv                                  |
| Kısaltmalar ve Simgeler Listesi .....                                 | 7                                   |
| Şekil listesi .....                                                   | 8                                   |
| Resim listesi.....                                                    | 9                                   |
| Tablo listesi .....                                                   | 10                                  |
| 1. ÖZET .....                                                         | 11                                  |
| 2. SUMMARY .....                                                      | 12                                  |
| 3. GİRİŞ ve AMAÇ .....                                                | 13                                  |
| 4. GENEL BİLGİLER.....                                                | 14                                  |
| 4.1. Parkinson Hastalığı.....                                         | 14                                  |
| 4.1.1. PH’de olası rolleri olan genler .....                          | 15                                  |
| 4.1.2. Parkinson hastalığı ve dopamin reseptörleri .....              | 16                                  |
| 4.1. Oksidatif Stres .....                                            | 16                                  |
| 4.2. 6-OHDA Mekanizması ve Nörotoksitesi .....                        | 16                                  |
| 4.3. Parkinson Hastalığı Modellemesi.....                             | 18                                  |
| 4.4. Büyüme Hormonu.....                                              | 18                                  |
| 4.4.1. Büyüme hormonu regülasyonu ve sekresyonu.....                  | 19                                  |
| 4.4.2. Büyüme hormonu ekspresyonu.....                                | 20                                  |
| 4.4.3. Büyüme hormonu ve büyüme faktörü farkı .....                   | 21                                  |
| 4.4.4. Büyüme hormonunun klinikte kullanımı.....                      | 22                                  |
| 4.4.5. Büyüme hormonu ve nörodejeneratif hastalıklarda kullanımı..... | 22                                  |
| 5. GEREÇ ve YÖNTEM.....                                               | 24                                  |
| 5.1. Hücre Kültürü .....                                              | 24                                  |
| 5.2. 6-Hidroksi Dopamin Uygulaması.....                               | 24                                  |
| 5.3. İnsan Büyüme Hormonu Uygulaması.....                             | 25                                  |
| 5.4. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Uygulaması .....                   | 25                                  |
| 5.5. Farmakolojik tedavi.....                                         | 26                                  |
| 5.6. MTS testi .....                                                  | 26                                  |
| 5.7. Hücre Sayımı Testi.....                                          | 26                                  |
| 5.8. RNA izolasyonu .....                                             | 27                                  |
| 5.9. cDNA sentezi .....                                               | 27                                  |
| 5.10. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Analizi ..... | 28                                  |

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6. BULGULAR.....                                                                     | 30 |
| 6.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Işık Mikroskobu Altındaki Görünümler .....                 | 30 |
| 6.2. MTS Testi.....                                                                  | 34 |
| 6.3. Hücre Sayımı .....                                                              | 35 |
| 6.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi ile Gen İfadelerinin Ölçümü.. | 36 |
| 7. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                                           | 39 |
| KAYNAKLAR .....                                                                      | 41 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                       | 51 |



### Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

|            |                                                                                          |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| PH         | Parkinson hastalığı                                                                      |
| BH         | Büyüme Hormonu                                                                           |
| 6-OHDA     | 6-hidroksidopami                                                                         |
| ng/ml      | nanogram/mililitre                                                                       |
| $\mu$ M/ml | mikromolar/mililitre                                                                     |
| PBS        | Fosfat tamponlu salin                                                                    |
| nm         | nanometre                                                                                |
| DMSO       | Dimetilsülfoksit                                                                         |
| ROS        | Reaktif oksijen türleri                                                                  |
| DNA        | Deoksiribonükleik asit                                                                   |
| MAO        | Monoamin oksidaz                                                                         |
| FBS        | Fetal Buzağı serumu                                                                      |
| MTS        | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |

## Şekil listesi

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Parkinson genlerinin işleyiş mekanizması. Miquel Vila & Serge Przedborski 2004 den uyarlanmış ve Türkçeleştirilmiştir.....                                             | 15 |
| <b>Şekil 2.</b> 6-OHDA yolağı. D. Blum ve arkadaşları 2001 den uyarlanmış ve Türkçeleştirilmiştir.....                                                                                 | 17 |
| <b>Şekil 3.</b> Büyüme hormonu hücre içi sinyal yolağı, Man lu ve ark 2019 dan alınmıştır.....                                                                                         | 20 |
| <b>Şekil 4.</b> Büyüme hormonu sentezlenen dokuların RNA miktarları ve Protein izoformları. Perez-Ibave ve ark. 2014 dan uyarlanmış ve Türkçeleştirilmiştir.....                       | 21 |
| <b>Şekil 5.</b> Büyüme Hormonunun 100ng/ml ve 10.000ng/ml aralığında hücre canlılığına olan etkisi.....                                                                                | 34 |
| <b>Şekil 6.</b> Büyüme hormonu ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanması sonrası canlı kalan hücre miktarı.                                                                         | 35 |
| <b>Şekil 7.</b> Büyüme Hormonu ve 6-OHDA uygulanması sonrası canlı hücre sayısı .....                                                                                                  | 36 |
| <b>Şekil 8.</b> 6-OHDA 100 µM/ml ve 150 µM/ml, BH 1000ng/ml ve 6-OHDA-BH Kombine verilmiş şekildeki grupların gen ifadelerindeki değişiklikler.....                                    | 37 |
| <b>Şekil 9.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 300 µM/ml, BH 1000ng/ml ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -BH kombine verilmiş şekildeki grupların gen ifadelerindeki değişiklikler. .... | 37 |

## **Resim listesi**

**Resim 1.** Hücrelerin Büyüme Hormonu uygulaması sonrasında 24 saat sonraki görünümleri. ....30

**Resim 2.** Hücrelerin 6-OHDA uygulaması sonrasında 24 saat sonraki görünümleri.31

**Resim 3:** Hücrelere 1 saat 1000ng/ml lik büyüme hormonlu besi yeri verildikten sonra, 100 µM/ml 6-OHDA eşliğinde sırasıyla 100, 200, 500 ve 1000 ng/ml BH verilmiş ve üzerinden 24 saat geçmiş halleri .....32

**Resim 4.** Hücrelere 1 saat 1000ng/ml lik büyüme hormonlu besi yeri verildikten sonra, 150 µM/ml 6-OHDA eşliğinde sırasıyla 100, 200, 500 ve 1000 ng/ml BH verilmiş ve üzerinden 24 saat geçmiş halleri. ....33

## **Tablo listesi**

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> cDNA sentezinde kullanılan karışım protokolü.....    | 28 |
| <b>Tablo 2.</b> cDNA Reaksiyon protokolü .....                       | 28 |
| <b>Tablo 3.</b> qPCR analizinde kullanılan genlerin primerleri ..... | 28 |
| <b>Tablo 4.</b> qPCR analizi için kullanılan karışım protokolü ..... | 29 |
| <b>Tablo 5.</b> qPCR reaksiyon protokolü .....                       | 29 |



## 1. ÖZET

### **Büyüme Hormonunun Parkinson Hücre Modellemesi Üzerinde Terapötik ve Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**

Öğrenci Adı: Kadir Sinan ARSLAN

Danışman Adı: Prof. Dr. Ahmet Arman

**Amaç:** Parkinson hastalığı beyinde basal gangliyo ve elemanlarındaki dopamin miktarında azalma ve substantia nigradaki hücrelerin ölümü ile ortaya çıkan dünyada en sık karşılaşılan nörodejenarasyon rahatsızlıklarından birisidir. Büyüme hormonuyla ilgili yapılan çalışmalar BH'nin apoptoz karşıtı bir protein olmasına ek olarak BH'nin nöron hücrelerini yenilediği ve dopamin miktarını artırdığını göstermiştir. Bu tezde BH'nin 6-OHDA ile in-vitro Parkinson hastalığı modellemesi yapılmış SH-SY5Y hücre hattı üzerinde nöron koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve yöntem:** 6-OHDA nın öldürücü dozu olan 100µM/ml ile 1000ng/ml BH birlikte verilerek hücrelerdeki değişim gözlemlendi. Hücre hayatta kalımı mts ve boyayarak canlı hücre sayımı ile hesaplandı, ayrıca hücrelerden RNA izole edilerek qPCR ile ilgili genlerin ifade miktarına bakıldı ve böylece BH'nin olası etkileri genomik olarak da incelendi.

**Bulgular:** Büyüme Hormonunun oksidatif stresi önleyici ve nöron hücrelerinde 6-OHDA kaynaklı oluşan mitokondriyal disfonksiyonu ve oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünü durdurabileceği ve hücreleri bunun etkisinden koruyabileceği ortaya konuldu.

**Sonuç:** Bu çalışma BH'nin 6-OHDA'lı parkinson hücre modellemesinde apoptozu önleyip proliferatif etki gösterebileceğini ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında BH'nin parkinson hastalığı için potansiyel bir nöroprotektif veya teröpotik bir ajan olabileceğini düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Büyüme Hormonu, parkinson, 6-OHDA, nörodejenarasyon, apoptoz

## 2. SUMMARY

### **Investigation of Therapeutic and Protective Effects of Growth Hormone on Parkinson's Cell Modeling**

Student Name: Kadir Sinan ARSLAN

Name of Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ARMAN

**Objective:** Parkinson's disease is one of the most common neurodegeneration disorders in the world caused by the decrease in the amount of dopamine in the basal ganglia and the death of cells in the substantia nigra. Studies on growth hormone have shown that is an anti-apoptosis protein, GH has proliferative effect on neuron cells and increases the amount of dopamine. In this thesis, it was aimed to determine the neuroprotective effect of GH on SH-SY5Y cell line modelled with 6-OHDA *in-vitro* Parkinson disease.

**Material and methods:** The morphological change in the cells was observed by administering the lethal dose of 6-OHDA with 100  $\mu\text{m}$  / ml and 1000 ng / ml BH. Cell survival was calculated by MTS and live cell counting. The mRNA was isolated from cells and qPCR was performed with this. Thus, the possible effects of GH were also examined genomically.

**Results:** It has been demonstrated that Growth Hormone can inhibit 6-OHDA-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress-induced cell death in neuronal cells. Thus, it protects the cells.

**Conclusion:** This is the first study to demonstrate that GH can prevent apoptosis and have a proliferative effect in parkinson cell modeling which made by 6-OHDA. In the light of the findings obtained from the study, we think that GH may be a potential neuroprotective or therapeutic agent for parkinson's disease.

**Keywords:** Growth Hormone, parkinson, 6-OHDA, neurodegeneration, apoptosis

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bu araştırmanın amacı 6-OHDA ile in vitro Parkinson hastalığı modellenmesi yapılmış SH-SY5Y hücre hattında insan büyüme hormonunun nöron koruyucu etkiye sahip olup olmadığı incelemektir.

Parkinson hastalığının en karakteristik nörokimyasal özelliği striatumdaki dopamin kaybıdır(Ehringer ve ark.,1960) en önemli patolojik özelliği ise substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronların hücre içi oksidatif stresin artmasına bağlı olarak dejenerasyonudur. Nigral nöronların kaybı striatumda şiddetli dopaminerjik denervasyona da neden olur (Blandini ve ark.,2000). Nigral dopaminerjik nöron kaybına ek olarak dopa dekarboksilaz ve dopamin taşıyıcıları gibi presinaptik dopamin terminalleri belirteçlerinin kaybı da eşlik etmektedir, (Spillantini ve ark.,1997; Baba ve ark.,1998). Büyüme hormonu monoamin (serotonin, dopamin ve noradrenalin gibi) (Stern ve ark.,1975), dopaminerjik sistem (Andersson ve ark.,1983) ve dopaminerjik aktiviteyi uyarır (Johansson ve ark.,2004), beyin nörotransmitterlerinin çoğunu etkiler. Büyüme hormonunun dopaminerjik aktiviteyi artırdığıyla, dopamin ve büyüme hormonu arasında çok net bağlantı olduğuyla alakalı çalışmalar literatürde mevcuttur( Johansson ve ark., 2004; Wong ve ark., 1992). BH ve IGF-1, yaralanma sonrası beyin onarımında büyük ölçüde yer almaktadır (Scheepens ve ark.,2000) ve hipokampal dentat girustaki (Sun ve ark.,2005; Cameron ve ark.,2006) olgun ve olgunlaşmamış nöronların hayatta kalmasını uyarır ve nöronal öncüllerin çoğalmasını teşvik eder (Devesa ve ark.,2011). Bütün bu bilgiler büyüme hormonunun nörokoruyucu etkisi olduğunu ve diğer ALS, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson ve Demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda yeni bir terapi yöntemi olabileceğini temsil edebilir. Projenin sonuçlarına göre büyüme hormonu verilen parkinson modellenmesi yapılmış hücrelerde meydana gelen değişiklikler ileride büyüme hormonunun doğrudan parkinsonlu hastalarda uygulanmasının ve hastalığın tedavisine ya da ilerlemesini durdurmaya katkı sağlamasının önünü açmasına sebep olabilir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Parkinson Hastalığı

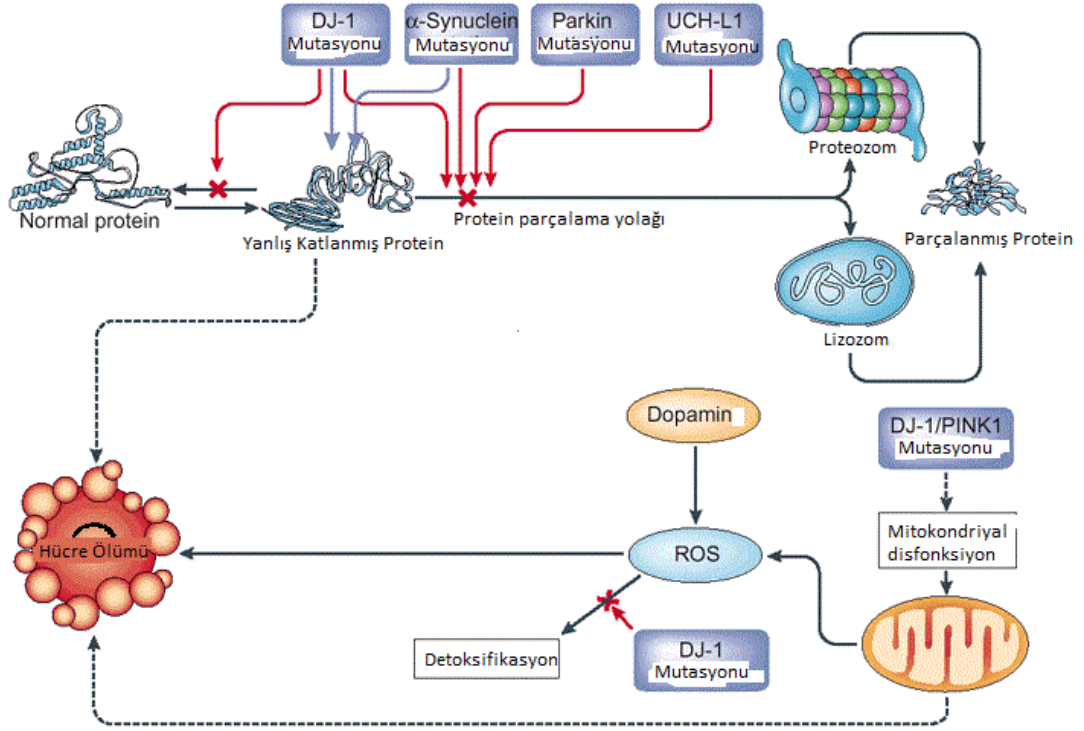
Parkinson hastalığının görünme sıklığı 50-59 yaş üzeri kişilerde ortalama binde 1, 60-69 yaş arası binde 4 70 yaş ve üstünde ise yüzde 1'lere kadar çıkabilmektedir. (De Rijk ve ark., 2000). PH'nin 1990'dan 2016'ya 2 kattan fazla artarak, nüfusun yaşlanması ve de PH'li kişilerin sağ kalımı göz önünde bulundurulduğunda 2030'a kadar bu sayının 2 katına çıkacağı tahmin edilmektedir (Marras ve ark., 2018).

Parkinson hastalığı hareket bozuklukları içerisinde en sık rastlanan hastalık olmakla birlikte nörodejenereatif bozukluklarda Alzheimer hastalığından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Klinik olarak bradikinezi, rijidite ve tremor ile karakterize olup dopaminerjik nöronların nigral dejenerasyonu nedeniyle ortaya çıkar (Benabid ve ark.,2001; De Rijk ve ark.,2000). Parkinson hastalığı 1960'lı yıllara kadar halen ölümle sonuçlanabilen bir hastalıktı. Parkinson hastalığının en karakteristik nörokimyasal özelliği striatumdaki dopamin kaybıdır. Parkinson hastalarında çeşitli beyin bölgelerinde dopamin kaybı ortaya konulduktan sonra, tedavi edilebilir hale gelmiştir (Ehringer ve ark.,1960). Dopamin kaybının paterninin ise düzensiz olduğu gösterilmiştir.

Parkinson hastalığının bir diğer patolojik özelliği Lewy cisimciği olarak adlandırılan anormal sitoplazmik kalıntıların varlığıdır. Ancak en önemli patolojik özelliği substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronların dejenerasyonudur. Nigral nöronların kaybı striatumba şiddetli dopaminerjik denervasyona neden olur (Blandini ve ark.,2000) ve Striatumba dopamin seviyeleri %80 azaldığında motor semptomlar ortaya çıkar (Dauer ve Przedborski., 2003). Nigral dopaminerjik nöron kaybına ek olarak TH, dopa dekarboksilaz ve dopamin taşıyıcıları gibi presinaptik dopamin terminalleri belirteçlerinin kaybı da eşlik etmektedir (Spillantini ve ark.,1997; Baba ve ark.,1998).

#### 4.1.1. PH’de olası rolleri olan genler

PH’ye sebebiyet verdiği düşünölen ya da aday olan çok sayıda gen bulunmaktadır. Bu genler birbirinden farklı mekanizmalarda rol alsalar da hepsi olmasa da birçoğu hücre içi oksidatif stresle alakalı yollaklarda etkilidirler. En anlamlı genler ise “PARK” olarak tanımlanmıştır örn: (UCHL1 [PARK5], GYGYF2 [PARK11], OMI/HTRA2 [PARK13], PLA2G6 [PARK14], ve FBXO7 [PARK15]) (Shulman ve ark., 2011). Ayrıca Parkinson’a sebep olduğu düşünölen mutasyonlara ve etkilerine baktığımızda genelde hücre içi oksidatif stresi ya da mitokondriyal disfonksiyona sebep olan proteinler ortaya çıkmasına sebep olduklarını görürüz(Şekil 1.).



**Şekil 1.** Parkinson genlerinin işleyiş mekanizması. Miquel Vila & Serge Przedborski 2004’den uyarlanmış ve Türkçeleştirilmiştir.

Mevcut mutasyonların doğrudan hücre içi oksidatif strese yol açtığı ya da mitokondriyal disfonksiyona sebep olarak hücre ölümüne yol açtığı düşünölmekte ve şekildeki gibi bir etki mekanizması olduğu varsayılmaktadır.

#### **4.1.2. Parkinson hastalığı ve dopamin reseptörleri**

Dopamin kaybının bazal gangliyon yollarında ve dengelemesinde ciddi sonuçları vardır. Klasik modellemede bazal gangliyodaki dopamin kaybı motor ağlarının hareketlerinin başlamasını uyaran ve engelleyen dengesizliğe neden olur. Bazal gangliyalarda ise dopamin reseptörleriyle ilişkili iki ana yol vardır bunlardan biri D1 reseptörleri ki bu doğrudan yoldur, dolaylı yol ise D2 reseptörleridir. (Gerfen ve ark. 1990; Floran ve ark.,1990) Bir diğer fenomene göre PH da dopamin reseptörlerinin aşırı duyarlılığı dopamin reseptörlerinin genetik olarak yeniden düzenlemesine yol açmaktadır. Bu da PH'nin dopamin miktarı ya da dopamin reseptör miktarıyla doğrudan ya da dolaylı bir bağlantısı olduğunun kanıtıdır.

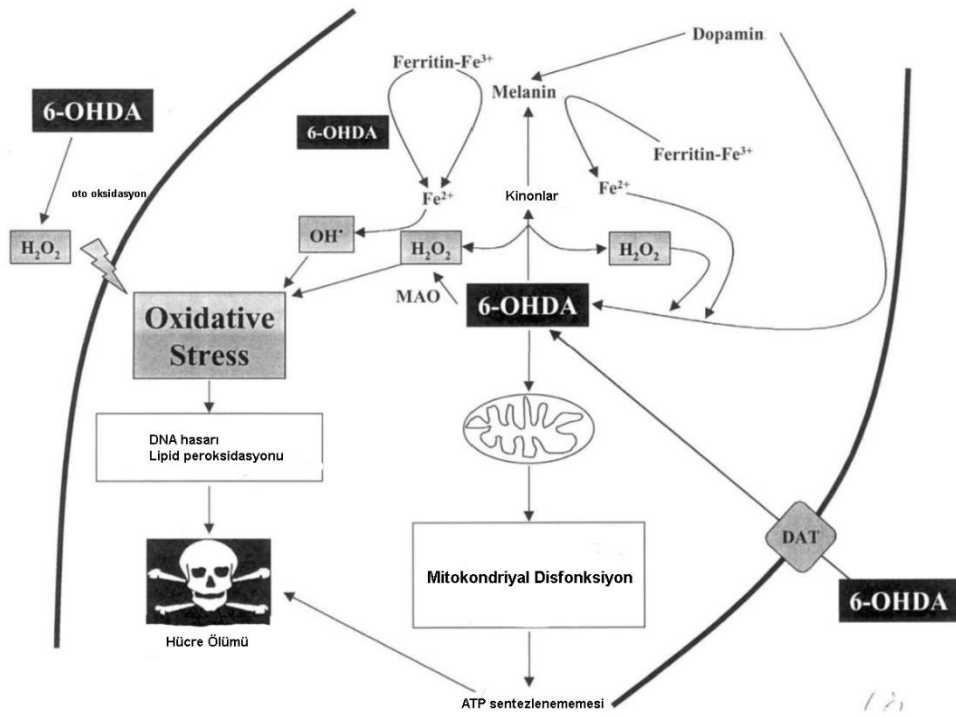
#### **4.1. Oksidatif Stres**

PH'de dopaminerjik hücrelerde mitokondri görevini yerine getiremez ve bu disfonksiyonun neden olduğu oksidatif stres artar, ancak hücre ölümünde oksidatif stresin erken mi yoksa geç mi ortaya çıktığı konusu tam olarak kesin değildir (Dias ve ark., 2013). Antioksidan proteini kodlayan DJ1 genindeki mutasyon, hücre içi oksidatif stresini arttırdığı biliniyor ve nakavt DJ1 fare deneylerinde, nigral dopaminerjik nöronlarda protein oksidasyonu gözlemlenmiştir (Di Nottia ve ark., 2017). Çalışmalar, dopaminerjik nöronların nispeten daha uzun büyük ve miyelinsiz olmasından dolayı metabolik ve oksidatif strese duyarlı olduğunu göstermiştir. Artan oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon varlığı lizozom bozulmasına ve lizozomal otofaji sisteminde (LAS) bozulmaya yol açar ve hücre ölümü gerçekleşir (Dehay ve ark., 2010; Lotharius ve Brundin, 2002).

#### **4.2. 6-OHDA Mekanizması ve Nörotoksitesi**

Mevcut literatüre bakıldığında 6-OHDA deneylerde en çok kullanılan nörotoksinlerden birisidir. 6-OHDA, doğal dopamin nörotransmitterinin hidroksillenmiş bir analogudur. 1959'da Senoh tarafından izole edilmiştir (Senoh ve Witkop, 1959a, b;). Birçok çalışma sinir hücrelerini yok etme yeteneğini göstermiştir (Tranzer ve Thoenen, 1967, 1968; Thoenen ve Tranzer, 1968). 6-OHDA'nın

mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da bilindiği kadarıyla hücreyi iki farklı yoldan etkileyebilmekte. Bunlardan birincisi DAT ile hücre içine girip stoplazmadaki MAOa tarafından katalizlenerek hücre içi serbest oksijen miktarını artırarak oksidatif stres yapması ve mitokondriye gidip mitokondriyal disfonksiyon yapması ya da hücre içine DAT yoluyla girmeden hücre dışında oksitlenip hücreyi oksidatif strese sokmasıyla hücreyi apoptoza götürerek biten bir sürecin başlamasına sebep olması olarak açıklanabilir(Şekil 2).



Şekil 2. 6-OHDA yolağı. D. Blum ve arkadaşları 2001 den uyarlanmış ve Türkçeleştirilmiştir.

6-OHDA hücreye dopamin taşıyıcı protein(DAT) vasıtasıyla girer ve hücre içinde monoamin oksidaz ile katalize olarak ortaya  $H_2O_2$  çıkarır.  $H_2O_2$ 'nin ortaya çıkması sonucunda hücre içi oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon baş gösterir ve buna bağlı olarak hücre apoptoza uğrayarak ölür.

#### **4.3. Parkinson Hastalığı Modellemesi**

Parkinson hastalığında en yaygın kullanılan hayvan modellerinden biri, sıçanlarda, substantia nigra pars kompakta da dopaminerjik hücre ölümüne yol açan 6-OHDA'dır. Dopaminerjik ve noradrenerjik taşıyıcılar tarafından alınır ve hücre ölümüne yol açar (Jeon ve ark.,1995). 6-OHDA mitokondriyal komplekste toksiktir ve süperoksit serbest radikaller ile kinonların düzenlenmesine katkıda bulunur (Bove ve ark.,2005). Striatuma 6-OHDA enjeksiyonunda retrograd hücre ölümü indüklenir ve potansiyel ajanın etkisini göstermesi için daha uzun bir zaman dilimi sağlar. Retrograd hücre kaybı iki adımda ortaya çıkar; hızlı faz büyük ölçüde 3-4 haftada gerçekleşir, onu takip eden yavaş ve uzun süreli faz lezyondan sonra aylarca sürebilir (Kirik ve ark.,1998). Mediyal ön beyin demetine yapılan enjeksiyon dopaminerjik nöronların neredeyse tümünün tükenmesine yol açmaktadır. Pontine Raphe nükleus ve Locus coeruleus gelen liflere sahip mediyal ön beyin demetine yapılan 6-OHDA enjeksiyonu yalnızca dopaminerjik değil aynı zamanda serotonerjik ve noradrenerjik liflerin de kaybına yol açmaktadır.

Hücre modellemelerinde ise, 6-OHDA çalışmalarından elde edilen sonuçlar, oksidatif stresin aracılık ettiği apoptotik hücre ölümünün, parkinson hastalığı modelinde dopaminerjik nöronların selektif dejenerasyonuna önemli bir katkıda bulunan faktör olduğunu göstermektedir. 6-OHDA'nın, çeşitli hücre dizilerinde ve primer nöron kültürlerinde mitokondriyal disfonksiyonu ve kaspaz aktivasyonunu bozduğu gösterilmiştir. (Choi ve ark.,1999; Dodel ve ark.,1999; Liu ve ark., 2007; Kim ve ark., 2010; Zhou ve ark.,2000).

#### **4.4. Büyüme Hormonu**

Büyüme hormonu (BH), hipofiz bezinin ön lobunun somatotrop hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan bir hormondur (De Vos ve ark.,1992). BH büyümede ve karbonhidrat-yağ metabolizmasında rol alır ve biyolojik etkilerini, transmembran ve hücre içi bölgeleri de içeren tek geçişli bir protein olan BH reseptörünün hücre dışı alanına bağlayarak uygular. Tek bir BH molekülünün, iki BH reseptör molekülüne bağlanması ve böylece reseptörün dimerizasyonu ile sonuçlanır (Cunningham ve ark.,1991; Argetsinder ve ark.,1996). BH eylemleri çoklu organları ve sistemleri

içerir. Postnatal boyuna büyüme ve gelişme, ancak intrauterin büyüme değil normal pulsatil BH salgılanmasına bağlıdır (Gluckman ve ark.,1981). BH ayrıca protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasındaki değişikliklerden sorumludur (Le Roith ve ark.,2001).

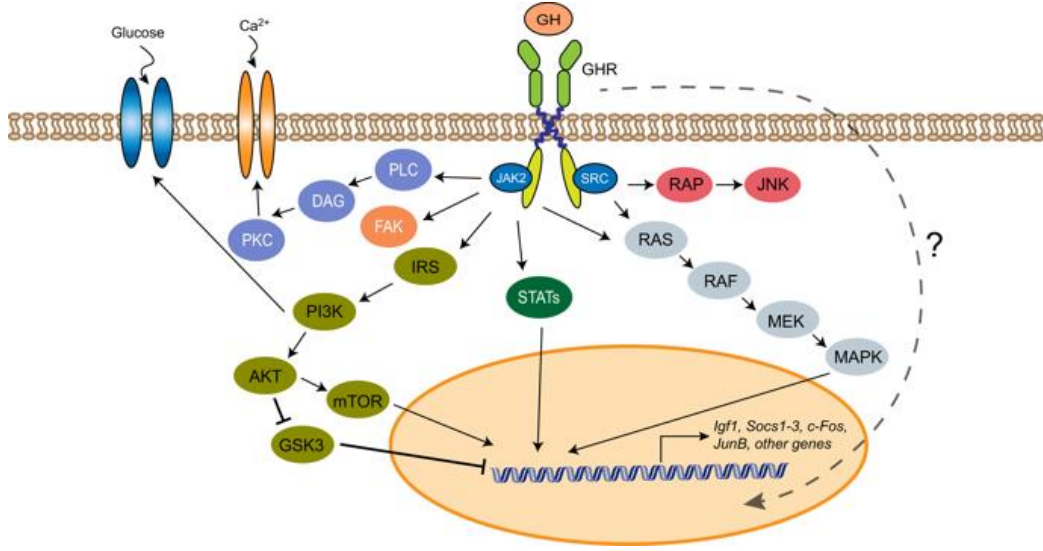
#### **4.4.1. Büyüme hormonu regülasyonu ve sekresyonu**

BH sekresyonu, hipotalamus ve BH eylemlerinin aracıları tarafından düzenlenir. Düzenleyici faktörler arasında BH serbest bırakma hormonu (BHRH), somatostatin, BH serbest bırakma peptidi (ghrelin) bulunur. BH / IGF1 sisteminin bozuklukları, ya BH aşırı duyarlılığından (devasa, akromegali) ya da BH eksikliğinden kaynaklanır.

Kandaki BH serbest durumda ya da BH bağlayıcı protein (BHBP) kompleksindedir. Kompleks, bozunma hızını azaltarak dolaşım sistemindeki BH'nin yarı ömrünü iyileştirir ve ayrıca ekstrasvasküler varlığı kısıtlar (Weigent, 1996).

Regülasyonunda ise mevcut BH miktarı esas olarak, somatotropin salınımını inhibe edici faktör (SRIF) olarak adlandırılan BH salgılama hormonu (BHRH) ve bu eylemi baskılayan somatostatinin karşılıklı etkileri, fizyolojik uyarıcılar ve inhibitörler ile düzenlenir (Kochar, 2010).

Ayrıca, BH, BH salınımının baskılanmasına neden olan negatif geri beslemeye katılan diğer hormonlar, yani insülin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) da bu regülasyonda etkili olabildiği gibi glukokortikoid hormonlar, tiroid hormonu ve retinoik asitin A vitamini formu BH'nin upregülasyonun sağlayan faktörlerdendir (Kopchick and Woodley, 1997).



**Şekil 3.** Büyüme hormonu hücre içi sinyal yolağı, Man lu ve ark 2019'dan alınmıştır.

Büyüme hormonu kendine spesifik olan büyüme hormonu reseptörüne bağlanarak başta Jak-stat yolakları olmak üzere özellikle karbonhidrat ve yağ metabolizmasında etkili genler olmak üzere bazı büyüme faktörlerini de etkileyerek birçok genin ifadesini artırır.

#### 4.4.2. Büyüme hormonu ekspresyonu

İnsan BH 17.kromozomda q22-24 gen lokusunda bulunur ve yüksek oranda korunmuş olan 50 kb'lık bir bölgedir ve 5 genden oluşur. Bunlardan 4 tanesi plasentada aktifken 1 tanesi doğumdan sonra hayat boyu aktiftir. Bu genler (hGH-N, hCS-L, hCS-1, hGH-V, hCS-2) aralarında yüksek sekans benzerliğine rağmen farklı dokularda üretilir. GH-N geni, ön hipofizin somatotrof hücreleri tarafından transkripsiyonlanır, diğerleri plasental trofoblastlarla eksprese edilir (Baumann, 2009).



#### **4.4.4. Büyüme hormonunun klinikte kullanımı**

Büyüme hormonunun orta veya ağır şiddetli kafa travmasında tedavi amaçlı kullanılabileceğiyle ilgili çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Örneğin, travmatik beyin ameliyatlarında büyüme hormonunun etkilerini araştıran ve 161 kişide yapılan bir çalışmada hastalara 1 yıl boyunca günlük 0.37mg büyüme hormonu verilmiş ve sonunda hastaların hayat kalitesinde anlamlı derecede iyileşme olduğu gözlemlenmiştir (Gardner ve ark.,2015). Ayrıca yapılan diğer deneylerde kognisyonu artırdığı (Moreau ve ark.,2013) kognitiv ve motor becerileri geliştirip görme becerilerinin iyileştiği (Maric ve ark.,2010) kognitiv parametrelerin yanında IQ ve WAİS ölçeklerinde büyüme hormonu alan hastaların yüksek aldığı (Reimunde ve ark.,2011) ve yine 2008 yılında yapılan 854 kişilik büyük ölçekli bir çalışmada da günlük 0.3 mg büyüme hormonu alan hastaların hayat kalitesinin arttığı görülmüştür. (Kreitschmann ve ark.,2008) Friedman ve ark. (Freidman ve ark.,2013) hafif bilişsel erişkin hastalarda BHRH uygulamasının alzheimer hastalığında da olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir.

#### **4.4.5. Büyüme hormonu ve nörodejeneratif hastalıklarda kullanımı**

Hayvanlardaki deneysel modeller, BH'nin kan beyin bariyerinin kılcal damarları tarafından emildiğini, BH akışının basit difüzyonla gerçekleştiği kavramını desteklediği, ancak belirli bir taşıma sisteminin gösterilemediğini göstermiştir (Pan ve ark.,2005). BH / IGF-1 hücrel fonksiyonun belirleyici düzenleyicileridir ve BH ve ilerleyen yaştaki IGF-1, doku yapısında ve fonksiyonlarında, özellikle de beyinde ciddi değişikliklere neden olur (Ashpole ve ark.,2015). BH ön hipofiz bezi tarafından salgılanır ve birincil etki BH reseptörlerinin aktivasyonu ve IGF-1'in salgılanması, özellikle karaciğer tarafından (Giustina ve ark.,1998) ve yerel olarak beyin tarafındandır (Frago ve ark.,2002). Bu nedenle, BH iki bağımsız etki mekanizmasıyla hareket eder: biri hücrel BH reseptörlerini aktive eder, diğeri ise karaciğer tarafından IGF1 salgılanmasını uyarır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) kanda altı bağlama proteini, IGF-BP1-6 ile taşınır ve IGF-1 esas olarak IGF-BP3 ile taşınır (Holly ve Perks.,2006).

BH, beyin korteksi nöronlarının zarında, talamus ve hipotalamus nöronlarında, beyin sapının Purkinje hücrelerinde, beyin sapının trapezoid body nöronlarında nöron membranında bulunan BH reseptörlerini aktive ederek doğrudan beyin üzerinde etki edebilir (Lobie ve ark.,1993). Serebral korteksin embriyonik kültürlerinde, BH'nin nöronal prekürsör ve glial hücreleri uyardığı, (Aio ve ark., 2003; Miller ve ark.,1995), nörojenez, miyelin ve sinaptogenezi arttırdığı gösterilmiştir (Aberg ve ark.,2006). Yetişkinlerde, BH uygulaması beyin fonksiyonunu, öğrenmeyi, hafızayı ve nöroproteksiyonu düzenler (Oertel ve ark.,2004). Faredeki BH eksikliği, oligodendroglial hücrelerde ve miyelinasyon prosesinde azalmaya neden olur (Morisawa ve ark.,1989). Yetişkin beyindeki en bol ve iyi çalışılmış bir glial hücre tipi olan astrositler (Kimelberg, 2010), beyin sağlığının korunmasında inflamasyonla korunarak çok önemli bir rol oynar (Sofroniew, 2015). Oligodendrositler, aksonlardaki miyelin üretiminden sorumludur ve onlara uzun süreli bütünlük sağlayarak besleyici destek sağlar (Nave, 2010). Miyelin kaybı, çeşitli nörolojik hastalıklardan sorumludur ve nöropsikiyatrik bozukluklara katkıda bulunur. BH apoptozu etkileyen genleri aşağı yönlü regüle ederek nöroprotektif olarak da görev yapar (Shin ve ark., 2004).

İlginç bir şekilde, BH, monoamin (serotonin ve noradrenalin gibi) (Stern ve ark., 1975), dopaminerjik sistem (Andersson ve ark., 1983) ve dopaminerjik aktiviteyi uyarır (Johansson ve ark., 2004), beyin nörotransmitterlerinin çoğunu etkiler. IGF-1, BH ile karşılaştırıldığında motor ve duyuşal nöronlarda ve nöronal gelişim ve rejenerasyonda daha güçlü bir etkiye sahiptir (Stewart ve ark., 1996; Caroni ve Grandes., 1990; Glazner ve Ishii., 1995; Dore ve ark.,1997). IGF-1 ve reseptör geninin mutasyonuna bağlı olarak azalmış bir IGF-1 sinyalinin, mikrosefali ve zihinsel bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir. (Juanes ve ark.,2015; Abou Ghoch ve ark.,2013).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Hücre Kültürü

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri(ATCC) Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölüm başkanı Prof.Dr. Fikrettin Şahin den temin edildi. Hücreler Dulbecco Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HIGH) %1 L-glutamin ve %10 fetal buzağı serumu (FBS) içeren besi ortamında 24 saat süre ile 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> ve nemlendirilmiş atmosferde kültürlendi. Her 2-3 günde bir hücrelerin besi ortamı değiştirilerek yenilendi. %70-90 çoğalan flasklardaki hücreler pasajlanarak, yeni flasklara alındı. İlerleyen pasajlarda ortaya çıkabilecek fenotipik değişimleri önlemek ve farklı zamanlarda tekrar aynı hücre hattıyla çalışabilmek için hücreler pasajlanırken ihtiyaç kadarı %10 DMSO ile -196°C’deki azot tankında yedeklendi.

Dondurulan hücreler ihtiyaç halinde azot tankında alınarak 37 °C ye düşürülerek çözündürüldü. Çözülen hücreler donması için hazırlanan besiyerindeki DMSO dan uzaklaştırılması amaçlanarak 5ml besi ortamı ile 15ml lik falkonda birleştirilerek 300xg de 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü ve tüpün üzerinde biriken süpernatant tek hamlede atık kabına döküldü. Tüpün altında kalan pellet hücreler bir kısım besi yeri ile pipetlenerek önceden hazırlanmış olan flask içerisindeki besi ortamına alındı. Gerekli etiketleme yapıldıktan sonra hücreler 37 °C sıcaklıkta, nemlendirilmiş CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücreler genel olarak 2x10<sup>6</sup> hücre/ml lik 25cm<sup>2</sup> ve 75cm<sup>2</sup> lik platelerde büyütülüp MTS analizi için 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olarak 96 well platelere alındı. Total RNA izolasyonu içinse ayrı ayrı 6 well platelere 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde ekilerek doz uygulandı. (Chen ve ark.,2015).

### 5.2. 6-Hidroksi Dopamin Uygulaması

Parkinson hastalığı çalışmalarında dopaminerjik nöron kaybının mekanizması ile ilgili çalışmalarda genellikle MPTP, rotenon ve 6-OHDA ile oluşturulan deneysel modellerden sağlanmaktadır (Liang vd., 2011; Shimohama vd., 2003).

Bu çalışmada in-vitro Parkinson hastalığı modeli oluşturmak için hücrelerin yaklaşık %50 oranında ölümünü sağlayacak olan toksik doz belirlenerek dopaminerjik nöron kaybının taklit edilmesi hedeflendi. Bunun için SH-SY5Y hücrelerinin besi ortamına farklı konsantrasyonlarda 6-OHDA(Sigma) (50-100-150-200  $\mu$ M/ml) eklendi.

Ana stoktan ölçülerek alınan 1mg'lık toz halindeki 6-OHDA ışıksız ortamda tartılarak %0,01 lik askorbik asit/PBS çözeltisinde çözdürüldü ve 10mM'lık 500  $\mu$ l çözelti elde edildi, bu çözelti 4,5ml besiyeri içeren falkona aktarılarak toplamda 5ml ve 1000uM çözelti elde edilerek filitrelendi. Her deney öncesi yeniden tartılıp taze hazırlandı.

### **5.3. İnsan Büyüme Hormonu Uygulaması**

İnsan büyüme hormonu olarak Genotropin 12mg(Pfizer) kullanıldı. Biyofilize halde gelen hormon kitin içindeki 1ml lik saf su ile nazikçe karıştırılarak kontaminasyon riski göz önünde bulundurularak ort.300'er mikro litrelik 3 farklı steril ependorflara alınarak buharlaşmayı önlemek adına parafilm ile ağızları kapatıldı. Hormon 1 ay süre kullanıldı 1 ayı doldurduğunda yeni hormon temin edildi. 12mg'lık Hormon, DMEM HIGH media ile ihtiyaç kadarı ana stoktan alınarak seyreltildi, ana stok ışıktan ve ısıdan korundu. Hazırlanan hormon besi ortamına farklı konsantrasyonlarda (100-1000ng) eklendi. Hormonun kullanılması için herhangi bir aktiveleştiriciye ya da ek madde eklenmesine gerek yoktu.

### **5.4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Uygulaması**

Nörolojik korunma etkisinin incelenmesinde sık kullanılan hidrojen peroksit ile oksidatif strese maruz bırakarak programlı hücre ölümüne yol açma yöntemi için ihtiyaç duyulan -ana stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12M olarak hesaplandı- hücrelere daha önce toksik etkisi görülen doz olan 300uM ana stoktan seyreltilerek ve her defasında taze olacak şekilde verildi(Yalvaç ve ark., 2011). Daha sonra hücreler RNA izolasyonu için toplandı ve pellet şeklinde -20°C de saklandı, ayrıca pellet haline getirilmeden uygun şekilde pipetlenerek içinden bir miktar alındı ve hemocytometer kullanılarak sayıldı.

### 5.5. Farmakolojik tedavi

6 well platelere  $1 \times 10^5$  hücre/ml olarak ekilmiş hücreler en yüksek proliferasyon etkisi gösteren doz olan 1000 ng/ml lik büyüme hormonuyla 2 saat boyunca muamele edilip içindeki büyüme hormonlu besiyeri değiştirilmeden üstüne 24 saatlik toksik doz olarak belirlenen 6-OHDA'nın 100µl ve 150µl lik iki farklı doz ayrı ayrı gruplandırılıp hem büyüme hormonlu hem 6-OHDA'lı ortam sağlandı ve co-treatment grubumuzu oluşturdu (Guo ve ark., 2005).

### 5.6. MTS testi

MTS tuzu (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) Promega CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder olarak temin edildi ve 42 ml PBS'de 84mg olacak şekilde çözüldü, ayrıca phenazine methosulfate (PMS) 2,1 ml PBS'e 2,016 mg eklendi ve iki çözelti kombine edilip filtrelendi ve farklı zamanlarda kullanılmak için 2 ml'lik ependorflara paylaştırılarak -20°C de saklandı. Bütün işlemler ışısız ortamda gerçekleştirildi. Deney gruplarına MTS testi uygulandıktan sonra hücreler UV spektrofotometrede 490nm- 630nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

### 5.7. Hücre Sayımı Testi

RNA izolasyonu için kaldırılan hücrelerden 100µl çöktürülmeden önce iyice pipetlenerek farklı gruplar halinde ayrı ayrı steril ependorfa alındı. Ependorftan 10µl alınan hücreler 10µl tiripan mavisini solusyonuyla karıştırılarak 60 saniye beklendi. Canlı hücreler seçici geçirgen oldukları için tiripan mavisini hücre içine almayıp parlak renkte kalırken ölü hücreler maviye boyandı. Sayımda Bright-Line™ Hemacytometer lamı kullanıldı. Sayılan hücreler total çözelti miktarı baz alınarak aşağıdaki verilen formüle göre hesaplandı.

$$2 * \frac{\text{sayılan hücre}}{4} * \text{Hücrelerin alındığı dilüsyon miktarı(ml)} \\ = \text{Total hücre sayısı / ml}$$

### 5.8. RNA izolasyonu

Farmakolojik tedavi oluşturulan gruplar 6 well platelerden 500µl tripsin edta ile kaldırılarak ayrı ayrı ependorflara alınıp pellet olarak -20°C de saklandı. Pelletlerden daha sonra aşağıdaki protokol uygulanarak trizol(sigma TRI Reagent®) ile manuel RNA izolasyonu yapıldı.

1. Besiyerinden tamamen arındırılmış hücre pelletlerinin üstüne 1 ml Trizol eklenerek hücreler parçalanıncaya kadar pipetleme yapıp 5 dakika inkübe edildi.
2. Üzerine 200µl soğuk Kloroform eklendi ve 15 saniye ters düz edilerek nazikçe çalkalanıp 3 dakika inkübe edildi.
3. İnkübe edilen hücreler 12,000xg de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi.
4. Üstfaz olan şeffaf kısım başka bir ependofa alındı ve üzerine 500µl soğuk isopropanol eklenerek 10 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası 12,000xg de 10 dakika 4°C de santrifüj edildi.
6. Pellete dikkat edilerek soğuk isopropanol döküldü.
7. Üzerine %75'lik soğuk Etanol/dH<sub>2</sub>O eklendi ve 2 saniye vortekslendi.
8. Vortekslenen ürünler 7,500xg de 5 dakika 4°C de santrifüj edildi.
9. Üzerindeki alkol dökülerek ependorf içinde kalan alkol uçması için 15 dakika bekletildi.
10. İçindeki alkolün tamamen uçtuğuna emin olduğunda 30µl RNAzsız ultra saflaştırılmış suda çözülerek -80°C de saklandı.

### 5.9. cDNA sentezi

İzole edilen RNA'lar Mikro-Hacim Spektrofotometreler (Nano-Drop) ile ölçülerek her biri 1µg gelecek şekilde hesaplanıp protokole uygun hazırlandı. Kit olarak BIO-RAD'ın Script™ cDNA Synthesis Kit kullanıldı ve protokolüne uygun şekilde reaksiyonlar gerçekleştirildi. Sentez karışımı protokolü (Tablo 1.) ve reaksiyon protokolü (Tablo 2.) aşağıda belirtilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar 30µl Nükleazsız suda çözüldükten sonra tekrar ölçüldü ve 10ng/µl olacak şekilde seyreltilip -20°C de stoklandı.

**Tablo 1.** cDNA sentezinde kullanılan karışım protokolü

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| 5x İscript Reaksiyon mix      | 4µl  |
| iScript Reverse transkriptaz  | 1µl  |
| RNA                           | 1µl  |
| Ultra arıtılmış nükleazsız su | 14µl |

**Tablo 2.** cDNA Reaksiyon protokolü

|                                      |                |
|--------------------------------------|----------------|
| İşleme hazırlama                     | 5 dakika 25°C  |
| Tersine transkripsiyon               | 20 dakika 46°C |
| Tersine transkripsiyon inaktivasyonu | 1 dakika 95°C  |

### 5.10. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Analizi

Sentezlenen cDNA'lar -20°C den alınıp çözündükten sonra aşağıdaki protokole uygun şekilde gerçek zamanlı PCR analizi için kullanıldı. qPCR analizi için PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix - Thermo Fisher kiti kullanıldı. Reaksiyonlarda kullanılan genler (Tablo 3.), reaksiyon karışımı protokolü (Tablo 4.) ve reaksiyon protokolü (Tablo 5.) aşağıda verilmiştir.

**Tablo 3.** qPCR analizinde kullanılan genlerin primerleri

| Gen       | Düz Primer                     | Ters Primer                  |
|-----------|--------------------------------|------------------------------|
| P53       | 5' GCCCAACAACACCAGCTCCT 3'     | 5' CCTGGGCATCCTTGAGTTCC 3'   |
| BCL2      | 5' AACGGAGGCTGGGATGCCTTTGTG 3' | 5' ACCAGGGCCAACTGAGCAGAGT 3' |
| Caspase 3 | 5' GAGGCGGTTGTAGAAGAGTTCGTG 3' | 5' TGGGGGAAGAGGCAGGTGCA 3'   |
| Caspase 7 | 5' GGAGAAAGCTCATGGCTGTGT 3'    | 5' TCCCCTTGGCTGTGTTTTG 3'    |
| PTEN      | 5' TGTGGTCTGCCAGCTAAAGG 3'     | 5' ACACACAGGTAACGGCTGAG 3'   |

|       |                             |                              |
|-------|-----------------------------|------------------------------|
| GAPDH | 5' AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC 3' | 5' GGGGTCATTGATGGCAACAATA 3' |
|-------|-----------------------------|------------------------------|

**Tablo 4.** qPCR analizi için kullanılan karışım protokolü

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| SYBR green mix                | 5µl    |
| Ultra arıtılmış nükleazsız su | 2µl    |
| Ters primer                   | 0,5 µl |
| Düz primer                    | 0,5 µl |
| cDNA                          | 1 µl   |

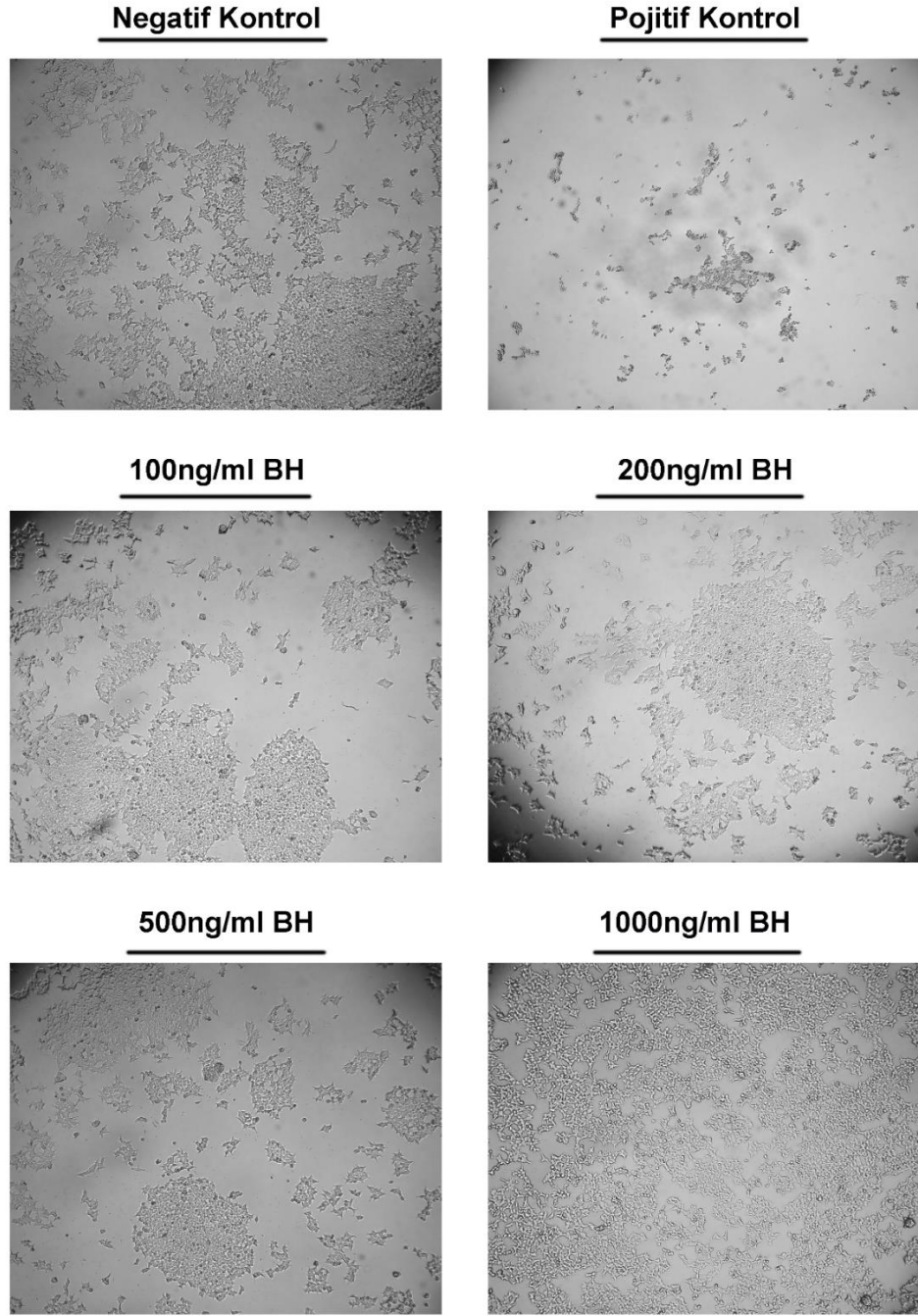
**Tablo 5.** qPCR reaksiyon protokolü

|                                                   |                |
|---------------------------------------------------|----------------|
| İşleme hazırlama ve denatürasyon                  | 3 dakika 93°C  |
| Denatürasyon                                      | 30 saniye 93°C |
| Pirimer bağlanması                                | 40 saniye 59°C |
| Amplifikasyon                                     | 45 saniye 72°C |
| Denatürasyondan itibaren 39 defa döngüye alınması | 39x Döngü      |
| Amplifikasyon Uzatma(ekstensiyon)                 | 10 dakika 72°C |

## 6. BULGULAR

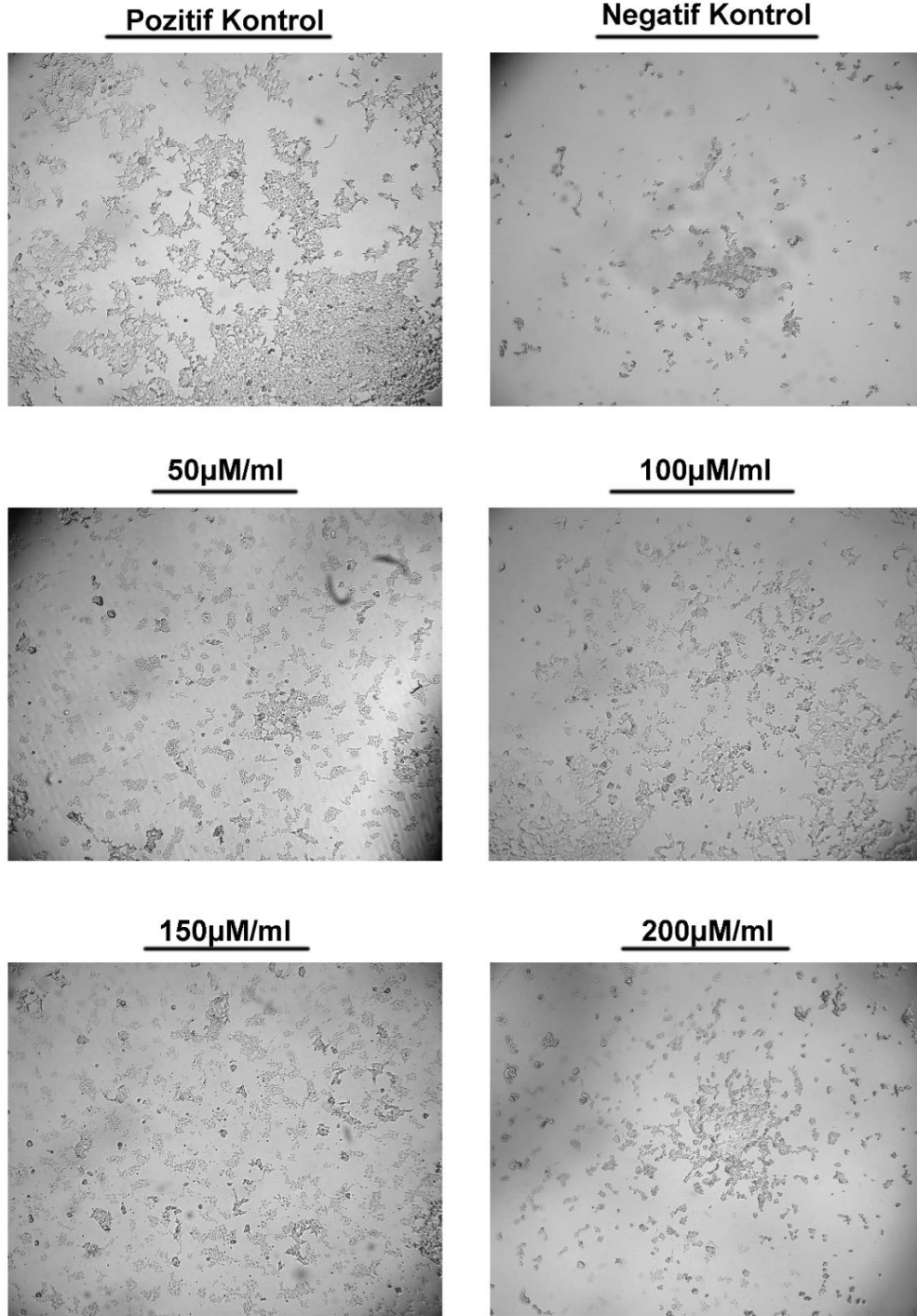
### 6.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Işık Mikroskobu Altındaki Görünümler

Büyüme hormonu ve toksik madde uygulamalarından sonra, SH-SY5Y hücrelerinin inverted mikroskopla elde edilen görüntüleri Resim 1.- 4. de verilmiştir.



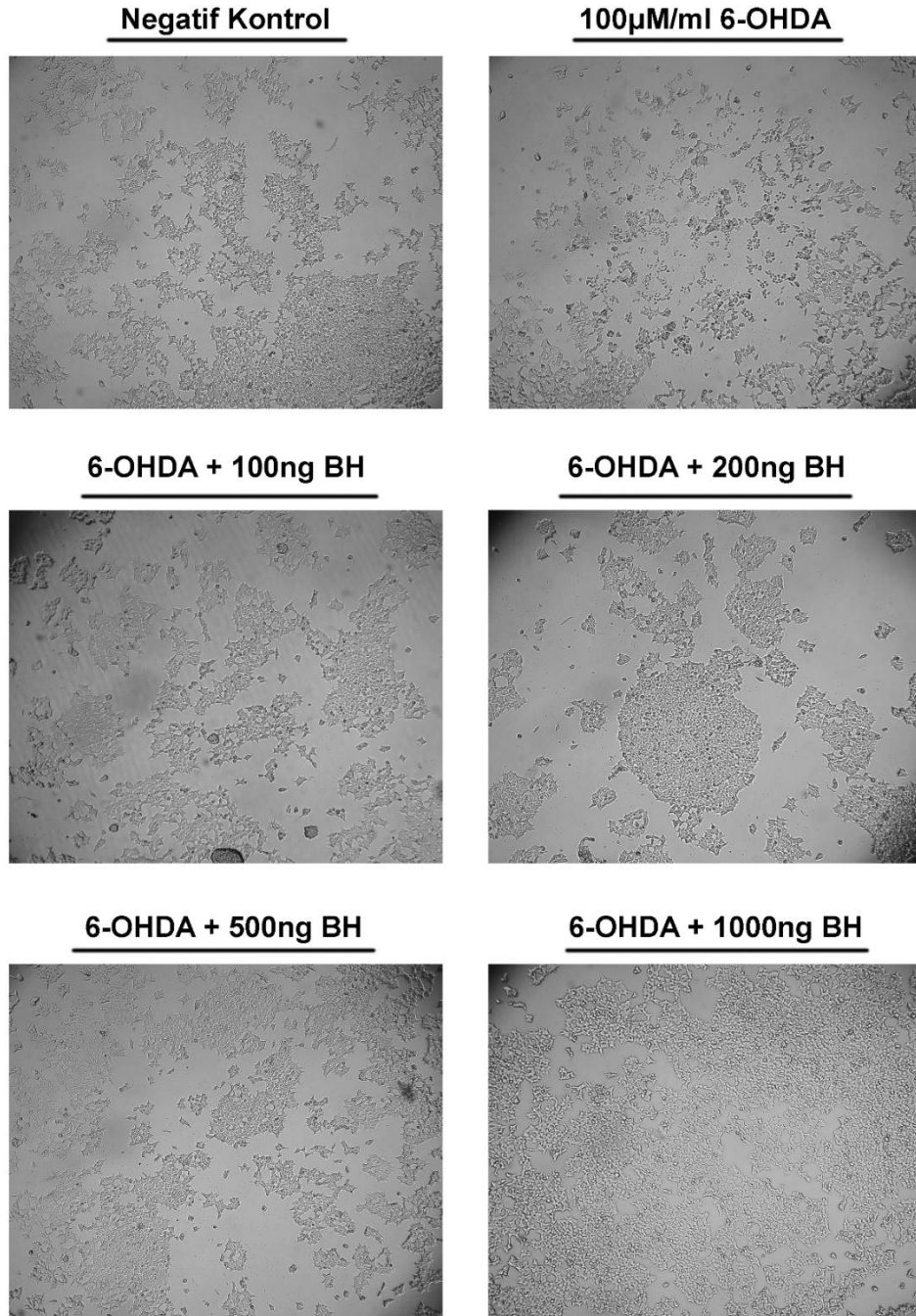
**Resim 1.** Hücrelerin Büyüme Hormonu uygulaması sonrasında 24 saat sonraki görüntüleri.

Resim 1. de görüldüğü gibi büyüme hormonu proliferasyonu nc ye göre anlamlı derecede arttırmamış ve 1000ng a kadar toksik etki görülmemiş. 1000ng da hücreler kolonize olmayıp morfolojilerinde nöron hücresine doğru bir değişim gözlemlenmiş ancak bu diğer testlerle kanıtlanmamıştır.



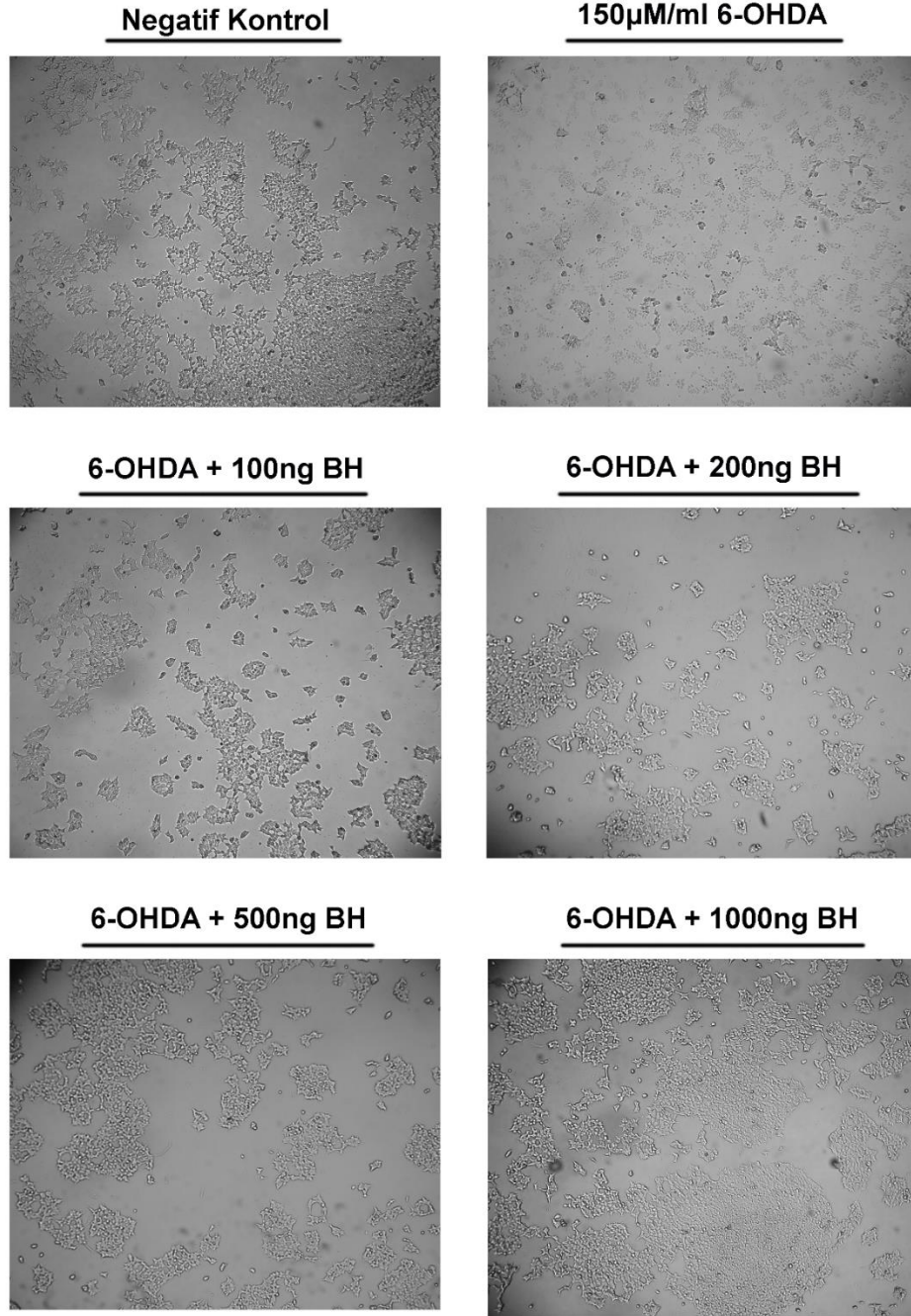
**Resim 2.** Hücrelerin 6-OHDA uygulaması sonrasında 24 saat sonraki görünüşleri.

Resim 2. de görüldüğü gibi 6-OHDA verilen gruplarda hücre canlılığı 24 saatte azalmış. Doz arttıkça canlılık ve sağ kalımlarda ise morfolojik değişiklikler gözlemlenmiş 100  $\mu$ M/ml 6-OHDA dozu yeterince hücrenin ölmesine sebep olmuştur.



**Resim 3:** Hücrelere 1 saat 1000ng/ml lik büyüme hormonlu besi yeri verildikten sonra, 100  $\mu$ M/ml 6-OHDA eşliğinde sırasıyla 100, 200, 500 ve 1000 ng/ml BH verilmiş ve üzerinden 24 saat geçmiş halleri.

Hücrelere kombine dozlar verilmeden önce hepsi 1000ng/ml lik BH'ye maruz bırakıldı ve sonrasında yukarıda belirtilen dozlar ayrı ayrı hazırlanarak verildi. Şekil 3x de görüldüğü üzere Büyüme hormonu dozu arttıkça hücrelerideki canlılığın arttığı gözlemlendi.



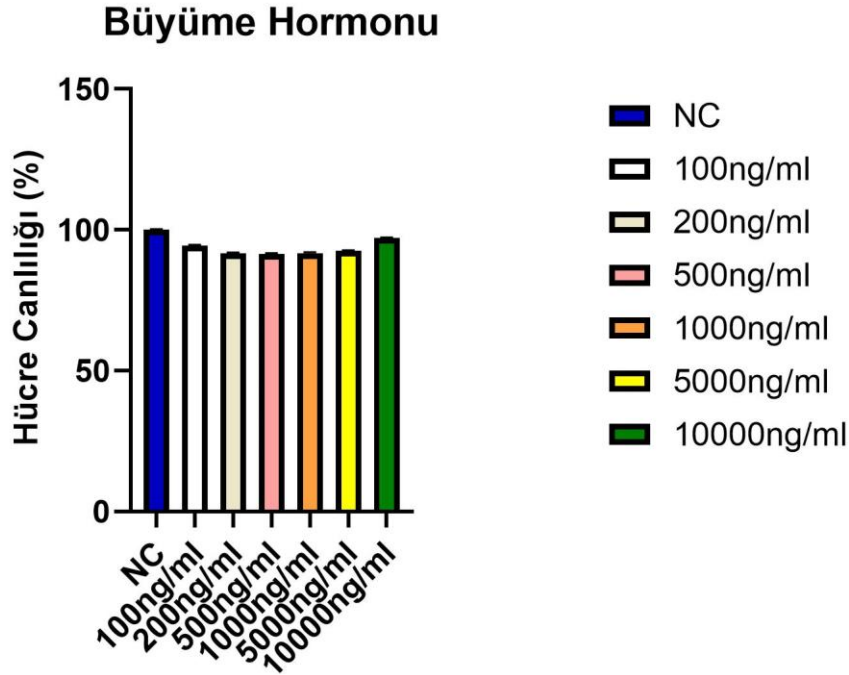
**Resim 4.** Hücrelere 1 saat 1000ng/ml lik büyüme hormonlu besi yeri verildikten sonra, 150 µM/ml 6-OHDA eşliğinde sırasıyla 100, 200, 500 ve 1000 ng/ml BH verilmiş ve üzerinden 24 saat geçmiş halleri.

Hücrelere kombine dozlar verilmeden önce hepsi 1000ng/ml’lik BH’ye maruz bırakıldı ve sonrasında yukarıda belirtilen dozlar ayrı ayrı hazırlanarak verildi. Resim 4 de görüldüğü üzere büyüme hormonu dozu arttıkça hücrelerdeki canlılığın arttığı gözlemlendi.

Ayrıca Resim 3. ve Resim 4.’e bakıldığında kendi aralarında da 6-OHDA dozunun artmasına bağlı olarak fark olduğu ve 150  $\mu$ M/ml 6-OHDA’lı grupta hücrelerin daha az olduğu görülmekte.

## 6.2. MTS Testi

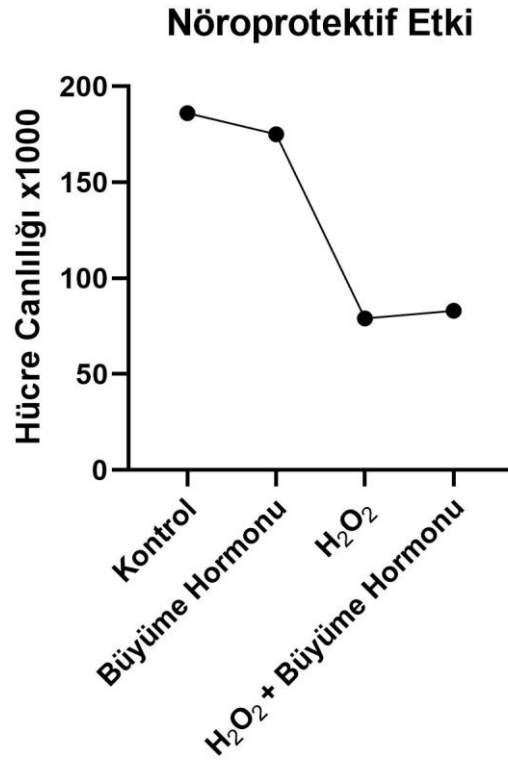
Hücreler 96 well platelere her bir grup 4 biyolojik tekrarlı olmak üzere kuyucuk başı 10.000 hücre olmak üzere ekildikten 24 saat sonra 100-10.000 ng/ml olacak şekilde değişik dozlara maruz bırakılmış ve şekil 5. de görüldüğü gibi 24 saat sonra büyüme hormonunun toksik etkisi olup olmadığı MTS yöntemi ile incelenmiş ve BH’nin 10.000 ng/ml dahi toksik etki yapmadığı görülmüştür.



Şekil 5. Büyüme Hormonunun 100ng/ml ve 10.000ng/ml aralığında hücre canlılığına olan etkisi.

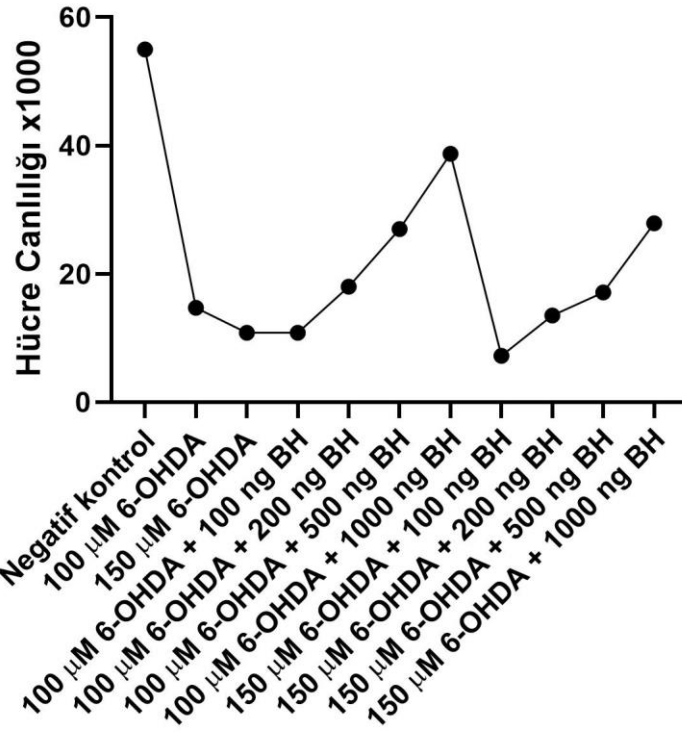
### 6.3. Hücre Sayımı

Farmakolojik tedavi uygulanan ve RNA izolasyonu için kaldırılan hücrelerden 100µl steril ependorflara alındıktan sonra metotta anlatıldığı gibi sayımı yapılmıştır.



Şekil 6. Büyüme hormonu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması sonrası canlı kalan hücre miktarı.

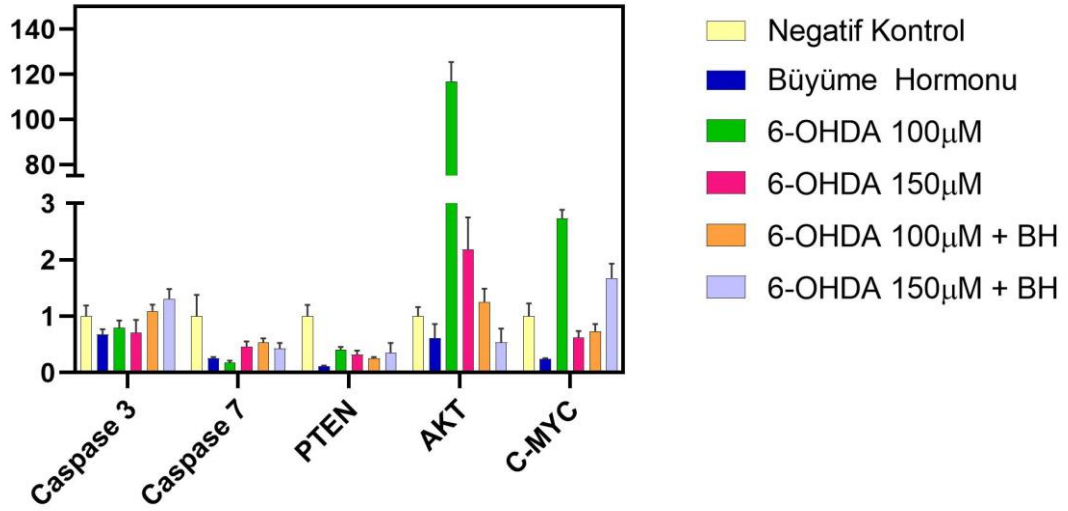
### 6-Ohda Karşısında BH etkisi



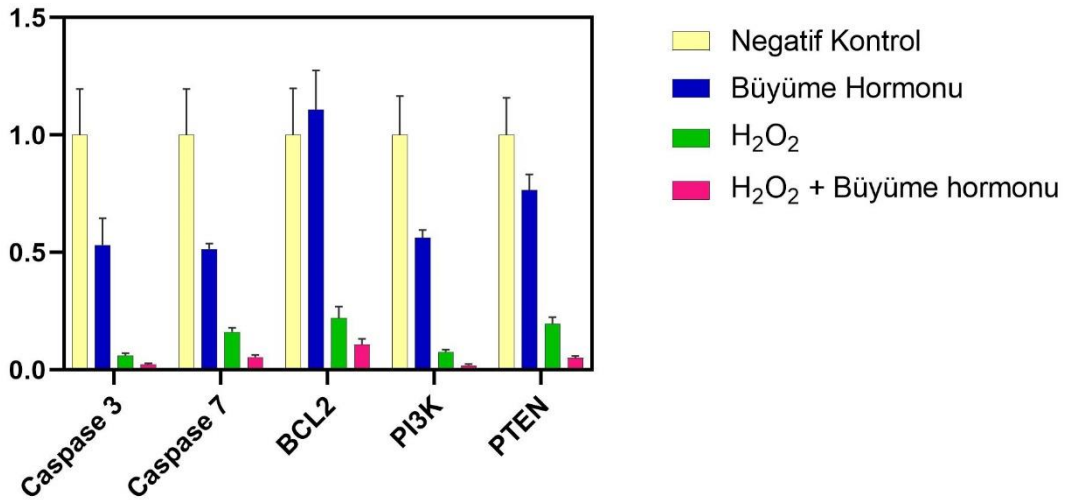
Şekil 7. Büyüme Hormonu ve 6-OHDA uygulanması sonrası canlı hücre sayısı

#### 6.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi ile Gen İfadelerinin Ölçümü

Hücreler 6 well platelerden toplanıp RNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevirilmiş ve metotta belirtilen şekilde qPCR yapılmıştır. qPCR sonucunda 6-OHDA'lı grubun gen ifadeleri Şekil 1. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li grubun gen ifadeleri ise şekil 2. de verilmiştir.



Şekil 8. 6-OHDA 100 µM/ml ve 150 µM/ml, BH 1000ng/ml ve 6-OHDA-BH Kombine verilmiş şekildeki grupların gen ifadelerindeki değişiklikler.



Şekil 9. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM/ml, BH 1000ng/ml ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-BH kombine verilmiş şekildeki grupların gen ifadelerindeki değişiklikler.

Şekil 7. ve Şekil 8. incelendiğinde Büyüme hormonu kontrol grubuna göre apoptozu engellemiş, combine ve yalnızca toksik madde verilen gruplara bakıldığında da yine aynı etki görülmüş, ancak toksik dozlar ve kontrol arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış ayrıca BH nu hücre proliferasyonunu etkileyen genlerin ifadelinde

anlamalı bir değişikliğe sebep olmamış ve bu da hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri ve MTS sonuçlarıyla birlikte dengeli bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez kapsamında 6-OHDA ile oluşturulan invitro parkinson modelinde Büyüme hormonunun nörokoruyucu etkisi ortaya konulmuştur. 1000ng ve üzeri büyüme hormonunun hücrelerde 10.000ng a kadar toksik etki yapmadığı görülmüştür.

Literatürde 1000ng dan sonra büyüme hormonu hücreyi etkileyemediği varsayılmaktadır ancak biyofilize proteinlerin çok kolay parçalandığı düşünülürse 1000ng dan daha yüksek dozlarda daha iyi sonuç alınabileceğini düşünmekteyim.

Hücreler 6-OHDA'nın toksik dozu olarak belirlenen 100uM dan %50 daha fazla toksik maddeye maruz bırakıldıklarında dahi büyüme hormonuna karşı olumlu cevap vermişlerdir.

Hücreler nöron hücresine başkalaştırılmamış olması deneyin negatif yanlarından birisidir, nöron hücresine başkalaşma yapıldıktan sonra toksik doz ve BH'na verilen tepki değişebilir bu yüzden leride başka hücre hatları ve aynı hücre hattının nöron hücresine baykalaytırılmış formları üzerinden deneyler tekrarlanmalıdır.

Şekil8 ve Şekil9 a bakıldığında caspase 3 ve caspase7 ifadelerinin kontrole göre BH'nin toksik kimyasala göre ise BH ile kombine verilen grubun düşük olduğu bu yüzden BH'nin anti apoptotik etki gösterdiğini görmekteyiz.

Ancak caspase aktivitesinin toksik dozlarda verilen kimyasallarda yüksek olmasını beklerken düşük çıkmasının sebebini ise, bu genlerin pre-apoptotik genler olmasına bağlayabiliriz, çünkü zaten apoptoza uğramış bu hücrelerde caspase 3 ve caspase 7 genleri ifade edileli çok zaman geçmiş olmalıki hücreler apoptoza gitsin. Bunu anlamanın ve kanıtlamanın en iyi yolu ise Wester-Bloting yapmaktır. İleride bu genlerin protein ifadelerine de bakılacaktır.

6-OHDA'lı ve kombine grupların MTS analizi yapılamamıştır, çünkü hücelere MTS tuzu verildiği an ölmektedirler ve bu problem çözülememiştir, belki hücreler nöron hücresine çevrildiğinde ya da MTT ile denendiğinde olumlu sonuçlar alınabilir.

6-OHDA çok kolay okside olduğu için %0,01'lik askorbik asit çözeltisinde çözülerek besi yerine verilmiştir ancak gruplar incelendiğinde sadece askorbik asitli grup

görünmemektedir bunun sebebi ise askorbik asidin bu derece seyreltik halinin SH-SY5Y hücrelerinde herhangi bir etkisi olmamasıdır (Turan ve ark.,2020).

Bu çalışmanın fareler üzerinde daha olumlu sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz çünkü BH karaciğer üzerinden IGF-I üretimini arttırdığı için ve büyüme faktörleri anti apoptotik etki gösterdiği için belki de farelerde tedavi edici bir etki görülebilir.

Bu sonuçlar ışığında büyüme hormonunun Parkinson hastalığında tedavi edici ya da koruyucu etkisi olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun yanında büyüme hormonunun kolay sentezlenebilinmesi, vücudun ürettiği organik bir bileşik olması ve kan beyin bariyerini aşması göz önünde bulundurulduğunda kullanımı kolay ve ucuz bir biyolojik ilaç potansiyeli olduğunu da göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Åberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*. 2006;6.
- Abou Ghoch J, Choucair N, Pfäffle R, Mégarbané A. Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a patient with severe pre-and postnatal growth failure and congenital malformations. *Eur J Endocrinol*. 2013;168:K1–7.
- Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sánchez-Franco F. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology*. 2003;144:1086–97.
- Andersson K, Fuxe K, Eneroth P, Isaksson O, Nyberg F, Roos P. Rat growth hormone and hypothalamic catecholamine nerve terminal systems. Evidence for rapid and discrete reductions in dopamine and noradrenaline levels and turnover in the median eminence of the hypophysectomized male rat. *Eur J Pharmacol*. 1983;95:271–5.
- Argetsinger LS, Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev*. 1996;76:1089–107.
- Ashpole NM, Sanders JE, Hodges EL, Yan H, Sonntag WE. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. *Exp Gerontol*. 2015;68:76–81.
- Baba M, Nakajo S, Tu P-H, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*. 1998;152:879.
- Baumann GP. Growth hormone isoforms. *Growth Horm IGF Res*. 2009;19:333–40.
- Benabid AL, Koudsié A, Benazzouz A, Vercueil L, Fraix V, Chabardes S, et al. Deep brain stimulation of the corpus luyysi (subthalamic nucleus) and other targets in Parkinson's disease. Extension to new indications such as dystonia

- and epilepsy. *J Neurol.* 2001;248:37–47.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000;62:63–88.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;65:135–72.
- Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005;2:484–94.
- Cameron AA, Smith GM, Randall DC, Brown DR, Rabchevsky AG. Genetic manipulation of intraspinal plasticity after spinal cord injury alters the severity of autonomic dysreflexia. *J Neurosci.* 2006;26:2923–32.
- Caroni P, Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol.* 1990;110:1307–17.
- Chen D, Kanthasamy AG, Reddy MB. EGCG protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in a cell culture model. *Park Dis.* 2015;2015.
- Choi W, Yoon S, Oh TH, Choi E, O'Malley KL, Oh YJ. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine-and MPP<sup>+</sup>-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res.* 1999;57:86–94.
- Cik M, Masure S, Lesage ASJ, Van der Linden I, Van Gompel P, Pangalos MN, et al. Binding of GDNF and neurturin to human GDNF family receptor  $\alpha$  1 and 2 influence of cRET and cooperative interactions. *J Biol Chem.* 2000;275:27505–12.
- Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* . 1991;254:821–5.

- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39:889–909.
- De Rijk MC de, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54:S21-3.
- De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 1992;255:306–12.
- Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2010;30:12535–44.
- Devesa J, Alonso B, Casteleiro N, Couto P, Castañón B, Zas E, et al. Effects of recombinant growth hormone (GH) replacement and psychomotor and cognitive stimulation in the neurodevelopment of GH-deficient (GHD) children with cerebral palsy: a pilot study. *Ther Clin Risk Manag*. 2011;7:199.
- Di Nottia M, Masciullo M, Verrigni D, Petrillo S, Modoni A, Rizzo V, et al. DJ-1 modulates mitochondrial response to oxidative stress: clues from a novel diagnosis of PARK7. *Clin Genet*. 2017 Jul 1;92:18–25.
- Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2013;3:461–91.
- Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM. Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Mol brain Res*. 1999;64:141–8.
- Doré S, Kar S, Quirion R. Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*. 1997;20:326–31.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-

hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system<sup>1</sup> This article was originally published in German in the journal *Klinische Wochenschrift*, volume 38, issue 24, 15 December 1960, pp. 1236–1239.1. *Parkinsonism Relat Disord*. 1998;4:53–7.

Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett*. 1990;116:136–40.

Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology*. 2002;143:4113–22.

Friedman SD, Baker LD, Borson S, Jensen JE, Barsness SM, Craft S, et al. Growth Hormone–Releasing Hormone Effects on Brain  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Levels in Mild Cognitive Impairment and Healthy Aging. *JAMA Neurol*. 2013;70:883–90.

Gardner CJ, Mattsson AF, Daousi C, Korbonits M, Koltowska-Haggstrom M, Cuthbertson DJ. GH deficiency after traumatic brain injury: improvement in quality of life with GH therapy: analysis of the KIMS database. *Eur J Endocrinol*. 2015;172:371–81.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel ZVI, Chase TN, Monsma FJ, et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* . 1990;250:1429–32.

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*. 1998;19:717–97.

Glazner GW, Ishii DN. Insulinlike growth factor gene expression in rat muscle during reinnervation. *Muscle Nerve Off J Am Assoc Electrodiagn Med*. 1995;18:1433–42.

- Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. *Endocr Rev.* 1981;2:363–95.
- Guo S, Bezard E, Zhao B. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS–NO pathway. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:682–95.
- Holly J, Perks C. The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology.* 2006;83:154–60.
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 1995;4:131–7.
- Johansson V, Winberg S, Jönsson E, Hall D, Björnsson BT. Peripherally administered growth hormone increases brain dopaminergic activity and swimming in rainbow trout. *Horm Behav.* 2004;46:436–43.
- Juanes M, Guercio G, Marino R, Berensztejn E, Warman DM, Ciaccio M, et al. Three novel IGF1R mutations in microcephalic patients with prenatal and postnatal growth impairment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;82:704–11.
- Kim S-Y, Woo M-S, Park J-S, Hyun J-W, Kim Y-S, Kim H-S. The neuroprotective role of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in MPP<sup>+</sup>-or 6-OHDA-treated SK-N-BE (2) C and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2010;468:136–40.
- Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neurosci.* 2010;16:79–106.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 1998;152:259–77.
- Kirkeby A, Barker RA. Parkinson disease and growth factors—is GDNF good

- enough? *Nat Rev Neurol.* 2019;15:312–4.
- Kochar IPS. Recent Trends in Use of Growth Hormone Therapy. *Apollo Med.* 2010;7:13–20.
- Kopchick, J.J., Woodley, F.W. Regulation of Growth Hormone Gene Expression. In D. Leroith (Eds.), *Advances in Molecular and Cellular Endocrinology* 1997. 1:51–82
- Kreitschmann-Andermahr I, Poll EM, Reineke A, Gilsbach JM, Brabant G, Buchfelder M, et al. Growth hormone deficient patients after traumatic brain injury—baseline characteristics and benefits after growth hormone replacement—an analysis of the German KIMS database. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18:472–8.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J-L, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001;22:53–74.
- Liang Z, Shi F, Wang Y, Lu L, Zhang Z, Wang X, et al. Neuroprotective effects of tenuigenin in a SH-SY5Y cell model with 6-OHDA-induced injury. *Neurosci Lett.* 2011;497:104–9.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993;260:1130–2.
- Liu W-G, Wang X-J, Lu G-Q, Li B, Wang G, Chen S-D. Dopaminergic regeneration by neurturin-overexpressing c17. 2 neural stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2007;2:19.
- Lobie PE, García-Aragón J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ. Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Dev brain Res.* 1993;74:225–33.
- Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:932–42.

- Lu M, Flanagan JU, Langley RJ, Hay MP, Perry JK. Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4:1–11.
- Maric NP, Doknic M, Pavlovic D, Pekic S, Stojanovic M, Jasovic-Gasic M, et al. Psychiatric and neuropsychological changes in growth hormone-deficient patients after traumatic brain injury in response to growth hormone therapy. *J Endocrinol Invest.* 2010;33:770–5.
- Marras C, Beck JC, Bower JH, Roberts E, Ritz B, Ross GW, et al. Prevalence of Parkinson's disease across North America. *NPJ Park Dis.* 2018;4:1–7.
- Miller DB, Bartke A, O'Callaghan JP. Increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) levels in the brains of transgenic mice expressing the bovine growth hormone (bGH) gene. *Exp Gerontol.* 1995;30:383–400.
- Moreau OK, Cortet-Rudelli C, Yollin E, Merlen E, Daveluy W, Rousseaux M. Growth hormone replacement therapy in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2013;30:998–1006.
- Morisawa K, Sugisaki T, Kanamatsu T, Aoki T, Noguchi T. Factors contributing to cerebral hypomyelination in the growth hormone-deficient little mouse. *Neurochem Res.* 1989;14:173–7.
- Nave K-A. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature.* 2010;468:244–52.
- Oertel H, Schneider HJ, Stalla GK, Holsboer F, Zihl J. The effect of growth hormone substitution on cognitive performance in adult patients with hypopituitarism. *Psychoneuroendocrinology.* 2004;29:839–50.
- Pan W, Yu Y, Cain CM, Nyberg F, Couraud PO, Kastin AJ. Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 2005;146:4898–904.
- Pérez-Ibave DC, Rodríguez-Sánchez IP, de Lourdes Garza-Rodríguez M, Barrera-Saldaña HA. Extrapituitary growth hormone synthesis in humans. *Growth*

- Horm IGF Res. 2014;24:47–53.
- Reimunde P, Quintana A, Castañón B, Casteleiro N, Vilarnovo Z, Otero A, et al. Effects of growth hormone (GH) replacement and cognitive rehabilitation in patients with cognitive disorders after traumatic brain injury. *Brain Inj.* 2011;25:65–73.
- Scheepens A, Williams CE, Breier BH, Guan J, Gluckman PD. A Role for the Somatotrophic Axis in Neural Development, Injury and Disease: Research Centre for Developmental Medicine and Biology, Faculty of Medical and Health Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13:1483–92.
- Senoh S, Witkop B. Non-enzymatic Conversions of Dopamine to Norepinephrine and Trihydroxyphenethylamines<sup>1</sup>. *J Am Chem Soc.* 1959a;81:6222–31.
- Senoh S, Witkop B. Formation and Rearrangements of Aminochromes from a New Metabolite of Dopamine and Some of its Derivatives<sup>1</sup>. *J Am Chem Soc.* 1959b;81:6231–5.
- Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 2003;9:360–5.
- Shin DH, Lee E, Kim J-W, Kwon B-S, Jung MK, Jee YH, et al. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia–ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett.* 2004;354:64–8.
- Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6:193–222.
- Sofroniew M V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16:249–63.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997;388:839–40.
- Stern WC, Miller M, Jalowiec JE, Forbes WB, Morgane PJ. Effects of growth

- hormone on brain biogenic amine levels. *Pharmacol Biochem Behav.* 1975;3:1115–8.
- Stewart HJS, Bradke F, Tabernero A, Morrell D, Jessen KR, Mirsky R. Regulation of rat Schwann cell Po expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur J Neurosci.* 1996;8:553–64.
- Sun LY, Evans MS, Hsieh J, Panici J, Bartke A. Increased neurogenesis in dentate gyrus of long-lived Ames dwarf mice. *Endocrinology.* 2005;146:1138–44.
- Thoenen H, Tranzer JP. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Exp Pathol.* 1968;261:271–88.
- Tovar-y-Romo LB, Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tapia R. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:61.
- Tranzer JP, Thoenen H. An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia.* 1968;24:155–6.
- Turan D, Abdik H, Şahin F, Abdik EA. Evaluation of the neuroprotective potential of caffeic acid phenethyl ester in a cellular model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 2020;173342.
- Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med.* 2004;10:S58–62.
- Weigent DA. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacol Ther.* 1996;69:237–57.
- Wong AO, Chang JP, Peter RE. Dopamine stimulates growth hormone release from the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*, through the dopamine D1 receptors. *Endocrinology.* 1992;130:1201–10.
- Yalvaç ME, Yilmaz A, Mercan D, Aydın S, Dogan A, Arslan A, et al. Differentiation

and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells. *Neurochem Res.* 2011;36:2227.

Zhou W, Hurlbert MS, Schaack J, Prasad KN, Freed CR. Overexpression of human  $\alpha$ -synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. *Brain Res.* 2000;866:33–43.



## ÖZGEÇMİŞ

|                   |                            |                     |            |
|-------------------|----------------------------|---------------------|------------|
| <b>Adı</b>        | Kadir Sinan                | <b>Soyadı</b>       | ARSLAN     |
| <b>Doğum Yeri</b> | UŞAK                       | <b>Doğum Tarihi</b> | 24.11.1993 |
| <b>Uyruğu</b>     | TÜRK                       | <b>Tel</b>          | 5532970483 |
| <b>E-mail</b>     | kadirsinanarslan@gmail.com |                     |            |

### Eğitim Düzeyi

|                      |                                 |                       |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------|
|                      | <b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b> | <b>Mezuniyet Yılı</b> |
| <b>Yüksek Lisans</b> | Marmara Üniversitesi            | 2020                  |
| <b>Lisans</b>        | Üsküdar Üniversitesi            | 2017                  |

|                        |                          |                 |               |
|------------------------|--------------------------|-----------------|---------------|
| <b>Yabancı Dilleri</b> | <b>Okuduğunu Anlama*</b> | <b>Konuşma*</b> | <b>Yazma*</b> |
| İngilizce              | İyi                      | İyi             | İyi           |

### Yabancı Dil Sınav Notu #

|     |     |       |           |           |           |     |     |     |
|-----|-----|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| YDS | ÜDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
| 74  |     |       |           |           |           |     |     |     |

|                   |                |                     |              |
|-------------------|----------------|---------------------|--------------|
|                   | <b>Sayısal</b> | <b>Eşit Ağırlık</b> | <b>Sözel</b> |
| <b>ALES Puanı</b> | 78,86091       | 72,89583            | 63,54833     |

### Bilgisayar Bilgisi

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| <b>Program</b>   | <b>Kullanma becerisi</b> |
| Microsoft Office | iyi                      |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.