



**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE BOR
NİTRÜR NANOPARTİKÜLLERİNİN
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Recep KÜÇÜKDOĞRU

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

2019

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE BOR NİTRÜR
NANOPARTİKÜLLERİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Recep KÜÇÜKDOĞRU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE BOR NİTRÜR
NANOPARTİKÜLLERİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Recep KÜÇÜKDOĞRU tarafından hazırlanan bu çalışma 12 / 07 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile** kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Erdal SÖNMEZ *İmza* :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi M. Enes ARSLAN *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12 / 07 / 2019

Recep KÜÇÜKDOĞRU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE BOR NİTRÜR NANOPARTİKÜLLERİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Recep KÜÇÜKDOĞRU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Parkinson hastalığı (PH) titreme, konuşma bozukluğu, beynin duyarlı bölgelerindeki nöronların kaybı ile karakterize ve dünyada Alzheimer'dan sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar borun insan ve hayvan sağlığı için gerekli bir element olduğunu göstermektedir. Diğer yandan PH'nın hala kesin olarak tedavisi yapılamamaktadır. Yapılan bu tezde ise antioksidan özellikleri, yüksek kararlı kimyasal yapıları ve ilaç taşıyıcı nano boyutlarından dolayı bor nitrür nanopartiküllerinin, MPP⁺ ile oluşturulan deneysel parkinson modeli üzerindeki nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Tezde, insan embriyonal karsinom Ntera-2 (NT-2) hücre hattı Retinoik Asit (RA) uygulaması ile nöron benzeri hücrelere dönüştürülmüş ve ardından hücrelere deneysel parkinson modeli oluşturmak için MPP⁺ uygulanmıştır. Deneysel parkinson modeline geniş doz aralığında (0,19-100 mg/L) bor nitrür nanopartikülleri uygulanmış ve nanopartiküllerin nöron koruyucu etkinlikleri belirlenmiştir. Hücrelerdeki canlılık oranlarının belirlenmesi için 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) testleri uygulanmıştır. Ardından toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan seviye (TOS) analizleri ile hücrelerdeki antioksidan ve oksidan değerlerin değişimleri hesaplanmıştır. Önemli apoptoz belirteçlerinden olan kromozomal integriteleri belirlemek için hücreler, Hoechst 33258 floresan boyama metodu kullanılarak mikroskop altında analiz edilmiştir. Bor nitrür nanopartiküllerin hücrelerdeki asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi üzerine olan etkileri AChE kolorimetrik testi ile belirlenmiştir. Son olarak hücrelerin ölüm yollarını akış sitometrisi kullanılarak ortaya konulmuştur. Sonuçlar, bor nitrür nanopartiküllerinin hücreler üzerinde belirli dozlarda herhangi bir toksik etkiye sebep olmadığını göstermiştir. Bor nitrür nanopartikül uygulaması deneysel parkinson modelinde MPP⁺ toksisitesinin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı fakat AChE seviyelerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Akış sitometrisi analizi de bor nitrür nanopartikül uygulamasının deneysel parkinson modelinde canlılığı artırdığını göstermiştir.

2019 Yıl, 40 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Parkinson, Bor nitrür nanopartikül, Nöroprotektif etki, Deneysel model, Ntera-2

ABSTRACT

MS. Thesis

EVALUATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF BORON NITRIDE NANOPARTICLES IN THE EXPERIMENTAL PARKINSON MODEL

Recep KÜÇÜKDOĞRU

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Parkinson disease (PD) is characterized by shaking, speech disturbance, loss of neurons in sensitive areas of brain and the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease in world. Boron is require element for health of human and animal. It is still not possible to fully treat PH. In this thesis, neuroprotective effects of boron nitride nanoparticles were investigated due to their antioxidant effects, high chemical stability and nanoscale of them to drug delivery on experimental parkinson model which composing with MPP⁺. In the study, human pluripotent embryonal carcinoma Ntera-2 (NT-2) cell line was trans differentiated like a neuron cell with Retinoic acid (RA) then differentiated cells were treated with MPP⁺ to create experimental parkinson model. Boron nitride nanoparticles were applied to experimental parkinson model in wide dose range (0,19-100 mg/L) then neuroprotective efficacy of nanoparticles was determined. To determine the viability of cells, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) tests were performed. Then, analysis of the changes in the antioxidant and oxidant values in cells were calculated with total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant level (TOS) tests. Cells were analyzed under the microscope using the Hoechst 33258 fluorescence staining method to determine chromosomal integrities which are important markers of apoptosis. The effects of boron nitride nanoparticles on acetylcholinesterase (AChE) activity in cells were determined by AChE colorimetric test. Finally, death pathways of the cells were determined using flow cytometry. As a result, it was shown that boron nitride nanoparticles do not cause toxic effect at spesific doses on cells. Boron nitride nanoparticle application in experimental parkinson model reduced the oxidative stress caused by MPP⁺ + toxicity but did not cause any effect on AChE levels. Flow cytometry analysis also showed that application of boron nitride nanoparticle increased viability of cells in parkinson model.

2019 Year, 40 Page

Keywords: Parkinson, Boron nitride nanoparticle, Neuroprotective effect, Experimental model, Ntera-2

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam için bana daima yardımcı olan ve yol gösteren, desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen bütün Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tezimin uygulama kısmında güler yüzle ve sabırla bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi M. Enes ARSLAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ve sabırla her konuda bana destek olan, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma,

Ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Recep KÜÇÜKDOĞRU

Temmuz / 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Parkinson Hastalığı.....	1
1.1.1. Prevalansı.....	1
1.1.2. Patolojisi, etiyolojisi ve patogenezi.....	2
1.1.3. Genetik özellikleri.....	3
1.1.4. PH'nin monogenik formları.....	3
1.1.4.1. Sinükleyin alfa (SNCA).....	3
1.1.4.2. Lösin zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2).....	4
1.1.4.3. Parkin.....	5
1.1.4.4. PTEN indüklenmiş kinaz 1 (PINK1).....	5
1.1.4.5. Parkinson ilişkili deglikoz (DJ-1/PARK7).....	6
1.1.4.6. ATPaz katyon taşıma 13A2 (ATP13A2).....	6
1.1.5. PH'de olası rolleri olan diğer genler.....	7
1.1.6. Çevresel faktörler.....	7
1.2. Nanoteknoloji.....	8
1.2.1. Nanotıp.....	8
1.2.2. Bor nitrür nanomateryaller.....	9
1.2.2.1. Nanotıpta bor nitrür nanopartikülleri.....	10
1.2.2.2. Hekzagonal bor nitrür nanopartikülleri (hBN).....	10
1.2.2.3. Bor nitrür nanotüpleri (BNNT).....	10
1.2.3. Parkinson tedavisi ve bor nitrür nanopartikülleri.....	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Yöntem.....	18

3.2.1. Bor nitrür nanopartiküllerinin sentezi	18
3.2.2. Bor nitrür nanopartiküllerinin karakterizasyonu	18
3.2.3. Hücre kültürü ve nöronal dönüşüm	18
3.2.4. Hücre canlılık testleri	19
3.2.4.1. MTT	19
3.2.4.2. LDH	20
3.2.5. Toplam antioksidan kapasite ve toplam oksidan seviye analizi.....	20
3.2.6. Hoechst 33258 boyaması ile çekirdek analizi.....	20
3.2.7. Asetilkolinesteraz (AChE) seviye analizi	21
3.2.8. Akış sitometrisi analizi.....	21
3.2.9. İstatistiksel analizler	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	22
4.1. Bor Nitrür Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	22
4.2. Hücre Kültürü ve Nöronal Dönüşüm	23
4.3. Hücre Canlılık Testleri	25
4.4 Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) ve Toplam Oksidan Seviye (TOS) Analizi ..	27
4.5. Hoechst 33258 Boyaması ile Apoptoz Analizi	28
4.6. Asetilkolinesteraz Aktivite Analizi	29
4.7. Akış Sitometrisi Analizi.....	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolin Esteraz
AH	Alzheimer Hastalığı
ATP13A2	ATPaz Katyon Taşıma 13A2
BN	Bor Nitrür Nanopartikül
BNNT	Bor Nitrür Nanotüpleri
DA	Dopamin
DJ-1/PARK7	Parkinson İlişkili Deglikoz
DMSO	Dimetilsülfoksit
DOX	Doksorubisin
hBN	Hekzagonal Bor Nitrür Nanopartikülleri
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LRRK2	Lösin Zengin Tekrar Kinaz 2
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpridinium iyodür +
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrasodyum bromid
OD	Otozomal Dominant
OR	Otozomal Resesif
PBS	Fosfat Tamponu
PH	Parkinson Hastalığı
PINK1	PTEN İndüklenmiş Kinaz 1
RA	Retinoik Asit

ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SNCA	Sinükleyin Alfa
TAK	Total Antioksidant Kapasite
TOS	Toplam Oksidant Seviye
UPS	Ubikuitin-Proteazom Sistemi
wBN	Würtzit Bor Nitrür Nanopartikülleri



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 PH'de görülen tek gen mutasyonlarının sebep olduğu patolojik sonuçlar şematize gösterimi (Vila 2004'den uyarlanmıştır)	7
Şekil 4.1 hBN nanopartiküllerinin farklı ölçeklerde taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri	22
Şekil 4.2 hBN X-ışını kırınım deseni	23
Şekil 4.3 Farklılaşmamış ve farklılaşmış NT-2 hücre görüntüleri	24
Şekil 4.4 MPP+ uygulanmış kültürlerdeki hücre canlılık oranları.....	25
Şekil 4.5 hBN nanopartiküllerinin NT-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki potansiyeli	26
Şekil 4.6 Deneysel parkinson modelinde hBN'nin nöron koruyucu etkinliği	27
Şekil 4.7 Hoechst 33258 boyası ile hücre çekirdeklerinin boyanması	29
Şekil 4.8 Hücre akış sitometrisi analizi	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kimyasal ve Kitler Listesi	17
Çizelge 3.2 Cihazlar Listesi	17
Çizelge 4.1 hBN uygulamasından sonra hücrelerdeki TAK ve TOS değerleri	28
Çizelge 4.2 hBN uygulamasından sonra hücrelerdeki asetilkolinesteraz aktivite analizi	30



1. GİRİŞ

1.1.Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) motor ve motor olmayan semptomlarla karakterize, Alzheimer'dan sonra dünya üzerinde en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Hastalık ilk olarak Dr. James Parkinson tarafından 1817 yılında “shaking palsy” (titrek felç) olarak adlandırılmıştır (Parkinson. 1817). Birçok araştırmacı tarafından nedenleri hala araştırılmakla birlikte hastalığa, beyinin duyarlı bölgelerindeki nöronların dejenerasyonuna yol açan genetik ve çevresel faktörlerin neden olduğuna inanılmaktadır (Broen et al. 2016). Hastalığın prevalansı Batı Avrupa’da 160/100 000 olarak belirtilmektedir. Parkinson hastalığının motor semptomları: titreme, sertlik, hareket yavaşlığı, postural instabilite ve yürüme zorluğu olarak sıralanabilir. Diğer belirtileri ise anksiyete ve depresyon gibi psikiyatrik bozukluklar, koku disfonksiyonu, kramplar, hipotansiyon, kabızlık, parestezi ve seboreik dermatit gibi semptomlar şeklindedir (Wirdefeldt et al. 2011). Hastalığın kesin tanısı ancak ölümden sonra beyin dokusunun histopatolojik incelenmesi sonucu ortaya konur.

1.1.1. Prevalansı

PH'nin prevalansına ilişkin epidemiyolojik veriler risk faktörlerini belirleme ve durumun doğal tarihinin anlaşılmasını iyileştirme potansiyelleri açısından önemlidir. PH prevalansının (her 100,000 kişi): 40-49 yaş arası 41 kişi; 50-59 yaş arası 107 kişi; 55-64 yaş arası 173 kişi; 60-69 yaş arası 428 kişi; 65-74 arası 425 kişi; 70-79 yaş arası 1087 kişi ve 80 yaşından daha yaşlı olanlarda 1903 kişi olarak yaşa bağlı arttığı yönündedir. Coğrafi konumun hastalık prevalansına etkisi yalnızca 70-79 yaş aralığında Kuzey Amerika, Avrupa ve Avusturalya kıtasında, Asya kıtasına oranla 2 katından biraz fazla olan önemli bir fark görülmüştür. Cinsiyete göre prevalansta, sadece 50-59 yaşları arasındaki bireylerde, erkeklerde kadınlara kıyasla 3 kat gibi anlamlı bir farklılık görülmüştür (Broen et al. 2016). PH’li hasta sayısının 1990’dan 2016’ya 2 kattan fazla arttığı ve hem nüfusun yaşlanması hem de PH’li kişilerin sağ kalımının artması nedeniyle 2030’a kadar bu sayının

1. GİRİŞ

2 katına çıkacağı tahmin edilmektedir (Marras et al. 2018). Sınırlı olan veriler PH insidansının hayat tarzında meydana gelen seküler değişimler ve sanayileşme ile artmakta olduğu bildirilmiştir (Savica et al. 2016).

1.1.2. Patolojisi, etiyolojisi ve patogenezisi

Hastalığın patolojisine bakacak olursak özellikle pars kompakta'nın ventral bileşenini etkileyen *suffia nigra* içindeki nöronal dejenerasyondur. Hastalıktan etkilenmiş kişilerde bu bölgede bulunan nöronların sayısı hastalıktan etkilenmeyenlere oranla %50-%60 oranında azalmıştır. Hastalığın erken evrelerinde dejenerasyonlar *medulla oblongata/pontine tegmentum*, *olfactor bulb*'da meydana gelir. Bu erken evrelerde hastalık semptomları gözlenmez. Hastalığın ileri evrelerinde *substantia nigra*, orta beyin ve bazal ön beyin bölgeleri etkilenir. Bu patolojik evreler, Lewy cisimlerinin dağılımına dayanır. PH'nin patolojik işareti olan Lewy cisimleri, proteolizden sorumlu proteinlerle birlikte bir dizi nörofilament proteininden oluşan α -sinüklein-immünoreaktif inklüzyonlarıdır. Ailesel PH hastalarında α -sinüklein genindeki mutasyonlar sonucu lewy cisimcikleri görülür (Braak et al. 2006). Parkin proteinindeki mutasyonlar, juvenil vakalarda, lewy cisimleri olmayan parkinson sendromu üretir ve parkin proteininin, lewy cisimlerinin ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Chung et al. 2001). Lewy cisimleri, PH ve lewy cisimleri içeren demansta bulunur, başka hiçbir nörodejeneratif hastalığın patolojik bir işareti olmadığı düşünülmektedir.

PH'de tanımlanan tek gen defektleri, *ubikuitin-proteazom* sisteminine (UPS) olan ilgiyi arttırmıştır (Ullrich et al. 2010). UPS sistemi, hücre içi proteoliz basamaklarında ve hücrelerin canlılığını koruyan çok sayıda hücre içi mekanizmada görev almaktadır. Bu görevini, hücre için artık gerekli olmayan proteinleri parçalayarak gerçekleştirir. UPS sisteminde meydana gelen aksaklıklar Lewy cisimciklerinin önemli bir bileşeni olan α -sinüklein de dahil olmak üzere, proteinlerin anormal kümelenmesine yol açar. PH'nin erken evrelerinde Lewy cisimlerinin ilk birikme yerlerinden birisi *olfactory bulb* (Koku soğanı) bölgesidir. Bu nedenle, koku ve tat duyularında ki bozuklukların, PH'nin en erken klinik özelliklerinden biri olması, Lewy cisimcikleri oluşumuna, nöronal fonksiyon bozukluğuna ve dejenerasyona yol açan yolların aktivasyonu için gerekli olduğundan ilgi çekicidir (Ullrich et al. 2010; Broen et al. 2016).

PH'deki birkaç ubikuitin-proteazom proteinini kodlayan genlerdeki mutasyonların keşfi ile UPS ve nörodejenerasyon arasında bağlantı olduğuna dair kanıtlar artmıştır.

1.1.3. Genetik özellikleri

Parkinson hastalığında bugüne kadar yapılan genetik araştırmalar, hastalığın çeşitli monogenik formlarının ve PH gelişme riskini artıran çok sayıda genetik risk faktörünün tanımlanmasına neden olmuştur. PH genellikle sporadik bir hastalık olmasına rağmen, tanımlanmış olan artan sayıda tekli gen mutasyonları da vardır. Baskın veya resesif olarak kalıtsal bir gende tek bir mutasyonun neden olduğu monogenik formlar, nispeten nadir görülen PH tiplerinde de yer almaktadır. Bu formlar ailevi vakaların %30'unu, sporadik vakaların %4'ünü oluşturmaktadır. Mevcut PH genetik terminolojisinde, *PARK* olarak adlandırılan 18 spesifik kromozomal bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler kronolojik sıraya göre numaralandırılır (*PARK1*, *PARK2*, *PARK3*, vs.). PH vakalarının çoğunluğu sporadiktir, yani hastaların sadece %10'u aile öyküsüne sahiptir (Thomas and Beal. 2007). Monogenik PH de kalıtsallıkla bağlantılı olan altı genden *SNCA* (*PARK1=4*) ve *LRRK2* (*PARK8*) genlerinde meydana gelen mutasyon otozomal-dominant PH formu ile *Parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*), *DJ-1* (*PARK7*), ve *ATP13A2* (*PARK9*) genlerinde meydana gelen mutasyon otozomal-resesif PH form ile ilişkilidir.

1.1.4. PH'nin monogenik formları

1.1.4.1. Sinükleyin alfa (SNCA)

Otozomal-dominant PH'ye sebep olan genler içerisinde, bildirilen ilk gen mutasyonudur. *SNCA* mutasyonu genellikle erken evreli (başlangıç yaşı <50) PH'de görülür ve Levodopa tedavisine iyi yanıt verir. Fakat hastalık hızlı bir gelişme gösterir, sıklıkla demans bilişsel bozukluk ve bazen de kas seğirmesi, merkezi hipoventilasyon gibi atipik belirtiler takip eder. Lewy cisimcikleri substantia nigra başta olmak üzere serebral korteks, lokus seruleus ve hipotalamus boyunca yayılır (Polymeropoulos et al. 1996).

Bununla birlikte, *SNCA*'daki mutasyonlar genel olarak nadirdir. Şimdiye kadar, sadece üç farklı hatalı mutasyon rapor edilmiştir (Klein and Schlossmacher. 2006). *SNCA*

1. GİRİŞ

geni 140 amino asitten oluşan sitozolik bir protein olan α -sinükleini kodlayan 6 ekzondan meydana gelir. Proteinin 3 domaini bulunur, bunlar; (i) amino-terminal bölgesi (7–87. amino asit), (ii) merkezi hidrofobik bölge (61–95. amino asit) ve (iii) negatif yüklü asitik karboksil domaini (96–140. amino asit). α -sinüklein proteini çoğunlukla α -helikal yapılardan oluşmaktadır (Giasson et al. 2001). Fakat gende oluşan üç nokta mutasyonu sonucu β -tabakaları meydana gelir ve bu nedenle toksik oligomerlerin, protofibrillerin ve fibrillerin oluşumu artar. Mutasyonların sonucu olarak ortaya çıkan toksik moleküllerin PH'yi meydana getirdiği rapor edilmiştir (Bertoncini et al. 2005).

1.1.4.2. Lösin zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2)

LRRK2 geninde meydana gelen mutasyonlar sıklıkla geç başlangıçlı otozomal dominant ve sporadik PH ile ilişkilidir. Farklı toplumlarda mutasyonun sıklık oranı %2'den %40 kadar değişiklik göstermektedir (Brice. 2005; Ozelius et al. 2006). Klinik olarak, *LRRK2*-bağımlı PH genellikle orta-geç evre gelişim gösterir ve ilerlemesi yavaştır. Hastalar levodopa tedavisine olumlu yanıt verir ve demans yaygınlık göstermez. Nöropatolojik bulgular, Lewy cisimcikleri içermeyen nigral dejenerasyon ve bazen tau bazen de ubiquitin içeren Lewy inklüzyonları şeklinde ortaya çıkmaktadır (Giasson et al. 2006).

LRRK2 geni büyük bir gen olup 51 ekzondan meydana gelir. Bu gen, 2527 amino asitten meydana gelen lösin bakımından zengin tekrar içeren sitoplazmik protein kinaz 2'yi kodlamaktadır. Gende, 50'den fazla anlamsız veya yanlış anlamlı mutasyon bulunduğu ve bunlardan 16 tanesinin patolojik olduğu rapor edilmiştir (Nuytemans et al. 2010). *LRRK2* mutasyonlarının PH'ye nasıl sebep olduğu hala tam olarak anlaşılamamıştır.

1.1.4.3. Parkin

Parkin geni PH'ya sebep olan genler arasında ikinci, OR kalıtım gösterenler arasında ilk gen olarak tanımlanmıştır. Hastalık genellikle bireyin 3. veya 4. hayat evresinde başlar ve dopaminerjik tedaviye iyi yanıt veren yavaş bir seyir gösterir. Fakat bazı *parkin* mutasyonları çocukluk çağında (başlangıç yaşı <21) ortaya çıkar ve gende homozigot mutasyonlar barındıran juvenil PH'ya sebebiyet verir. *Parkin*'in klinik fenotipi *PINK1*-ve

DJ-1-bağımlı PH'dan ayırt edilemez. Post-mortem incelemelerde substantia nigra'da nöron kaybı, gliyozis görüldüğü fakat Lewy cisimciklerinin azlığı rapor edilmiştir.

Çeşitli etnik gruplar arasında, 12 ekzonun tümü de dâhil olmak üzere çok sayıda ve geniş *Parkin* mutasyonları tespit edilmiştir. *Parkin* geni insan genomundaki en büyük ikinci gendir ve 465 amino asitlik bir proteini kodlar. *Parkin* proteini E3 ubiquitin ligaz olarak ubiquitinasyonda görev alır. Hedef proteinlerin lizin rezidülerine ubiquitin proteinlerini ekleyen, sonuç olarak onların hücre içi geleceğini belirleyen bir post-transyonal modifikasyondur.

1.1.4.4. PTEN indüklenmiş kinaz 1 (PINK1)

Fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*)-bağımlı putatif kinaz 1 (*PINK1*) geninde meydana gelen mutasyonlar erken evreli PH'ya sebebiyet vermede ikinci en genel sebep olarak yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. *PINK1* mutasyon sıklığı, çeşitli etnik gruplar arasında önemli farklar olmakla birlikte %1-%9 arasında değiştiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Healy et al. 2004; Rogaeva et al. 2004; Bonifati et al. 2005).

Burada, *Parkin* mutasyonlarından farklı olarak *PINK1* mutasyonlarının büyük çoğunluğu ya yanlış anlamlı ya da anlamsız mutasyonlar olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak 1 ailede heterozigot tüm gen delesyonu tanımlanmasına karşın 3 ailede ise tüm ekzonların delesyona uğradığı bildirilmiştir (Marongiu et al. 2007).

PINK1, 581 amino asitten meydana gelmiş bir protein kinazdır. *PINK1*, aminoterminal mitokondrial hedefli 34 amino asitlik bölge, korunmuş serin-tirozin kinaz bölgesi ve karboksi-terminal oregülâtör bölgesi olmak üzere 3 bölgeden meydana gelmektedir. Rapor edilmiş *PINK1* de meydana gelen mutasyonların üçte ikisi kinaz domainini etkileyen fonksiyon kaybı mutasyonlarının olması *PINK1*'in enzimatik aktivitesinin PH patogenezindeki önemini gösterir. Son zamanda yapılan çalışmalar *PINK1* ve *Parkin*'in, mitokondriyal ağdaki hasarlı mitokondriyi algılamak ve seçici bir şekilde ortadan kaldırmak için ortak bir yolda görev aldığını göstermiştir. *PINK1*, düşük membran potansiyeli olan mitokondri üzerinde stabilize edilir ve bu şekilde *Parkin*'i sitozolden alır. *Parkin* proteini

1. GİRİŞ

bir kez mitokondriye alındığında, enzimatik olarak aktif hale gelir ve mitofaji ile mitokondrinin otofajik yok edilmesi başlatılmış olur (Narendra and Youle. 2011).

1.1.4.5. Parkinson ilişkili deglikoz (DJ-1/PARK7)

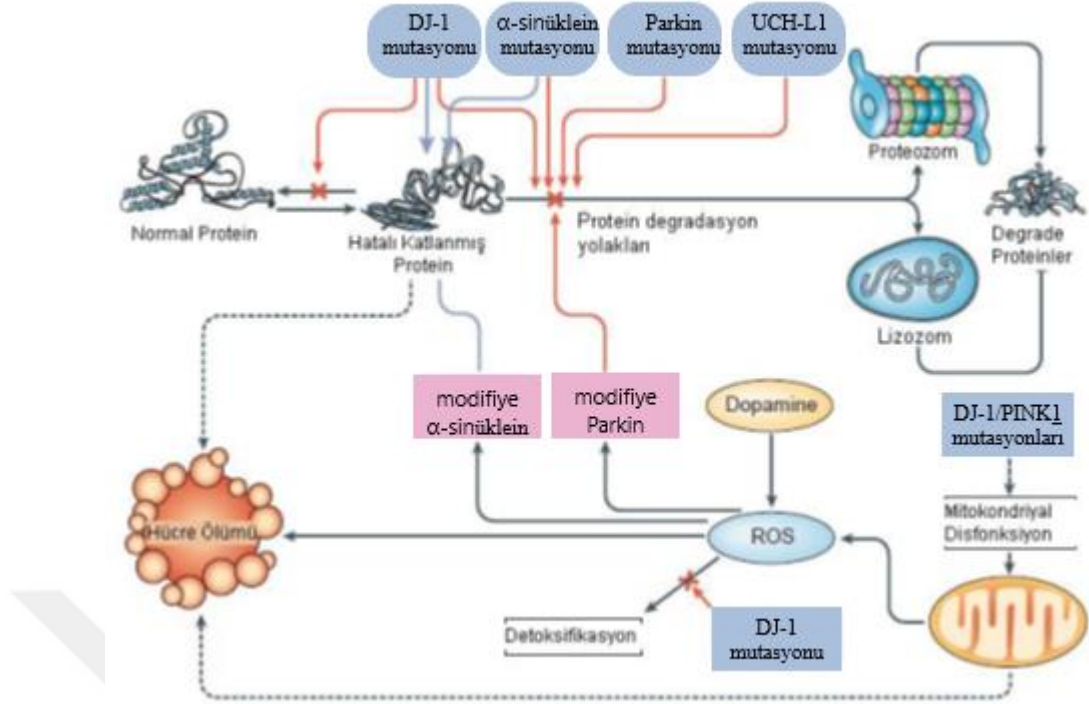
DJ-1 (PARK7) geni, OR PH ile ilişkili üçüncü gen olarak bildirilmiş, erken evreli PH'larda %1-%3 oranında mutant olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Pankratz et al. 2006). Literatürde DJ-1- bağlantılı çok az PH hastası bildirilmiştir.

DJ-1 geni 7 ekzona sahiptir ve oksidatif stresin hücrel bir sensörü olarak işlev gören 189-amino asit uzunluğunda bir proteini kodlar (Canet-Avilés et al. 2004; Horak et al. 2005). DJ-1 proteini fizyolojik şartlarda dimerik bir yapıdadır (Macedo et al. 2003) ve hastalığa neden olan mutantların çoğunun, vahşi tip DJ-1 ile heterodimerize olduğu görülmektedir (Taira et al. 2004). Mutant proteinler çoğunlukla tam olarak katlanmamış halde bulunur ve proteozom tarafından degrade edilir. Bu nedenle de proteinlerin nöron koruyucu etkinlikleri ve antioksidant aktiviteleri azalır (Anderson and Daggett. 2008; Malgieri and Eliezer. 2008).

1.1.4.6. ATPaz katyon taşıma 13A2 (ATP13A2)

ATP13A2 genindeki homozigot ve heterozigot mutasyonların, PH'nin OR atipik formu olan Kufor-Rakeb sendromuna sebep olduğu yapılan genetik çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Ramirez et al. 2006). Fakat bu mutasyonların hastalığa nasıl sebep olduğu hala tam olarak açıklanamamıştır.

1. GİRİŞ



Şekil 1.1 PH'da görülen tek gen mutasyonlarının sebep olduğu patolojik sonuçlar şemataze gösterimi (Vila and Przedborski. 2004'den uyarlanmıştır)

1.1.5. PH'de olası rolleri olan diğer genler

Monogenik formların dışında PH' sebebiyet veren ya da aday olan çok sayıda gen, yapılan genetik çalışmalarla gösterilmiştir. Hatta bazı genler "PARK1" olarak tanımlanmıştır. (*UCHL1* [PARK5], *GYGYF2* [PARK11], *OMI/HTRA2* [PARK13], *PLA2G6* [PARK14], ve *FBXO7* [PARK15]). Fakat bu genlerin PH ile olan ilişkisi kesin olarak tanımlanmamıştır (Shulman et al. 2011).

1.1.6. Çevresel faktörler

Çevresel etmenler, hayat tarzı gibi dış etkenlerin de PH riskini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Son on yılda yapılan gen-çevre etkileşim çalışmalarında, fiziksel aktivite, böcek ilaçları, diğer kimyasal mazurietler, diyet alışkanlıkları, duygusal stres, kafa travması ve sigara kullanımının PH ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. Birçok epidemiyolojik çalışma ve meta-analiz, pestisit maruziyeti ile PH arasında ilişki olduğunu (Pezzoli and Cereda. 2013) ve doza bağımlı olarak PH riskini arttırdığını ortaya koymuştur (Yan et al. 2018). Diğer yandan hayat stresi, doğrudan nörotoksik etkiler yoluyla PH ve diğer

nörodejeneratif hastalıklar için bir risk faktörü olarak bulunmuştur (Metz. 2007). Fiziksel aktivitenin PH üzerine olan etkilerine bakıldığında, orta ve ileri yaşlardaki hafif ila şiddetli fiziksel aktivitenin daha yüksek seviyelerinin, PH geliştirme riskinin daha düşük olduğunu göstermiştir (Yang et al. 2015). Son on yılda yapılmış olan çalışmalarda Akdeniz diyet programlarının PH'den korunmada etkili olabileceğine dair yeni kanıtlar ortaya çıkmıştır (Alcalay et al. 2012). Antioksidanlar arasındaki flavonoidlerin alımı, poli-doymamış yağ asitleri gibi faydalı olabileceği belirtilmiş (Wang et al. 2015). Fakat n-6 poli-doymamış yağ asitlerinin alımı PH gelişimi riski ile ilişkili olarak bulunmuştur (Kamel et al. 2014). Diğer bir faktör olan sigara kullanımı ile PH arasındaki ters ilişki yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmış fakat mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Son zamanda yapılmış olan çalışmada pasif içicilik ile PH arasında da ters bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Mellick et al. 2006).

1.2. Nanoteknoloji

Son yıllarda, nanoteknoloji alanında büyük çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Nanomateryaller, özellikle tıp ve biyomedikal alanlarda, sahip oldukları nano boyutları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, optik, manyetik, elektronik ve mekanik karakterleri sayesinde artan bir ilgiye sahiptir. Nanomateryaller çok küçük boyutlara ve ilginç fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir. Bu özellikler onları ilaç taşınımı, doku mühendisliği, medikal görüntüleme ve tedavi gibi biyolojik uygulamalar için uygun hale getirmektedir.

1.2.1. Nanotıp

Nanotıp, nano boyuttaki malzeme ve parçacıkların medikal uygulamalarda kullanılması olarak tanımlanabilir. Nanotıp tanımı yapılmadan çok öncelerinde nano materyaller biyomedikal uygulamalarını etkilemeye başlamıştır. Örneğin, süper paramanyetik nanoparçacıklar ve bunların türevleri, 1980'lerin başından beri biyolojik türlerin saflaştırılması, ayrılması ve tespiti için ticari olarak pazarlanmıştır (Xia. 2008). Nanomateryaller karbon nanotüp grafen oksit gibi biyolojik uygulamalar için özellikle hücre hedefleme, görüntüleme, ilaç taşınımı vb. potansiyelleri çok kez yapılmış çalışmalarla araştırılmıştır. Fakat buradaki en önemli sorunlarından biri olan, nanomateryallerin toksisitesi hala tam olarak ortadan kaldırılamamıştır.

Nanomateriyaller ilaç taşınımı için vektör olarak ve manyetik rezonans görüntüleme sisteminde karşıt boya olarak da kullanılmaya başlanmıştır (Lee et al. 2007). Yaklaşık on yıl önce, yarı iletken kuantum dotların (KD'ler), *in vitro* görüntülemede floresan etiketler olarak geleneksel organik boyaların aksine çeşitli avantajlar (örneğin, yüksek emisyon yoğunluğu, mükemmel fotostabilite ve çoklu renkler için tek bir uyarma dalga boyu) sunabileceği keşfedilmiştir (Gao et al. 2004).

1.2.2. Bor nitrür nanomateriyaller

Bor nitrür (BN), bor ve azot sitokiyometrisi 1:1 olan tipik bir III-V grubu bileşiktir. İlk olarak Balmain tarafından 1842'de borik asit ve potasyum siyanid arasındaki reaksiyonla üretilmiştir (Balmain. 2011). BN mineralinin, çevrede doğal olarak meydana gelmediği düşünülüyordu. Fakat 2016 yılında ilk olarak Çin'in Tibet bölgesinde mineral kübik bor nitrürlerin (cBN) doğal olarak oluştuğu keşfedilmiştir (Du Frane et al. 2016).

Bor nitrür moleküler yapısından dolayı farklı nano formlarda sentezlenebilir. Bunlar hekzagonal bor nitrür (hBN), bor nitrür nanotüpleri (BNNT) kübik bor nitrür (cBN) ve würtzit bor nitrürdür (wBN). Günümüzde BN yapıları ileri teknolojide, tıpta, biyoteknolojide, kayganlaştırıcı ve kristal yapısı ile aşındırıcı gibi pek çok teknolojik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. BN yapıları, mükemmel termal ve kimyasal stabiliteleri, düşük toksisitesi ve benzersiz elektronik ve optik özellikleri ile bilinmektedir. Ayrıca kontrollü kalite örneklerinin sentezi aşamasındaki zorluklar ve elektriksel olarak yalıtıcı özellik eksikliği, BN nanoyapıların kullanım güçlükleri arasındadır (Golberg et al., 2010).

Karbon nanotüpler üzerine yapılmış *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda doz, zaman ve şekle bağlı olarak karbon nanotüplerin insan hücreleri ve diğer biyolojik alanlar üzerine toksik etkisi bulunmuştur. Karbon nanopartiküllerinin aksine, bor nitrür nanomalzemelerin örneğin, bor nitrür nanotüplerin, düşük toksisiteye ve yüksek biyouyumluluğa sahip oldukları çalışmalarda rapor edilmiştir (Weng et al. 2014). Fakat bu konu hakkındaki literatür verileri hala yeterli değildir.

1.2.2.1. Nanotıpta bor nitrür nanopartikülleri

Bor nitrür nanomateryallerinin (hBN, BNNT, cBN vb.) medikal alanlardaki farklı uygulamalar için termal stabiliteleri, düşük toksisiteye sahip olmaları ve biyouyumlu olmalarından dolayı kullanımları hızla artmaktadır.

1.2.2.2. Hekzagonal bor nitrür nanopartikülleri (hBN)

hBN'ler ilk olarak 1842'de keşfedilmiştir. Fakat ilk kararlı formu yaklaşık bir yüzyıl sonra elde edilebilmiştir. hBN'ler doğal olarak meydana gelmezler. Bu nedenle grafenlere benzer yapılarını hazırlamak için B ve N öncülerinden sentetik olarak sentezlenmeleri gerekir (Arenal and Lopez-Bezanilla. 2015). hBN'lerde, B ve N atomları altıgen bir yapıda kovalent olarak bağlanır ve katmanları grafene benzer şekilde üst üste istiflenir. 2D hBN katmanları, Van der Waals etkileşimleri yoluyla birbirleriyle etkileşime girer ve hBN ince katman veya küresel nanoyapılar oluşturur (Bhimanapati et al. 2014). Mükemmel fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önüne alındığında, hBN'ler birçok teknolojik ve tıbbi pek çok uygulamada umut verici nanomalzemeler olarak kabul edilmektedir (Li et al. 2018). Yapılan bir çalışmada, folat ve doksüribisin eklenmiş hBN'lerin kanser terapisi için kullanılabileceği önerilmiştir (Emanet et al. 2017).

1.2.2.3. Bor nitrür nanotüpleri (BNNT)

Bor nitrür nanotüpleri (BNNT) kimyasal ve fiziksel özellikleri ile oldukça ilgi çeken bir diğer bor nitrür yapısıdır. Nanoteknolojide ve özellikle nanotıpta da uygulama alanları oldukça fazladır. Son yapılan çalışmalarda, biyomedikal alanda nanotaşıyıcı ve nanotransdüser olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonlu (0,5;1;10;20 µg/mL) BNNT'lerin farklı hücre hatlarında sitotoksisiteye sahip olmadığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Li et al. 2017). Ciofani et al. gerçekleştirdikleri bir çalışmada BNNT'lerin insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) üzerinde toksisitesini araştırmışlardır. Hücreler, 72 saat boyunca 5 µg/mL'ye kadar polietilenimin (PEI) kaplı BNNT'ler ile muamele edilmiş ve ardından tripan mavisi ve MTT deneyleri ile toksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, BNNT'lerin 72 saat boyunca 5µg/mL'ye kadar hücre canlılığını ve metabolizmasını etkilemediğini göstermiştir (Ciofani et al. 2008).

1.2.3. Parkinson tedavisi ve bor nitrür nanopartikülleri

Son yıllarda nanopartiküllerin nöronal büyüme ve nöron koruyucu bir ajan olarak kullanılabilmesine dair bilgiler rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin, nöronal hayatta kalımı ve farklılaşmayı arttırdığı bildirilmiştir (Wang and Guo. 2016). Nanoteknoloji ve nanoboyutlu ilaç taşıma sistemleri PH'ye etkili bir tedavi yöntemi geliştirmek için yoğun olarak araştırılmaktadır. İlaç taşıma sistemlerindeki gelişmeler PH tedavilerinin etkinliğini artırırken geleneksel ilaçların sebep olduğu yan etkileri de azaltabilecektir.

Literatür taramalarında daha önce bu konuda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Bu tez çalışması ile literatürdeki bu boşluk doldurulmak istenmektedir. Bu amaçla, hBN nanopartiküllerinin olası nöron koruyucu etkinliği, antioksidant özellikleri, MTT ve LDH testi, total antioksidant seviye analizi, total oksidant durum analizi ve akış sitometrisi ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Khan ve ark. yapmış olduğu çalışmada Kristalin 2D hegzagonal bor nitrür (2D-hBN) nanopartiküllerinin, dopaminin (DA) elektroanalitik algılanmasına yönelik potansiyel bir elektrolizör olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. 2D-hBN nanotabakaları, camsı karbon (GC), bor katkılı elmas (BDD) ve ekran baskılı grafit elektrotlar (SPE'ler) dahil olmak üzere ticari olarak temin edilebilen karbon destek elektrotları dizisine, bulk modifikasyon işlemi ile elektriksel olarak bağlanacağı gözlenmiştir. Çalışmada, 2D-hBN ile modifiye edilmiş elektrotların potansiyel elektrokatalitik performansını, destekleyici karbon elektrot platformlarının etkisini ve “kütle kaplamının” etkisinin DA'nın tespitine yönelik kullanılabilmesi değerlendirilmiştir. 2D-hBN ile modifiye edilmiş elektrotların tepkisinin, büyük ölçüde 2D-hBN ile destekleyici elektrot materyali arasındaki etkileşimine bağlı olduğu bulunmuştur. Örneğin, 2D-hBN (324 ng) ile modifiye edilmiş SPE'lerde, modifiye edilmemiş bir SPE'ye kıyasla DA'nın elektrokimyasal oksidasyon potansiyelini ~90 mV azaltarak elektrokimyasal cevabı arttırmıştır. Aksine, bir GC elektrotunun 2D-hBN (324 ng) ile modifikasyonu, modifiye edilmemiş elektrot ile karşılaştırıldığında DA'nın oksidasyon potansiyelinin ~80 mV yükselttiği bulunmuştur. 2D-hBN'de gözlenen elektrokatalitik etki, karbon veya başka herhangi bir elektrot üzerine desteklendiğine dair literatürde daha önce herhangi bir çalışma bulunmamıştır (Khan et al. 2016).

Di Crescenzo ve ark. yapmış olduğu başka bir çalışmada ise lipoik aside (LA) dayalı bir anti parkinson ilaç ile kovalent olmayan altın nanopartiküllerini (AuNP'ler) konju etmişlerdir. Elde edilen AuNP'lerin hem dimetil sülfoksit hem de fetal sığır serumu içerisinde stabil olduğu görülmüştür ve altının ağırlığının iki katı miktarda ilaç yüklenebileceği bildirilmiştir. Bu AuNP'lerin, primer insan kan hücreleri ve dopaminerjik sinir hücrelerini incelemek için en yaygın kullanılan hücre modellerden biri olarak kullanılan insan nöroblastom hücrelerine karşı güvenli ve biyo-uyumlu olduğu rapor edilmiştir. Çok ilginç bir şekilde, ilaç-stabilize AuNP'lerin LD ile tedavi edilen SH-SY5Y hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin birikimini azalttığı ve kültürlenmiş insan kan hücrelerinde total oksidan durum seviyelerini değiştirmediği, dolayısıyla LA'nın antioksidan rolünü doğruladığı görülmüştür (Di Crescenzo et al. 2017).

Feng ve ark. bor nitrür nanoküreler ile yapmış oldukları başka bir çalışmada doksorubisin ilacının hedefli taşınması için folat konjuge edilmiş mesoporoz silika ile fonksiyonelleştirilmiş bor nitrür nanoküreleri kullanılmıştır. BN nanosferler (BNNS) kanser ilacını tümör hücrelerine güvenle iletebilecek özelliklere sahip olduğu ve bu da onları kanser tedavisi için potansiyel hedefler olduğu düşünülmektedir. Fakat BNNS'lerin fizyolojik ortamlardaki zayıf dağılımı ve düşük ilaç yükleme kapasitesi gibi bazı sınırlandırmaları belirlenmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar bu sınırlandırmaları aşmak için BNNS'leri folat ile konjuge etmiş ve ardından mesoporoz silika (MS) ile fonksiyon kazandırmışlardır. BNNS'nin dağılımı ve ilaç yükleme kapasitesi, MS modifikasyonu ile yüksek oranda iyileştirilmiştir. BNMS-FA komplekslerinin, 100 µg/mL konsantrasyonuna kadar toksik olmadığı ve folat reseptörü aracılı endositoz yoluyla HeLa ve MCF-7 hücreleri tarafından spesifik olarak hücre içine alındığı bildirilmiştir. Doksorubisin (DOX), π - π istifleme ve hidrojen bağlama yoluyla yüksek verimli BNMS-FA komplekslerine yüklenebileceği ve farklı pH koşulları altında sürekli bir salınım modeli gösterebileceği tartışılmıştır. BNMS-FA/DOX kompleksleri, serbest DOX'a göre hedeflenen kanser tedavisi için ümit verici sonuçlar rapor edilmiştir (Feng et al. 2019).

Roondhe ve ark. yaptığı bir çalışmada ise, nörotransmitterler, dopamin (DA) ve adrenalin (AD) ile adsorbe edilen bor nitrür nanoribbonların (BNNR) yapısal ve elektronik özellikleri, BNNR'lerin bir taşıyıcı olarak kullanılmasının uygulanabilirliğini test etmek için yoğunluk fonksiyonel teorisine dayanan elektronik yapı hesaplamaları kullanılarak sistematik olarak araştırılmıştır. AD ve DA'nın BNNR'ler üzerindeki adsorpsiyon mekanizmasını kontrol etmek için, BNNR (ABNNR) ve zigzag BNNR (ZBNNR) nano yapıları karşılaştırmalı bir çalışma ile dispersiyon düzeltilmiş yoğunluk fonksiyonel teorisi kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları, her iki NRT'nin adsorpsiyonunun ABNNR ve ZBNNR'nin elektronik yapısını etkin bir şekilde değiştirdiğini ortaya koymaktadır. DA ve AD'nin her iki BNNR ile güçlü bir etkileşime sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışma, BNNR'lerin biyo-nano ara yüzde NRT'ler üzerindeki etkisini anlamayı ve nörolojik ilaçlar için taşıyıcı olarak kullanılabilme potansiyelini hedeflemiştir (Roondhe and Jha. 2019).

Raj ve ark. yapmış olduğu çalışmada parkinson hastaları için pramipeksol dihidroklorür yüklü kitosan nanopartiküllerinin (P-CN'ler) burun yoluyla beyin bölgesine taşınması tartışılmıştır. Kitosan ve sodyum tripolifosfat ile optimize edilmiş P-CN'ler, $292,5 \pm 8,80$ nm partikül büyüklüğü ve $\%91,25 \pm 0,95$ yükleme verimi göstermiştir. Yapay membran ve keçi nazal mukozasında difüzyonunun 24 saat sonrasında $\%93,32 \pm 2,56$ ve $\%83,03 \pm 3,48$ olduğu bulunmuştur. Transmisyon elektron mikroskobu incelemesinde, P-CN parçacıklarının küresel yapı gösterdiği ve taramalı elektron fotoğrafların da ise pürüzlü yüzey morfolojisine sahip olduğu rapor edilmiştir. Farmakodinamik çalışmalarda, karşılaştırmalı davranış testi sonuçları, P-CN tedavi grubunda, nazal çözeltiler veya oral pazarlanan tabletlere kıyasla, P-CN tedavi grubunda azalmış fotoaktometre skoru ve azalmış motor aktivite kabiliyeti, iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, P-CN'ler, beyindeki artmış dopamin seviyesi ile birlikte, artan süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri ile antioksidan seviyesini arttırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle, Pramipeksol yüklü kitosan nanopartiküllerinin intranazal verilisinin, parkinson hastalığında beyin hedefli iletim için kullanılabileceği önerilmiştir (Raj et al. 2018).

Esteves ve ark. yapmış oldukları başka bir çalışmada ise retinoik asit yüklü polimerik nanopartiküllerin, parkinson fare modelinde nöroprotektif etkinliği indüklediği tartışılmıştır. Retinoik asit (RA), sinir hücrelerinin olgunlaşma ve sağ kalımında önemli bir rol oynar. Son zamanlarda RA, Parkinson hastalığı (PH) dahil olmak üzere bazı nörodegeneratif hastalıklar için terapötik bir seçenek olarak gösterilmiştir. Çalışmada, RA'nın verimli hücre içi taşınmasını ve kontrollü salınımını sağlayan yeni RA yüklü polimerik nanoparçacıklar (RA-NP'ler) geliştirilmiştir. Burada, nanoformülasyonun, PH'nin 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin (MPTP) indüklenmiş fare modelinde, dopaminerjik (DA) nöronlar üzerinde etkili bir nöroprotektif etkisi olduğu bildirilmiştir. Sonuçlar, RA-NP'lerin uygulanmasının, striatumdaki nöronal lif/aksonal invazyonlarının yanı sıra, substantia nigra (SN) içindeki DA nöron kaybında önemli bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, RA-NP'ler tarafından uyarılan Pitx3 ve Nurr1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerinde bir artış gözlemlenmiştir. Bu, RA-NP'lerin, PH patogenezinin ilerlemesini durdurmak için yenilikçi bir strateji olabileceğini ve bu nanoformülasyonun, PH terapötikleri için yeni yaklaşımların geliştirilmesinde ön ayak olabileceği çalışmada bildirilmiştir (Esteves et al. 2015).

Huang ve ark. çalışmasında rotenon kaynaklı kronik parkinson modelinde laktoferrin ile modifiye edilmiş nanopartiküller kullanılarak gen tedavisi yapılmıştır. Gen tedavisi, parkinson hastalığına etkili bir tedavi geliştirmek için en umut verici yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir. Kan-beyin bariyerinin (BBB) varlığı ise bu tedavi yaklaşımını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada ise bu sorunu aşmak için Laktoferrin (Lf) ile modifiye edilmiş nanoparçacıklar (NP'ler), beyin hedeflemesi ve BBB-geçiş kabiliyeti nedeniyle potansiyel non-viral gen vektörü olarak kullanılmıştır. İnsan glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör geni (hGDNF) ile en kapsüle edilmiş NP'ler, çoklu dozlarda damar içi enjeksiyon ile rotenon yol açtığı kronik PH'li sıçanlara verilmiştir. Sonuçlar, Lf-modifiye NP'lerin çoklu enjeksiyonlarının daha yüksek GDNF ekspresyonu elde ettiği ve bu gen ekspresyonunun, tek bir enjeksiyonla yapılandan daha uzun süre korunduğunu göstermiştir. Lf ile modifiye edilmiş NP'lerin çoklu dozaj intravenöz uygulaması lokomotor aktivitesini önemli ölçüde iyileştirebileceği, dopaminerjik nöronal kaybı azaltabileceği ve güçlü nöroprotektif etkilerini gösteren rotenon kaynaklı PH sıçanlar üzerindeki monoamin nörotransmitter seviyelerini arttırabileceği rapor edilmiştir (Huang et al. 2010).

Lindner ve ark. yapmış oldukları çalışmada, resveratrol (RVT) yüklü polisorbate-80 (PS80) kaplı poli (laktid) nanopartiküllerinin, MPTP'nin neden olduğu Parkinsonizmdeki nöron koruyucu etkinliği tartışılmıştır. Çalışmada, C57BL/6 fareleri, 15 gün boyunca RVT'ye intraperitoneal muamele edildi ve ayrıca dopaminerjik nöronlara hasar vermek ve PH ile ilişkili semptomları indüklemek için, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) tek bir doz intranasal olarak tatbik edilmiştir. MPTP, koku ayırımı ve sosyal tanıma hafızasında önemli bozulmalara neden olmuş, bunun yanı sıra striatal oksidatif strese neden olmuş ve striatumdaki tirozin hidroksilaz ekspresyonunu azaltmıştır. RVT yüklü nanoparçacıklar (bulk halde değil) MPTP'nin neden olduğu davranışsal ve nörokimyasal değişikliklere karşı önemli nöron koruyucu etki sergilemiştir. Bu sonuçlar, RVT yüklü PS80 kaplı poli (laktid) nanoparçacıkların umut verici bir nanomedikal araç ve PH için adjuvan tedavi yöntemi olabileceği rapor edilmiştir (Da Rocha Lindner et al. 2015).

Wang ve ark. yapmış oldukları başka bir çalışmada ise geç doyumluğa ulaşan demir şelatör nanopartiküllerinin yenilikçi ve etkili bir PH terapisi olabileceği araştırılmıştır. Temel olarak nigra pars kompakta (SNpc)'de demir birikiminin, dopaminerjik

(DA) nöronların ölümüne neden olabilecek, PH'nin belirgin bir patofizyolojik özelliği olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) yükselmesini sağladığı ve ilerleyen evrelerde ise motor kontrolünde kayba sebep olduğu diğer raporlarda bildirilmiştir. Son yıllarda, demir şelasyon terapisi, PH için etkili bir tedavi yöntemi olarak, klinik denemelerde önemli gelişmeler göstermiştir. Bununla birlikte, mevcut demir şelatörleri, kısa dolaşım süreleri, kan dolaşımındaki iyonlarla şelasyondan uygun koruma olmaması ve yan etkileri nedeniyle yetersiz olduğu düşünülmektedir. Çalışmada bu sorunu aşmak adına, kan dolaşımında demir şelatörlerini, şelasyondan korumak için zwitteriyonik poli(2-metakriloloksietil fosforilkolin) (PMPC) tarafından korunan demir şelatör terapötik bir nanopartikül oluşturulmuştur. Nanopartikülün kan-beyin bariyerinden geçirgenliğini arttırmak için, HIV-1 transkriptiv edici transkripsiyon (TAT), faktörü eklenmiştir. Parkinson nörodegenerasyonunun sebep olduğu davranış ve fizyolojik semptomlara karşı nanopartikülün etkileri, *in vivo* ve *in vitro* olarak tartışılmıştır. Çalışmada, demir şelatörü yüklü terapötik nanoparçacıkların, parkinson farelerinde, sadece fizyolojik olarak değil aynı zamanda davranışsal olarak da fonksiyonel bozuklukları tersine çevirebildiği bildirilmiştir. Diğer taraftan, hem tedavi edilmemiş PH fareleri hem de TAT eklenmemiş nanopartikül ile tedavi edilen PH fareleri, DA nöronlarında benzer bir kayıp ve davranış zorluklarında benzer sonuçlar göstermiştir. Sonuç olarak, demir şelatör yüklenmiş nanopartikülün *in vivo* hayatta kalımı, zwitter iyonik polimer eklenmesi ile artırılmıştır. Ayrıca, parkinsoniazim gösteren farelerin yaşam kalitesinin önemli derecede artırıldığı rapor edilmiştir (Wang et al. 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez kapsamındaki deneylerde kullanılan Ntera-2/D1 (NT-2/D1) (ATCC[®], CRL-1973[™]) insan malign pluripotent embriyonal karsinom hücre hattı ATCC[®], ABD'den temin edilmiştir.

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal malzeme ve kitlerin listesi Çizelge 3.1'de, cihazlar ise Çizelge 3.2'de listelenmektedir.

Çizelge 3.1 Kimyasal ve Kitler Listesi

Kimyasal ve Kitler	Satın Alınan Firma
Asetilkolinesteraz Kit	Abcam [®] (ABD)
Borik asit (H ₃ BO ₃)	Eti-Maden [®] (Türkiye)
DMEM	Gibco [®] (ABD)
DMSO	Sigma-Aldrich [®] (Almanya)
FBS (Fetal Bovin Serum)	Gibco [®] (ABD)
Hidrazin Hidrat (N ₂ H ₄ .H ₂ O)	Sigma-Aldrich [®] (Almanya)
LDH Assay Kit	Thermo Fisher Scientific [®] (ABD)
MTT	Sigma-Aldrich [®] (Almanya)
PBS	Sigma-Aldrich [®] (Almanya)
Sodyum Azid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich [®] (Almanya)
TAK Kit	Rel Assay Diagnostics [®] (Türkiye)
TOS Kit	Rel Assay Diagnostics [®] (Türkiye)
Tripan Blue	Thermo Fisher Scientific [®] (ABD)
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich [®] (Almanya)

Çizelge 3.2 Cihazlar Listesi

Cihazlar	Marka ve Model
Analitik Terazî (0,0001)	Shimadzu ATX 224
CO ² 'li İnkübatör	ESCO Celculture
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Laminer Kabin	ESCO NordicSafe [™]
Mikroplaka Okuyucu	Biotek EPOCH
Otoklav	JSR, JSAC-60
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Su Banyosu	ESCO
Taramalı Elektron Mikroskobu	Zeiss Sigma 300 [®]
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
X ışını kırınım cihazı	PANalytical, Empyrean [®]

3.2. Yöntem

3.2.1. Bor nitrür nanopartiküllerinin sentezi

Nanopartikül sentezi için, 5 gr borik asit (H_3BO_3), 16 gr NaN_3 hassas terazide tartılmış ve bir beher içerisinde 600 ml deiyonize saf su içerisinde çözülmüştür. Ardından manyetik karıştırıcıda yarım saat karıştırılmıştır. Devamında 4,6 ml $N_2H_4.H_2O$ ortama yavaş yavaş eklenmiş ve yarım saat daha karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir. Yarım saatin sonunda inert (azot) bir gaz varlığında otoklava yerleştirilmiş, sıkı bir şekilde ağzı kapatılan otoklav kül fırınında $300^\circ C$ sıcaklıkta 16 saat boyunca bekletilmiştir. Sonra, otoklav içerisinde çıkan karışım safsızlıkları uzaklaştırmak için bol su ile yıkanmış, ardından ürün deiyonize saf suyla 100 derece sıcaklıkta 2-3 saat vakumda kurutulmuştur.

3.2.2. Bor nitrür nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Taramalı elektron mikroskobu, yüksek vakum altında çeşitli elektro manyetik lensler tarafından şiddeti azaltılan elektron demetlerinin numuneye gönderilerek, malzemenin analiz edilmesine imkân sağlar. Elde edilen hBN nanopartiküllerinin yüzey ve boyut analizi taramalı elektron mikroskobu (DAYTAM, Zeiss Sigma 300[®] SEM) ile yapılmıştır.

Sonrasında nanopartiküllerin elementer karakterizasyonu X-ışını kırınım (XRD) yöntemi ile analiz edilmiştir. X-ışını difraksiyon ölçümü Doğu Anadolu Teknoloji Merkezi'nde (DAYTAM) Empyrean[®] (PANalytical[®] Almanya) modeli XRD cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizler, $10-90^\circ$ arasında $0,1^\circ$ lik adımlarla ve dalga boyu $1,5406 \text{ \AA}$ olan x-ışınları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3. Hücre kültürü ve nöronal dönüşüm

Yapılan tezde insan malign pluripotent embriyonal karsinomdan elde edilmiş Ntera-2/D1 (NT-2/D1) hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı ATCC[®](CRL-1973[™]), ABD'den temin edilmiştir. Hücreler, %10 inaktive edilmiş Fetal Bovin Serum (FBS) ve

%1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik eklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde büyütülmüştür. Hücreler inkübatörde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 hava atmosferinde inkübe edilmiştir. Flask içerisinde hücreler %80 konfluense ulaşınca öncelikle PBS (Fosfat Buffer Salin) ile yıkama yapılarak hücre kalıntıları ve FBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ardından flaska %5 FBS içeren yeni besiyeri ile birlikte 10 µM konsantrasyonda all-trans-retinoik asit (all-trans-RA) (Sigma Aldrich®) eklenerek inkübe edilmiştir. Ertesi gün besiyeri RA içermeyen %10'luk FBS içeren yeni besiyeri ile değiştirilmiştir. Bu döngü 11 gün boyunca tekrar edilmiş ve hücrelerdeki değişimler mikroskop altında fotoğraflanmıştır. 11. günün sonunda nöronal dönüşümleri tamamlanmış olan hücreler çalışmada kullanılmıştır.

Hücreler %0,05 tripsin/EDTA (Sigma Aldrich®) solüsyonu ile hasat edilerek 96'lık pleytlere ekimi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle deneysel parkinson modeli oluşturmak için hücelere dopaminerjik nörotoksin MPTP'nin aktif bir metaboliti olan 1-metil-4-fenilpridinium iyodür (MPP⁺ iyodür) (Sigma Aldrich®) çeşitli konsantrasyonlarda (0,62; 0,12; 0,25; 0,50; 1; 2 mM) verilmiş ve 24 saatin sonunda hücre canlılık testleri uygulanmıştır. Canlılık testi sonucunda MPP⁺'nin IC₅₀ konsantrasyonu belirlenmiştir. Dönüşümleri tamamlanmış hücelere IC₅₀ konsantrasyonunda MPP⁺ verilerek deneysel parkinson modeli oluşturulmuştur. Ardından hBN nanopartikülleri deiyonize saf su içerisinde disperse edilmiş ve geniş doz aralığında (0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25; 50; 100 mg/L) deneysel parkinson modeline eklenerek nanopartiküllerin nöron koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak herhangi bir işlem yapılmamış hücre, pozitif kontrol olarak ise %1 Triton X-100 kullanılmıştır.

3.2.4. Hücre canlılık testleri

3.2.4.1. MTT

24 saatin sonunda 96'lık pleytin her bir kuyucuğuna 3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT)'den %10 olacak şekilde eklenmiş ve 3 saat 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 hava atmosferinde inkübe edilmiştir. 3 saatin sonunda kuyucuklardaki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından hücrelerde oluşmuş olan formazan kristalleri DMSO (Sigma-Aldrich®) ile çözdürülmüş ve bir mikropilaya okuyucu yardımı ile 570-630 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır.

3.2.4.2. LDH

Test için Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, U.S.), Pierce™ LDH kiti üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. 24 saatin sonunda yeni bir 96'lık pleyte hücrelerin üzerindeki süpernatandan 50 µL aktarılmış, üzerine 50 µL reaksiyon karışımından eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından 50 µL stop solüsyonundan eklenerek 490-680 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

3.2.5. Toplam antioksidan kapasite ve toplam oksidan seviye analizi

Hücrelerdeki toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan seviye (TOS) Rel Assay Diagnostics® (Türkiye) TAS ve TOS kitleri aracılığıyla üreticinin talimatlarına uygun olarak hesaplanmıştır. Hücre besisi yerinde bulunan antioksidan molekülleri kit içerisindeki koyu yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS molekülüne indirgemektedir. Ardından renk değişimi 660 nm'de mikropilaka okuyucu tarafından ölçülmüştür. Absorbans değişimi hücrenin antioksidan kapasitesi ile ilişkilidir. Numunede bulunan oksidantların, daha önce şelatlayıcıya bağlanmış olan demir iyonlarını oksitleyebilme prensibine dayanmaktadır. Ayrıca, asidik bir ortamda, ferrik iyonlar bir kromojen ile renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Numunelerin absorbansı 530 nm'de ölçülmüş ve test sonuçları µmol H₂O₂ Eq/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. Hoechst 33258 boyaması ile çekirdek analizi

24 saatlik inkübasyondan sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından, hücreleri fikse etmek için %4'lük paraformaldehit kullanılmış ve +4°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Hücreler fikse edildikten sonra tekrar PBS ile yıkanmış ve Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich®) floresan boyası ile karanlık bir ortamda 5 dakika muamele edilerek hücre çekirdeği boyanmıştır. Sonrasında floresan mikroskop (Leica® DM IL LED) altında analiz edilerek fotoğraflanmıştır.

3.2.7. Asetilkolinesteraz (AChE) seviye analizi

Deneysel parkinson modelindeki AChE aktivitesi, Abcam®'den (Cambridge, MA, ABD) Asetilkolinesteraz Test Kiti kullanılarak kolorimetrik olarak hesaplanmıştır. Üreticinin talimatına göre süpernatandan 50 µL yeni bir pleyte aktarılmış ve üzerine 50 µL master mix eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak bekletilmiştir. Sonrasında mikropkaya okuyucuda 410 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır.

3.2.8. Akış sitometrisi analizi

Hücreler 24 saatlik inkübasyonunun sonunda tripsinlenerek kaldırılmış ve santrifüj ile toplanmıştır. Santrifüj sonunda çökmüş olan hücreler 500 µL 1x bağlanma tamponu ile süspansiyon edilmiştir. Ardından süspansiyon edilmiş hücrelere, 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL propidyum iyodür eklenmiştir. Karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra hücreler akış sitometrisinden (CyFlow® Cube 6, Almanya) geçirilerek analiz edilmiştir.

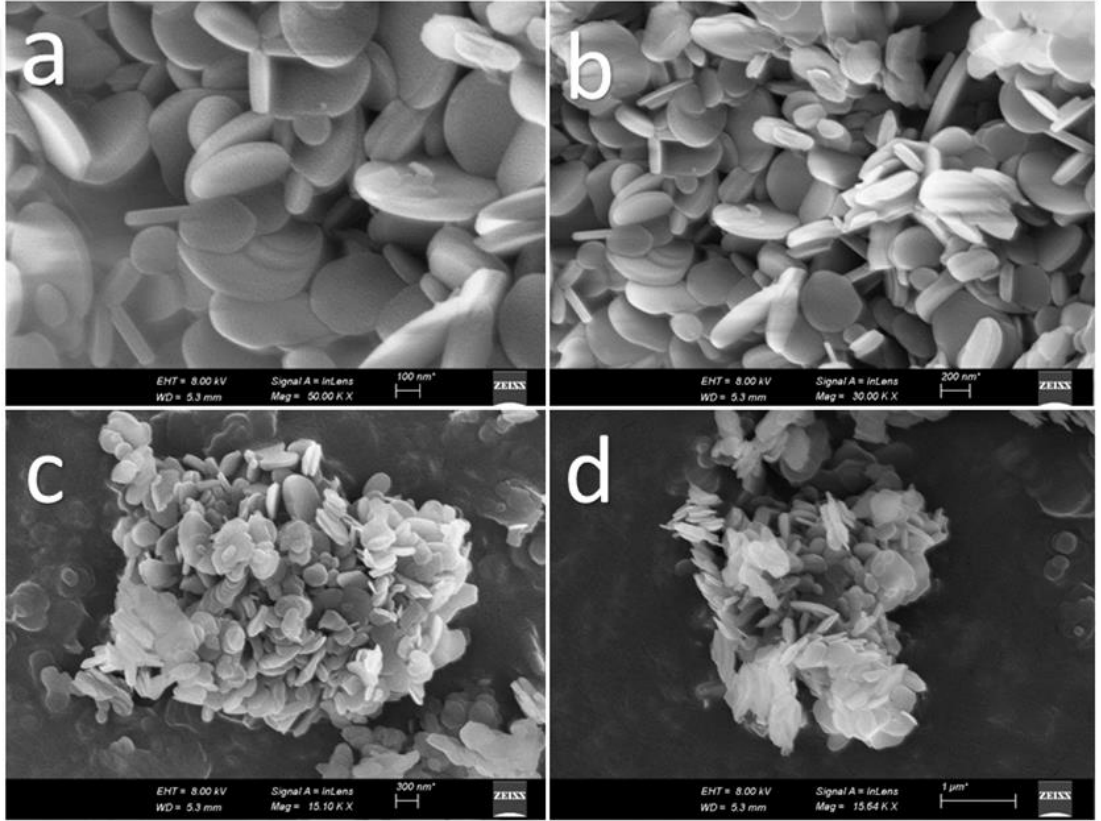
3.2.9. İstatistiksel analizler

Araştırmadan elde edilen sayısal veriler GraphPad Prism® sürüm 7.0 istatistik programı ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için iki yönlü ANOVA, Tukey ve Dunnett testi uygulanmıştır. İstatistiksel önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bor Nitrür Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Hekzagonal bor nitrür nanopartiküllerinin yüzey morfolojileri ve elementer analizleri taramalı elektron mikroskop (SEM) ve X-ray difraksiyon (XRD) yöntemi ile yapılmıştır. Farklı skalalar kullanılarak hBN nanopartikülleri SEM mikroskobu altında görüntülenmiştir (Şekil 4.1). Görüntülerde hBN nanopartiküllerinin yüzeylerinin oldukça homojen ve boyutlarının 100 ila 300 nm arasında oldukları görülmüştür.



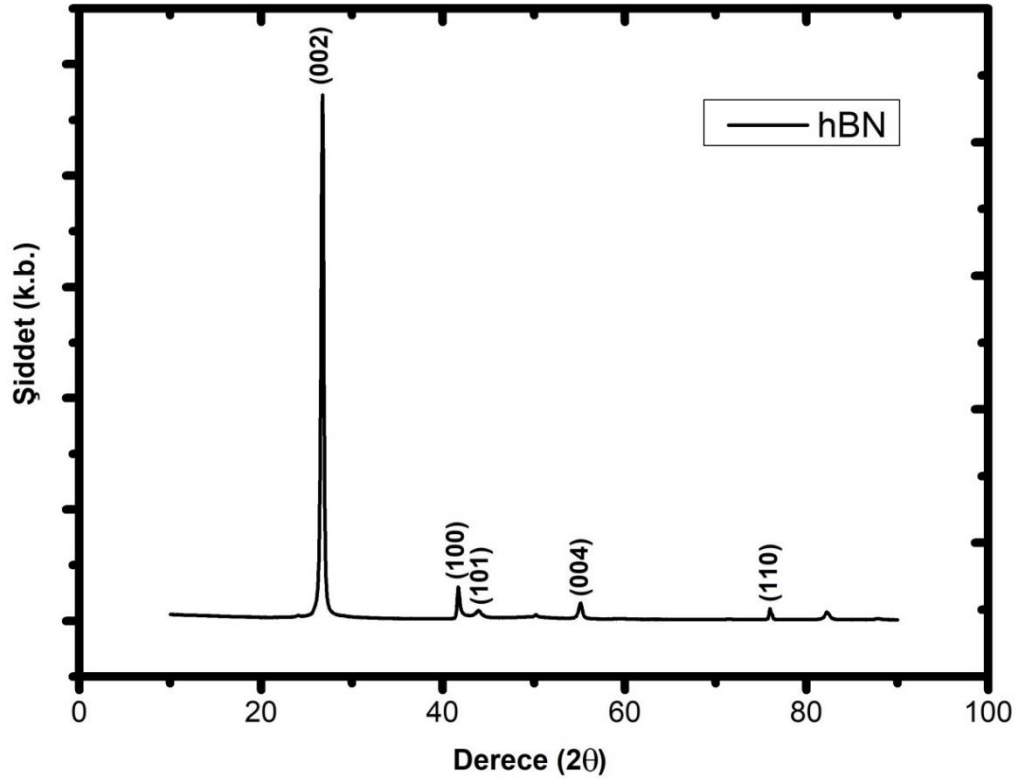
Şekil 4.1 hBN nanopartiküllerinin farklı ölçeklerde taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri **a.** 100 nm **b.** 200 nm **c.** 300 nm **d.** 1 µm.

Spray pyrolysis yöntemi kullanılarak hBN nanopartiküllerinin X-ışını kırınım analizleri yapılmıştır. hBN nanopartiküllerinin XRD analizi sonuçlarında en yüksek pik Müller indisinde 002 düzlemine denk gelen $2\theta=26,76^\circ$ 'de görülmüştür (Şekil 4.2). Diğer pikler ise sırasıyla $2\theta=41,70^\circ$, $43,91^\circ$, $55,12^\circ$, $75,97^\circ$ 'lerde görülmüştür. Bu piklerin Müller indisine göre düzlemsel sıralaması 100, 101, 004 ve 110 şeklindedir. Bu XRD pikleri

JCPDS kartı 89-7102 nolu XRD dosya görüntüleri ve literatürdeki diğer verilerle de uyumludur. Daha sonra Debye-Scherrer formülü (4.1) (Patterson. 1939) kullanılarak hBN nanopartiküllerinin boyutu hesaplanmıştır.

$$D = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (4.1)$$

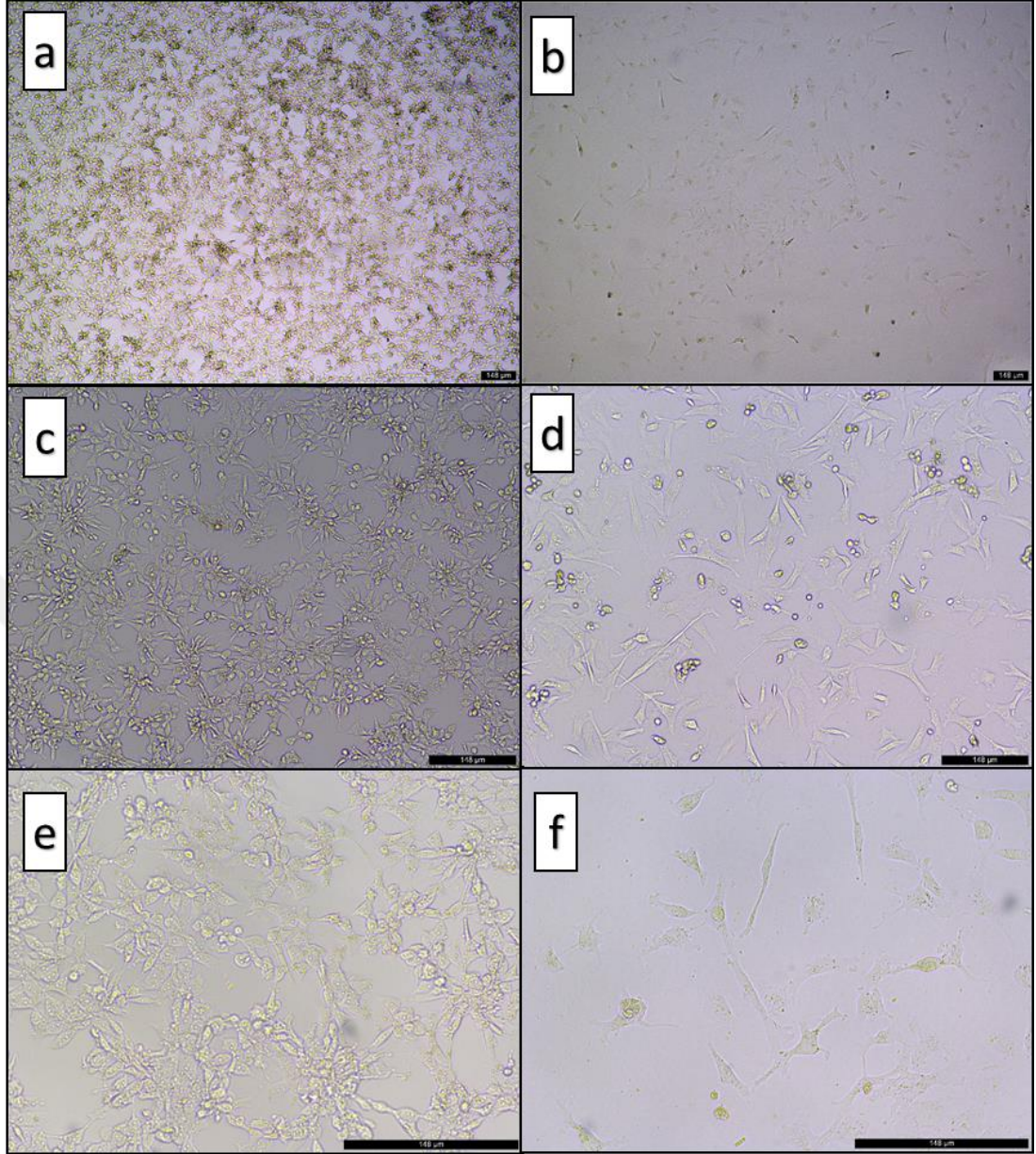
D partikülün boyutunu, β maksimum radyan pik değerinin yarısı (FWHM), θ Bragg açısını temsil etmektedir. En yüksek pik olan, 002 düzlemindeki pikin D değeri 220 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2 hBN nanopartiküllerinin X-ışını kırınım deseni.

4.2. Hücre Kültürü ve Nöronal Dönüşüm

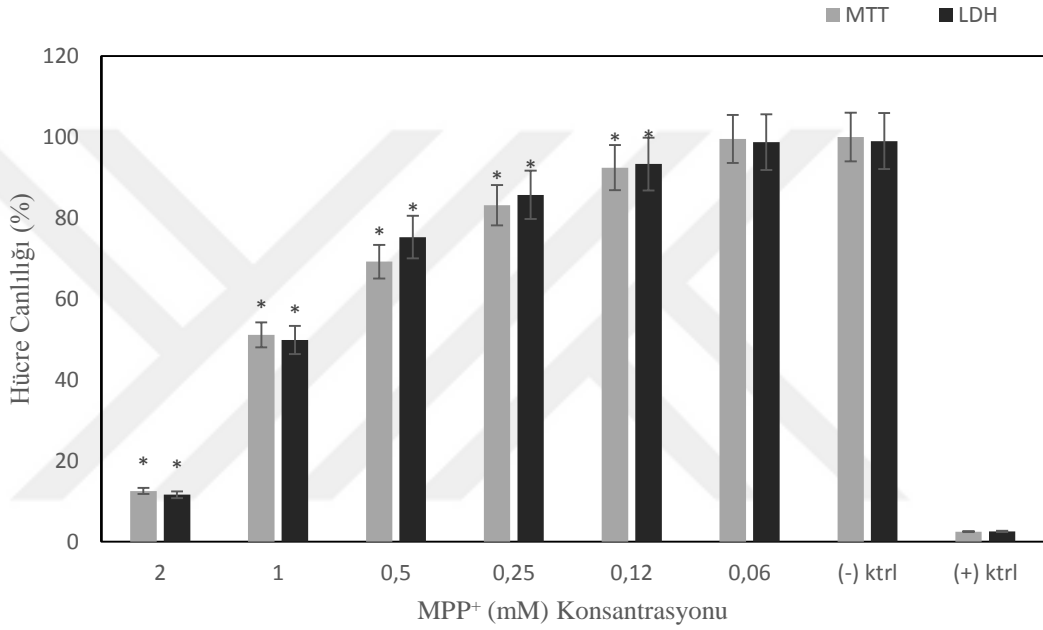
11 gün boyunca NT-2 hücreleri, all trans RA ile muamele edildikten sonra hücre dönüşümleri (Andrews et al. 1984) mikroskop altında fotoğraflanmıştır. RA uygulamasından sonra hücrelerin uzamaya başladığı ve akson-dentrit etkileşimleri geliştirdiği görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklılaşmamış ve farklılaşmış NT-2 hücre görüntüleri. RA içermeyen hücre kültürü **a.** 4X, **c.** 10X, **e.** 20X, RA uygulanmış hücre kültürü **b.** 4X, **d.** 10X **f.** 20X, (11 gün).

4.3. Hücre Canlılık Testleri

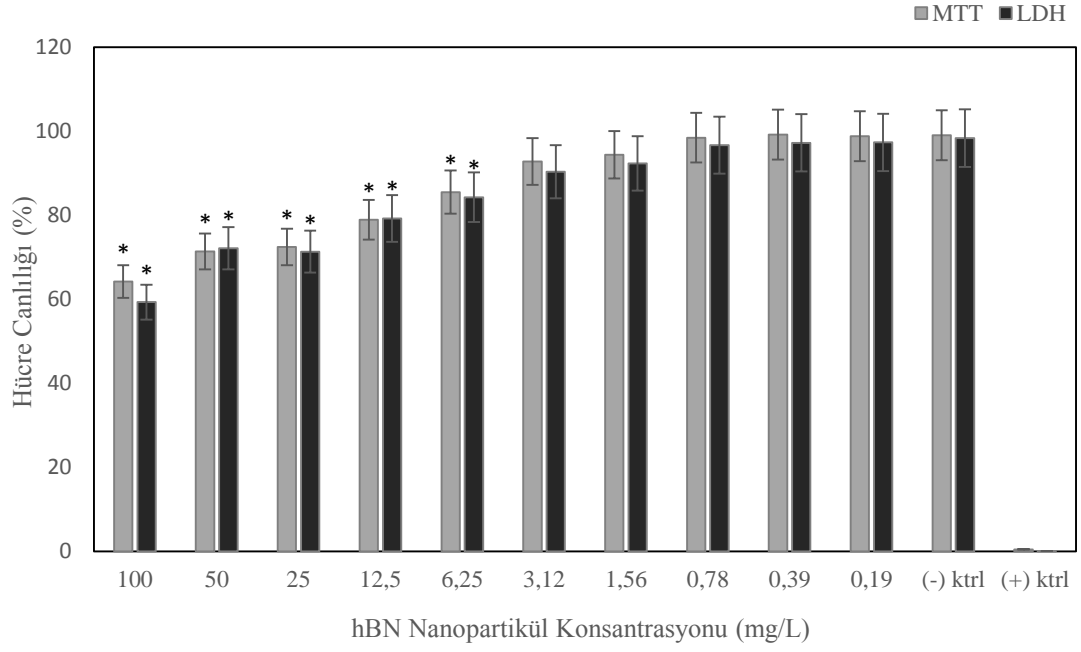
Öncelikle deneysel parkinson modeli oluşturmak için hücreler dopaminerjik nörotoksin MPTP'nin aktif bir metaboliti olan MPP⁺ iydür çeşitli dozlarda 24 saat boyunca hücre kültürüne uygulanmıştır. 24 saatin sonunda MPP⁺'nin IC₅₀ konsantrasyonunu belirlemek için hücrelere MTT ve LDH testleri uygulanmıştır. Literatürdeki verilere (Zeng et al. 2006; Esteves et al. 2008) paralel olarak testlerin sonunda MPP⁺'nin IC₅₀ konsantrasyonu 1 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 MPP⁺ uygulanmış kültürlerdeki hücre canlılık oranları (24 saat) (negatif kontrol; işlem yapılmamış hücre, pozitif kontrol; %1 Triton X-100). *sembolü negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

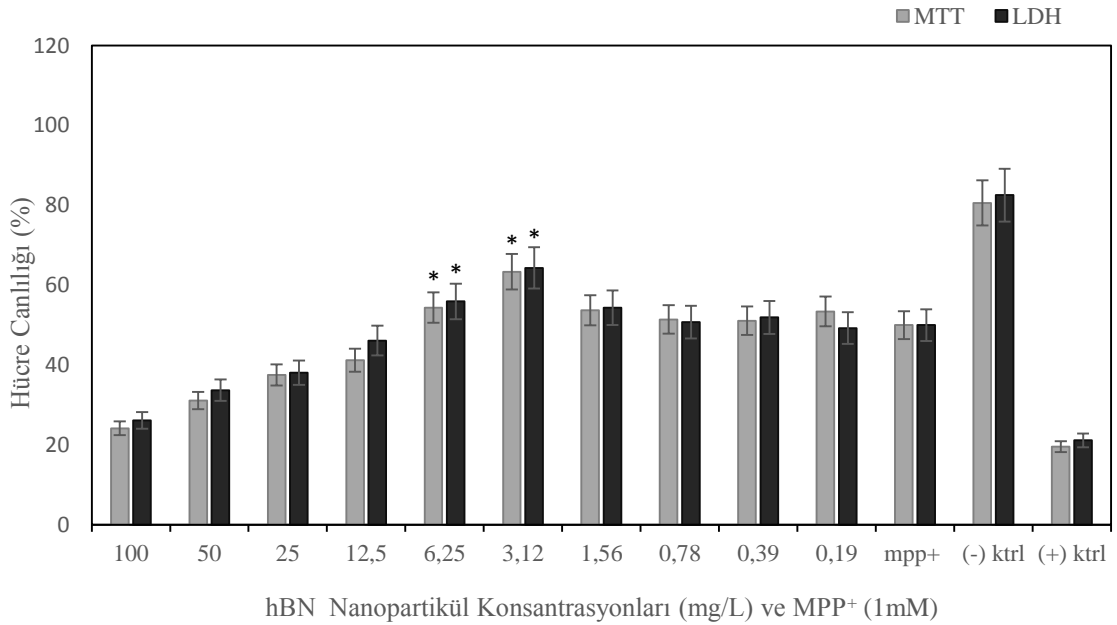
Önceki yapılmış çalışmalarda BN nanopartiküllerinin tıbbi kullanım için uygun dozlarda biyoyumlu oldukları ve çeşitli hücre hatları üzerinde toksik etki göstermedikleri rapor edilmiştir (Ciofani et al. 2008; Li et al. 2018; Türkez et al. 2019). Çalışmamızda hBN nanopartikülleri çeşitli dozlarda (0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25; 50; 100 mg/L) hücrelere uygulanmış ve deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 24 saatin sonunda kültürlerdeki hücre canlılıkları hesaplanmış ve grafik üzerinde yüzde cinsinden gösterilmiştir (Şekil 4.5). hBN nanopartikül uygulamasından sonra hücre canlılığında doza bağımlı olarak düşüş görülmektedir fakat bu düşüşün yüksek dozlarda ortaya çıktığı hesaplanmıştır. Sonuçlara bakıldığında, hBN nanopartiküllerinin belirli dozlarında nöronal dönüşümü yapılmış hücreler üzerinde toksik etki göstermedikleri hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.5 hBN nanopartiküllerinin NT-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki potansiyeli (24 saat) (negatif kontrol; herhangi bir işlem yapılmamış hücre, pozitif kontrol; %1 Triton X-100). *sembolü negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

hBN nanopartiküllerinin deneysel parkinson modelindeki MPP⁺ toksisitesine karşı nöron koruyucu özelliklerini belirlemek için, MPP⁺'nin IC₅₀ konsantrasyonu uygulanmış hücrelere farklı konsantrasyonlarda hBN nanopartikülleri eklenmiş ve 24 saatin sonunda hücre canlılığı hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda hBN'nin 3,12 mg/L dozunun MPP⁺ grubuna kıyasla %13'den daha fazla, 6,25 mg/L dozunun ise yaklaşık %6 oranında hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür. Diğer gruplarda ise hücre canlılığı doza bağımlı olarak azalmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Deneysel parkinson modelinde hBN'nin nöron koruyucu etkinliği (24 saat) (negatif kontrol; herhangi bir işlem yapılmamış hücre, pozitif kontrol; %1 Triton X-100). *sembölü MPP⁺ grubuna kıyasla istatistiksel (artış) anlamlılığı ifade etmektedir.

4.4. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) ve Toplam Oksidan Seviye (TOS)

Analizi

Önceki yapılmış çalışmalarda, nörodejeneratif hastalıklardan özellikle PH'de nöronlardaki reaktif oksijen türlerinin arttığı ve bunun sonucu olarak hastalarda nöron kaybına sebep olduğu rapor edilmiştir (Kim et al. 2015; Niedzielska et al. 2016). *In vitro* model oluşturmak için kullanılan MPP⁺'nin ise mitokondriyal elektron taşıma zincirinin NADH CoQ redüktazını (kompleks I) seçici bir şekilde inhibe ettiği (ATP üretiminin çarpıcı bir şekilde düşmesine neden olur) ve bu şekilde nöronal dejenerasyonu indüklediği bildirilmiştir (Sanders and Greenamyren. 2013). Başka bir çalışmada ise MPP⁺'nin H₂O₂ ile ilişkili ROS türlerini arttırdığı ve hücreleri apoptoza sürüklediği bildirilmiştir

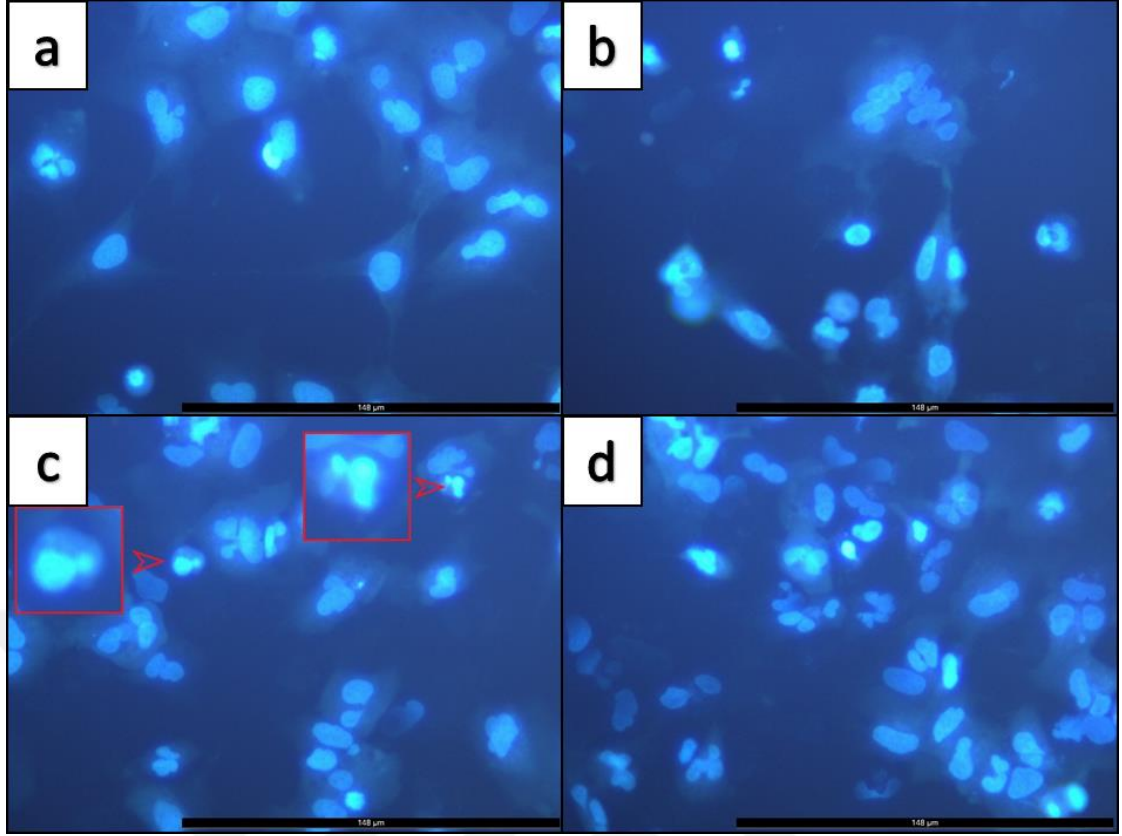
(Chun et al. 2001). Çalışmamızda ise hBN nanopartiküllerinin nöron hücrelerinin hayatta kalımı üzerine olan etkilerini belirlemek adına hücrelerdeki TAS ve TOS değerleri analiz edilmiştir (Çizelge 4.1). Sonuçlara bakıldığında parkinson modeli oluşturmak için kullanılan MPP⁺'nin hücrelerdeki toplam antioksidan kapasiteyi kontrole kıyasla azalttığı, toplam oksidan seviyeyi ise arttırdığı hesaplanmıştır. Deneysel parkinson modelinde ise hBN nanopartiküllerinin 24 saat sonunda hücrelerdeki TAK seviyesini MPP⁺'ya kıyasla arttırdığı TOK seviyesini ise azalttığı belirlenmiştir. hBN nanopartiküllerinin kontrol grubundaki TAK ve TOS değerlerine olan etkileri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.1 hBN uygulamasından sonra hücrelerdeki TAK ve TOS değerleri (24 saat).

Gruplar	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TOS (µmol H2O2 Equiv./l)
Kontrol	1,91±0,09 ^a	11,88±0,59 ^a
MPP ⁺	1,13±0,05 ^b	17,58±0,87 ^b
hBN	1,98±0,07 ^a	13,02±0,65 ^a
hBN+MPP ⁺	1,39±0,06 ^c	15,63±0,78 ^c

4.5. Hoechst 33258 Boyaması ile Apoptoz Analizi

Deneysel parkinson modeli oluşturulmuş hücelere 24 saat boyunca 3,12 mg/L hBN uygulaması yapılmıştır. Ardından hücreler Hoechst 33258 boyası ile muamele edildikten sonra adi mikroskop altında incelenmiş ve hücrelerdeki değişimler fotoğraflanmıştır. Deneysel parkinson modelinde hücre çekirdeklerinde önemli bir apoptoz belirteci olan kromozomal integriteler görülmüştür. Hücrelerdeki kromozomların kırıldığı ve fragmentler oluşturduğu belirlenmiştir. Yalnızca hBN eklenen grupta ise hücrelerdeki kromozomal yapılarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişim görülmemiştir. hBN eklenmiş PH⁺li grupta ise kromozomal bozuklukların sayısının azaldığı ve hücre sayısında kontrole kıyasla artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Hoechst 33258 boyası ile hücre çekirdeklerinin boyanması (20X büyütme) **a.** Kontrol, **b.** hBN (3,12 mg/L), **c.** MPP⁺ (1 mM), **d.** hBN+MPP⁺.

4.6. Asetilkolinesteraz Aktivite Analizi

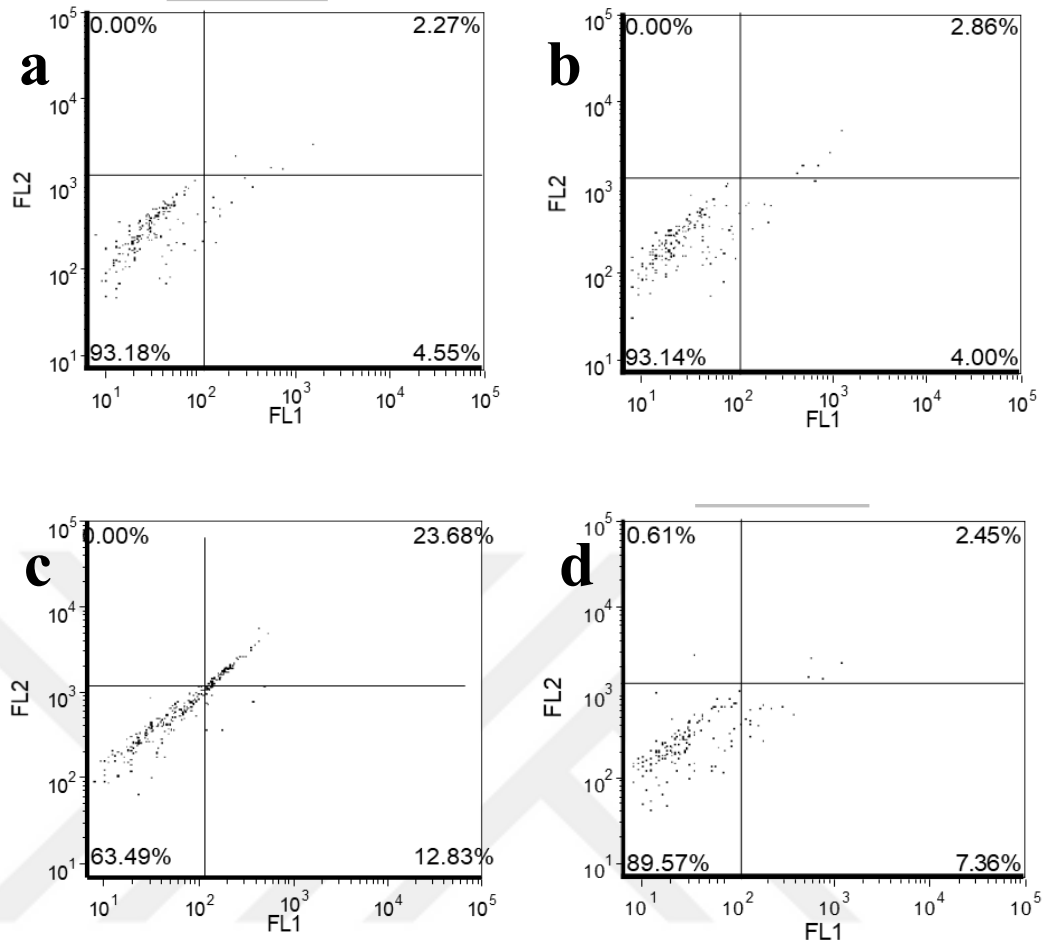
Hücelere 24 saat 3,12 mg/L konsantrasyonunda hBN uygulandıktan sonra hücrelerdeki asetilkolinesteraz enzim aktivitesi analiz edilmiştir. Önceki yapılan çalışmalarda deneysel parkinson modeli oluşturmak için kullanılan MPP⁺ nörotoksininin hücrelerdeki asetilkolinesteraz enzim aktivitesini kontrol grubuna karşın doza bağımlı azalttığı rapor edilmiştir (Zang and Misra. 1993). Fakat farklı nörodejeneratif bozukluklarda (Alzheimer, senil bozukluk vb.) yapılan başka çalışmalarda ise asetilkolinesteraz aktivitesinin arttığı görülmüştür (Mukherjee et al. 2007). Analiz sonuçlarına bakıldığında MPP⁺ verilen grupta asetilkolinesteraz aktivitesinin kontrole kıyasla ciddi şekilde azaldığı istatistiksel olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan yalnızca hBN eklenmiş hücrelerdeki asetilkolinesteraz aktivitesinin ise kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadığı hesaplanmıştır. Deneysel parkinson modelinde ise 24 saat hBN uygulamasının sonunda asetilkolinesteraz enzim aktivite seviyesinin bir miktar arttığı fakat artışın önemlilik düzeyinde olmadığı hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Sonuçlar, hBN uygulamasının hücredeki asetilkolinesteraz enzim aktivitesine herhangi bir etki yapmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.2 hBN uygulamasından sonra hücrelerdeki asetilkolinesteraz aktivite analizi (24 saat).

Gruplar	Asetilkolinesteraz Aktivitesi (mu/ml)
Kontrol	431,79±4,71 ^a
MPP ⁺	355,90±6,87 ^b
hBN	438,54±9,63 ^a
hBN+MPP ⁺	373,27±8,71 ^b

4.7. Akış Sitometrisi Analizi

24 saat hBN uygulamasından sonra hücrelerin ölüm yolları akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Deneysel parkinson modelinde 24 saat hBN uygulamasının canlılığı hBN eklenmemiş gruba göre arttırdığı hesaplanmıştır. Bu sonuçlar hücre canlılık testlerini de doğrular niteliktedir. Diğer taraftan analiz sonuçlarında deneysel parkinson modeli oluşturmak için uygulanan MPP⁺'nin hücrelerdeki apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Literatürde yapılmış çalışmalarda da MPP⁺'nin nöronları apoptoz aracılı ölüme sürüklediği rapor edilmiştir (Sheehan et al. 1997; Shimohama et al. 2003; Janhom and Dharmasaroja. 2015). Deneysel sonuçlar da bu veriyi desteklemektedir. Literatürde yapılmış diğer bir çalışmada ise MPP⁺ nörotoksininin hücrelerdeki oksidatif stresi tetikleyerek hücreleri apoptoza sürüklediği rapor edilmiştir (Lee et al. 2011). Bu bağlamda hBN uygulamasının deneysel parkinson modelindeki hücrelerde antioksidan seviyeyi arttırdığı ve bu yolağı kullanarak MPP⁺'nin neden olduğu apoptoz aracılı ölümü azalttığı düşünülmektedir. Yalnız hBN uygulamasının ise hücre canlılığında kontrolle karşılaştırıldığında herhangi bir değişim yapmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Hücre akış sitometrisi analizi (24 saat) **a.** Kontrol, **b.** hBN (3,12 mg/L), **c.** MPP⁺ (1 mM), **d.** hBN+MPP⁺.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında MPP⁺ ile indüklenerek oluşturulan deneysel parkinson modelinde ilk defa hBN nanopartiküllerinin nöron koruyucu etkinliği ortaya konulmuştur. hBN nanopartiküllerinin nöroprotektif özelliği ile birlikte hBN nanopartiküllerinin kullanılan dozda toksik olmadığı hücre canlılık testleri ile tespit edilmiştir. Toplam antioksidan ve oksidan seviye analizlerinde hBN nanopartiküllerinin 24 saat sonunda hücrelerdeki TAK seviyesini MPP⁺'ya kıyasla arttırdığı TOK seviyesini ise azalttığı belirlenmiştir. Asetilkolinesteraz analizinde ise deneysel parkinson modeline 24 saat hBN uygulamasının sonunda asetilkolinesteraz enzim aktivite seviyesinin bir miktar arttığı fakat artışın önemlilik düzeyinde olmadığı hesaplanmıştır. Son olarak akış sitometrisi analizinde deneysel parkinson modelinde 24 saat hBN uygulamasının canlılığı hBN eklenmemiş gruba göre arttırdığı hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar ışığında hBN nanopartiküllerinin parkinson tedavisinde yardımcı ajan olarak ya da ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabileceğini önermekteyiz. Bunun yanında hBN nanopartiküllerinin antioksidan özelliklere sahip olması, tıbbi kullanım için uygun dozlarda toksik olmamaları, oksidan ve asetilkolinesteraz seviyelerini arttırmaması gibi özellikleri bu önerimizi güçlendirmektedir.

KAYNAKLAR

- Alcalay, R.N., Gu, Y., Mejia-Santana, H., Cote, L., Marder, K.S., Scarmeas, N., 2012. The association between Mediterranean diet adherence and Parkinson's disease. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.24918>
- Anderson, P.C., Daggett, V., 2008. Molecular basis for the structural instability of human DJ-1 induced by the L166P mutation associated with Parkinson's disease. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi800677k>
- Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., Føgh, J., 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*.
- Arenal, R., Lopez-Bezanilla, A., 2015. Boron nitride materials: An overview from 0D to 3D (nano)structures. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. <https://doi.org/10.1002/wcms.1219>
- Balmain, W.H., 2011. XLVI. Observations on the formation of compounds of boron and silicon with nitrogen and certain metals . The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science. <https://doi.org/10.1080/14786444208621545>
- Bertoncini, C.W., Jung, Y.-S., Fernandez, C.O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T.M., Zweckstetter, M., 2005. From The Cover: Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407146102>
- Bhimanapati, G.R., Kozuch, D., Robinson, J.A., 2014. Large-scale synthesis and functionalization of hexagonal boron nitride nanosheets. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/c4nr01816h>
- Bonifati, V., Rohé, C.F., Breedveld, G.J., Fabrizio, E., De Mari, M., Tassorelli, C., Tavella, A., Marconi, R., Nicholl, D.J., Chien, H.F., Fincati, E., Abbruzzese, G., Marini, P., De Gaetano, A., Horstink, M.W., Maat-Kievit, J.A., Sampaio, C., Antonini, A., Stocchi, F., Montagna, P., Toni, V., Guidi, M., Dalla Libera, A., Tinazzi, M., De Pandis, F., Fabbrini, G., Goldwurm, S., De Klein, A., Barbosa, E., Lopiano, L., Martignoni, E., Lamberti, P., Vanacore, N., Meco, G., Oostra, B.A., 2005. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: Frequency, genotypes and phenotypes. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000167546.39375.82>
- Braak, H., Bohl, J.R., Müller, C.M., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Del Tredici, K., 2006. Stanley Fahn lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered., *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.21065>
- Brice, A., 2005. Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awh676>

- Broen, M.P.G., Narayan, N.E., Kuijff, M.L., Dissanayaka, N.N.W., Leentjens, A.F.G., 2016. Prevalence of anxiety in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis., *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26643>
- Canet-Avilés, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., Cookson, M.R., 2004. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402959101>
- Chun, H.S., Gibson, G.E., Degiorgio, L.A., Zhang, H., Kidd, V.J., Son, J.H., 2001. Dopaminergic cell death induced by MPP+, oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00096.x>
- Chung, K.K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2001. Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: Implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1001-1144>
- Ciofani, G., Raffa, V., Menciassi, A., Cuschieri, A., 2008. Cytocompatibility, interactions, and uptake of polyethyleneimine-coated boron nitride nanotubes by living cells: Confirmation of their potential for biomedical applications. *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.21952>
- Da Rocha Lindner, G., Bonfanti Santos, D., Colle, D., Gasnhar Moreira, E.L., Daniel Prediger, R., Farina, M., Khalil, N.M., Mara Mainardes, R., 2015. Improved neuroprotective effects of resveratrol-loaded polysorbate 80-coated poly(lactide) nanoparticles in MPTP-induced Parkinsonism. *Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.165>
- Di Crescenzo, A., Cacciatore, I., Petrini, M., D'Alessandro, M., Petraghani, N., Del Boccio, P., Di Profio, P., Boncompagni, S., Spoto, G., Turkez, H., Ballerini, P., Di Stefano, A., Fontana, A., 2017. Gold nanoparticles as scaffolds for poor water soluble and difficult to vehiculate antiparkinson codrugs. *Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/28/2/025102>
- Du Frane, W.L., Cervantes, O., Ellsworth, G.F., Kuntz, J.D., 2016. Consolidation of cubic and hexagonal boron nitride composites. *Diamond and Related Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2015.12.003>
- Emanet, M., Şen, Ö., Çulha, M., 2017. Evaluation of boron nitride nanotubes and hexagonal boron nitrides as nanocarriers for cancer drugs. *Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0322>
- Esteves, A.R.F., Domingues, A.F., Ferreira, I.L., Januário, C., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R., Cardoso, S.M., 2008. Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background. *Mitochondrion*. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.03.004>
- Esteves, M., Cristóvão, A.C., Saraiva, T., Rocha, S.M., Baltazar, G., Ferreira, L., Bernardino, L., 2015. Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce

- neuroprotection in a mouse model for parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00020>
- Feng, S., Zhang, H., Xu, S., Zhi, C., Nakanishi, H., Gao, X.D., 2019. Folate-conjugated, mesoporous silica functionalized boron nitride nanospheres for targeted delivery of doxorubicin. *Materials Science and Engineering*
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.063>
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.K., Nie, S., 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1038/nbt994>
- Giasson, B.I., Covy, J.P., Bonini, N.M., Hurtig, H.I., Farrer, M.J., Trojanowski, J.Q., Van Deerlin, V.M., 2006. Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20791>
- Giasson, B.I., Murray, I.V.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2001. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008919200>
- Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Gibson, J.M., Ross, O.A., Jain, S., Gandhi, S., Gosal, D., Muqit, M.M.K., Wood, N.W., Lynch, T., 2004. PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. *Neurology*.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000142089.38301.8E>
- Huang, R., Ke, W., Liu, Y., Wu, D., Feng, L., Jiang, C., Pei, Y., 2010. Gene therapy using lactoferrin-modified nanoparticles in a rotenone-induced chronic Parkinson model. *Journal of the Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.09.032>
- Horak, F.B., Dimitrova, D., Nutt, J.G., 2005. Direction-specific postural instability in subjects with Parkinson's disease. *Experimental Neurology*.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.12.008>
- Janhom, P., Dharmasaroja, P., 2015. Neuroprotective effects of alpha-mangostin on MPP⁺-induced apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Toxicology*. <https://doi.org/10.1155/2015/919058>
- Kamel, F., Goldman, S.M., Umbach, D.M., Chen, H., Richardson, G., Barber, M.R., Meng, C., Marras, C., Korell, M., Kasten, M., Hoppin, J.A., Comyns, K., Chade, A., Blair, A., Bhudhikanok, G.S., Webster Ross, G., William Langston, J., Sandler, D.P., Tanner, C.M., 2014. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.09.023>
- Khan, A.F., Brownson, D.A.C., Randviir, E.P., Smith, G.C., Banks, C.E., 2016. 2D Hexagonal Boron Nitride (2D-hBN) Explored for the Electrochemical Sensing of Dopamine. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02638>
- Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*
<https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>

- Klein, C., Schlossmacher, M.G., 2006. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care., *Nature Clinical Practice Neurology*.
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0126>
- Lee, J.H., Huh, Y.M., Jun, Y.W., Seo, J.W., Jang, J.T., Song, H.T., Kim, S., Cho, E.J., Yoon, H.G., Suh, J.S., Cheon, J., 2007. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature Medicine*.
<https://doi.org/10.1038/nm1467>
- Li, X., Wang, Xiupeng, Zhang, J., Hanagata, N., Wang, Xuebin, Weng, Q., Ito, A., Bando, Y., Golberg, D., 2017. Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13936>
- Li, Y., Yang, M., Xu, B., Sun, Q., Zhang, W., Zhang, Y., Meng, F., 2018. Synthesis, structure and antioxidant performance of boron nitride (hexagonal) layers coating on carbon nanotubes (multi-walled). *Surface Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.205>
- Macedo, M.G., Anar, B., Bronner, I.F., Cannella, M., Squitieri, F., Bonifati, V., Hoogeveen, A., Heutink, P., Rizzu, P., 2003. The DJ-1L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes. *Human Molecular Genetics*.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddg304>
- Malgieri, G., Eliezer, D., 2008. Structural effects of Parkinson's disease linked DJ-1 mutations. *Protein Science*. <https://doi.org/10.1110/ps.073411608>
- Marongiu, R., Brancati, F., Antonini, A., Ialongo, T., Ceccarini, C., Scarciolla, O., Capalbo, A., Benti, R., Pezzoli, G., Dallapiccola, B., Goldwurm, S., Valente, E.M., 2007. Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.9472>
- Marras, C., Beck, J.C., Bower, J.H., Roberts, E., Ritz, B., Ross, G.W., Abbott, R.D., Savica, R., Van Den Eeden, S.K., Willis, A.W., Tanner, C., 2018. Prevalence of Parkinson's disease across North America. *Npj Parkinson's Disease*.
<https://doi.org/10.1038/s41531-018-0058-0>
- Mellick, G.D., Gartner, C.E., Silburn, P.A., Battistutta, D., 2006. Passive smoking and Parkinson disease. *Neurology*.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223618.53129.56>
- Metz, G.A., 2007. Stress as a modulator of motor system function and pathology., *Reviews in the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2007.18.3-4.209>
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.0-2.002>
- Narendra, D.P., Youle, R.J., 2011. Targeting Mitochondrial Dysfunction: Role for PINK1

and Parkin in Mitochondrial Quality Control. Antioxidants & Redox Signaling. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3799>

Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., Filip, M., 2016. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases., *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>

Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2010. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: A mutation update., *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.21277>

Ozelius, L.J., Senthil, G., Saunders-Pullman, R., Ohmann, E., Deligtisch, A., Tagliati, M., Hunt, A.L., Klein, C., Henick, B., Hailpern, S.M., Lipton, R.B., Soto-Valencia, J., Risch, N., Bressman, S.B., 2006. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews . *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmc055509>

Pankratz, N., Pauciulo, M.W., Elsaesser, V.E., Marek, D.K., Halter, C.A., Wojcieszek, J., Rudolph, A., Shults, C.W., Foroud, T., Nichols, W.C., 2006. Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.003>

Patterson, A.L., 1939. The scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical Review*. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.56.978>

Parkinson, J., 1817. An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>

Pezzoli, G., Cereda, E., 2013. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease., *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318294b3c8>

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L., Duvoisin, R.C., 1996. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1197>

Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I., Kubisch, C., 2006. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1884>

Raj, R., Wairkar, S., Sridhar, V., Gaud, R., 2018. Pramipexole dihydrochloride loaded chitosan nanoparticles for nose to brain delivery: Development, characterization and in vivo anti-Parkinson activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.056>

Roondhe, B., Jha, P.K., 2019. Neurotransmitter-Functionalized Boron Nitride Nanoribbons as Biological Cargo Carriers: Analysis by Density Functional Theory. *ACS Applied Nano Materials*. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00028>

- Rogaeva, E., Johnson, J., Lang, A.E., Gulick, C., Gwinn-Hardy, K., Kawarai, T., Sato, C., Morgan, A., Werner, J., Nussbaum, R., Petit, A., Okun, M.S., McInerney, A., Mandel, R., Groen, J.L., Fernandez, H.H., Postuma, R., Foote, K.D., Salehi-Rad, S., Liang, Y., Reimsnider, S., Tandon, A., Hardy, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A.B., 2004. Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Archives of Neurology*. <https://doi.org/10.1001/arch-neur.61.12.1898>
- Sanders, L.H., Greenamyren, J.T., 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model., *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003>
- Savica, R., Grossardt, B.R., Bower, J.H., Eric Ahlskog, J., Rocca, W.A., 2016. Time trends in the incidence of parkinson disease. *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0947>
- Sheehan, J.P., Palmer, P.E., Helm, G.A., Tuttle, J.B., 1997. MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: An electron microscope study. *Journal of Neuroscience Research*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970501\)48:3<226::AID-JNR5>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970501)48:3<226::AID-JNR5>3.0.CO;2-H)
- Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., Taniguchi, T., 2003. Disease model: Parkinson's disease., *Trends in Molecular Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00117-5)
- Shulman, J.M., De Jager, P.L., Feany, M.B., 2011. Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130242>
- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., Takahashi, K., Ariga, H., 2004. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400074>
- Türkez, H., Arslan, M.E., Sönmez, E., Açıkyıldız, M., Tatar, A., Geyikoğlu, F., 2019. Synthesis, characterization and cytotoxicity of boron nitride nanoparticles: emphasis on toxicogenomics. *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00292-8>
- Ullrich, C., Mlekusch, R., Kuschig, A., Marksteiner, J., Humpel, C., 2010. Ubiquitin Enzymes, Ubiquitin and Proteasome Activity in Blood Mononuclear Cells of MCI, Alzheimer and Parkinson Patients. *Current Alzheimer Research*. <https://doi.org/10.2174/1567210204558642050>
- Vila, M., Przedborski, S., 2004. Genetic clues to the pathogenesis of parkinson's disease. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1068>
- Wang, A., Lin, Y., Wu, Y., Zhang, D., 2015. Macronutrients intake and risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Geriatrics and Gerontology International*. <https://doi.org/10.1111/ggi.12321>
- Wang, N., Jin, X., Guo, D., Tong, G., Zhu, X., 2017. Iron Chelation Nanoparticles with Delayed Saturation as an Effective Therapy for Parkinson Disease. *Biomacromolecules*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01547>
- Wang, Y., Guo, L., 2016. Nanomaterial-enabled neural stimulation., *Frontiers in*

Neuroscience. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00069>

Weng, Q., Wang, B., Wang, Xuebin, Hanagata, N., Li, X., Liu, D., Wang, Xi, Jiang, X., Bando, Y., Golberg, D., 2014. Highly water-soluble, porous, and biocompatible boron nitrides for anticancer drug delivery. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/n-n5014808>

Wirdefeldt, K., Adami, H.O., Cole, P., Trichopoulos, D., Mandel, J., 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: A review of the evidence., *European Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>

Xia, Y., 2008. Nanomaterials at work in biomedical research. *Nature Materials*. <https://doi.org/10.1038/nmat2277>

Yan, D., Zhang, Y., Liu, L., Shi, N., Yan, H., 2018. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: Dose-response meta-analysis of observational studies., *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.05.005>

Yang, F., Lagerros, Y.T., Bellocco, R., Adami, H.O., Fang, F., Pedersen, N.L., Wirdefeldt, K., 2015. Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awu323>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Recep KÜÇÜKDOĞRU
Uyruğu : T.C
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.03.1993 KARATAY
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90 554 840 77 36
e-mail : Recep.kucukdogru@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Konya Tarım Meslek Lisesi	2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

-Erzurum Teknik Üniversitesi, 2018

Uluslararası Kongre Sunum (Sunum tarihleri dikkate alınmalıdır)

1. Arslan M.E, Kucukdogru R, Aydın E, Turkez H, 5. Pharmaceutical Chemistry Congress, (2017) “İn-vitro Alzheimer modelinde farnesen’in nöron koruyucu etkisinin incelenmesi”, ANTALYA
2. Kucukdogru R, Ozdemir O, Arslan M.E, Turkez H, (2019) ‘‘Anticancer potential of boric acid against to prostate cancer cell line’’, International Symposium on Boron, NEVSEHIR

*Tezle ilgili varsa yayın eklenerek belirtilmelidir.