T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE METAL UYARICILI OKSİDATİF STRESLE İNDÜKLENEN ALZHEİMER MODELİ

ELİF KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ALPER YILMAZ

İSTANBUL, 2017

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE METAL UYARICILI OKSİDATİF STRESLE İNDÜKLENEN ALZHEİMER MODELİ

Elif KARAMAN tarafından hazırlanan tez çalışması 16.05.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Alper Yılmaz

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Alper Yılmaz

Yıldız Teknik Üniversitesi



Prof.Dr. Adil Alahverdiyev

Yıldız Teknik Üniversitesi



Yrd.Doç.Dr. Belkıs Atasever Arslan

Üsküdar Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2016-07-04-YL05 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında; insanda Alzheimer hastalığının modellenmesi amacıyla *in vitro* koşullarda bakır metalinin uyardığı oksidatif stres tablosunun insan nöroblastoma hücrelerinde oluşturulması amaçlanmıştır. Bakır iyonlarının, hücrelerde oksidatif stres ürünlerinin oluşmasına ve Alzheimer patolojik bulgusu olan amiloid-β (Aβ)'nın hücreler tarafından salınması üzerine etkisi incelenmiştir.

Tez çalışması boyunca engin bilgisi, yol göstericiliği ve desteğiyle her zaman yanımda olan değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Alper YILMAZ'a;

Çalışmamda yardım ve tecrübesini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV, Araş. Gör. Dr. Emrah Şefik ABAMOR ve Araş. Gör. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na;

Bu süreçte yardım ve desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Hatice Büşra KONUK ve Deniz ORTAÇ'a;

Tez çalışmasını 2016-07-04-YL05 numaralı proje ile destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Her zaman sabır ve hoşgörüyle yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren sevgili babam Ali KARAMAN, sevgili annem Fatma KARAMAN ve sevgili kardeşim Eda KARAMAN'a;

Dostlukları ve destekleriyle yanımda olan sevgili arkadaşlarıma;

Emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2017

Elif KARAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ x

ÇİZELGE LİSTESİ xii

ÖZET xiiii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 4

BÖLÜM 2

ALZHEİMER HASTALIĞI 5

2.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi 6
2.2 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi 7
2.3 Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi 8
2.3.1 Amiloid Plak Oluşumu 9
2.3.1.1 Amiloidojenik Olmayan Yolak 13
2.3.1.2 Amiloidojenik Yolak 14
2.3.1.3 Amiloid-β'nın Alzheimer Hastalığındaki Rolü 15
2.3.2 Nörofibriler Yumak Oluşumu 17
2.4 Risk Faktörleri 18
2.4.1 Oksidatif Stres 24

2.4.1.1 Oksidatif Stres ve Alzheimer İlişkisi 28
2.4.1.2 Metal Uyarıcılı Oksidatif Stres 38
2.4.1.3 Amiloid-β ile Metaller Arasındaki İlişki 40

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD 55

3.1 Kullanılan Materyaller 55
3.2 SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürü 56
3.3 SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması 57
3.4 SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması 57
3.5 SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması 58
3.6 SH-SY5Y Hücrelerinin Metal İyonları ile Muamelesi 58
3.7 Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Metal İyonları ile Muamelesi 59
3.8 Hücre Canlılık Testleri 59
3.9 Amiloid-β Tespiti 60
3.10 Reaktif Oksijen Türlerinin İncelenmesi 61
3.11 İstatistiksel Analizler 61

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA 63

4.1 SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürlenmesi, Pasajlanması ve Dondurulması 63
4.2 SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması 64
4.3 SH-SY5Y Hücrelerinin ve Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Canlılık Testleri. 71
4.4 SH-SY5Y Hücrelerinin ve Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Amiloid-β Tespiti. 78
4.5 SH-SY5Y Hücrelerinin ve Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Ürettiği Reaktif Oksijen Türlerinin İncelenmesi. 87

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER 100

KAYNAKLAR 105

ÖZGEÇMİŞ 122

SİMGE LİSTESİ

Cu	Bakır
$CuCl_2$	Bakır(II) klorür
$CuSO_4$	Bakır(II) sülfat
Fe	Demir
$FeSO_4$	Demir(II) sülfat
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipokloröz asit
HOO•	Hidroperoksil radikali
HOONO	Peroksinitröz asit
kDa	kilodalton
L•	Lipit serbest radikali
LOO•	Lipit peroksil radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
NO•	Nitrik oksit radikali
NO_2•	Nitrojen dioksit radikali
O_2	Moleküler oksijen
$O_2^{-\bullet}$	Süperoksit radikali
$^1O_2$	Singlet oksijen
OH•	Hidroksil radikali
ONOO•	Peroksinitrit
R•	Serbest radikal
RO•	Alkoksi radikali
ROO•	Peroksil radikali
ROOH	Hidroperoksit
Zn	Çinko

KISALTMA LİSTESİ

5-OHC	5-hidroksisitozin
8-OHA	8-hidroksiadenin
8-OHG	8-hidroksiguanin
Aβ	Amiloid β
Aβ40	40 aminoasit uzunluğundaki Amiloid β
Aβ42	42 aminoasit uzunluğundaki Amiloid β
ADAM	Disintegrin metalloproteinaz
AGEs	İleri glikozillenme son ürünleri
AICD	Amiloid öncül protein hücreiçi bölgesi
ApH-1	Anteror pharynx-defective 1
ApoE	Apoliprotein E
APP	Amiloid öncül protein
ATP	Adenozin trifosfat
ATP7A	Bakır taşıyıcı P-tipi ATPaz
BACE1	APP-β bölgesinden kesen enzim, β-sekretaz
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CAT	Katalaz
CCS1	Süperoksit dismutaz bakır şaperonu
CDK5	Siklin bağımlı kinaz-5
CQ	Clioquinol
CTF-α	C-terminal parçası-α
CTF-β	C-terminal parçası-β
Ctr1	Bakır taşıyıcı protein 1
DMT1	Divalent metal taşıyıcı 1
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAD	Ailesel Alzheimer Hastalığı
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfit
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
HNE	4-hidroksi-2-trans-nonenal
HSA	İnsan serum albümin

IDE	İnsülin degrede edici enzim
IL-6	İnterlökin-6
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MCI	Hafif kognitif bozukluk
MDA	Malondialdehit
MnSOD	Manganez bağımlı süperoksit dismutaz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NDMA	N-metil-D-aspartik asit
nDNA	Nükleer DNA
NF-κβ	Nükleer faktör κβ
NFY	Nörofibriler yumak
Pen-2	Presenilin arttırıcı protein-2
PET	Pozitron emisyon tomografisi
PS-1	Presenilin-1
PS-2	Presenilin-2
RAGE	İleri glikozillenme son ürünleri reseptörleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
sAPPα	Çözünebilir amiloid öncül protein α
sAPPβ	Çözünebilir amiloid öncül protein α
SOD	Süperoksit dismutaz
TACE	Tümör nekroz faktör-α dönüştürücü enzim
TNF-α	Tümör nekröz faktör-α

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Alzheimer patofizyolojisi 9
Şekil 2. 2 Aβ42 aminoasit dizisi 10
Şekil 2. 3 APP'nin amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yolak gösterimi.....14
Şekil 2. 4 Aβ birikimi ve agregasyonuna yol açan Alzheimer risk faktörleri 23
Şekil 2. 5 Metabolizmada oksidatif stres ve antioksidan sistemi 26
Şekil 2. 6 Guaninin hidroksil radikaliyle reaksiyonu ile 8-hidroksiguanin oluşumu.....32
Şekil 2. 7 Alzheimer hastalığında ROS etkileri 35
Şekil 2. 8 Alzheimer hastalığında oksidatif stres belirteçleri.....37
Şekil 2. 9 Sağlıklı ve Alzheimer hastası bireyde sinaps aktivasyonu.....43
Şekil 2. 10 Tirozin, 3-nitrotirozin, ditirozin.....48
Şekil 2. 11 Aβ-Cu(I) ve Aβ-Cu(II) komplekslerinin redoks aktivitesi (Asc: askorbat).....49
Şekil 2. 12 Aβ ile Cu(II) ve Cu(I) iyonlarının etkileşimi.....50
Şekil 2. 13 Oksidatif ürünler, Aβ ve bakır iyonları arasındaki ilişki.....52
Şekil 4. 1 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü.....68
Şekil 4. 2 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü.....69
Şekil 4. 3 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin DCF floresans yoğunlukları.....88
Şekil 4. 4 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin DCF floresans yoğunlukları.....89

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Dünyadaki demans hastası bireylerin 2015 yılı sayısı ile 2030 ve 2050 yılına ait tahmini sayıları.....7
Çizelge 2.2 Alzheimer epidemiyolojisi 19
Çizelge 3.1 Kullanılan cihazlar ve malzemeler.....56
Çizelge 4.1 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin yüzde canlılık grafiği.....72
Çizelge 4.2 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin yüzde canlılık grafiği.....76
Çizelge 4.3 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ40 konsantrasyonu 80
Çizelge 4.4 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ42 konsantrasyonu 81
Çizelge 4.5 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri için Aβ42/ Aβ40 oranı.....82
Çizelge 4.6 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ40 konsantrasyonu 83
Çizelge 4.7 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ42 konsantrasyonu 84
Çizelge 4.8 Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri için Aβ42/ Aβ40 oranı.....85

ÖZET

İNSAN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE METAL UYARICILI OKSİDATİF STRESLE İNDÜKLENEN ALZHEİMER MODELİ

Elif KARAMAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Alper YILMAZ

Dünya genelinde görülen demansın en sık nedeni olan Alzheimer; merkezi sinir sistemindeki sinaps ve nöronal kayıp, hafıza kaybı ve bilişsel bozukluklarla ilişkilendirilen, ilerleyici nitelikteki nörodejeneratif bir hastalıktır. Tedavi edilebilmesi ve önlenebilmesinde hastalığa neden olan etkenlerin bilinmesi önemlidir. Ancak hastalığın çok faktörlü oluşu ve deneysel modellerini oluşturmadaki güçlüklere bağlı olarak Alzheimer etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, oksidatif stresin hastalığın erken dönem patogenezinde rol oynadığı, amiloid-beta birikiminde etkili olduğu ve Alzheimer'lı beyinde oksidatif stresi uyaran metallerin birikiminde artış olduğu bilinmektedir.

Literatürde; farklılaşmamış hücre hatlarında amiloid-beta proteinlerinin ve metal iyonlarının doğrudan uygulandığı modeller ile genetik olarak modifiye edilmiş ve amiloid-beta üretebilen hücrelerle oluşturulmuş metal iyonlarının etkilediği in vitro modeller mevcuttur. Ancak bu modeller geç dönem Alzheimer patolojisini yansıtmaktadır. Tez çalışmasında ise; Alzheimer'ın erken dönemlerinde ve ilerlemesinde önemli rol oynayan oksidatif stresin indüklediği bir in vitro Alzheimer modeli oluşturmak amaçlanmaktadır. Bu amaçla nöron-benzeri özellikteki insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) ile bu hücrelerin nöronal özelliklerini geliştirmek için, retinoik asit uygulaması ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Oksidatif stresi indükleyici olarak bakır sülfat çözeltisi kullanılmış; MTT, ELISA ve reaktif oksijen türleri (ROS) belirleme yöntemleri uygulanmıştır.

Sonuç olarak, 50-200 mikromolar bakır sülfat uygulaması, farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerde kontrole kıyasla hücre canlılığında azalma, amiloid-beta42 konsantrasyonunda ve ROS düzeyinde artış sağlamıştır. Farklılaşmış hücrelerle kurulan modelin, farklılaşmamış hücrelere göre, nöronal özellikleri ve Alzheimer patolojisini güçlü şekilde temsil ettiği belirlenmiştir. Sonuçlar, ilk kez bu çalışmada retinoik asit ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan, bakır iyonları aracılı oksidatif stresle indüklenen Alzheimer modelinin; Alzheimer hastalığı araştırmalarında faydalı ve etkili bir model niteliğinde olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, amiloid-beta, oksidatif stres, metal, bakır, SH-SY5Y, insan nöroblastoma hücreleri

ABSTRACT

METAL-MEDIATED OXIDATIVE STRESS-INDUCED MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE IN HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS

Elif KARAMAN

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist.Prof.Dr. Alper YILMAZ

Alzheimer's disease is the most common cause of dementia and is a progressive neurodegenerative disorder. Identifying the factors causing diseases is important but, the etiology of Alzheimer's disease has not been understood due to the presence of multiple factors causing disease and difficulties in creating experimental models. Oxidative stress is effective amyloid-beta accumulation and metal ions accumulate in Alzheimer's brain.

In the literature; there are in vitro models in which amyloid-beta and metal ions are directly applied to undifferentiated cells, and models established with genetically modified amyloid-beta secreting cells influenced by metal ions. However, these models reflect late-stage pathology. Oxidative stress is effective in the early and late pathogenesis of disease and in this thesis, we aimed to create an in vitro oxidative stress-induced model of Alzheimer's. For this purpose, human neuroblastoma cells and differentiated cells by retinoic acid to improve neuronal properties of cells have been used. Copper sulphate has been used as oxidative stress inducer and MTT, ELISA and determination of ROS methods have been performed.

In conclusion, 50-200 micromolar copper sulphate treatments were decreased cell viability, were increased concentration of amiloid-beta42 and levels of ROS in undifferentiated and differentiated cells compared to control. It has been determined

that the model established with differentiated cells represents neuronal characteristics and Alzheimer's pathology forcefully compared to undifferentiated cells. For the first time in this study; the results demonstrate that copper-mediated oxidative stress-induced model established with differentiated SH-SY5Y by retinoic acid is a useful and effective model for Alzheimer's disease researches.

Keywords: Alzheimer, amyloid-beta, oxidative stress, metal, copper, SH-SY5Y, human neuroblastoma cell line

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Nörodejeneratif hastalıklar; dünya çapında pek çok insanın muzdarip olduğu ve ülkelerin sağlık alanında harcadığı ekonomik kaynakların önemli bir payını oluşturan hastalıklardır [1-5]. Alzheimer hastalığı protein agregasyonu, oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon kaybı, inflamasyon, sinaps kaybı, nöronal kayıp ve metal iyon birikimi ile ilişkilendirilen; hafıza ve kognitif işlevlerde bozulma ile seyreden, yaşam kalitesinde önemli düzeyde düşüşe neden olan, ilerleyici nitelikteki nörodejeneratif bir hastalıktır [1,4,6-9,11,12]. Alzheimer durumunda beyindeki nöronal kayıp beyin ağırlığının %20'si kadardır [9].

Amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar (NFY) Alzheimer'ın patogenezini açıklamada kullanılmaktadır [1,8-10,13-16]. Nörodejenerasyona neden olan bu plak ve nörofibriler yumaklar; nöronal fonksiyon kaybının bir sonucu olarak, bilişsel ve davranışsal faaliyetlerde bozukluk ve ilerleyen süreçte ölüme yol açmaktadırlar [14,17].

Amiloid plaklar; nöron ve mitokondri membranında bulunan amiloid öncül transmembran proteinin (APP) sekretaz enzimleri ile proteolizi sonucu oluşan, amiloid-β (Aβ) adı verilen peptitlerin hücre dışı alanda biraraya gelmesiyle oluşmuş yapılardır [5,6,8,9,18-21]. Sekretaz enzimlerinin APP'yi farklı bölgelerden kesebilmesi, aminoasit sayısı bakımından farklı olan Aβ türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. 42 aminoasit uzunluğundaki Aβ (Aβ42), hidrofobik özellik açısından daha güçlü olması, daha kolay agrege olması ve redoks aktivitesi nedeniyle farklı uzunluklardaki diğer Aβ peptitlerinden daha toksiktir [6,9,18,19,20,22-24]. Aβ peptit dizisinin özellikle Leu17-

Ala21 aminoasitleri, kendi kendine biraraya gelmede monomerlerin birbirini tanımasını kolaylaştıran kritik önemdeki dizidir [24]. Aβ monomerik, oligomerik, protofibril, fibril ve agregat formlarında bulunabilir ve bu formların oksidatif stresi uyardığı kanıtlanmıştır [19]. Ayrıca oligomerik Aβ, membran tabakasını geçerek hücresel organellerde bozulma meydana getirmesi ve sinaptik bölgede depolanarak hafıza kaybına yol açması sebebiyle oldukça toksiktir [8,9,14,20,23,25-27]. Aβ'nın nörotoksisitesi; uyardığı mitokondriyal işlev kaybı, enerji üretiminde azalma, oksidatif ürünlerde artış, hücre içi kalsiyum homeostazisinde değişiklik, inflamasyon, sinaps ve nöron kaybı ile ilişkilidir [9,28-34].

Alzheimer'ın diğer patolojik bulgusu olan nörofibriler yumaklar ise; hücre iskelet yapısının korunmasında önemli rol oynayan tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu nedeniyle oluşan, toksik karakterdeki çözünemeyen filamentlerden meydana gelir. Bu yapılar nörotransmitter iletimini ve hücre yapısını değiştirerek nöron ölümüne, kognitif bozulmaya yol açar [1,14,20,35,36].

Oksidatif stresin; Alzheimer'ın, bilinen histopatolojik bulgularının henüz ortaya çıkmadığı erken dönemde etkin rol oynayarak hastalığın ilerleyici seyrine ve diğer bulguların gelişimine katkıda bulunduğuna yönelik literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur [8,14,25,33,37-41]. Alzheimer olgularında; protein ve DNA oksidasyonundaki artış, lipit peroksidasyonundaki ilerleme, mitokondriyal solunum zincirinde yer alan enzimlerden sitokrom c oksidaz seviyesindeki azalma oksidatif stresin belirteçleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Alzheimer'da sitokrom c oksidazın fonksiyonunu kaybetmesi ya da miktarının azalması durumunda oksidatif fosforilasyon sırasında artan elektron kaçakları, oksijenle birleşerek serbest radikal üretimine yol açmakta ve oksidatif hasar genişlemektedir. Ayrıca Alzheimer hastalarının beyninde, oksidasyona hassas olan tirozin aminoasidinin serbest radikallerin oksidasyonuyla oluşan, ditirozin ile 3-nitrotirozin seviyesindeki artış da oksidatif stresin boyutlarını ortaya çıkarmaktadır [2,11,17,19,37,42-44].

Alzheimer hastalarının beyninde amiloid plakların çevresinde bakır, demir ve çinko gibi metallerin konsantrasyonunun yüksek olduğu ispatlanmıştır [8,14]. Geçiş metalleri, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları aracılığında çok sayıda reaktif oksijen türleri

oluşturarak oksidatif stresi uyaran ajanlardır. Ayrıca henüz işlevi net bir şekilde bilinmeyen APP proteininin taşıdığı metal bağlayıcı domainler, APP'nin metal taşınması ve homeostazisinde görevli olabileceğini düşündürmektedir [14].

Alzheimer hastalığının patogenezine ışık tutulan 20. yüzyılın başından itibaren; hastalık etkeni olarak pek çok faktör araştırılmış, tedavi edici yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmış, ancak günümüze dek kalıcı bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir [15]. Bunun en önemli nedenlerinden biri; hastalığın, henüz patolojik durumun olgunlaşmaya başladığı erken dönemde, tespitinin zor olmasıdır. Alzheimer'ın patolojik bulguları arasında gösterilen amiloid plaklar hastalığın geç dönemlerinde görüntüleme tekniklerinden pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans görüntüleme ile tespit edilebilse de, hastalığın geliştiği erken dönemde bu bulgulara rastlamak mümkün değildir [4,42]. Kesin tanı, hastanın ölümünün ardından yapılacak otopsi ile histopatolojik inceleme yoluyla konulmaktadır. Etkin tedavi yöntemi geliştirmede yaşanılan diğer zorluk; hastalığın çok sayıda etkenden kaynaklanabileceği gerçeğidir. Genetik yatkınlık, ailede demans öyküsünün bulunması, asetilkolinesteraz düzeyi, Aβ'yı oluşturan yolakta görevli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, eksitoksisite, oksidatif stres gibi çok sayıda etken Alzheimer patolojisinde yer almaktadır [8,37,45-48]. Ayrıca tedavi yöntemi bulma yolunda en önemli parametrelerden biri, hastalığı yüksek düzeyde temsil edebilecek nitelikteki uygun modellere duyulan ihtiyaçtır. Kullanılan modelin Alzheimer patolojisine uygunluğu bu alanda yapılacak araştırmalardan daha sağlıklı sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Tüm demans vakalarının %60-80'ini Alzheimer'ın oluşturduğu ve yaşlanan populasyonda görülme sıklığının arttığı düşünüldüğünde, etkili bir tedavi yöntemi ve önleyici terapi uygulamalarının geliştirilmesinin önemi gözler önüne serilmektedir. Alzheimer hastası bireylerin yanında hasta aileleri ve yakınlarının yaşamı da hastalık nedeniyle olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu şekilde toplumun önemli bir kesiminin Alzheimer hastalığından çeşitli açılardan etkilendiği anlaşılmaktadır. Hastalığın başlangıç döneminde tespit edilmesi, hastanın ve çevresindekilerin yaşam kalitesinde

önemli bir fark meydana getirecektir. Alzheimer'ın, ülkemizde ve dünyada hızla çözümü bekleyen önemli bir sorun olduğu çok açıktır.

Alzheimer hastalığının gelişiminde çok sayıda risk faktörünün yer alması ve hastalığın etiyolojisinin tam olarak anlaşılamamış olması, etkin tedavi yöntemlerinin ve önleyici terapilerin geliştirilmesi önündeki zorluklar olarak karşımıza çıkmaktadır [4,15,25,38]. Bu nedenle bu alandaki araştırmaların etkinliğini arttırmak amacıyla, *in vivo* koşullarda insanlarda meydana gelen Alzheimer tablosunu, en iyi şekilde yansıtacak bir *in vitro* modele ihtiyaç olduğu kaçınılmaz bir gerçektir.

Oksidatif stres Alzheimer'ın henüz bilinen patolojik bulguların görülmediği, erken dönem şeklinde adlandırılan başlangıç döneminde etkili olan ve hastalığın ilerlemesine kaynaklık eden önemli bir faktördür [8,9,25,38]. Amiloid plaklarda ve plak çevresinde yüksek metal konsantrasyonlarına rastlanılması metaller ve metallerin neden olduğu oksidatif stresin Alzheimer hastalığında önemli bir rolü olduğunu kanıtlar niteliktedir. Bu verilerden yola çıkarak metal aracılı oksidatif stresin indükleyeceği bir *in vitro* Alzheimer modeli oluşturmak bu tezin amacıdır.

1.3 Hipotez

Oksidatif stresin Alzheimer patogenezini başlatıcı ve ilerletici niteliğinden hareketle, oksidatif stres ajanı olarak değerlendirilen metallerin Alzheimer hastalığındaki rolü dikkate alınarak, *in vivo* patolojik koşulları en iyi şekilde temsil edecek, insan nöroblastoma hücrelerinde bakır metalinin uyardığı oksidatif stresin indüklediği bir *in vitro* Alzheimer modeli oluşturulmuştur. Devamlı soy hatları arasında değerlendirilen insan nöroblastoma hücreleri, nöron hücrelerinin aksine, kendilerini yenileyebilme özelliklerinin oluşu nedeniyle Alzheimer çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. En uygun Alzheimer modeli oluşturabilmek için nöron-benzeri özellikte olan nöroblastoma hücrelerinin nöronal özellikleri, farklılaştırma yoluyla geliştirilmiştir. İnsan nöroblastoma hücrelerinde metal aracılı oksidatif stresin neden olduğu sitotoksisite, reaktif oksijen türleri üretimi ve Aβ üretimi incelenmiştir. Geliştirilen ve oksidatif stres koşullarını sağlayan Alzheimer modeli, yalnızca etkin tedavi yönteminin belirlenmesi ile sınırlı kalmayıp hastalığı önleyici terapilerin geliştirilmesi çalışmalarına hizmet edebilecek niteliktedir.

BÖLÜM 2

ALZHEİMER HASTALIĞI

Alzheimer hastalığı; merkezi sinir sisteminde kortikal ve hipokampal nöron ve sinaps kaybıyla ilişkili; hatırlama, konuşma ve davranış durumunda ilerleyici nitelikte seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır [7,9,15,20,49]. Nörodejenerasyon ileri boyutta olup beyin ağırlığının %20'si kadar nöron kaybedilmektedir [9].

Klinik açıdan değerlendirildiğinde; hastalığın başlangıcında bellekte bozukluk görülür. İlk bilişsel bozukluk kısa süreli hafıza ile ilgilidir, uzun süreli hafızada bozulma daha geç evrelerde meydana gelir. İlerleyen evrelerde ise yeni bilgiler öğrenmede güçlük, konuşma sırasında kelime seçimi ve isimlendirme gibi lisan kabiliyetinde zorluklar, soyut düşünme yeteneğinde zayıflık, problem çözmede zorluk, zaman ve mekan algısında karışıklık, depresyon, konsantrasyon ve davranış bozuklukları, sosyal aktivitelerde azalma yaşanır. Hastalığın geç evrelerinde ise ileri düzeyde bellek kaybı, halüsinasyon görülmesi, ciddi ölçüde konuşma bozukluğu ya da kaybı ve günlük aktivitelerde başkasının bakımına bağımlı olma durumu söz konusudur. Hastalığın başlangıcından geç evresine geçiş ortalama on yıl sürmektedir [22,31,36,45,50-52].

Hasta hayatta iken Alzheimer hastalığının kesin tanısında bulunmak mümkün değildir, yalnızca muhtemel Alzheimer vakası şeklinde değerlendirme yapılabilir. Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, NINCDS-ADRDA) verilerine göre, muhtemel Alzheimer tanısının konulması için incelenen parametreler;

gözlem ve mental testler yardımıyla demansın olduğuna dair bulguların mevcudiyeti, bilişsel yeteneklerde zayıflığın tespiti, hastalığın ilerleyici nitelikte oluşu, 40-90 yaş arasında başlaması ve kişinin herhangi bir beyin rahatsızlığının olmayışı şeklindedir [4,31,36].

2.1 Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığının ilk tanısı 1900'lü yıllara dayanmaktadır. Hastalığa adını veren; 14 Haziran 1864 doğumlu, Alman psikiyatrist ve nöropatolog olan Alois Alzheimer'dır. [45,53,54].

Alois Alzheimer 26 Kasım 1901'de Frankfurt'ta bulunan bir hastanede; paranoya, halüsinasyon, ileri derecede kognitif bozukluğa eşlik eden hafıza kaybı, uyku ve davranış bozukluğu ile saldırganlık belirtileri olan August Deter isimli 51 yaşındaki kadın hastayla karşılaşmıştır. 1906 yılında A. Deter'in ölümünün ardından hastanın beyninde yaptığı otopside; serebral kortekste hücre kaybının yanında, histopatolojik boyama teknikleri sonucu, daha sonraki yıllarda plak ve nörofibriler yumak adı verilecek olan, histopatolojik bulguları keşfetmiştir. Bu bulguları 1906 yılında Almanya, Tübingen'de yapılan Güneybatı Alman Akıl Hastalıkları Uzmanları Kongresi'nde 'serebral kortekse özgü alışılmadık şiddetli bir hastalık' şeklinde paylaşmış, 1907 yılında ise 'Genel Psikiyatri ve Adli Tıp Dergisi'nde yayınlamıştır. [45,53].

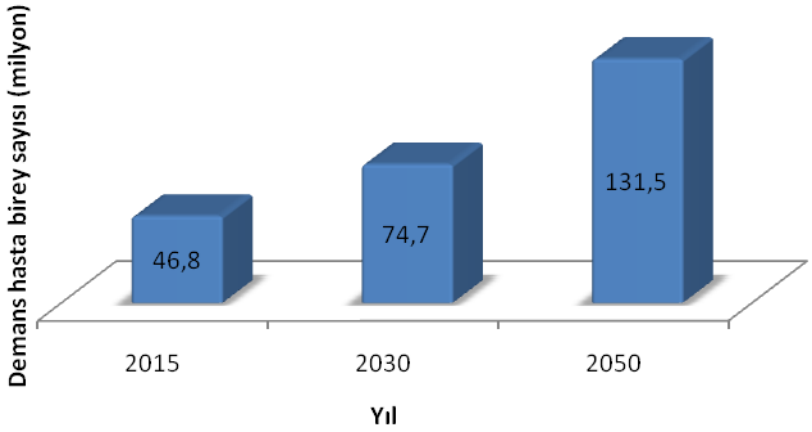
1910 yılında Alois Alzheimer'ın Münih Üniversitesi'nde birlikte çalıştığı ünlü psikiyatrist Emil Kraepelin, 'Psychiatrie' isimli kitabında Alzheimer'ın A. Deter vakasındaki temel bulgularını 'Alzheimer's disease' adıyla yayınlamasıyla bu hastalık Alois Alzheimer'ın ismiyle anılmaya başlanmıştır [45,53,54].

Alzheimer hastalığı, halen üzerinde çok sayıda araştırmacının çalıştığı, patogenezinin altında yatan nedenlerin araştırıldığı ve tedavi edici yaklaşımların geliştirilmeye çalışıldığı nörodejeneratif bir hastalıktır. Ancak hastalığın patolojisine dair ilk bulguların ortaya çıktığı zamandan günümüze kadar, hastalığın nedeni ve patogenezi net olarak açıklanamamış, etkin şekilde tedavi edici bir yöntem geliştirilememiştir [8].

2.2 Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Günümüzde dünya genelinde kentleşme, ekonomik ve endüstriyel gelişme ile birlikte yükselen hayat kalitesi sebebiyle, yaşlı popülasyon gittikçe artmakta ve demans gibi kronik hastalıkların sayısında da artış olmaktadır [12]. 2015 yılı verilerine göre dünyada demans hastası 46.8 milyon kişi bulunmaktadır ve bu sayının her 20 yılda yaklaşık iki katına çıkarak 2050 yılına gelindiğinde 131.5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Çizelge 2.1). Tüm demans vakalarının %60-80'i Alzheimer hastalığı kaynaklıdır [55].

Çizelge 2.1 Dünyadaki demans hastası bireylerin 2015 yılı sayısı ile 2030 ve 2050 yılına ait tahmini sayıları [55]



ABD Hastalık Koruma ve Önleme Merkezi verilerine göre Amerika'da 2014 yılında Alzheimer hastalığından ölen kişi sayısı 93,541'dir [56]. Türkiye'de demans vakası sayısı 2012 verilerinde 331,512 kişi olarak belirlenmiştir [57]. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı 2014 yılı verilerine göre hastanelerde 18.158 Alzheimer hastası bulunmaktadır [58]. 2008 yılında, İstanbul ili Kadıköy ilçesi baz alınarak Türkiye için yapılan çalışmada; 70 yaş üzeri görülme sıklığı %11 olarak belirlenmiştir [47,59].

Demans hasta yakınları ve toplum açısından duygusal yük anlamına geldiği gibi aynı zamanda ülke ekonomisine büyük bir yük getirmektedir. Dünya çapında 2015 yılında demans için harcanan bütçenin 818 milyar dolar olduğu bilinmekte ve bu bütçenin 2030 yılında 2 trilyon dolar olacağı düşünülmektedir [55].

2.3 Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

Sağlık açısından yıkıcı etkileri ve ekonomik yükü nedeniyle, yaşlanmakta olan toplumun önemli bir kısmını ilgilendiren Alzheimer hastalığının patogenezinin anlaşılması hastalığın önlenmesi ve tedavi edilmesinde önemli bir basamaktır. Alois Alzheimer'ın 1906 yılında ilk bulgularını saptadığı Alzheimer hastalığının patogenezi araştırmacılar tarafından ayrıntılı olarak incelenmeye devam etmektedir.

Alzheimer patogenezinde birlikte rol oynadığı kabul edilen farklı etkenlerden söz etmek mümkündür. Alzheimer hastalığının bilinen temel bulguları Aβ adı verilen protein yapılarının birikerek hücrelerarası boşlukta oluşturdukları amiloid plaklar ile tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu sonucu hücreiçi alanda oluşan nörofibriler yumaklardır [5,6,8,9,18,19,36,60,61]. Bunun yanısıra yaşlanma, sinaps kaybı [9,36], nöritlerde kısalma [36,47], nöronal hücre ölümü [9,33,36], inflamasyon [9,32,36], glutamat eksitoksisitesi [62], oksidatif stres [9,12-14,16,37,41,63,64], mitokondriyal fonksiyon bozukluğu [9,32,38], metal iyon birikimi ve genetik mutasyonlar şeklinde çok sayıda faktör Alzheimer'ın patogenezinde etkilidir [35,63]. Ayrıca Alzheimer hastalığında, bellek üzerinde önemli rol oynayan bir nörotransmitter olan asetilkolinin seviyesinde görülen azalma, kognitif işlev bozukluğunu beraberinde getirir [33,47,65].

APP proteolizi sırasında farklı aminoasit sayısına sahip olacak şekilde üretilen toplam Aβ miktarı bireyden bireye değişebilmektedir. Bu nedenle Aβ42/Aβ40 oranı Alzheimer tablosunda ve tanısında önemli bir tanı kriteridir [3]. Beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndaki Aβ42 düzeyi ve hiperfosforile tau seviyesi, plazmada ise Aβ42/Aβ40 oranı Alzheimer için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Fizyolojik şartlarda Aβ42/Aβ40 oranı 0.05-0.1 şeklindedir [66]. Aβ42 düzeyi beyin omurilik sıvısında azalmakta, beyinde artmaktadır [4,5,25]. Alzheimer hastalarında beyin omurilik sıvısında Aβ40 düzeyi sabittir [25]. Hiperfosforile tau seviyesi BOS'da, Aβ42/Aβ40 oranı ise plazmada yüksektir [19]. Alzheimer hastası bireylerin plazmasında inflamatörle ilişkili olarak interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör-α (TNF-α) düzeyleri de yüksek bulunmuştur [4]. Ayrıca bir risk faktörü olan apoE geninin ε4 allelinin varlığı da tanıda önemli bir veridir [67].



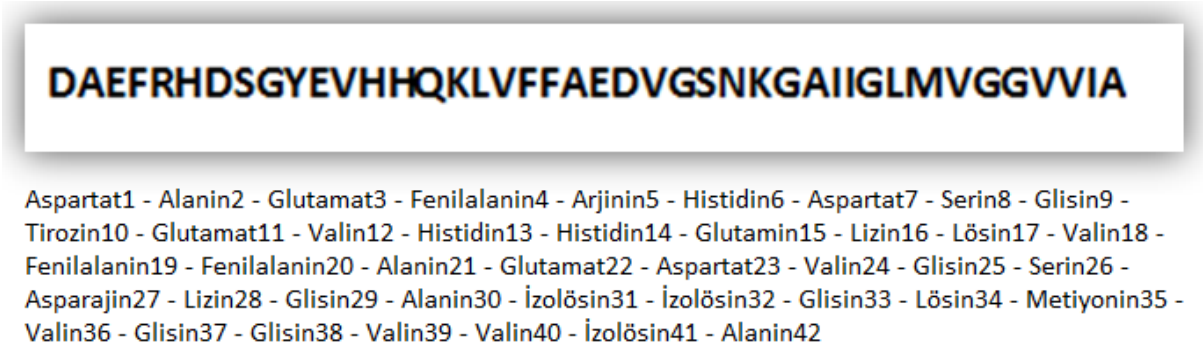
Şekil 2.1 Alzheimer patofizyolojisi

2.3.1 Amiloid Plak Oluşumu

Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde hatalı katlanmış proteinlerin sitoplazmada meydana getirdiği agrege yapıların önemi bilinmektedir. Alzheimer hastalığında bu protein Aβ'dır [14, 32].

Alzheimer hastalığının patogenezinde geçerliliğini uzun yıllardır koruyan en önemli hipotez 'amiloid kaskad hipotezi'dir [13,15,20,24,35,68,69]. 1992 yılında Hardy ve Higgins tarafından ortaya atılan bu hipoteze göre Alzheimer'a yol açan ana etken; beyinde hücreler arasında, nöronal endoplazmik retikulum [9,28,70-72], golgi aygıtı ve endozomal-lizozomal birimlerde biriken [9] Aβ'nın, agrage olarak amiloid plak adı verilen yapıları oluşturmasıdır [13,24,66,67,69,73]. Ancak Aβ birikimine neden olan mekanizmalar açıkça anlaşılamamıştır [13]. Bu hipotezde nörofibril yumaklar ve nöronal kayıplar Aβ'ya bağlı olarak gelişen bulgular olarak değerlendirilmiştir [13,63,67].

Aβ; 4 kDa boyutunda, 39-43 aminoasit uzunluğunda değişebilen, monomerik, oligomerik, protofibriler ve fibriler yapılarda bulunabilen ve sahip olduğu kendi-kendine biraraya gelme özelliği sebebiyle agrega olabilen proteinlerdir [6,9,10,18,61].



Şekil 2.2 Aβ42 aminoasit dizisi [74]

Aβ, sağlıklı bireylerde beyinde ve beyin omurilik sıvısında çözünür halde, agrege olmuş halde ve membrana bağlı şekilde bulunabilmektedir [13,17,33,66,73,75]. Agrage haldeki Aβ'ya, beynin özellikle hipokampus ve serebral korteks bölümlerinde rastlanmaktadır [23]. Aynı zamanda Aβ *in vitro* koşullarda hücre kültürü besi ortamına salınmaktadır [10,33].

Alzheimer hastalığının gelişiminde, beyinde normal bireylerden daha yüksek düzeyde Aβ olduğu ve bu proteinlerden meydana gelen amiloid plakların varlığı histopatolojik çalışmalarda tespit edilmiştir [35,45].

Aβ; beyinde diffüz, kompakt ve nöritik (senil) plak adı verilen farklı özellikte üç tür plak oluşturabilir. Toksisitesi diğer plaklara göre daha az olan, amorf ve küresel yapılı diffüz plaklar; sağlıklı bireylerde ve Alzheimer hastalarında yaşlanmaya bağlı olarak meydana gelebilmektedir. Diffüz plakların çevresindeki nöronlarda hasar yoktur [13,76]. Aβ oluşumuna eşlik eden süreçte oksidatif stresin yer alması amiloid plakların toksik karakter gösteren kompakt plak adı verilen yapılara dönüşümünü sağlar. Aβ'ya ek olarak nörofibriler yumakların, fonksiyonunu yitirmiş nörit, mikroglia ve astrositlerin, birarada bulunduğu plaklar nöritik (senil) plaklardır. Alzheimer hastası bireylerde kompakt ve nöritik plaklar yoğunluktadır [13,31,47,76]. Amiloid plaklarda Aβ ile birlikte glikozaminoglikanlar, apoliprotein E (apoE), kolajen ve metal iyonları bulunabilmektedir. Ayrıca plak miktarı ile bilişsel zayıflık arasında doğrusal bir ilişki söz konusudur [13].

Aβ, proteolitik enzimlerin bulunduğu özellikle golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve endozomal-lizozomal organellerde APP adı verilen öncül bir proteinin proteolizi ile

üretilmekte ve sinapslardan hücrelerarası boşluğa taşınmaktadır [1,6,9,18,77,78]. Aβ nöron dışında fibroblastlardan da salgılanabilmektedir. Salgılandıktan sonra lizozomal veziküller aracılığında ileri glikozillenme son ürünleri reseptörleri (RAGE) veya membran kanalları ile hücre içine alınabilmektedir [67,79].

Alzheimer'lı beyinde Aβ birikiminde; Aβ üretimi, klirensi ve agregasyonu arasındaki denge önemlidir [1,13,20,23,24]. Aβ'nın %90'ı kan-beyin bariyeri tarafından beyinden uzaklaştırılmaktadır [13]. Proteolitik enzimler olan neprilsin enzimi, insülin degrade edici enzim (IDE), apoE, endotelin dönüştürücü enzim ve anjiyotensin dönüştürücü enzimin yanısıra proteozom aktivitesi, matriks metalloproteinazlar ve otofaji yoluyla Aβ klirensi gerçekleştirilmektedir [3,28,33,36,52]. Neprilsin enzimi monomerik Aβ dizisinin hidrofobik amino ucundan keserek işlev görmektedir. ApoE ise Aβ'ye bağlanarak konformasyonel değişime uğratmakta ve bu şekilde Aβ'nın klirensini hızlandırmaktadır [23].

Fizyolojik koşullarda beyin omurilik sıvısındaki Aβ yaklaşık 15 dakikada ortadan kaldırılmakta iken, artan yaş ile birlikte Aβ klirensinde zayıflama olmakta, beyinde artan metal konsantrasyonu ile birlikte Aβ düzeyi artmakta, yüksek derecede metal bağlı Aβ oluşmaktadır [23,77].

Nörodejeneratif hastalıklarda merkezi sinir sisteminde yeterli düzeyde otofaji yapılamamaktadır. Otofagozom oluşumu, otofagozom ile lizozomun birleşmesi ve otofagozomun lizisi bozulmuştur. Bu nedenle Aβ oluşumu ve klirensi arasındaki denge sağlanamaz hale gelmekte ve fagositozla uzaklaştırılamayan bu yapılar hücreler arasında birikmektedir. Ayrıca, oluştuktan sonra lizozom ile birleşemeyen otofagozomlar Aβ için bir depo görevi görebilmektedir [32].

Alzheimer'da apoptozis yolağında etkili proteinlerden kaspaz ailesi, p53, bax ve c-jun proteinlerinin düzeyinde artış olduğu saptansa da, apoptozise dirençli hale gelmiş post-mitotik nöronların varlığı hasarlı hücresel bileşenlerin ve Aβ'nın birikerek arttığı göstermektedir [3,32,52].

Aβ'nın fizyolojik olarak uzaklaştırılmasını sağlayan mekanizmaların yetersiz kalması ya da Aβ üreten yolağın aktivasyonunda artış olması, bu proteinin beyinde miktarının artmasına neden olmaktadır [6,8,28,80]. Fazla miktardaki Aβ'nın uzaklaştırılması

zorlaşacağından bu proteinler agregasyon ile biraraya gelerek hücreler arasında amiloid plakların merkezini oluşturmaktadır.

Aβ'nın oluşmasına neden olan APP, 21. kromozomda kodlanan, periferik ve merkezi sinir sisteminde nöronal membranlarda ifadelenen, 695-770 aminoasit uzunluğunda, bir integral tip I transmembran proteinidir [9,13,23,29,65,81,82]. Aminoasit uzunluğuna göre APP695, APP751 ve APP770 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır [13,22,23,36,81]. Nöronlarda özellikle APP695 izoformu ifade olmaktadır [66]. Kapsamlı işlevi anlaşılamamış olan bu öncül proteinin; hücre büyümesi, miyelinasyon, nöronal sağkalım, sinaps fonksiyonu, hücresel adezyon, akson oluşumu, anjiyogenezis, göç, apoptozisin düzenlenmesi ve nörit uzatımında görevli olabileceği düşünülmektedir [3,14,15,18,22,25,32,66,81-83]. Aynı zamanda APP'nin N-terminal bölgesinde metal bağlayıcı domainleri bulundurduğunun anlaşılmasıyla metal iyonlarının taşınmasında ve metal homeostazisinde rol oynadığı varsayılmaktadır [6,13,18,34,40].

APP, üç farklı sekretaz enzimi (α, β ve γ) tarafından proteolitik yıkıma uğratılmaktadır. Bu süreçte yer alan sekretaz enzimlerinin türüne bağlı olarak açığa çıkan son ürünler değişmektedir. Üretilen son ürünler arasında Alzheimer patogenezinden sorumlu tutulan Aβ proteinleri de bulunmaktadır. Bu nedenle proteolitik yıkım sonucu oluşan ürünlerin amiloidojenik karakter gösterip göstermemesine bağlı olarak APP'nin yıkıma uğratıldığı iki farklı yolaktan söz edilebilir [1,8,9,14,24,40,65,82]. Bu yolaklar 'amiloidojenik olmayan yolak' ve 'amiloidojenik yolak'tır. Her iki yolak Alzheimer hastası olmayan sağlıklı bireylerde de gerçekleşmektedir, ancak Alzheimer patolojisi durumunda amiloidojenik yolak aktivitesi daha yüksektir [13,35]. Ayrıca APP'nin büyük çoğunluğu amiloidojenik olmayan yolakta ilerlerken; yaşlanma ya da genetik mutasyonlar ile bu iki yolakta yer alan sekretaz enzimlerinin aktivite düzeylerinde meydana gelen değişimler, APP'nin ilerleyeceği yolağı etkileyebilmektedir [4,7,14].

2.3.1.1 Amiloidojenik Olmayan Yolak

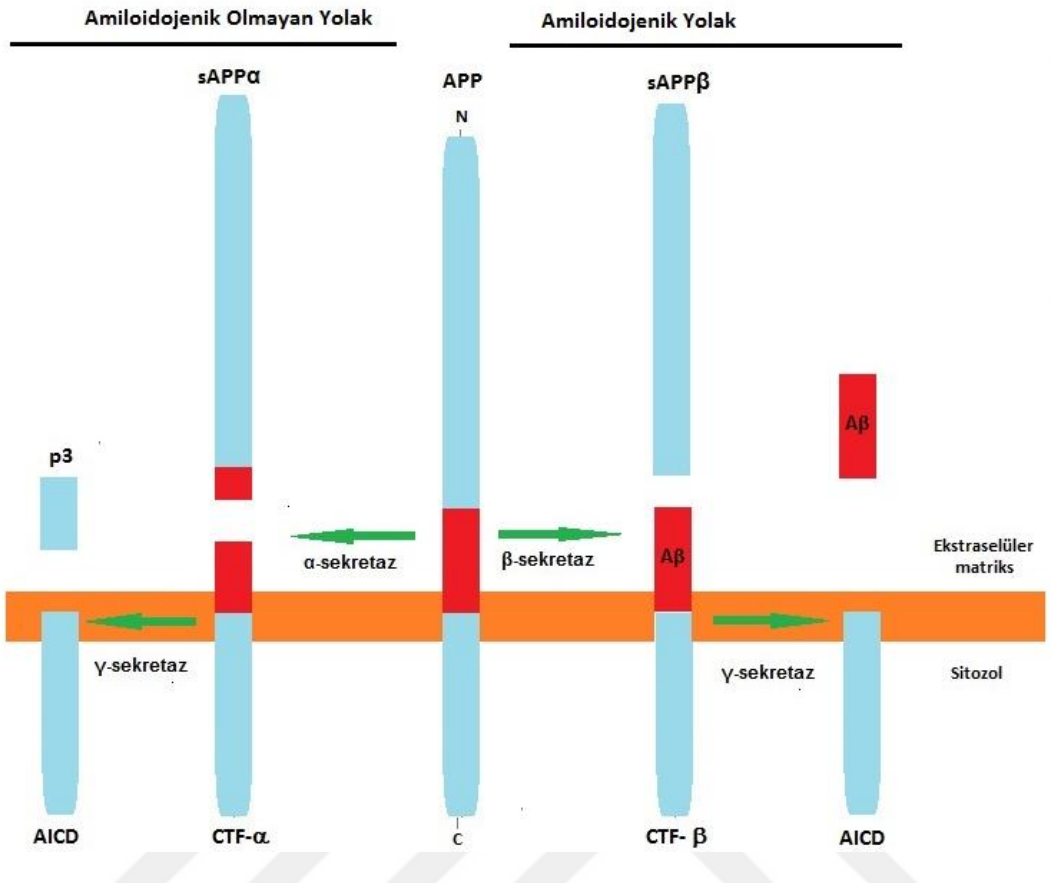
Amiloidojenik olmayan yolakta APP'nin yıkımından sorumlu sekretaz enzimleri α-sekretaz ve γ-sekretazdır (Şekil 2.3).

İlk olarak; APP, membrana bağlı olan bölgenin 12 aminoasit uzaklığındaki pozisyondan α-sekretaz tarafından kesilir ve çözünebilir APPα (sAPPα) olarak adlandırılan bir parça ile 83 aminoasitlik membrana bağlı C-terminal parçası-α (CTF-α, C83) açığa çıkar. [9, 14,22,25,52,63,81]. Ardından CTF-α'nın γ-sekretaz enzimi ile kesilmesi sonucu p3 parçası ve membrana bağlı kısım olan amiloid öncül protein hücreiçi bölgesi (AICD) adı verilen bir parça ortaya çıkar. Oluşan bu parçalar herhangi bir toksik özellik ya da amiloidojenik karakter göstermediğinden bu yolağa 'amiloidojenik olmayan yolak' adı verilmiştir [9,14,22,25,52,63,81,82].

sAPPα'nin kan pıhtılaşması ve potasyum kanallarının işleyişinde görevli olduğu ve nörokoruyucu olabileceği, AICD'nin hücre sinyalleşmesi, hücre ölümü ve transkripsiyonda rol oynadığı düşünülmektedir [22,23,25].

Amiloidojenik olmayan yolakta α-sekretaz enziminin APP kesim bölgesi, Aβ protein dizisinin iç bölgesine rastlamaktadır. Dolayısıyla Aβ'yı oluşturan dizi, kesim sonrasında birbirinden ayrılmış olur ve Aβ türlerinin açığa çıkması önlenmiş olur [23,36,66,83].

α-sekretaz aktivitesine sahip olan enzimler; biri tümör nekrozis faktör-α dönüştürücü enzim (TACE) olan distegrin metalloproteinaz (ADAM) ailesi üyeleridir. [23,36,83]. Bu enzimler hücre yapışması ve sinyalleşmesinde de görev aldıkları gibi, aktivitelerinin metal iyon bağımlı olması metallerin Alzheimer'daki önemini göstermektedir. Alzheimer hastası beyinde disintegrin metalloproteinaz seviyesinde azalma saptanmıştır [23].



Şekil 2.3 APP'nin amiloidojenik olmayan ve amiloidojenik yolak gösterimi [9,66,67]

2.3.1.2 Amiloidojenik Yolak

Amiloidojenik yolakta APP'nin yıkımından β-sekretaz (BACE-1) ve γ-sekretaz enzimleri sorumludur (Şekil 2.3).

APP, diğer yolaktan farklı olarak, başlangıçta β-sekretaz tarafından yıkıma uğratılır [8,13,22,29,83]. BACE1, APP'yi N-terminal ucundan 671. aminoasitten keser [8,25]. Bunun sonucunda çözünebilir APPβ (sAPPβ) olarak adlandırılan bir parça ve 99 aminoasitlik, membrana bağlı C-terminal parçası-β (CTF-β,99) adı verilen bir parça ortaya çıkar. Ardından CTF-β'nın transmembran bölgesinden γ-sekretaz ile kesilmesi sonucu membrana bağlı AICD parçası ve 39-43 aminoasit uzunluğunda Aβ protein yapıları meydana gelir [8,14,22,29,52,82].

γ-sekretaz enziminin APP'yi farklı aminoasit pozisyonlarından kesebilmesinden dolayı farklı uzunluklarda Aβ üretilmektedir [3,8,9,13,83]. Amiloidojenik yolakta %80-90 oranında Aβ40 oluşurken, %5-10 oranında Aβ42 oluşmaktadır [13]. Oluşan Aβ proteinleri nedeniyle bu yolak amiloidojenik yolak şeklinde adlandırılmıştır [9].

sAPPβ aksonal transortu bozarak hücresel ölüm meydana getirir [25]. C99 parçasının ise asetilkolinesteraz aktivitesinde etkili olduğu düşünülmektedir [22].

BACE1 enzimi transmembran aspartil proteaz enzimdir ve nöronlarda yüksek aktiviteye sahiptir. APP ve BACE1 nöronal membranda birbirine yakın bölgelerde yer almaktadır [23]. APP bakımından transgenik olan ve olmayan SH-SY5Y hücrelerine BACE1 ve γ-sekretaz inhibitörleri uygulanarak gerçekleştirilen araştırmada; BACE1 inhibitörünün iki hücre türünde de Aβ düzeyinde azalma sağlarken, γ-sekretaz ile birlikte kullanıldığında etkisiz kaldığı belirlenmiştir [84]. Dolayısıyla BACE1 aktivitesi Aβ oluşumunda önemli bir yer teşkil ederken, APP proteolizinde farklı etkenler birarada işlev yapmaktadır.

Sağlıklı bir beyinde, beyin omurilik sıvısında ve plazmada bulunan Aβ'nın büyük çoğunluğu (%90) ana çözünür form olan 40 aminoasit uzunluğundaki Aβ40'dır. 42 aminoasit uzunluğundaki Aβ42 ise biyolojik sıvılarda daha az bulunmaktadır [7,9,10,13,22,25,83]. Ancak Aβ42, Aβ40'a göre, kendiliğinden oligomer yapıyı oluşturmada daha hızlı agrege olma ve daha fazla fibrile olma eğilimindedir, hidrofobikliği ve redoks aktivitesi daha yüksektir, bu nedenlerle Aβ42 daha toksik karakterdedir [3,8,24,67,80,83]. Ayrıca amiloid plaklar farklı uzunlukta Aβ içerse de, Aβ42 peptitleri plakların merkezini oluşturmaktadır [13].

2.3.1.3 Amiloid-β'nın Alzheimer Hastalığındaki Rolü

Aβ, sahip olduğu pozitif yüklü arjinin5, lizin16 ve lizin28 aminoasitleri ile negatif yüklü olan hücre membranlarına bağlanabilir [15,22]. Mitokondriyal membranlara yerleşebilen Aβ; mitokondriyal işlev bozukluğuna, mitokondriyal proteinlerle etkileşerek elektron transfer sisteminde aktivasyon kaybına, membran depolarizasyonuna, enerji üretiminde azalmaya, toksinlere karşı hassasiyete, kalsiyum homeostazisinde bozulmaya, oksidatif strese, lizozomal aktivite kaybına, glutamat reseptör aktivitesinde değişikliğe, inflamasyona, öğrenme ve hafıza için önemli olan

uzun dönem potansiyelizasyonda azalmaya, sinaps kaybına, nöronal ölüme ve nörofibriler yumak oluşumuna yol açmaktadır [15,17,20,27,28,30,33,36,42,78].

Aβ'nın en önemli özelliklerinden biri kendiliğinden agrege olabilmesidir. APP proteolizi ile üretilen Aβ monomerleri sinaptik uçlarda kolayca oligomerik yapı kazanır. Aβ yapıları arasında oligomerik formun diğer formlardan daha toksik olduğu anlaşılmıştır ve toksisitesi bilişsel faaliyetlerdeki bozulma ile ilişkilidir [8,9,13,14,28,29,31,40,85]. Oligomerik Aβ; hücresel organellerin membranından geçerek fonksiyonel özellikleri etkileyebilir, sinyal yolaklarını bozarak reaktif oksijen türleri üretebilir, kalsiyum homeostazisinde bozulmaya yol açabilir, mitokondriyal membran potansiyelinde ve sitokrom c oksidaz aktivitesinde azalmaya neden olarak kaspaz bağımlı apoptozisi başlatabilir ve kinaz aktivasyonunu etkileyerek nörofibriler yumak oluşturabilir, glutamat eksitoksisitesini başlatabilir [14,17,20,26,29,32,52,60,65,78,86-88]. Aβ42 oligomerleri ROS üretimini başlatan α-heliks yapıyı kazanabilmekte, nöronal ve glial membranların lipit çift tabakasını kat edebilmektedir [9,25,71]. Üretilen serbest radikaller β-sekretazı uyararak amiloidojenik yolak aktivitesini arttırmaktadır [9]. Artan Aβ42 birikimi hücre içi sinyalleşmeyi bozarak nöronal hücre kaybı meydana getirir ve bilişsel faaliyetlerde bozulmaya neden olur [8].

Kalsiyum iyonları; nörotransmitter salınımında, sinyalleşmede, gen transkripsiyonda, apoptozisin düzenlenmesinde görevlidir. Ancak kalsiyum iyonlarının metabolizmadaki işlevlerini yerine getirebilmesi, homeostazisinin sağlanmasına bağlıdır. Kalsiyum homeostazisinin bozulması; serbest radikallerin oluşumu, membran protansiyelinde düşüşe bağlı sitokrom c oksidazın sitozole salınması ve kaspazların aktivasyonunu sağlayarak hücresel ölümü tetikleyen mekanizmaları başlatır [15,52].

Nöron membranına tutunarak birikmeye başlayan Aβ, metal iyonlarının ve üretilen serbest radikallerin de etkisiyle membranda hasar meydana getirerek Ca^{+2} iyonlarının geçişine izin veren kanallar oluşturur [15,22]. Aβ, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz aktivasyonunu uyararak kalsiyum homeostazisini bozabilir ve bu etki insan nöroblastoma hücrelerinde de görülmektedir [15,17,22,52,78]. Kalsiyum bağlayan proteinlerin *in vitro* koşullarda Aβ toksisitesini önleyici etkide bulunması ise, aşırı Ca^{+2} iyonlarının Aβ oluşumunu desteklediğini göstermiştir [15,52].

Alzheimer patolojisinde bir risk faktörü olan apoE, NDMA reseptörleri aracılığında Ca^{+2} akısını değiştirebilmektedir [15]. Aβ, glutamat reseptörlerini aktive ederek glutamat eksitoksisitesine zemin hazırlamaktadır [17,22,52,78]. Aβ40 ve Aβ42 kalsiyum iyon metabolizmasının yanında potasyum homeostazisini de etkilemektedir[3,15].

Tau proteinlerini fosforile eden Ca^{+2} bağımlı protein kinaz II enzimi, kalsiyum homeostazisindeki değişimden etkilenir ve tau fosforilasyonunu arttırabilir [15].

Sinapslarda bakır ve çinko iyonları yoğun konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Aβ'nın metallerle oluşturduğu kompleksler sonucu agregasyona eğilimi de artmaktadır. Bu bilgiler ışığında; Aβ'nın ilk birikme yerleri sinapslardır [27].

2.3.2 Nörofibriler Yumak Oluşumu

Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ile oluşan nörofibriler yumaklar Alzheimer'ın patogenezindeki diğer patolojik bulgudur [36].

Tau proteini; 17. kromozomda kodlanmakta ve mikrotübül ağ boyunca yer alarak ağın dayanıklılığını arttırmaktadır [10,21,35,36,65]. Ayrıca tau proteini aksonal taşıma işlevinde de yer almaktadır [21,35,36].

Tau proteinlerini hiperfosforile eden enzimler hiperaktif kinazlar ve hipoaktif fosfatazlardır [36]. Hiperfosforile olan tau proteinlerinin mikrotübül ağa affinitesi azalmaktadır [21,35]. Sonuç olarak; mikrotübül ağ bozulmakta ve hiperfosforile tau proteinleri, çözünemeyen nörofibriler yumak adı verilen yapıları meydana getirmektedir [21,33,35,52]. Aksonal ve dendritik hücreiçi alanlarında meydana gelen NFY'ler; hücre yapısında bozulmalara neden olmaktadır. Biriken NFY'ler hücreyi parçalamaktadır; bu durum sinaps kaybı, nöronal işlevlerde aksama ve nöronal ölüm anlamına gelmektedir [10,36].

Alzheimer hastalığında, nöronal gelişimde rol oynayan bir enzim olan siklin bağımlı kinaz-5 (CDK5)'in hiperaktivasyonunu nedeniyle tau proteinlerinin hiperfosforile olduğu ileri sürülmektedir [28,35,78].

Aβ birikimi ile NFY birbiri ile ilişkilidir. Aβ ile NFY birbirini destekleyerek Alzheimer patogenezini oluşturmaktadır. Buna göre; Aβ oligomerleri sinyal yolaklarını etkileyerek

tau proteinleri fosforile eden enzimlerden CDK5, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK3β), mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ve protein kinaz C'ın etkinliğini arttırabilmektedir [8,28,78]. CDK5 nöroblastoma hücrelerinde nörogeneziste önemlidir [8,78].

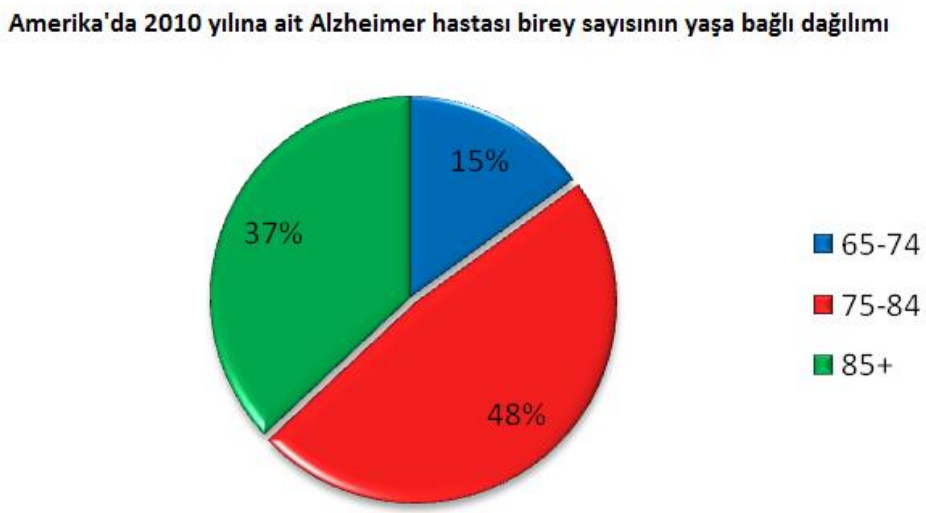
2.4 Risk Faktörleri

Alzheimer hastalığının önlenmesinde hastalık patogenezinin anlaşılması kadar hastalığa neden olan faktörlerin bilinmesi de önem taşımaktadır.

Alzheimer hastalığında yaşlanma önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir [1,8,9,20]. Hayat kalitesinin artışıyla birlikte ortalama yaşam süresinin uzaması sonucu demans vakaları dünya genelinde daha sık rastlanır hale gelmiştir. Demansın en sık nedeni olan Alzheimer hastalığı, diğer nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi yaşlı popülasyonun karşılaştığı ciddi bir sorundur [12,13,45,50]. Alzheimer hastalığının görülme sıklığı yaşa bağlı olarak değişmekte ve 65 yaş üzerindeki bireylerde risk, her beş yılda yaklaşık olarak iki katına çıkmaktadır [13,45,47,50]. Alzheimer hastalığına yakalanma riski 80 yaş ve üzerinde %50 oranına varmaktadır [89].

Çizelge 2.2'de 2010 yılında Amerika'da 65 yaş üzeri Alzheimer hastası olan bireylerin önemli bir çoğunluğunun 75-84 yaş aralığında olduğu görülmektedir [90]. Türkiye için de 70-84 yaş aralığı Alzheimer'ın en sık görüldüğü yaş aralığıdır [58]. Ancak aynı yaş grubundaki tüm bireylerde Alzheimer görülmemesi; yaşın tek başına risk faktörü olmadığını, diğer etkenlerle birlikte etkili olduğunu göstermektedir.

Çizelge 2.2 Alzheimer epidemiyolojisi [90]



Yaşlı bireylerde oksidatif stres hasarları yüksektir [14,34,64]. Mitokondride elektron transfer sisteminde yer alan ve ROS üretiminde etkili olan kompleks 1'deki (NADH dehidrogenaz) aktivite kaybı yaşlanma ile belirgin hale gelir ve bu nedenle yaşlandıkça oksidatif stres artmaktadır [14]. Yaşlanma ile birlikte meydana gelen; mitokondriyal DNA mutasyonları, mitokondriyal işlev bozukluğu, enerji üretiminde aksama, sitokrom c oksidaz aktivitesinde azalma, sinaps kaybı ve sinyal iletiminde yavaşlama Alzheimer hastalarında da görülür [9,64,65]. Artan yaş ile birlikte, oksidatif stresin de bir sonucu olarak Aβ üretiminde rol oynayan BACE1 aktivasyonunda artış olmaktadır [9,14]. Doğal yaşlanma sürecinde toplam Aβ miktarında artış meydana gelmektedir, ancak Alzheimer hastalığının normal yaşlanmadan farkı bu birikimin çok hızlı meydana gelmesi ve Aβ42 ağırlıklı olmasıdır [3].

Alzheimer hastalığında diğer risk faktörü cinsiyettir. Alzheimer'da cinsiyet faktörünün rolü tartışmalı olmaya devam etmekle birlikte hastalığın görülme sıklığının kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [7,47,52,91]. Bunun nedeni; kadın ve erkeklerin beyin fonksiyonlarındaki farklılık, kadınlarda menopoz sonrası hormonal değişim ve östrojen konsantrasyonunda azalma etkili olabilir [7]. Östrojen amiloidojenik olmayan yolakta yer alan α-sekretaz aktivasyonunu desteklemekte ve antioksidan işleve sahip glutatyon enzimi ile birlikte hücresel savunmada yer almaktadır [23,92]. Menopoz sonrası dönemde östrojen takviyesi alan

kadınlarda Alzheimer belirtilerinde yavaşlama görülmüştür [52,92]. Türkiye'deki hastanelerde bulunan, kayda geçmiş Alzheimer hastası 18.158 bireyin %43,6'sı erkek ve %56,4'ü kadındır [58]. Östrojenin *in vitro* koşullarda etkisinin incelendiği bir araştırmada; SH-SY5Y hücrelerinde ağır metallerin uyardığı sitotoksisite, oksidatif stres koşulları ve Aβ salımını, bir östrojen türü olan β-estradiol molekülleri hafifletebilmiştir [92].

Alzheimer'ın görülmesinde genetik yatkınlık önemli bir risk faktörüdür. Aile öyküsünde Alzheimer hastalığı bulunan bireylerde hastalığın görülmesi diğer bireylere kıyasla yüksektir [45,50,89,93].

Aβ üretiminde yer alan protein ve enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar Alzheimer patogenezini moleküler düzeyde etkileyebilir. Alzheimer hastalığı %5-10 oranında ailesel (FAD), büyük bir çoğunlukta ise sporadik olarak görülmektedir [7,13,16,33,47]. 65 yaşından daha erken yaşta görülmekte olan ailesel Alzheimer'da Aβ üretiminde yer alan APP ve sekretaz enzimlerini kodlayan genlerde, 14. kromozomda yer alan presenilin-1 (PS-1) ve 1. kromozomda yer alan presenilin-2 (PS-2) genlerinde meydana gelen 160'dan fazla sayıdaki mutasyonların, Aβ birikimini arttırdığı anlaşılmıştır [6,13,17,20,22,28,33,35,47,49,60,65,80,83].

γ-sekretaz enzimi; presenilin, nikastrin, Aph-1 ve Pen-2 integral membran proteinlerinden oluşan bir komplekstir [8,13,36,83] ve bu altbirimlerdeki mutasyonlar Aβ40 üretimini azaltırken Aβ42 üretimini arttırmaktadır [7,83]. APP ve PS1 genlerindeki mutasyon γ-sekretazın proteolitik yıkım modelini, dolayısıyla amiloidojenik ve amilodojenik olmayan karakteri değiştirebilmektedir [23,25,36]. PS-1 mutasyonunda otofajinin inhibe olduğu, bu inhibisyonun γ-sekretaz aktivasyonunu arttırıcı yönde etki yaparak Aβ birikimini yükselttiği saptanmıştır [3,32]. APP geninde tespit edilmiş 32 mutasyonun çoğu Aβ42/Aβ40 oranını arttırmaktadır ve bu artış plak oluşumu ve nörodejenerasyonu desteklemektedir [13,83,94]. β-sekretaz aktivitesinden sorumlu BACE1 geninin mutasyona uğraması da Alzheimer riskini arttırmaktadır [7]. APP genindeki mutasyonlar; β-sekretaz etkinliğini arttırıcı yönde etkide bulunarak Aβ42 düzeyini doğrudan etkileyebileceği gibi, doğrudan Aβ42 üretimini arttırıcı özellikte de olabilir [35].

Alzheimer'da 19. kromozomda yer alan apoE alleli ciddi bir risk faktörüdür [13,36,47,52,95]. Fizyolojik görevi nöron membranları için fosfolipit ve kolesterol üretimi ve taşınması olan apoE proteini, γ-sekretaz aktivitesini etkileyebilmektedir [32]. Mikroglial hücrelerde bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ilişkili reseptör, apoE'ye bağlanarak Aβ üretimini arttırabilmektedir [30,61]. apoE proteinini kodlayan genin 4 farklı alleli (ε1, ε2, ε3, ε4) bulunmaktadır. Bu allellerden ε4 alleli oranındaki artış Alzheimer riskini 2-3 kat arttırmaktadır [7,35,50,65,83,91]. Bunun aksine ε2 allelinin artışı riski azaltabilmektedir [7,35,83]. ε4 alleli, Aβ ile diğer allellere göre daha kolay bağlanabilmekte; Aβ üretimi, dağılımı ve klirensinde etkili olabilmektedir [23,83]. Ayrıca ε4 allelinin oksidasyona diğer allellere göre daha hassas olması, oksidatif stres ve Alzheimer arasındaki ilişkiyi güçlendirmektedir [64,88].

Genetik yatkınlık Alzheimer gelişiminde önemli bir unsur olarak kabul edilse de mutasyonların olmadığı durumda da Alzheimer gelişimine rastlanılması; genetik yatkınlığın tek başına yeterli olmayıp metaller, solventler, toksik ajanlar, pestisitler, diyet, yaşam tarzı, inflamasyon, oksidatif stres gibi diğer çevresel faktörlerle birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir [7,32].

Down sendromu, obezite, kafa travması, alkol alımı, diyabet, enfeksiyonlar, vasküler hastalıklar, sigara kullanımı ve depresyon Alzheimer hastalığının diğer risk faktörleri arasında sayılabilir [3,4,7,13,32,33,45-48,50-52,64,91,93,96].

21. kromozomda trizomi hali olan Down sendromunda; hastalarda 21. kromozomda kodlanmakta olan APP transmembran proteini normalden fazladır ve bu proteinin öncülüğünde üretilen Aβ seviyesi yüksektir [7,35,37,81].

Hiperinsülinemia durumunda ise, insülin Aβ'nın klirensinde yer alan IDE enzimini inhibe edebilir ve Aβ birikiminde artış sağlayabilir [21,48]. Aβ ile insülin IDE enzimi için yarışmalı haldedir. İnsülin artışı durumunda; enzime bağlanan insülin artarken, Aβ'nın bağlanması için yeterli düzeyde enzim kalmayacak ve Aβ düzeyi, klirensi yapılamadığı için artacaktır. Bu nedenle diyabet Alzheimer için bir risk faktörü olarak görülmektedir [4,39,42,97]. Diyabet hastası bireylerin plazmasında bakır seviyesi de yüksektir [98].

Alzheimer hastası bireylerde homosistein düzeyi yüksek iken, folat düzeyi düşüktür [89,96]. Bu nedenle homosistein ve folat düzeyleri de risk faktörleri olarak

değerlendirilmiştir [91]. Homosistein oksidatif stres ve inflamatuar yanıtları aktive ederek nöronal hasara yol açmakta, metal aracılı LDL oksidasyonunu desteklemektedir [96,98]. Primer nöron kültürüne homosistein ve bakır iyonları birlikte uygulandığında homosisteinin bakır iyonlarını indirgeyerek H_2O_2 ürettiği ve metal toksisitesine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır [99].

Bir tür kardiyovasküler rahatsızlık olan hipoperfüzyon; CDK5'in aktivasyonunu destekleyerek tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunu arttırmaktadır. Hipertansiyon ise kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini değiştirerek hücresel hasar ve apoptozisin yanısıra kognitif etkinlikte azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle kardiyovasküler hastalıklar Alzheimer için bir risk faktörüdür [4].

Vasküler hastalıklarda önemli rolü olan kolesterol ise membranal lipit yığınları içinde bulunarak APP ile β-sekretazın hücre membranında aynı bölgede yer almasını önlemekte ve bu şekilde koruyucu etki yapmaktadır [4]. γ-sekretaz kolesterol bağımlı bir enzimdir. Ayrıca kolesterol yetersizliği durumunda APP'nin β-sekretaz ile proteolize uğraması artmaktadır [3,83].

Sigara dumanında çok sayıda lipit peroksidasyon ürünleri bulunmaktadır. Sigara dumanı solunması halinde hücresel seviyede oksidatif stres artar, inflamasyon ve immün sistemler devreye girer. Ayrıca kardiyovasküler hastalıkların oluşması için de zemin hazırlar. Bu açıdan değerlendirildiğinde; sigara oksidatif strese ve vasküler hastalıklara neden olduğunda, Alzheimer için bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir [4].

Düşük eğitim düzeyi de Alzheimer için bir diğer etken olarak değerlendirilmektedir [32,47]. Eğitim seviyesi yüksek bireylerde Alzheimer daha az görülmektedir. Ancak Alzheimer gelişiminde eğitim düzeyinin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır [47].

Alzheimer hastalığında en önemli risk faktörü oksidatif strestir. Oksidatif stres mitokondriyal hasar, sinaptik kayıp, nöronal kayıp ve bilişsel bozukluk ile ilişkilidir [9,41]. Alzheimer'da oksidatif stresin oynadığı role ilişkin çeşitli kanıtlar mevcuttur. Serbest radikal üretebilen ve Aβ oluşumunu destekleyen metal iyonlarının birikimi; serebral korteksteki çoklu doymamış yağ asitleri düzeyindeki azalış; glutamin sentaz

enzim aktivasyonunda düşüş; DNA, RNA, protein, karbonhidrat ve lipitlerin oksidasyonuyla oluşan ürünlerinin artışı; mitokondriyal solunum zincirinde meydana gelen fonksiyon bozuklukları; enerji üretiminde azalış; sitokrom c oksidazın sitozole salınması; hücreiçi Ca^{+2} düzeyinde artış; kaspaz aktivasyonunda artış ve apoptozisin desteklenmesi; süperoksit dismutaz (SOD) enzim düzeyinde artış; nörofibril yumaklarda ve amiloid plaklarda ileri glikozilenme ürünlerinin birikimi ve inflamatuar yanıtların varlığı Alzheimer patolojisinde oksidatif stresin etkileridir [11,37,43,60,65,88,100].

Oksidatif stresin Alzheimer hastalığının patolojik bulgularının ortaya çıkmasından daha önce etkin olduğunu; Alzheimer patolojik tablosundan daha önceki evre olan hafif kognitif bozukluk (MCI) hastalarında görmek mümkündür. Aynı yaş grubundaki sağlıklı bireylere kıyasla MCI hastalarının fizyolojik sıvılarında lipit peroksidasyon ürünlerine, beyinde ise protein oksidasyon ürünlerine rastlanılmış ancak Aβ ya da NFY tespit edilememiştir. Ayrıca enzimatik antioksidan sisteminde zayıflama olduğu saptanmıştır. Buna göre Aβ ve NFY oluşmamış olsa da oksidatif stres Alzheimer başlangıcı bir tabloyu doğurabilmektedir [37].



Şekil 2.4 Aβ birikimi ve agregasyonuna yol açan Alzheimer risk faktörleri

2.4.1 Oksidatif Stres

Oksidatif stres; serbest radikal üretimi ile serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran antioksidan kapasite arasındaki dengenin serbest radikaller lehine dönmesi sonucu gelişen bir durumdur [21,25,30,31,37,39,42,101,102]. Fizyolojik şartlarda oksidatif denge sıkı bir şekilde kontrol edilirken; patolojik koşullarda denge korunamaz hale gelir ve antioksidan savunma sisteminin gideremeyeceği düzeyde serbest radikallerin oluşumu nedeniyle oksidatif hasar meydana gelir [14,30,31,34,37,38,41].

Serbest radikaller; bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom ya da moleküllerdir ve enzimatik olan veya enzimatik olmayan reaksiyonlarla üretilirler [19,21,33,34,39,103]. Oldukça reaktif, kararsız ve kısa ömürlü olan serbest radikaller kendilerine en yakın molekülden elektron kazanarak kararlı hale geçerken, elektronunu kaybeden molekül serbest radikal haline dönüşür ve başka bir molekülden elektron kazanmaya çalışır, bu şekilde zincirleme reaksiyonlar meydana gelir [19,21,33,37]. Zincirleme reaksiyonlar ise iki serbest radikalin birbiri ile etkileşimi ya da bir serbest radikalin antioksidan bir molekülle etkileşmesi ile sonlanabilir. Serbest radikallerin oksijen türevli olanlarına reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen türevli olanlarına reaktif nitrojen türleri (RNS) denilmektedir [21,33]. Süperoksit radikali (O_2-•), hidroksil radikali (OH•), alkoksi radikali (RO•) ve singlet oksijen ($^1O_2$) ROS türevleri ve peroksinitrit (ONOO•), nitrik oksit radikali (NO•) RNS türevleri arasında değerlendirilebilir [34,39]. Reaktif oksijen türleri, immün yanıtta ve sinyalleşmede etkin rol oynadıkları gibi oksidatif hasara da neden olurlar [21,34].

Oksijen aerobik solunum yapan canlılar için hayati bir zorunluluktur ve yüksek elektronegativitesi ile kolayca elektron alarak indirgenebilmektedir. Normalde oksijenin yaklaşık %1-2'si mitokondrilerde ROS'a dönüşmektedir [31,34,103]. Oluşan ROS'lar oldukça kararsızdır ve kararlı hale gelmek için biyomoleküllerden elektron koparırlar. Protein oksidasyonu, DNA ve RNA oksidasyonu ve lipit peroksidasyonu denilen zincirleme reaksiyonlara yol açarak biyomoleküllerin fonksiyonlarını değiştirirler, nükleik asitlerin yapısında kırılma ve enzim inhibisyonlarına neden olarak hasarın boyutunu genişletirler [11,14,25,31-33,38,39,61,101].

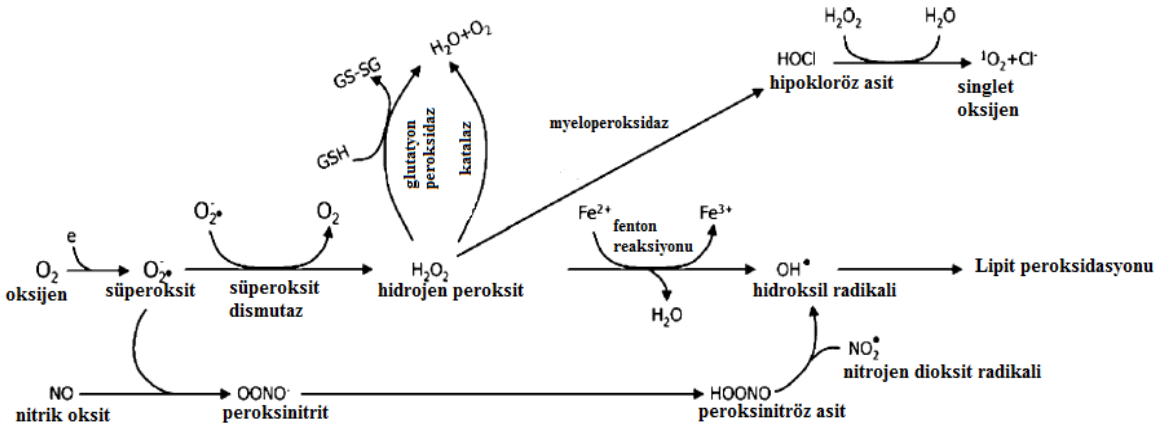
Oksidatif stres proteinlerin tersinir olmayan agregasyonuna neden olarak nörodejenerasyonu uyarır [39]. Proteinlerin histidin, lizin, prolin aminoasitleri oksidasyona hassas aminoasitlerdir [61]. Lipit peroksidasyonu ise membran akışkanlığını ve proteinlerin aktivasyonunu etkilemektedir [21].

Oksidatif stresin meydana gelmesinde mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyondan sorumlu elektron transfer sistemi önemli rol oynamaktadır [14,39,41,62]. ROS'ların %90'ı mitokondrilerde üretilmektedir [38,104].

Mitokondri hücrede enerji üretimi, kalsiyum homeostazisinin sağlanması ve apoptoziste görevli hücresel elemanlardır [8,10,37,104]. Hücrenin ihtiyaç duyduğu enerji; mitokondride elektronların protein altbirimleri arasında transferi yoluyla son elektron alıcısı olan oksijenin suya indirgenmesi sonucu sağlanır [38,104]. Elektronların transferi sırasında meydana gelen elektron sızıntıları mitokondrinin çevresindeki oksijenle birleşerek süperoksit radikalini meydana getirir [14,19,20,31,34,37,41,101]. Elektron transfer sisteminde yer alan protein alt birimlerinden kompleks 1 (NADH dehidrogenaz) ve kompleks 3 (sitokrom bc1) ROS üretiminde önemli merkezlerdir [9,14,21,38,41,104]. İlk oluşan ROS olan süperoksit radikali de hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi çeşitli serbest radikallerin üretildiği zincirleme reaksiyonları başlatabilir [19-21,31,34,37,41,101].

Mitokondri, serbest radikallerin üretildiği kaynak olduğu gibi, üretilen serbest radikallere yakın olması nedeniyle serbest radikallerin yıkıcı etkilerine de açıktır [8,37,38]. Mitokondriyal solunum zincirinde yer alan enzim altbirimleri mitokondriyal DNA (mtDNA) ve nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanır ve Alzheimer'da görüldüğü gibi bu DNA türlerinde mutasyon olması enzimlerin aktivitelerini bozar [104]. Ayrıca, mtDNA'lar, koruyucu histon proteinlerinden yoksundur ve sınırlı DNA onarım mekanizmasına sahiptir [38]. Bu özellikler, mitokondriyi oksidatif stresten en fazla hasar gören hücre bileşeni durumuna getirmekte, hasar görmüş mitokondri elektron transfer sistemini bozacağı için daha yüksek miktarda serbest radikal üretmektedir. Bu kısır döngü kendini tekrarlayarak, serbest radikallerin hücreler üzerindeki zararlı etkilerini ve sonrasında hücre ölümüne yol açan yolakları güçlendirmektedir [10,37,38,103].

Mitokondri matriksinde manganaz süperoksit dismutaz (MnSOD) antioksidan enzimi ve iç membranında bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) antioksidan enzimi yer alır. Bu enzimler süperoksit radikalini ve oksijeni hidrojen peroksit oluşturmak üzere katalizler [14,25,34,41]. Hidrojen peroksit zayıf bir oksidandır ancak hücre membranını geçerek hasarı geniş bir alana yayabilir ve geçiş metallerinin katalizörlüğündeki Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla en toksik karaktere sahip ROS olan hidroksil radikalini oluşturarak hasarı arttırabilir [25,38,39,66].



Oksijen molekülü, elektron transfer sistemindeki elektron sızıntısı ile birleşerek süperoksit radikalini($O_2^{-\bullet}$), süperoksit radikali ise süperoksit dismutaz (SOD) katalizörlüğünde hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur. Hidrojen peroksit glutatyon peroksidaz (GPx) ya da katalaz (CAT) enzimleri ile su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalanabilir. Hidrojen peroksit; fenton reaksiyonuyla hidroksil radikalini ($OH\bullet$) oluşturarak lipit peroksidasyonuna yol açabileceği gibi, myeloperoksidaz enzimi aracılığında hipokloröz asidi (HOCl), ardından singlet oksijeni ($^1O_2$) oluşturabilir. Süperoksit radikali nitrik oksit ($NO\bullet$) ile birleşerek peroksinitriti ($ONOO\bullet$), peroksinitrit ise peroksinitröz asidi (HOONO) ve nitrojen dioksit radikalini ($NO_2\bullet$) açığa çıkarır.

Şekil 2.5 Metabolizmada oksidatif stres ve antioksidan sistemi [33]

Mitokondride apoptozis sürecinde; oksidatif stres ürünleri mitokondriyal membran potansiyelini düşürerek membranda porlar açar ve proapoptotik proteinler ve sitokrom c oksidaz sitozole salınır. Bu durumda apoptotik kaspaz yolağı aktive olur ve hücre apoptozise yönlenmiş olur [39,66].

Oksidatif fosforilasyon dışında ROS üreten diğer kaynak nötrofil aktivasyonudur. Nötrofiller vücuda giren patojenlerin ortadan kaldırılmasında NADPH oksidaz aracılığında ürettikleri hidrojen peroksit ve hidroksil radikali ile yanıt verirler [14].

Kimyasallar, pestisitler, radyasyon gibi çeşitli dış uyaranlara maruziyet ve stres koşulları da ROS üretimine yol açar [14].

Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin lipitler üzerinde hasar meydana getiren ve farklı uzunluklarda reaktif yan ürünler açığa çıkaran; başlama, uzama ve sonlanma şeklinde üç basamaktan oluşan zincirleme reaksiyonlardır [95,105,106]. Başlama basamağında lipit açil zincirindeki karbon atomuna bağlı haldeki hidrojen atomunun bir serbest radikal ($X^{\bullet}$) tarafından koparılması ile lipit radikali ($L^{\bullet}$) meydana gelir. Lipit radikali oksijen ile birleşerek lipit peroksil radikallerini ($LOO^{\bullet}$) meydana getirir. Oluşan lipit peroksil radikalleri ise diğer lipitler ile etkileşerek lipit hidroperoksidine dönüşüp reaktivitesini kaybederken, yeni bir lipit radikalini oluşturur. Reaksiyonlar, iki peroksil radikali birbirini sönümleyene ya da antioksidan özellikteki yağda çözünebilen α-tokoferol (vitamin E)'ün bu radikalik yapılarla etkileşip sönümleyene kadar, zincirleme şekilde devam eder [95].

$$LH + X^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + XH$$

$$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$$

$$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow LOOH + L^{\bullet}$$

Lipit peroksidasyonu sonucu parçalanan yağ asidi zincirleri ve oluşan çapraz bağlı lipit-lipit ve lipit-protein kompleksleri, membran yapısını ve membran proteinlerinin aktivitesini değiştirir [105-107]. Aynı zamanda, lipit peroksidasyonu ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-trans-nonenal (HNE), acrolein ve izoprostanlar gibi elektrofilik ürünler nöronlar için toksik karakterdedir [17,61,105,106]. HNE; DNA, RNA ve protein sentezini inhibe edebilir; kalsiyum homeostazisini bozabilir; glutamat taşıyıcısını modifiye ederek glutamat eksitoksisitesine katkıda bulunabilir [17,34,65,95,106]. Ayrıca HNE, hücresel enerji üretiminde görevli pirüvat dehidrogenaz ve α-ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesini sınırlamaktadır [41,108].

Reaktif oksijen türlerinin hücre üzerindeki etkileri genel olarak şu şekilde sıralanabilir; membran geçirgenliğinde artış, hücre içine doğru Ca^{+2} akışında artış, nDNA ve mtDNA hasarı ve mutasyonu, DNA'da çift iplik kırılmaları, DNA-protein ve protein-protein çapraz bağlanmaları, kaspaz aktivasyonunda artış ve apoptozisin uyarılmasıdır [14,34].

Amoroso ve ark.'nın SH-SY5Y hücreleri üzerinde oksidatif stresin ve oksidatif stres sonucu artan hücreiçi Ca^{+2} iyonlarının, hücre hasarı üzerine etkisini inceledikleri araştırmada; oksidatif stres uyarıcısı olan 300, 500 ve 1000 µM ter-bütilhidroperoksit (t-BOOH) ile 5 saat muamele edilen hücrelerde oksidatif stresin uyarıldığı, ROS üretildiği ve sitozolik Ca^{+2} oranında artış olduğu anlaşılmıştır. Bu etkilerin bir antioksidan olan vitamin E uygulaması ile tersine çevrilebildiği tespit edilmiştir. Sonuçlar; oksidatif stres kaynaklı hücresel hasar mekanizmasını ortaya koymuştur [109].

Vücutta ROS üretimine karşı dengenin sağlanmasında antioksidan savunma sistemi etkin rol oynamaktadır. Antioksidan savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde iki sınıfa ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar SOD, CAT ve GPx'dir ve birlikte çalışarak hücresel bileşenleri ROS'ların zararlı etkilerine karşı korurlar [14,21]. SOD enzimi süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu sağlarken, CAT enzimi hidrojen peroksiti oksijen ve su moleküllere ayırır. Selenyum barındıran GPx ise hidrojen peroksidi suya indirger [14,44].

2.4.1.1 Oksidatif Stres ve Alzheimer İlişkisi

Yetişkin bir insan beyninde 10^{11}-10^{12} nöron ve bunların çevresinde çok sayıda oligodendrosit, mikroglia ve astrositler bulunmaktadır. Beyin, vücudun hayati ve merkezi organı olarak eşsiz bir özelliğe sahip olmasının yanında oksidatif strese karşı hassastır [34,37,62,78,101]. Bunun nedenleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir. Beyin gibi yüksek düzeyde enerji tüketen dokular oksijene daha fazla ihtiyaç duymaktadır [34,37,42,64,101]. Beyin vücuda alınan toplam oksijenin %20'sini kullanmaktadır [31,40,62,82,101]. Dolayısıyla nöronlarda yüksek düzeyde enerji üretimi sağlanmakta ve bu sırada çok sayıda ROS açığa çıkmaktadır [38,62,101]. Ayrıca yüksek düzeyde okside olma kapasitesine sahip araşidonik asit ve doksahekzanoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olan beyin, ROS saldırısı için hedef konumundadır [21,31,34,37,38,42,60,64,101]. Beyin antioksidan enzim savunma sistemi açısından diğer dokulara göre daha zayıftır, GSH düzeyi düşüktür [9,21,31,40,42,61,64,110]. Son olarak, ROS üretimine aracılık eden reaksiyonlarda yer alan geçiş metal iyonları beynin bazı bölgelerinde yüksek oranda bulunmaktadır

[34,37,103]. Bu nedenlerden dolayı, beyin oksidatif stresten ciddi şekilde etkilenmektedir. Ayrıca nöronlar post-mitotik özelliklerinden dolayı bölünme yeteneğine sahip değildir ve kaybedilen nöronların yerine yeni nöronlar oluşturulamamaktadır [62,64,101,110]. Bu durum nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin tahrip edici etkisinin ve nöronal kaybın ciddiyetini göstermektedir.

Yaşlanma ile birlikte ROS üretimindeki artış ve antioksidan savunma sistemindeki zayıflama sonucu etkisi artan oksidatif stres bulgularına, Alzheimer hastalığında yüksek oranda rastlanılmıştır [20,30]. Alzheimer hastalığında oksidatif hasar diğer patolojik bulgulardan önce ortaya çıkmaktadır [20,31,37]. İlk görülen oksidatif hasar belirteçleri; gliko-oksidasyon ürünü olan ileri glikozillenme son ürünleri (AGEs)'dir [19,20,30]. Proteinlerin indirgeyici şekerlerle reaksiyonu yoluyla oluşan AGEs, biyomoleküllerde çapraz bağlanma ve nükleik asitlerde hasar meydana getirir, RAGE ile birleşip IL-6 gibi sitokinlerin üretimini uyararak sinyal iletimini bozar ve hücre kaybına neden olur [19,39,100]. Nörofibriler yumaklarda AGEs'e rastlamak mümkündür [100].

RAGE; Aβ'ye spesifik olarak bağlanarak kan-beyin bariyeri aracılığında mitokondrinin bulunduğu hücreiçi boşluğa Aβ'nın taşınmasını sağlar, beyinde Aβ birikimini arttırır [14,60,86,87]. Ayrıca ROS üreterek oksidanlara duyarlı olan nükleer faktör κβ (NF-κβ)'nin uyarılması ile apoptozisi başlatabilir [14,30,61]. RAGE; BACE1 aktivatörünü uyararak BACE1 ifadelenmesini arttırır, BACE1 ise RAGE aktivasyonu sağlayarak karşılıklı ilerleyen bir döngü meydana getirir [14].

Alzheimer patolojisinde beyinde birlikte rol oynayan; mitokondriyal işlev bozukluğu, oksidasyon ürünlerinde artış, eksitoksisite ve redoks iyon dengesinde bozulma oksidatif stresin kaynaklık ettiği olaylardır [8,21,34,38,60,61].

APP'nin veya Aβ'nin aşırı ifadelenmesi sonucu; ROS üretimine kaynaklık eden mitokondriyal işlev bozukluğu Alzheimer hastalığının gelişiminde önemlidir [8,37,38,42,87]. Mitokondri iç membranındaki ATP sentaz α-zinciri Alzheimer'da okside olmuştur ve daha az oranda eksprese edilmektedir. Bu durum ATP sentezinde bozulmaya yol açmaktadır [11]. Ayrıca ailesel Alzheimer'da belirgin olan mitokondriyal işlev bozukluğu; enerji metabolizmasında düşüşe, α-ketoglutaraz ve sitokrom c oksidaz enzimlerinin düzeyinde ve etkinliğinde azalmaya neden olmaktadır [10,37,65,87,104].

Sitokrom c oksidaz düzeyinde azalma uzun dönem potansiyalizasyonu etkilediği gibi, ROS üretimine neden olmakta ve amiloidojenik yolağı da aktive etmektedir [104].

Alzheimer'da mitokondriyal hasar ve kalsiyum iyon birikiminin neden olduğu apoptozis süreci etkindir [37,101]. Serbest radikallerin meydana getirdiği mitokondriyal hasar sonucu, mitokondri membranında porlar oluşur ve mitokondri içerisine su girişi ve Ca^{+2} gibi iyon transportları gerçekleşir. Ca^{+2} iyonları proteazları uyararak kaspaz zincirini aktive etmekte ve apoptozisi başlatmaktadır. Mitokondriyal hasar sonucu, mitokondriyal solunum zinciri enzimlerinden olan sitokrom c oksidazın sitozole salınması da kaspazları tetikleyerek apoptozisi başlatır. [37,38,42,62,101,103,111]. SH-SY5Y hücrelerinde Aβ peptitleri, kaspaz 3 enzimini aktive ederek apoptozisi uyarmaktadır [33].

Alzheimer'da artmış glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi de oksidatif stresin bir belirtecidir [19,20,61,80,82]. Dolayısıyla enerji tüketimindeki bir artış daha fazla oksijen kullanımını sonucu doğurur ve oksidatif stres hasarı meydana gelir. Bunun sonucunda çok sayıda protein karbonil grupları, lipit peroksidasyon ürünleri, mtDNA ve nDNA oksidasyon ürünleri üretilir [19,20,33,61,80,82].

Mitokondri iç membranında yer alan, iyon transportunda görevli uncoupling proteinler, mitokondriyi oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu proteinler, ortamda bulunan ROS'ların etkisi nedeniyle proton yükte azalma meydana getirir. Mitokondriyal membran potansiyelinde oluşan azalma mitokondriyal çözülmeye, dolayısıyla üretilen ROS miktarında azalmaya neden olur. Ancak Aβ'nın mitokondrideki varlığı bu koruyucu mekanizmayı işlevsiz kılmaktadır. Bir serbest radikal olan süperoksite maruz bırakılan APP mutantı SH-SY5Y hücrelerinde; bu koruyucu proteinlerin ekspresyonundaki artış Aβ'nın etkisi nedeniyle sağlanamamış ve hücreler oksidatif strese açık hale gelmiştir [8].

Dong ve ark.'nın primer hipokampal nöron kültürü üzerinde yaptıkları çalışmada; hücrelere 24 saat boyunca uygulanan Aβ(25-35) peptidi, mitokondriyal içerik, hücresel morfoloji ve fonksiyonu bozmuş ve hücreler üzerinde sitotoksik etkide bulunmuştur [111].

APP mutantı olan transgenik farelerde ve fare N2a nöroblastoma hücrelerinde Aβ'nın mitokondrilere yerleşebildiği gösterilmiştir [87]. Mitokondriye giren Aβ metabolik faaliyetleri bozarak ROS üretimini kolaylaştırır. Fare beyninden izole edilmiş mitokondrilere yapılan Aβ uygulaması lipit ve proteinlerde bozulmaya, mitokondri membran geçirgenliğinde artışa ve sitokrom c oksidaz inhibisyonuna neden olmuştur. Aynı zamanda karbonhidrat metabolizmasında ve enerji üretiminde görevli α-ketogluratat dehidrogenaz ve pirüvat dehidrogenaz enzimlerini inhibe etmiştir [42,112].

Yapılan *in vitro* hücre kültür çalışmalarında, APP ve PS1 taşıyan transgenik fare modellerinde Aβ muamelesinin H_2O_2 seviyesini yükselttiği, protein ve lipit oksidasyonunu arttırdığının görülmesi oksidatif stres ile Aβ arasındaki ilişkiyi açıklar niteliktedir [8,17,61]. Mikromolar konsantrasyondaki Aβ, *in vitro* koşullarda H_2O_2 oluşması için yeterlidir [61].

MtDNA'nın ve enzimlerin serbest radikallerden etkilenmesi sonucu artan metabolik bozukluk da oksidatif stres kaynağı olarak fonksiyon gösterir [30,33,38]. Alzheimer hastalığında hipokampus ve neokorteksteki mtDNA delesyonları aynı yaştaki bireylere kıyasla 15 kat daha fazladır [38]. Alzheimer'da Aβ'nın etkisiyle mitokondri sayısı azalmakta ve mitokondrilerde şişme görülmektedir. Bu durum, iyon dengesi ve metabolizmayı bozmaktadır [38,88].

Maurer ve ark., 23 Alzheimer hastası birey ve 13 sağlıklı bireyin beyninde yaptığı çalışmada; Alzheimer'lı beynin korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerinde mitokondriyal enzimlerden olan sitokrom c oksidaz aktivitesinin azaldığını tespit etmiştir. Sonuçlar Alzheimer patolojisinde mitokondriyal işlev bozukluğunun bir göstergesi sayılabilir [104].

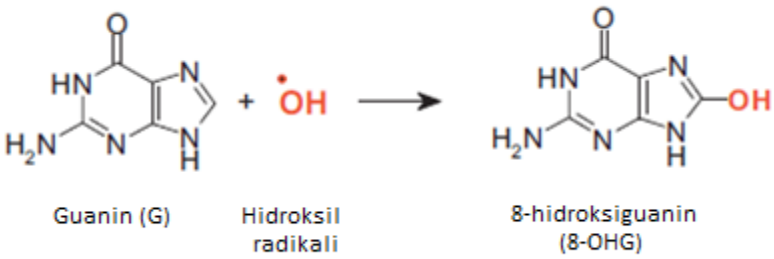
Leuner ve ark.'nın yaptığı çalışmada; HEK293 ve SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal kompleks 1 ve kompleks 3 inhibitörlerinin kullanımı mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açarak ROS ve Aβ üretiminde artışa neden olmuştur. Bu etkileri tersine çevirmek için yapılan antioksidan vitamin c uygulaması başarılı sonuç vermiştir. Sonuçlar mitokondriyal solunum zincirinde yer alan altbirimlerdeki işlevsizliğin oksidatif stresi ve Aβ üretimini tetiklediğini göstermiştir. Ayrıca tek başına Aβ da oksidatif stresi

uyarmakta olduğundan birbirini sürekli tetikleyerek devam eden zincirleme olaylar dizisi meydana gelmektedir [113].

Yüksek reaktiviteye sahip hidroksil radikali, DNA çift zincirinde kırılma meydana getirebileceği gibi, nükleik asitler arasında ve nükleik asitler ile proteinler arasında çapraz bağlanmaya neden olarak nükleik asitlerin yapısını değiştirir [30,31,37,38,42].

Serbest radikallerin guanini modifiye etmesiyle oluşan nükleik asit oksidasyon ürünü olan 8-OHG (8-hidroksiguanin); nükleik asit modifikasyonunda bir belirteç niteliğindedir [10,30,31,37,38,42,107]. Alzheimer hastası bir beyinde serbest radikallerin oluşturduğu nükleik asit modifikasyon ürünlerinden 8-OHG, 8-hidroksiadenin (8-OHA), 5-hidroksisitozin (5-OHC), 5-hidroksiurasil, timin glikol düzeyi yüksektir ve 8-OHG onarımını sağlayan baz ekzisyon mekanizması aktivitesinde düşüş olduğu saptanmıştır. Protein oksidasyon ürünlerinden olan protein karbonilleri ve 3-nitrotirozin miktarı da Alzheimer'lı beyinde yüksek bulunmuştur [30,31,33,37,39,41,42,60,82,87,101,103,106,107]. Bu belirteçlere beynin Aβ42 bakımından zengin olan bölgelerinde daha sık rastlanmıştır [60].

Alzheimer'da Aβ birikimi DNA onarımı sağlayan yolaktaki genlerin ifadelenmesini etkiler. Bunun sonucunda hasarlı DNA üzerindeki hatalı nükleik asitleri ortadan kaldıran baz ekzisyon onarım yolağı etkinliğini yitirir [60,65,110]. Dolayısıyla hücrelerde biriken DNA hasarı, hücreleri apoptozise yönlendirir [39,65,110].



Şekil 2.6 Guaninin hidroksil radikaliyle reaksiyonu ile 8-hidroksiguanin oluşumu [98]

Alzheimer'lı beyinde postmortem çalışmalarda lipit peroksidasyon ürünleri ölçümünde kullanılan tiyobarbütirik reaktif türleri (TBARS) seviyesinde artış gözlenmiştir [33,95,105,106]. Alzheimer oluşturulmuş transgenik hayvanlarda beynin korteks ve

hipokampus bölgelerinde protein ve lipit peroksidasyonunda artış bulunmuştur [60,101].

Alzheimer hastalığında; beyinde ve beyin omurilik sıvısında lipit peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, α- ve β-doymamış aldehitler, izoprostan, acrolein (2-propenal) ve HNE düzeyi yüksektir [17,33,20,21,37,60,64,82,95,101,103,105,106]. Bu α- ve β-doymamış aldehit ve türevleri nöronlar için sitotoksiktir ve proteinlerin amino grupları ile kolayca etkileşerek dimerizasyona ve inhibisyona neden olabilir, DNA modifikasyonları oluşturabilir [22,30,37-39,42].

Beyin lipit yoğunluğu nedeniyle lipit peroksidasyonuna karşı oldukça hassastır [20,21]. Alzheimer hastası beyinde lipit peroksidasyonu ürünleri seviyesi yükselirken, serebral kortekste yoğun olarak bulunan doymamış yağ asitleri düzeyi azalmaktadır [17,39,95]. Bu azalmanın nedeni okside edici nitelikte olan lipit peroksidasyonu ürünlerinin artan konsantrasyonudur [100].

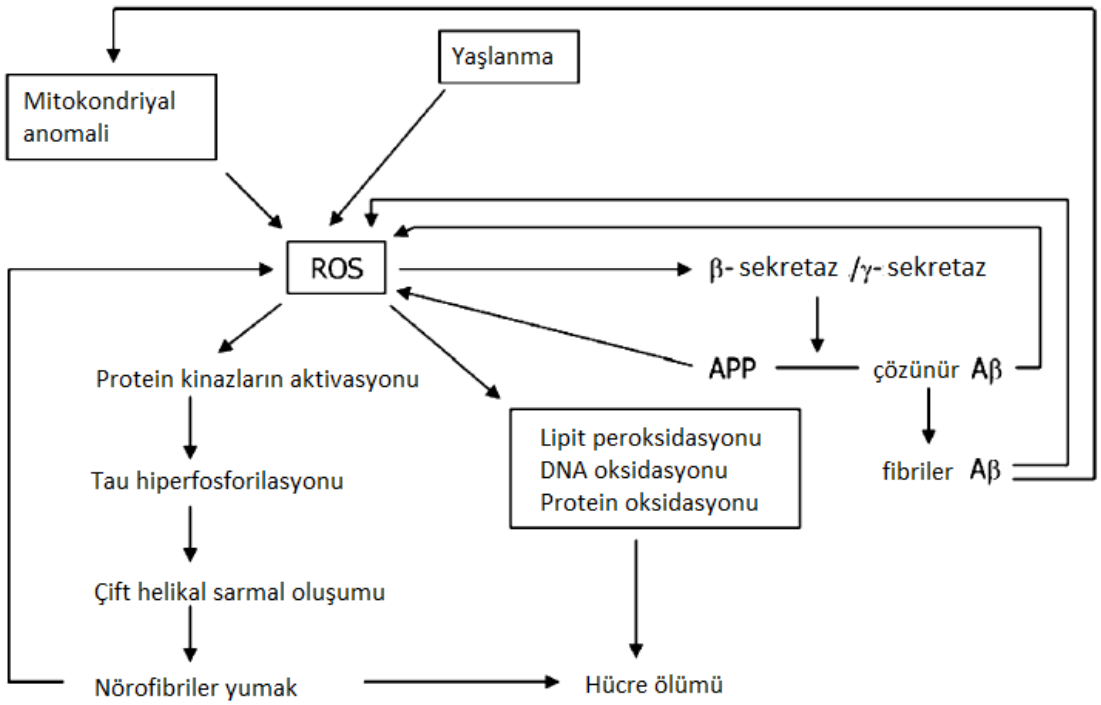
Acrolein ve HNE'nin yarı ömrü diğer serbest radikallere kıyasla daha uzun olduğundan bu ürünler oluştukları bölgeden daha uzak yerlere difüze olarak verdikleri zararın boyutunu genişletebilirler. Acrolein yüksek elektrofilik karakteri nedeniyle çok düşük miktarlarda dahi oksidasyon yapabilir [60,95,105,106]. HNE mikrotübül ağı oluşturan proteinlerin sistein grupları ile reaksiyona girerek ağın yapısında değişimlere yol açar [39,65]. Ayrıca HNE, fosforile olmuş tau proteinlerinin agregasyonunu genişleterek bu proteinlerin proteaza karşı kararlılığını arttırmaktadır [11,39,107]. Aβ ve HNE; sistein, lizin ve histidin aminoasitleri ile etkileşerek bozulmalara yol açmanın yanında, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde kayba neden olarak Ca^{+2} iyon dengesinde değişmeye, glikozun taşınmasında aksamaya yol açar [20,21,17,60,61,88,95,105,106]. Glutatyon-S-transferaz; HNE'i detoksifiye eden antioksidan bir enzimdir ve Alzheimer hastalığında bu enzimin aktivitesinde düşüş olduğu saptanmıştır [17,60,105,106].

Lipit peroksidasyonu, membran tabakasından yağ asitlerinin serbest hale geçmesini sağlayan fosfolipit lipaz A2 enzimini uyararak tau proteininin hiperfosforilasyonunu destekleyebilmektedir [95]. Aβ; nöronal membranlarda lipit peroksidasyonunu uyararak peroksidasyon yan ürünleri seviyesini arttırmaktadır [33,95,105,106].

Serbest radikallerin doğrudan etkileşimi ya da glikasyon yolu ile proteinler okside olabilmektedir [37]. Proteinlerin indirgeyici bir karbonhidrat ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan glikasyon ürünleri, monomerik Aβ'nın β-sheet yapı kazanmasını; böylece agregasyona eğilimini ve toksisitesini arttırmaktadır [79].

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki tahrip edici etkilerinden biri; protein yapılı olan enzimlerin aktivitelerini kaybetmesidir [103]. Metabolizmada oldukça önemli görevleri üstlenen enzimlerin aktivitesini yeterince gösterememesi başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere çok sayıda hastalığın gelişimine zemin hazırlar. Protein oksidasyonu yanlış katlanma, çapraz bağlanma, konformasyonel değişiklik ve agregasyona sebep olarak proteinlerin aktivitesinde, ifadelenmesinde, hücre sinyalleşmesinde bozulmaya yol açar ve sonrasında hücresel ölümü izleyen yolağı aktive eder [11,17,42,106]. Aβ'nin neden olduğu protein oksidasyonu UV-vis spektroskopi ve immünohistokimya yöntemleri ile saptanabilmektedir [17].

PS-1 proteininin tirozin aminoasidinin peroksinitrit radikali tarafından modifiye edilmesi Aβ42/Aβ40 oranında artışa neden olmaktadır [20]. Modifiye sistein kalıntılarına sahip protein konsantrasyonu nörodejeneratif hastalıklarda yüksektir [17,21]. Bu durumda enzimatik fonksiyonlarda ve otofaji gibi metabolik faaliyetlerin işleyişinde bozulma meydana gelebilir [21].



Mitokondriyal anomali, yaşlanma, nörofibriler yumaklar, çözünür ve fibriler Aβ'nin ürettiği reaktif oksijen türleri; lipit peroksidasyonuna, DNA ve protein oksidasyonuna, nörofibriler yumak oluşumunda artışa ve hücre ölümüne neden olur.

Şekil 2.7 Alzheimer hastalığında ROS etkileri [33]

İnflamasyon; vücudun çeşitli patojenik uyaranlara karşı kendini savunma sistemidir ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır ancak nörodejeneratif hastalıklarda kronik inflamasyon, nöronlar gibi post-mitotik hücreler için ciddi bir hasar anlamına gelmektedir [32]. Mikroglia ve astrosit hücreleri ROS kaynağı olarak görev yapmakta, inflamasyonda rol oynamaktadır [21,32,41,65,78]. Normal koşullarda inflamasyon bölgesinde aktive olan mikroglia hücreleri inflamatuar sitokinler salgılayarak immün yanıtın başlamasını sağlamaktadır. Patolojik koşullarda ise mikroglia aktivasyonu sonucu salgılanan IL-6, TNF-α gibi sitokinler ile nitrik oksit, süperoksit gibi serbest radikaller hasarlı bölgenin yanında bu bölgeye komşu sağlıklı hücreler için de toksik bir ortam meydana getirir, nöron hücreleri yapısal değişime uğrar, aksonal ve dendritik yapılar azalır [21,32,33,41,52,62,78]. Artan nitrik oksit, amiloid plak ve nörofibriler yumak oluşumuna katkıda bulunur, nörodejenerasyona, ve bilişsel bozukluklara neden olur [21,32,52]. Aβ birikimi de mikroglia aktivasyonu sağlayarak ROS üretimine katkıda bulunabilir [13,32,65]. Alzheimer'da senil plakların etrafı aktif mikroglialar ile çevrilir [30,32,33,61,78].

Nitrik oksit düşük konsantrasyonlarda nörokoruyucu etkide bulunabilir. İnsan beyin mikrovasküler endotelyal hücrelerinde yapılan çalışmada endotelyal nitrik oksit sentaz enziminin inhibe edilmesinin APP'nin amiloidojenik yolağa yönlenmesini sağladığı ve Aβ üretimini arttırdığı anlaşılmıştır [114].

NADPH oksidaz enzimi Alzheimer hastası bireylerin beyninde aşırı aktive haldedir. NADPH oksidaz nöron, mikroglia ve astrositlerde süperoksit radikalinin oluşumasına neden olur [34,39,98,101]. Aβ, mikroglialarda NADPH oksidazı aktive ederek süperoksit radikalini oluşturur [33,61].

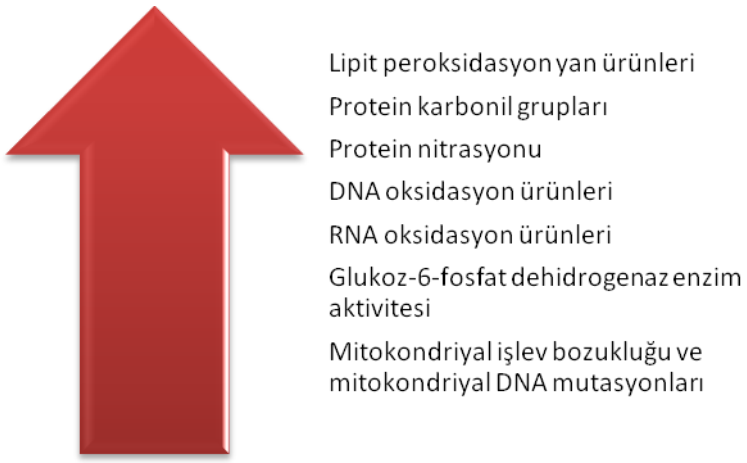
Alzheimer hastalığında glutamat eksitoksisitesi önemli bir parametredir. Glutamat hafıza ve kognitif yeteneklerde rol oynayan önemli bir nörotransmitterdir [62]. Aβ glutamat taşıyıcı sistemleri inhibe edebilir. Bu inhibisyon glutamatı glutamine çeviren glutamin sentaz enzimini inhibe ederek glutamatın birikmesine, dolayısıyla eksitoksisiteye katkıda bulunur [11,34,52,60,78,95,106]. Glutamatın hücre içinde artışına bağlı olarak hücreye Ca^{+2} iyonları girer, ROS üretimi gerçekleşir, hücrelerarası iletişimde bozulma ve nöronal kayıplar meydana gelir [52,60,62,95,106].

Oksidatif stres APP'nin proteolitik yıkım prosesini de etkiler. Buna göre; oksidatif stres β ve γ-sekretaz aktivasyonunu arttırıcı, α-sekretaz aktivasyonunu azaltıcı yönde etki yapar. BACE1 geninde redoksa duyarlı NF-κβ için bağlanma bölgeleri bulunur. BACE1, PS1 ve γ-sekretaz redoksa duyarlı yolakları aktive edebilir. Oksidatif stresin bu yolakları uyarması sonucu β-sekretaz ifadelenmesi artar [8]. Ayrıca oksidatif ürünler olan H_2O_2 ve HNE, BACE1 aktivasyonunu arttırır [25,33].

Aβ hücresel sinyal yolaklarını etkileyerek, tau fosforilasyonunu sağlayan p38 MAPK yolağını aktive edebilir [14,33,34]. Oksidatif stres koşullarında ROS'lar MAPK yolağını aktive ederek tau proteinlerini hiperfosforile eder, Ca^{+2} iyon dengesini değiştirerek apoptozisi destekler [41,103].

Aβ(25–35) peptit dizisinin sinaptik membranlarda ROS üretebildiği ve nöronlara agrege olmuş haldeki Aβ40'ın verilmesinin ROS oluşumunu hızlandırdığı saptanmıştır. Oligomerik Aβ42 ile muamele edilmiş nöronlarda, ROS üretiminde ve protein oksidasyon ürünlerinde artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Ek olarak, antioksidan

sistemi güçlendirmeye yönelik yapılan çalışmalarda Aβ aracılı oksidasyon ürün miktarında düşüş sağlanmıştır [25,43].



Şekil 2.8 Alzheimer hastalığında oksidatif stres belirteçleri [61,95]

Alzheimer hastalığında antioksidan durumu incelendiğinde; çelişkili sonuçlar olsa da genel olarak, üretilen ROS düzeyindeki artışa paralel olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini elemine etme amacıyla enzimatik antioksidan aktivasyonunda artış meydana gelmektedir. GPx, glutatyon redüktaz ve CAT enzim aktivasyonları Alzheimer'lı beyinde, aynı yaş grubundaki sağlıklı beyine kıyasla, daha yüksektir [100].

APP'yi aşırı eksprese eden transgenik fare modeli üzerinde yapılan bir çalışmada; Cu/ZnSOD enzimi düzeyindeki azalma, kontrol gruba kıyasla Aβ oligomerizasyonunu destekleyerek hafıza kaybını ve tau proteinlerinin fosforilasyonunu destekleyici etkide bulunmuştur [85]. Dolayısıyla antioksidan sistemdeki zayıflık; oksidatif stresteki artış nedeniyle Alzheimer patolojik bulgularını desteklemektedir.

Alzheimer hastası beyinde amiloid plakların yoğun olarak yerleştiği amigdala, hipokampus ve serebellum bölgelerinde bir antioksidan savunma sistemi proteini olan thioredoksin ifadesi ve aktivitesi azalmış durumdadır [82].

Boll ve ark.'nın yaptığı çalışmada Alzheimer, Parkinson, Huntington's ve Amyotrophic Sclerosis hastası olan hastalardan toplanan beyin omurilik sıvılarında nitrik oksit ve türevlerinde artış ve Cu/ZnSOD aktivitesinde ise düşüş olduğu saptanmıştır [115].

Murakami ve ark.'nın yaptığı çalışmada; SOD geni bakımından knockout olan transgenik farelerde BACE1 aktivasyonunun yükseldiği ve üretilen ROS'lar detoksifiye

edilemediğinden süperoksit radikali düzeyinin ve Aβ seviyesinin arttığı, nöroinflamasyon yolakların desteklendiği ve tau hiperfosforilasyonun meydana geldiği belirlenmiştir. Sonuçlar oksidatif stres koşullarının Alzheimer patogenezinde önemli oranda rol oynadığını kanıtlar [116].

Olivieri ve ark.'nın çalışmasında; kobalt ve cıva ağır metallerinin yanısıra H_2O_2 muamelesi, SH-SY5Y hücrelerinden besi ortamına salınan Aβ40 ve Aβ42 miktarını arttırmıştır. Ağır metallerinin bu etkisi; amiloidojenik olmayan yolak enzimlerinin inhibisyonuyla APP'nin amiloidojenik yolağa yönlendiği şeklinde açıklanmıştır [92].

Tamamen farklı bir yaklaşım olarak; oksidatif stres altında Aβ'nın, oksidatif hasara karşı hücresel savunma mekanizması tarafından üretildiğine dair bir varsayım da mevcuttur. Varsayımı desteklemek amacıyla; henüz Aβ birikiminin düşük olduğu, Alzheimer hastalığının erken safhalarında nöronal hasarın daha ciddi olduğu görüşünden söz edilmektedir. Ayrıca Aβ'nın agregasyon durumu ve miktarı pro-oksidan ve antioksidan işlevi arasındaki dengeyi belirlemektedir. Düşük düzeydeki Aβ nörokoruyucu olabilir. Ancak yüksek nanomolar Aβ konsantrasyonları ve agrege formu toksiktir [8].

2.4.1.2 Metal Uyarıcılı Oksidatif Stres

Oksidatif stresin Alzheimer hastalığı ile olan güçlü ilişkisinin kanıtlanmasının ardından bir grup bilimadamı, sıklıkla kullanılan 'amiloid kaskad hipotezi'ne bir alternatif geliştirmiştir. Alternatif hipotezde; Aβ'nın tek başına patogenezi başlatıcı karakterde olmadığı, serbest radikal üretebilen ve inflamatuar hücreleri uyarabilen özelliği nedeniyle patogenezin seyrinde ikincil bir olgu olduğu vurgulanmıştır [19]. Ancak literatürde, söz konusu farklı hipotezlerin birbirinden bağımsız değerlendirilmesi yerine; birlikte ele alınması gerektiği de dile getirilmektedir [13]. Bu durumda karşımıza metal uyarıcılı oksidatif stres ve Aβ ile metaller arasındaki ilişki çıkmaktadır.

Enzimatik faaliyetler, oksidatif fosforilasyon, hormon üretimi, antioksidan savunma sistemi, nörotransmitter salınımı, hafıza ile ilgili işlevlerde geçiş metal iyonları rol oynamaktadır [2,117]. Antioksidan enzimlere katalitik işlev kazandıran geçiş metal iyonlarının bu faydalı özellikleri ile, ROS üretimine neden olan zararlı nitelikleri arasında hassas bir denge olduğunu söylemek mümkündür [20,72].

Geçiş metalleri yükseltgenebilme ve indirgenebilme özelliğine sahip oldukları için pro-oksidan gibi davranarak protein agregasyonunun ve oksidatif stresin meydana gelmesinde rol oynamaktadırlar. Geçiş metallerinin katalize ettiği Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları süperoksit, H_2O_2 ve hidroksil radikallerini oluşturarak çok sayıda serbest radikalin üretildiği zincirleme reaksiyonların gelişmesine neden olmaktadır. Oksijence zengin bölgeler olan mitokondrilerin, redoks aktif metal iyonlarını yüksek oranda bulundurması oluşan ROS düzeyini arttırmaktadır [20,72]. Bu şekilde üretilen serbest radikallerin biyomoleküller üzerinde meydana getirdikleri bozukluklar birikerek nörodejenerasyona yol açmaktadır [6,8,14,19,20,49,61,64,98,103,107].

Demir ve bakır iyonları ile vücutta düşük dozda bulunan metallerden krom ve kobalt iyonları da redoks aktiftir ve ROS üretebilir [98].

Geçiş metalleri moleküler oksijen (O_2) ile reaksiyona girdiğinde indirgenerek süperoksit radikalini ($O_2^{-\bullet}$) meydana getirir [19-21,98,100].

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$$

$$Cu^{+} + O_2 \rightarrow Cu^{2+} + O_2^{\bullet -}$$

Süperoksit radikali ($O_2^{-\bullet}$) süperoksit dismutaz (SOD) enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana getirir [19-21,98,100].

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Demir veya bakır aracılığında gerçekleşen Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil iyonu (OH^-) ve hidroksil radikalini ($OH\bullet$) oluşturmak üzere reaksiyona girer [13,19,98,100].

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

Süperoksit radikali demir veya bakır aracılığında doğrudan Haber Weiss reaksiyonuna katılarak hidroksil iyonu (OH^-) ile hidroksil radikalini ($OH\bullet$) meydana getirir [13,19,98].

$$Cu^{2+} + O_2^{-\bullet} \rightarrow Cu^{+} + O_2$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{Cu^{2+}} O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$$

Bir antioksidan olan GSH, Cu iyonlarının toksisitesini inhibe edebilmektedir. Ancak Cu iyonlarının meydana getirdiği oksidatif stres ortamında GSH enzimi tükenmekte, Cu/ZnSOD aktivitesi azalmaktadır ve oksidatif hasar genişlemektedir. Bakır iyonları düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu uyarmakta, ROS üretimini başlatan MAPK yolağını aktive etmektedir. Peroksinitrit radikali ise bakır taşıyıcı protein serüloplazminin, bakır taşıma kapasitesini değiştirmekte, hücreiçi bakır yükünü arttırmaktadır [98].

Bakır iyonları oksidatif strese yol açtığı gibi, inflamasyon ve mitokondriyal işlev bozukluğuna eşlik eden nörodejenerasyonu ve hücre ölümünü desteklemektedir [13,20,33].

2.4.1.3 Amiloid-β ile Metaller Arasındaki İlişki

Yaşamsal faaliyetleri sürdürmek amacıyla metabolizmada ve sinir sisteminde çok sayıda enzimin aracılık ettiği bir dizi reaksiyon gerçekleşir. Söz konusu metabolik süreçte, özellikle antioksidan enzimlerin yapısına katılarak işlev göstermelerini sağlayan geçiş metalleri önemli bir yer tutmaktadır [2,19,49,118].

Bakır ve çinko iyonları sinaptik fonksiyon gösterirken, demir iyonları hücre büyümesi, elektron transfer sistemi, miyelinizasyon, nörotransmitter sistem ve sinaptik aktivasyonunda görevlidir [1,8,24,72]. Demir iyonu; hemoglobin ve sitokrom altbirimlerinin yapısında yer alan, oksjen ve karbondioksidin taşınması ve ATP üretimi için önemli bir iyondur [64,98,107].

Metabolizmada yapısal ve katalitik olmak üzere önemli fonksiyonlar üstlenen ve eksikliklerinde ölümcül sonuçlar doğuran bakır ve demir gibi geçiş metallerinin homeostazisinde meydana gelen bozukluk nörodejeneratif hastalıkların gelişimine de yol açabilmektedir. Alzheimer, Parkinson ve amyotrofik lateral skleroz hastalığında bakır ve demir homeostazisinde değişiklik görülmektedir [2,49].

Beynin diğer dokulara nazaran antioksidan savunma sistemi zayıf olduğu için bakır konsantrasyonunun nöronlarda çok sıkı bir şekilde düzenlenmesi hayatidir [12,40,119]. Bu nedenle fizyolojik koşullarda; geçiş metallerinin adsorplanması, taşınması ve hücresel bölmelere dağıtımı oldukça iyi organize edilmektedir [2,19,49,118].

Beyinde metal iyonları derişimi özellikle kan-beyin bariyerinin kontrolü altındadır [2]. Demir ve bakır redoks aktif geçiş metalleridir ve kontrolsüz reaksiyonlarının engellenmesi için serbest haldeki konsantrasyonları düşük seviyede tutulur [2,13,20,49,118]. Ancak yaşlanma ile birlikte kan-beyin bariyerinin fonksiyonel özelliğindeki azalma metal iyonların kandan beyine doğru ve beyinden kana doğru geçişini kolaylaştırır [13]. Fizyolojik koşullarda bakır, demir ve çinko iyon konsantrasyonu beyninde diğer dokulara göre yüksek olmakla birlikte Alzheimer patolojisi durumunda konsantrasyonlarında ciddi bir artış söz konusudur [1,2,11,20,24,61,64,120]. Sağlıklı bir beyinde sırasıyla bakır, demir ve çinko konsantrasyonları 70 µM, 340 µM ve 350 µM iken, Alzheimer hastalarında bu konsantrasyonlar sırasıyla 390 µM, 940 µM ve 1055 µM'dır [2,20,73,80,102]. Amiloid plaklar ve NFY'lerde de geçiş metalleri birikimi söz konusudur [1,2,8,11,20,24,61,64,120].

Sağlıklı bir insanda vücuttaki bakırın %7.3'ü beyinde bulunur [13]. Beyin omurilik sıvısındaki bakır konsantrasyonu ise 1 µM kadar düşük konsantrasyondadır [72]. Alzheimer patolojisinde beyin omurilik sıvısında ve serumdaki bakır konsantrasyonu yükselir [2]. Bakır düzeyi yüksekse Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları ile oksidatif stres başlatılırken, bakır düzeyi düşükse bakırı kofaktör olarak kullanan antioksidan enzimler işlevsiz kalacağından dolaylı yoldan oksidatif strese hassasiyet yükseltilir [6,121]. Geçiş metalleri, ürettikleri ROS'lar ile mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olur [8,30].

Fizyolojik koşullarda oluşan Aβ, beyinden beyin omurilik sıvısından kana verilerek uzaklaştırılmaktadır [122]. Konsantrasyonu bireysel farklılıklara göre değişmekle birlikte Alzheimer patolojisinde CSF'deki Aβ seviyesi düşüktür [13,20,67]. Aβ'nın yüksek konsantrasyonu ve metal iyonlarının ortamdaki varlığı fibrilizasyonu destekler ve

fibrilizasyon merkezlerinin artışı ile plaklar meydana gelir. Bu şekilde CSF'deki Aβ seviyesi azaltılmış olur [13,20].

Strozyk ve ark.'nın çalışmasında demansı bulunan yaşlı insanlardan otopsi ile alınan BOS örneklerinde Aβ42 seviyesi düşük bulunmuştur. BOS'da bulunan metal iyonları konsantrasyon sıralaması ise Fe>Zn>Cu>Se>Al>Mn>Cr şeklindedir [122].

Demir iyonunu beyine taşıyan transferrin proteinine amiloid plaklarda rastlanmıştır [64,98,107]. Beyinde, ferritin proteinine bağlanan demir iyonları eksikliğinde bilişsel fonksiyon kaybı görülür [1,8]. Ancak yüksek düzeydeki demir iyonları, ROS üreterek protein karbonil grup ve lipit peroksidasyon ürünlerinin artışına, hücresel membran hasarına, DNA hasarına, inflamatuar sürecin aktive olmasına, Aβ birikimine ve tau hiperfosforilasyonuna yol açar [1,14,98]. Demir iyonları Bcl-2 apoptotik yolağı aktive ederek sitotoksisite gösterebilir [1].

Çinko metalinin sinaptik yarıkta taşıyıcı proteini ZnT3'dür. Yaşlanma sürecinde seviyesi azalan ZnT3 östrojen hormonu tarafından modüle edilebilmektedir. Bu durum, cinsiyet faktörünün Alzheimer'da risk faktörü olmasına gerekçe gösterilebilir [2,27]. Çinko iyonları, γ-sekretaz aktivitesini inhibe edebilmekte, Aβ'nın protofibril hale gelmesinde etkili olmakta, Aβ klirensinde görevli olan neprilsin ve IDE enzimlerinin etkinliğini değiştirebilemekte ve Aβ dimerizasyonuna yol açabilmektedir [2,14,16,44].

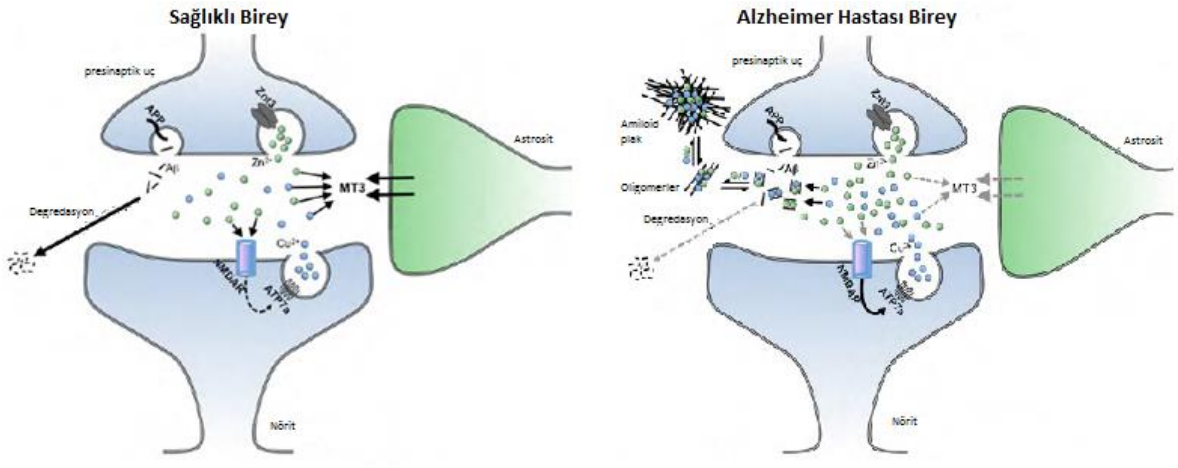
Bakır metali taşıyıcı proteinleri; bakır-taşıyıcı P-tip ATPaz (ATP7A), bakır taşıyıcı protein 1 (Ctr1), divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1)'dir [20,102,119,123,124]. Bu taşıyıcı sistemde yer alan proteinlerdeki mutasyonlar bakır metalinin hücre içinde birikmesine yol açar [123]. Bakır ve demir iyonlarını taşıyabilen DMT1 seviyesi yaşlanma sürecinde artmaktadır ve amiloid plaklarda da yüksektir [120].

Bakır metali ile ilişkili enzimler; süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite çevrilmesinden sorumlu SOD enzimi, mitokondride elektron transfer sisteminde yer alan sitokrom c oksidaz, ferröz durumdaki demiri ferrik duruma okside eden serüloplazmin enzimleridir [1,16,75,98]. Alzheimer'da serüloplazmine bağlı olmayan serbest haldeki bakır iyonları konsantrasyonu yüksektir [75].

Geçiş metalleri serbest halde iken ROS üreterek oksidatif stres meydana getirdiğinden, çoğunlukla transferrin ve serüloplazmin gibi proteinlere bağlı şekilde tutulmaktadır,

yalnızca sinaptik yarıkta bu metallere serbest halde rastlamak mümkündür [2,75,82,121].

Çinko ve bakır iyonları post-sinaptik nöronlardan sinaptik yarığa glutamat ile birlikte salınmakta ve burada yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir [11,12,16,27,77,122]. Bakır iyonları, N-metil-D-aspartik asit (NDMA) reseptörlerinin aktivasyonu ile sinaptik yarığa salınmak üzere ATP7A'nın işlevi aracılığında aktive olmaktadır [2,27,44,69]. Diğer taraftan Aβ da sinaptik yarığa salınmaktadır [27,77]. Şekil 2.9'da sağlıklı birey ve Alzheimer hastası bireyde sinaptik aktivasyonda çinko ve bakır iyonlarının etkinliği gösterilmektedir [98].



Sağlıklı bireylerde; çinko metali presinaptik uçtan ZnT3 aracılığında, bakır iyonları ise NDMA reseptörlerinin aktivasyonu üzerine ATP7A ile sinaptik yarığa salınır. APP'nin proteolitik yıkım ürünü olan Aβ ise degredasyona uğratılır. Metal iyonlarının konsantrasyonu astrosit hücrelerdeki metal bağlayıcı bir protein olan metallotioneinler (MT3) tarafından düzenlenir. Alzheimer hastası bireylerde; mitokondriyal aktivitedeki azalma nedeniyle metallerin yeterli düzeyde geri alımı sağlanamaz, bakır ve çinko iyonları Aβ ile etkileşerek oligomerlerini meydana getirir. Aβ-metal kompleksleri Aβ'nin degredasyona karşı kararlılığını arttırır ve amiloid plakları meydana getirir.

Şekil 2.9 Sağlıklı ve Alzheimer hastası bireyde sinaps aktivasyonu [2].

Metallothinonein-3 (MT-3) nöronal büyüme inhibitör faktörüdür ve astrositlerde çift değerlikli metal iyonları ile etkileşmektedir ve bakır iyonları ile etkileştiğinde bakırın indirgenmesi engellenmektedir. Ancak Alzheimer'lı beyinde bu işlev yeterince yerine getirilememektedir (Şekil 2.9). Luo ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücrelerinde Zn-MT3 kompleksinin bakır iyonlarını tutarak Aβ-Cu(II) kompleksinin toksisitesini, agregasyonunu ve ROS üretimini inhibe ettiği belirtilmiştir [125].

Metal iyonları APP, sekretaz enzimleri ve Aβ ile etkileşebilmektedir. α-sekretaz ailesi üyelerinden ADAM10 ve TACE birer metalloproteinazdır ve metaller ile işlev görürler [2,122]. Ayrıca Aβ klirensinde görevli metalloproteinazların aktivitesi bakır iyonlarından etkilenmektedir [6].

APP geni üzerinde 5' transloke olmamış bölgede demir iyonunu bağlayan demir-duyarlı bir elemanın mevcudiyeti bilinmektedir [2,6,8,126]. Demirin şelatlanarak APP ile bağlanmasının engellenmesi APP'nin ifadelenmesini azaltabilmektedir [126].

APP ve Aβ'nın metal bağlayıcı bölgeler bulundurdukları ve bakır metaline karşı yüksek affinite gösterdikleri saptanmıştır [1,6,8,18,20,75,127]. APP'nin N terminal ucunda sisteince zengin olan ve bakır şelatörlerinin yapısı ile benzerlik taşıyan bakır iyonlarının bağlanabileceği His147, His151, Tyr168 ve Met170 aminoasitleri bulunmaktadır [6, 20,40,66,127].

APP, üzerinde bulunan bakır bağlayıcı bölgeye (CuBD) bağlanan Cu(II) iyonlarını indirgeyerek farklı proteinlere transfer etmektedir [75]. Hücreiçi bakır konsantrasyonu düşük ve hücredışı bakır konsantrasyonu yüksek ise CuBD'e bakır bağlanması kolayca Aβ üretilmesini ve lipit peroksidasyonu reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar [44,75]. Bu veriler ışığında APP'nin metal homeostazisinde rol oynadığı tahmin edilmektedir.

Bakır homeostazisinde APP önemli bir rol oynamaktadır, ancak APP ile bağlanan bakır iyonları indirgendiği için oksidatif stresin oluşması kaçınılmazdır. Fare primer nöron kültüründe yapılan bir çalışmada; bakır metalinin meydana getirdiği toksisiteye karşı, APP bulundurmayan hücrelerin (APP^-), APP bulunduran hücrelerden (APP^+) daha dirençli olduğu anlaşılmıştır. APP^+ hücrelerine 10 µM $CuCl_2$ uygulandığında hücre canlılığında önemli bir düşüş yaşanırken, aynı etki APP^- hücrelerinde görülmemiştir. Bakırın neden olduğu oksidatif stres sonucu oluşan lipit peroksidasyon ürünlerinin APP^+ hücre kültüründe daha yüksek olduğu saptanmıştır [128].

ATP7A ve CTR1 bakır taşıyıcı proteinleri, bakır iyonlarının kandan kan-beyin bariyeri yoluyla beyine ulaşmasını sağlarken, APP ise ters yönde bakır transportu sağlayabilir [117,129]. Ancak bakır iyonları APP'ye bağlandığında proteinde konformasyonel değişime neden olarak proteolitik yıkıma dirençli APP-APP dimerlerinin ve ROS'ların oluşmasına neden olabilmektedir [43,64,129,130].

Bakır iyonları için bağlayıcı bir bölge bulunduran APP ile bakır iyonları arasında çift taraflı bir etkileşim söz konusudur [131]. Bayer ve ark. yaptığı çalışmada APP'yi aşırı ekprese eden transgenik farelerin beynindeki yüksek bakır seviyesine ters orantılı olarak APP'nin azaldığı anlaşılmıştır. APP bakımından eksik olan transgenik farelerde ise bakır seviyesi yükselmiştir. Bu sonuç APP'nin bakırı hücrelerden dışarı yönlendirdiğinin göstergesi sayılabilir. Transgenik farelere 3 ve 12 ay boyunca içme suyunda verilen bakır iyonları APP'nin bakırı hücrelerden uzaklaştırması sonucu; bakırı kullanan SOD enziminde işlevsizlik görülmüştür [132]. Dolayısıyla bakır iyonları oksidatif stresi antioksidan enzim yapısına katıldığı için doğrudan etkilemektedir.

APP bakır iyonlarını indirgeyebileceği gibi, APP'nin proteolitik yıkımı bakır iyonlarından etkilenebilmektedir [20,49,127]. Bakır iyonları APP'deki bakır bağlayıcı bölgeye bağlandığında konformasyonel değişikliğe neden olarak proteinin BACE1 ve γ-sekretazı daha yoğun hale getirecek şekilde kümelenmesini sağlar [18,49]. Bu durum amiloidojenik yolak aktivasyonunu arttırır. Bakır metali APP üretimini, proteinin mRNA'sının ifadelenmesini arttırarak destekleyebilmektedir [27,49].

BACE1 üzerinde de bakır bağlayıcı bölge bulunmaktadır ve BACE1, süperoksit dismutazın bakır şaperonu (CCS1) ile bakır metali bakımından yarışmalıdır [2,27,44,98]. Dolayısıyla BACE1 aktivasyonu, önemli bir antioksidan olan SOD enziminin etkinliği ile ters orantılıdır [2].

Bakır iyonları demir iyonlarına göre daha güçlü bir şekilde tau proteinlerine bağlanarak indirgenme yoluyla hidrojen peroksit üretebilir [133]. Bakır iyonları tau proteinlerini fosforile eden enzimlerin aktivitesini bozarak NFY oluşumu desteklemektedir [2].

Aβ'nın bakır, çinko, demir ve alüminyum metalleri ile etkileşimi ve nöroblastoma hücreleri üzerinde metal aracılı agregasyonun incelendiği çalışmada; alüminyum ve demir iyonlarının protofibril ve oligomerik Aβ yapılarını meydana getirdiği, APP'nin aşırı ifadelenmesine neden olduğu anlaşılırken; çinko iyonlarının granüler agregat oluşturduğu anlaşılmıştır. Bakır iyonları ise küçük oligomerik yapılar meydana getirmiştir ve Aβ-Cu(II) kompleksinin agrege hale gelmesi daha uzun sürmüştür. Bunun nedeni Aβ-Cu(II) kompleksinin ROS üreterek oksidatif stres meydana getirmesi ile açıklanabilir [134].

Metal iyonları proteinlerin yanlış katlanmasında etkin rol oynar. Alzheimer hastalığında Aβ ile metal iyonları birkaç farklı yolla etkileşebilir [6,26];

- **Konformasyonel değişiklik;** Aβ'ya bağlanan metal iyonları konformasyonel değişiklik meydana getirerek Aβ'nın yanlış katlanmasına ve birikimine yol açmaktadır.
- **Çapraz bağlanma;** Aβ'ya metal iyonların bağlanması dimerik ve oligomerik yapıları oluşturacak şekilde çapraz bağlanma meydana getirebilir ve amiloid plakların başlangıcı olan Aβ birikimi gerçekleşir.
- **Yük değişimi;** metal bağlanması proteinin net yükünü değiştirerek kendi kendine biraraya gelme eğilimini arttırabilir.
- **Kararlılıkta değişim;** metal iyonlar çapraz bağlanmalara neden olarak proteinlerin kararlılığını değiştirebilmektedir.
- **Fibriler yapıda değişim;** metal iyon bağlanması proteinin fibril yapısını etkileyerek yanlış katlanmaya eğilimli hale getirebilmektedir.
- **Metal katalizli kimyasal reaksiyonlar;** redoks metaller Aβ zinciri üzerindeki aminoasitler ile etkileşebilir [26]. Aβ; Cu(II) iyonlarını Cu(I)'e indirgeyebilir, Fe(III) iyonlarını Fe(II)'e indirgeyebilir, bu reaksiyonlar sırasında ROS açığa çıkar [44].

Demir, bakır ve çinko iyonları Aβ'ya doğrudan bağlanabilir, kendi kendine biraraya gelmesini destekleyerek agregasyonunu uyarabilir [1,2,16,20,24,40,44,70,118,120,122,135-137].

Aβ proteininin ilk 16 aminoasiti bakırın bağlanması için kritiktir [1]. Aβ monomerlerinin His6, His13 ve His14 aminoasitleri Cu(II)'ye yüksek affinite ile bağlanırken [1,2,8,13,19,20,68,75,103] Tyr10 ve Met35 aminoasitlerine zayıf affinite ile bağlanır [1,75]. Ayrıca Aβ42'nin bakır iyonlarına affinitesi Aβ40'dan daha fazladır, bu nedenle bakırın Aβ42 ile oluşturduğu kompleks Aβ40 ile olan kompleksten daha toksik niteliktedir [1,44].

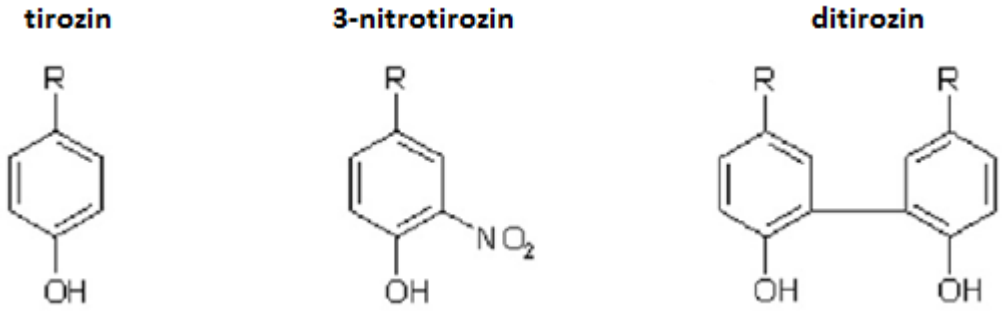
İnsan hücrelerinde üretilen Aβ ile farelerde üretilen Aβ arasında fark bulunmaktadır. İnsan Aβ'sındaki Arjinin5, Tirozin10 ile Histidin13 aminoasitleri fare Aβ dizisinde yer değiştirmiştir. Fare Aβ proteininin bakır metali ile etkileşimi sonucu agregasyona daha

az eğilim gösterdiğinin anlaşılması ve fare beyninde insandakine benzer amiloid plakların oluşmaması insanda Alzheimer patolojisinde bu aminoasit dizisinin ve Aβ-Cu kompleksinin önemini gözler önüne sermektedir [2,137]. Aβ proteinlerinin redoks aktivite sıralaması Aβ42(insan) > Aβ40(insan) > Aβ40(fare) şeklindedir [2,40,43,73].

Aβ ile bakır iyonları arasındaki etkileşim Aβ'yı konformasyonel değişikliğe uğratır, β-sheet yapı kazanmasını sağlayarak toksik oligomerleri oluşturur [8,10,11,26,64,75,82]. β-sheet yapılar proteinlerin daha düzenli yapı kazanarak biraraya gelmelerini kolaylaştırmaktadır [17,26]. Oligomerik Aβ'nın diğer Aβ yapılarından daha toksik olduğu düşünüldüğünde; nöronlar üzerinde bakır iyonlarının toksik etki meydana getirmesi açıklanabilir [118]. Cu(II), bir ya da birden daha fazla Aβ ile bağlanarak kompleks oluşturabilir ve Cu(II) ile Aβ affinitesi attomolardan mikromolara kadar değişebilir [2,13].

Aβ'nin bakır iyonları ile etkileşimi pH'a bağlı olarak değişebilmektedir. Bakır iyonları Aβ ile asidik koşullarda etkileşirse çözünmez agregatlar oluşurken, nötral pH koşullarında çözünür agregatlar meydana getirir [40,43,66,137]. Aβ, düşük μM konsantrasyonlarındaki bakır iyonları ile etkileşebilir [43].

Tirozin aminoasidi, yapısında aromatik halka barındırması nedeniyle oksidatif uyaranlara karşı oldukça hassastır [2,82]. Aβ'nın Tirozin10 aminoasidinin, Cu(II) ve H_2O_2 ile etkileşimi sonucu proteaza dirençli çapraz bağlı ditirozin yapıları oluşur. Bu yapı düzenlenerek agrega formları kolayca oluşturur (Şekil 2.10) [12,20,24,44,82,120]. Dolaysıyla bakır iyonları, Aβ dimer ve oligomerilerini meydana getirerek klirense karşı Aβ'nın direnç kazanmasına neden olur [40].



Şekil 2.10 Tirozin, 3-nitrotirozin, ditirozin [82]

Aβ, bir bakır bağımlı enzim olan sitokrom c oksidaz enzimini inhibe edebilme özelliğindedir [6,121,138]. Sitokrom oksidazın inhibisyonu mitokondriyal elektron transfer sisteminde aktivasyon kaybı meydana getirerek, elektron transfer sisteminde elektron sızıntılarının artmasını ve serbest elektronların mitokondri zarı çevresindeki oksijenlerle birleşerek ROS oluşturmasına neden olarak oksidatif stresi meydana getirir [65].

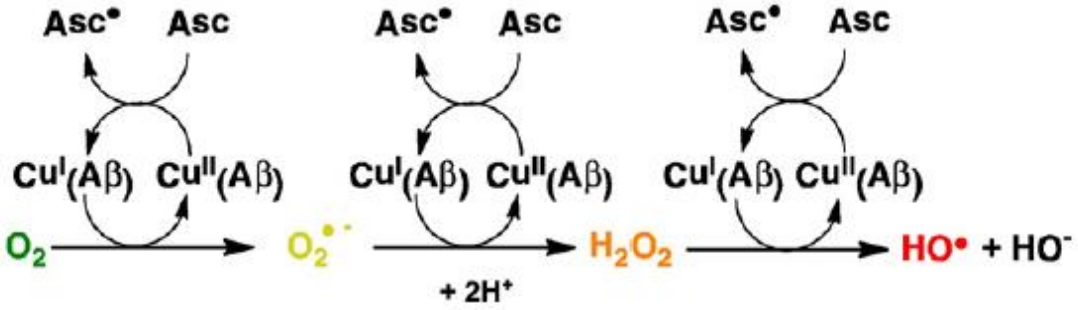
Aβ'nın geçiş metalleri ile etkileşiminin, ROS üretimini doğurduğu bilinmektedir [26,33,61,139]. Buna göre; Aβ42 ile Cu(II)'ın biraraya gelmesi sonucu redoks-aktif yapılı bir kompleks oluşur ve Aβ'dan Cu(II)'ye elektron transferi gerçekleşir. Cu(II)'ye transfer edilen bir elektron, Cu(II)'nin indirgenerek Cu(I)'e dönüşmesini sağlarken Aβ bir peptit radikaline dönüşür ve serbest radikal özelliği kazanır. Ardından Cu(I), oksijen ile etkileşerek iki elektronunu oksijene verir ve açığa H_2O_2 çıkar. Oluşan H_2O_2, metal katalizli Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikaline çevrilirken, elektron vererek radikalik hale gelmiş olan Aβ-Cu(I) kompleksi ise bir indirgeyici ajanın varlığında yeniden Aβ-Cu(II)'ye dönüştürülerek kısır bir döngünün meydana gelmesine yol açabilir. Bu biyolojik indirgeyici ajan askorbik asit (askorbat), kolesterol veya katekolamin olabilir [26,33,40,64,69,74,139].

$$A\beta - Cu(II) + AscH^- \leftrightarrow A\beta - Cu(I) + Asc^{\bullet -} + H^+$$
$$A\beta - Cu(II) + Asc^{\bullet -} \leftrightarrow A\beta - Cu(I) + Asc$$
$$A\beta - Cu(I) + H_2O_2 \rightarrow A\beta - Cu(II) + {}^{\bullet}OH + OH^- \text{ (Fenton)}$$

Aβ-Cu(II) kompleksi, moleküler oksijeni süperoksit radikaline indirgeyerek ROS oluşturulabileceği zincirleme reaksiyonları başlatabilir [139].

$$A\beta - Cu(II) + O_2^{\bullet -} \leftrightarrow A\beta - Cu(I) + O_2$$

Aβ, bakır iyonlarına benzer şekilde, Fe(III) iyonu ile etkileşerek Fe(II)'ye indirgenmesini sağlayabilir ve ortaya çok sayıda ROS çıkar [8,13,26,34,80].

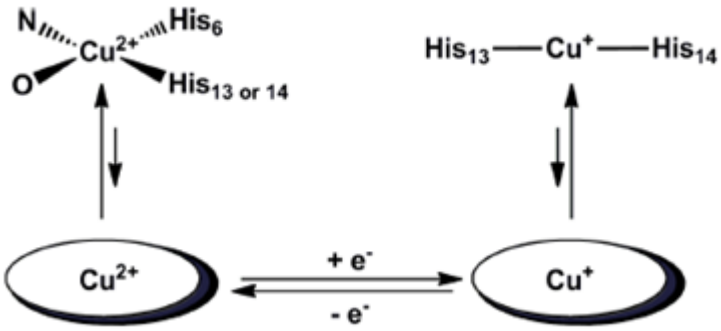


Şekil 2. 11 Aβ-Cu(I) ve Aβ-Cu(II) komplekslerinin redoks aktivitesi (Asc:askorbat) [5,19,98]

Aβ ile bakır metalinin oluşturduğu komplekslerde bakırın indirgenmesi sırasında elektron kaynağı olarak işlev yapan metiyonin35 aminoasidi sülfit radikaline dönüşür [19,20,82]. Oluşan metiyonin sülfoksit radikali proteinleri okside edebilir. 28 aminoasitten oluşan ve metiyonin35 bulundurmayan Aβ28'in; Cu(II) ile bağlanabildiğinin ancak bakırı indirgeyemediğinin anlaşılması sonucu bakır indirgenmesinde metiyonin35 aminoasidinin rolü olabileceği düşünülmüştür [24,42,75,95]. Ayrıca oksidasyona uğramış metiyonin35'e sahip olan Aβ peptitlerinin hücre membranına olan affinitesi azalmakta ve kendi kendine biraraya gelme eğilimi artmaktadır [40].

$$MetS + A\beta - Cu(II) \leftrightarrow MetS^{\bullet +} + A\beta - Cu(I)$$

Cu(II) ile Cu(I) iyonlarının Aβ ile oluşturduğu yapılar farklıdır ve bakırın indirgenmesi için gerekli olan bu iki yapı arasındaki dönüşüm bir enerjiye ihtiyaç duyar [66,68,118]. Aβ-Cu(II) kompleksinden elektron transferi bu gereken enerjinin sağlanması için konformasyonel bir değişim sağlamaktadır [118].



Şekil 2.12 Aβ ile Cu(II) ve Cu(I) iyonlarının etkileşimi [66]

Aβ Fenton ve Haber Weiss reaksiyonlarının yanısıra, hidrofobik özellikteki karboksil ucu ile moleküler oksijeni tutuklayarak metaller ile reaksiyona girmesini ve metallerin bu yolla indirgenerek ROS üretmesini sağlayabilmektedir [17,80,82,140].

Aβ-Cu(II) kompleksi *in vitro* koşullarda hücre kültüründe, Cu(II) iyonlarının ve Aβ'nın tek başına meydana getirdiği toksisitesiyi güçlendirmektedir [11,26,68]. Aşırı miktarda Cu(II), hidrojen peroksit ve süperoksit radikali üretimini uyarmaktadır [141]. Hidrojen peroksit üretimi için iki elektrona ihtiyaç vardır ve bu üretimin gerçekleşebilmesi için iki elektronun koparılabileceği dimerik bir yapıya ihtiyaç vardır. Bu dimerik yapı bakırın Aβ ile oluşturduğu kompleks ya da agrege haldeki Aβ olabilir. Bu durum agrege Aβ oluşumlarının, monomerik Aβ'dan daha fazla hidrojen peroksit üretmesini açıklar niteliktedir. Ayrıca Aβ-Cu(II) kompleksinin ürettiği hidrojen peroksit düzeyi, bakır bağlayıcı diğer proteinlerin bakır ile kompleks oluşturduklarında üretilen hidrojen peroksit düzeyinden daha fazladır [118]. Aβ42'nin hidrojen peroksit oluşturma kapasitesi de Aβ40'a göre daha fazladır [8,13,26,34,80].

Huang ve ark.'nın yaptığı çalışmada; Aβ'dan, Fenton reaksiyonları aracılığında Fe(III) ya da Cu(II)'ın indirgenmesi ile hidrojen peroksit üretildiği ve Cu(II) varlığında Aβ42'nin Aβ40'dan daha fazla oranda hidrojen peroksit oluşumuna yol açtığı ispatlanmıştır [40,80,140].

Uranga ve ark.'nın yaptığı çalışmada; Aβ'nın demir ya da bakır ile oluşturduğu komplekslere kısa süreli muamelenin sinaptozomlarda, membran yapısında ve mitokondriyal işlevde bozulma meydana getirdiği anlaşılmıştır. Aβ'nın metallerle yaptığı komplekslerin; sinapslarda fosfatidilinozitol-3-kinaz yolaklarını aktive ettiği ve

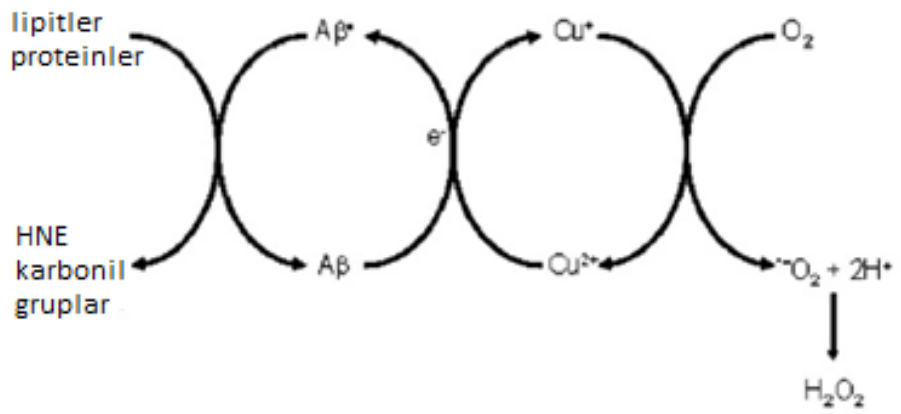
sinaps hasarı meydana getirdiği saptanmıştır. Ayrıca çalışmada Aβ'nin tek başına toksik etki meydana getirmezken, Aβ-Fe kompleksinin toksik etkiyi uyarabildiği görülmüştür [75,142]. Sonuç olarak, Aβ'nın metallerle oluşturduğu komplekslerin Aβ'nın toksisitesini arttırdığı belirlenmiştir.

Primer nöron kültüründe yapılan bir çalışmada; 10'ar μM uygulanan Cu-glisin kompleksi hücre canlılığını arttırırken, Aβ42 peptidi toksik etkide bulunmuştur. Ancak Cu-glisin ve Aβ42'nin birlikte inkübasyonu hücre ölümünü Aβ42'nin tek başına gösterdiği etkiye kıyasla önemli oranda tetiklemiştir [140]. Bu bulgular Aβ42-Cu(II) kompleksinin önemli bir sitotoksik ajan olduğunu göstermektedir. Smith ve ark.; Aβ-Cu(II) kompleksinin histidin köprüleri aracılığında oluştuğunu ve bu histidin kalıntılarının metillenmesiyle köprü oluşturması engellendiğinde primer nöron kültüründe Aβ toksisitesinin hafifletilebileceği gösterilmiştir [143].

HSA, kanda ve serebrospinal sıvıda serüloplazmine ek olarak Cu(II) transportunda görevli bir proteindir [68,144]. Cu(II), Aβ ile kompleks meydana getirerek Aβ agregasyonunu desteklerken; HSA, Aβ ile kompleks meydana getirerek Aβ agregasyonunu inhibe etmektedir. Perrone ve ark.'nın yaptığı çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde Aβ, HSA ve Cu(II)'nin arasındaki ilişki incelenmiştir. Yapılan çalışmada Cu(II) iyonlarının HSA ile affinitesinin, Aβ40 ile olan affinitesinden daha yüksek bulunmuştur [68,144]. SH-SY5Y hücrelerinde HSA, Cu(II) iyonlarını tutarak Aβ ile kompleks oluşturmasını engellemiş, hücre canlılığını desteklemiş ve Aβ-Cu(II) kompleksinin ürettiği ROS miktarını azaltmıştır [68].

Aβ-Cu(II) kompleksi mikroglia aktivasyonunu uyarabilir, nitrik oksit ve TNF-α salımı yükseltebilir ve çok sayıda ROS üretimini başlatan NF-κβ uyarımını arttırabilir [141].

Aβ'nin kendisi peptidil radikale dönüşerek ROS üretimine doğrudan katılabileceği gibi, dolaylı yoldan nükleer faktör κβ'yi uyaran RAGE adı verilen reseptörlere bağlanarak ROS üretebilir [10,17,61,64,79]. Bu nedenle Aβ önemli bir oksidatif stres kaynağıdır [25,30]. Lipit ve proteinleri okside ederek peptidil radikal niteliği kazanan Aβ, bakır iyonlarını indirgeyerek Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 üretir (Şekil 2. 13).



Lipit peroksidasyonu ile oluşan HNE ve protein oksidasyon ürünü olan karbonil grupları Aβ'nın Cu(II) iyonlarını elektron transferi yoluyla Cu(I) iyonuna indirgemesini sağlar. Ardından radikalik Aβ ve indirgenmiş Cu(I) eski haline aynı reaksiyonun ters yönde ilerlemesiyle ulaşabilir. Ancak Cu(I)'in yeniden yükseltgenmesi sırasında moleküler oksijen de süperoksit radikaline ve sonrasında hidrojen perokside dönüşür.

Şekil 2.13 Oksidatif ürünler, Aβ ve bakır iyonları arasındaki ilişki [82]

Wan ve ark.'nın çalışmasında; 100 µM demir iyonlarına maruz bırakılan Swedish APPsw SH-SY5Y hücrelerinde, demir konsantrasyonundaki artışa paralel olarak salınan Aβ miktarı artmış, SOD aktivitesi azalmış, mitokondriyal membran potansiyeli düşmüş, lipit peroksidasyonu yükselmiş, hücre canlılığı azalmıştır. Aβ'nın hücre içerine demir iyonlarının girişini destekleyici etkide bulunduğu da saptanmıştır [145]. Sonuçlar demir iyonlarının Alzheimer patolojisinde önemli rol oynayan metallerden biri olduğunu kanıtlamaktadır.

Banerjee ve ark.; farklı konsantrasyonlarda ferrik amonyum sitrat (FAC) ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde, BACE1 aktivasyonundaki artışa bağlı olarak besi ortamına salgılanan Aβ42 miktarında artış olduğunu göstermiştir. 400 µM FAC uygulaması Aβ42 oligomerizasyonunu desteklemiş ve NF-κβ yolağının demir iyonları tarafından uyarılması ile ROS üretimi artmıştır [146].

Part ve ark.; mikroglia BV2 hücrelerinde, Aβ25-35 dizisinin NADPH oksidaz kaynaklı ROS üretimine neden olduğunu göstermiştir. NADPH oksidaz enzim aktivitesi, hücre içi demir konsantrasyonlarındaki değişimden etkilenmektedir. Dolayısıyla Aβ, kalsiyum homeostazisinde bozulma, mitokondriyal membran potansiyelinde düşüş, antioksidan

sistemde zayıflama etkilerinin yanısıra demir aracılı ve NADPH oksidaz bağımlı ROS üretimine de yol açmaktadır [147].

Bautista ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücrelerinde demir iyonlarının MAPK yolaklarını uyararak ROS miktarını, 3-nitrotirozin düzeyini, hücre ölümünü ve metal taşıyıcı DMT1 ifadelenmesini arttırmıştır. Düşük konsantrasyonda demir iyonları (25-100 µM) mitokondriyal hasarı desteklerken, yüksek demir konsantrasyonları (500-1000 µM) apoptozise neden olmuştur [148].

Becerril-Ortega ve ark.; *in vivo* koşullarda APP/PS1 transgenik farelerde, in vitro koşullarda primer kortikal nöronlarında $FeSO_4$ uygulamasının, ROS üreterek hücre içi kalsiyum iyonlarının düzeyini arttırdığını ve böylece NDMA aktivasyonu ile APP proteolizini etkiyerek Aβ üretimini desteklediğini, hücresel toksisiteye neden olduğunu göstermiştir [149].

Gwon ve ark.'nın yaptığı çalışmada; $FeSO_4$ ya da lipit peroksidasyon ürünlerinden biri olan HNE'nin primer nöron ve Swedish mutant SH-SY5Y hücrelerine 4 saat boyunca uygulanması sonucu γ-sekretaz aktivitesinin, toplam Aβ üretiminin ve Aβ42/Aβ40 oranının arttığı görülmüştür. HNE'nin neden olduğu bu etkiler antioksidan özellikte olan GSH'ın varlığında ise inhibe olmuştur [94]. Sonuçlar demir iyonlarının ve lipit peroksidasyon ürünlerinin hücreler üzerinde oksidatif stresi uyararak Aβ düzeyine etki ettiğini ve bu etkilerin bir antioksidan bileşiğin oksidatif ürünleri elemine etmesiyle normale dönebildiğini göstermiştir.

Liu ve ark.; SH-SY5Y hücrelerine Aβ peptidinin tek başına ve demir iyonları ile birlikte uygulanmasının hücreler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Tek başına Aβ mevcudiyetinin hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemezken, demir ile birlikte Aβ'nın inkübasyonunun hücre canlılığı önemli oranda azalttığı anlaşılmıştır. Demir iyonları; Fenton reaksiyonları ile oksidatif stres koşulları meydana getirirken, diğer taraftan Aβ peptitlerinin β-sheet yapı kazanarak agrege olmasını önleyerek oligomerik yapı kazanmasına, dolayısıyla toksik niteliğinde artışa neden olmuştur [150]. Oligomerik Aβ türlerinin monomerik, fibriler ve agrege haldeki Aβ yapılarından daha toksik olduğu bilinmektedir.

Zheng ve ark. yaptığı çalışmada postmortem beyin dokusundan elde edilen amiloid plaklarda bakır taşıyıcı olan DMT1 ile Aβ'nın birarada bulunduğu tespit edilmiştir.

APP'yi aşırı eksprese eden Swedish mutant SH-SY5Y hücrelerinde de DMT1 seviyesinde artış olduğu saptanmıştır. DMT1, APP proteolizini amiloidojenik yolağa doğru yönlendirmektedir. DMT1 geni sessiz hale getirildiğinde ise metal iyon düzeyinde ve Aβ seviyesinde azalma meydana gelmiştir [120]. DMT1 bakır gibi divalent metallerin taşıyıcısı olduğu bilindiğine göre; bu çalışma bakır iyonları ile Aβ arasındaki yakın ilişkiye ışık tutmaktadır.

Yu ve ark.'nın yaptığı çalışmada fare mikroglial hücre hattı BV-2 ve primer kortikal nöronlara tek başına Aβ, tek başına Cu(II) ve Aβ-Cu(II) kompleksi ayrı ayrı uygulanmıştır. Bu bileşenler tek başına önemli bir etkide bulunmazken Aβ-Cu(II) kompleksi NADPH oksidaz enziminden bağımsız olarak hidrojen peroksit üretimini arttırmıştır [141]. Çalışma sonuçları bakır iyonlarının Aβ ile oluşturduğu komplekslerin oksidatif hasarı ve sitotoksisiteyi arttırdığını göstermiştir. Bu nedenle bakır iyonları, Alzheimer patolojisinde oksidatif stres uyaranı olarak önemli bir rol üstlenmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Materyaller

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı (CRL-2266, ATCC, American Type Culture Collection, ABD), DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, no glucose, Gibco, ABD), Nutrient Mixture F-12 (Gibco, ABD), Non Essential Amino Acids (Thermo Fisher Scientific, ABD), Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin) (Sigma, ABD), FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, USA), Protease Inhibitor Cocktail (Millipore, ABD), DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, low glucose, GlutaMAX^{TM}) (Invitrogen, ABD), N-2 Supplement (Invitrogen, ABD), Retinoic Acid (Sigma, ABD), H2DCFDA (H2-DCF, DCF) (Thermo Fisher Scientific, ABD), Beta Amyloid 42 Elisa Kit (KHB3441, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Biosource, Thermo Fisher Scientific, ABD), Beta Amyloid 40 Elisa Kit (KHB3481, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Biosource, Thermo Fisher Scientific, ABD), PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4) (Gibco, ABD), $CuSO_4$ (Bakır(II) sülfat, anhydrous) (Sigma, ABD), Trypsin/EDTA Solution (Sigma, USA), Trypan Blue Solution (Sigma, ABD), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma, ABD), DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma, ABD) kullanılan materyallerdir.

Çizelge 3. 1 Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihaz/Materyal	Marka	İşlev
Laminar air flow kabin	JSR	Deneylerin gerçekleştirilmesi
CO_2'li inkübatör	Memmert	Hücrelerin inkübasyonu
Inverted mikroskop	Moticam	Hücrelerin morfolojik incelenmesi
Hassas terazi	Radwag	Çözelti hazırlama işlemleri
Sıvı azot ünitesi	International Cryogenic	Hücrelerin uzun sure saklanması
Otoklav cihazı	Vwr	Sterilizasyon işlemleri
Santrifüj cihazı	Nüve	Santrifüj işlemleri
Su banyosu	Gfl	Kültür malzemelerinin uygun sıcaklığa getirilmesi
ELISA plak okuyucu	Thermo	Çok kuyucuklu kültür plaklarının gereken dalgaboyunda ölçümlerinin alınması
Floresans mikroskop	Olympus CKX41	Reaktif oksijen türlerinin belirlenmesinde floresans özellikten yararlanılması
Distile su cihazı	Nüve	Çözelti hazırlama işlemleri
25 ve 75 cm^2'lik kültür flaskları	Corning	Hücre kültürü işlemleri
Çok kuyucuklu kültür plakları	Corning	Hücre kültürü işlemleri ve deneylerin gerçekleştirilmesi
Otomatik pipetler (10, 100, 1000 µL)	Eppendorf Ag	Hücre kültürü işlemleri ve deneylerin gerçekleştirilmesi
Çok kanallı ayarlanabilir pipet	Axygen	Hücre kültürü işlemleri ve deneylerin gerçekleştirilmesi
Steril serolojik pipetler (2, 5, 10 mL)	Cellstar	Hücre kültürü işlemleri ve deneylerin gerçekleştirilmesi
0,22 µm filtre	Corning	Filtreleme işlemleri
Mikrosantrifüj tüp (1,5 mL)	Corning	Elisa numune toplama ve stok çözelti hazırlama işlemleri
Falcon tüp (15, 50 mL)	Vwr	Hücre kültürü işlemleri
Kriyovial	Corning	Hücrelerin dondurularak saklanması

3.2 SH-SY5Y Hücrelerinin Kültürü

İnsan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) için; kültür ortamı olarak 1:1 oranında karıştırılmış DMEM (glikozsuz):F12 besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamına %1 Antibiotic Antimycotic Solution (penicillin-streptomycin), %1 Non Essential Amino Acids ve %10 FBS eklenmiştir. Hücreler 25 ve 75 cm^2'lik kültür flasklarında 37 ^{0}C 'de %5

CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir (ATCC, CRL-2266). Besi ortamı iki günde bir yenilenmiştir [151].

3.3 SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması

Kültür flasklarında besi ortamında kültürlenen SH-SY5Y hücrelerinin yoğunluğu %75-80 oranına ulaştığında pasajlanmıştır.

Kültür flaskındaki hücrelerin bulunduğu, kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Trysin/EDTA çözeltisi eklenen kültür flaskları 2 dk boyunca 37 ^{0}C'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilerek, hücrelerin bulundukları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Ardından flasktaki hücreler taze besi ortamı ile buluşturularak steril bir tüpe alınmış ve 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan hücre pelleti, supernatant uzaklaştırıldıktan sonra taze besiyeri içinde çözülerek 1:5 oranında olacak şekilde, kültür flaskındaki taze besi ortamı üzerine eklenmiştir.

3.4 SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması

Dondurma işlemi için; büyüme ortamında kullanılan besi ortamı yerine, dondurma besi ortamı kullanılmıştır. Dondurma besi ortamı; %1 Antibiotic Antimycotic Solution (penicillin-streptomycin), %1 Non Essential Amino Acids, %20 FBS ve %5 DMSO içeren 1:1 oranında karıştırılmış DMEM (glikozsuz): F12 şeklindedir.

Kültür flasklarında büyüme besi ortamında kültürlenen SH-SY5Y hücrelerinin yoğunluğu %85-90 oranına ulaştığında dondurma işlemi yapılmıştır. Buna göre; SH-SY5Y hücrelerinden pasajlama işleminde santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti, dondurma besi ortamı içerisinde çözülerek kriyoviallere alınmıştır. Etiketlenerek işaretlenen kriyovialler kademeli olarak soğutma işlemine tabi tutulmuştur. Kriyovialler 1 saat +4 ^{0}C'de, 2 saat -20 ^{0}C'de ve 24 saat -80 ^{0}C'de saklandıktan sonra, uzun süreli saklama işlemi için sıvı azot ünitesine yerleştirilmiştir.

3.5 SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

Farklılaştırma için kullanmak üzere; %1 Antibiotic Antimycotic Solution (penicillin-streptomycin) ve %1 N2-Supplement içeren DMEM (düşük glikoz) besi ortamı hazırlanmıştır.

Stok retinoik asit çözeltisi; 3 mg/ml (0,01 M) konsantrasyona sahip olacak şekilde, filtrelenerek steril hale getirilmiş DMSO içinde çözülerek hazırlanmış ve düşük hacimlerde alikotlanarak, karanlık koşulda -20 ^{0}C'de saklanmıştır. Retinoik asit ısı, ışık ve atmosfere karşı hassas olduğu için; kullanım öncesinde gerekli hacimde alınarak, önceden 37 ^{0}C'ye ısıtılmış olan kültür besi ortamına eklenmiştir.

Farklılaştırma için, hücreler 96 kuyucuklu kültür plaklarına 25000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında kültür ortamı uzaklaştırılarak yerine farklılaştırma besi ortamı eklenmiştir. Farklılaştırmanın sağlanabilmesi için besi ortamına son konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde retinoik asit eklenmiş ve kültür plakları 37 ^{0}C 'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Farklılaştırma 6 gün boyunca, her iki günde bir besi ortamı ve retinoik asit yenilenerek sürdürülmüştür.

3.6 SHSY5Y Hücrelerinin Metal iyonları ile Muamelesi

Metal uygulaması için; stok $CuSO_4$ çözeltisi; 10 mM konsantrasyona sahip olacak şekilde steril bidistile su içinde hazırlanmış ve filtrelenerek karanlık koşulda +4 ^{0}C'de saklanmıştır. Uygulamada istenen konsantrasyona göre besi ortamı içinde seyreltilerek kullanılmıştır.

SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiş ve 24 saat boyunca 37 ^{0}C 'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu deney çalışması için uygun hale geldiğinde kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılarak 50, 100, 200, 400 ve 800 μM $CuSO_4$ içeren taze besi ortamı eklenmiş ve 24 saat boyunca 37 ^{0}C'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir.

3.7 Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Metal iyonları ile Muamelesi

Farklılaşmış hücreler için de hazırlanan stok $CuSO_4$ çözeltisi kullanılmıştır.

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine metal uygulaması için; SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilerek retinoik asit aracılığında farklılaştırılmıştır. Farklılaştırma süresinin sonunda kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılarak 50, 100, 200, 400 ve 800 µM $CuSO_4$ içeren taze farklılaştırma besi ortamı eklenmiş ve 24 saat boyunca 37 ^{0}C 'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir.

3.8 Hücre Canlılık Testleri

Hücre canlılık testi için MTT (3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi kullanılmıştır.

Yöntemde kullanmak üzere MTT çözeltisi; farklılaşmamış hücreler için 5 mg/ml, farklılaşmış hücreler için 2 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde steril PBS içinde hazırlanmış ve filtrelenerek, karanlık koşulda +4 ^{0}C'de saklanmıştır.

25 cm^{2}'lik kültür flasklarında kültürlenen SH-SY5Y hücreleri Trypan Blue Solution ile hemositometrik yöntem ile sayılarak 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plağına ekilmiştir ve uygun yoğunluğa ulaşana kadar 24 saat 37 ^{0}C 'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 50, 100, 200, 400 ve 800 µM $CuSO_4$ içeren besi ortamı ile kuyucuklardaki besi ortamları tazelenmiştir ve 24 saat süreyle 37 ^{0}C'de %5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sona ermesiyle birlikte her kuyucuktaki besi ortamı uzaklaştırılarak, 5 mg/ml MTT çözeltisi 100 µl olacak şekilde karanlık koşulda eklenmiştir ve 6 saat süreyle 37 ^{0}C'de %5 CO_2 koşullarında karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve kuyucuklardaki formazan kristaller 100 µl DMSO ile çözülmüştür. Kültür plağı 540 nm dalga boyunda, ELISA plak okuyucu cihazda okunmuştur (Thermo Labsystem, Multiskan Ascent, ELISA plate reader).

96 kuyucuklu kültür plaklarına 25.000 hücre/kuyucuk şekilde ekilerek retinoik asit muamelesi ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 50, 100, 200, 400 ve 800 µM $CuSO_4$ uygulanmış ve 24 saat süreyle 37 ^{0}C 'de % 5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından her kuyucuktan uzaklaştırılan besi ortamının yerine 2 mg/ml

MTT çözeltisi, 100 µl olacak şekilde, karanlık koşulda uygulanmış ve 4 saat süreyle 37 ^{0}C ‘de %5 CO_2 koşullarında karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve kuyucuklardaki formazan kristaller 100 µl DMSO ile çözülmüştür. Kültür plağı 540 nm dalga boyunda, ELISA plak okuyucu cihazda okunmuştur (Thermo Labsystem, Multiskan Ascent, ELISA plate reader).

3.9 Amiloid-β Tespiti

SH-SY5Y hücrelerinin üreterek besi ortamına salgıladığı Aβ miktarı Beta Amyloid 42 ELISA ve Beta Amyloid 40 ELISA Kitleri ile tespit edilmiştir.

Farklılaşmamış SH-SY5Y ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri, belirtilen $CuSO_4$ konsantrasyonlarına göre hazırlanan besi ortamları ile 24 saat boyunca 37 ^{0}C ‘de %5 CO_2 koşullarında muamele edilmiştir. Süre sonunda farklı konsantrasyonlarda $CuSO_4$ içeren besi ortamı ve kontrol grup olarak $CuSO_4$ içermeyen besi ortamı toplanmıştır. Toplanan besi ortamları 1400 rpm’de +4 °C’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Toplanan supernatantlar, önceden içine proteaz inhibitör kokteyl konularak hazırlanmış ve etiketlenmiş tüplere alınmıştır. İçinde numune bulunan tüpler, Aβ miktarını tespit etmek amacıyla ELISA kitleri kullanılana kadar -80 ^{0}C’de saklanmıştır.

Aβ ölçümü ELISA kit prosedürlerine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre -80 ^{0}C’de saklanan besi ortamı numunelerinin sıcaklığı, kademeli olarak, oda sıcaklığına ulaşana dek beklenmiştir. Kit ile sağlanan liyofilize Aβ standartları hazırlanan sodyum bikarbonat tampon çözeltisi ile çözünerek seri dilüsyonları elde edilmiştir. Ardından standart dilüsyonları, kontrol gruplar ile farklı $CuSO_4$ grupları için numune besi ortamları; her kuyucukta 50 µl olacak şekilde, kitte yer alan 96 kuyucuklu kültür plağına konulmuştur. Üzerine 50 µl ‘Aβ Detection Antibody’ eklenerek 3 saat süreyle oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından yapılan yıkama işlemleri sonrası, 100 µl HRP Anti-Rabbit Antibody ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar 100 µl hacmindeki kromojen boyaya 30 dakika süreyle oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda maruz bırakıldıktan sonra, 100 µl reaksiyonu durdurucu çözelti eklenerek reaksiyonlar sonlandırılmıştır.

Kültür plak 450 nm dalga boyunda ELISA plak okuyucu cihazda okunmuştur (Thermo Labsystem, Multiskan Ascent, ELISA plate reader).

3.10 Reaktif Oksijen Türlerinin İncelenmesi

Reaktif oksijen türlerinin ölçüm yönteminde H2DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescin diacetate) kullanılmıştır. Dış uyaranlara karşı hassas olan H2DCFH-DA stok çözeltisi; 10 mM konsantrasyonda olacak şekilde, filtrelenerek steril hale getirilmiş DMSO içinde çözülerek hazırlanmıştır. Stok çözelti düşük hacimlerde alikotlanarak, -80 ^{0}C'de ve karanlık koşullarda saklanmıştır. Reaktif oksijen türleri tespiti deneylerinde kullanılmak üzere, stok H2DCFH-DA çözeltisinden istenen konsantrasyona uygun olacak şekilde, PBS içinde seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanmış ve deneyde kullanıldıktan sonra artan çalışma solüsyonu, etkinliğini yitirmesi nedeniyle, yeniden kullanılmamıştır.

Farklılaşmamış SH-SY5Y ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri, belirtilen $CuSO_4$ konsantrasyonlarına göre hazırlanan besi ortamları ile 24 saat boyunca 37 ^{0}C 'de %5 CO_2 koşullarında muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kontrol gruptaki ve $CuSO_4$ uygulanan gruplardaki hücrelerin besi ortamı uzaklaştırılarak, 37 ^{0}C 'ye ısıtılmış PBS çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. Ardından hücreler PBS içinde hazırlanmış olan 10 µM H2DCFH-DA ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 100 µM H_2O_2 kullanılmıştır. 50 dakikalık 37 ^{0}C 'de ve karanlık koşuldaki inkübasyon sonrası kültür plağı floresans mikroskopta (Olympus CKX41 Microscope) 485 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon dalga boyu aralığında incelenmiştir.

3.11 İstatistiksel Analiz

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik analizi inverted mikroskop ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılık testi sonuçlarının ELISA plak okuyucu cihazda okunmasıyla elde edilen absorbans değerleri hücresel yüzde canlılık değerini vermektedir. Etkisi incelenen her $CuSO_4$ konsantrasyonu için deneyler 9 kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır. Buna göre; $CuSO_4$ eklenmeyen kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer %100 kabul edilmiştir. $CuSO_4$ eklenmiş olan

kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlanarak hücre canlılık yüzdesi belirlenmiş ve standart sapma hesaplanmıştır. Absorbanslara bağlı hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formül ile her konsantrasyon için hesaplanmıştır:

Hücre canlılığı (%) = $(OD_{örnek}-OD_{blank}) / (OD_{kontrol}-OD_{blank}) \times 100$

Aβ düzeyi ölçümünde; Beta Amyloid 42 ve Beta Amyloid 40 ELISA kitleri ile gerçekleştirilen deneylerden absorbanslar elde edilmiştir. Kitler ile sağlanan Aβ40 ve Aβ42 standartlarının seri dilüsyonlarından faydalanarak çizilen standart eğrilerinden, toplanan numunelerdeki Aβ40 ve Aβ42 konsantrasyonları tespit edilmiştir.

Reaktif oksijen türlerinin ölçümünde floresans mikroskopta elde edilen görüntüler ve floresans yoğunluğu hücreler tarafından üretilen ROS düzeyini belirtmektedir. Buna göre; etkisi belirlenmek istenen $CuSO_4$ konsantrasyonları için tekrarlanan deneylerden elde edilen floresans mikroskop görüntüleri, $CuSO_4$ uygulanmayan kontrol kuyucuklarından elde edilen görüntüler ile pozitif kontrol olarak seçilen H_2O_2 uygulanan kuyucuklardan alınan görüntüler floresans yoğunluklarına göre kıyaslanmıştır. Bu şekilde hücreiçi ROS düzeyi hakkında değerlendirme yapılmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 SHSY-5Y Hücrelerinin Kültürlenmesi, Pasajlanması ve Dondurulması

SH-SY5Y hücreleri; nöroblastom hastası bir bireyin kemik iliğinden türetilmiş SK-N-SH hücre hattından, üçüncü soy olarak elde edilmiş olan nöron-benzeri hücrelerden oluşmuştur. Katekolaminerjik nöron karakterine sahip hücrelerdir. SH-SY5Y hücrelerinin kültürü başlangıçta yapışkan ve süspansiyon hücrelerin birarada bulunduğu kültür şeklindedir, ancak pasajlama işlemi sırasında süspansiyon hücreler kaybedilir. Bu hücreler APP ve sekretaz enzimlerini barındırdığı gibi besi ortamına Aβ salabilir [151-157].

SH-SY5Y hücreleri, sahip oldukları ekstraselüler matriks gereği, bulundukları kültür flasklarına zayıf bir şekilde tutunarak çoğalmaktadır. Bu nedenle pasaj işlemleri ve gerçekleştirilen deneyler sırasında, hücrelerin uygulanan metot nedeniyle yüzeyden koparak uzaklaşmamaları için gerekli hassasiyet gösterilmiştir.

SH-SY5Y hücreleri; pasaj işlemi sırasında, Trypsin/EDTA çözeltisinin serum varlığında inaktif olması nedeniyle öncelikle PBS çözeltisi ile yıkanmış ve ortamdaki serumun uzaklaşması sağlanmıştır. Trypsin/EDTA çözeltisi hücrelerin bağlı oldukları yüzeyden ayrılarak bulundukları sıvı içerisinde yüzer hale geçmelerini sağlamaktadır [151]. Yüzeye zayıf şekilde tutunmuş haldeki SH-SY5Y hücrelerinin Trypsin/EDTA çözeltisi ile muamele süresi kısa tutulmuştur. Hücrelerin tamamen yüzeyden ayrılması için bu çözelti varlığında, 37 ^{0}C ve %5 CO_2 koşullarında 2 dakikalık inkübasyon yeterlidir.

Kültür işlemi boyunca, gün aşırı, hücrelerin morfolojik durumu incelenmiş ve iki günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücre yoğunluğu fazla olduğunda hücreler biraraya gelerek kümelenmekte ve ölüm hızında artış olmakta, hücre yoğunluğu az olduğunda ise hücrelerin çoğalma hızı yavaşlamakta ve istenen yoğunluğa daha geç ulaşmaktadır [151]. Bu nedenle pasajlama işlemi hücre yoğunluğu gözetilerek gerçekleştirilmiştir.

SH-SY5Y hücrelerinin pasaj numarası önemlidir. Pasaj numarasında artış hücrelerin morfolojik ve karakteristik özelliklerini yitirmesine yol açmaktadır. Ancak protein ifadelenmesinde değişim olmamaktadır [158]. Bu tez çalışmasında 13-20 pasaj numarası aralığındaki SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin tez çalışması boyunca kullanılabilmesi için, kültürlenen hücrelerin bir kısmı dondurma işlemine tabi tutularak yedeklenmiştir.

Belirli pasaj numaralarında sıvı azot ünitesinde tutulan hücreler deney çalışmalarında kullanmak üzere çözülerek yeniden kültürlenmiştir. Bunun için; sıvı azot ünitesinden alınan kriyovial tüp, hızla çözme işlemlerine tabi tutulmuştur. Kriyovial içinde hücrelerin bulunduğu besi ortamı donmuş haldedir ve tamamen çözülmesi amacıyla, kriyovial 1-2 dakika kadar 37 ^{0}C sıcaklıktaki su içinde, tamamen batmayacak şekilde tutulmuştur. Ardından kriyovial içindeki besi ortamı, içerisinde taze besi ortamı bulunan tüpe alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, supernatant atılmış ve oluşan hücre pelleti taze besi ortamı içinde çözülerek, önceden besi ortamı ilave edilmiş olan 25 cm^{2}'lik kültür flaskına konulmuştur. Kültür flaskı 37 ^{0}C ve %5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı azot ünitesinden çıkarılarak çözülen hücreler, flasklara eklendikten sonra iki günde bir besi ortamı yenilenmiştir ve bu koşullarda bir hafta içerisinde flasklardaki hücresel yoğunluk %70 oranına ulaşabilmektedir.

4.2 SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaştırılması

Alzheimer hastalığı çalışmalarında literatürde, *in vitro* koşullarda primer nöron hücreleri, fare adrenal medullasının feokromositomasından elde edilmiş PC12 hücreleri, SH-SY5Y hücreleri veya APP geni bakımından transfekte hale getirilmiş SH-SY5Y hücreleri kullanılmaktadır [155,159]. SH-SY5Y hücrelerinin çeşitli uyaranlarla farklılaştırılmış kültürlerinden de *in vitro* çalışmalarda yararlanılmaktadır [151,155].

Fare kaynaklı primer nöron kültürleri; olgun nöronal özellikleri göstermektedir ancak uzun süre kültürlenmeleri, nöronların post-mitotik olması nedeniyle, mümkün değildir. Ayrıca etik nedenlerden dolayı primer nöron hücrelerinin embriyolardan elde edilmelerinin önünde güçlükler bulunmaktadır [155,156]. Etik kaygılara neden olmaması ve sürekli bölünebilme özelliği nedeniyle devamlı soy hatlarından olan PC12 hücreleri kültürün devamı konusunda avantaj sağlasa da, primer nöron kültürleri gibi fare kaynaklıdır. Bu durumda Alzheimer gibi insanlara özgü olan nörodejeneratif bir hastalığı modellemede metabolik farklılıktan dolayı, kaynağı insan olmayan bu hücrelerin kullanımı uygun olmayabilir [155,159]. Yetişkin insan nöronların elde edilerek kültürlerinin yapılması ise etik olarak ve metodolojik olarak mümkün gözükmemektedir [159].

Nöroblastoma; genelde genç çocuklarda görülen sempatik sinir sisteminde yaygın olan bir tümördür [157]. İnsan nöroblastoma hücrelerini barından SH-SY5Y hücreleri, insan nörobiyokimyasını diğer hücre hatlarına kıyasla daha iyi yansıtmaktadır. Nöronal belirteçlerden dopamin-β-hidroksilaz ve tirozin hidroksilaz enzim aktivitesi göstermekte, sinir büyüme faktörü reseptörleri içermektedir. Nöronal tümör kaynaklı olması nedeniyle sürekli bölünen devamlı soy hatlarından olan SH-SY5Y hücreleri, uzun süreli kültür koşullarını ve çok sayıda hücre topluluğu gerektiren çalışmalarda, özellikle de toksisite çalışmalarında kullanıma uygundur [151,155,159]. SH-SY5Y hücrelerinin, primer nöron kültürlerine göre daha kolay ve daha az maliyetle kültürü yapılabilir [151]. Bu nedenlerden dolayı, bu tez çalışmasında Alzheimer modeli için SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır.

SH-SY5Y hücreleri nöron-benzeri hücrelerden meydana gelmiştir. Bu nedenle olgun nöronların tüm karakteristik özelliklerini göstermezler ve bölünerek çoğalabilmeleri bu hücreleri nöronlardan farklı kılan bir özelliktir. Ancak nöronal belirteçleri, olgun nöronlara kıyasla düşük düzeyde olsa da ifade edebilmektedirler [155,159]. SH-SY5Y hücrelerini; retinoik asit, kolesterol, forbol esterler, BDNF, nörepinefrin gibi uyaranlarla olgun nöron belirteçlerini ifade edebilecekleri nöronlar haline getirmek ise farklılaştırma yoluyla mümkündür. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin kullanımı transfekte SH-SY5Y hücre kültürüne göre daha pratik ve daha az maliyetli bir yöntemdir [151,155,156]. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin

yanısıra, retinoik asit muamelesi yoluyla farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri ile Alzheimer modeli oluşturulmuştur.

Retinoik asit vitamin A türevi olan bir moleküldür, ucuz ve etkin olması nedeniyle farklılaştırma deneylerinde sıklıkla tercih edilen bir uyarandır [151,156,157]. Retinoik asit nöronal ve glial hücrelerin promoter bölgelerini etkileyerek farklılaştırma sağlayabilmektedir [157]. SH-SY5Y hücrelerin retinoik asit ile muamelesi öncelikle morfolojik olarak hücrelerin nöronlara benzer şekilde nörit uzatmasına neden olmaktadır. Ayrıca asetilkolinesteraz aktivitesi ve nörotransmitter salınmasında artış sağlanmaktadır [151,155-157,160]. Retinoik asit ile farklılaşan SH-SY5Y hücreleri nöronlara özgü olan βIII-tübülin, MAP-2, Neun gibi nöronal belirteçleri eksprese edebilmektedir [151].

SH-SY5Y hücre kültürleri N-tip ve S-tip adı verilen iki tip hücre barındırmaktadır. S-tip hücreler Schwannian tip hücre morfolojisine benzerken, N-tip hücreler nöroblastik morfolojiye benzemektedir. Farklılaştırmada N-tipi hücrelerinin çoğunlukta olması beklenmektedir [151,155,156]. Kısa süreli retinoik asit muamelesi N-tipi hücrelerin çoğunlukta olmasını sağlarken, uzun süreli retinoik asit muamelesi S-tipi hücrelerin çoğunluğu kazanmasına neden olabilmektedir [151]. Tez kapsamında retinoik asit ile farklılaştırılan hücrelerde N-tipi hücreler çoğunluktadır.

SH-SY5Y hücreleri biraraya gelerek kümelenmeler oluşturma eğilimine sahipken, farklılaştırıldıklarında hücreler birbirleri ile nöritleri aracılığında bağ kurar ve kümelenmezler [151]. Tez çalışması kapsamında bu veriyi destekler bulgular elde edilmiştir (Şekil 4.1). Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri pasajlanarak kültür flasklara ekildikten sonraki 48 saat içinde hücreler biraraya gelecek şekilde çoğalmaya başlamıştır. Besi ortamı iki günde bir değiştirilerek, çoğalmaları besi ortamındaki serum (FBS) ile desteklenmiş ve ölü hücreler ile metabolik atıklar uzaklaştırılmıştır. Hücre yoğunluğu arttıkça hücreler biraraya gelmekte ve pasajlanarak hücre sayısı azaltılmazsa kümelenen hücreler ölmektedir. Farklılaşmış hücreler ise çoğalmayı durdurmuş, nörit ağ meydana getirmiş ve kümelenmemiştir (Şekil 4.2).

SH-SY5Y hücreleri nöron-benzeri hücrelerden meydana geldiği için tez kapsamında; Alzheimer modeli oluşturmak amacıyla olgun nöronal karakteristik özelliklerini daha iyi yansıtan farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri elde edilmiştir.

Literatürde retinoik asit ile farklılaştırma farklı inkübasyon süreleri (3, 4, 5, 7, 10, 14 ve 21 gün) için denenmiş ve besi ortamı iki ya da üç günde bir yenilenmiştir. Tez kapsamında ise; farklılaşmamış hücreler çoklu kültür plaklarına ekilmiş ve 24 saat inkübasyonun ardından 10 µM retinoik asit ile 6 gün boyunca farklılaştırılmıştır.

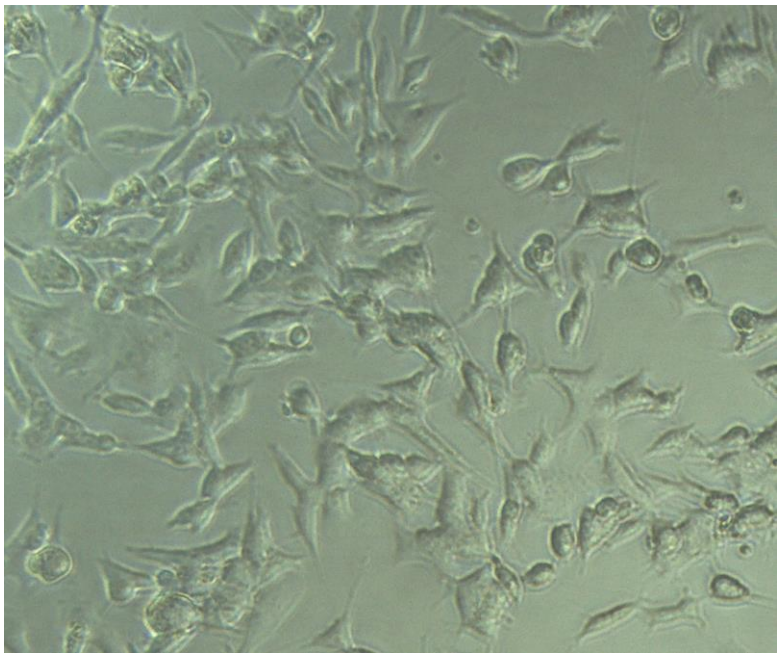
Hücrelerin farklılaşırken uzattıkları nörit ağ için yeterli bir alana sahip olmaları gerekmektedir. Bu nedenle farklılaştırmak üzere çoklu kültür plaklarının her kuyucuğuna ekilecek hücre sayısı önemlidir. Hücre sayısı yüksek olursa farklılaşma sağlanana kadar hücre çoğalması devam edeceği için hücreler biraraya gelecek ve nörit uzatabilmeleri için gerekli alan sağlanamayacaktır. Hücre sayısı düşük olduğunda ise farklılaştırmanın başlatılması için gereken en az %70'lik hücresel yoğunluğa daha geç ulaşacaklardır. %70 hücresel yoğunluktan daha az yoğunlukta hücreler üzerinde yapılan farklılaştırma deneylerinde retinoik asit muamelesi hücresel çoğalmayı baskıladığı için hücreler kolayca birbiri ile bağ kuramamakta ve ölmektedir. Bu sebeplerden dolayı farklılaştırma deneyi için çoklu kültür plaklarına kuyucuk başına ekilmesi gereken ideal hücre sayısı 25.000 olarak belirlenmiştir.

Farklılaştırma uyaranı olarak kullanılan retinoik asit; ısı, atmosfer ve ışığa karşı hassas bir çözeltidir. Bu nedenle retinoik asitin bozunmaması için yoğun konsantrasyonda hazırlanan stok retinoik asit çözeltisi, küçük hacimlerde alikotlanarak kullanılmıştır. Retinoik asit besi ortamına, kullanmadan hemen önce, uygun konsantrasyonu sağlayacak hacimde eklenerek hücrelere uygulanmıştır. Retinoik asit hızlı bir şekilde bozunduğu için farklılaştırma besi ortamı, iki günde bir, retinoik asit içeren taze besi ortamı ile yenilenmiştir.

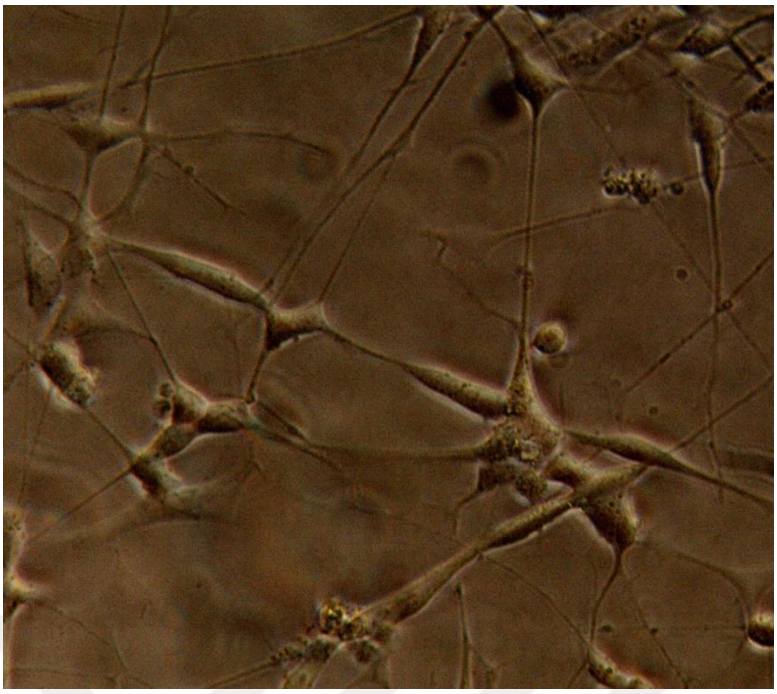
Farklılaştırma deneyinde hücrelerin retinoik asit ile 48 saatlik inkübasyonu hücrelerin morfolojik olarak nöronal özellik göstermelerini, nörit uzatmalarını sağlamıştır. 6 günlük retinoik asite maruziyet sonucu farklılaşan SH-SY5Y hücrelerinin çoğalması tamamen durmuş ve uzun nöritler aracılığında birbirleri ile ağ kurmuşlardır (Şekil 4.2).

Literatürde retinoik asit 10 µM konsantrasyonda serumsuz ya da düşük serum koşullarında kullanılmaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında SH-SY5Y hücreleri serumsuz ya da %1 FBS içeren besi ortamında retinoik asit ile farklılaştırılmıştır. Ancak FBS, düşük oranda olsa dahi hücre çoğalmasını desteklemiş ve retinoik asidin hücre çoğalma hızı üzerindeki inhibisyonunu zayıflatmıştır. Ayrıca %1 FBS bulunan hücrelerin morfolojik özelliklerinin, serumsuz ortamda farklılaştırılan hücrelerin morfolojisinden daha farklı olduğu belirlenmiştir. FBS'in retinoik asit ile birlikte farklılaştırmada kullanılması sonucu farklılaşan hücrelerin nörit uzunluğu daha kısa olmaktadır.

Sonuç olarak; SH-SY5Y hücreleri 25000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda çoklu kültür plaklarına tekrarlı şekilde ekilmiş; 24 saat inkübasyon sonrası hücresel yoğunluk %70'e ulaşmış; önceden 37 ^{0}C'ye ısıtılmış serumsuz farklılaştırma besi ortamı 10 µM retinoik asit ilave edilerek hücrelere uygulanmış ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Retinoik asit ilaveli besi ortamı iki günde bir yenilenmiş ve farklılaştırma süreci 6 gün boyunca sürdürülmüştür. Farklılaşmış hücrelerin morfolojik özelliklerinin tespiti inverted mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. Retinoik asit uygulaması ile hücre çoğalması yavaşlayarak tamamen durmuştur ve nörit uzatımı gelişmiştir. Hücreler nöritleri aracılığında birbirleri ile yoğun şekilde bağ kurmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü



Şekil 4.2 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüsü

Literatürde farklılaştırma ajanı olarak retinoik asit ile BDNF ajanlarının birlikte kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazılarında BDNF, retinoik asitin farklılaştırma etkilerini destekleyici yönde rol oynarken, bazı çalışmalarda önemli bir etkisi olmamıştır [156,157,161]. Retinoik asit tek başına hücre döngüsünü tutuklayarak farklılaştırma sağlayabilmektedir. Tez kapsamında retinoik asit tek başına kullanılmıştır.

Jamsa ve ark., SH-SY5Y hücrelerine 6 gün boyunca, %1 oranında serum içeren besi ortamı içinde 10 µM retinoik asit muamelesinde bulunmuş, ardından serumsuz ortamda BDNF ile 48 saat uygulama yapmıştır. Farklılaşmamış hücreler yuvarlak benzeri bir morfolojiye sahipken, retinoik asit etkisiyle bu yapı değişmiş ve nörit büyümesi olduğu saptanmıştır. Ayrıca farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde tau fosforilasyonunda artış olduğu belirlenmiştir [161]. Bu çalışmada BDNF'nin retinoik asidin etkilerini yalnızca destekleyici olduğu anlaşılmıştır. Farklılaşmış hücreler Alzheimer patolojik bulgularından olan tau fosforilasyonunu desteklemiş olması bu hücrelerin Alzheimer modeli için uygun olduğunu gösteren bir kanıt niteliğindedir. Başka bir çalışmada ise SH-SY5Y hücreleri; %15 oranında serum içeren besi ortamına eklenen 10 µM retinoik asitle 5 gün muamele edildikten sonra, serumsuz ortamda BDNF uygulaması ile farklılaştırılmıştır. Retinoik asit uygulaması sonunda S-tipi

morfolojiye sahip hücre seviyesinde azalma sağlanmış. Ancak, çalışmanın önemli bir sonucu; 10 günden daha uzun süreli retinoik asit maruziyetinde S-tipi hücre morfolojisi kazanan hücre sayısında artış olduğu anlaşılmıştır [156]. Bu nedenle tez çalışmasında retinoik asit ile muamele 6 gün ile sınırlandırılmıştır ve hücreler serumsuz ortamda inkübe edilmiştir. Serumsuz ortamda hücreler daha hızlı şekilde farklılaşmıştır.

Constantinescu ve ark., Parkinson hastalığının modellenmesinde kullanmak üzere; SH-SY5Y hücrelerini, retinoik asit ve mitotik inhibitörler kullanarak perfüzyon adı verilen farklı bir yöntemde farklılaştırmıştır. 14 günlük 10 µM'lık retinoik asit muamelesinin ardından hücreler hücre döngüsünün G1 fazında tutuklanmıştır. DNA sentezi ve hücre bölünmesi retinoik asit muamelesinin ikinci gününde durmuştur [155]. Sonuç olarak; morfolojik ve moleküler açıdan nöronal farklılaşmayı sağlamıştır. Uzun süre retinoik asit muamelesinin N-tipi hücreler üzerinde bilinen dezavantajına rağmen, Constantinescu'nun araştırmasında farklılaşmanın başarı ile sağlanmasının nedeni retinoik asidin yanısıra kullanılan mitotik inibitörlerin etkisinden ileri gelmiş olabilir.

Teppola ve ark., 29-30 pasaj numaralı SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılmasında 10 günlük uygulama için ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde retinoik asit, BDNF, estradiol ve kolesterol ajanlarını uyarıcı olarak kullanmıştır. 10 µM retinoik asit içeren uygulamalarda hücre çoğalması durmuş, potasyum depolarizasyonu artmış, nörit uzaması görülmüştür. Bu çalışmada BDNF ile birlikte retinoik asit uygulaması literatürdeki diğer çalışmaların aksine farklılaştırma sağlamamıştır [157]. Tez kapsamında ise morfolojik farkları daha iyi gözlemleyebilmek amacıyla farklılaştırma deneyi için düşük pasaj numaralı (15-17) SH-SY5Y hücreleri tercih edilmiştir.

Lopes ve ark.'nın çalışmasında, SH-SY5Y hücreleri düşük serum içeren (%1 FBS) besi ortamında 10 µM retinoik asit ile 4, 7 ve 10 gün farklılaştırılmış, hücre çoğalma hızında azalma ve nörit uzunluğunda artış olduğu görülmüştür. Morfolojik değişim ilk 24 saat içinde gözlenmiştir. Retinoik uygulaması sonrası yapılan incelemelerde; SH-SY5Y hücrelerinde nöronal belirteçlerden nöron-spesifik enolaz seviyesi farklılaştırma ile birlikte artarken, farklılaşmamış hücrelerin belirteci olan nestin seviyesi azalmıştır [160]. Bu çalışma retinoik asit muamelesinin SH-SY5Y hücrelerinin olgun nöronal karakter kazandığının bir göstergesidir.

Aghomle ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücreleri ekstraselüler matriks ile destekli üç boyutlu bir kültür ortamında, ayrı ayrı ve kombinasyonlar halinde 10 µM retinoik asit, BDNF, NGF, kolesterol, vitamin D3, neurogulin β1 ile 10-21 gün süresince farklılaştırılmıştır. Hücreler 25 numaralı pasaja kadar kullanılmıştır. Retinoik asit büyüme hızında inhibisyon ve nörit büyümesinde artış sağlamıştır [159]. Bu çalışmada yüksek pasaj numarası ve uzun süreli retinoik asit ile muamele yapılmasına rağmen üç boyutlu kültür tasarımı ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin varlığı söz konusu dezavantajların etkili olmasını önlemiş olabilir.

Schneider ve ark., 11-17 pasaj numaralı SH-SY5Y hücrelerini %1 FBS içeren besi ortamında 10 µM retinoik asit ile 5 gün boyunca muamele etmiştir. Retinoik asit morfolojik olarak farklılaşma sağlamıştır. Nöronal belirteç olan MAP-2 seviyesinde artış saptanmıştır. Mitokondriyal membran potansiyeli, solunum kapasitesi ve MnSOD düzeyi artarken, mitokondriyal enzim düzeyi değişmemiştir [162].

Cantarella ve ark.'nın Aβ'nın hücreler üzerindeki toksisitesine karşı TNF-α ilişkili bir ligandın etkisini inceledikleri ve bu ligandın toksisiteyi desteklediklerini tespit ettikleri araştırma çalışmasında farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri bir hafta boyunca 10 µM retinoik asit ile muamele edilmiş ve süre sonunda hücrelerin morfolojik olarak nörona benzer yapı kazanmasının yanısıra nöronal belirteç salımında artış olduğu belirlenmiştir [163]. Bu yönüyle söz konusu araştırma Alzheimer için oluşturulan modellerde farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin tercih edildiğinin bir göstergesidir.

4.3 SH-SY5Y Hücrelerinin ve Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Canlılık Testleri

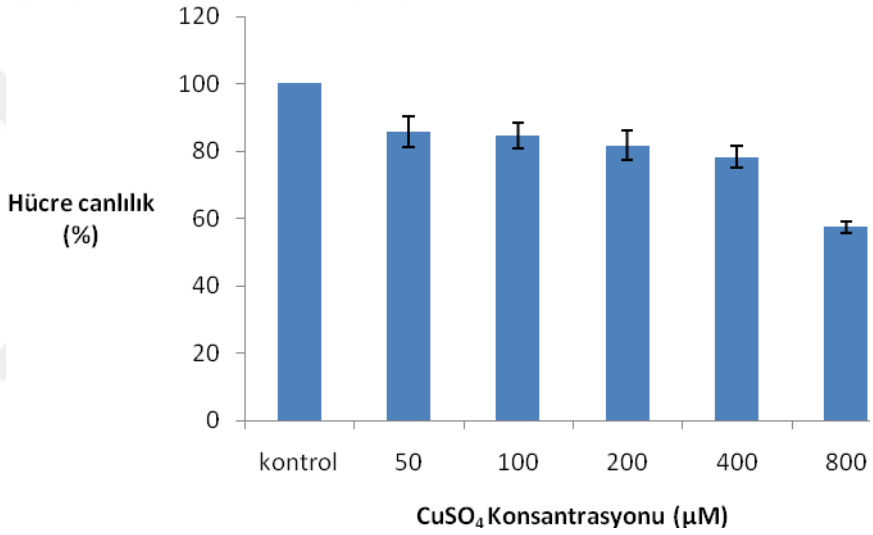
Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerinde bakır iyonlarının etkisi, MTT hücre canlılık testi yöntemi ile belirlenmiştir. Bakır iyonları, suda kolay çözünebilir olası nedeniyle bidistile suda hazırlanmış $CuSO_4$ çözeltisinin hücre besi ortamına katılması şeklinde hücrelere uygulanmıştır.

MTT yöntemi çok sayıda hücre arasından canlı hücrelerin kolorimetrik ve kantitatif olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Yöntemin prensibi; mitokondriyal fonksiyonu bozulmamış canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi ile

tetrazolyum halkasını parçalamasına dayanmaktadır [123,164]. Dolayısıyla yöntem hücre canlılığını yüzde olarak hesaplamayı ve mitokondriyal aktivite hakkında yorum yapılmasını sağlamaktadır.

Elde edilen verilerin hesaplanması ile ulaşılan sonuçlara göre farklılaşmamış hücrelerde kontrol gruba kıyasla hücre canlılık değeri; 50 µM $CuSO_4$ uygulaması için %85,7 ; 100 µM $CuSO_4$ uygulaması için %84,5 ; 200 µM $CuSO_4$ uygulaması için %81,6 ; 400 µM $CuSO_4$ uygulaması için ise %78,2 ve 800 µM $CuSO_4$ uygulaması için ise %57,3 şeklindedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin yüzde canlılık grafiği



Tez çalışmasında farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerine $CuSO_4$ uygulaması serum bulunan besi ortamında gerçekleştirildiğinden seçilen $CuSO_4$ konsantrasyonları 50 µM'dan başlanarak 800 µM'a kadar yükseltilmiştir. Serumda bulunan proteinler tarafından bakır iyonları tutulabileceği için düşük $CuSO_4$ konsantrasyonlarında hedeflenen hücre içi bakır düzeyindeki artış sağlanamayabilir. Ancak serumun varlığı hücrelerin bakır iyonlarını kullanmasında etkili olacağı için seçilen $CuSO_4$ konsantrasyonları serum bulunduran besi ortamına eklenmiştir.

Acevedo ve ark.'nın araştırmasında; 25-150 µM $CuCl_2$ ile muamele ettikleri SH-SY5Y hücrelerinde bakır iyonları uygulaması serum bulunan besi ortamında gerçekleştirildiğinden, serumun bakır iyonlarını tutma özelliği göz önünde

bulundurulmuştur [165]. Serum varlığı bakır iyonları tutabildiği gibi, bakır iyonlarının hücreler tarafından hücre içine alınmasını da kolaylaştırmaktadır [123].

Tez çalışmasında; farklılaşmamış hücrelerde, 50 µM $CuSO_4$ uygulaması hücre canlılığını %15 oranında azaltmıştır. Buna göre; bakır iyonlarının hücreler üzerinde toksik etki meydana getirerek hücre canlılığını azaltıcı yönde etkileyici olması için 50 µM'lık $CuSO_4$ konsantrasyonun yeterli olduğu tespit edilmiştir. Bakır konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir.

Arciello ve ark. yaptığı araştırmada 50-300 µM $CuSO_4$ ile 24 saat boyunca muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde; hücreiçi metal düzeyinin ve hücre ölümünün uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonunun hücre canlılığını azaltmak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Daha yüksek $CuSO_4$ konsantrasyonlarında ise hücrelerin yapıştıkları yüzeyden koparak apoptozis sürecine yönlendikleri anlaşılmıştır [123]. Bu sonuçlar; tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Başka bir çalışmada; SH-SY5Y hücrelerine farklı konsantrasyonlarda $CuSO_4$ uygulamasının yanısıra, glisin ya da imin grupları ile türevli hale getirilmiş Cu(II) iyonları uygulaması yapılmıştır. 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etkide bulunmuş, 150 µM'dan daha yüksek $CuSO_4$ konsantrasyonları ise mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olmuş ve ROS üretmiştir. Glisin ile türevli Cu(II) kompleksleri hücre içine alınmazken, imin grupları ile türevli Cu(II) kompleksleri hücre içine alınarak apoptozise yol açmıştır [166]. Araştırma sonuçlarına göre; bakır iyonları mitokondriyal işlevsizliğe, oksidatif strese ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu sitotoksisik etki için yeterlidir. Sonuçlar; tez çalışmasında elde edilen verilerle aynı yöndedir.

Tez çalışmasında 50, 100, 200 ve 400 µM $CuSO_4$ konsantrasyonları arasında hücre canlılığı üzerinde önemli bir fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar literatürdeki veriler ile benzerlik taşımaktadır [167,168]. Yalnızca 800 µM $CuSO_4$ uygulaması hücrelerin canlılığını %43 oranında azaltarak önemli düzeyde etkide bulunmuştur.

Hirashima ve ark., SH-SY5Y hücrelerini 10 µM $CuCl_2$ ve 250 µM homosistein ile tek başına ya da birlikte olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe etmiştir. Bakır iyonlarının hücre canlılığı üzerinde etkisi bakımından $CuCl_2$ konsantrasyonları arasında fark

görülmezken, homosisteinle birlikte inkübasyonunda hücre canlılığı %44 olarak belirlenmiştir. Ortama CAT enzimi eklendiğinde hücre canlılığında artış görülmesi, bakır iyonlarının ürettiği H_2O_2'yi katalaz enziminin detoksifiye etmesinden kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır [168].

Tabbi ve ark.; adrenokortikotropik hormonun N ucundaki 4-7 dizisinin analogu ile bakır iyonlarının oluşturduğu komplekslerin antioksidan ve şelatlama kabiliyetini araştırmıştır. SH-SY5Y hücreleri tek başına kompleksler ve $CuSO_4$ ile 48 saat inkübe edilmiştir. Tasarlanan komplekslerin sınırlı antioksidan kabiliyetine sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerinde 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonun önemli bir etkisi olmazken, 100 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu %70, 200 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu %50 düzeyinde hücre canlılığı göstermiştir [169].

Huang ve ark.'nın yaptığı araştırmada; 18 saatlik 10, 20, 50, 100 ve 200 µM $CuCl_2$ aracılı oksidatif strese maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde kitooligosakkaritler, bakır aracılı hücre canlılığındaki azalma, apoptozis ve oksidatif stresi iyileştirici yönde etkide bulunmuştur. 50 µM $CuCl_2$ uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı %77 şeklinde belirlenmiştir. Kitooligosakkaritler Nrf2 adı verilen antioksidan elemanını aktive ederek işlev yapmıştır [170]. Sonuçlar bakır iyonlarının hücre canlılığını, tez çalışmasındaki verilere paralel şekilde azalttığını göstermekle birlikte, antioksidan mekanizmanın aktivasyonu ile bakır iyonlarının etkilerinin önlenebilmesi, uygulanan konsantrasyonlarda SH-SY5Y hücrelerinde metal aracılı oksidatif stresin etkili olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmasında; farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin hücre canlılığı belirlenirken; analizde kullanılan MTT çözeltisi 5 mg/ml konsantrasyonda ve inkübasyon süresi 6 saat olacak şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu konsantrasyondan daha düşük MTT konsantrasyonlarında ya da daha kısa süreli inkübasyon durumunda deney sonucu alınan absorbans değerlerinin düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum; bakır iyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi etkilemesi ile açıklanabilir.

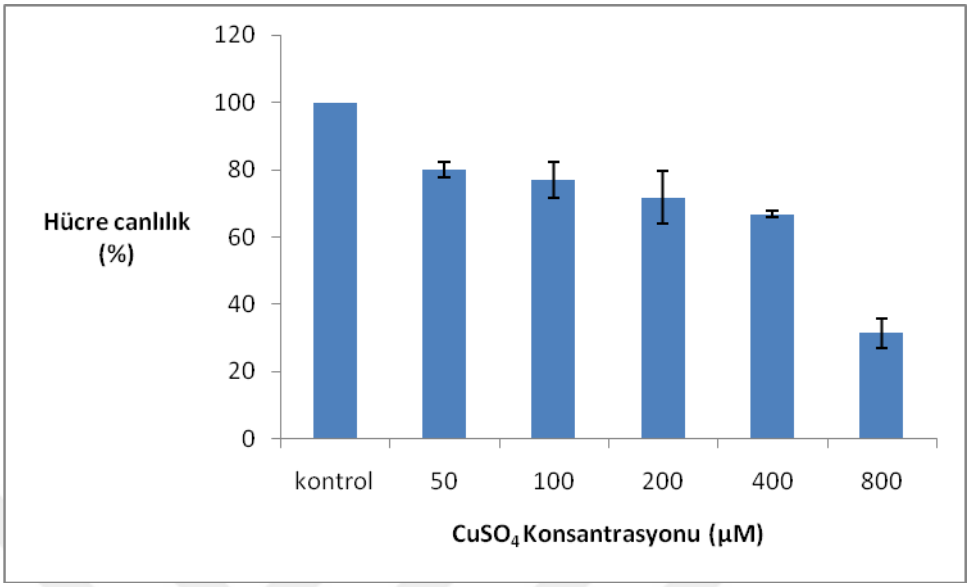
MTT yönteminde; canlı hücreler tetrazolyum halkasını parçalayarak formazan kristallerini meydana getirmektedir. Oluşan formazan kristallerin bir çözücü yardımıyla çözülmesi ve ardından uygun nm dalga boyunda absorbansların okunması ile sonuçlar

elde edilmekte ve gerekli hesaplamalar ile yüzde canlılık değerleri belirlenmektedir. Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin $CuSO_4$ uygulaması ile bakır iyonlarına maruz bırakılması sonucu, bakır iyonları hücrelerin mitokondriyal işlevlerini yerine getirmesini engelleyerek, formazan kristallerinin düşük oranda oluşmasına neden olmuştur. Bu dezavantaj; uygulanan yöntem parametrelerinin hücrelere yönelik iyileştirme çalışmaları ile aşılmıştır. Buna göre SH-SY5Y hücrelerine 5 mg/ml MTT çözeltisi 6 saat süreyle uygulandığında güvenilir sonuçların elde edilebileceği düzeyde formazan kristalleri oluşmakta ve absorbans değerleri alınmaktadır.

Arciello ve ark. yaptığı araştırmada; askorbat varlığında bakır uygulaması sonrası SH-SY5Y hücrelerinde üretilen ROS miktarı yükselmiştir. 150 ve 300 µM $CuSO_4$ 24 saatlik inkübasyon sonrası mitokondriyal kompleks 1, kompleks 5 ve sitokrom oksidaz c seviyesi ve pirüvat dehidrogenaz aktivitesi azalmıştır. Bu bulgular bakır iyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde mitokondriyal işlev bozukluğuna ve oksidatif strese neden olduğunu kanıtlar niteliktedir [123]. Bakır iyonları sitokrom oksidaz c aktivitesini etkileyerek mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olmaktadır [121]. Araştırmanın en önemli sonucu; $CuSO_4$ uygulamasının hücrelerin mitokondriyal işlev ve membran bozukluğuna neden olarak tetrazolyum tuzlarını formazan tuzlarına dönüştüren mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini azalttığının tespitidir. Benzer sonuçlara Do Lago ve ark.'nın yaptığı çalışmada rastlanmıştır; 150 µM'dan daha yüksek $CuSO_4$ konsantrasyonları mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açmıştır [166]. Literatürdeki çalışmalar tez çalışmasının sonuçları ile, mitokondriyal aktivitede bakır uygulaması sonrası görülen değişim yönüyle uyuşmaktadır.

Tez çalışmasında; elde edilen verilerin hesaplanması ile ulaşılan sonuçlara göre farklılaşmış hücrelerde kontrol gruba kıyasla hücre canlılık değeri; 50 µM $CuSO_4$ uygulaması için %79,9 ; 100 µM $CuSO_4$ uygulaması için %77 ; 200 µM $CuSO_4$ uygulaması için %71,2 ; 400 µM $CuSO_4$ uygulaması için ise %66,78 ve 800 µM $CuSO_4$ uygulaması için ise %31,4 şeklindedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin yüzde canlılık grafiği



Farklılaşmamış hücrelerin aksine, farklılaşma sürecinde besi ortamı serum ihtiva etmemektedir. Ayrıca serumun farklılaştırma boyunca retinoik asidin hücre çoğalması üzerindeki inhibe edici etkisini, önleyici yönde rol oynadığı tespit edildiği için farklılaşmış hücrelere $CuSO_4$ uygulaması serumsuz besi ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu durumda serumun bakır iyonlarını tutucu etkisinden kaçınılmıştır.

Tez çalışmasında; farklılaşmış hücrelerde, 50 µM $CuSO_4$ uygulaması hücre canlılığını %21 oranında azaltmıştır. Buna göre; farklılaşmamış hücrelerde olduğu gibi; farklılaşmış hücrelerde de 50 µM'lık $CuSO_4$ konsantrasyonu, bakır iyonlarının hücreler üzerinde toksik etki meydana getirerek hücre canlılığını azaltması için yeterli olmuştur. Ayrıca farklılaşmamış hücreler ile benzer olarak hücre canlılığı bakır konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azalmıştır.

Tez çalışmasında 50, 100 ve 200 µM $CuSO_4$ konsantrasyonları arasında hücre canlılığı üzerinde önemli bir fark saptanmamıştır. Ancak 400 µM $CuSO_4$ uygulaması hücre canlılığını %34 oranında azaltırken, 800 µM $CuSO_4$ uygulaması hücre canlılığını %69 oranında azaltarak ciddi bir etkide bulunmuştur.

Canlılık yüzdeleri incelendiğinde SH-SY5Y hücrelerinin, bakır iyonlarına verdikleri yanıtların farklılaştırıldıktan sonra değiştiği tespit edilmiştir. Buna göre; farklılaşan

hücrelerin bakır iyonlarına hassasiyeti artmıştır ve aynı konsantrasyondaki $CuSO_4$ uygulamaları hücre canlılığını farklılaşan hücrelerde farklılaşmamış olanlara kıyasla daha fazla azaltmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile benzerlik taşımaktadır [162,171,172].

Zhang ve ark.'nın nikotinin metal homeostazisi üzerindeki etkisine yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada; normal SH-SY5Y hücrelerinde ve Swedish APPswe SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat boyunca yapılan 10 ve 100 µM $CuCl_2$ muamelesinin meydana getirdiği aşırı APP üretimini ve ortama salınan Aβ miktarındaki artışı, nikotin uygulaması hafifletmiştir. Hücre canlılığı açısından değerlendirildiğinde; 10 µM $CuCl_2$ normal hücrelerde etkide bulunmazken APPswe hücrelerinde hücre canlılığını %19 azaltmış; 100 µM $CuCl_2$ normal hücrelerde hücre canlılığını %25, APPswe hücrelerde %55 oranında azaltmıştır. Bu fark; APPswe hücrelerinin hücreiçi bakır düzeyinin normal hücrelerden daha fazla olması ile açıklanmıştır. Çalışmayı önemli kılan diğer veri; APPswe SH-SY5Y hücrelerinde 100 µM $CuCl_2$, Aβ40 salımını %28.4 oranında yükseltmiştir. Ancak normal SH-SY5Y hücrelerinden salınan Aβ40 düzeyi ölçüm aralığında olmadığından belirlenememiş. Bakır iyonlarının ürettiği ROS düzeyi açısından karşılaştırıldığında; her iki hücre tipinde de 10 µM $CuCl_2$ %58.96 oranında, 100 µM $CuCl_2$ ise % 58.2 oranında ROS artışı sağlamıştır [171].

De Benedetto ve ark.'nın redoks düzenleyici Glutaredoksin (GRx1) proteinini aşırı ifadeleyen SH-SY5Y hücreleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada; 50 ve 150 µM $CuSO_4$ ile 24 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı sırasıyla %65 ve %25 olarak belirlenmiştir. Bu durumda; GRx1 bakır iyonları ile etkileşerek mitokondride bakır birikimine engel olmuş, bakır taşıyıcı sistemleri upregüle etmiş ve böylece bakır aracılı mitokondriyal hasarı önlemiştir [172].

Tez çalışmasında gerçekleştirilen, mitokondriyal aktivite yoluyla formazan tuzlarının oluşması prensibine dayanan hücre canlılık testlerinde; farklılaşmamış hücrelerin $CuSO_4$ uygulaması sonrası formazan oluşturma kabiliyetinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bakır iyonları mitokondriyal bütünlüğü bozucu etkide bulunduğu için formazan tuzlarının oluşması için daha yoğun konsantrasyonda MTT çözeltisi uygulaması ve daha uzun bir süre beklenmesi gerekmiştir. İlginç olarak retinoik asit ile

farklılaştırılan SH-SY5Y hücrelerinin $CuSO_4$ uygulaması sonrası formazan tuzlarını oluşturma kabiliyetinin farklılaşmamış hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Farklılaşmış hücrelerin bakır iyonları varlığında formazan tuzlarını oluşturmaları için diğer hücrelere göre; daha düşük konsantrasyonda MTT çözeltisi (2 mg/ml) uygulaması ve daha kısa bir inkübasyon süresi (4 saat) yeterli olmuştur.

Postmitotik nöron hücreleri yüksek enerji tüketmektedir, bu nedenle mitokondriyal aktiviteleri yüksektir. Schneider ve ark.'nın araştırmasının önemli sonuçlarından biri; farklılaşmış hücrelerde mitokondriyal aktivitedeki artış olması ve bu artış yoluyla nöronlara olan benzerliğin güçlenmesidir. Ayrıca farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin, farklılaşmamış olanlara göre ROS'lar tarafından uyarılan oksidatif stres koşullarına daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir [162]. Tez kapsamında ise; uygulanan canlılık testlerinde MTT yanıtları değerlendirildiğinde; farklılaşmamış hücrelere kıyasla farklılaştırılan hücrelerde mitokondriyal aktivite artışı olduğu saptanmıştır. Bu sonuç Schneider ve ark.'nın araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

4.4 SH-SY5Y Hücrelerinin ve Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Amiloid-β Tespiti

SH-SY5Y hücrelerinde APP proteininin sekretaz enzimleri tarafından proteolize uğraması sonucu üretilen, farklı uzunluklardaki Aβ proteinleri besi ortamına salınmaktadır. İn vitro koşullarda hücrelerin ürettiği Aβ düzeyi, besi ortamına salınan Aβ peptitlerinin ELISA kitleri kullanılarak ölçülmesiyle tespit edilebilmektedir. Buna göre kullanılan yöntemin prensibi gereği; plaklar insan Aβ dizisinin amino ucuna spesifik olan antikor ile kaplıdır. Aβ içeriği tespit edilmek istenen numune, plaklara yüklenir ve Aβ dizisinin karboksi ucuna spesifik olan tavşan antikoru ile birlikte inkübe edilir. Numune içeriğindeki Aβ ile bağlanan tavşan antikoru, plaklara eklenen anti-antikor ile tespit edilir. İnkübasyon ve fazla enzimin uzaklaşması için yapılan yıkama işlemlerinin ardından renk oluşturan bir substrat plaklara eklenir. Bu substratın yoğunluğu, plaklara yüklenmiş olan numunelerdeki Aβ miktarı ile doğru orantılı olacak şekilde Aβ tayinini sağlamaktadır.

Tez çalışmasında farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerinden olmak üzere iki durum için besi ortamlarında Aβ tespiti yapılmış ve iki durum birbiri ile karşılaştırılmıştır.

Belirtilen $CuSO_4$ konsantrasyonları (50, 100, 200, 400 µM) ile muamele edilen farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinden 24 saatlik inkübasyonun ardından besi ortamları; her bakır konsantrasyonu için ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine alınarak, +4 ^{0}C'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamada besi ortamında bulunan Aβ peptitlerinin, santrifüj sırasında oluşacak sıcaklık artışı nedeniyle degrade olmaması için soğutmalı santrifüj uygulaması yapılmıştır. Ayrıca hızla degrade olabilen Aβ peptitlerinin ELISA analizine kadar korunabilmesi amacıyla santrifüj sonrası elde edilen supernatantlar proteaz inhibitör kokteyl içeren tüplere alınarak -80 ^{0}C'de saklanmıştır.

Retinoik asit ile 6 günlük muamelenin ardından farklılaşan hücreler belirtilen $CuSO_4$ konsantrasyonlarına (50, 100, 200, 400 µM) maruz bırakılmış ve 24 saatlik inkübasyonun ardından toplanan besi ortamları ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine alınarak +4 ^{0}C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlar proteaz inhibitör kokteyl içeren tüplere alınarak -80 ^{0}C'de saklanmıştır.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin plaklara ekildikten 24 saat sonra toplanan, $CuSO_4$ ile muameleye tabi tutulmamış besi ortamları; ELISA kitlerinde analiz edilirken kontrol gruplar olarak değerlendirmeye alınmıştır. Tüm koşullar için gerekli miktarda besi ortamı örneği toplandığında -80 ^{0}C'de tutulan örneklerin; ELISA kitlerinde kullanılmak üzere önce -20 ^{0}C'ye ve daha sonra +4 ^{0}C'ye alınarak çözülmesi sağlanmış ve analizler gerçekleştirilmiştir.

APP'nin γ-sekretaz tarafından farklı pozisyonlardan kesilmesi nedeniyle 39 ile 43 aminoasit arasında değişen uzunluklarda Aβ üretilebilmektedir. Aβ40 düzeyi diğer Aβ peptitlerine kıyasla en fazla oranda üretilen türdür ve Alzheimer hastası bireylerin beyninde Aβ40 düzeyinde artış olmaktadır. Aβ42 düzeyi ise Aβ40'a kıyasla daha az olmakla birlikte Alzheimer hastalarında artma yönünde eğilim göstermektedir. Ayrıca Aβ42/Aβ40 oranındaki artış Alzheimer'da önemli bir oran olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenlerle tez çalışması kapsamında hücrelerden toplanan besi ortamlarında Aβ40 ve Aβ42 düzeyi iki farklı kit ürünü ile tespit edilmiştir.

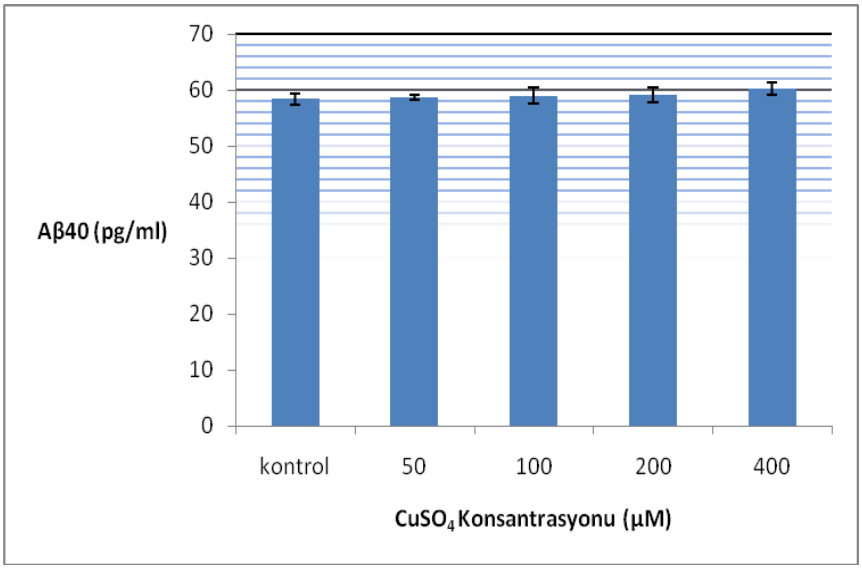
Besi ortamlarında Aβ40 ve Aβ42 ölçümü ELISA kit prosedürlerine uygun olacak şekilde yapılmıştır. Beta Amyloid 42 ELISA ve Beta Amyloid 40 ELISA Kitleri için benzer işlemler

uygulanmıştır. Kitler arasındaki tek fark, plak kuyucuklarının kaplı olduğu antikor çeşidinin Aβ40 veya Aβ42'e özgü olmasıdır.

Analiz sonucu standartlar, kontrol gruplar ve deney gruplarından elde edilen absorbanslar değerlendirilerek grafikler oluşturulmuştur. Her iki kit için ayrı olacak şekilde, standartlardan seri dilüsyon yapılarak oluşturulan Aβ40 standart eğrisi ve Aβ42 standart eğrisi çizilmiştir. Farklılaşmış ve farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin besi ortamına salgıladığı Aβ40 ve Aβ42 konsantrasyonları, çizilen standart eğrileri yardımıyla kontrol ve deney grupları için belirlenmiştir.

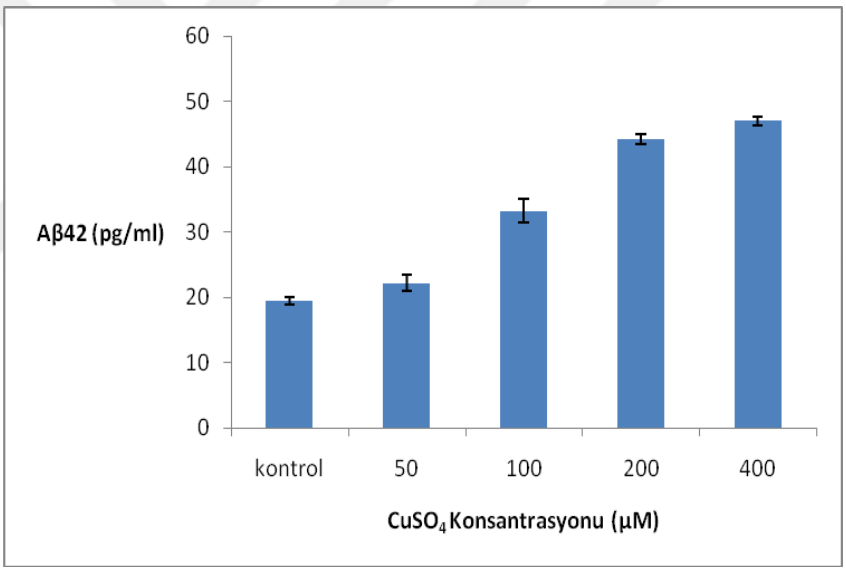
Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin besi ortamına salgıladığı Aβ40 konsantrasyonu; $CuSO_4$ uygulaması yapılmayan kontrol grup için 58,41 pg/ml iken; 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 58,71 pg/ml, 100 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 59,01 pg/ml, 200 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 59,19 pg/ml ve 400 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında ise 60,22 pg/ml şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Elde edilen sonuçlara göre, besi ortamındaki Aβ40 konsantrasyonu açısından değerlendirildiğinde; $CuSO_4$ uygulanmayan kontrol grup ile düşük $CuSO_4$ konsantrasyonları ile muamele edilmiş deney grupları arasında önemli bir fark görülmemiştir. Ancak artan bakır iyon konsantrasyonlarına bağlı olarak hücrelerin salgıladığı Aβ40 düzeyi yükselmiştir.

Çizelge 4.3 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ40 konsantrasyonu



Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin besi ortamına salgıladığı Aβ42 konsantrasyonu; $CuSO_4$ uygulaması yapılmayan kontrol grup için 19,44 pg/ml iken; 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 22,19 pg/ml, 100 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 33,21 pg/ml, 200 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 44,22 pg/ml ve 400 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında ise 46,97 pg/ml şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Sonuçlara göre; hücrelerin besi ortamındaki Aβ42 konsantrasyonu bakımından; $CuSO_4$ uygulanmayan kontrol grup ile $CuSO_4$ konsantrasyonları ile muamele edilmiş deney grupları karşılaştırılmıştır. Kontrol gruba kıyasla $CuSO_4$ konsantrasyonunda artış, üretilen Aβ42 düzeyini önemli oranda arttırmıştır.

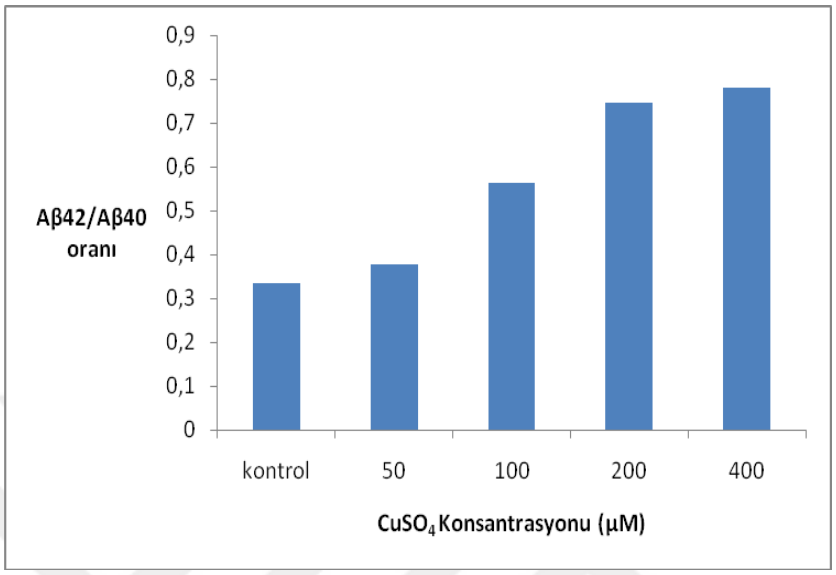
Çizelge 4.4 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ42 konsantrasyonu



Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin salgıladığı Aβ42 ve Aβ40 konsantrasyonlarına bağlı olarak Aβ42/Aβ40 oranı hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Farklılaşmamış hücrelerdeki Aβ40 ve Aβ42 salınması üzerine aynı konsantrasyondaki bakır iyonlarının etkisi incelendiğinde; bakır iyonlarının Aβ42 konsantrasyonunu Aβ40 konsantrasyonundan daha fazla arttırdığı görülmüştür. Bu sonuç bakır iyonlarının Aβ40'a göre Aβ42 ile daha yüksek affiniteye sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir. Bakır iyonları yüksek affinite nedeniyle Aβ42 iyonlarına daha güçlü şekilde bağlanmış ve degradasyona uğramasını Aβ40'a göre daha etkin şekilde önlemiş olabilir. Bu durumda Aβ42/Aβ40 oranı,

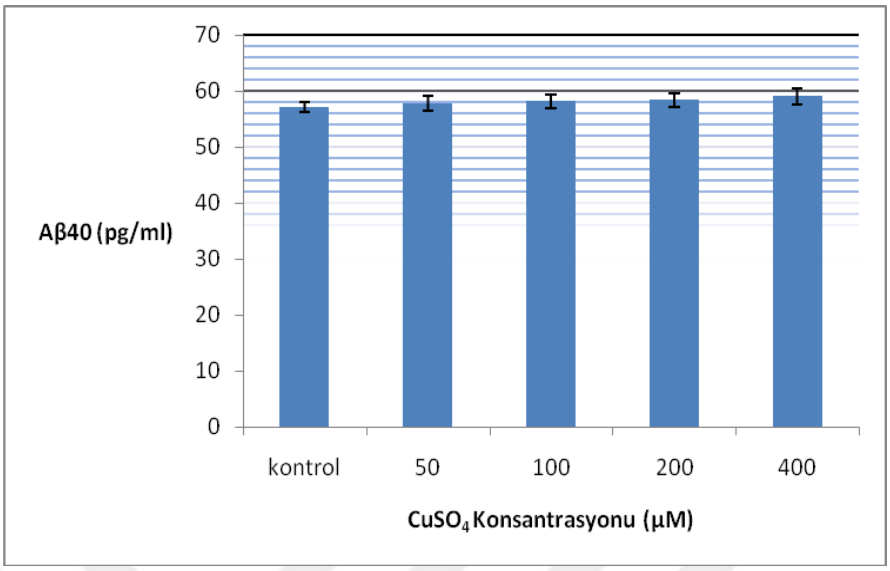
uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonundaki artışa paralel olacak şekilde yükselmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri için Aβ42/Aβ40 oranı



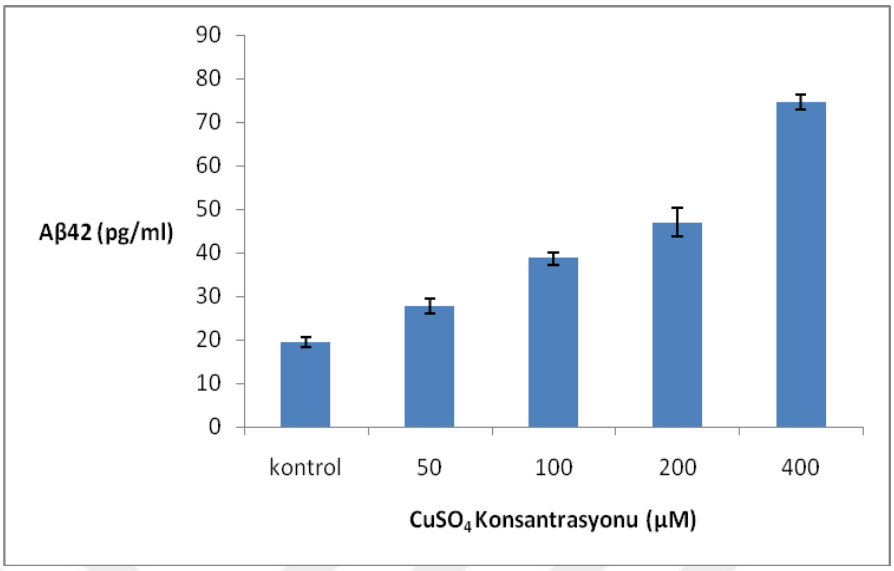
Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin besi ortamına salgıladığı Aβ40 konsantrasyonu; $CuSO_4$ uygulaması yapılmayan kontrol grup için 57,2 pg/ml iken; 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 57,8 pg/ml, 100 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 58,16 pg/ml, 200 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 58,41 pg/ml ve 400 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında ise 59,01 pg/ml şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Farklılaşmış hücreler için elde edilen sonuçlara göre, besi ortamındaki Aβ40 konsantrasyonu; $CuSO_4$ uygulanmayan kontrol grup ile $CuSO_4$ konsantrasyonları ile muamele edilmiş deney grupları arasında önemli bir fark görülmezken; hücrelere uygulanan bakır iyon konsantrasyonlarını arttıkça hücrelerin salgıladığı Aβ40 düzeyinde artış sağlandığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ40 konsantrasyonu



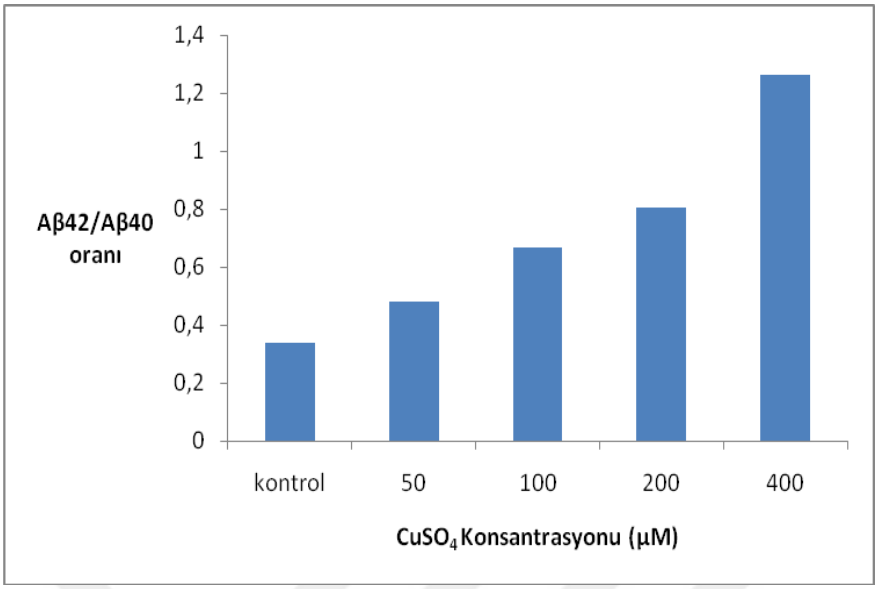
Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin besi ortamına salgıladığı Aβ42 konsantrasyonu; $CuSO_4$ uygulaması yapılmayan kontrol grup için 19,44 pg/ml iken; 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 27,7 pg/ml, 100 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 38,71 pg/ml, 200 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında 46,97 pg/ml ve 400 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu uygulandığında ise 74,55 pg/ml şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Farklılaştırılmış hücrelerin besi ortamındaki Aβ42 konsantrasyonu için; $CuSO_4$ uygulanmayan kontrol grup ile $CuSO_4$ konsantrasyonları ile muamele edilmiş deney grupları karşılaştırılmıştır. Kontrol grup ile kıyaslandığında yükselen $CuSO_4$ konsantrasyonuna bağlı olarak Aβ42 düzeyinin arttığı ve yüksek $CuSO_4$ konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerin salgıladığı Aβ42 düzeyinde ciddi bir artış olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.7 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde bakır konsantrasyonuna bağlı salınan Aβ42 konsantrasyonu



Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin salgıladığı Aβ42 ve Aβ40 konsantrasyonlarına bağlı olarak Aβ42/Aβ40 oranı hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Farklılaşmamış hücreler ile benzer şekilde retinoik asit ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde de bakır iyonlarının varlığı Aβ42 konsantrasyonunu Aβ40 konsantrasyonundan daha fazla arttırmıştır (Çizelge 4.8). Bu durumda uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonuna bağlı olarak Aβ42/Aβ40 oranında artış sağlanmıştır. Bakır iyonlarının Aβ40'a nazaran, Aβ42 peptitlerine karşı daha güçlü affinite göstermesi ve bu şekilde Aβ42'nin degredasyonunu zorlaştırıcı etkide bulunması, farklılaşmamış hücrelerde olduğu gibi farklılaşan hücrelerde de mümkündür.

Çizelge 4.8 Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri için Aβ42/Aβ40 oranı



Postmortem çalışmalarda Alzheimer hastası bireylerin beyninde hipokampus, korteks ve amigdalada ve senil plaklarda bulunan yüksek bakır iyonu miktarına rastlanılmıştır [8,26,33,49,70,73,78].

Zhang ve ark.'nın araştırmasında; 100 µM bakır konsantrasyonunun, Swedish mutant SH-SY5Y hücrelerinin salgıladığı Aβ40 düzeyinde artış sağladığı anlaşılmıştır [173].

Bakır iyonlarının Aβ üretim mekanizmasında karmaşık bir etkiye sahip olduğu açıktır. APP'nin lokasyonu ve bakır iyonları ile etkileşiminin, üretilen Aβ düzeyini etkileyebilmesi bu duruma örnek gösterilebilir. Bakır konsantrasyonu hücre içinde düşük ve hücredışı ortamda yüksekse; APP yüksek oranda ifade edilmektedir. Ancak APP, bakır iyonlarını hücreden uzaklaştırdığından hücreiçi bakır düzeyi yeniden azalmakta ve kısır bir döngü meydana gelmektedir [165].

Tez çalışmasında SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen sonuçların aksine, farklı hücre hatlarından farklı sonuçların alındığı çalışmalar vardır. APP ile Cu(II) etkileşimi APP'de konformasyonel bir değişime neden olmaktadır. Borchardt ve ark.'nın CHO (Chinese-hamster ovary) hücrelerinde yaptığı çalışmada; 10 ve 50 µM $CuCl_2$ muamelesi, APP ekspresyonunda ve amiloidojenik olmayan yolak ürünlerinde artış sağlarken, Aβ seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Aβ üretiminde önemli olan BACE1 aktivasyonu için, APP'nin hücre membranındaki lipit yığınlarının içinde olması gerekmektedir. Ancak

çalışmada APP-Cu(II) kompleksleri APP'yi lipit yığınlardan uzaklaştırdığı için APP'deki artışa rağmen BACE1 etkin olamamış ve Aβ seviyesi bu nedenle artmamıştır [130]. Tez çalışmasında ise; SH-SY5Y hücrelerinde bakır iyonları Aβ40 üretimine kıyasla, Aβ42 düzeyinde önemli düzeyde artış sağlamıştır. Benzer şekilde Noda ve ark.'nın çalışmasında; APP770 ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin 24 saat boyunca 50 ve 100 µM $CuCl_2$ ile inkübasyonu, hücre canlılığını etkilemezken APP dimerizasyonunu desteklemiş, Aβ42/Aβ40 oranında azalmaya neden olmuş, bakır iyonları besi ortamına salınan Aβ40 miktarını Aβ42'den daha fazla düzeyde arttırmıştır [174]. Tez çalışmasında ise; SH-SY5Y hücrelerinde bakır iyonları Aβ42/Aβ40 oranında artış sağlamıştır. Farklı hücre tiplerinden farklı sonuçların alınması; hücrelerin bakır iyonlarına olan yanıtlarının farklı olmasından ileri gelmiştir [165]. Bu nedenle Alzheimer patolojisini en iyi şekilde yansıtacak modeli oluşturmada seçilecek hücre tipi ve özellikleri oldukça önemlidir. Bu açıdan tez çalışması sonuçlarına göre SH-SY5Y hücreleri Alzheimer modellemesi için uygun bir modeldir.

Hung ve ark.'nın yaptığı çalışmada APP bakımından transgenik olan SH-SY5Y hücrelerine 5 µM $CuCl_2$, 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Artan bakır konsantrasyonu, lipit yığınların yeniden düzenlenmesi yoluyla APP lokasyonunu değiştirmiştir. Değişen lokasyon nedeniyle APP proteolizi zorlaşmıştır. Bu nedenle Aβ düzeyinde artış olmasa da daha yüksek oranda Aβ-Cu(II) kompleksi oluşturmaktadır [175]. Dolayısıyla bakır iyonları yalnızca Aβ düzeyine etkide bulunmaz, aynı zamanda oluşturdukları kompleksler aracılığında oksidatif stres meydana getirerek hücresel hasar meydana getirebilir.

Bakır iyonlarının Aβ üretiminin yanısıra, Aβ klirensinde de etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Sparks ve Schreurs'un yaptığı çalışmada kolesterol ile beslenen tavşanlara 0.12 ppm bakır içeren içme suyu verilmiş ve kolesterol ile bakır iyonlarının Aβ klirensini etkilediği görülmüştür. Buna göre; bakır iyonlarının etkisiyle amiloid plaklarda Aβ birikiminde artış ve öğrenme kabiliyetinde yavaşlama tespit edilmiştir [176].

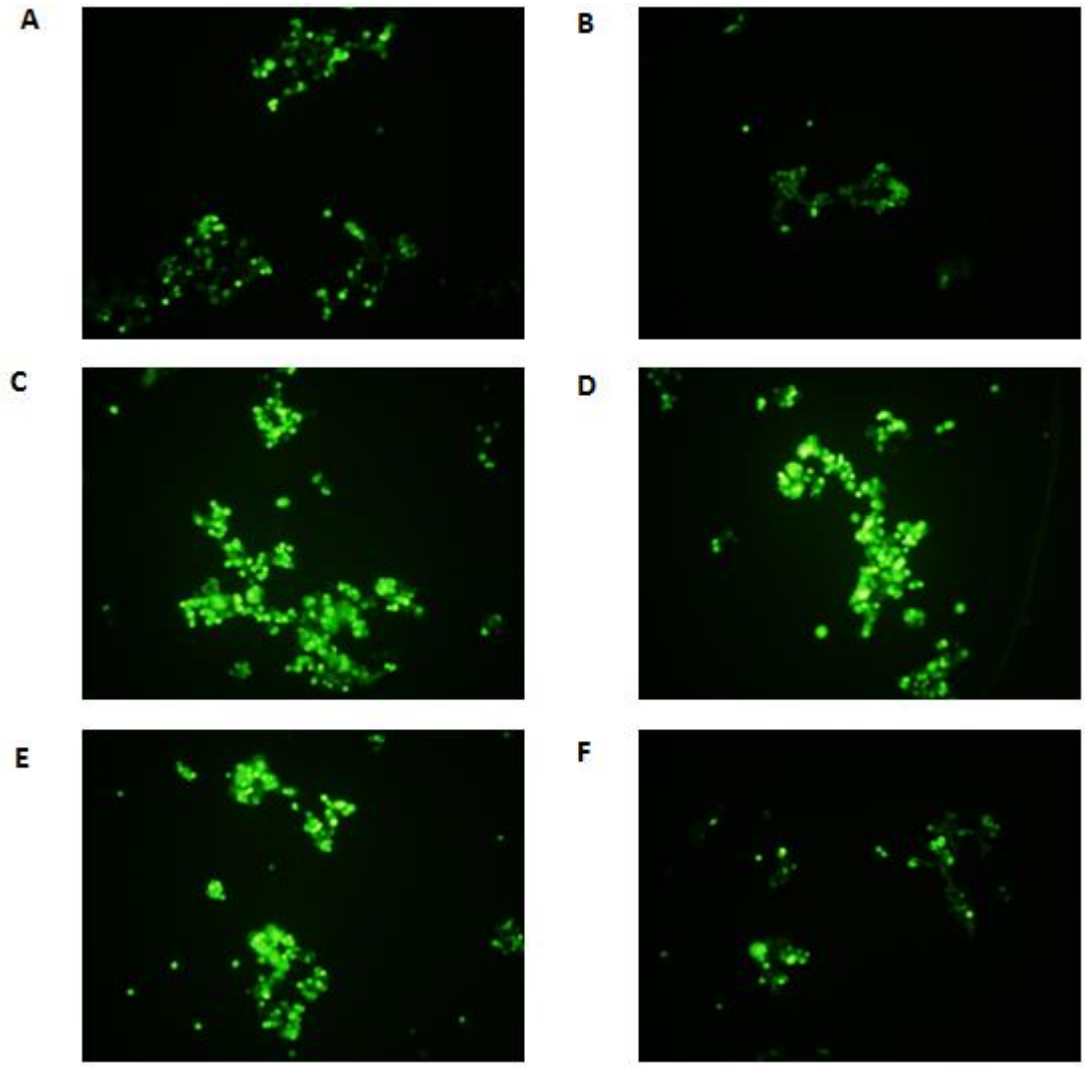
Hou ve ark., primer nöron kültüründe ve APP695 ile transfekte edilmiş fare nöroblastoma N2a hücrelerinde, $CuSO_4$'ün etkilerini bakır ile ilişkili protein olan Cuta

proteini için incelemişlerdir. Buna göre; bakır iyonları APP ve Aβ seviyesini arttırmaktadır. Cuta proteini ise, BACE1 ile etkileşerek APP proteolizini etkilemektedir [177]. Dolayısıyla bakır iyonları tek başına ya da bakır ilişkili proteinleri aktive ederek çeşitli yollarla Alzheimer patolojisine katkıda bulunmaktadır.

4.5 SH-SY5Y Hücrelerinin ve Farklılaşmış SH-SY5Y Hücrelerinin Ürettiği Reaktif Oksijen Türlerinin İncelenmesi

DCFH-DA oksidatif strese karşı hassas bir boya olarak hücre kültürü çalışmalarında reaktif oksijen türleri ölçümünde kullanılmaktadır. Buna göre hücreler tarafından pasif difüzyonla hücre içine alınan DCFH-DA, esteraz enzimlerinin aktivitesi ile önce DCFH molekülüne dönüşmektedir. Ardından DCFH molekülü, ortamda bulunan reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek floresans özellikteki DCF molekülüne dönüşmektedir. Bu yöntemde özellikle hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit radikalleri tespit edilmektedir [178].

Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri kültür plaklarına ekilmiş, %70 yoğunluğa ulaştığında 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarında $CuSO_4$ ile 24 saat muamele edilmiştir. Farklılaşmış hücreler ise; farklılaşmamış hücrelerin kültür plaklarında 6 günlük retinoik asit maruziyeti sonrası farklılaştırılmasının ardından, farklılaştırma besi ortamı içinde hazırlanmış olan 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarında $CuSO_4$ ile 24 saat muamele edilmiştir. Bu aşamadan sonra her iki hücre tipi için benzer uygulamalar gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklardaki ölü hücreler ve serum PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, PBS içinde hazırlanan 10 µM konsantrasyondaki H2DCFDA ile hücreler muamele edilmiş, 50 dk boyunca karanlıkta, 37 ^{0}C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Ardından fazla boya, PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra görüntüleme işlemleri floresans mikroskopta alınmıştır. Pozitif kontrol olarak, besiyeri içinde hazırlanan 100 µM konsantrasyonunda H_2O_2 çözeltisi kullanılmıştır.

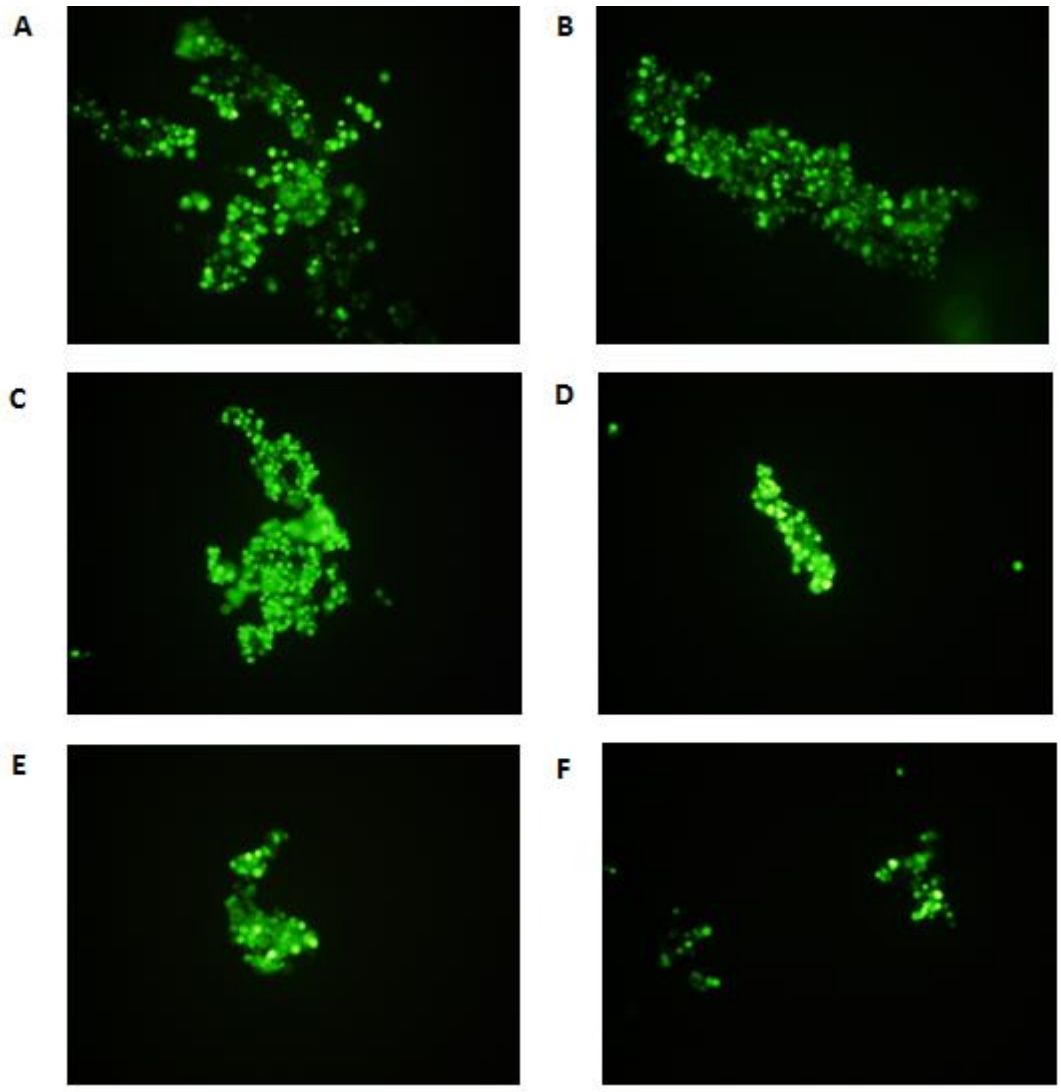


Kontrol grup (A), 100 µM H_2O_2 (B), 50 µM $CuSO_4$ (C), 100 µM $CuSO_4$ (D), 200 µM $CuSO_4$ (E) ve 400 µM $CuSO_4$ (F). Görüntüler floresans mikroskop ile elde edilmiştir.

Şekil 4.3 Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinin DCF floresans yoğunlukları

Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinden $CuSO_4$ uygulanmamış olan kontrol grup hücrelerinin DCF floresans yoğunlukları ile, farklı konsantrasyonlardaki $CuSO_4$ ve pozitif kontrol olarak seçilen 100 µM H_2O_2 uygulanan hücrelerin DCF floresans yoğunlukları karşılaştırılmıştır. Buna göre 50 µM $CuSO_4$ uygulandığında hücrelerin yaydığı DCF floresans yoğunluğunda kontrol gruba kıyasla önemli oranda artış meydana gelmiştir (C). Dolayısıyla hücrelerin ürettikleri ROS düzeyi 50 µM $CuSO_4$ uygulamasının ardından yükselmiştir. 100 µM $CuSO_4$ (D) ve 200 µM $CuSO_4$ (E) uygulaması sonrası hücrelerden elde edilen DCF floresans yoğunlukları, kontrol grubun DCF floresans yoğunluğuna kıyasla belirgin şekilde artmıştır. Ancak 400 µM $CuSO_4$ uygulaması ise (F); hücrelerin

diğer konsantrasyonlardaki $CuSO_4$ uygulamalarından daha düşük düzeyde DCF floresans yoğunluğu göstermiştir (Şekil 4.3). Sonuçlara göre; farklılaşmamış hücrelerin ürettiği ROS düzeyinde artış için 50 µM $CuSO_4$ uygulaması yeterlidir. 400 µM düzeyindeki yüksek $CuSO_4$ konsantrasyonlarında hücrelerde belirgin şekilde ROS üretiminde artış meydana gelmemiştir.



Kontrol grup (A), 100 µM H_2O_2 (B), 50 µM $CuSO_4$ (C), 100 µM $CuSO_4$ (D), 200 µM $CuSO_4$ (E) ve 400 µM $CuSO_4$ (F). Görüntüler floresans mikroskop ile elde edilmiştir.

Şekil 4.4 Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin DCF floresans yoğunlukları

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinden $CuSO_4$ uygulanmamış olan kontrol grup hücrelerinin DCF floresans yoğunlukları ile, farklı konsantrasyonlardaki $CuSO_4$ ve pozitif

kontrol olarak seçilen 100 µM H_2O_2 uygulanan hücrelerin DCF floresans yoğunlukları karşılaştırılmıştır. Buna göre 50 µM $CuSO_4$ uygulaması sonrası hücrelerin gösterdiği DCF floresans yoğunluğunda kontrol gruba göre önemli düzeyde artış olduğu görülmüştür (C). Benzer şekilde 100 µM $CuSO_4$ (D) ve 200 µM $CuSO_4$ (E) uygulamalarında hücrelerin yaydığı DCF floresans yoğunlukları, kontrol grubun DCF floresans yoğunluğuna kıyasla daha belirgindir. Ancak 400 µM $CuSO_4$ uygulamasında (F); diğer $CuSO_4$ konsantrasyonlardaki uygulamalarından daha düşük düzeyde DCF floresans yoğunluğu olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4). Sonuçlara göre; 50 µM $CuSO_4$ uygulaması farklılaşmış hücrelerin ürettiği ROS düzeyinde önemli bir artış sağlamıştır. 100 ve 200 µM $CuSO_4$ uygulaması ROS düzeyinde benzer bir artış sağlamıştır. Ancak 400 µM düzeyindeki yüksek $CuSO_4$ konsantrasyonlarında hücrelerde ROS üretiminde ciddi bir artış söz konusu olmamıştır.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerin, uygulanan bakır konsantrasyonlarına bağlı ROS üretimindeki artış düzeyi incelendiğinde; farklılaşma süreci sonrası SH-SY5Y hücrelerinin oksidatif strese karşı hassasiyetinde artış olduğunu söylemek mümkündür. Kontrol grubu hücrelerinden elde edilen mikroskop görüntüleri kıyaslandığında; farklılaşmış hücrelerin farklılaşmamış hücrelerden daha yüksek düzeyde DCF floresans yoğunluk gösterdikleri, dolayısıyla daha yüksek oranda ROS üretebildiği anlaşılmıştır. İki hücre tipi arasındaki benzer ilişkinin, diğer bakır konsantrasyonlarına bağlı üretilen ROS düzeyleri için de geçerli olduğu görülmüştür.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri için 50-200 µM arasındaki $CuSO_4$ konsantrasyonları hücre canlılığı üzerinde etkide bulunduğu gibi, oksidatif stresi de önemli düzeyde tetiklemektdir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile uyuşmaktadır. Seth ve ark.'nın yaptığı araştırmada; insan hepatoma HepG2 hücreleri 50, 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında $CuCl_2$ ile, 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. 50 µM ve üzerindeki $CuCl_2$ konsantrasyonlarının, sitotoksik olduğu ve bu etkinin uygulama süresi ile doğru orantılı görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda bakır iyonları için 1 saat ve 1.5 saat için ölçülen ROS üretiminin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Çalışma; bakır iyonlarını mitokondriyal ve lizozomal hasara yol açtığını ve oksidatif stresi tetiklediğini göstermiştir [179].

Zhang ve ark.'nın yaptığı çalışmada; 24 saat bakır iyonları tarafından uyarılan Swedish APPswe SH-SY5Y hücrelerinde ve transfekte edilmemiş SH-SY5Y hücrelerinde fermente papaya ürününün bakır toksisitesine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. 100 µM uygulanan bakır konsantrasyonu hücrelerde açığa çıkan ROS miktarını, lipit peroksidasyon düzeyini arttırarak ve nitrik oksit sentezi yapan enzim aktivitesinde ve kalsiyum iyonlarının akısında artışa neden olarak oksidatif stres meydana getirmiştir. Ayrıca APP ifadelenmesinde ve Aβ40 düzeyinde artışa yol açmıştır. Bakırın meydana getirdiği etkiler mutant SH-SY5Y hücrelerinde normal SH-SY5Y hücrelerine kıyasla daha belirgin şekilde saptanmıştır. 100 µM bakır konsantrasyonu; normal SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığını %24 azaltırken ROS üretimini %23 arttırmış, mutant SH-SY5Y hücrelerinde ise hücre canlılığını %54 azaltırken ROS üretimini %110 arttırmıştır. Uygulanan fermente papaya ise bakırın etkilerini elemine edebilmiştir [173]. Bu etkileri ile bakır iyonlarının Alzheimer patolojisinin özelliklerini sağladığını görülmektedir.

Sheline ve ark., nöron ve glia karışımı halinde bulunan hücrelere 20 µM $CuCl_2$ uygulamıştır. Mitokondriyal enzimlerden pirüvat dehidrogenaz ve α-ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesinde düşüşü mitokondriyal membran potansiyelinde azalma izlemiş, ayrıca ROS ve enerji üretiminde artış olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, bakır iyonlarının nöronlarda mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olduğu ve oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir. Bakır konsantrasyonlarının farklı hücre tipleri üzerinde farklı sitotoksik etkileri olmaktadır. Buna göre kortikal ve hipokampal nöronlarda 200 µM $CuCl_2$, glial nöronlarda ise 500 µM $CuCl_2$ hücrelerin yarısı üzerinde öldürücü etki göstermiştir [108]. Benzer şekilde, SH-SY5Y hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada okside olmuş LDL ve 27-hidroksikolesterol uygulaması, hücreiçi GSH düzeyinde ve GSH/GSSG oranında düşüş sağlamıştır. Ayrıca kolesterol tarafından uyarılan BACE1 aktivasyonuna paralel olarak besiyeri ortamına salınan Aβ miktarında da artış olduğu belirlenmiştir. Okside LDL proteazomal aktiveyi inhibe etmiştir, bu nedenle Aβ klirensinde yavaşlama olmuştur. Sonuçlar SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres ürünlerinin Aβ üretiminde artışı uyardığını göstermiştir [152]. Bakır iyonları da LDL'in oksidasyonunu desteklemektedir [2].

Forestier ve ark.'nın APP751 ile transfekte edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde yaptığı çalışmada; 100-1000 µM konsantrasyonlarında 24 saat boyunca uygulanan $CuSO_4$ ve

H_2O_2'in mitokondriyal ve nükleer DNA hasarını tetiklediği anlaşılmıştır. Aβ ise ROS üretimine neden olduğu gibi, DNA hasarını gideren enzimlerin aktivitesinde azalmaya yol açarak hasarı büyütmüştür [110].

Jin ve ark; nöroblastoma N2a hücrelerini 24 saat boyunca tek başına ya da birlikte Aβ40, Aβ42 ve Cu(II) iyonları ile inkübe ettikten sonra yaptıkları incelemelerde; tek başına Aβ ile inkübasyon koşullarına kıyasla, Aβ ile bakır iyonlarının birarada inkübasyonu hücre canlılığını önemli oranda azaltmıştır. Aβ42-Cu(II) uygulaması; Aβ40-Cu(II) uygulamasına göre hücre canlılığını daha fazla oranda azaltmışken, daha az oranda ROS üretmiştir. Bunun nedeni bakır iyonlarının Aβ40'a nazaran Aβ42'yi oligomerik yapıya kolayca dönüştürebilmesi ve bu yapıyı kararlı hale getirmesindendir [180].

Kitazawa ve ark.'nın, transgenik fareler üzerinde yaptığı çalışmada; 3 ve 9 aylık periyot boyunca $CuSO_4$ içeren içme suyu ile beslenen farelerde bakır metalinin Alzheimer patolojisi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; bakır maruziyetinden 3 aylık periyotta APP'nin amiloidojenik olmayan yolağı etkilenmezken, amiloidojenik yolak ürünlerinden C99 ve Aβ üretimi, BACE1 enziminin upregülasyonu nedeniyle artmıştır. 9 aylık periyotta ise APP'nin amiloidojenik olan ve olmayan iki yolak aktivasyonu ve ürünleri artmıştır. Aynı zamanda çalışmada SHSY5Y hücrelerinde 24 saatlik 10-100 µM $CuSO_4$ uygulaması APP seviyesinde artış sağlamıştır. Bakır metali düzeyindeki artışa paralel olarak bakır bağlayıcı bölgeye sahip olan BACE1 aktivasyonu artarken, bakır metalini bağlayan SOD enzimi aktivitesi azalmıştır [18,77]. Transgenik APP mutantı farelerde SOD aktivitesindeki bozukluk Aβ üretimini arttırmıştır [33]. Bu veriler bakır iyonlarının, Aβ üretiminin yanında, antioksidan enzim etkinliğinde zayıflamaya neden olarak oksidatif stresi yükseltici etkide bulunmasını kanıtlar niteliktedir [18].

SH-SY5Y hücrelerinde serbest radikaller ve metal iyonların kültür ortamına eklenmesi oksidatif stresi ve amiloidojenik yolağı tetiklemekte, Alzheimer patolojik bulgusu olan Aβ düzeyinde değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca metal iyonlarının konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında, ROS üretiminde ve besi ortamına Aβ salınmasında gösterdikleri etkiler çeşitli çalışmalarla ispatlanmıştır.

Misonou ve ark., SH-SY5Y hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 200 µM H_2O_2'in APP düzeyini azalttığını, Aβ miktarını arttırdığını ve apoptozisi desteklediğini göstermiştir [154]. Başka bir çalışmada; SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile uyarılan oksidatif stres koşullarının hücre canlılığını %50 oranında azalttığı, hücrelerin apoptozise yönlendiği tespit edilmiştir [181].

Acevedo ve ark., yaptıkları çalışmada SH-SY5Y hücrelerini 25-150 µM $CuCl_2$ ile, primer kortikal nöronları ise 5-20 µM $CuCl_2$ ile 3 saat inkübe etmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde 150 µM $CuCl_2$ uygulaması, fosfatidilinositol-3-kinaz ve glikojen sentaz kinaz-3 yolağını aktive ederek APP'yi fosforile etmiş ve APP'nin sitoplazmaya ve oradan nöritlere kadar uzanan translokasyonunu sağlamıştır. Böylece bakır iyonları APP seviyesini; APP endositozunda azalma ve ekzositozunda artma sağlayarak arttırmıştır [165].

Lu ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücrelerinin tek başına Aβ ile muamelesi durumunda hücre canlılığı %80 iken, Aβ-Cu(II) ile muamelesi durumunda hücre canlılığı %20'ye düşmektedir. Ortamdaki HSA varlığı ise Aβ-Cu(II) kompleksi aracılı hücre canlılığındaki azalmayı ve ROS üretimindeki artışı engellemiştir [144]. Dolayısıyla *in vitro* koşullarda Aβ-Cu(II) kompleksinin oluşması önlenirse Alzheimer'a karşı koruyucu bir yaklaşım sağlanabilir.

Bakır iyonlarının neden olduğu Aβ agregasyonu, sitotoksisitesi ve oksidatif stres düzeyi antioksidan moleküller aracılığında azalmaktadır. Bu moleküller bakır iyonlarının Aβ ile etkileşimini önleyerek, ya da oluşan ROS moleküllerini detoksifiye ederek tahrip edici etkileri giderebilmektedir.

Liu ve ark; doğal bir bileşen olan tanshionine II A'nın, Aβ ile muamele edilmiş primer kortikal nöron kültüründe görülen hücre canlılığında azalma, antioksidan enzim etkinliğinde düşüş, mitokondri membran potansiyelinde azalma, kaspaz aktivasyonunda yükselme, sitokrom c oksidaz enziminin sitozole salınması etkilerini zayıflatıcı etkide bulunduğunu göstermiştir [182]. Benzer şekilde diğer bir çalışmada; antioksidan olan baicalin adı verilen bir flavanoid, sentetik Aβ42 ve bakır iyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki toksisitesini önleyici etkide bulunmuştur. Buna göre; baicalin, bakır iyonları ile etkileşerek Aβ42-Cu kompleksinin ve tek başına Aβ42'nin meydana getirdiği H_2O_2 üretimini ve Aβ42 agregasyonunu zamana ve konsantrasyona

bağlı olarak azaltmış, hücre canlılığını arttırmıştır [183]. Başka bir çalışmada ise; APPsw Swedish mutant SH-SY5Y hücrelerine 24 saat için uygulanan 300 µM bakır iyonlarının meydana getirdiği Aβ agregasyonu, oksidatif stres, mitokondriyal membran hasarı ve kaspaz bağımlı apoptozis koşullarını bir çeşit flavanoid olan luteolin uygulamasının hafiflettiği anlaşılmıştır. Luteolin bakır iyonları ile etkileşerek APP upregülasyonunu engelleyerek işlev göstermiştir [167].

Zhao ve ark.'nın yaptığı çalışmada; Swedish APPsw SH-SY5Y hücrelerinde bakır iyonlarının yokluğunda üretilen Aβ'nın toksik etkide bulunmadığı anlaşılmıştır. 24 saat boyunca 200 µM bakır iyonlarına maruz kalan hücrelerde canlılığın azaldığı, mitokondriyal membran hasarının oluştuğu, sitokrom c oksidaz enziminin sitozole salındığı, APP seviyesinin ve besi ortamına salınan Aβ miktarının arttığı, ROS üretiminin yükseldiği görülmüştür. Ayrıca antioksidan enzimlerden SOD, GSH ve GPx düzeyi de bakır iyonları ile muamele sonrasında azalmıştır. Bakır iyonları Aβ ile etkileşerek MAPK yolağı aktive etmiş ve apoptozisi uyarmıştır. Ancak bir flavanoid olan apigeninin bakır aracılı etkileri tersine çevirebildiği anlaşılmıştır [131]. Benzer bir çalışmada, Swedish mutant APPswe SH-SY5Y hücrelerinde; $CuCl_2$ muamelesi ile tetiklenen oksidatif stres durumu üzerinde antioksidan özellikteki lycopene adı verilen molekülün etkisi araştırılmıştır. Lycopene, Aβ peptidini aşırı eksprese eden APPswe SH-SY5Y hücrelerinde salınan Aβ42 düzeyini, ifade edilen APP ve üretilen ROS miktarını azalttığı gibi, 150 µM $CuCl_2$ konsantrasyonu ile muamele sonrası bakır iyonlarının uyardığı oksidatif stresi gidererek hücre canlılığını arttırmıştır [184]. Diğer bir çalışmada, primer kortikal nöron kültüründe 24 saatlik $CuCl_2$ iyonlarına maruziyet sonucu hücre kromatinlerinde yoğunlaşma, hücre gövdesinde şişme, canlılık düzeyinde azalma meydana geldiği anlaşılmıştır. 20 µM $CuCl_2$ konsantrasyonu %70 canlılık değeri göstermektedir. Bakır toksisitesine karşı bir polifenolik antioksidan olan kurkuminin düşük dozda koruyucu, yüksek dozda toksisiteyi destekleyici role sahip olduğu ispatlanmıştır. Buna göre yüksek doz kurkumin bakır iyonlarını indirgeyerek ROS üretmiştir [185].

Jiang ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücreleri üzerinde salphen bileşiklerinin, bakır iyonlarının ve H_2O_2'nin aracılık ettiği Aβ agregasyonu ve oksidatif stres üzerindeki inhibe edici etkinliği saptanmıştır [186]. Başka bir çalışmada; antioksidan kapasitesine

sahip 8-hidroksiquanin bileşiklerinin, Cu(II) ile etkileşiminin Aβ agregasyonunu inhibe edici etkide bulunduğu gösterilmiştir [187].

Chi ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücreleri 18 saat boyunca 20 µM Aβ25-35 peptidine maruz bırakılmış ve ROS üretiminde artma, lipit peroksidasyonunda yükselme, antioksidan enzimlerden SOD ve GPx düzeyinde azalma, membran ve iyon taşıyıcı fonksiyonlardaki bozulma nedeniyle kalsiyum iyon homeostazisinde değişme, mitokondriyal membran bütünlüğünde bozulma sonucu sitokrom c oksidazın sitozole geçmesi ve kaspaz aktivasyonunda artma belirlenmiştir. Deniz kabuğu ekstraktı olan xanthoceraside'in düşük dozda uygulandığında Aβ25-35'in söz konusu etkilerini geri çevirdiği görülmüştür [188].

Bermejo-Bescos ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücrelerinde 0-1000 µM arasında değişen konsantrasyonlarda $FeSO_4$ uygulaması yapılmıştır ve 40 µM $FeSO_4$'ün sitotoksik etki için yeterli olduğu anlaşılmıştır. 200 µM $FeSO_4$'ün GPx ve GSH antioksidan enzimlerinin aktivitesinde düşüşe ve Fenton reaksiyonları ile üretilen hidroksil radikallerinin lipit peroksidasyonunu başlatması nedeniyle lipit peroksidasyon ürünleri düzeyinde artış meydana getirdiği saptanmıştır. Ancak çalışmada etkinliği test edilen Spirulina plantensis protean ekstraktının demir aracılı oksidatif hasar mekanizmalarına karşı koruyucu olduğu görülmüştür [189].

Alzheimer tedavisinde kullanmak üzere antioksidan ve metal şelatör niteliğinde olan doğal ya da sentetik moleküllerin etkinliği araştırılmaktadır. Clioquinol (CQ, idoklorhidroksikuin, 5-kloro-7-iyodo-8-hidroksikuinolin) kan-beyin bariyerini katedebilen bakır metali şelatörüdür ve metallerle Aβ arasındaki bağı koparark agrega haldeki Aβ yapılarını çözer [41,44,98,102]. Diğer bakır şelatörleri; D-penicillamine ve Trientin'dir. Askorbat (vitamin C), vitamin E, glutatyon (GSH), karotenoidler, polifenoller metal şelatlama özelliğine sahip olan antioksidanlardır [98].

Cherny ve ark.'nın APP'yi aşırı eksprese eden ve beyinlerinde plak mevcut olan transgenik fareler üzerinde yaptığı çalışmada; oral olarak 9 hafta boyunca verilen CQ'nun fare beynindeki Aβ birikiminde azalma sağladığı görülmüştür. Çalışmada, CQ-Cu etkileşiminin CQ-Zn etkileşiminden daha fazla oranda Aβ agregasyonunu çözdüğü belirtilmiştir. Sonuçlar; Aβ-Cu kompleksinin uyardığı agregasyonun, bakır iyonlarının bir

şelatör tarafından tutuklanarak Aβ ile kompleks oluşturmasının engellenmesiyle önlenebileceğini göstermiştir [190]. Başka bir çalışmada ise; APP'yi aşırı eksprese eden CHO hücreleri 10'ar µM bakır, demir, çinko iyonları ve şelatör olarak CQ ile 6 saat boyunca inkübe edilmiştir ve tek başına uygulanan bakır iyonlarının Aβ40 seviyesini %35 oranında yükselttiği görülmüştür. CQ, metal kompleksleri ile muamele edilen hücrelerde Aβ40 ve Aβ42 seviyesinde %85-90 oranında azalma sağlamıştır. Sonuçlar bakır iyonlarının Aβ düzeyini arttırmada etkili olduğunu ve şelatlanması durumunda bu düzeyin azaldığını göstermektedir [191].

Cao ve ark.; polifenolik özelliği ile antioksidan etki gösteren salvianolik asit A'nın, Aβ agregasyonunu inhibe edici etkisini, metal şelatlayıcı ve ROS üretimini sınırlayıcı rolünü Aβ42, $CuSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, $ZnSO_4$ varlığında ve SH-SY5Y hücreleri üzerinde araştırmıştır [192]. Benzer bir çalışmada, tasarlanan scutellarein-O-alkilamin türevi moleküllerin; antioksidan ve şelatlama özellikleri, Aβ-Cu(II) kompleksi ile H_2O_2'nin uyardığı Aβ agregasyonunu inhibe edici etkileri, PC12 ve SH-SY5Y hücrelerinde incelenmiştir [193]. İlave olarak, diğer bir çalışmada; güçlü antioksidan özellikteki resveratrolün türevleri olan moleküller tasarlanmış ve SH-SY5Y hücrelerinde Cu(II) aracılı meydana getirilen ROS artışı ve Aβ agregasyonu üzerinde antioksidatif ve şelatlama kapasiteleri araştırılmıştır [194].

Reznichenko ve ark.'nın çalışmasında; SH-SY5Y hücreleri Fe_2SO_4 ile muamele edildiğinde meydana gelen APP upregülasyonu ve artan Aβ düzeyini demir şelatlayıcı özellikteki EGCG'nin hafifletebileceği anlaşılmıştır [195]. Başka bir çalışmada; bir flavanoid olan tacrin türevli moleküllerin, demir ya da bakır iyonlarını şelatlayarak Aβ düzeyini ve agregasyonunu azaltıcı etkide bulunduğu gösterilmiştir [196]. Custodio ve ark.'nın çalışmasında makroalglerden elde ettikleri fenolik ekstraktların 100 µM H_2O_2'in sitotoksik etkisine karşı koruyucu oldukları, bazı ekstraktların demir ya da bakır iyonlarını şelatlayıcı etkilerinin olduğu görülmüştür [197].

Yang ve ark.; iki cyclam türevi molekülün, çinko ve bakır aracılı Aβ40 agregasyonunu ve oksidatif stresi inhibe ettiğini göstermiştir. Metal iyonlarının Aβ molekülleri ile oluşturduğu kompleksler, β-sheet yapısının oluşmasını kolaylaştırmaktadır. Çalışmada etkinliği denenen moleküller ise β-sheet yapıların bozulmasını sağlayarak etkide

bulunmuştur. Ayrıca tek başına ve Aβ40 peptitlerinin çinko veya bakır iyonları ile oluşturduğu komplekslerin 24 saat uygulandığı SH-SY5Y hücrelerinde; tek başına metal uygulamasına kıyasla Aβ40-metal kompleksi varlığında hücre canlılığı azalırken, ROS üretimi yükselmiştir. Metal iyonları arasında; bakır iyonları çinko iyonlarına göre hücre canlılığını daha fazla azaltmıştır [198]. Bu sonuçlardan anlaşıldığı üzere Aβ40-metal kompleksleri oksidatif stres meydana getirerek ve kendi kendine agregasyona eğilim kazanarak önemli ölçüde toksik etkide bulunmaktadır. Bakır iyonlarının çinko iyonlarının aksine redoks aktif olması toksisitesinin daha fazla olmasını açıklar niteliktedir.

Chen ve ark.; primer kortikal nöron kültüründe çinko ve bakır iyonlarının yol açtığı Aβ40 agregasyonunu, Aβ40-metal komplekslerinin β-sheet yapısını bozarak inhibe eden cyclen ve cyclam moleküllerinin etkinliğini incelenmiştir [199].

Guo ve ark.; APP695 bakımından transfekte farelerde, demir iyonlarının neden olduğu hafıza kaybında, amiloidojenik yolak aktivasyonundaki ve ROS üretimindeki artışta demir şelatörünün inhibe edici etkisini göstermiştir [200].

Noel ve ark. yaptığı çalışmada; sülfonlanmış bakır şelatörü, Aβ40-Cu(II) kompleksinin neden olduğu agregasyonu hafifletmiş ve üretilen ROS miktarı da azalmıştır [135]. Benzer şekilde başka bir çalışmada; streptavidin ile fonksiyonelize edilmiş nanopartikül yapılar, Cu(II) ve Zn(II) tarafından uyarılan Aβ16 peptit agregasyonlarının çözülmesini sağlamıştır [136]. Chen ve ark.; PC12 hücrelerinde 40 µM çinko ve bakır iyonlarının kültür ortamına dışarıdan verilen Aβ ile oluşturduğu kompleks yapıların agregasyonu destekleyici, hücre canlılığını azaltıcı, oksidatif stres oluşturucu yönde etkide bulunduğunu, polioksometalat nanomalzemelerin ise söz konusu bu etkileri iyileştirici olduğunu göstermiştir [201]. Sharma ve ark.; tasarladıkları moleküllerin nöroblastoma N2a hücrelerinde Aβ42, $CuCl_2$ ya da $ZnCl_2$ varlığında meydana gelen agregasyonu çözdüğünü, Aβ42-Cu(II) kompleksinin ürettiği H_2O_2 miktarını azalttığını göstermiştir [202]. Diğer bir çalışmada; tasarlanan salisilaldehit türevli moleküllerin Aβ ve $CuCl_2$ ile muamele edilmiş PC12 hücrelerinde metal şelatlayıcı, SOD aktivitesinde artış sağlayarak üretilen H_2O_2 molekülleri detoksifiye edici, bakır aracılı Aβ'nın kendi kendine biraraya gelme özelliğini inhibe edici özellikleri olduğu anlaşılmıştır [203].

Wang ve ark., bir Cu(II) şelatörü olan trientine molekülünün, 3 ay boyunca verildiği APP ve PS1 genleri bakımından transgenik olan fareler üzerinde etkinliğini incelemiştir. Buna göre; bakır şelatörü, üretilen Aβ düzeyini ve AGE miktarını azaltmıştır. Aynı çalışma kapsamında; Swedish APPswe SH-SY5Y hücreleri üzerinde, trientine molekülü BACE1 enzimini inhibe etmiştir [204].

Hyung ve ark. nöroblastoma N2a hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışmada; Aβ-Cu(II) kompleksinin hücre ölümünü desteklediğini göstererek, antioksidan olan EGCG'nin Aβ ile etkileşerek ve metal iyonlarını şelatlayarak koruyucu rol üstlendiğini göstermiştir [205].

Celsi ve ark.; dibütiril siklik AMP aracılığında farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde, Aβ42'nin 24 saatlik inkübasyonu sonrası Aβ'nın hücre içinde agrega yapılar oluşturduğu, ROS üretimini ve kaspaz yolağı aktive ettiği belirlenmiştir. Bakır şelatör ile muamele ise Aβ toksisitesini engellemezken, Aβ-Cu(II) kompleksinin ürettiği ROS düzeyini azaltabilmiştir [206].

Lombardo ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada; üç pasaj boyunca bakır şelatör olan trientine uygulayarak bakır iyonları bakımından yetersiz hale getirilen SH-SY5Y hücrelerinde bakır düzeyindeki azalmaya paralel olarak sitokrom oksidaz c ve Cu/ZnSOD enzim aktiveleri azalmış, ATP üretimi düşmüş ve ROS düzeyi ise yükselmiştir. Bu koşullarda hücrelere 0.3 nM $CuSO_4$ eklenmesi, bakır yetersizliğinin neden olduğu tabloyu tersine çevirmiştir. Sonuçlar bakır eksikliğinin de antioksidan savunma sistemini zayıflatarak oksidatif stresin etkilerini güçlendirdiğini göstermiştir [153].

Cater ve ark.'nın yaptığı çalışmada APP695 ile klonlanmış SH-SY5Y hücrelerinin besiyeri ortamına ayrı ayrı 200 µM $CuCl_2$ ve bakır iyonlarını şelatlayıcı molekül olarak D-penicillamine eklenmiştir. Bakırın şelatlanması nedeniyle meydana gelen bakır iyonlarının yetersizliği durumunda salınan Aβ40 miktarında artış olduğu saptanmış. Bu etki oligomerize olmuş Aβ komplekslerinin çözünmesinden ileri gelmiştir. Tersine bakır ile muamele edilen hücrelerde ise bakır Aβ'nın çapraz bağlı yapılar oluşturmasını desteklemiştir [124].

Tez çalışmasında oluşturulan Alzheimer modelinde; modeli destekleyici verileri arttırmak amacıyla, bakır muamelesiyle oluşan oksidatif stresin neden olduğu

membran potansiyelindeki değişim ölçülebilir, sitokrom c oksidaz salınımı incelenebilir. Ayrıca Aβ42 düzeyindeki artışa neden olan mekanizmanın daha iyi aydınlatılabilmesi için amilodojenik yolakta etkin olan β-sekretaz enzim düzeyi ve ifadelenmesi incelenebilir, amiloidojenik olmayan yolak enzimi α-sekretaz düzeyi ve ifadelenmesi ile karşılaştırılabilir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Alzheimer'ın patogenezinin açıkça bilinmemesi, çok sayıda risk faktörünün birarada hastalığın gelişime katkı sağlaması ve *in vitro* koşullarda uygun nitelikte Alzheimer modelini oluşturmadaki güçlükler, yapılan çalışmaları güçleştirmekte ve araştırmaların verimliliğini azaltmaktadır. Dolayısıyla literatürdeki mevcut bilgilere dayanarak metal uyarıcılı oksidatif stresle indüklenen bir Alzheimer modeli oluşturmak, etkin tedavi ve önleyici yöntemlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek özellikte olacaktır.

Alzheimer hastalığının araştırılmasında, *in vitro* çalışmalarda farklı hücre hatları kullanılmaktadır. PC12 hücreleri, primer nöron hücreleri, APP genini aşırı eksprese eden transfekte hücreler ve SH-SY5Y hücreleri Alzheimer araştırmalarında kullanılan hücre hatlarıdır.

Tez çalışmasında Alzheimer hastalığının modeli, SH-SY5Y hücreleri kullanılarak oluşturulmuştur. SH-SY5Y hücreleri, Alzheimer hastalığı araştırmalarında tercih edilen diğer hücre hatlarına göre çeşitli avantajlara sahiptir. SH-SY5Y hücreleri insan nörobiyokimyasına fare kaynaklı olan diğer hücre hatlarından daha uyumludur. Embriyolardan elde edilen diğer hücre hatlarına kıyasla bu hücrelerin kullanımında etik kaygılar söz konusu değildir. Transfekte hücre hatlarına kıyasla kültürlenmeleri daha pratik ve az maliyetlidir. SH-SY5Y hücrelerinin tümör türevli olması nedeniyle sürekli bölünerek çoğalabilmesi, bu hücrelerle oluşturulan Alzheimer modelinde olduğu gibi, uzun süreli ve çok sayıda hücre gerektiren çalışmalarda, dolayısıyla tedavi amaçlı etkinliği denenmek istenen maddelerin etkinliğini tayin etme konusunda kolaylık

sağlayacaktır. SH-SY5Y hücrelerinin, düşük düzeyde de olsa nöronal belirteçleri salgılayabilmesi nörodejeneratif hastalık modellerinde kullanımı pratik kılmaktadır. Tez çalışması kapsamında; nöronal özellikleri daha iyi yansıtabilmesi amacıyla SH-SY5Y hücreleri farklılaştırılmıştır.

SH-SY5Y hücrelerinde farklılaştırma; serumsuz besi ortamı içerisinde, 6 günlük retinoik asit maruziyeti ile gerçekleştirilmiştir. Retinoik asit uygulaması hücrelerin bölünmeyi durdurarak nörit ağlar yardımıyla nöronal özellikleri geliştirmelerini sağlamıştır. Serum kullanımının çoğalmayı destekleyerek, retinoik asidin hücreler üzerindeki etkisini inhibe etmesi nedeniyle serumsuz besi ortamı tercih edilmiştir. Ayrıca uzun süreli retinoik asit muamelesinin S-tipi hücre yapısında artışa neden olması nedeniyle, hücrelerin N-tipi morfolojilerini koruyabilmek amacıyla retinoik asit muamelesi 48 saatte bir yenilenme koşuluyla 6 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücrelerin farklılaştırılması çalışmasında, kullanılan hücre sayısı ve retinoik asit ile muamele edilmeden önceki hücre yoğunluğu önemlidir.

SH-SY5Y hücrelerinin pasaj numarası önemlidir, bu nedenle hücrelerin morfolojik ve karakteristik özelliklerinin korunması amacıyla, 13-20 pasaj numarası aralığındaki hücreler kullanılmıştır.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde gerçekleştirilen canlılık testlerinde uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonlarından (50, 100, 200, 400, 800 µM), bakır iyonlarının sitotoksik etkide bulunması için 50 µM'lık $CuSO_4$ yeterli olmuştur. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; hücre canlılığı her iki hücre tipinde de, artan $CuSO_4$ konsantrasyonu ile ters orantılı olacak şekilde azalmaktadır. Özellikle 800 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu hücre canlılığını, her iki hücre tipinde ciddi düzeyde azaltmıştır. Ancak bakır iyonlarının farklılaşmamış hücreler üzerindeki etkisi öncelikli olarak mitokondriyal aktivitede yavaşlama ve mitokondriyal bütünlük kaybı şeklinde olmuştur. Farklılaşmış hücrelerde ise; mitokondriyal işlev ve bütünlük bakımından bakır iyonlarının tahrip edici etkisinden, farklılaşmış hücrelerin farklılaşmamış hücreler kadar etkilenmediği anlaşılmıştır. Farklılaşmış hücrelerde bakır iyonları mitokondriyal işleve nazaran muhtemelen apoptozisi doğrudan destekleyerek hücre canlılığı üzerinde etkili olmuştur. Ayrıca

$CuSO_4$ uygulamasının, farklılaşmış hücrelerde serumsuz ortamda, farklılaşmamış hücrelerde serum varlığında yapılması iki hücre tipi arasında bakır iyonlarına yanıtın değişmesine düşük oranda da olsa etkili olmuş olabilir. Bakır iyonlarının neden olduğu mitokondriyal işlevsizliğe karşı farklılaşmış hücrelerin daha kararlı olduğu, hücre ölümüne karşı ise farklılaşmamış hücrelerin daha kararlı olduğu belirlenmiştir.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonlarına (50, 100, 200, 400 µM) bağlı olarak, üretilerek besi ortamına salınan Aβ40 konsantrasyonunun kontrol gruba kıyasla önemli bir fark göstermediği tespit edilirken, $CuSO_4$ konsantrasyonundaki artış ile düşük düzeyde de olsa salınan Aβ40 konsantrasyonunda artış olduğu anlaşılmıştır.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonlarına (50, 100, 200, 400 µM) bağlı olarak, üretilerek besi ortamına salınan Aβ42 konsantrasyonunun, artan $CuSO_4$ konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde önemli bir düzeyde arttığı saptanmıştır.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerde; bakır iyonları Aβ42 konsantrasyonunu, Aβ40 konsantrasyonundan daha fazla arttırmıştır. Bunun nedeni; farklılaşmamış hücrelerde bakır iyonlarının, Aβ42 ile yüksek affiniteyle bağlanarak, Aβ42'nin degredasyondan korunmasını Aβ40'a göre daha etkin şekilde sağlamış olması şeklinde açıklanabilir. Benzer şekilde; farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde de; bakır iyonları Aβ40'a kıyasla Aβ42 ile daha güçlü bir kompleks meydana getirerek Aβ42'nin degredasyonunu zorlaştırmış olabilir. Bu durumda; her iki hücre tipi için; Aβ42/Aβ40 oranının, uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonundaki artışa paralel olacak şekilde yükseldiği belirlenmiştir. Bu orandaki artış Alzheimer'ın belirteçleri arasında değerlendirildiğinden; tez çalışması kapsamında uygulanan 50-200 µM metal konsantrasyonlarının Alzheimer modeli oluşturmada etkili olacağı anlaşılmaktadır.

Oluşturulmak istenen Alzheimer modelinde, bakır iyonlarının neden olduğu Aβ42 ve Aβ40 konsantrasyonundaki artış farklılaştırma uygulamasının etkinliği açısından değerlendirildiğinde; üretilen Aβ40 düzeyi bakımından farklılaşmamış hücreler ile farklılaştırılmış hücreler arasında önemli bir fark tespit edilemezken, farklılaştırılmış hücrelerin ürettiği Aβ42 miktarı, farklılaşmamış hücrelere kıyasla daha hızlı şekilde

artmıştır, bu nedenle farklılaşmış hücrelerin Aβ42/Aβ40 oranı daha yüksek tespit edilmiştir. Dolayısıyla, retinoik asit ile muamele, SH-SY5Y hücrelerinin metal uyarıcılı Aβ42 üretme kapasitesini yükseltmiştir. Bu veri; farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin bakır iyonları ile muamele edilmesinin Alzheimer patolojisini *in vitro* koşullarda temsil edebilme gücünü göstermiştir.

Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan $CuSO_4$ konsantrasyonlarına (50, 100, 200, 400 µM) bağlı olarak üretilen ROS düzeyi, DCF floresans yoğunluğu incelemesi ile belirlenmiştir. Buna göre; 50 µM $CuSO_4$ uygulandığında, hücrelerde belirgin bir şekilde DCF floresansı artışı meydana gelmiştir, dolayısyla bakır iyonlarının etkisiyle hücrelerde önemli bir oranda ROS açığa çıkmıştır. Benzer etki; 100 µM $CuSO_4$ ve 200 µM $CuSO_4$ uygulamasında da gözlenmiştir. Ancak 400 µM $CuSO_4$ uygulamasında; hücreler diğer konsantrasyonlardaki $CuSO_4$ uygulamalarından daha düşük düzeyde ROS üretmiştir. Uygulanan bakır konsantrasyonlarına bağlı ROS üretimindeki artış düzeyi farklılaştırma süreci bakımından incelendiğinde; farklılaşmış hücrelerde daha belirgin DCF yoğunluklarına rastlanılmıştır, dolayısıyla daha yüksek oranda ROS üretilmiş. Bu sebeple; farklılaştırma sırasında retinoik asit maruziyetinin hücreleri oksidatif strese karşı daha hassas kıldığı, farklılaşmış hücrelerin bakır iyonlarının katalizlediği redoks reaksiyonlar ile ürettiği ROS düzeyinin daha fazla olduğu anlaşılabilir.

Oksidatif stresi başlatıcı rol oynayan bakır iyonları, Aβ ile kompleks oluşturmakta ve indirgenerek H_2O_2 açığa çıkarmaktadır. Bakır iyonlarının Aβ42 ile oluşturduğu kompleks, Aβ40 ile bakır iyonlarının oluşturduğu kompleksten daha yüksek düzeyde H_2O_2 açığa çıkarmaktadır. Ayrıca bakır iyonlarının katalizlediği Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları ile oluşan hidroksil radikali, Aβ monomerleri arasında yeni kovalent bağların oluşumunu katalizleyerek Aβ peptitlerinin biraraya gelmesine ve amiloid plakların oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Gerçekleşen reaksiyonlar sırasında Aβ'nin kendisi de peptidil radikale dönüşerek oksidatif stresi desteklemektedir. Dolayısıyla Aβ'nın oluşturduğu toksisiteyi tek başına, oluşan amiloid plakların mevcudiyeti ile kısıtlamak mümkün değildir, Aβ'nın metal aracılı neden olduğu oksidatif stres de çok sayıda biyomolekülde hasarlara yol açarak sitotoksisitede önemli bir rol oynamaktadır. Aβ'nın geçiş metalleri varlığında toksisitesinde artış olduğu bilinmektedir.

Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendiğinde; bakır iyonları varlığında, hücrelerin canlılığında azalma, üretilen Aβ konsantrasyonunda ve açığa çıkan ROS miktarında artış meydana gelmektedir. Bu etkilerin meydana gelmesi için 50 µM $CuSO_4$ konsantrasyonu yeterlidir. Farklılaşmamış hücrelere göre; nöronal özellikleri ve Alzheimer patolojisini daha iyi yansıtan farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri Alzheimer modeli oluşturmada daha kullanışlıdır ve bu modelin kullanılacağı araştırmalarda daha iyi sonuçlar alınmasında etkili olacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Ayton, S., Lei, P., ve Bush, A.I., (2013). 'Metallostasis in Alzheimer's disease', Free Radical Biology and Medicine 62: 76-89.

[2] Duce, J.A., ve Bush, A.I., (2010). 'Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for the therapeutics and diagnostics', Progress in Neurobiology 92:1-18.

[3] Findeis, M., (2007). 'The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease', Pharmacology & Therapeutics; 116: 266-286.

[4] Reitz, C., ve Mayeux, R., (2014). 'Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers', Biochemical Pharmacology; 88: 640-651.

[5] Liu, G., Huang, W., Moir, R.D., Vanderburg, C.R., Lai, B., Peng, Z., Tanzi, R.E., Rogers, J.T., ve Huang, X., (2006). 'Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis', Journal of Structural Biology; 155: 45-51.

[6] Rivera-Mancia, S., Perez-Neri, I., Rios, C., Tristan-Lopez, L., Rivera-Espinosa, L., ve Montes, S., (2010). 'The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases', Chemico-Biological Interactions 186: 184-199.

[7] Migliore, L., ve Coppede, F., (2009). 'Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases', Mutation Research 667: 82-97.

[8] Zhao, Y., ve Zhao, B., (2013). 'Oxidative Stress and Pathogenesis of Alzheimer's Disease', Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Vol 2013.

[9] Reddy, P.H., ve Beal, F., (2008). 'Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease', Trends Mol Med, 14(2): 45-53.

[10] Mao, P., ve Reddy, P.H., (2011). 'Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Implications for early intervention and therapeutics', Biochimica et Biophysica Acta; 1812: 1359-1370.

[11] Butterfield, D.A., Perluigi, M., ve Sultana, R., (2006). 'Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insight from redox proteomics', European Journal of Pharmacology 545: 39-50.

[12] Kenche, V.B., ve Barnham, K.J., (2011). 'Alzheimer's disease & metals: therapeutics opportunities', British journal of Pharmacology; 163: 211-219.

[13] Tiiman, A., Palumaa, P., ve Tougu, V., (2013). 'The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease-Metal ions', Neurochemistry International 62: 367-378.

[14] Zuo, L., Hemmelgarn, B.T., Chuang, C., ve Best, T.M., (2015). 'The Role of Oxidative Stress-Induced Epigenetic Alterations in Amyloid-β Production in Alzheimer's Disease', Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 1-15.

[15] Bojarski, L., Herms, J., ve Kuznicki, J., (2008). 'Calcium dysregulation in Alzheimer's disease', Neurochemistry International; 52: 621-633.

[16] Prakash, A., Dhaliwal, G.K., Kumar, P., ve Majeed, A.B.A., (2016). 'Brain biometals and Alzheimer's disease – boon or bane?', International Journal of Neuroscience: 1-10.

[17] Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., ve Butterfield, D.A., (2000). 'Review: Alzheimer's Amyloid β-Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity', Journal of Structural Biology; 130: 184-208.

[18] Kitazawa, M., Cheng, D., ve LaFerla, F.M., (2009). 'Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively dysregulates cdk5 in a mouse model of AD', J Neurochem; 108 (6) : 1550-1560.

[19] Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M, ve Valko, M., (2010). 'Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders', Mol Cell Biochem 345: 91-104.

[20] Greenough, M.A., Camakaris, J., ve Bush, A.I., (2013). 'Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease', Neurochemistry International 62: 540-555.

[21] Cobb, A.A., ve Cole, M.P., (2015). 'Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration', Neurobiology of Disease; 84: 4-21.

[22] Dursun, E., (2009). Vitamin D'nin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

[23] Ling, Y., Morgan, K., ve Kalsheker, N., (2003). 'Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease', The International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 35: 1505-1535.

[24] Pithadia, A.S., ve Lim, M.H., (2012). 'Metal-associated amyloid-β species in Alzheimer's disease', Current Opinion in Chemical Biology; 16: 67-73.

[25] Swomley, A. M., Förster, S., Keeney, J.T., Triplett, J., Zhang, Z., Sultana, R. ve Butterfield, D.A., (2014). 'Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies', Biochimica et Biophysica Acta 1842: 1248-1257.

[26] Viles, J., (2012). ‘Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer’s, Parkinson’s and prion diseases’, Coordination Chemistry Reviews 256: 2271-2284.

[27] Barnham, K.J., ve Bush, A.I., (2008). ‘Metals in Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases’, Current Opinion in Chemical Biology; 12: 222-228.

[28] Crews, L., ve Masliah, E., (2010). ‘Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer’s disease’, Human Molecular Genetics, 19 (1): 12-20.

[29] Small, D., (2008). ‘Network dysfunction in Alzheimer’s disease: does synaptic scaling drive disease progression?’, Trends i Molecular Medicine; 14(3):103-108.

[30] Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., ve Perry, G., (2000). ‘Oxidative stress in Alzheimer’s Disease’, Biochimica et Biophysica Acta 1502; 139-144.

[31] Lovell, M.A., ve Markesbery, W.R., (2007). ‘Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer’s disease’, Nucleic Acids Research, 35(22): 7497-7504.

[32] Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., Hashemi, M., Owni, A.A., ve Los, M.J., (2014). ‘Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders’, Progress in Neurobiology 112; 24-49.

[33] Chauhan, V., ve Chauhan, A., (2006). ‘Oxidative stress in Alzheimer’s disease’, Pathophysiology 13: 195-208.

[34] Huang, W., Zhang, X., ve Chen, W., (2016). ‘Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease (Review)’, Biomedical Reports; 4: 519-522.

[35] Saka, E., (2010). ‘Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi: Deneysel ve Genetik Bulgular’, Türk Geriatri Dergisi, 13(3):21-16.

[36] Özcan, S., (2014). APOL3 Aday Geninin Ateroskleroz ve Alzheimer Hastalığı Patogenezindeki Rolünün Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

[37] Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., ve Zhu, X., (2014). ‘Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer’s disease’, Biochimica et Biophysica Acta 1842: 1240-1247.

[38] Yan, M.H., Wang, X., ve Zhu, X., (2013). ‘Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer’s disease’, Free Radical Biology and Medicine 62: 90-101.

[39] Reddy, P.V., Zhu, X., Perry, G., ve Smith, M.A., (2009). ‘Oxidative Stress in Diabetes and Alzheimer’s Disease’, J Alzheimers Dis, 16(4): 763-774.

[40] Maynard, C.J., Bush, A.I., Masters, C.L., Cappai, R., ve Li, Q., (2005). ‘Metals and amyloid-β in Alzheimer’s disease’, International Journal of Experimental Pathology; 86: 147-159.

[41] Dumont, M., ve Beal, M.F., (2011). 'Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease', Free Radical Biology & Medicine; 51: 1014-10026.

[42] Butterfield, D.A., Reed, T., Newman, S.F., ve Sultana, R., (2007). 'Roles of amyloid β-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment', Free Radical Biology & Medicine; 43: 658-677.

[43] Lynch, T., Cherny, R.A., ve Bush, A.I., (2000). 'Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of Aβ-metal interactions', Experimental Gerontology; 35: 445-451.

[44] White, A.R., ve Bush, A.I., (2008). 'Metal Complexing Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease', Top Med Chem; 2: 107-136.

[45] Selekler, K., 2010. 'Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı' ,Turkish Journal of Geriatrics, 13(3), 9-14.

[46] Fleminger, S., Oliver, D.L., Lovestone, S., Rabe-Hesketh, S., ve Giora, A., (2003). 'Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication, J Neurl Neurosurg Psychiatry; 74: 857-862.

[47] Yazıcı, T., ve Şahin, H.A., (2010). Alzheimer Hastalığı, Klinik Gelişim Dergisi; 23(1): 48– 52.

[48] Borenstein, A.R., Copenhaver, C.I., ve Mortimer, J.A., (2006). 'Early-Life Risk Factors for Alzheimer Disease', Alzheimer Dis Assoc Disord; 20: 63-72.

[49] Martin, C.R., ve Preedy, V.R., (2015). Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline, Chapter 52, Iron and Copper in Alzheimer's Disease: A review, Academic Press, Londra.

[50] Özkay, Ü.D., Öztürk, Y., ve Can, Ö.D., (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı, S.D.Ü. tıp Fak. Derg., 18 (1) : 35-42.

[51] Eker, E., (2008). Alzheimer Hastalığı, Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi, 62: 85-110.

[52] Law, A., Gauthier, S., ve Quirion, R., (2001). 'Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of Alzheimer's type' Brain Research Reviews; 35: 73-96.

[53] Hippius, H., ve Neundörfer, G., (2003). 'The discovery of Alzheimer's disease', Dialogues in Clinical Neuroscience, 5(1): 101-108.

[54] Maurer, K., Volk, S., ve Gerbaldo, H., (1997). Auguste D and Alzheimer's disease, The Lancet, 349: 1546-1549.

[55] Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G., Wu, Y., ve Prina, M., (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia, Alzheimer's Disease International (ADI), London.

[56] Centers for Disease Control and Prevention, (2015). Health, United States, 2015, US Department of Health and Human Services, National Center for Health Statistics, United States.

[57] Alzheimer Europe, Turkey, http://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/The-prevalence-of-dementia-in-Europe/Turkey, 2 Temmuz 2016.

[58] Öztürk, E., (2015). Dünya Alzheimer Farkındalık Günü, Rapor Bülteni İstatistik Analiz ve Raporlama Daire Başkanlığı, 11.

[59] Gurvit, H., Emre, M., Tinaz, S., Bilgic, B., Hanagasi, H., Sahin, H., Gurol, E., Kvaloy, J.T., ve Harmanci, H., (2008). 'The Prevalence of Dementia in an Urban Turkish Population', American Journal of Alzheimer's Disease&Other Dementias; 23 (1): 67-76.

[60] Butterfield, A., Drake, j., Pocernich, C., ve Categna, A., (2001). 'Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β-peptide', Trends in Molecular Medicine; 7 (12): 548-554.

[61] Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., ve Inestrosa, N.C., (2000). 'The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β-peptide in Alzheimer's disease', Progress in Neurobiology 62: 633-648.

[62] Emerit, J., Edeas, M., ve Bricaire, F., (2004). 'Neurodegenerative diseases and oxidative stress', Biomedicine & Pharmacotherapy; 58: 39-46.

[63] Kantar Gök, D., (2016). Deneysel Alzheimer Modelinde Olaya İlişkin Potansiyeller ve Oksidan Stres Değişikliklerine Rosmarinik Asidin Etkileri ve Mekanizması, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya.

[64] Christen, Y., (2000). 'Oxidative stress and Alzheimer disease', The American Journal of Clinical Nutrition; 71:621-629.

[65] Parihar, M.S., ve Hemnanni, T., (2004). 'Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions', Journal of Clinical Neuroscience; 11(5): 456-467.

[66] Hureau, C., (2012). 'Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview', Coordination Chemistry Reviews; 256: 2164-2174.

[67] Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V.P., ve Dwivedi, U.N., (2016). 'Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with *in silico* approaches emphasizing the role of natural products', Journal of the Neurological Sciences; 361: 256-271.

[68] Perrone, L., Mothes, E., Vignes, M., Mockel, A., Figueroa, C., Miquel, M., Maddelein, M., ve Faller, P., (2010). 'Copper Transfer from Cu-Aβ to Human Serum Albumin Inhibits Aggregation, Radical Production and Reduces Aβ Toxicity', ChemBioChem; 11: 110-118.

[69] Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., ve Sensi, S.L., (2009). 'Alzheimer's disease, metal ios and metal homeostatic therapy', Trends in Pharmacological Sciences; 30(7): 346-355.

[70] Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., ve Markesbery, W.R., (1998). 'Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques', Journal of Neurological Sciences; 158: 47-52.

[71] Hardy, J.A., ve Higgins, G.A., (1992). 'Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis', Science, Apr 10; 256 (5054): 184-185.

[72] Gaier, E.D., Eipper, B.A., ve Mains, R.E., (2013). 'Copper Signaling in the Mammalian Nervous System: Synaptic Effects', Journal of Neuroscience Ressearches; 91: 2-19.

[73] Bush, A.I., (2003). 'The metallobiology of Alzheimer's disease', TRENDS in Neurosciences; 26(4): 207-214.

[74] Hureau, C., ve Dorlet, P., (2012). 'Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-β peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with Aβ sequences', Coordination Chemistry Reviews; 256: 2175-2187.

[75] Lin, C., Huang, H., ve Jiang, Z., (2010). 'Cu(II) interaction with amyloid-β peptide: A review of neuroactive mechanisms in AD brains', Brain Research Bulletin; 82: 235-242.

[76] Morgan, C., Colombres, M., Nunez, M.T., ve Inestro, N.C., (2004). 'Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease', Progress in Neurobiology; 74: 323-349.

[77] Dingwall, C., (2007). 'A copper-binding site in the cytoplasmic domain of BACE1 identifies a possible link to metal homoeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease', New Approaches for Elucidating Protease Biology and Therapeutic Opportunities, Biochemical Society, 571-573.

[78] Maccioni, R.B., Munoz, J.P., ve Barbeito, L., (2001). 'The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders', Archives of Medical Research; 32: 367-381.

[79] Salahuddin, P., Rabbani, G., ve Khan, R.H., (2014). 'The Role of Advanced Glycation End Products in Various Types of Neurodegenerative Disease: A Therapeutic Approach', Cellular & Molecular Biology Letters; 19: 407-437.

[80] Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., ve Bush, A.I., (1999). 'The Aβ Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction', Biochemistry, vol 38 (24).

[81] Tyan, S., Shih, A.Y., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P.R., Koo, E.H., ve Dickstein, D.L., (2012). 'Amiloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function', Molecular and Cellular Neuroscience 51; 43-52.

[82] Smith, D., Cappai, R, ve Barnham, K., (2007). 'The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide', Biochimica et Biophysica Acta 1768: 1976-1990.

[83] George-Hyslop, P.H., ve Petit, A., (2004). 'Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease', C. R. Biologies 328: 119-130.

[84] Jamsa, A., Belda, O., Edlund, M., ve Lindström, E., (2011). 'BACE-1 inhibition prevents the γ-secretase inhibitor evoked Aβ rise in human neuroblastoma SH-SY5Y cells', Journal of Biomedical Science; 18(76): 1-9.

[85] Murakami, K., Murata, N., Noda Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K.J., Irie, K., Shirasawa, T., ve Shimizu, T., (2011). 'SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase) Deficiency Drives Amyloid β Protein Oligmerization and Memory Loss in Mouse Model of Alzheimer Disease', J Biol Chem, Dec 30; 286(52): 44557-44568.

[86] Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A.A., Mckhann, G.M., ve Yan, S.S., (2010). 'Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model', PNAS; 107 (43): 18670-18675.

[87] Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., ve Reddy, P.H., (2006). 'Mitochondria are a direct site of Aβ accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression', Human Molecular Genetics; 15(9): 1437-1449.

[88] Butterfield, D.A., ve Kanski, J., (2001). 'Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins', Mechanisms of Ageing and Development; 122: 945-962.

[89] Manga Günaydın, F., (2008). Demans Hastalarında Homosistein, Vitamin B12 ve Folat İlişkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji, İstanbul.

[90] Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., ve Evans, D.A., (2013). 'Alzheimer disease in United States (2010-2050) estimated using the 2010 census', Neurology; 80(19): 1778-1783.

[91] Yıldız Dalgınlı, K., (2010). Alzheimer (AH) Hastalarının Plazmasında Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.

[92] Olivieri, G., Novakovic, M., Savaskan, E., Meier, F., Baysang, G., Brockhaus, M., ve Müller-Spahn, F., (2002). 'The effects of β-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and β-amyloid secretion', Neuroscience; 133(4): 849-855.

[93] Turunç Bayrakdar, S.E., (2012). Amiloid β-Peptid (1-42) ile Oluşturulan *in vivo* ve *in vitro* Nörodejenerasyon Deney Modellerinde PARP-1 İnhibitörlerinin Nöroterapötik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

[94] Gwon, A., Park, J., Arumugam, T.V., Kwon, Y., Chan, S.L., Kim, S., Baik, S., Yang, S., Yun, Y., Choi, Y., Kim, S., Tang, S., Hyun, D., Cheng, A., Dann, C.E., Bernier, M., Lee, J., Markesbery, W.R., Mattson, M.P., ve Jo, D., (2012). 'Oxidative lipid

modification of nicastrin enhances amyloidogenic γ-secretase activity in Alzheimer's disease', Aging Cell; 11: 559-568.

[95] Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., ve Drake, J., (2002). 'Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipit peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death', Neurobiology of Aging 23: 655-664.

[96] Karaman, Y., (2006). 'Alzheimer Hastalığı, Vasküler Demans ve Hafif Kognitif Etkilenmede Plazma Homosistein, Vitamin B12 ve Folat Seviyeleri', Journal of Neurological Sciences; 23(3): 175-184.

[97] Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Nienias, J.L., Evans, D.A., ve Bennett, D.A., (2004). 'Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function', Arch Neurol; 61: 661-666.

[98] Jomova, K., ve Valko, M., (2011). 'Advances in metal-induced oxidative stress and human disease', Toxicology; 283: 65-87.

[99] White, A.R., Huang, X., Jobling, M.F., Barrow, C.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., ve Cappai, R., (2001). 'Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in Alzheimer's-type neurodegenerative pathways', Journal of Neurochemistry; 76: 1509-1520.

[100] Markesbery, W.R., (1997). 'Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease', Free Radical Biology & Medicine; 23(1): 134-147.

[101] Gandhi, S., ve Abramov, A.Y., (2012). 'Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegenation', Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012: 1-11.

[102] Crichton, R.R., Dexter, D.T., ve Ward, R.J., (2008). 'Metal based neurodegenerative diseases-from molecular mechanisms to therapeutic stretegies', Coordination Chemistry Reviews; 252: 1189-1199.

[103] Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., ve Mahajan, R.T., (2009). 'Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options', Current Neuropharmacology ; 7: 65-74.

[104] Maurer, I., Zierz, S., ve Möller, H., (2000). 'A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients ', Neurobiology of Aging; 21: 455-462.

[105] Montine, T.J., Neely, M.D., Quinn, J.F., Beal, M.F., Markesbery, W.R., Roberts, L.J., ve Morrow, J.D., (2002). 'Lipid Peroxidation in Aging Brain and Alzheimer's Disease', Free Radical Biology & Medicine; 33 (5): 620-626.

[106] Butterfield, D.A., ve Lauderback, C.M., (2002). 'Lipid Peroxidation and Protein Oxidation in Alzheimer's Disease Brain: Potential Causes and Consequences Involving Amyloid β-Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress', Free Radical Biology & Medicine; 32 (11): 1050-1060.

[107] Perry, G., Cash, A.D., ve Smith, M.A., (2002). 'Alzheimer Disease and Oxidative Stress', Journal of Biomedicine and Biotechnology; 2(3): 120-123.

[108] Sheline, C.T., ve Choi, D.W., (2004). 'Cu^{+2} Toxicity Inhibition of Mitochondrial Dehydrogenases In Vitro and In Vivo', ANN Neurol; 55: 645-653.

[109] Amoroso, S., Gioielli, A., Cataldi, M., Renzo, G.D., ve Annunziato, L., (1999). 'In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca^{+2} increase', Biochimica et Biophysica Acta; 1452: 151-160.

[110] Forestier, A., Douki, T., Sauvaigo, S., De Rosa, V., Demeilliers, C., ve Rachidi, W., (2012). 'Alzheimer's Disease-Associated Neurotoxic Peptide Amyloid-B Impairs Base Excision Repair in Human Neuroblastoma Cells', Int. J. Mol. Sci., 13; 14776-14787.

[111] Dong, W., Wang, F., Guo, W., Zheng, X., Chen, Y., Zhang, W., ve Shi, H., (2015). 'Aβ25-35 Suppresses Mitochondrial Biogenesis in Primary Hippocampal Neurons', Cell Mol Neurobiol, doi 10.1007/s10571-015-0222-6.

[112] Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B., ve Sharpe, M.A., (20029. 'β-Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities', Journal of neurochemistry, 80; 91-100.

[113] Leuner, K., Schütt, T., Kurz, C., Eckert, S.H., Schiller, C., Occhipinti, A., Mai, S., Jendrach, M., Eckert, G.P., Kruse, S.E., Palmiter, R.D., Brandt, U., Dröse, S., Witting, I., Willem, M., Haass, C., Reichert, A.S., ve Müller, W.E., (2012).'Mitochondrion-Derived Reactive Oxygen Species Lead to Enhanced Amyloid Beta Formation', Antioxidants & Redox Signaling; 16(12): 1421-1433.

[114] Austin, S.A., Santhanam, A.V., ve Katusic, Z.S., (2010). 'Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein', Circ Res; 107(12): 1498-1502.

[115] Boll, M.C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., ve Rios, C., (2008). 'Free Copper, Ferroxidase and SOD1 Activities, Lipid Peroxidation and NO_x Content in CSF. A Different Marker Profile in Four Neurodegenerative Diseases', Neurochem Res; 33: 1717-1723.

[116] Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Irie, K., Shirasawa, T., ve Shimizu, T., (2012). 'Stimulation of Amyloidogenic Pathway by Cytoplasmic Superoxide Radicals in an Alzheimer's Disease Mouse Model', Biosci. Biotechnol. Biochem., 76(6): 1098-1103.

[117] Rossi, L., Lombardo, M.F., Ciriolo, M.R., ve Rotilio, G., (2004). 'Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases Associated with Copper Imbalance', Neurochemical Research; 2983): 493-504.

[118] Faller, P., Penna, G.L., Hureau, C., ve Furlan, S., (2013). 'Coordination of Metal Ions to β-Amyloid Peptide: Impact on Alzheimer's Disease', Alzheimer's Disease: Insights into Low Molecular Weight and Cytotoxic Aggregates from In Vitro and Computer Experiments, www.worldscientific.com.

[119] White, A.R., Reyes, R., Mercer, J.F.B., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A.I., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., ve Cappai, R., (1999). 'Copper

levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice', Brain Research 842: 439-444.

[120] Zheng, w., Xin, N., Chi, Z., Zhao, B., Zhang, J., Li, J., ve Wang, Z., (2009). 'Divalent metal transporter 1 is involved in amyloid precursor protein processing and Aβ generation', The FASEB Journal; 23: 4207-4217.

[121] Gaetke, L.M., ve Chow, C.K., (2003). 'Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients', Toxicology 189: 147-163.

[122] Strozyk, D., Launer, L.J., Adlard, P.A., Cherny, R.A., Tsatsanis, A., Volitakis, I., Blennow, K., Petrovitch, H., White, L.R., ve Bush, A., (2009). 'Zinc and copper modulate Alzheimer Aβ levels in human cerebrospinal fluid', Neurobiology of Aging; 30: 1069-1077.

[123] Arciello, M., Rotilio, G., ve Rossi, L., (2005). 'Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage', Biochemical and Biophysical Research Communications; 327: 454-459.

[124] Cater, M.A., McInnes, K.T., Li, Q., Volitakis, I., La Fontaine, S., Mercer, J.F.B., ve Bush, A.I., (2008). 'Intracellular copper deficiency increases amyloid-β secretion by diverse mechanisms', Biochem.J.; 412: 141-152.

[125] Luo, Y., Xu, Y., Bao, Q., Ding, Z., Zhu, C., Huang, Z., ve Tan, X., (2013). 'The molecular mechanism for human metallothionein-3 to protect against the neuronal cytotoxicity of $A\beta_{1-42}$ with Cu ions', J Biol Inorg Chem; 18: 39-47.

[126] Bandyopadhyay, S., ve Rogers, J.T., (2014). 'Alzheimer's disease therapeutics targeted to the control of amyloid precursor protein translation: Maintenance of brain iron homeostasis', Biochemical Pharmacology; 88: 486-494.

[127] Kessler H., Pajonk F.G., Bach D., Schneider-Axmann T., Falkai P., Herrmann W., Multhaup, G., Wiltfang, J., Schafer, S., Wirths, O., ve Bayer, T.A., (2008). 'Effect of copper intake on CSF parameters in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. J Neural Transm 2008;115(12):1651–9.

[128] White, A.R., Multhaup, G., Maher, F., Bellingham, S., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A.I., Beyreuther, K., Masters, C.L., ve Cappai, R., (1999). 'The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures', The Journal of Neuroscience, Nov 1; 19(21):9170–9179.

[129] Rossi, L., Arciello, M., Capo, C., ve Rotilio, G., (2006). 'Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration', The Italian Journal of Biochemistry; 55: 3-4.

[130] Borchardt, T., Camakaris, J., Cappai, R., Masters, C.L., Beyreuther, K., ve Multhaup, G., (1999). 'Copper inhibits β-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion', Biochem. J.; 344-461-467.

[131] Zhao, L., Wang, J., Wang, Y., ve Fa, X. (2013). 'Apigenin attenuates copper-mediated β-amyloid neurotoxicity through antioxidation, mitochondrion

protection and MAPK signal inactivation in an AD cell model', Brain Research 1492: 33-45.

[132] Bayer, T.A., Schafer, S., Simons, A., Kemmling, A., Kamer, T., Tepest, R., Eckert, A., Schüssel, K., Eikenberg, O., Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Staufenbiel, M., ve Multhaup, G., (2003). 'Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Aβ production in APP23 transgenic mice', PNAS; 24: 14187-14192.

[133] Su, X., Wu, W., Huang, Z., Hu, J., Lei, P., Yu, C., Zhao, Y., ve Li, Y., (2007). 'Hydrogen peroxide can be generated by tau in presence of Cu(II)', Biochemical and Biophysical Research Communications 358, 661-665.

[134] Bolognin, S., Messori, L., Drago, D., Gabbiani, C., Cendron, L., ve Zatta, P., (2011). 'Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid-$A\beta_{1-42}$ aggregation', The International journal of Biochemistry & Cell Biology; 43: 877-855.

[135] Noel, S., Perez, F., Pedersen, J.T., Alies, B., Ladeira, S., Sayen, S., Guillon, E., Gras, E., ve Hureau, C., (2012). 'A new water-soluble Cu(II) chelator that retrieves Cu from Cu(amyloid-β) species, stops associated ROS production and prevents Cu(II)-induced Aβ aggregation', Journal of Inorganic Biochemistry; 17: 322-325.

[136] Wang, C., Wang, K., ve Wang, Z., (2014). 'Development of gold nanoparticle based colorimetric method for quantitatively studying the inhibitors of Cu^{+2}/Zn^{+2} induced β–amyloid peptide assembly', Analytica Chimica Acta; 858 : 42-48.

[137] Bush, A.I., (2002). 'Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease', Neurobiology of Aging; 23: 1031-1038.

[138] Crouch, P.J., Blake, R., Duce, J.A., Ciccotosto, G.D., Li, Q.X., Barnham, K.J., Curtain, C.C., Cherny, R.A., Cappai, R., Dyrks, T., Masters, C.L., ve Trounce, I.A., (2005). 'Copper-Dependent Inhibition of Human Cytochrome c Oxidase by a Dimeric Conformer of Amyloid-β_{1-42}', The Journal of Neuroscience, 25 (3): 672-679.

[139] Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., ve Bush, A.I., (2002). 'Metalloenzyme-like Activity of Alzheimer's Disease β-Amyloid', The Journal of Biological Chemistry, 277 (43) : 40302-40308.

[140] Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D.A., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.L., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., ve Bush, A.I., (1999). 'Cu(II) Potentiation of Alzheimer Aβ Neurotoxicity', The Journal of Biological Chemistry, 274 (52): 37111-37116.

[141] Yu, F., Gong, P., Hu, Z., Qiu, Y., Cui, Y., Gao, X., Chen, H., ve Li, J., (2015).'Cu(II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid-β peptide on microglial activation', Journal of Neuroinflammation; 12:122.

[142] Uranga, R.M., Giusto, N.M., ve Salvador, G.A., (2010). 'Effect of Transition Metals in Synaptic Damage Induced By Amyloid Beta Peptide', Neuroscience; 170: 381-389.

[143] Smith, D.P., Smith, D.G., Curtain, C.C., Boas, J.F., Pilbrow, J.R., Ciccotosto, G.D., Lau, T., Tew, D.J., Perez, K., Wade, J.D., Bush, A.I., Drew, S.C., Separovic, F., Masters, C.L., Cappai, R., ve Barnham, K.J., (2006). 'Copper-mediated Amyloid-β Toxicity Is Associated with an Intermolecular Histidine Bridge', The Journal of Biological Chemistry; 281(22): 15145-15154.

[144] Lu, N., Yang, Q., Li, J., Tian, R., ve Peng, Y., (2015). 'Inhibitory effect of human serum albumin on Cu-induced $A\beta_{40}$ aggregation and toxicity', European Journal of Pharmacology; 767: 160-164.

[145] Wan, L., Nie, G., Zhang, J., Luo, Y., Zhang, P., Zhang, Z., ve Zhao, B., (2011). 'β-Amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer disease', Free Radical Biology & Medicine; 50: 122-129.

[146] Banerjee, P., Sahoo, A., Anand, S., Ganguly, A., Righi, G., Bovicelli, P., Saso, L., ve Chakrabarti, S., (2014). 'Multiple Mechanisms of Iron-Induced Amyloid Beta-Peptide Accumulation in SHSY5Y Cells: Protective Action of Negletein', Neuromol Med; 16: 787-798.

[147] Part, K., Künnis-Beres, K., Poska, H., Land, T., Shimmo, R., ve Fernaeus, S.Z., (2015). 'Amyloid β_{25-35} induced ROS-burst through NADPH oxidase is sensitive to iron chelation in microglian Bv2 cells', Brain Research 1629: 282-290.

[148] Bautista, E., Vergara, P., ve Segovia, J., (2016). 'Iron-induced oxidative stress activates AKT and ERK1/2 and decreases Dyrk1B and PRMT1 in neuroblastoma SH-SY5Y cells', Journal of Trace Elements in Medicine and Biology; 34: 62-69.

[149] Becerril-Ortega, J., Bordji, K., Freret, T., Rush, T., ve Buisson, A., (2014). 'Iron overload accelerates neuronal amyloid-β production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease', Neurobiology of Aging; 35: 2288-2301.

[150] Liu, B., Moloney, A., Meehan, S., Morris, K., Thomas, S.E., Serpell, L.C., Hider, R., Marciniak, S.J., Lomas, D.A., ve Crowther, D.C., (2011). 'Iron Promotes the Toxicity of Amyloid β Peptide by Impeding Its Ordered Aggregation', The Journal of Biological Chemistry; 286(6): 4248-4256.

[151] Kovalevich, J., ve Langford, D., (2013). Neuronal Cell Culture : Methods and Protocols, 1078, Methods in Molecular Biology, Considerations for the use of *SH-SY5Y* Neuroblastoma Cells in Neurobiology, USA.

[152] Dias, I.H.K., Mistry, J., Fell, S., Reis, A., Spickett, C.M., Polidori, M.C., Lip, G.Y.H., ve Griffiths, H.R., (2014). 'Oxidized LDL lipids increase β-amyloid production by SH-SY5Y cells through glutathione depletion and lipid raft formation', Free Radical Biology and Medicine; 75: 48-59.

[153] Lombardo, M.F., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., ve Rossi, L., (2003). 'Prolonged copper depletion induces expression of antioxidants and triggers apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells', CMLS, Cell. Mol. Life Sci.; 60: 1733-1743.

[154] Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., ve Ihara, Y., (2000). 'Oxidative Stress Induces Intracellular Acumulation of Amyloid β-Protein (Aβ) in Human Neuroblastoma Cells', Biochemistry; 39: 6951-6959.

[155] Constantinescu, R., Constantinescu, A.T., Reichmann, H., ve Janetzky, B., (2007). 'Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y', J Neural Transm; 72: 17-28.

[156] Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., Cena V., Gallego C., ve Comella J.X., (2000). 'Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells', Journal of Neurochemistry; 75: 991-1003.

[157] Teppola, H., Sarkanen, J., Jalonen, T.O., ve Linne, M., (2016). 'Morphological Differentiation towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y neuroblastoma Cells by Estradiol, ertinoic Acid and Cholesterol', Neurochem Res; 41: 731-747.

[158] Barti-Juhasz, H., Pazsitka, A., Jori, B., Arvai, K., Erös, D., Keri, G., Petak, I., ve Mihalik, R., (2009). 'Altered Expression of a Broad Range of Protease Genes in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells After Bortezomib Treatment', Cancer Research Application Note; 2: 1-11.

[159] Agholme, L., Lindström, T., Kagedal, K., Marcusson, J., ve Hallbeck, M., (2010). 'An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons', Journal of Alzheimer's Disease; 20(4): 1069-1082.

[160] Lopes, F.M., Schröder, R., da Frota Junior, M.L.C., Zanotto-Filho, A., Müller, C.B., Pires, A.S., Meurer, R.T., Colpo, G.D., Gelain, D.P., Kapczinski, F., Moreira, J.C.F., da Cruz Fernandes, M., ve Klamt, F., (2010). 'Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkinson disease studies', Brain Research; 1337: 85-94.

[161] Jamsa, A., Hasslund, K., Cowburn, R.F., Backström, A., ve Vasange, M., (2004). 'The retinoic acid and brain-derived neurotropic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation', Biiochemical and Biophysical Research Communications; 319: 993-1000.

[162] Schneider, L., Giordano, S., Zelickso, B.R., Johnson, M.S., Benavides, G.A., Ouyang, X., Fineberg, N., Darley-Usmar, V.M., ve Zhang, J., (2011). 'Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress', Free Radical Biology & Medicine; 51: 2007-2017.

[163] Cantarella, G., Uberti, D., Carsana, T., Lombardo, G., Bernardini, R., ve Memo, M., (2003). 'Neutralization of TRAIL death pathway protects human neuonal cell line from β-amyloid toxicity', Cell Death and Differentiation; 10: 134-141.

[164] Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., ve Minor, L., (2013). 'Cell Viability Assay', Assay Guidance Manual, 1-23.

[165] Acevedo, K.M., Hung, Y.H., Dalziel, A.H., Li, Q., Laughton, K., Wikhe, K., Rembaach, A., Roberts, B., Masters, C.L., Bush, A.I., ve Camakaris, J., (2011). 'Copper Promotes the Traffickig of the Amyloid Procursor Protein', The Journal of Biological Chemistry; (286(10): 8252-8262.

[166] do Lago, L.C., Matias, A.C., Nomura, C.S., ve Cerchiaro, G., (2011). 'Radical production by hydrogen peroxide/bicarbonate and copper uptake in mammalian cells: Modulation by Cu(II) complexes', Journal of Inorganic Biochemistry; 105: 189-194.

[167] Liu, R., Meng, F., Zhang, L., Liu, A., Qin, H., Lan, X., Li, L., ve Du, G. (2011). 'Luteolin Isolated from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) Prevents Copper-Mediated Toxicity in β–Amyloid Precursor Protein Swedish Mutation Overexpressing SH-SY5Y Cells', Molecules; 16: 2084-2096.

[168] Hirashima, Y., Seshimo, S., Fujiki, Y., Okabe, M., Nishiyama, K., Matsumoto, M., Kanouchi, H., ve Oka, T., (2010). 'Homocysteine and copper induce cellular apoptosis via caspase activation and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neuronal cell line SH-SY5Y', Neuroscience Research; 67: 300-306.

[169] Tabbi, G., Magri, A., Giuffrida, A., Lanza, V., Pappalardo, G., Naletova, I., Nicoletti, V.G., Attanasio, F, ve Rizzarelli, E., (2015). 'Semax, an $ACTH_{4-10}$ peptide analog with high affinity for copper(II) ion and protective ability against metal induced cell toxicity', Journal of Inorganic Biochemistry; 142: 39-46.

[170] Huang, H., Hong, L., Chang, P., Zhang, J., Lu, S., Zheng, B., ve Jiang, Z., (2015). 'Chitooligosaccharides Attenuate Cu^{+2}-Induced Cellular Oxidative Damage and Cell Apoptosis Involving Nrf2 Activation, Neurotox Res; 27: 411-420.

[171] Zhang, J., Liu, Q., Chen, Q., Liu, N., Li, F., Lu, Z., Qin, C., Zhu, H., Huang, Y., He, W., ve Zhao, B., (2006). 'Nicotine attenuates the β-amyloid neurotoxicity through regulating metal homeostasis', The FASEB Journal; 20: E399-3408.

[172] De Benedetto, M.L., Capo, C.R., Ferri, A., Valle, C., Polimanti, R., Carri, M.T., ve Rossi, L., (2014). 'Glutaredoxin 1 is a major player in copper metabolism in neuroblastoma cells', Biochimica et Biophysica Acta; 1840: 255-261.

[173] Zhang, J., Mori, A., Chen, Q., ve Zhao, B., (2006). 'Fermented Papaya Preparation Attenuates β-Amyloid Precursor Protein: β-Amyloid-Mediated Copper Neurotoxicity in β-Amyloid Precursor Protein and β-Amyloid Precursor Protein Swedish Mutation Overexpressing Sh-SY5Y Cells', Neuroscience 143: 63-72.

[174] Noda, Y., Asada, M., Kubota, M., Maesako, M., Watanabe, K., Uemura, M., Kihara, T., Shimohama, S., Takahashi, R., Kinoshita, A., ve Uemura, K., (2013). 'Copper enhances APP dimerization and promotes Aβ production', Neuroscience Letters; 547: 10-15.

[175] Hung, Y.H., Robb, E.L., Volitakis, I., Ho, M., Evin, G., Li, Q., Culvenor, J.G., Masters, C.L., Cherny, R.A., ve Bush, A.I., (2009). 'Paradoxical Condensation of Copper with Elevated β-Amyloid in Lipid Rafts under Cellular Copper Deficiency Conditions', The Journal of Biiological Chemistry; 284(33): 21899-21907.

[176] Sparks, D.L., ve Schreurs, B.G., (2003). 'Trace amounts of copper in water induce β-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease, PNAS, September 16, vol 100; 19: 11065-11069.

[177] Hou, P., Liu, G., Zhao, Y., Shi, Z., Zheng, Q., Bu, G., Xu, H., ve Zhang, Y., (2015). 'The role of copper and the copper-related protein CUTA in mediating APP processing and Aβ generation', Neurobiology of Aging 36: 1310-1315.

[178] Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., ve Fonnum, F., (2003). 'Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescin diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation', Biochemical Pharmacology; 65: 1575-1582.

[179] Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabean, M., ve Roberts, E.A., (2004). 'In vitro assessment of copper-induced toxicity in human hepatoma line, Hep G2', Toxicology in vitro; 18: 501-509.

[180] Jin, L., Wu, W., Li, Q., Zhao, Y., ve Li, Y., (2011). 'Copper inducing Aβ42 rather than Aβ40 nanoscale oligomer formation is the key process for Aβ neurotoxicity', Nanoscale; 3: 4746-4751.

[181] Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Lenjou, M., Laufs, T., Bockstaele, D.V., Moens, L., ve Dewilde, S., (2006). 'Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death', Neuroscience Letters; 410: 146-151.

[182] Liu, T., Jin, H., Sun, Q., Xu, J., ve Hu, H., (2010). 'The neuroprotective effects of tanshinone IIA on β-amyloid-induced toxicity in rat cortical neurons', Neuropharmacology; 59: 595-604.

[183] Yin, F., Liu, J., Ji, X., Wang, Y., Zidichouski, J., ve Zhang, J., (2011). 'Baicalin prevents the production of hydrogen peroxide and oxidative stress induced by Aβ aggregation in SH-SY5Y cells', Neuroscience Letters; 492: 79-79.

[184] Chen, W., Mao, L., Xing, H., Xu, L., Fu, X., Huang, L., Huang, D., Pu, Z., ve Li, Q., (2015). 'Lycopene attenuates $A\beta_{1-42}$ secretion and its toxicity in human cell and *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer disease', Neuroscience Letters 608: 28-33.

[185] Huang, H., Lin, C., Liu, W., Jiang, R., ve Jiang, Z., (2011). 'Dual effects of curcumin on neuronal oxidative stress in the presence of Cu(II)', Food and Chemical Toxicology; 49: 1578-1583.

[186] Jiang, N., Li, S., Xie, S., Li, Z., Wang, K.D.G., Wang, X., ve Kong, L., (2014). 'Design, synthesis and evaluation of multifunctional salphen derivaties for the treatment of Alzheimer's disease', European Journal of Medicinal Chemistry; 87: 540-551.

[187] Gomes, L.M.F., Vieira, R.P., Jones, M.R., Wang, M.C.P., Dyrager, C., Souza-Fagundes, E.M., Da Silva, J.G., Storr, T., ve Beraldo, H., (2014). '8-Hydroxyquinoline Schiff-base compounds as antioxidants and modulators of copper-mediated Aβ peptide aggregation', Journal of Inorganic Biochemistry 139: 106-116.

[188] Chi, T., Wang, L., Ji, X., Shen, L., ve Zou, L., (2013). 'Protective effect of xanthoceraside against β-amyloid-induced neurotoxicity in neuroblastoma SHSY5Y cells', Journal of Asian Natural Product Research; 15(9): 1013-1022.

[189] Bermejo-Bescos, P., Pinero-Estrada, E., ve del Fresno, A.M., (2008). 'Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells', Toxicology in Vitro; 22: 1496-1502.

[190] Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Tim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., ve Bush, A.I., (2001). 'Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits β-Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice', Neuron; 30: 665-676.

[191] White, A.R., Du, T., Laughton, K.M., Volitakis, I., Sharples, R.A., Xilinas, M.E., Hoke, D.E., Holsinger, R.M.D., Evin, G., Cherny, R.A., Hill, A.F., Barnham, K.J., Li, Q., Bush, A.I., ve Masters, C.L., (2006). 'Degredation of the Alzheimer Disease Amyloid β-Peptide by Metal-dependent Up-regulation of Metalloprotease Activity', The Journal of Biological Chemistry; 281(26): 17670-17680.

[192] Cao, Y.Y., Wang, L., Ge, H., Lu, X.L., Pei, Z., Gu, Q., ve Xu, J., (2013). 'Salvianolic acid A, a polyphenolic derivative from *Salvia miltiorrhiza* bunge, as a multifunctional agent for the treatment of Alzheimer's diseasse', Mol Divers; 17: 515-524.

[193] Sang, Z., Qiang, X., Li, Y., Yuan, W., Liu, Q., Shi, Y., Ang, W., Luo, Y., Tan, Z., ve Deng, Y., (2015). 'Design, synthesis and evaluation of scutellarein-O-alkylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease', European Journal of Medicinal Chemistry 94: 348-366.

[194] Li, S., Wang, X., ve Kong, L., (2014). 'Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivaties as multi-targeted agents against Alzheimer's disease', European Journal of Medicinal Chemistry 71: 36-45.

[195] Reznichenko, L., Amit, T., Zheng, H., Avramovich-Tirosh, Y., Youdim, M.B.H., Weinreb, O., ve Mandel, S., (2006). 'Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and β-amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease', Journal of Neurochemistry; 97: 527-536.

[196] Li, S., Wang, X., Xie, S., Jiang, N., Wang, K.D.G., Yao, H., Sun, H., ve Kong, L., (2013). 'Multifunctional tacrine-flavanoid hybrids with cholinergic, β-amyloid-

reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease', European Journal of Medicinal Chemistry; 69: 632:646.

[197] Custodio, L., Silvestre, L., Rocha, M.I., Rodrigues, M.J., Vizetto-Duarte, C., pereira, H., Barreira, L., ve Varela, J., (2016). 'Methanol extracts from Cystoseira tamariscifolia and Cystoseira nodicaulis are able to inhibit cholinesterases and protect a human dopaminergic cell line from hydrogen peroxide induced cytotoxicity', Pharmaceutical Biology; 1-10.

[198] Yang, Y., Chen, T., Zhu, S., Gu, X., Jia, X., Lu, Y., ve Zhu, L., (2015). 'Two macrocylic polyamines as modulators metal-mediated $A\beta_{40}$ aggregation', Integr. Biol.; 7: 655-662.

[199] Chen, T., Wang, X., He, Y., Zhang, C., Wu, Z., Liao, K., Wang, J., ve Guo, Z., (2009). 'Effects of Cyclen and Cyclam on Zinc(II)- and Copper(II)-induced Amyloid β-Peptide Aggregation and Neurotoxicity', Inorg. Chem.; 48: 5801-5809.

[200] Guo, C., Wang, T., Zheng, W., Shan, Z., Teng, W., ve Wang, Z., (2013). 'Intranasal deferoxamine reverses iron-induced memory deficits and inhibits amyloidogenic APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease', Neurobiology of Aging; 34: 562-575.

[201] Chen, Q., Yang, L., Zheng, C., Zheng, W., Zhang, J., Zhou, Y., ve Liu, J., (2014). 'Mo polyoxometalate nanoclusters capable of inhibiting the aggregation of Aβ-peptide associated with Alzheimer's disease', Nanoscale; 6: 6886-6897.

[202] Sharma, A.K., Pavlova, S.T., Kim, J., Finkelstein, D., Hawco, N.J., Rath, N.P., Kim, J., ve Mirica, L.M., (2012). 'Bifunctional Compounds for Controlling Metal-Mediated Aggregation of the $A\beta_{42}$ Peptide', J Am Chem soc.; 134(15): 6625-6636.

[203] Geng, J., Li, M., Wu, L., Ren, J., ve Qu, X., (2012). 'Liberation of Copper from Amyloid Plaques: Making a Risk Factor Useful for Alzheimer's Disease Treatment', Journal of Medicinal Chemistry; 55: 9146-9155.

[204] Wang, C., Xie, J., Xu, Y., Wang, T., Chai, J., Wang, X., Zhao, B., An, L., ve Wang, Z., (2013). 'Trientine Reduces BACE1 Activity and Mitigates Amyloidosis via the AGE/RAGE/NF-κB Pathway in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease', Antioxidants & Redox Signalling; 19(17): 2024-2039.

[205] Hyung, S., Detoma, A.S., Brender, J.R., Lee, S., Vivekanandan, S., Kochi, A., Choi, J., Ramamoorthy, A., Ruotolo, B.T., ve Lim, M.H., (2013). 'Insights into antiamyloidogenic properties of the green tea extract (-)-epigallocatechin-3-gallate toward metal-associated amyloid-β species', PNAS; 110(10): 3743-3748.

[206] Celsi, F., Feri, A., Casciati, A., D'Ambrosi, N., Rotilio, G., Costa, A., Volonte, C., ve Carri, M.T., (2004). 'Overexpression of superoxide dismutase 1 protects against β-amyloid peptide toxicity: effect of estrogen and copper chelators', Neurochemistry International; 44: 25-33.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elif KARAMAN

Doğum Tarihi ve Yeri : 18.01.1992 Rize

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : elifkaraman1992@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Uluslararası İlişkiler	Anadolu Üniversitesi	2016
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014

YAYINLARI

Makale

1. Rasolonjatovo, M.A., Cemek, M., Cengiz, M.F., Ortaç, D., Konuk, H.B., **Karaman, E.**, Kocaman, A.T., ve Göneş, S., (2016). Reduction of methomyl and acetamiprid residues from tomatoes after various household washing solutions, International Journal of Food Properties, (baskıda).

Bildiri

1. **Karaman, E.**, ve Cemek, M., (2016). 'İnsan Nöroblastoma Hücrelerinde Metal Uyarıcılı Oksidatif Stresle İndüklenen Alzheimer Modeli', 7. Ulusal Tıp Fakültesi Öğrenci Kongresi, 6-8 Mayıs 2016, Düzce.
2. Sarı, İ., Cemek, M., Topuzoğulları, M., Kocaman, T., Hazini, A., Göneş, S., Önül, A., **Karaman, E.**, ve Konuk, H.B., (2015). 'Asit fosfataz ve amilazın pratik tespiti', 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 28-30 Mayıs 2015, Samsun.
3. Cemek, M., Ortaç, D., Karaca, T., Büyükokuroğlu, M.E., Özdemir, Z.Ö., Kocaman, T., Alpdağtaş, S., **Karaman, E.**, ve Konuk, H.B., (2015). 'Akut mide mukoza hasarı üzerine okra (*Abelmoschus esculentus L.*)'nın anti-ülser etkisinin araştırılması', 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 28-30 Mayıs 2015, Samsun.
4. Rasolonjatovo, M.A., Cemek, M., Şenel, Ü., Kocaman, T., Göneş, S., Alpdağtaş, S., Ortaç, D., Konuk, H.B., ve **Karaman E.**, (2015).'Domateste bulunan pestisit kalıntılarının giderilmesinde doğal ve kimyasal çözücülerin etkinliğinin araştırılması, 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 28-30 Mayıs 2015, Samsun.
5. Göneş, S., Cemek, M., Özdemir, Z.Ö., Kocaman, T., Önül, A., Ortaç, D., Sarı, İ., Konuk, H.B., ve **Karaman, E.**, (2015). 'Fonksiyonel özelliğe sahip jelatin sentezi ve karakterizasyonu', 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 28-30 Mayıs 2015, Samsun.