

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**NÖRONAL HÜCRE HATLARINDA AMİLOİD β
PEPTİDİN OLUŞTURDUĞU HASARDA
NÖROSTEROİDLERİN ROLÜ**

Dr. ÖZLEM GÜRSOY ÇALAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**NÖRONAL HÜCRE HATLARINDA AMİLOİD β
PEPTİDİN OLUŞTURDUĞU HASARDA
NÖROSTEROİDLERİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÖZLEM GÜRSOY ÇALAN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

DOÇ. DR. PINAR AKAN

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2006.KB.SAG.036 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Resim Listesi.....	iii
Grafik Listesi.....	iv
Kısaltmalar.....	v
Teşekkür.....	vii
Özet.....	1
Abstract.....	3

BİRİNCİ BÖLÜM

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
----------------------	---

İKİNCİ BÖLÜM

2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. ALZHEİMER HASTALIĞI.....	7
2.1.1. Alzheimer Hastalığı'na eşlik eden patofizyolojik süreçler.....	11
2.1.1.1. Amiloid Plak (AP) Oluşumu.....	12
2.1.1.2. Nörofibriler Yumak (NFY) Oluşumu.....	20
2.1.1.3. Gliyozis ve İnflamasyon.....	22
2.1.1.4. Oksidatif Hasar.....	22
2.1.1.5. Nöron ve Sinaps Kaybı.....	23
2.1.1.6. Kolinergik İnervasyon-Diğer Nörotransmitter Kayıpları...23	

2.2. NÖROSTEROİDLER.....	25
2.2.1. Tanım.....	25
2.2.2. Nörosteroidlerin Biyosentezi.....	26
2.2.3. Nörosteroidlerin Metabolizması.....	28
2.2.4. Nörosteroidlerin Etki Mekanizmaları - Nöroaktif steroidler.....	29
2.2.5. Nöroaktif Steroidlerin Fizyopatolojik Süreçlerdeki Rolü.....	31
2.2.6. Pregnenolon, Pregnenolon Sülfat ve Nöronal Hücre Ölümü.....	34

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	37
3.1. KULLANILAN GEREÇLER VE SARF MALZEMELER.....	37
3.2. HÜCRE TİPLERİ ve KULLANILAN PROTOKOLLER.....	40
3.2.1. HÜCRE TİPLERİ.....	40
3.2.1.1. PC-12 Sıçan feokromasitoma hücre hattı.....	40
3.2.1.2. SHSY-5Y İnsan nöroblastoma hücre hattı.....	41
3.2.2. PROTOKOLLER.....	42
3.2.2.1. Hücre Kültür Kaplarının Poli-D-lizin ile Kaplanması.....	42
3.2.2.2. Donmuş Hücrelerin Çözülmesi.....	43
3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması.....	44
3.2.2.4. Hücrelerin Sayılması.....	45
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEY MODELLERİ.....	46
3.3.1. MODEL I-A β ₂₅₋₃₅ Toksisitesinin Steroid Sentezine Etkisi.....	48
3.3.1.1. A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesi.....	48
3.3.1.2. Nöronal hücrelerin steroid içeriğinin belirlenmesi.....	49

3.3.2. MODEL II-Steroidlerin A β ₂₅₋₃₅ Toksikitesi Üzerine Etkisi.....	53
3.3.2.1. PC-12 ve SHSY-5Y Hücrelerine Steroid uygulaması.....	53
3.3.2.2. Steroid Uygulamasının A β ₂₅₋₃₅ Toksikitesi Üzerine Etkisi...	55
3.3.2.3. Steroid Sentez İnhibisyonunun A β Toksikitesine Etkisi.....	55
3.4. YÖNTEMLER.....	56
3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi.....	56
3.4.2. LDH Salınımının Belirlenmesi (Hücre Sitotoksikite Testi).....	58
3.4.3. Hücre İçi Steroid Ölçümünde Kullanılan Örneklerin Hazırlığı.....	59
3.4.3.1. Hücre lizatı hazırlığı ve Çekitleme Basamakları.....	59
3.4.3.2. Solid Faz Ekstraksiyon (SFE) Plağı ile saflaştırma.....	61
3.4.3.3. Solvolisis (Steroidin sülfat grubunun ayrılması).....	62
3.4.4. Pregnenolon Ölçümü.....	63
3.4.4.1. ELISA ile Pregnenolon Ölçümü.....	63
3.4.4.2. HPLC ile Pregnenolon Ölçümü.....	66
3.4.5. Akış Sitometri ile apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi....	68
3.4.6. Protein Tayini.....	70
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	71

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR.....	72
4.1. MODEL I.....	72
4.1.1. A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesinin oluşturulması.....	72
4.1.2. A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesinin steroid sentezine etkisi.....	75
4.1.3. Steroid sentez inhibisyonunun hücre içi P, PS düzeylerine etkisi....	76

4.2. MODEL II.....	79
4.2.1. Steroidlerin hücre canlılığına etkisi.....	79
4.2.2. Steroidlerin Aβ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesine etkisi.....	82
4.2.3. Steroid sentez inhibisyonunun hücre canlılığına etkisi.....	84
4.2.4. Steroid sentez inhibisyonunun Aβ₂₅₋₃₅ toksisitesi üzerine etkisi.....	85

BESİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	88
-------------------------------------	-----------

ALTINCI BÖLÜM

6. KAYNAKLAR.....	99
--------------------------	-----------

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri.....	8
Tablo 2: AH ile ilgili genler, kromozomal lokuslar ve patoloji üzerine etkileri	11
Tablo 3: A β fibrilizasyon yolağındaki ara ürünler.....	16
Tablo 4: AH'daki patolojik değişiklikler.....	21
Tablo 5: Nöroaktif steroidler tarafından modüle edilen nörotransmitter reseptörleri.....	30
Tablo 6: Çalışmada kullanılan cihazlar	37
Tablo 7: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler.....	38
Tablo 8: Canlı, erken/geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin fluoresan boyanması.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Amiloid prekürsör proteinin (APP) uzun hücre dışı bölgesi, transmembran bölgesi ve kısa hücre içindeki sitozolik kuyruğu.....13
- Şekil 2:** Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlar ile kesimi.....15
- Şekil 3: A.** İnsan $A\beta_{1-42}$ peptidinin amino asit dizilimi. $A\beta$ 'nin hidrofobik transmembran kısmı kırmızı renk ile gösterilmiştir. D = Aspartat; A = alanin; E = glutamat; F = fenilalanin; R = arjinin; H = histidin; S = serin; G = glisin; Y = tirozin; V = valin; Q = glutamin; K = lizin; L = lösin; N = asparajin; I = izolösin; M = metionin. **B.** $A\beta$ fibrilizasyonunun şematik görüntüsü.....18
- Şekil 4:** APP proteolizinden nöritik plak oluşumuna kadar geçen süreç.....19
- Şekil 5:** Mikrotübül asosiye tau proteinin NFY' a dönüşümü20
- Şekil 6:** Sinir sisteminde üretilen nörosteroidler.....25
- Şekil 7:** Steroid sentezinin mikrozomal ve mitokondrial kompartmandaki bölümleri.....26
- Şekil 8:** Steroidlerin biyosentez yolağı27
- Şekil 9:** PS'nin prefrontal korteks ve hippokampusta glutamat salınımına etkisi29
- Şekil 10:** Nöroaktif steroidlerin sınıflandırılması31
- Şekil 11:** NAS'lardan pregnenolon(P) ve metabolitleri PS ve PROG'un bazı etkilerinin şematize edilerek gösterilmesi.....32
- Şekil 12:** $GABA_A$ reseptörünün α , β , γ alt birimleri ve reseptörün pozitif düzenlenmesi veya inhibisyonu sonucu ortaya çıkan etkiler.....33
- Şekil 13:** PS'nin nörotransmitter salınımına etkisi. (+) salınımı artırır; (-) salınımı azaltır; (o) salınımına etkisiz34
- Şekil 14:** Model-I ve Model-II'nin şematize edilerek gösterimi.....46
- Şekil 15:** MODEL I'in ($A\beta_{25-35}$ toksisitesi ve bu toksisitenin steroid sentezi üzerine etkisi) plak üzerinde şematize edilerek gösterilmesi.....51

Şekil 16: P ve PS ölçümü öncesi hücelere uygulanan işlemler.....	52
Şekil 17: MODEL II'nin (farklı dozlarda steroid uygulamasının PC-12 ve SHSY-5Y hücreleri üzerine etkisi) plak üzerinde şematize edilmesi.....	54
Şekil 18: MODEL II (farklı dozlarda steroid uygulamasının A β_{25-35} toksisitesi üzerine etkisi)'in plak üzerinde şematize edilerek gösterilmesi.....	55
Şekil 19: MTT tuzunun süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazana dönüşümü	56
Şekil 20: LDH yönteminin iki basamaklı enzimatik reaksiyonu.....	58
Şekil 21: Pregnenolon ve Pregnenolon sülfatın yapısı	61
Şekil 22: Pregnenolon ELISA kitinin çalışma prensibi	63
Şekil 23: Apoptoz ve nekroz belirlenmesinde akış sitometri diyagramı.....	69
Şekil 24: 20 μ M A β_{25-35} muamelesinin 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda PC-12 hücre canlılığına etkisinin A MTT redüksiyonu B LDH salınımı ile değerlendirilmesi.....	73
Şekil 25: Agrege 40 μ M A β_{25-35} peptidinin 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda SHSY-5Y hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu ile değerlendirilmesi.....	74
Şekil 26: A β_{25-35} peptidin ve steroid sentez inhibitörlerinin PC-12 hücrelerinde hücre içi steroid düzeylerinde ortaya çıkardığı değişimin ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi. A. Pregnenolon (P) düzeyleri B. Pregnenolon sülfat (PS) düzeyleri.....	77
Şekil 27: A β_{25-35} peptidin ve steroid sentez inhibitörlerinin SHSY-5Y hücrelerinde hücre içi steroid düzeylerinde ortaya çıkardığı değişimin ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi. A. Pregnenolon (P) düzeyleri B. Pregnenolon sülfat (PS) düzeyleri.....	77
Şekil 28: A β_{25-35} peptidinin ve steroid sentez inhibitörlerinin hücre içi steroid düzeylerine etkisinin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi (PC-12 hücre hattı). A. Pregnenolon düzeyleri B. Pregnenolon sülfat düzeyleri.....	78

Şekil 29: A β_{25-35} peptidinin ve steroid sentez inhibitörlerinin hücre içi steroid düzeylerine etkisinin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi (SHSY-5Y hücre hattı). A. Pregnenolon düzeyleri B. Pregnenolon sülfat düzeyleri.....	78
Şekil 30: PC-12 hücrelerinde pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat'ın (PS) doza bağlı etkilerinin A. MTT redüksiyonu B. LDH salınımı ile 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda değerlendirilmesi.....	79
Şekil 31: SHSY-5Y hücrelerinde pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat'ın (PS) doza bağlı etkilerinin 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda değerlendirilmesi.....	80
Şekil 32: 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat'ın (PS) düşük ve yüksek dozlarının PC-12 hücre hattında hücre canlılığına etkilerinin MTT redüksiyonu ile değerlendirilmesi.....	80
Şekil 33: 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda düşük ve yüksek doz P ve PS'nin SHSY-5Y hücre hattında hücre canlılığına etkilerinin MTT redüksiyonu ile değerlendirilmesi.....	81
Şekil 34: Akış sitometresinden elde edilen hücre dağılımları. A PC-12 (kontrol), B 0.5 μ M P C 50 μ M P, D SHSY-5Y (kontrol), E 0.5 μ M P, F 50 μ M P ile 48 saat muamele edilen hücreler.....	81
Şekil 35: Farklı dozlarda P ve PS'nin PC-12 hücrelerinde A β toksisitesi üzerine etkisi.....	83
Şekil 36: Farklı dozlarda steroidlerin SHSY-5Y hücrelerinde A β toksisitesine etkisi.....	83
Şekil 37: DCNP ilave edilmesinin 72 saat boyunca P (50 μ M) ile muamele edilen hücrelerin canlılığı üzerinde oluşturduğu değişimin değerlendirilmesi (PC-12).....	84
Şekil 38: DCNP ilave edilmesinin P(50 μ M) ile 72 saat muamele edilen hücrelerin canlılığında yarattığı değişimin değerlendirilmesi (SHSY-5Y).....	84
Şekil 39: 0.76 mM AMG'in PC-12 hücre hattında A β_{25-35} toksisitesine etkisinin değerlendirilmesi.....	85
Şekil 40: 0.76 mM AMG'in SHSY-5Y hücre hattında. A β_{25-35} toksisitesine etkisinin değerlendirilmesi.....	86

Şekil 41: 1µM DCNP'nin PC-12 hücre hattında Aβ₂₅₋₃₅ toksisitesine etkisinin değerlendirilmesi.....**87**

Şekil 42: 1µM DCNP'nin SHSY-5Y hücre hattında Aβ₂₅₋₃₅ toksisitesine etkisinin değerlendirilmesi.....**87**

RESİM LİSTESİ

- Resim 1:** PC-12 hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20).....**40**
- Resim 2:** SHSY-5Y hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20).....**41**
- Resim 3: A.** PC12 hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20) **B.** 72 saat süreyle A β_{25-35} peptidine maruz kalmış PC-12 hücreleri).....**74**
- Resim 4: A.** SHSY-5Y hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20) **B.** 72 saat süreyle A β_{25-35} peptidine maruz kalmış SHSY-5Y hücreleri).....**75**

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Pregnenolon standart eğrisi.....	65
Grafik 2: Pregnenolon standart eğrisi.....	67
Grafik 3: Pregnenolon standart ve örnek çalışması	67
Grafik 4: Protein standart eğrisi.....	71

KISALTMALAR

AH: Alzheimer Hastalığı

A β : Amiloid beta peptidi

AP: Amiloid plak

APP: Amiloid Prekürsör Proteini

ApoE: Apolipoprotein E

Allo: Allopregnanolone (3 α ,5 α -THP; 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one)

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CTF: C-ucu fragmanı

Ca²⁺: Kalsiyum

DHEA: Dehydroepiandrosterone (3 β -hydroxy-androst-5-ene-17-one)

DHEAS: Dehydroepiandrosterone Sülfat

DNA: Deoksiribonükleik asit

DCNP: 2,4-dichloro-6-nitrophenol

GABA: γ -amino bütirik asit

HST: Hidroksi steroid sülfotransferaz

3 β -HSD: 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/ Δ^5 - Δ^4 -izomeraz

HMGCOA redüktaz: Hidroksimetilglutaril Co-enzim A redüktaz

LDH: Laktat dehidrogenaz

MAH: Muhtemel Alzheimer Hastalığı

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

NFY: Nörofibriler yumak

NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NMDA: N-metil D-aspartat

PAPS: 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfat

PC-12: Sıçan feokromasitoma hücre hattı

PROG: Progesteron

P: Pregnenolon (3 β -hydroxy-pregn-5-ene-20-one)

PS: Pregnenolon Sülfat

PI: Propidium iyodid

PHF: (Paired Helical Filaments)Çift sarmallı filamanlar

PS1: Presenilin 1

PS2: Presenilin 2

PBS: Phosphorylated buffer solution (Fosforile edilmiş tampon çözelti)

P450scc: Cytochrome P450 side chain cleavage enzim (Sitokrom P450 yan zincir koparan enzim)

SHSY-5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı

SSS: Santral Sinir Sistemi

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER ve Sayın Prof. Dr. Banu ÖNVURAL'a,

Engin deneyim ve bilgisinden yararlanmaktan mutluluk duyduğum, eğitimimin her adımında ve tez çalışmamın planlanması sürecinde ilgi, sevgi ve yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Meral FADILLOĞLU'na

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden itibaren bilimsel olarak bana yol gösteren, kolaylık sağlayan ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Pınar AKAN'a,

Tezimin yönetsel zenginleşmesine katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a,

Eğitim sürecindeki sonsuz katkılarından dolayı Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN ve Dr. Tuncay KÜME'ye,

Arkadaşlık, dostluk ve sevgilerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma, Birce AKPINAR ve Ayşenur ÇATALER'e,

Bu zorlu süreçte dostluk ve sabrını benden esirgemeyen, tüm evraklarımın takibinde büyük titizlik gösteren anabilim dalımızın güler yüzlü sekreteri Eda OLUM'a,

Çalışmalarım esnasında kimyasal maddelerin temininde yardımcı olan Kim. Hüseyin TURGAY ve Kim. Abdullah ADAGÜL'e ve Sağ. Tkn. Emin ÇAVUŞLU'ya,

Deneylerimin analiz aşamasında emeği geçen Kim. Memduh BÜLBÜL ve tüm ARLAB çalışanlarına,

Hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, yaptığım tercihlerde beni destekleyen ve emeklerini esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşime,

Bana her konuda destek olan azim ve motivasyon kaynağım, hayat arkadaşım sevgili eşim Mehmet ÇALAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Özlem GÜRSOY ÇALAN

2010

ÖZET

Giriş: Alzheimer Hastalığı (AH) progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümsüz nörodejeneratif bir hastalıktır. 65 yaş üzerinde gözlenen demansın en sık nedeni olan AH batı ülkelerinde ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Patogenezinde nörofibriller yumak oluşumu, inflamasyon, glutamat toksisitesi, oksidatif stres, sinaptik hasar ve kolinerjik aktivite kaybı gibi bir çok patofizyolojik süreç yer almakla birlikte nöronal dokuda oluşan amiloid beta (A β) toksisitesinin temel mekanizma olduğuna dair artan görüşler mevcuttur. A β 'nin indüklediği toksisitenin oluşum mekanizması ise henüz kesin olarak bilinmemektedir.

Beyinde ya da sinir sisteminde sentezlenen, alışılmışın dışında orjinleri ve farklı fonksiyonları nedeniyle nörosteroidler olarak isimlendirilen nöroaktif steroid hormonların nöronal dokudaki sentezi A β peptidi de içeren pek çok farklı etken tarafından indüklenebilir. Bu nörosteroidler nöronal dokuda doza ve zamana bağlı koruyucu ya da toksik etkiler gösterirler. Ancak A β toksisitesi ile steroid sentezi arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Amaç: Bu tez çalışması ile iki farklı sinir hücre hattında oluşturulan A β toksisitesinin nörosteroid sentezi üzerine etkisi ve steroid sentezinin farklı basamaklardaki inhibisyonunun nöronal hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra nöronal steroidlerin en belli başlılarından olan pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfatın (PS) nöronal hücre canlılığı üzerine etkilerini konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntemler: Çalışmamızda sıçan feokromasitoma (PC-12) ve insan nöroblastoma (SHSY-5Y) hücre hatları kullanılarak 20/40 μ M A β_{25-35} peptidi ile 72.saatın sonunda oluşturulan anlamlı toksisite sonrası hücre içi P ve PS düzeylerindeki değişim ELISA ve HPLC yöntemleriyle belirlendi. Bu iki steroidin nM- μ M'lık değişik konsantrasyonlarının nöronal hücre canlılıklarına ve A β toksisitesi üzerine etkileri MTT indirgenme, laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı, akış sitometri yöntemleri ve mikroskopik inceleme ile değerlendirildi. Ayrıca aminoglutetimid (AMG) ve 2,4-dikloro-6-nitrofenol (DCNP) kullanılarak steroid sentezi iki farklı basamakta bloke edildikten sonra nöronal hücre canlılıkları üzerine etkileri değerlendirildi.

Bulgular: PC-12 hücrelerine 20µM, SHSY-5Y hücrelerine agrege 40µM Aβ₂₅₋₃₅ peptidi uygulamasının hücre canlılıklarını MTT redüksiyonu ile değerlendirildiğinde 48. ve 72. saatlerin sonunda kontrole göre anlamlı azalttığı gözlemlendi (p<0.05). 20/40 µM Aβ₂₅₋₃₅ 72 saat süreyle hücrelere uygulandığında her iki nöronal hücre hattında Aβ'nin P sentezini anlamlı arttırdığı (p<0.05), PS sentezini ise azaltma eğiliminde olduğu belirlendi.

P ve PS'nin suprafizyolojik (>1 µM) konsantrasyonlarda dışarıdan verilmesinin her iki nöronal hücre hattında hücre canlılıklarını anlamlı azalttığı, bunun yanında fizyolojik konsantrasyonlarda (<1 µM) ise 72 saate kadar toksik etki göstermediği belirlendi (p<0.05). Ayrıca Aβ'nin indüklediği hücre ölümü üzerine 0.5 µM P'nin koruyucu etkiye sahip olduğu, 50 µM düzeyde ise Aβ toksisitesini şiddetlendirdiği gösterildi.

Steroid sentezinin AMG ve DCNP ile farklı basamaklarda bloke edilmesinin, her iki hücre hattında 72. saatin sonunda hücre canlılıklarında Aβ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu gösterildi (p<0.05).

Sonuç: Sonuç olarak çalışmamızda Aβ'nin P sentezi üzerine etkili olduğu ve oluşan P'nin sülfotransferaz yoluna gidişinin kısıtlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca P ve PS sentezinin inhibisyonunun ve düşük doz P uygulamasının Aβ toksisitesine karşı nöroprotektif etkili olduğunun gösterilmesi Aβ'a bağlı nörodejeneratif değişikliklerin önlenmesi ve nörodejeneratif hastalıkların oluşum mekanizmalarının anlaşılmasında önemli ip uçları oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Pregnenolon, pregnenolon sülfat, amiloid beta, Alzheimer Hastalığı, nörosteroid, nöronal hücre canlılığı

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, progressive neurodegenerative disorder, which results in memory impairment. AD, the most common cause of dementia among people age 65 and older, takes place in fourth range among the causes of deaths in Western Countries. Many pathophysiological processes play role in its pathogenesis, such as neurofibrillary tangle, inflammation, glutamate toxicity, oxidative stress, synaptic damage and lost of cholinergic activity and also some remaining considerations exist about amyloid beta ($A\beta$) toxicity in neural tissue is the basic mechanism. The mechanism of $A\beta$ induced toxicity has not known exactly yet.

Neuroactive steroid hormones which are biosynthesized in brain or nervous system, are called 'neurosteroids' since their extraordinary origins and different functions, their synthesis in neural tissue is able to be induced by many different factors that are consist of $A\beta$ peptide. These steroids show dose- or time-dependent protective or toxic effects. However, the relation between $A\beta$ toxicity and steroid synthesis has not been clearly identified.

Purpose: In this thesis study, it is purposed to determine that the effect of $A\beta$ toxicity, forming in two different neuron cell lines, on neurosteroid synthesis and the effects of inhibition of neurosteroid synthesis, in different steps, on neural cell viability. Besides, this work aimed to investigate the effects of pregnenolone (P) and pregnenolone sulfate (PS), being well-known among neural steroids, on cell viability in a concentration- and exposure time-dependent manner.

Materials and Methods: In our study, using rat pheochromocytoma (PC-12) and human neuroblastoma (SHSY-5Y) cell lines, after the significant toxicity formed in the end of 72th hour with 20/40 μ M $A\beta_{25-35}$ peptide, the change in intracellular P and PS levels were determined by ELISA and HPLC methods. The effects of different concentrations (nM or μ M) of these two steroids on neural cell viability and $A\beta$ toxicity were evaluated by MTT reduction, lactate dehydrogenase (LDH) release, flow cytometry methods and microscopic investigation. Moreover, after the inhibition of steroid synthesis in two different steps by using aminoglutethimide (AMG) and 2,4 Dichloro-6-Nitrophenol (DCNP), their effects on neural cell viability were evaluated.

Results: When the effect of treatment of PC-12 cells with 20 μ M and SHSY-5Y cells with 40 μ M aggregated A β_{25-35} peptide on cell viability is evaluated with MTT reduction after 48-72 h exposure a significant decrease is observed compared to control group ($p < 0.05$). It is determined that after 72 h exposure A β increase P synthesis significantly ($p < 0.05$) and tended to decrease PS synthesis in both neural cell lines.

It is determined that external treatment of P and PS in supraphysiological ($> 1 \mu\text{M}$) concentrations decreased cell viability significantly in both neural cell lines besides in physiological ($< 1 \mu\text{M}$) concentrations didn't show toxic effect till 72 h exposure ($p < 0.05$). Furthermore it is shown that 0.5 μM P had protective effect against A β -induced cell death and at 50 μM concentrations increased the toxicity of A β .

It is shown that inhibition of steroid synthesis with AMG and DCNP in two different steps resulted in a statistically significant increase in cell viability in both cell line at 72h exposure compared to A β -treated group.

Conclusion: In conclusion, in our study it is shown that A β is effective on the synthesis of P and the newly synthesized P participated sulfotransferase pathway in restricted manner. Moreover showing that the inhibition of P and PS synthesis, P exposure in low concentration had neuroprotective effects against A β toxicity would give important clues to prevent A β related neurodegenerative changes and to understand the mechanisms of neurodegenerative diseases.

Key Words: Pregnenolone, pregnenolone sulfate, amyloid beta, Alzheimer's disease, neurosteroid, neural cell viability

BİRİNCİ BÖLÜM

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Santral sinir sisteminin (SSS) dejenerasyonu ve nöron kaybı ile karakterize olan ve progresif demansların büyük bir kısmının nedeni olan Alzheimer Hastalığı (AH), batı ülkelerinde ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almakta ve tüm dünyada 20 milyonun üzerinde kişiyi etkilemektedir. AH, yaş ile ilişkili, progresif ilerleme gösteren, hafıza kaybı ile sonuçlanan geri dönüşümsüz beyin hastalığıdır ve 65 yaş üzerinde gözlenen demansın en sık nedenidir. 65 yaşından sonraki her 5 yılda prevalans ikiye katlanır ve 85 yaş üzeri en riskli gruptur. Özellikle gelişmiş batı ülkelerinde yaşam süresinde ve hastalığın görülme sıklığında ortaya çıkan artış AH'nı toplum ve aileler için sosyal ve ekonomik problem haline getirmektedir. ABD'de 4 milyondan fazla AH olgusu bulunduğu ve bu hastaların sağlık ve bakım harcamalarının yılda 100 milyar doların üzerinde olduğu bildirilmektedir. Türkiye'de ise bu sayının 300-400 bin olduğu ve 2010 yılında 65 yaş üzeri nüfusun 4.8 milyona ulaşacağı öngörüldüğünden 30-40 yıl sonra AH'nın en önemli sağlık sorunu olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle AH'nda nöron ölümünün kesin mekanizmalarının anlaşılması, nöron kaybını önleyecek ajanların belirlenmesi ve dolayısı ile hastalıktan koruyucu ve tedavi edici yöntemlerin bulunması en önemli hedef haline gelmiştir [1, 2].

SSS'nin nörodejeneratif hastalıklarında; genetik ve çevresel faktörler, inflamatuvar süreçler, glutamat ve amiloid β peptidi ($A\beta$) toksisitesi, oksidan ajanlar, sinaptik hasar, kolinerjik aktivite kaybı gibi patofizyolojik süreçler rol oynamakta olup bunlar sinir sistemi hücrelerinin ölümü ile sonuçlanmaktadır [3]. AH'da tüm bu etkenler patogeneze yer almakla birlikte, $A\beta$ üretim ve birikiminin nöron kaybı ile sonuçlanan temel mekanizma olduğuna dair artan görüşler mevcuttur [4-7]. AH'nın nöropatolojisinde hücre dışı amiloid plaklarının (AP) ve hücre içi nörofibriler yumakların (NFY) gözlemlendiği yaygın nöronal yıkım söz konusudur. Amiloid plaklar Amiloid Prekürsör Proteini'nin (APP) yıkım ürünü olan $A\beta$ peptidinden oluşmaktadır. AH'daki nöron ölümünün apoptozis yolu ile gerçekleştiği [8] ve bunun da $A\beta$ tarafından oluşturulduğu bilinmektedir [9, 10]. AH ile ilişkilendirilen bir diğer önemli patolojik mekanizmada oksidatif hasardır. $A\beta$ 'nin kültüre edilmiş insan hippokampal ve kortikal nöronlarında oksidatif hasar yaratarak, sinyal yollarının işleyişinde

modifikasyonlara, biyokimyasal ve yapısal anormalliklere neden olarak apoptotik hücre ölümünü gerçekleştirdiği gösterilmiştir [11, 12].

Nörosteroidler beyinde ya da sinir sisteminde sentezlenen nöroaktif steroid hormonlar olup alışılmadık dışında orjinleri ve farklı fonksiyonları nedeniyle bu şekilde isimlendirilirler [13]. Bu steroidler, özellikle miyelin yapımını sağlayan glial hücreler başta olmak üzere, astrositler ve nöronlarda sentezlenmektedir [14]

Sinir sisteminde steroid hormon sentezi, A β peptit tarafından hücre içi kalsiyum ve reaktif oksijen ürünlerinin artışı ile birlikte indüklenebilmektedir [15-17]. A β 'nın oksidatif hasarı tetikleyerek ve hücre içi kalsiyumunu arttırarak nöronal apoptoza yol açtığı ileri sürülmektedir [18-20]. Sinir sisteminde steroid sentezinin artmasının, nöronal apoptozun erken bir kanıtı olabileceği ileri sürülmüştür [21]. Bunun aksine bazı çalışmalarda dışarıdan verilen östrojen ve pregnenolon (P) gibi steroidlerin nöron ölümünü önleyebildiği ileri sürülürken [22, 23], bazı çalışmalarda sülfatlanmış pregnenolonun (PS) nöronal hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir [24]. Doğal bir eksitotoksin olarak kabul edilen pregnenolon sülfatın, hücrenin oksidatif durumundaki değişiklikten bağımsız olarak erken dönemde kaspaz 2 ve kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir [25].

Nörosteroidlerin nöronal dokudaki etkileri doza bağlı olarak oldukça karmaşık bir düzen içinde gerçekleşmektedir. Günümüzde nöronal dokudaki etkileri halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

A β peptidin indükleyebildiği steroid hormon sentezinin, nöron ölümünde nasıl bir rol oynadığı araştırmaya açık bir konudur. Bu tez çalışması ile AH patogenezinde büyük öneme sahip A β birikimi sonucu ortaya çıkan nöronal hücre ölümünde, başlıca nöronal steroidlerden olan pregnenolon ve bunun sülfat esterinin oynadığı rolü ortaya koymak amaçlanmıştır. Bunun için iki farklı nöronal karakterli hücre hattında oluşturulan A β toksisitesinde, hücre içi steroid düzeylerindeki değişiklikler, steroid düzeylerinin hücre canlılığı ile ilişkisi ve bunun yanı sıra steroid sentezinin inhibisyonunun olası etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu şekilde A β 'nın oluşturduğu nöronal hasar mekanizmasının anlaşılmasına ve etkin koruyucu yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir.

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALZHEİMER HASTALIĞI

İlk kez 1906'da Alois Alzheimer tarafından nöropsikiyatrik hastalık nedeniyle 51 yaşında ölen bir kadının beyin dokusundaki değişikliklerin incelenmesi sonucu tanımlanan ve uzun yıllar demansın presenil formu olarak kabul gören hastalık bugün yaygın olarak AH ismiyle bilinmektedir. AH, bellek ve en azından bir diğer kognitif alandaki ilerleyici bozulmanın, demansın başka tanımlanabilir sebepleri olmaksızın, sosyal, profesyonel ve evle ilgili işlerde önceki düzeye göre yitimin olduğu klinik durumu tanımlamak için kullanılır [26]. Tedaviden çok yarar elde edilemeyen bu demans hastalığı 65 yaşın altındaki bireylerin %1'inden azını etkilerken 85 yaşın üzerindeki bireylerin yaklaşık %30-40'ı risk altındadır. Demans sendromları içinde en sık (%50-70) görüleni olan AH'nın başlangıcında bellekteki bozulma seçici olarak yakın geçmişteki olaylar ve deneyimleri kapsarken, çocukluk ile ilgili uzak olaylar ve duygusal ağırlığı olan yeni olaylar göreceli olarak daha iyi hatırlanabilir. Hastalığın daha sonraki 5-15 yıllık döneminde bilişsel ve duygusal fonksiyon bozukluğu ve fiziksel işlevlerde kayıp meydana gelebilmektedir. AH'nda nörodejenerasyon, bilişsel işlevlerde hayati önem taşıyan limbik sistem ve asosiyasyon alanlarında sınırlı kalarak genellikle motor ya da duygusal değişiklikler ortaya çıkarmasa da , nadir vakalarda motor sistem dejenerasyonu ile spastik paraparazi gibi atipik klinik bulgular gözlenmektedir [1, 27, 28].

AH'nın kesin tanısı bugün bile ancak post-mortem beyin incelemesi ile mümkün olmaktadır. Beynin histopatolojik analizinde AH'na ait klasik üçlü bulgu olan A β içeren senil plaklar, hiperfosforile mikrotübüler tau proteini içeren nörofibriler yumaklar (NFY) ve beynin özellikle temporal, parietal ve hipokampal bölgelerinde ilerleyici nöron kaybı gözlenmektedir [1, 9, 29].

AH'nın tanı kriteri olarak günümüzde yaygın biçimde "National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association" tarafından 1984 yılında ortaya konmuş olan NINCDS-ADRDA kriterleri (Tablo 1) kullanılır. Klinik tanı ile postmortem uygulanan patolojik tanı

karşılaştırıldığında, NINCDS-ADRDA kriterleri muhtemel ve mümkün AH tanısı için %90 sensitivite ve %60 spesifisite sağlar [30-34].

Tanıda laboratuvarın yeri kısıtlıdır. Henüz yaşayan bir hastada kesin AH tanısı koyabilecek hiçbir laboratuvar testi yoktur. Geçmiş yıllardaki çalışmalarda ileri sürülen aday belirteçlerin hiçbiri ile AH arasında bire bir ilişki sağlanamamıştır. AH'da beyin omurilik sıvısında (BOS) $A\beta_{1-42}$ peptidinin azalması [35, 36] veya tau protein [35] düzeylerinin artması tanı için tek başına yeterli değildir.

Diğer yöntemler arasında MRG ya da BT gibi beyin görüntüleme teknikleri ile PET, SPECT ve yeni geliştirilen fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRG) gibi fonksiyonel görüntüleme teknikleri yer almaktadır. Ancak bunlarda kendi başına AH tanısı koyduramamaktadır [34].

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri [30]

<p>I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir:</p> <ul style="list-style-type: none">• klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Test, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümanite edilmiş ve nöropsikolojik testlerle doğrulanan demans tablosu;• iki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma;• bilinç bozukluğu yok;• başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra;• bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok. <p>II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:</p> <ul style="list-style-type: none">• dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma;• günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişim;• ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa);• laboratuvarında: standart tekniklerle normal lomber ponksiyon, EEG'nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler, BT'de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi. <p>III. Alzheimer hastalığı dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler şunlardır:</p> <ul style="list-style-type: none">• hastalığın seyirinde platolar;• depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik padamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular;• bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, miyoklonus ya da yürütme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar;• hastalığın ileri evresinde nöbetler;• yaş için normal BT. <p>IV. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışına çıkaran özellikler şunlardır:</p> <ul style="list-style-type: none">• inme tarzında ani başlangıç;• hemiparazi, duysal kayıp, görme alanı defektlere ve inkoordinasyon gibi lokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerinde bulunması;• nöbetler ya da yürütme bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması; <p>V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır:</p> <ul style="list-style-type: none">• demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, prezentasyon ya da klinik seyirde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir;• demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir;• diğer belirlebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir. <p>VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır:</p> <ul style="list-style-type: none">• muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri;• biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.
--

AH için kesin olarak tanımlanmış birkaç risk faktörü ile birlikte halen üzerinde çalışılan ve hastalık gelişimindeki rolü tamamen aydınlatılamamış faktörler de mevcuttur. İlerlemiş yaş AH için en önemli risk faktörüdür. 65 yaş üzerindeki popülasyon büyük risk taşımaktadır ve her 5 yılda hastalık gelişimi riski ikiye katlanmaktadır.[37]

Aile öyküsü bulunması da birinci derece risk faktörü olarak tanımlanmıştır. AH ailesel ve sporadik olmak üzere iki formda gelişir. Otozomal dominant olan ailesel AH 30-60 yaşları arasında başlamaktadır. Erken başlangıçlı (ailesel) AH'nda aile hikayesi bulunması hastalık gelişim riskini önemli ölçüde artırmaktadır ve bu tip AH'da genetik kalıtım kesin olarak belirlenmiştir. 21. kromozomda bulunan APP geni, 14. kromozomda bulunan presenilin 1 (PS1) geni ve 1. kromozomda bulunan presenilin 2 (PS2) geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar ailesel AH'na neden olur. Her üç mutant gen (APP, PS1, PS2) A β üretimini artırarak senil plaklarda birikimine neden olmaktadır (Tablo 2). Ailesel AH vakaları tüm AH vakalarının sadece %5'ini oluştururken bunun tersine sporadik olarak görülen geç başlangıçlı AH çok yaygındır ve vakaların % 90-95'ini oluşturmaktadır. Ancak sporadik AH'nın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte hem genetik hem de çevresel risk faktörlerinin kompleks etkileşimi ile birlikte yaşlanma süreciyle ortaya çıkabileceği görüşü ileri sürülmektedir. [38, 39] Yapılan çalışmalarda Apo E4 allel frekansının gerek sporadik gerekse ailesel tipteki AH'nda arttığı gösterilmiştir.

ApoE, plasma ve beyinde kolesterol taşıyan temel apolipoproteinlerden biridir. Bu proteinin mRNA'sı karaciğerden sonra ikinci olarak en fazla beyinde bulunmaktadır. ApoE beyinde primer olarak astrositler tarafından sentezlenmekte ve salgılanmaktadır ayrıca mikroglia ve nöronlarda da bulunmaktadır.

Apo E SSS'nde oluşan bir hasar sonrası nöronal membranın onarımı ve aksonların miyelinizasyonu için gerekli olan kolesterolün salınımını, hücrelere yeniden dağılımını koordine eden bir protein olup 19. kromozomda kodlanır. İnsanlarda üç ayrı allelik formu vardır; ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4. Bu aleller tarafından üretilen protein izoformları 112 ve 158. pozisyonlardaki aminoasitlerde farklılık göstermektedir: ϵ 2 (Cys112, Cys158), ϵ 3 (Cys112, Arg158), ϵ 4 (Arg112, Arg158). Toplumda ϵ 3 sıklığı %70 olarak görülürken, ϵ 4 sıklığı %20'dir. AH'da bu oran %40'a çıkmaktadır. Apo E ϵ 4 alleline sahip olmak her zaman AH'a neden olmaz ancak hastalığa duyarlılığı artırır, bu nedenle duyarlılık geni olarakta bilinmektedir [30, 34, 37, 40, 41].

Apo E ϵ 4 allelindeki artış; artmış AH riski, AH'nın ilk başlama yaşının azalması, senil plak yoğunluğunun artışı ile doğru orantılı bulunmuştur Bunun aksine ϵ 2 alleli A β peptid temizlenmesinde etkin, koruyucu bir faktör olarak bilinmektedir [42, 43].

Risk faktörü olarak cinsiyet halen tartışılan bir konudur. Bazı epidemiyolojik çalışmalar kadın cinsiyetin AH riskini artırdığını belirtmektedir. Kadınlarda hastalık erkeklerden 2 kat daha fazla görülmektedir. Bu durumun altında yatan biyolojik neden tam olarak bilinmemekle birlikte, kadınlarda yaşam beklentisinin daha uzun olması, menopozdan sonra ki östrojen düzeylerinde ki düşüşün buna neden olduğu düşünülmektedir. Gözlemsel çalışmalarda postmenopozal dönemde östrojen replasmanının AH riskini azalttığı ileri sürülmüştür. Hayvan çalışmalarında östrojenin nörotrofik, nöroprotektif olduğu, serebral kan akımını arttırdığı gösterilmiş olsa da klinik çalışmalar bu durumu tam olarak desteklememektedir.

Kafa travması, depresyon öyküsü, düşük eğitim seviyesi, doğum sırasındaki parental yaş, sigara içme ve birinci-derece akrabada Down Sendromu varlığı, vasküler hastalık öyküsü, yüksek plazma homosistein öyküsü, hipotiroidizm, organik çözücüler, aliminyum, elektromanyetik alanlar gibi bazı toksik ve zararlı durumlara maruziyet AH ile ilişkilendirilen diğer olumsuz risk faktörleridir [30, 34].

Yüksek eğitim düzeyine sahip olmak, neokortikal asosiasyon alanlarında artmış sinaptik ve/veya dendritik yoğunluk ve komplekslik sağlaması nedeni ile hastalık gelişimi riskini azaltıcı bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanı sıra aile ve yakın çevre ile iyi ilişkilerde bulunma, sosyal aktivitelerdeki zenginlik, düzenli egzersiz gibi vasküler hastalıkların riskini azaltacak tüm koşulların sağlanması, omega 3'ten ve vitamin E gibi antioksidanlardan zengin besinlerin tüketimi, düzenli anti enflamatuvar ajan kullanımı AH gelişim riskini azaltıcı diğer etkenlerdir [37].

Tablo 2: AH ile ilgili genler, kromozomal lokuslar ve patoloji üzerine etkileri [34]

Kromozom	Gen	Başlangıç Yaşı	Patern	Varyant/Mutasyon	Etki
Ch21q21.3	APP	30-60 yaş	OD	20 (ekzon 16,17)	A β Yapımı ve Agregasyonu $\uparrow\uparrow$
Ch14q24.13	PS1	30-50 yaş	OD ve ailesel	135 (ekzon 4+12)	A β Yapımı ve Agregasyonu \uparrow
Ch1q31.42	PS2	50-70 yaş	OD	10 (ekzon 4,5,7)	A β Yapımı ve Agregasyonu \uparrow
Ch19q13.2	ApoE	50-80+ yaş	Ailesel/ Sporodik	3 izoform	A β 'nın Plaklarda Depolanmasını \uparrow

2.1.1. AH gelişimine eşlik eden patofizyolojik süreçler

Yapılan yaygın çalışmalara rağmen AH'nın nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Şu an için sadece hastalığın gelişimine eşlik eden bazı nöropatolojik değişiklikler tanımlanmış durumdadır. Bunlar;

- Amiloid Plak (AP)
- Nörofibriler yumak (NFY) “Neurofibrillary Tangle” (NFT)
- Gliyozis ve inflamasyon
- Oksidatif hasar
- Nöron ve sinaps kaybı
- Kolinergik inervasyon ve diğer nörotransmitterlerin kayıpları şeklinde sıralanabilir.

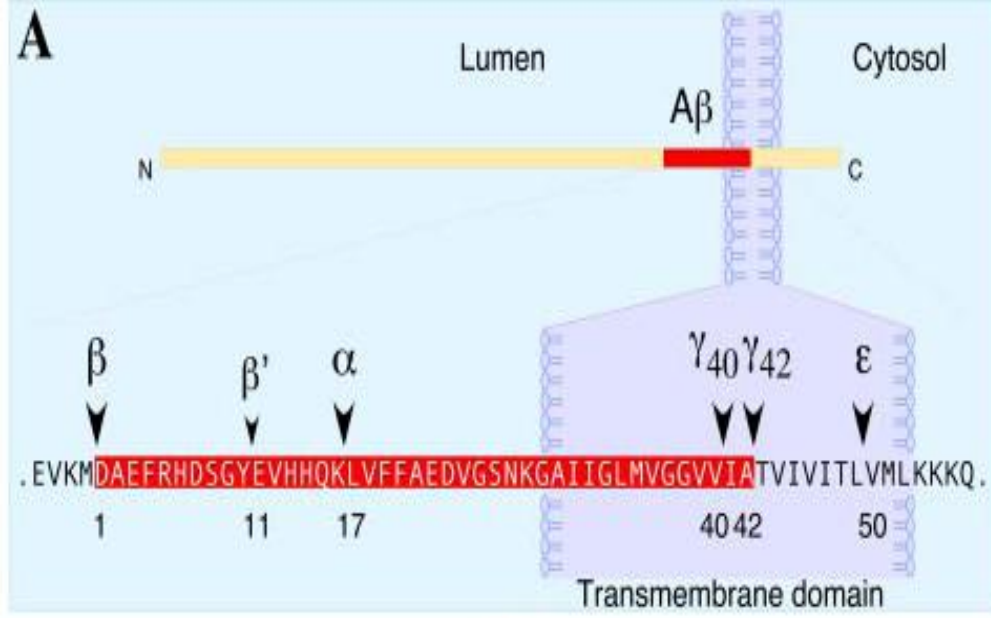
AH'nın patofizyolojik süreçleri bu başlıklar altında incelenecektir.

2.1.1.1. Amiloid Plak (AP) Oluşumu:

Amiloid plakların temel bileşeni molekül büyüklüğü 4 kDa olan A β 'dir. A β , bir transmembran protein olan amiloid öncül proteinin "Amyloid Precursor Protein"(APP) metabolizma ürünlerinden biridir. Bu ürünün birikimi AH'nın değişmez özelliğidir. Ancak yine de AH'nın patogenezindeki A β 'nin oynadığı rol çok az anlaşılmıştır. Hücre kültürlerinde A β 'nin nöronlara toksik olduğu gösterilmişse de AH lezyonları ile in vitro aktivite arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. A β birikiminin AH'nın gelişiminde primer bir rol mü oynadığı yoksa sekonder bir olayın kalıntıları mı gösterdiği halen tartışılan bir konudur. Ancak A β agregatlarının AH'nın bir sonucu olmasından çok hastalığın sebebi olduğuna dair artan kanıtlar mevcuttur. A β peptidinin aşırı üretimi ve birikimi sonucu potansiyel toksik etkisinin hastalığı başlatıcı ilk faktör olduğu görüşünün kabul edilmesi "**Amiloid Kaskad Hipotezi**" olarak bilinmektedir [44-46].

A β peptit öncülü Amiloid Prekürsör Protein (APP):

Proteazlar ile yıkım sonucu A β peptidini oluşturan APP; 21. kromozom üzerinde bulunan, ilk kez 1987'de tanımlanmış olan insan APP³ geni tarafından kodlanır. Alternatif splicing nedeni ile 563-770 amino asit arasında değişebilen uzunlukta 10 izoformu bulunur. APP, amiloid prekürsör-benzeri protein 1 ve 2 (APLP1 ve APLP2)'yi içeren küçük bir gen ailesinin üç üyesinden biri olarak bilinir. Hepsisi uzun bir ekstrasellüler bölge (ektodomain), bir transmembran bölge ve kısa bir sitozolik kuyruktan oluşan transmembran proteini kodlar ancak sadece tip 1 integral membran proteini olan APP A β parçası oluşumuna katılır (Şekil 1) [47].



Şekil 1: Amiloid prekürsör proteininin (APP) uzun hücre dışı bölgesi, transmembran bölgesi ve kısa hücre içindeki sitozolik kuyruğu [47]

APP farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip olmakla birlikte işlevi tam olarak açıklanamamış bir glikoproteindir. APP'nin bazı fonksiyonel bölgeleri kesin olarak tanımlanmıştır. Bunlardan biri bakır ve çinko gibi metal iyonlara bağlanabilen bölgedir. Diğeri ekstrasellüler matriks bileşenlerine (heparin, kollagen ve laminin) bağlandığı bölgedir. APP'nin heparin ve kollagen'e bağlanmasının ekstrasellüler matriks ile etkileşim için aracılık ettiği bildirilmiştir. APP'nin hücre adezyonu, hücre/hücre veya hücre/matriks etkileşimini düzenlemekte işlev gördüğü varsayılmaktadır.

İşlevi tanımlanan bir diğer bölge ise sadece APP751 ve APP770 izoformlarının amino terminal domainlerinde bulunan proteaz inhibisyon özelliği taşıyan fonksiyonel bölgedir. Serin proteaz inhibitörü (Kunitz proteaz inhibitör) (KPI) kodlayan bir bölge taşıyan APP'nin bu izoformları trombositler tarafından sentezlenir ve koagülasyon faktörlerinden faktör IX ve faktör XIa'ı inhibe eder. Nöronlar ise KPI bölgesi içermeyen APP 695 izoformunu eksprese ederler.

Bakır bağlama bölgesi ise tüm APP izoformlarında bulunmaktadır. Bu da bakır bağlama bölgesinin proteinin yapısı ve/veya işlevi için esansiyel olduğunu göstermektedir. APP Cu^{+2} 'i Cu^{+1} 'e indirgeyebilmekte ve bir antioksidan gibi davranarak nöroprotektif etki gösterebilmektedir. APP'nin sitozolik bölümünün sinyal ileti yollarında rolü olduğu,

içerdiği motiflerin sitozolik adaptör proteinlere bağlandığı ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdiği, kaspazları (özellikle kaspaz 6 ve 8) tanıdığı ve kestiği bir bölge içerdiği farklı çalışmalar ile bildirilmiştir [46-49].

APP'nin ekstrasellüler kısmının ortalarına denk gelen bölgede bulunan (403-407 pozisyonunda) aktif pentapeptid ile yapılan çalışmalarda bu kısmın etkisinin sadece fibroblast büyümesi üzerine sınırlı kalmadığı, hayvanlarda beyine infüzyon sonucu sinaptik yoğunluğu arttırdığı ve hafızayı güçlendirdiği gösterilmiştir.

APP gen bölgesinin 21. kromozom üzerinde olduğunun keşfedilmesi ile 21. kromozomun fazladan bir kopyasını taşıyan Down sendromlu bireylerde AH'nın çok erken yaşlarda gelişmesinin nedeni açıklık kazanmıştır. Bu direkt gen dozaj etkisidir ve APP'nin artmış ekspresyonu ve dolayısı ile artan A β düzeyleri hastalık oluşumunu hızlandırır [47, 49].

APP metabolizması ve nöronal toksisite ile ilişkisi:

APP, "amiloidojenik" ve "amiloidojenik olmayan" olarak isimlendirilen iki alternatif yoldan biri ile proteazlar (α , β ve γ sekretazlar) tarafından proteolitik yıkımla metabolize edilebilmektedir. AH histopatolojisindeki senil plakların yapı taşı, amiloidojenik yolak hipotezinin kalbi A β ; APP'nin β ve γ sekretazlar ile ardışık yıkımı sonucu meydana gelmektedir (Şekil 2).

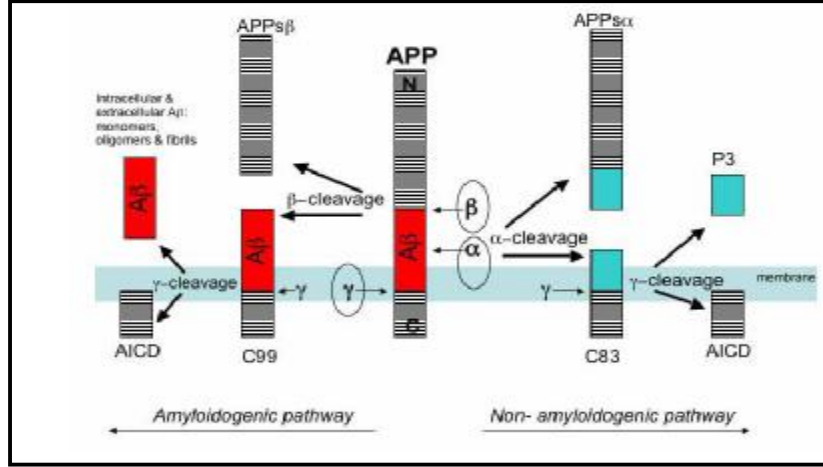
Amiloidojenik olmayan yolda, α -sekretaz APP'i tam A β dizisinin ortalarına denk gelen hücre dışı bölgede (Lys16 ve Lys17 arası) kesmekte ve tam bir A β parçasının oluşumunu engellemektedir. α -sekretaz etkisiyle APP'den ayrılan büyük çözünebilir N terminal kısım APPs- α olarak isimlendirilir. Hücreler arası boşluğa salınan. APPs- α 'nın hafıza ve öğrenmeyi düzenleyici, nöronları koruyucu etkisi, olduğu çalışmalar ile desteklenmektedir.

Membrana bağlı kalan 83 aminoasitlik α -C-terminal kısım (α -CTF, C-Terminal Fragment) ise γ -sekretazın etkisi ile yıkılarak 3 kDa'luk p3 fragmanı adı verilen bir parçanın hücre dışına salınmasına neden olur. Bu ektodomain çözünebilir yapıdadır ve amiloidojenik değildir. Kalan membrana bağlı p7 fragmanı APP intrasellüler domaini (AICD) adını almaktadır.

β ve γ sekretazlar etkilerini, sırasıyla A β bölgesinin hemen dışındaki N- ve C- uçlarında göstererek tam A β oluşumuna neden olarak amiloidojenik yolağı başlatmaktadırlar. β -sekretaz aktivitesi ile APP'nin ektodomaini (APPs- β) hücre yüzeyinden hücrelerarası

boşluğa salıverilmekte ve A β dizisini içeren 99 aminoasitlik β -C-terminal kısım (β -CTF) ise membrana tutunmuş şekilde kalmaktadır. Bu parça da γ -sekretaz tarafından kesilerek A β peptidi oluşmaktadır [47, 49-51].

γ -sekretaz'ın etkinlik gösterdiği kesim bölgesine göre, oluşan A β parçası, kısa (39-40 aminoasit) veya uzun (42-43 aminoasit) olabilir. Uzun A β , çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkındır ve nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. A β_{1-40} 40 aminoasit kalıntısından oluşan ve en sık (>%60-70) karşılaşılan fragmandır, suda ve sıvı ortamda nispeten çözünebilir yapıdadır. İkinci en sık (~%15) karşılaşılan form A β_{1-42} 42 aminoasit kalıntısından oluşur. Bunların yanı sıra A β_{1-28} , A β_{1-33} , A β_{1-34} , A β_{1-37} , A β_{1-38} , A β_{1-39} gibi daha az oranda bulunan formları da vardır [49, 52, 53].



Şekil 2: Amiloid prekürsör proteininin (APP) sekretazlar ile kesimi [51]

AP'ların moleküler kompozisyonu 1980'li yılların ortalarında Glenner ve arkadaşları tarafından plağın en büyük komponenti olan amiloid proteinin saflaştırılması ve protein diziliminin belirlenmesi sonucunda tanımlanmıştır. Şekil 3A'da 42 aminoasit uzunluğundaki A β peptidin aminoasit dizilimi görülmektedir. Amfipatik özelliğe sahip A β peptidin C-terminaldeki 12-14 aminoasitlik kısmı oldukça hidrofobik olup N-terminal kısım hidrofildir. [46].

AP baskın olarak A β peptid içermekle birlikte ApoE, tau protein gibi diğer bazı proteinleri de içerebilmektedir [54]. ApoE'nin amiloid birikimi üzerine etkilerini araştıran bazı çalışmalarda ApoE4'ün A β_{1-42} birikiminden çok A β_{1-40} birikimine yol açtığı saptanmıştır. ApoE4'ün A β_{1-40} 'ın fibrilizasyon eşliğini düşürerek etki gösterdiği düşünülmektedir [43, 55].

A β birikimi başlangıçta selim olup NFY'lerin aksine limbik sistemde değil, neokortekste ve gevşek (diffuse) plaklar şeklindedir, zaman içinde patojenik senil (nöritik) plaklara dönüşür. Bu dönüşümde pek çok etken yer almaktadır. Bunlardan en önemlisi tau proteindir. Tau proteini varlığında A β birikintilerinin kademeli olarak patojenik nöritik plaklara dönüştükleri gösterilmiştir [56]. Bu dönüşümü başlatan bir diğer olası neden serbest radikal ve reaktif oksijen türleridir. Bu olası oksidatif stres açıklaması, vitamin E, selegilin, melatonin ve ginkgo biloba gibi antioksidanların AH'a yararlı etkileri olabileceğini öne süren hipotezlere bir dayanak oluşturmaktadır.

A β beyinde hücre içi veya hücre dışı yerleşimli olarak çözünür, çözünmez formlarda, monomerden yüksek molekül ağırlıklı oligomerlere, fibrillere ve hatta plağa kadar değişen şekillerde bulunabilir (Tablo 3 ve Şekil 3B).

Tablo 3: A β fibrilizasyon yolağındaki ara ürünler [46]

A β TÜRLERİ	ÖZELLİKLERİ
Monomerler	Çözünür, amfipatik molekül, α -helikal, random coil veya β -tabaka yapısı gösterir
Dimerler	İn vitro, in vivo ve insan beyin ekstraktlarında gözlenen hidrofobik çekirdeğe sahip hücre içi yerleşimli yapılardır
Trimerler	İn vivo fare modellerinde gözlenmiş olup toksik oligomerlerin alt birimleridirler
Küçük (globüler) oligomerler	3-50 monomerden oluşan in vivo AH hastalarında, fare modellerinde ve in vitro gözlenen çoğunlukla stabil olmayan, geçici, fakat toksik yapılardır
Anüler (halkasal) oligomerler	Hücre kültürü ve in vitro deneylerde patojenik, membran yapısını bozan, düzensiz iyon kanalları veya küçük delikler (por) olarak potansiyel role sahip yapılar olarak tanımlanırlar
ADDLs ''A β -Derived Diffusible Ligands''	İn vitro olduğu gibi sıçan ve insan beyin ekstraktlarında da gözlenebilen fibriller olmayan, nörotoksik 17-42 kDa'luk trimerden 24mere kadar değişen büyüklükte yapılardır
Protofibriller	Kısa, esnek, çubuk benzeri yapı gösteren in vitro saptanan toksik, olgun fibrillerin prekürsörü olan Congo red ve thioflavin T ile bağlanabilen yapılardır. Boyutları en fazla 8x200 nm'dir.
Fibriller	İn vivo AH hastalarda ve fare modellerinde ve in vitro gözlenen Congo red ve thioflavin T ile bağlanabilen stabil,yapısal olarak organize, tekrarlayan A β birimlerinden oluşan çözünmez ve pek çok protofibrilin birbiri etrafında sarılıp bükülmesi ile oluşan yapılardır
Plaklar	İn vivo AH hastalarında ve fare modellerinde gözlenen geniş hücre dışı A β birikimleri olup distrofik dendritler, aksonlar, aktive mikroglialar ve reaktif astrositler ile çevrilidirler.

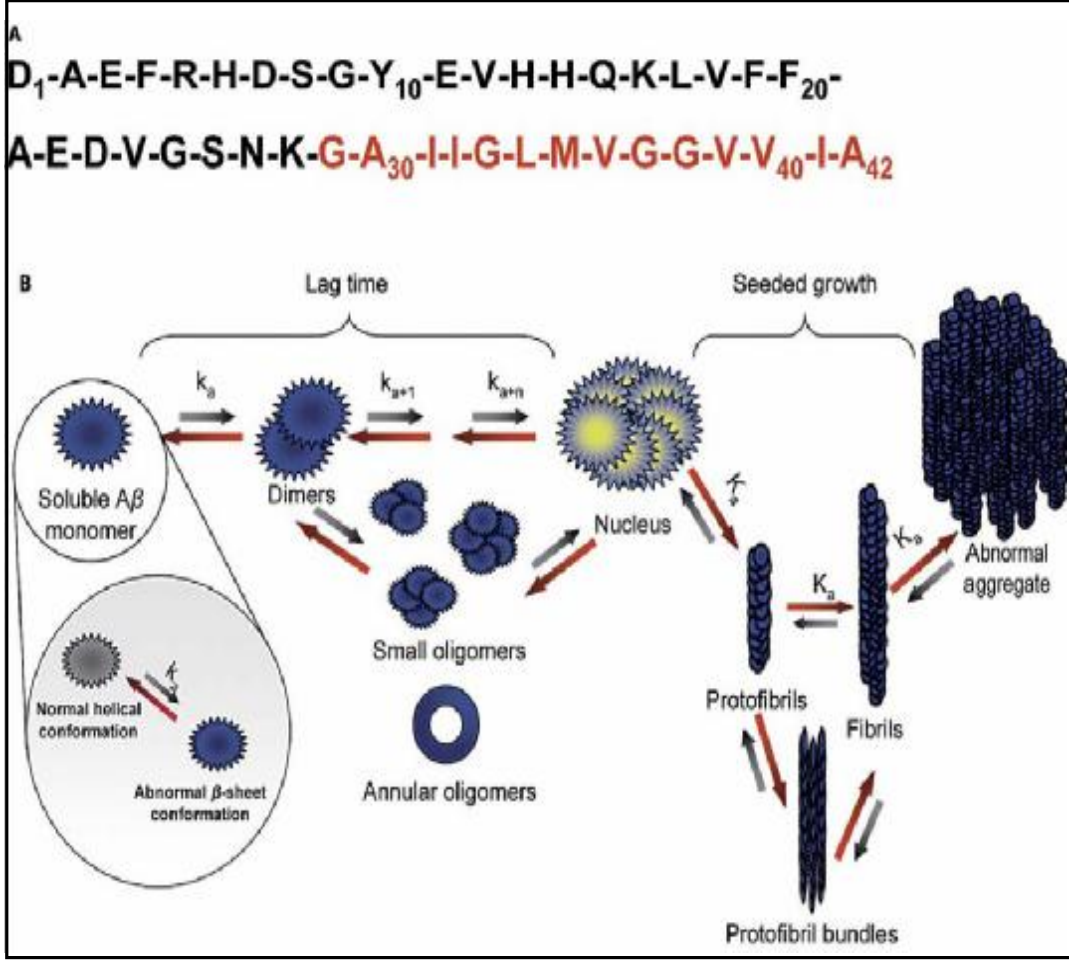
Çözünür formdaki A β monomerleri ağırlıklı olarak random coil ve α -helikal katlanmış peptid olarak bulunurken, çözünmez A β ise β tabaka yapısı gösterir ve katı (compact) plak oluşumuna katılır.

A β ve nörotoksisite üzerine yapılan çalışmalarda başlangıçta dikkatler A β fibrillerine odaklanmış olsa da son 10 yıldır yapılan çalışmalar ile düzensiz (lower-order) A β demetlerinin nörotoksik olduğu gösterilmiştir. AH olan hastaların beyinlerinde çözünür A β oligomer miktarı ile hastalığın semptomları arasında çözünmez plaklar ile kıyaslandığında çok daha iyi bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda AH olan insanların beyin dokularında çözünür A β oligomer konsantrasyonları yüksek bulunmuş ve bu çözünür oligomerlerin oluşumunun AH semptomlarının ortaya çıkışından daha önce meydana geldiği vurgulanmıştır.

Plakların hücre dışı yerleşimi, toksisitenin A β 'nin nöronlara hücre dışından saldırısı sonucu ortaya çıktığı varsayımını ortaya koymuştur. Ancak hücre kültürlerinde ve rat beyin dokularında A β 'nin hücre içi varlığının gösterilmesi ve hücre içi fibriller olmayan A β oligomerlerinin insan nöronlarında sitotoksisiteye neden olduğunun gösterilmesi ile hücre dışı A β türlerine ait varsayımın önüne geçilmiştir.

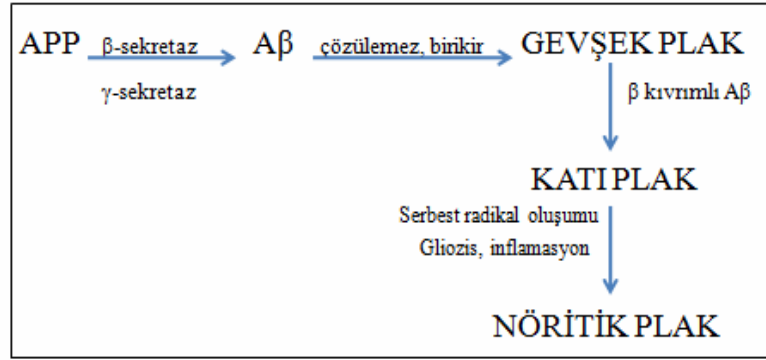
Küçük A β oligomerlerinin çözünmez A β fibrillerinden daha yüksek sitotoksisite göstermesi nedeniyle küçük A β oligomerleri ilgi odağı haline gelmiş ve bunlarla ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır. İn vitro A β_{1-42} oligomerizasyonunu başlatan olay "paranuclei" olarak isimlendirilen çoğu yapısal olmayan pentamerlerin/hekzamerlerin çekirdek yapısı oluşturmasıdır.

Çözünür A β monomerlerinin β tabaka yapısına dönüşümü ile başlayan agregasyon yolağında çekirdek yapısı oluşumuna kadar geçen süreç duraklama zamanı "lag time" olarak bilinir ve bundan sonra protofibril, fibril ve plak oluşumuna kadar geçen süreç hızlı büyüme "seeded growth" dönemidir [46].



Şekil 3: A. İnsan Aβ₁₋₄₂ peptidinin amino asit dizilimi. Aβ'nın hidrofobik transmembran kısmı kırmızı renk ile gösterilmiştir. D = Aspartat; A = alanin; E = glutamat; F = fenilalanin; R = arjinin; H = histidin; S = serin; G = glisin; Y = tirozin; V = valin; Q = glutamin; K = lizin; L = lösin; N = asparajin; I = izolösin; M = metionin. **B.** Aβ fibrilizasyonunun şematik görüntüsü [46].

Nöritik olmayan katı plaklar demanssız beyinlerde de görülebilir ancak bunlar da lokal nörotoksisite ile hücre ölümü ve nöritik dejenerasyona neden olmaktadır. Bu aşamadan sonra dejenere nöritler içeren katı plaklar nöritik plaklar adını alır. Sonuç olarak nöritik (senil) plaklar nörofiller içinde bulunan Aβ peptidten oluşmuş amiloid çekirdek ve anormal nöritler ile glial hücrelerden oluşan kompleks yapılardır (Şekil4). Bu plaklar elektron mikroskopuyla görülebilirler ve distrofik nöritlerin varlığı nöritik plakların karakteristik özelliğini oluşturur [30].



Şekil 4: APP proteolizinden nöritik plak oluşumuna kadar geçen süreç [30]

Aβ peptit ve Nöronal Hücre Ölümü:

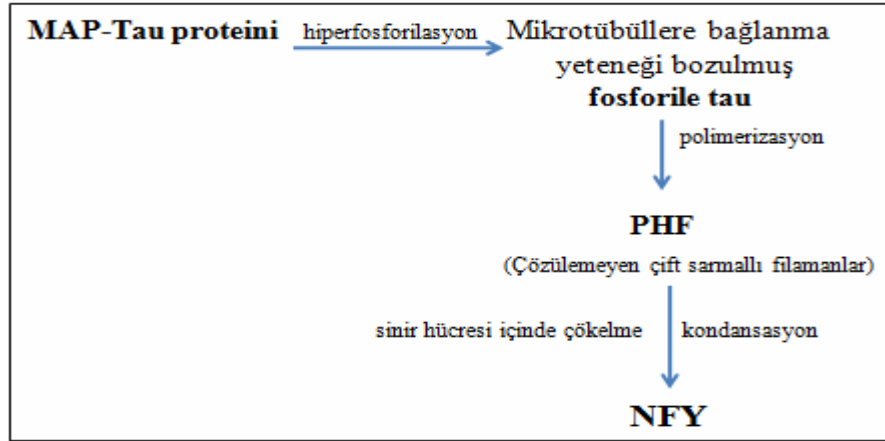
AH'daki nöron ölümünün apoptozis yolu ile gerçekleştiği [8] ve bunun da Aβ tarafından oluşturulduğu bilinmektedir [9, 10]. AH ile ilişkilendirilen bir diğer önemli patolojik mekanizmada oksidatif hasardır. Aβ'nin kültüre edilmiş insan hipokampal ve kortikal nöronlarında oksidatif hasar yaratarak, sinyal yollarının işleyişinde modifikasyonlara, biyokimyasal ve yapısal anormalliklere neden olarak apoptotik hücre ölümünü gerçekleştirdiği gösterilmiştir [11, 12]. Apoptotik hücre ölümünden eksternal ve internal stimuluslarla aktive olan kaspazlar olarak adlandırılan proteaz ailesi büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır. Kaspaz aktivasyonu ile birlikte gözlenen nöronal apoptozun AH'nın patogenezini modifiye ettiği ve nöronal ölümü hızlandırdığı ileri sürülmektedir. Ayrıca Aβ peptidin oluşturduğu nöronal hücre ölümlerinde kaspaz 1, 2, 3, 6, 8, 9, 12'nin rolü olabileceği bildirilmektedir [57, 58].

Özet olarak Aβ'nin nörotoksik etkilerini oksidatif hasarı tetikleyerek, hücre içi kalsiyumunu arttırarak, membran yapısını bozarak nöronal apoptoz ve inflamasyon süreçlerini aktive ederek gösterdiği ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalar anüler (por benzeri oligomer) Aβ türlerinin kanallar oluşturarak veya hücre yüzey reseptörlerini aktive ederek hücre içine Ca^{+2} girişini arttırdığını göstermişlerdir [46]. Aβ'nin nöral lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA oksidasyonu ile ilişkili olarak reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi ile birlikte nöronal apoptozisi tetiklediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [59-63].

2.1.1.2 Nörofibriler Yumak (NFY) Oluşumu:

Hücre iskeleti bütünlüğünü ve aksonal iletiyi bozarak hücre ölümüne neden olan nörofibriler yumaklar AH'daki bir diğer nöropatolojik değişikliktir. Hücre içi bu NFY'lerin önemli bir bileşeni hiperfosforile tau proteindir. İlk kez 1986'da tanımlanmış olan tau proteini 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül birleştirici (asosiye) proteinler (MAP) ailesindedir [30]. Tau proteini mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeleti bütünlüğü ve aksonal iletide önemli rol oynar. AH patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau çözülemeyen çift sarmallı filamanlara (PHF, Paired Helical Filaments) polimerize olur. Bunlar zamanla sinir hücresi içinde çökelerek NFY'leri oluştururlar (Şekil 5). Oluşan NFY'ler hücre iskelet bütünlüğünü ve aksonal iletiyi bozarak hücre ölümüne neden olurlar [11, 26]. Daha önce vurgulandığı gibi tau proteini patojenik nöritik plakların oluşumuna da katılan önemli bir etkidir. [56].

Yanlış katlanmış, yapısal bütünlüğü bozulmuş toksik birikimler oluşturan hasarlı proteinler normalde proteozom sistemi tarafından etkili bir şekilde yıkılmaktadırlar. PHF-tau, proteozom aktivitesinin azalmasına ve protein birikimlerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Tüm bu özellikleri nedeniyle hiperfosforile tau proteini AH'nın patojenik sürecinde etkinlik gösteren önemli bir nörotoksik ajan olarak kabul edilmektedir.



Şekil 5: Mikrotübül asosiye tau proteininin NFY'a dönüşümü [30]

NFY'ler genellikle kortekste olmakla birlikte diğer beyin bölgelerinde de görülebilir. Kortekste NFY'lerin en yoğun olduğu bölgeler hipokampus ve entorinal korteks gibi paralimbik ve limbik bölgelerdir. Demansın şiddeti ve NFY yoğunluğu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu düşünülmektedir.

Yine de AH patogenezinde yer alan NFY ve AP'ların kesin AH tanısı için patolojik olarak saptanması gerekli, ancak yeterli değildir. Çünkü bu iki bulgu sağlıklı yaşlılarda ve farklı nörodejeneratif hastalıklarda da izlenebilmektedir. AH'nın kesin tanısı için gereken, her iki bulgunun varlığından çok bunların belli nöroanatomik lokalizasyonlarda ve belli miktarlarda bulunmalarıdır (Tablo 4). 60 yaşından sonra hemen herkeste neokortikal AP'lar ve limbik NFY'ler gelişmeye başlar. Ancak son araştırmalar NFY'lerin neokorteks, AP'ların limbik sistemde görünür olmalarının AH için %100'e yaklaşan duyarlılık ve özgüllük ortaya koyduğunu göstermiştir [30].

Tablo 4: AH'daki patolojik değişiklikler [34]

<u>Hücre kaybı, amiloid plaklar ve NFY'lerin daima bulunduğu yerler;</u>	<u>Bazen bulunduğu yerler;</u>
Neokorteks, özellikle asosiasyon alanları	Talamusun medyal çekirdeği
Hipokampus, entorhinal korteks dahil	Dorsal tegmentum
Amigdala	Lokus seruleus
Meynert'in bazal çekirdeği	Paramedian retiküler alan
	Lateral hipotalamik çekirdek

2.1.1.3. Gliyozis ve inflamasyon:

A β birikimi, mikroglial ve astroglial aktivasyona yol açarak sitokinlerin salgılanmasını, akut faz yanıtı ve komplemanın aktive edilmesiyle inflamasyonu harekete geçirir. Ortaya çıkan inflamatuvar proteinlerin senil plak yapısına katıldığı bu şekilde gevşek plağın katı, nöritik plağa dönüştüğü yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Hem plak hem de inflamatuvar yanıt, nöron ve nörofil hasarına yol açmakta, nöron metabolik ve iyonik homeostazi bozulmakta, oksidatif hasar meydana gelmektedir.

NSAİ ajanların kompleman aktivasyonunu önleyerek muhtemelen nöritik plakların oluşumunda ki inflamatuvar süreci etkileyerek AH riskini ve kognitif yıkım hızını azalttığını gösteren çalışmalar bu bilgileri destekler niteliktedir [30].

2.1.1.4. Oksidatif hasar:

AH ile ilişkilendirilen bir diğer önemli patolojik mekanizma oksidatif hasar olup hasarın şekli ile ilgili halen cevaplanmamış konular mevcuttur. Son zamanlardaki kanıtlar hasarın iki yönlü, ya amiloidogenezin sonucu ya da A β birikimi nedeniyle, olduğu yönündedir.

AH'da süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı üretildiği ve bunların hücrel hasara yol açarak apoptoz sinyaline aracılık ettiği bildirilmektedir. Sağlıklı kontrol grubu ile AH olanların beyin dokusu örneklerinin kıyaslandığı bir araştırmada da AH'nda protein oksidasyon ürünlerinin artmış olduğu gözlenmiştir. Beyin korteks hücrelerinin nükleer ve mitokondriyal DNA'sını etkileyen oksidatif hasarın ve artmış lipid peroksidasyonunun, AH gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir [64].

Serbest radikaller ya direkt olarak aminoasitlerin yan zincirlerini okside ederek, ya da lipid peroksidasyonu, glikasyon ürünleri gibi oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile proteinlerde hasara neden olabilmektedirler. Oksidatif olarak değişikliğe uğrayan ve fonksiyonunu kaybetmiş çapraz bağlar oluşturan proteinler ya proteozomal yıkıma yönlendirilirler ya da nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimlerini oluşturarak hücrel hasarlara neden olurlar [65, 66].

Bazı çalışmalarda ise A β 'nin serbest radikal oluşumuna neden olarak, nöronal kültürleri oksidatif toksisiteye karşı hassas kıldığı ve nöronlar arası kalsiyum düzeyi artışına neden olarak plazma membranında hasar oluşmasına aracılık ettiği böylece nöronal değişikliklere ve beyin dokusunda hasar gelişimine neden olduğu bildirilmiştir[67]. A β 'nın kültüre edilmiş insan hipokampal ve kortikal nöronlarında yapılan bir çalışmada oksidatif hasar yaratarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [11, 12].

Serbest oksijen radikallerinin amiloid çökmesini artırıcı etki gösterdiği ve E vitamini gibi bazı serbest radikal yakalayıcılarının bu etkiyi engelleyerek koruyucu rol oynadığı farklı çalışmalarda bildirilmiştir [68].

2.1.1.5. Nöron ve sinaps kaybı:

AH'daki nöron kaybının anatomik dağılımı NFY'ların anatomik dağılımı yatkinlığına benzesede hücre ölümünden tek başına NFY'lar sorumlu tutulamaz. NFY ile nöron sayısı arasında anlamlı negatif korelasyonu vurgulayan pek çok çalışma olmasına rağmen NFY'ların olmadığı bölgelerde ağır nöron kaybı da görülebilmektedir. Dolayısıyla hücre ölümünde rolü olan farklı nedenlerden, amiloid nörotoksinite ve transsinaptik dejenerasyon gibi diğer etmenler ön plana çıkmaktadır. Ayrıca hücre ölümünün bir başka mekanizması olarak da apoptoz ve programlanmış hücre ölümü üzerinde durulmaktadır.

2.1.1.6. Kolinerjik inervasyon ve diğer nörotransmitter kayıpları:

Serebral korteksin kolinerjik inervasyonu, limbik sistemin en önemli bileşeni olan Meynert'in bazal çekirdeğinden sağlanır [68]. Bu çekirdek tau proteininin aşırı fosforile olduğu ilk alanlardan biri olup, yaşlanma sırasında yaygın NFY oluşumunun ve nöron kaybının görüldüğü önemli bir alandır. Kolinerjik aksonların kaybı da belirtilen diğer patolojik özellikler gibi Meynert'in bazal çekirdeğine bölgesel yatkinlik göstermektedir.

Kolinerjik inervasyon bellek ve dikkatin nöral kontrolünde önemli bir rol oynar. Sinaptik aralıktan difüzyonla ilerleyen asetilkolin (Ach) postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak ise G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir. Nikotinik etkiler hücrenin uyarılabilirliğini

arttırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynar, muskarinik etkiler kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin toplanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarına yol açar. Nikotinik ve muskarinik stimülasyon kaybı A β oluşumunu arttırırken, diğer yandan A β 'nın kendisi de Ach sentez, salınım, postsinaptik etkinliğini azaltarak kısır bir döngü ortaya çıkarır. [30].

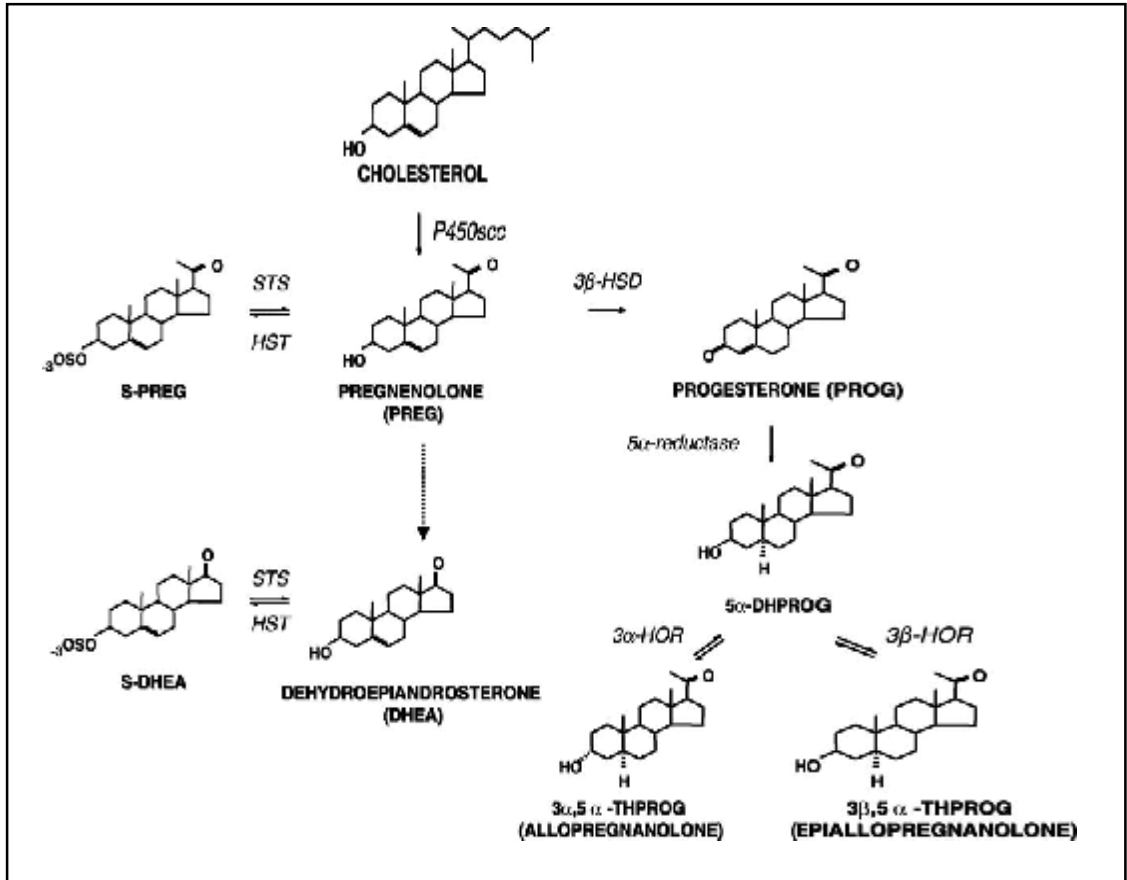
Aynı zamanda AP ve NFY'ların varlığı diğer nörotransmitter sistemlerini de büyük ölçüde zayıflatır. AH'da kortikal serotonerjik akson terminallerinde serotonin salınımı ve geri alınımı bozulur. Bu da hastalıkta gözlenen depresyon ve saldırgan davranışlar ile ilişkilendirilebilir. Noradrenerjik, dopaminerjik kayıplar ile somatostatin üreten hücrelerde, substans P ve/veya nöropeptid Y salıveren nöronlarda değişik oranlarda azalmalar olabilir ve bu değişiklikler hastalıkta gözlenen davranış bozuklukları ile ilişkili bulunmuştur [3].

2.2. NÖROSTEROİDLER

2.2.1. Tanım

Gonadlar, adrenal korteks gibi endokrin organlardan salgılanan steroid hormonlar lipofilik yapıları nedeniyle kan-beyin-bariyerini kolaylıkla geçip SSS'ne ulaşabilirler. Ancak, bir grup steroid hormon beyinde ya da sinir sisteminde kolesterolden “*de novo*” sentezlenir, periferik kaynaklara ihtiyaç duymaz ve nöral aktiviteyi değiştirebilir. Bu nedenle bu nöroaktif steroidler alışılmışın dışında orjinleri ve farklı fonksiyonları nedeniyle “nörosteroidler” olarak isimlendirilirler [13, 14].

Şekil 6’da nöronal dokuda üretilen nörosteroidlerden (NS) bazıları (Pregnenolon (P), Pregnenolon sülfat (PS), Progesteron (PROG), Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), Allopregnanolon ($3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesteron), Epiallopregnanolon ($3\beta,5\alpha$ -THP) gibi görülmektedir [69]. Pregnenolone (P) ve pregnenolon sülfat (PS) bu nörosteroidlerin en belli başlılarından [70].

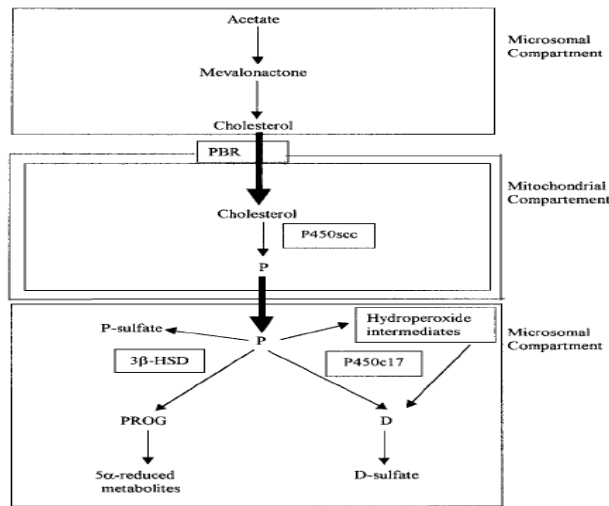


Şekil 6: Sinir sisteminde üretilen nörosteroidler [69]

2.2.2. Nörosteroidlerin Biyosentezi

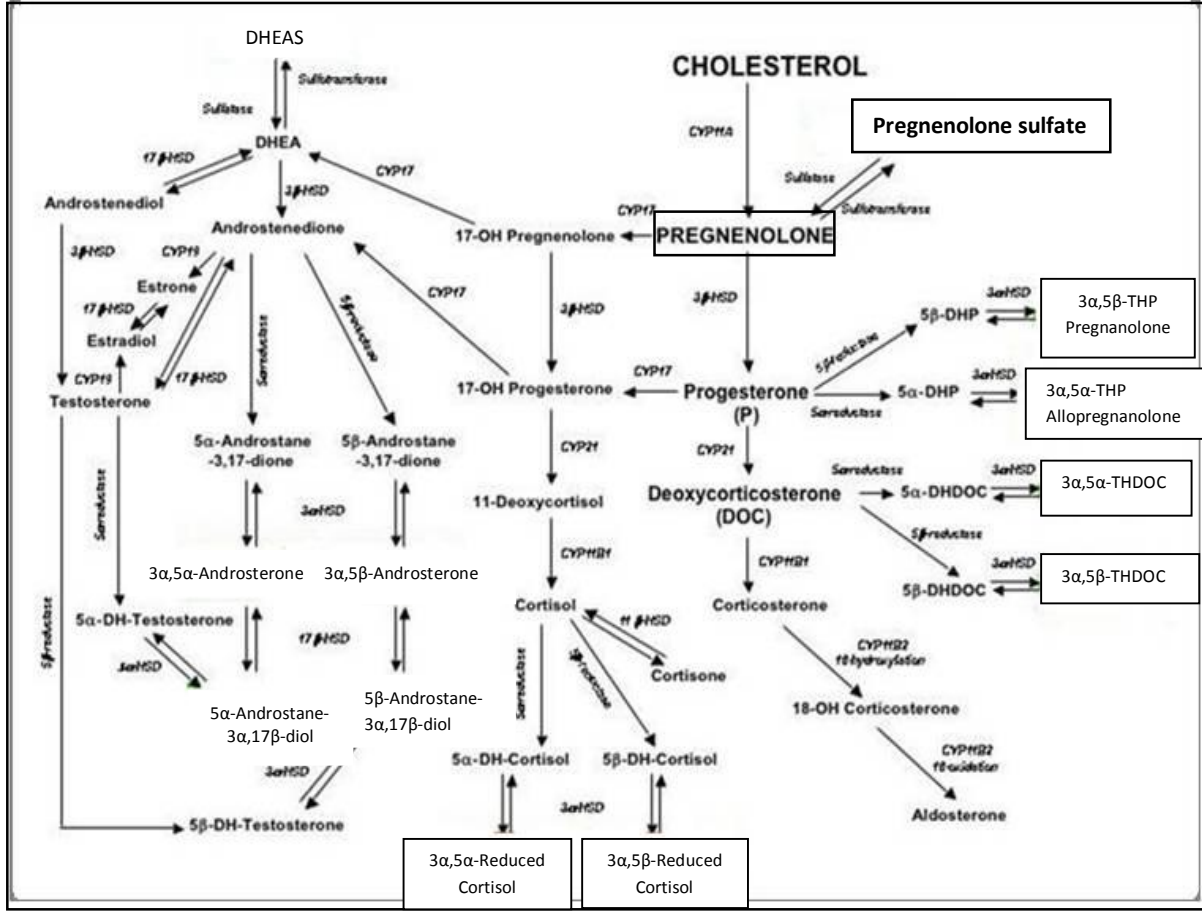
Sıçanlarda adrenalectomi ve gonadektomi yapıldıktan [14, 71] ve maymunlarda da adrenal baskılanma sağlandıktan sonra [72] sinir sisteminde steroid hormon varlığının devam etmesi sinir sisteminde steroid sentezini destekleyen pek çok kanıttan biridir. Steroid sentezi kolesterolün pregnenolona dönüşüm basamağı ile mitokondride başlar. Bu basamak sitokrom P450 kolesterol side-chain cleavage (P450_{sc}) enzimi tarafından katalizlenir ve tüm steroid hormonlarda olduğu gibi nörosteroidlerin sentezinde de hız kısıtlayıcı basamaktır.

Kolesterolden P'e dönüşümü sağlayan P450_{sc} enzimi beyinde beyaz cevherde [73, 74] ve özellikle oligodendrositlerde [75, 76] bulunur. Mitokondri dış zarındaki periferal benzodiazepin reseptörü (PBR) mikrozomal kompartmanda bulunan kolesterolün iç zara bağlı P450_{sc} enzim kompleksi ile etkileşime girmesine yardım eder ve mitokondrial kompartmanda kolesterol P'e steroid biyosentez yolağının ilk hız kısıtlayıcı basamağı olan CYP11A (P450_{sc}) tarafından dönüştürülür (Şekil 7). Sentezlenen P mikrozomal kompartmana geçtikten sonra endoplazmik retikulumun 3 β -hidroksisteroid dehidrogenazı (3 β -HSD) ile progesterona okside olur, CYP17 (P450_{c17}) enzimi ile de P'den DHEA oluşur [77]. P ve DHEA'nın PS ve DHEAS'a dönüşümü sitozolik enzimler ailesinden hidroksisteroid sülfotransferaz (HST; EC 2.8.2.2) enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim 3'-fosfoadenozin 5' fosfosülfat (PAPS)'ın sülfonat kısmını steroidlerin 3-hidroksi bölümüne transfer eder [78, 79]. Pregnenolonun sentezinden sonraki bu basamakların oligodendroglial hücrelerin dışında astrosit ve nöronlarda gerçekleştiği ileri sürülmektedir [15].



Şekil 7: Steroid sentezinin mikrozomal ve mitokondrial kompartmandaki bölümleri [15]

Steroid hormonların biyosentez basamakları ve bu basamaklarda yer alan enzimler şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8: Steroidlerin biyosentez yolağı [80]

CYP11A=P450_{sc}=sitokrom P450 kolesterol yan zincir kırıcı enzim (Kolesterolün pregnenolona dönüştürüldüğü ilk hız kısıtlayıcı basamak); Sülfotransferaz (HST=EC 2.8.2.2 =SULT2B1a=Pregnenolon sülfotransferaz)(P’den PS’e oluşumunu katalizleyen enzim); 3β-HSD=3β-hidroksisteroid dehidrogenaz; 3α-HSD=3α-hidroksisteroid dehidrogenaz; 17β-HSD=17β-hidroksisteroid dehidrogenaz ; CYP17 =P450_{c17};

DHEA: Dihidroepiandrosteron; DHEA-S: Dihidroepiandrosteron sülfat;DHP: Dihidroprogesteron; THP: Tetrahidroprogesteron; 3α,5β-THP: Pregnanolon; 3α,5α-THP: Allopregnanolon; DHDOC: Dihidrideoksikortikosteron;

THDOC:tetrahidrideoksikortikosteron; 3α,5α-THDOC: 3α,5α tetrahidrideoksikortikosteron

Sentezdeki biyokimyasal yolların çoğu açığa çıkarılmış olmasına rağmen, NS yapan hücrelerin aktivitesini kontrol eden düzenek halen tam olarak bilinmemektedir. GABA'nın kendisi ve reseptör kompleksinin, NS sentezinde görevli enzim aktivitelerini baskıladığı gösterilmiştir. Nöroaktif steroidlerin de GABA_A reseptör etkinliğini değiştirerek kendi sentezlerini düzenleyebildikleri bildirilmektedir [81].

2.2.3. Nörosteroidlerin Metabolizması

NS'lerin metabolizması yıllardır yaygın olarak incelenmiş olup çoğu çalışma şu an için daha iyi bilinen faz 1 metabolizma yolağına odaklanmış durumdadır [82, 83]. Bu yolak pregnenolondan DHEA, PROG, pregnanolon, allopregnanolon, testosteron ve östrojen gibi çeşitli steroidlerin sentezi basamaklarını içermektedir. Diğer taraftan NS'lerin faz 2 metabolizması ise daha az çalışılan yeterince aydınlatılmamış bir yolaktır. Faz 2 olarak adlandırılan metabolizma süreci ise steroidlerin sırasıyla sülfotransferaz (SULT) ve glukuronoziltransferaz (UGT) ile katalizlenen sülfatlanması ve glukuronidasyonu, yani temel konjugasyon reaksiyonlarıdır. Bu enzimlerin izoenzimleri insan, maymun ve rat beyinde gösterilmiştir [84].

Sitozolik sülfotransferazlar hormonlar ve nörotransmitterler gibi küçük endojen bileşiklerin ve aynı zamanda ilaçlar ve ksenobiotiklerin sülfatlanmasından sorumlu enzimlerin bir üst ailesini oluşturmaktadır. Sülfotransferazların SULT2 ailesi tarafından gerçekleştirilen nötral steroidlerin sülfatlanması steroid sentez, taşınma ve metabolizmasında rol oynamaktadır. SULT2 ailesi iki alt familyadan oluşmaktadır. Bunlar, prototipik steroid sülfotransferaz olan SULT2A1 ve SULT2B1'dir. SULT2B1 geni SULT2B1a ve SULT2B1b olmak üzere iki izoform kodlamaktadır. SULT2B1a büyük oranda P'i sülfatlarken, SULT2B1b kolesterolü tercih etmektedir.

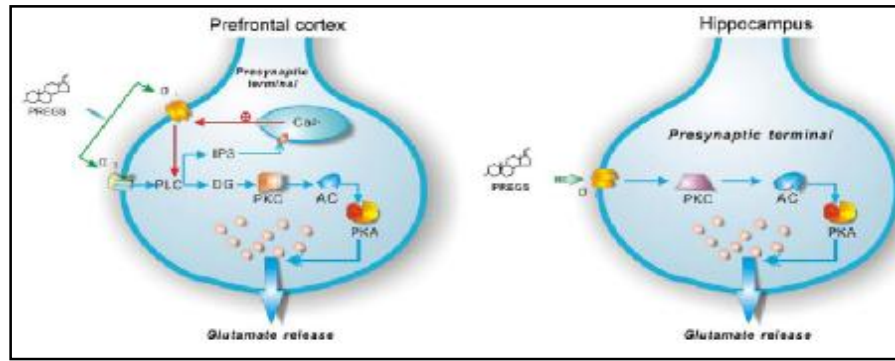
NS'ler kısmen sülfat, glukuronid ve yağ asidi esterleri şeklinde bulunur. Ester formları sıkça serbest steroidlerin konsantrasyonuna eşit veya daha fazladır. Serbest 3 β hidroksi steroidler (P, DHEA) ve bunların sülfat esterleri belirgin biyolojik aktivite gösterirken sinir dokusunda diğer ester formlarının aktivitesiyle ilgili çok az şey bilinmektedir [77]. Kemirgen beyinde glukuronidlerin varlığının gösterilmesi glukuronidasyonun NS metabolizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmekte ve sinir sisteminde bu konjugasyon şeklinin incelenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır [84].

2.2.4. Nörosteroidlerin Etki Mekanizmaları - Nöroaktif steroidler

Nörosteroidler sinir sisteminde aktif nörotransmitter rolü oynamaları nedeni ile “nöroaktif steroidler” olarak adlandırılabilirler. Nöroaktif steroidler (NAS), sentez edildikleri yerden bağımsız olarak, nöral aktiviteyi değiştirebilen hormonlar olup [85] SSS içerisinde klasik/genomik ya da hızlı/genomik olmayan yollar üzerinden etki gösterirler [86].

Nörosteroidler genomik etkilerini klasik steroid hormonlar gibi hücre içi steroid reseptörlerine bağlanarak spesifik genlerin ekspresyonunun artması şeklinde gösterirler. Bu etkiler transkripsiyon ve bunu takiben protein sentezi için translasyonu içeren bir süreçte gerçekleştiğinden saatler hatta günler içinde ortaya çıkar. Genomik olmayan sinyal iletimi ise NS’lerin gama amino bütirik asit (GABA_A), N-metil D-aspartat (NMDA), sigma 1 gibi çeşitli postsinaptik reseptörleri ve bir çok ligand-kapılı ve voltaj bağımlı iyon kanallarını modüle etmeleri ile saniye veya milisaniye içinde gerçekleşir [83, 87].

NS’lerin reseptörler üzerine etkilerine ek olarak çoğu NAS’ın glutamat, GABA, asetilkolin, norepinefrin, dopamin ve serotonin (5-HT) gibi çeşitli nörotransmitterlerin salınımı üzerine düzenleyici etkileri de vardır. Bu etkilerin çoğu beyin öğrenme, hafıza, duygu durum ve bilişsel yeti ile ilgili alanlarında ortaya çıkar. Şekil 9’da bir örneğini gördüğümüz gibi PS prefrontal korteks ve hippocampusta glutamat salınımına yol açmakta ve bu yolla çeşitli etkiler göstermektedir [88].



Şekil 9:PS'nin prefrontal korteks ve hippocampusta glutamat salınımına etkisi [88]

Pek çok farklı çalışmadan elde edilen sonuçlar ile bazı reseptörler ile nöroaktif steroidlerin yaptığı etkiler ve etki ettikleri konsantrasyon aralıkları Tablo 5’te özetlenmiştir.

Tablo 5: Nöroaktif steroidler tarafından modüle edilen nörotransmitter reseptörleri [87]

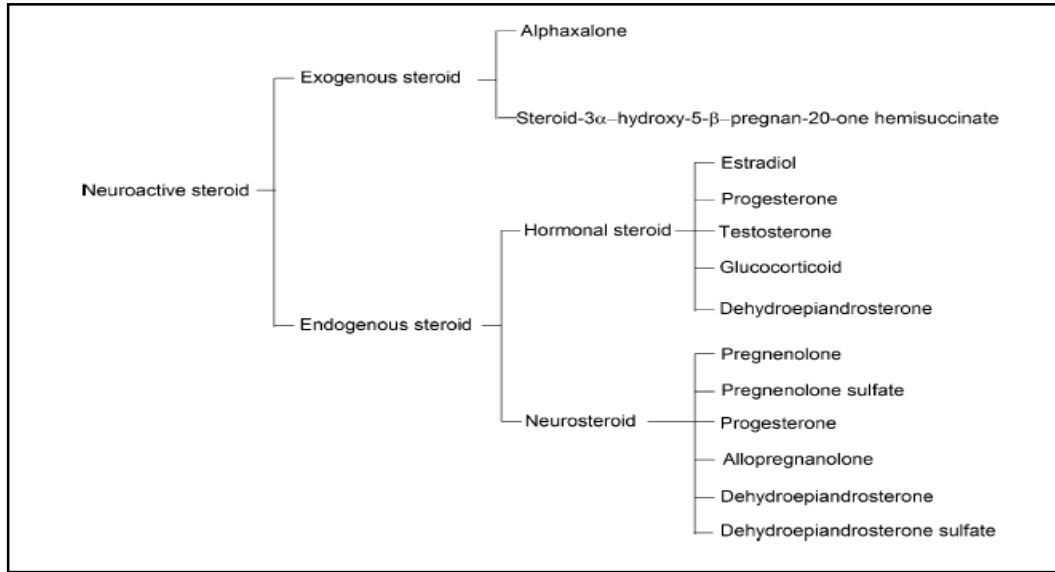
<u>Reseptör</u>	<u>Steroid</u>	<u>Etki</u>	<u>Etki konsantrasyon aralığı</u>
GABA_A	3 α ,5 α THP	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	3 α ,5 β THP	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	3 α ,5 α THDOC	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	PS	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
	DHEAS	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
Nikotinik	PROG	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M
Asetilkolin			10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴ M
	3 α ,5 α THP	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴ M
Glisin	PROG	Negatif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
	PS	Negatif	10 ⁻⁴ M
5-HT3	Östradiol (E2)(α , β)	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M
	PROG	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M
	Testosteron	Negatif	10 ⁻⁴ M
	3 α ,5 α THP	Negatif	10 ⁻⁵ M
	PS	Yok	10 ⁻⁵ M
NMDA	E2	Negatif	5x10 ⁻⁵ M
	PREG-S	Negatif	10 ⁻⁶ -10 ⁻³ M
	PREG-Hemisüksinat	Negatif	10 ⁻⁴ M
	PS	Pozitif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
AMPA	PS	Negatif	10 ⁻⁴ M
Kainat	PS	Negatif	10 ⁻⁴ M
	E2	Pozitif	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	PROG	Pozitif	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
Oksitosin	PROG	Negatif	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁶ M
Sigma Tip 1	DHEAS	Pozitif	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵ M
	PS	Negatif	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵ M
	PROG	Antagonist	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶ M

THP:Tetrahydroprogesteron; 3 α ,5 α -THP:Allopregnanolon; 3 α ,5 β -THP:Pregnanolon; 3 α ,5 α -THDOC:3 α ,5 α tetrahidrodeoksikortikosteron; PS:Pregnenolon sülfat; DHEAS:Dihidroepiandrosteron sülfat; PROG:Progesteron; PREG-S:Pregnenolon süksinat; PREG-Hemisüksinat:Pregnenolon hemisüksinat;

2.2.5. Nöroaktif Steroidlerin Sinir Sistemindeki Fizyopatolojik Süreçlerdeki Rolü

Nörotransmitterlerin ve modülatörlerin metabolizmasının aydınlatılması beyin fonksiyonlarını anlamamızdaki anahtar noktadır. NS'ler nöromodülatörlerin önemli bir sınıfı olup pek çok beyin fonksiyonunu düzenleyen nöron-nöron haberleşmesini aktive veya inaktive edebilirler [84].

Şekil 10'da basitçe sınıflandırılan NAS'lerin ister sinir dokusunda de novo sentezlensin ister periferal endokrin bezlerden kaynaklansın yada sentetik yapıda olsun beyin fonksiyonları ve hastalıkları üzerine önemli modülatör etkileri vardır.

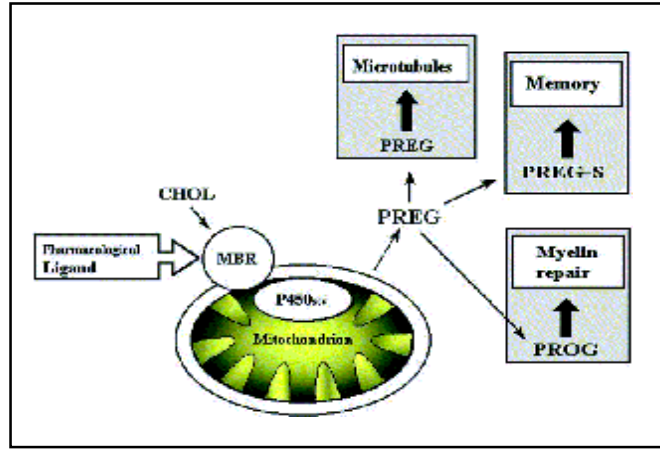


Şekil 10: Nöroaktif steroidlerin sınıflandırılması [88]

Endokrin organlarda yapılabildiği kadar kolayca kan beyin bariyerini geçen steroid hormonların beyin büyümesinde, gelişmesinde ve olgunlaşmasında önemli görevler üstlendiği yıllardır bilinmektedir [83]. Progesteron, östradiol ve testosteron gibi bu hormonların 5HT-3 reseptörlerinde, ligand kapılı iyon kanallarında ya da farklı glutamat reseptörlerinde işlevsel antagonist olarak davranan birer NAS oldukları belirtilmektedir [89]. Buna ek olarak SSS'de sentezlenen NS'lerin gelişim sırasında veya yetişkinlerde yokluğu veya azalmış konsantrasyonları nörogelişimsel, psikiyatrik ya da davranışsal bozukluklar ile ilişkili bulunmuş ve bu bileşikler ile fizyolojik ya da farmakolojik dozlarda tedavinin de nörogenezi,

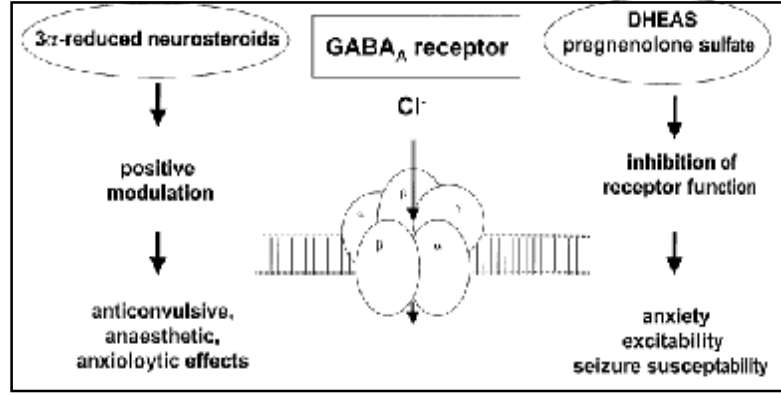
nöronal yaşam süresini, miyelinizasyonu, hafızada artışı ve nörotoksitede azalmayı sağlayabildikleri gösterilmiştir [79].

Fizyolojik koşullar altında NAS'lar strese cevap, seksüel ve beslenme davranışı, duygu durum, hafıza ve bilişsel yeti gibi yaygın davranışsal fonksiyonlar üzerine etkilidir. NAS'lerin davranış biyolojisinden, bilişsel performans ve hafızayı içine alan değişik etkilerinin dışında, hücrelerin nöral yollarda çoğalma ve farklılaşması, gelişim ve yaşlanma süreci ile miyelinizasyon üzerine trofik etkilere, dendritik sinaps, sinaptogenez ve nörit gelişimini tetiklemesine kadar uzanan çok geniş, oldukça karmaşık ve önemli etkilere sahip oldukları düşünülür (Şekil 11) [14, 77, 82, 90].



Şekil 11: NAS'lardan pregnenolon(P) ve metabolitleri PS ve PROG'un bazı etkilerinin şematize edilerek gösterilmesi [77]

Patofizyolojik durumlarda NAS'lar; epilepsi, premenstrüel sendrom (PMS), şizofreni, depresyon, anksiyete, alkol bağımlılığı, multiple skleroz (MS) ve diğer nörodejeneratif hastalıklar gibi nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların oluşumunda ve tedavi süreçlerinde önemli rol oynarlar. Nöroprotektif, sedatif, hipnotik, anksiyolitik, anestetik, antikonvülzan, antipsikotik, antidepresan ve uyku düzenleyici etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar da mevcuttur [87]. Bu etkilerin bazılarını şekil 12'de gösterildiği gibi ligand kapılı iyon kanalları ailesinden olan GABA_A reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedirler [90].



Şekil 12: GABA_A reseptörünün α , β , γ alt birimleri ve reseptörün pozitif düzenlenmesi veya inhibisyonu sonucu ortaya çıkan etkiler [90]

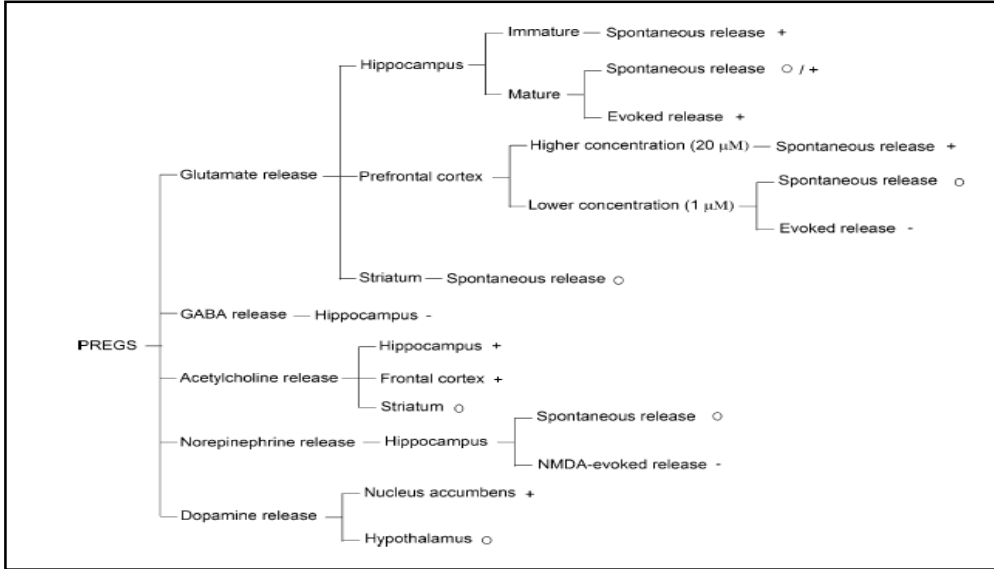
Nöroaktif steroidlerin sinir gelişimindeki koruyucu ve geliştirici özellikleri başlıklar halinde aşağıdaki gibi özetlenebilir [77, 83, 91].

- Nöronların ve glial hücrelerin hayatta kalımı ve farklılaşması
- Myelin proteini sentezi – myelinizasyon (PROG'un genomik etkisi ile)
- Sinir sistemi onarımı - remyelinizasyon
- Serebellar gelişimde purkinje hücrelerinde dentritik büyüme ve sinaptogenez gelişimi (serebellar sinirsel ağ bağlantısı)
- Oligodendrosit farklılaşması, olgunlaşması
- Neokorteks yapılanması (olası sinyal molekülü)
- Nöronların korunması (oksidatif stres, eksitotoksik hasar, anoksiye karşı)

2.2.6. Pregnenolon, Pregnenolon Sülfat ve Nöronal Hücre Ölümü

Tüm steroid hormonların öncülü olan P ve bunun sülfat esteri PS'nin sinir sistemindeki fizyopatolojik süreçlerdeki rolleri incelendiğinde, PS rodent modellerinde öğrenme ve hafıza üzerine olumlu etki gösteren eksitator bir NAS olarak bilinir [92]. PS genomik olmayan etkilerini GABA_A'nın etkisini inhibe ederek, NMDA reseptörlerini uyararak ya da sigma 1 ters agonist etki göstererek gerçekleştirir [77, 83, 87, 93]. Beynin öğrenme ve hafıza ile ilgili alanı olan hippokampusta PS bölgesel bir mediatör gibi davranıp glutamat bağımlı nöronal uyarılabilirliğe katkıda bulunur [69]. Sıçanlarda hippokampustaki PS konsantrasyonunun hafıza performansı ile korele olduğu ve ayrıca NMDA antagonistlerince indüklenen hafıza bozukluğunun intraserebroventriküler PS enjeksiyonu ile düzeltilebildiği gösterilmiştir [92].

PS'nin NMDA reseptör bağımlı Ca⁺⁺ aşırı salınımı sonucu hücre içi Ca⁺⁺ dengesini bozduğu ve eksitotoksisiteyi artırıcı etki gösterdiği de bilinmektedir [92]. Bunlara ek olarak hücresel düzeyde glutamat, GABA, asetilkolin (Ach), norepinefrin (NE) ve dopamin (DA) salınımı üzerine önemli düzenleyici etkileri de vardır (Şekil 13) [88].



Şekil 13: PS'nin nörotransmitter salınımına etkisi. (+) salınımı artırır; (-) salınımı azaltır; (o) salınımına etkisiz [88]

Pregnenolonun da $GABA_A$ 'nın etkisini inhibe eden, öğrenme ve hafıza üzerine olumlu etkiler gösteren bir NAS olduğu ve fare hipokampal hücrelerinde glutamat ve A β peptit tarafından oluşturulan toksisiteye karşı nöronları koruyucu bazı özellikler gösterdiği bilinmektedir [94]. Ayrıca P'nin striatumda NMDA'nin stimule ettiği dopamin salınımını inhibe ettiği, bunu da sigma1 ve 2 antagonistleri verildiğinde etkinin tamamen geriye dönmesi nedeniyle sigma reseptörleri aracılığıyla yaptığı ileri sürülmüştür [88]. Bazı çalışmalarda ise P'nin kendi başına etkisiz olduğu ancak PS ve allopregnanolon gibi metabolitlerinin prelimbik kortikal ve hipokampal kesitlerde glutamat salınımını arttırdığı ve kortikal kesitlerde K^+ 'un indüklediği norepinefrin salınımını artırdığı vurgulanmıştır. Bu bilgi P'nin metabolitlerine dönüşümünün bazı etkilerin oluşumu için gerekli olduğunu düşündürmektedir [88].

Sinir dokusunda P ve PS için fizyolojik düzey $1\mu M$ ve altı olarak tanımlanmış [79] olup bu düzey farklı etkenler tarafından değişikliğe uğrayabilir. Örneğin A β peptid tarafından hücre içi kalsiyum ve reaktif oksijen ürünlerinin artışı ile birlikte sinir sisteminde steroid hormon sentezi indüklenebilir [15-17]. Bununla birlikte nöronal dokudaki P konsantrasyonu iskemik hasar, oksidatif stressin yanı sıra A β peptit ve glutamat tarafından indüklenen nörotoksisite ile de değişime uğrayabilmektedir [15, 95]. PS düzeyinin ise beyinde A β düzeyi ile negatif korele olduğu gösterilmiştir [96].

Sinir sisteminde steroid sentezinin artmasının, nöronal apoptozun erken bir kanıtı olduğu [21], yine bazı çalışmalarda PS'nin nöronal hücre ölümünü tetiklediği bildirilirken [24], bunun aksine dışarıdan verilen östrojen ve P gibi steroidlerin apoptotik nöron ölümünü önleyebildiği de gösterilmiştir [22, 23]. Apoptotik hücre ölümünden kaspazlar sorumlu tutulmakta ve kaspaz aktivasyonu ile birlikte gözlenen nöronal apoptozun AH'nın patogenezini modifiye ettiği ve nöronal ölümü hızlandırdığı ileri sürülmektedir [57, 58]. Doğal bir eksitotoksin olarak kabul edilen PS'nin, hücrenin oksidatif durumundaki değişiklikten bağımsız olarak erken dönemde kaspaz 2 ve kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [25].

AH'daki nöronal hasardan NMDA reseptörlerini kullanan eksitotoksisite de sorumlu tutulmaktadır [97]. AH'da hipokampus, assosiasyon kortikal alanlarda glutamatın yüksek konsantrasyonlarda bulunması nörodejenerasyona yol açabilmektedir [98]. PS'nin de bu

reseptörler aracılığıyla etki gösterdiği göz önüne alındığında, bu NAS'ın AH'daki nörodejeneratif süreç ile yakın ilişkide olabileceği ileri sürülebilir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. KULLANILAN GEREÇLER VE SARF MALZEMELER

Çalışmamızda kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve sarf malzemeler tablo 6 ve 7’te listelenmiştir.

Tablo 6: Çalışmada kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	MODEL- KOD
Laminer-air flow	Holten Lamin Air Biosafe 1.2
Karbondioksit inkübatörü	Nuaire Us Autoflow NU-4750
Ters-faz ışık mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Santrifüj	Eppendorf 5810 R
Akış Sitometre	Beckman Coulter –Epics XL.MCL
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Forma Model 705
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik 2031
Azot tankı	MVE Cryogenics cryosystem 4000
Plak okuyucu	BioTek ELX 800
Buz makinası	Scotsman AF-100
Otoklav	Hirayama HICLAVE HV-50
Ettüv	Thermo Heraeus
Sonikatör	Sonic Materials
pH metre	Orion, USA Model 420
Hassas terazi	Precisa XB 220 A

Saf su cihazı	Milipore Mili-Q ZLX55003Y
Liyofilizasyon cihazı	Flexi-Dry
Ekstraksiyon plate-manifold	Waters P/N 186001831

Tablo 7: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler

KİMYASAL VE SARF MALZEME ADI	ÜRETİCİ FIRMA-KOD
Pregnenolon	Fluka 81630 / Sigma P 9129
Pregnenolon Sülfat	Sigma P 162
Aminoglutetimid (AMG) (Enzim inhibitörü)	Sigma A-123
2,4 Dichloro-6-Nitrophenol (DCNP)	Fluka 36065
Ultra saf su	Biochrom L0020
Asetik asit	Merck K24209656 728
Etanol	Riedel-de Haen 32221
Metanol	Riedel-de Haen 34860
Etilasetat	Riedel-de Haen 27227
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom S01115
Donör at serum (DHS)	Biochrom S9133
RPMI 1640	Invitrogen 21875034
Sığır serum albumin (BSA)	Thermo 23209
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma D 5796
Poli D Lizin	Sigma P1149

PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom L1815
MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)	Appllichem A2231,0001
Amiloid β fragman 25-35	Sigma A4559
LDH Sitotoksisite kiti	Roche 11644793001
ApopNexin Anneksin V FITC Apoptosis kiti	Chemicon APT750
Pregnenolon ELİSA kiti	BLK 3-4500
BCA Protein kiti	Pierce 23225
Mikro elüsyon plağı	Waters 01757
DMSO (Dimetil sülfoksid)	Sigma D2650
Tripsin-EDTA	Biochrom L2143
Penisilin/Streptomisin	Biochrom A2210

3.2. HÜCRE TİPLERİ ve KULLANILAN PROTOKOLLER

3.2.1. HÜCRE TİPLERİ

3.2.1.1. PC-12 Sıçan feokromasitoma hücre hattı:

Kaynağı: İlk kez 1976'da Grene ve Tischler tarafından sıçan feokromasitomasından klonlanmıştır.

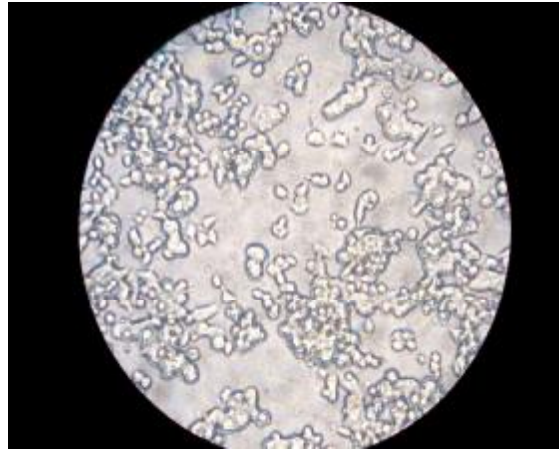
Çalışmamızda kullanılan hat ticari olarak DSMZ (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANİSMEN UND ZELLKULTUREN) hücre kültür bankasından DSMZ ACC159 kodu ile temin edilmiştir.

Özellikleri: Adrenal bezin medullasından köken alan tek hücre klonudur. Feokromasitoma nöral krestten köken alan nöroendokrin özelliğe sahip kromaffin hücrelerden gelişen bir tümördür. Bu hat nöronal dokuya ait endokrin özellikleri göstermesi nedeniyle çalışmamızda nöronal model olarak seçilmiştir.

Hücreler nemli atmosfer, %5 CO₂ basıncı altında 37 °C'de inkübe edilirler. Kültür ortamında kümeler halinde çoğalan hücreler morfolojik olarak poligonal görünümündedir. Hücrelerin iki katı sayıya çıkması için gerekli süre (doubling time) 50-60 saattir.

PC-12 hücreleri aderan özellikte olup kültür kabının yüzeyine yapışarak yaşarlar. Ancak plastiğe zayıf tutunma gösterdiklerinden tutunmalarını kolaylaştırmak amacıyla kültür kaplarının yüzeylerinin kollagen, laminin, poli lizin gibi maddeler ile kaplanması gerekir.

Büyüme ortamı olarak bu hücreler için %10 DHS, %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanılır.



Resim 1: PC12 hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20)

3.2.1.2. SHSY-5Y İnsan nöroblastoma hücre hattı:

Kaynağı: İlk kez 1978’de rapor edilen SHSY-5Y hücre hattı üçüncü jenerasyon nöroblastoma olup orijinal olarak nöroepitelioma hücre hattı olan SK-N-SH’den klonlanmıştır. SHSY-5Y hücre hattı SH-SY5’ten klonlanmıştır. SH-SY5 ise SK-N-SH’den klonlanan SH-SY’den klonlanmıştır. Orijinal hücre hattı 1970 yılında metastatik nöroblastomalı 4 yaşındaki bir kızın kemik iliği biyopsisinden izole edilmiş olduğundan SHSY-5Y hücreleri iki tane X kromozomu taşımaktadır.

Çalışmamızda kullanılan bu hat ticari olarak DSMZ (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN) hücre kültür bankasından DSMZ ACC209 kodu ile temin edilmiştir.

Özellikleri: Nöroblastoma embriyonik nöral krestten kaynaklanan primitif, pluripotent sempatik hücrelerden köken alır. Bu hücreler esas olarak sempatik sinir sistemi ve adrenal bezin medullasında bulunur. Hücreler mitoz yoluyla çoğalır ve çevreye uzantılar (nöritler) vererek farklılaşır. Nöronal karakterli bu hücrelerin anahtar nörosteroidogenik enzimleri içerdiği ve nörosteroidleri üretebildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [99].

Hücreler nemli atmosfer ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C’de inkübe edilirler. Kültür ortamında tek tabakalı olarak çoğalan hücreler morfolojik açıdan iğsi yada hücre gövdesinden çok sayıda uzantılar veren farklı görünümde dirler. Hücrelerin iki katı sayıya çıkması için gerekli süre (doubling time) 55 saatten uzundur.

Büyüme ortamı olarak bu hücrelerde %17 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM ortamı kullanılır.



Resim 2: SHSY-5Y hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20)

3.2.2. PROTOKOLLER

3.2.2.1. Hücre Kültür Kaplarının Poli-D-lizin ile Kaplanması:

PC-12 hücre hattı çalışmalarında kullanılan tüm hücre kültür kaplarının (25, 75 cm²'lik hücre kültür kapları ve 6, 96 kuyulu plaklar) kullanım öncesi poli-D-lizin ile kaplanması gerekir.

Kaplama işlemi 10 µg/mL'lik konsantrasyon ile yapılacağından ilk önce uygun poli-D-lizin solüsyonu hazırlanır.

Poli-D-Lizin Solüsyonu Hazırlığı:

- Ø 100 mg'lık poli-D-lizin şişesi 10 mL ultra saf su ile çözüldü.
- Ø Elde edilen 10 mg/mL konsantrasyonundaki poli-D-lizin 1 mL'lik hacimlerde ependorf tüplerine ayrılarak -20°C'de dondurularak saklandı.
- Ø Kaplama işlemi 10 µg/mL'lik konsantrasyon ile yapılacağından kullanılmadan önce 10 mg/mL konsantrasyonundaki poli-D-lizin'den 100 µL alıp 100 mL'e ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

Uygulama Basamakları:

1. Kaplama işlemindeki tüm basamaklar laminar kabin içinde steril ortamda gerçekleştirildi.
2. 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına 2.5 mL, 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına 7.5 mL, 96 kuyulu plaklara her kuyuya 100 µL, 6 kuyulu plaklara her kuyuya 1 mL olacak şekilde hazırlanan 10 µg/mL konsantrasyondaki stok poli-D-lizin solüsyonundan eklendi.
3. Laminar kabin içinde oda sıcaklığında 1 saat beklendi.
4. Kapladığımız tabana dokunmadan dikkatlice poli-D-lizin solüsyonu pipet ile çekildi.

5. Aynı miktarda saf su koyarak hafif çalkalama yapıldı. Tabana dokunmadan dikkatlice su çekildi ve atıldı. Yıkama işlemi 2-3 kez tekrarlandı.
6. Kapladığımız malzemelerin kuruması için kapağı açık şekilde laminar kabinde 2-3 saat bekletildi.
7. Yüzey kuruduktan sonra kapaklar kapatılarak ağızları parafilm ile sarıldı. Kullanılmaya kadar oda ısısında saklandı.

3.2.2.2. Donmuş Hücrelerin Çözülmesi:

Uygulama Basamakları:

1. Önceden hazırlanan ve 4 °C'de saklanmakta olan %15 ve %17 serum içeren ortamlar 37 °C'e ısıtıldı.
2. Her bir hücre hattı için birer adet 25 cm² 'lik hücre kültür kabı hazırlandı. (SHSY-5Y hücreleri için Poli-D-lizin ile kaplamaya gerek yoktur, PC-12 için gerekli olan protokol yukarıda anlatılmıştır.)
3. Dondurma tüpleri (Cryovial) içindeki hücreler -80°C'den çıkarılarak hızlıca 37° C'de çözüldü.
4. Çözünmüş olan hücreler pipet ile 2-3 kez süspanse edildi ve 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10 mL büyüme ortamı eklenerek pipet ile 1-2 kez alt üst edildi.
5. Tüpler 600 g de 5 dk santrifüj edildi.
6. Üst faz atıldı. Dipte kalan çökelti 2-3 mL büyüme ortamı ile süspanse edildi uygun kültür kaplarına aktararak üzeri ortam ile uygun hacme tamamlandı.
7. 1 gün sonra (16-20 saat) hücrelerin morfolojileri ve yüzeye tutunma oranları ters-fazlı mikroskop ile değerlendirildi.

3.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması:

Uygulama Basamakları:

1. Hücre kültür kaplarının içindeki ortam atıldı.
2. Hücre kültür kapları steril PBS ile yıkandı.
3. 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına 3 mL, 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına 7 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
4. Hücre kültür kaplarının tabanına hafifçe el ile vurularak hücrelerin kalkması sağlandı (özellikle PC-12 hücreleri için). Hücrelerin tabandan yeterince ayrılması durumunda hücre kültür kapları 2-3 dakikayı geçmeyecek kadar 37°C'de inkübatörde bekletildi.
5. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra hücre kültür kaplarına en az tripsin/EDTA hacmi kadar büyüme ortamı ilave edildi ve 1-2 kez pipetaj yapıldıktan sonra ayrılan hücreler 15 mL'lik tüplere alındı.
6. Tüpler 800 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
7. Üst faz atıldı.
8. Alta kalan çökelti 1-2 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış ortam içinde süspansiyon edildi.
9. Hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı "hücrelerin sayılması protokolüne" göre belirlendi. Analiz koşullarının gerektirdiği hücre sayılarını elde edebilmek için hücre süspansiyonu belirli oranlarda seyreltilerek tekrar çoğalmaları için uygun hücre kültür kaplarına aktarıldı.
10. Daha sonra kullanılmak üzere saklanması planlanan hücreler 1-2x10⁶ hücre/mL olacak şekilde taze hazırlanan dondurma ortamı içinde dondurma tüplerine paylaştırıldı. (-80°C'de saklamak için %90 FBS, %10 DMSO; sıvı nitrojende saklamak için %20 FBS, %10 DMSO, %70 RPMI/DMEM içeren ortam kullanıldı.)
11. Dondurma tüpleri önce -20°C'de 1 saat bekletildikten sonra hücrelerin ihtiyaç duyulan saklama zamanına göre -80°C'ye veya -200°C'ye (sıvı nitrojen) kaldırıldı.

3.2.2.4. Hücrelerin Sayılması:

Uygulama Basamakları:

1. Hücrelerin pasajlanması işlemindeki ilk 8 basamak aynen yapıldıktan sonra homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak ependorfa kondu ve üzerine 180 µL %1.5 veya %1.7'lik ortam eklendi.
2. 1:10 seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak Neubauer lamı ve lamel arasına yayıldı.
3. Ters-faz ışık mikroskopunda 20x büyütmede sayım yapıldı. Neubauer lamının mümkünse tüm kareleri veya hücre sayısı fazla ise 16 küçük kare içeren 4 farklı alanı sayılarak ortalaması alındı.
4. Hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarını (hücre sayısı/mL) belirlemek için hesaplama yapıldı.

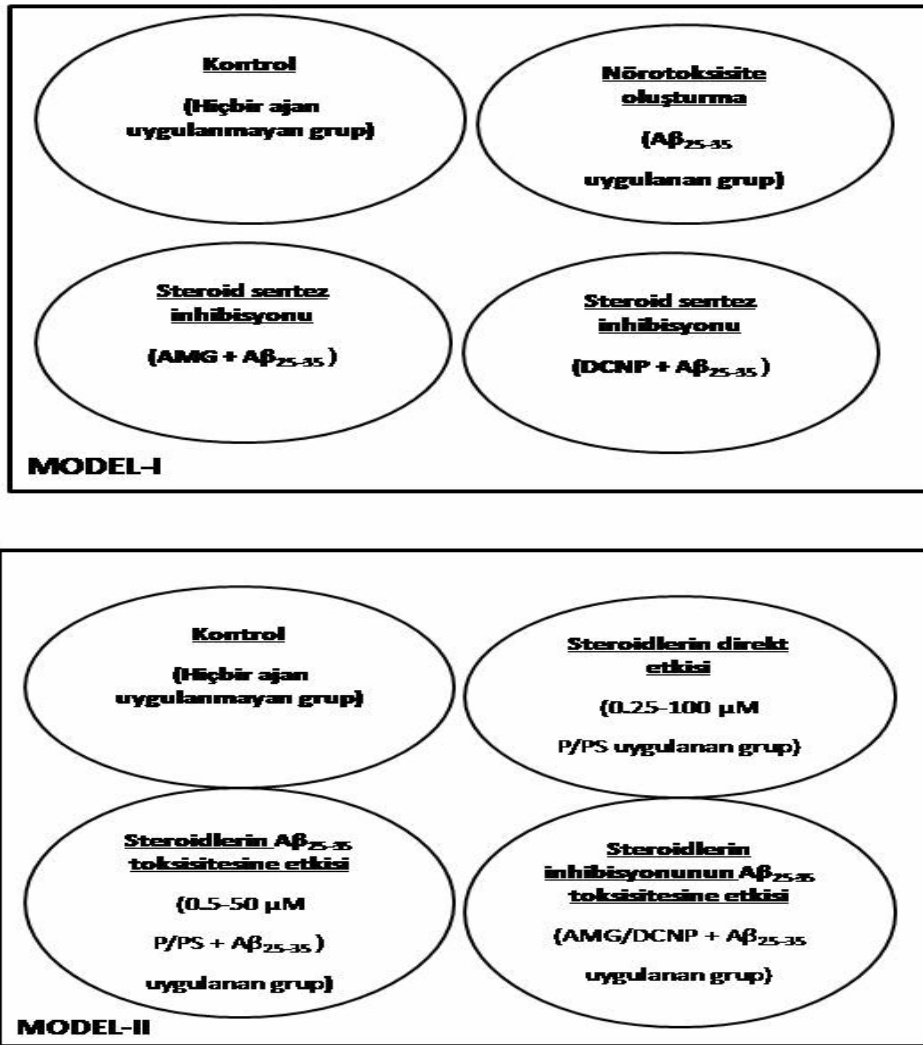
Hesaplama: Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x 10^4

3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEY MODELLERİ

Çalışmamızda sıçan ve insan kaynaklı iki ayrı nöronal hücre kültür hattı (PC-12 ve SHSY-5Y) kullanılarak iki farklı deney modeli oluşturuldu.

1. MODEL I- $A\beta_{25-35}$ toksisitesi ve toksisitenin steroid sentezine etkisi
2. MODEL II- Steroidlerin $A\beta_{25-35}$ toksisitesi üzerine etkisi

Oluşturulan bu iki farklı modelin şematize edilmiş halleri şekil 14’te görülmektedir.



Şekil 14: Model-I ve Model-II'nin şematize edilerek gösterimi

Deneylere geçmeden önce hücreler %70-80 sıklıkta oluncaya kadar hücre sayısının iki katına çıkma süresine göre (doubling time) ~ 2-3 günde bir %15-%17 serum içeren kültür ortamları ile beslenerek nemli atmosfer ve %5 CO₂ basıncı altında 37 °C'de inkübatör içinde tutuldu.

Deneylerde kullanılacak toksik ajanların, kimyasal malzemelerin gerekli dozları ve analizler için gerekli olan hücre sayıları yapılan ön çalışmalar ile belirlendi.

Deney modellerini oluşturmak için 96 veya 6 kuyulu plakların her bir kuyusuna ekilen hücrelerin plak yüzeyine yapışabilmeleri için 18-24 saat süreyle %15-17 serum içeren ortam, nemli atmosfer ve %5 CO₂ basıncı altında 37°C'de bekletildi. Hücrelerin tutunması gerçekleştikten sonra deney koşullarının sağlanması için uygun kimyasalların uygulanmasına geçildi.

Oluşturulan tüm deney koşulları kendi içinde üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 kez olmak üzere tekrarlanarak teyit edildi.

3.3.1. MODEL I - A β ₂₅₋₃₅ TOKSİSİTESİNİN STEROİD SENTEZİNE ETKİSİ

3.3.1.1. A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesi:

PC-12 hücreleri hücre kültür kapları poli-D-lizin ile kaplandıktan sonra, SHSY-5Y hücreleri ise direkt olarak 96 ve 6 kuyulu plakların her bir kuyusuna sırasıyla 2×10^4 veya 2×10^6 yoğunluğunda olacak şekilde ekildi.

İlk 18-24 saat boyunca hücreler plak yüzeyine yapışabilmeleri için %15,%17 serumlu ortam, nemli atmosfer, %5 CO₂ basıncı altında 37 °C’de tutulduktan sonra hücrelerin deneyler süresince çoğalmasını yavaşlatmak ve serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kurtulmak amacı ile, kültür kapları içindeki ortamların yarısı çekilip atılarak (6 kuyucuklu kap için 1 mL, 96 kuyucuklu kap için 100 μ L) aynı oranlarda %1.5 veya %1.7 serum içeren ortamlar ile değiştirildi. Koşullar için gerekli tüm kimyasal maddeler aşağıda detayları verildiği şekilde %1.5 veya %1.7 serum içeren ortamlarda hazırlanarak uygulandı. Bu şekilde oluşturulan koşulların şematize edilmiş hali şekil 15’te görülmektedir.

A β ₂₅₋₃₅ solüsyonunun hazırlanması:

A β ₂₅₋₃₅ toksisitesinin oluşturulmasında kullanılan solüsyon aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı. Stok solüsyonlar tükeninceye kadar -20°C’de saklandı ancak %1.5 veya %1.7 serum içeren ortam ile seyreltilerek hazırlanan konsantrasyonlar her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

Ø 1 mg’lık ambalajın içine 943 μ L ultra saf su eklenerek 1 mM’lık stok solüsyonu hazırlandı.

Ø 1 mM’lık stok solüsyonundan 160 μ L alıp üzerine %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortamdan 840 μ L eklenerek 160 μ M’lık A β ₂₅₋₃₅ solüsyonu hazırlandı. Seri seyreltmeler yapılarak 80 μ M ve 40 μ M’lık solüsyonlar hazırlandı.

PC-12 hücreleri 20 µM (%50 oranında nöronal hücre ölümü yaptığı bilinen doz) Aβ₂₅₋₃₅ ile 24, 48, 72 saat süreyle inkübe edildi [100].

SHSY-5Y hücreleri ise 72 saat boyunca 37 C'de inkübe ederek agregasyonu sağlanan 40 µM Aβ₂₅₋₃₅ ile 24, 48, 72 saat süreyle inkübe edildi. Eş zamanlı olarak kontrol gruplarını oluşturmak için hücreler sadece %1.5 (PC-12) ve %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortamlar ile muamele edildi.

Her iki hücre hattı için Aβ₂₅₋₃₅ peptidin hücreler üzerine etkisi; MTT hücre canlılık testi, LDH salınımı (sadece PC-12 için) ve mikroskopik inceleme ile değerlendirildi.

Bu yöntemlere ait detaylı bilgiler yöntemler bölümünde verilmiştir.

3.3.1.2. Nöronal hücrelerin steroid içeriğinin belirlenmesi:

Aβ₂₅₋₃₅ peptidin hücre steroid sentezine etkisini inceleyebilmek için hücreler 6 kuyulu plaklara en az 2x10⁶ yoğunlukta ekildi. PC-12 hücreleri için 20 µM, SHSY-5Y hücreleri için ise 40 µM agregate edilmiş Aβ₂₅₋₃₅ peptit, toksisitenin belirginleşmesi için gerekli olan 72 saat boyunca uygulandı.

Steroid sentezinde görev alan bazı enzimlerin inhibitörleri kullanılarak Aβ₂₅₋₃₅ peptidin etkili olabileceği metabolik yollar değerlendirildi.

Bu amaçla, steroid sentezinin ilk hız kısıtlayıcı enzimi olan, kolesterolün pregnenolona dönüşümü basamağını katalizleyen sitokrom P450 kolesterol side-chain cleavage enziminin (P450_{scc}; CYP11A) inhibitörü aminoglutetimid (AMG) 0.76 mM, ayrıca P'un PS'a dönüşümünü sağlayan hidroksisteroid sülfotransferazı (HST) inhibe eden 2,4-dikloro-6-nitrofenol (DCNP) 1µM dozda 72 saat boyunca hücrelere uygulandı. (P450_{scc} ve HST=SULT-2B1a enzim inhibisyonlarını yaptığı önceden bilinen dozlar) [78, 101].

Bu şekilde oluşturulan çalışma koşullarının şematize edilmiş hali şekil 15'te görülmektedir.

İnkübasyon süresinin sonunda hücre lizatlarından çekitleme ve ön saflaştırma sonrasında elde edilen örneklerde P düzeyleri ELISA ve HPLC yöntemi ile analiz edildi. PS düzeyleri ise solvolizis işleminden sonra sülfat grubu kopartılarak toplam P düzeyi üzerinden indirekt olarak belirlendi. Bu işlemlerin şematize edilerek özetlenmiş hali şekil 16'da görülmektedir.

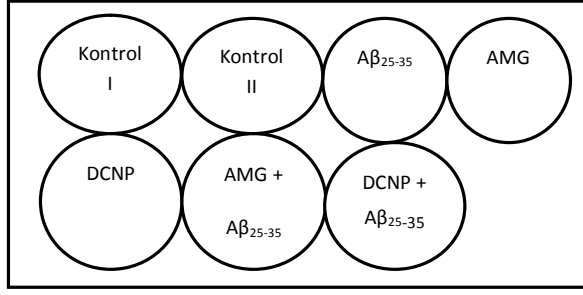
Lizat hazırlığı ve çekitleme protokolü, solid faz ekstraksiyon (SFE) yöntemi ile saflaştırma işlemi, ELISA ve HPLC analiz yöntemleri ayrıntılı bir şekilde yöntemler bölümünde açıklanmıştır.

AMG solüsyonunun hazırlanması:

- Ø 50 mg'lık ambalajın içine 860 µL DMSO eklenerek 152 mmol/L stok solüsyonu hazırlandı.
- Ø 152 mM'lık stok solüsyonundan 100µL alıp %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile 5 mL'e tamamlanarak 3.04 mM'lık solüsyonlar elde edildi.
- Ø 3.04 mM'lık solüsyonlar yine 1:2 oranında ortam ile seyreltilerek sonuçta 1.52 mM'lık %1 DMSO içeren solüsyonlar hazırlandı. (DMSO'nun son konsantrasyonu hücreler için toksik olmadığı ön çalışmalar ile gösterilen %0.5 oranına getirildi.)

DCNP solüsyonunun hazırlanması:

- Ø Laminer kabin içinde steril şartlarda tartımı yapılan 208 mg DCNP 100 mL DMSO içinde çözülerek 10 mmol/L stok solüsyonu hazırlandı.
- Ø Bu 10 mM'lık stok solüsyonundan 100 µL alındı üzeri 10 mL'ye %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile tamamlandı ve sonuçta %1'lik DMSO ve 100 µM'lık DCNP içeren 10 mL solüsyon elde edilmiş oldu.
- Ø 100 µM'lık DCNP solüsyonu %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile seyreltilerek 4 µM ve 2 µM'lık DCNP solüsyonları hazırlandı.



Şekil 15: MODEL I'in ($A\beta_{25-35}$ toksisitesi ve bu toksisitenin steroid sentezi üzerine etkisi) plak üzerinde şematize edilerek gösterilmesi

Kontrol I: % 1.5-% 1.7'lik serum içeren ortam ile muamele edilen (+) kontrol

Kontrol II: Triton X100 içeren % 1.5-% 1.7'lik serumlu ortam ile muamele edilen (-) kontrol

$A\beta_{25-35}$: PC-12 hücrelerine 20 μM , SHSY-5Y hücrelerine ise agregre 40 μM $A\beta_{25-35}$ peptit uygulanan grup

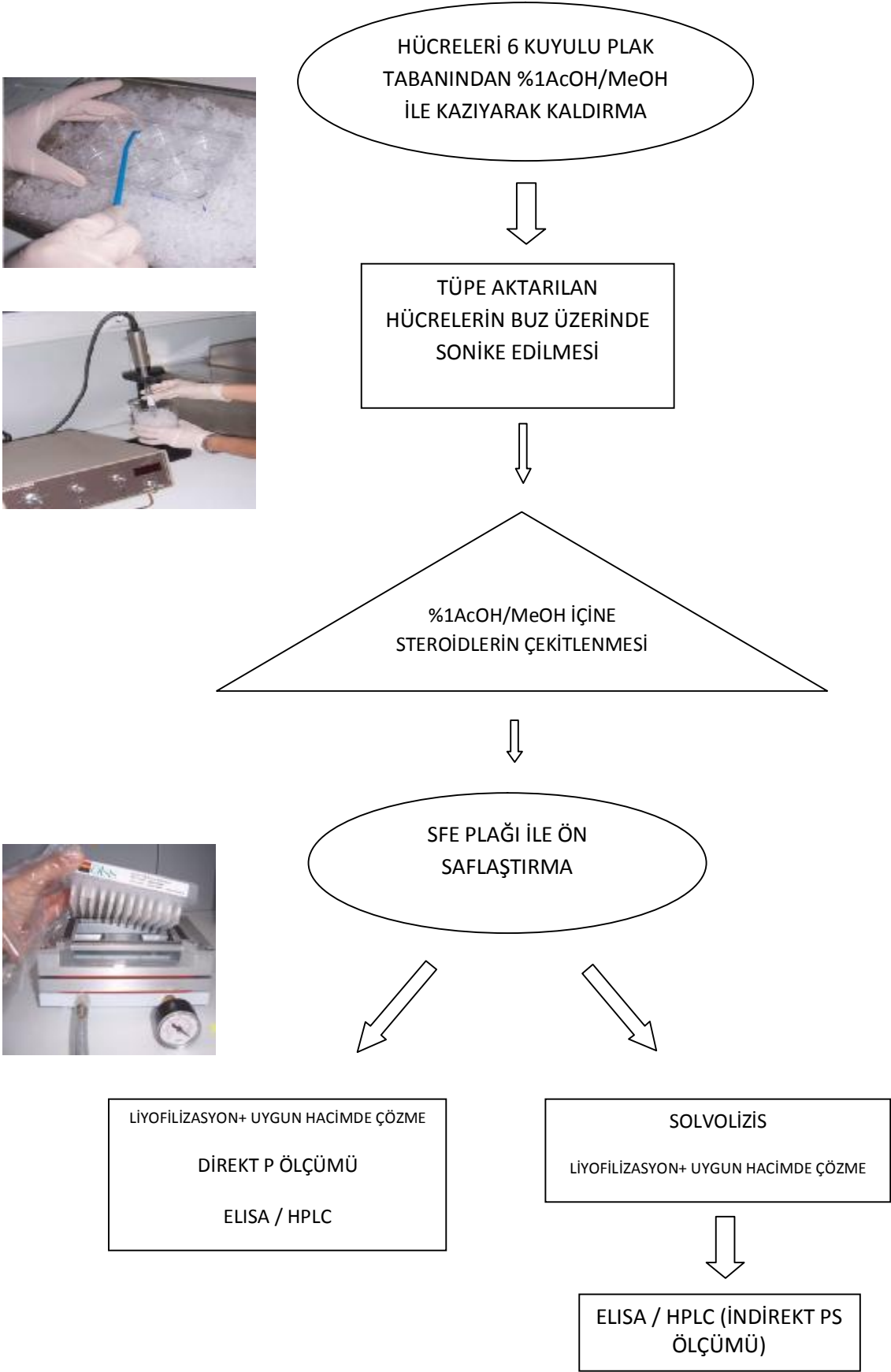
AMG: 0.76 mM aminoglutetimid ile muamele edilen grup

DCNP: 1 μM 2,4 Dikloro-6-Nitrofenol ile muamele edilen grup

AMG + $A\beta_{25-35}$: Eş zamanlı olarak 0.76 mM aminoglutetimid ile birlikte 20 μM (PC-12)/ 40 μM (SH-SY5Y) $A\beta_{25-35}$ uygulanan grup

DCNP + $A\beta_{25-35}$: Eş zamanlı 1 μM 2,4 Dikloro-6-Nitrofenol ile birlikte 20 μM (PC-12)/40 μM (SHSY-5Y) $A\beta_{25-35}$ uygulanan grup

Oluşturulan tüm deney koşulları her iki hücre hattında kendi içinde üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 kez çalışıldı.



Şekil 16: P ve PS ölçümü öncesi hücrelere uygulanan işlemler

3.3.2. MODEL II - STEROİDLERİN A β ₂₅₋₃₅ TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

3.3.2.1. PC-12 ve SHSY-5Y Hücrelerine Steroid uygulaması:

PC-12 ve SHSY-5Y hücreleri 96 kuyulu plağın her bir kuyusunda 2×10^4 yoğunluğunda hücre olacak şekilde ekildi. Detayları aşağıda verildiği gibi hazırlanan P ve PS'in farklı dozları (100, 80, 60,50, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.25 μ M) hücrelere 72 saat süreyle uygulandı. Oluşturulan koşulların şematize edilmiş hali şekil 17'de görülmektedir.

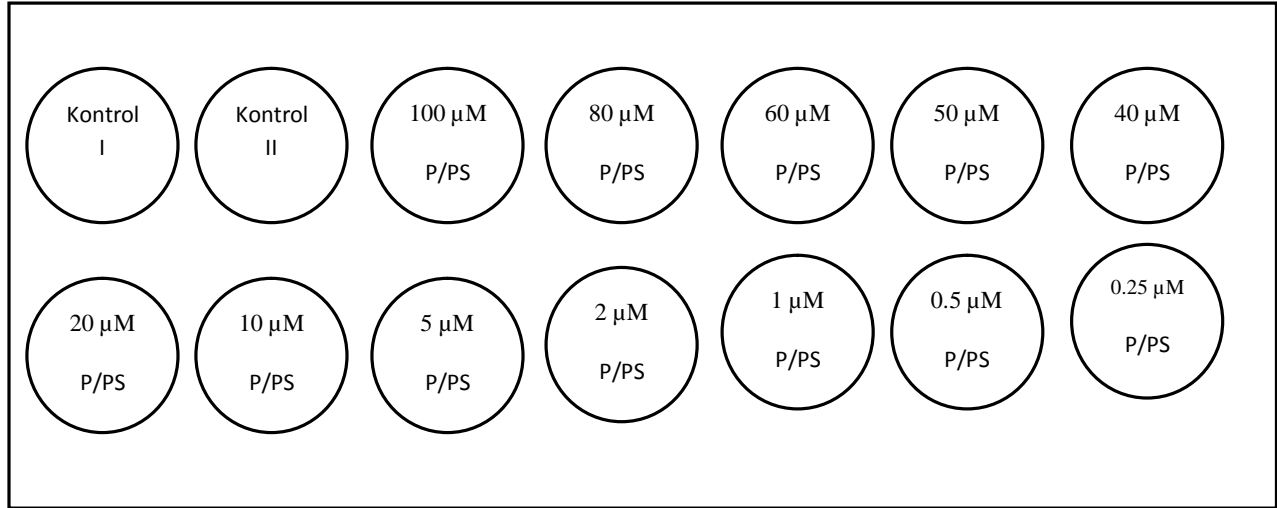
Her iki hücre hattı için P ve PS'in hücreler üzerine etkisi; MTT hücre canlılık testi, LDH salınımı (sadece PC-12 için), akış sitometri kullanılarak değerlendirildi.

Pregnenolon solüsyonunun hazırlanması:

- Ø 10 mmol/L stok solüsyonu hazırlamak için laminar kabin içinde steril şartlarda tartımı yapılan 316.5 mg pregnenolon 100 mL DMSO içinde çözüldü.
- Ø 10 mM'lık stok solüsyonundan 200 μ L alındı üzeri 10 mL'ye %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile tamamlandı ve sonuçta %2'lik DMSO ve 200 μ M pregnenolon içeren 10 mL solüsyon elde edilmiş oldu.
- Ø 200 μ M pregnenolon solüsyonu %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile değişik oranlarda seyreltilerek 160, 120, 100, 80, 40, 20, 10, 2, 1, 0.5 μ M'lık solüsyonlar hazırlandı.

Pregnenolon Sülfat solüsyonunun hazırlanması:

- Ø 25 mg'lık ambalajın içine 5.973 µL DMSO eklenerek 10 mmol/L stok solüsyonu hazırlandı.
- Ø 10 mM'lık stok solüsyonundan 200 µL alındı üzeri 10 mL'ye %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile tamamlandı ve sonuçta %2'lik DMSO ve 200 µM'lık pregnenolon sülfat içeren 10 mL solüsyon elde edildi.
- Ø 200 µM pregnenolon sülfat solüsyonu %1.5 veya %1.7 (SHSY-5Y için) serum içeren ortam ile değişik oranlarda seyreltilerek 160, 120, 100, 80, 40, 20, 10, 2, 1, 0.5 µM'lık solüsyonlar hazırlandı.



Şekil 17: MODEL II'nin (farklı dozlarda steroid uygulamasının PC-12 ve SHSY-5Y hücreleri üzerine etkisi) plak üzerinde şematize edilmesi

Kontrol I: %1.5-%1.7'lik serum içeren ortam ile muamele edilen (+) kontrol

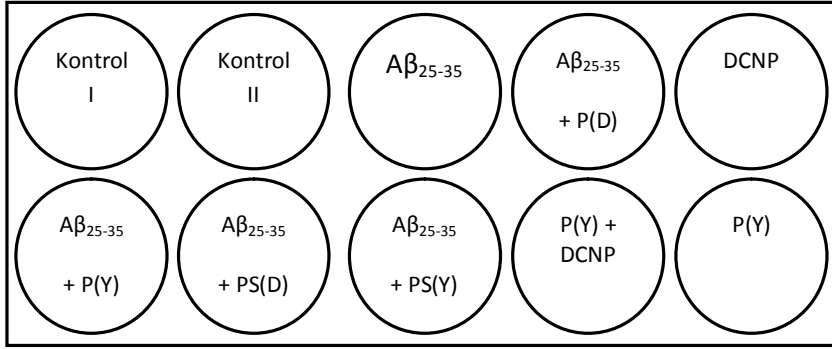
Kontrol II: Triton X100 içeren %1.5-%1.7'lik serumlu ortam ile muamele edilen (-) kontrol

P/PS: 100, 80, 60,50, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.25 µM P veya PS ile muamele edilen gruplar

3.3.2.2. Steroid Uygulamasının $A\beta_{25-35}$ Toksikitesi Üzerine Etkisi:

P ve PS'nin $A\beta_{25-35}$ peptit toksisitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla hücreler 96 kuyulu plaklara 2×10^4 yoğunlukta ekildi. Eş zamanlı olarak PC-12 hücrelerine 20 μ M, SHSY-5Y hücrelerine ise agregre edilmiş 40 μ M $A\beta_{25-35}$ peptit ile birlikte düşük (0.5 μ M) ve yüksek (50 μ M) konsantrasyonlardaki P ve PS 72 saat boyunca uygulandı.

Ayrıca P'nin PS'e dönüşümünü engelleyen DCNP (1 μ M), P(Y) uygulanan hücrelere eş zamanlı olarak 72 saat boyunca uygulandı. Etkiler, MTT hücre canlılık testi kullanılarak değerlendirildi. Bu şekilde oluşturulan deney koşullarının şematize edilmiş hali şekil 18'de görülmektedir.



Şekil 18: MODEL II (farklı dozlarda steroid uygulamasının $A\beta_{25-35}$ toksisitesi üzerine etkisi)'in plak üzerinde şematize edilerek gösterilmesi

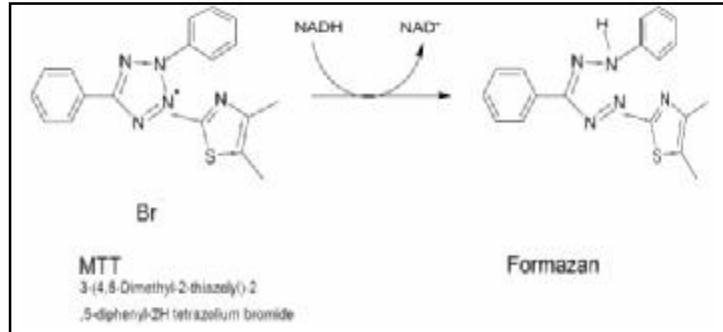
3.3.2.3. Steroid Sentez İnhibisyonunun $A\beta_{25-35}$ Toksikitesi Üzerine Etkisi:

AMG ve DCNP'nin $A\beta_{25-35}$ peptit toksisitesinde hücre canlılığı üzerine yaptığı etkileri incelemek amacıyla hücreler 96 kuyulu plaklara 2×10^4 yoğunlukta ekildi. Eş zamanlı olarak PC-12 hücrelerine 20 μ M, SHSY-5Y hücrelerine ise agregre edilmiş 40 μ M $A\beta_{25-35}$ peptit ile birlikte AMG ve DCNP 72 saat süreyle uygulandı. Ayrıca AMG ve DCNP'nin hücre canlılığına direkt etkisini de değerlendirebilmek için tek başına 0.76 mM AMG ve 1 μ M DCNP de hücrelere uygulandı. Oluşturulan deney koşullarının şematize edilmiş hali şekil 15'de görülmektedir.

3.4. YÖNTEMLER

3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) redüksiyonu yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir (Şekil 19). Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücrelerin bulunduğu ortam mor renge boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerin bulunduğu ortam ise boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır [102-104].



Şekil 19: MTT tuzunun süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşümü [105]

MTT stok solüsyonu Hazırlığı:

- Ø MTT maddesi (Sigma) PBS içinde çözülerek 5 mg/mL konsantrasyonunda stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı.
- Ø Solüsyon 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek debrisler uzaklaştırıldı. (5 mg/mL'lik stok MTT solüsyonu karanlık ortamda 4°C'de 1 ay kadar stabil kalabilmektedir)

Hücre canlılığının değerlendirileceği gün 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin tamamlanmasından bir saat önce belirlenen bazı kuyulara 100 µL TritonX-100 (son konsantrasyon %1 olacak şekilde) eklendi ve bu kuyular maksimum hücre ölümünün gerçekleştiği kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu şekilde tüm inkübasyon süreleri aynı anda sonlandırılarak tüm deney koşullarının MTT testleri aynı anda gerçekleştirildi.

Uygulama Basamakları:

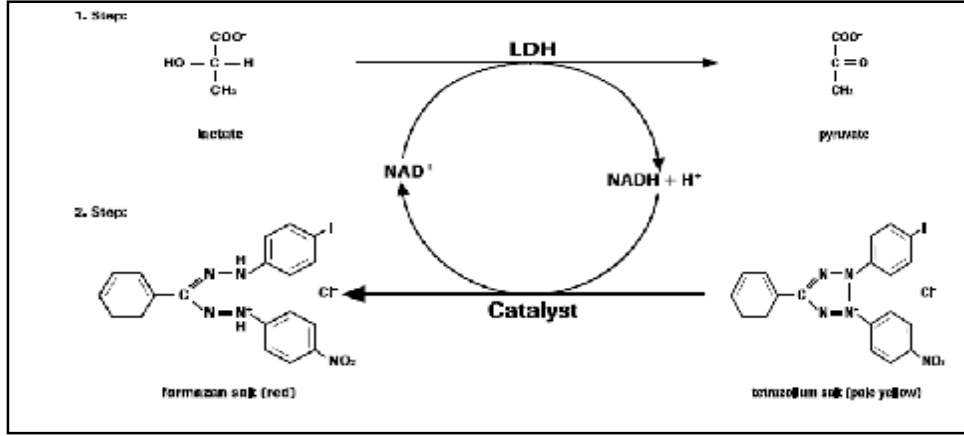
1. Hücre kültür kabı kuyularına son konsantrasyon 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT stok solüsyonundan eklendi ve MTT'nin ortama iyice karışması için 5-10 saniye el ile sallayarak karıştırıldı.
2. Plaklar üzeri alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'de %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde 3.5 saat (1-5 saat) bekletildi.
3. Kültür plağı 1250 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
4. MTT metabolizma ürünü olan formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için tüm kuyulara 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) (solubilizasyon solüsyonu) eklendi ve 37°C'de 30 dakika bekletildi.
5. 96 kuyulu hücre kültür kabının, ELİSA plak okuyucusunda 590 nm'de absorbansları okutuldu.

Hesaplama:

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Örnek Abs} - \Delta \text{Kontrol II Abs} / \Delta \text{Kontrol I Abs} - \Delta \text{Kontrol II Abs}) \times 100$$

3.4.2. LDH Salınımının Belirlenmesi (Hücre Sitotoksite Testi)

Hücre zarı bütünlüğü bozulmuş veya ölü hücrelerin oranı “Cytotoxicity Detection Kit®” kullanılarak kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sitoplazmik bir enzim olan LDH’ın hasarlı hücreden ortama salınması ve ortamdaki enzim aktivitesinin iki basamaklı ölçümüne dayanmaktadır. Birinci basamakta laktat LDH enzimi ile piruvata dönüşürken NAD^+ NADH/H^+ ’a indirgenir. İkinci basamakta kullanılan katalist (diaphorase) NADH/H^+ ’ın H/H^+ ’lerini soluk sarı renkli tetrazolium tuzuna transfer eder ve kırmızı renkli formazan ürünü oluşturur (Şekil 20). Oluşan bu ürün kolorimetrik olarak ölçülür.



Şekil 20: LDH yönteminin iki basamaklı enzimatik reaksiyonu [106]

Uygulama Basamakları:

1. Örnek olarak hücresiz süpernatant kullanılacağından deney modellerinin oluşturulduğu 96 kuyulu plak, hücreleri ortamdan tamamen uzaklaştırmak amacıyla 1250 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi.
2. 10 µL süpernatant farklı bir 96 kuyulu plağa alındı. (LDH ölçümü hemen yapılmayacak ise üst faz 2-8°C’de birkaç gün saklanabilir.)

3. Çalışma solüsyonunun "Working Solution" hazırlanması: Şişe 1 (katalist) 1mL saf su ile çözülüp hazırlandıktan sonra Şişe 2'deki boya solüsyonu ile kullanılmadan hemen önce 1:45 oranında karıştırıldı ve taze olarak kullanıldı.
4. 10 µL süpernatant içeren kuyuların üzerine 90 µL saf su eklenerek örnekler 1:10 oranında seyreltilerek çalışıldı.
5. Toplam 100 µL örneğin üzerine 100 µL çalışma solüsyonu eklendi.
6. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
7. 50 µL 1 N HCl (stop solüsyonu) eklendi.
8. 30 dakika içinde 96 kuyulu hücre kültür kabının, plak okuyucusunda 492 nm'de absorbansları okutuldu.

Hesaplama:

$$\% \text{ Sitotoksinite} = (\text{Örnek Abs} - \Delta \text{ Kontrol I Abs} / \Delta \text{ Kontrol II Abs} - \Delta \text{ Kontrol I Abs}) \times 100$$

3.4.3. Hücre İçi Steroid Ölçümünde Kullanılan Örneklerin Hazırlığı

3.4.3.1. Hücre lizatı hazırlığı ve Çekitleme Basamakları:

Hücre içi P ve PS düzeylerini analiz edebilmek için hücrelerin parçalanması ve steroidlerin serbest kalması için analiz öncesi hücre zar bütünlüğünü bozacak ve hücre içindeki bu steroidleri çekitleyip, saflaştıracak ön işlemler gereklidir. Bu işlemler aşağıda detaylandırıldığı gibi gerçekleştirildi [107-109].

Uygulama Basamakları:

1. 6 kuyulu plaklar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi, buz üzerine alındı ve işlem boyunca buz üzerinde tutuldu.
2. %1'lik AcOH/MeOH solüsyonu hazırlandı ve buz üzerinde soğumaya bırakıldı. Bu işlem sırasında tüm tüplerin soğuk olmasına dikkat edildi.
3. Kuyuların içindeki kültür ortamı tabana dokunmadan pipet ile uzaklaştırıldı.

4. Her bir kuyucuğa 2 mL soğuk %1'lik AcOH/MeOH solüsyonu eklendi ve plak yüzeyinden kazıyıcı (scraper) ile hücreler kazınarak kaldırıldı.
5. Hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine aktarıldı.
6. Plak tabanında hücre kalmadığından emin olmak amacıyla mikroskop ile kontrol edildi.
7. Hücre süspansiyonu buz üzerinde sonike edilerek hücreler parçalandı (homojenize edildi).
8. Homojenat önceden soğutulmuş olan santrifüjde 4°C'de 1500xg devirde 10 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım alındı ve ayrı bir tüpte toplandı.
10. Dipte kalan çökelti üzerine 0.5 mL %1'lik AcOH/MeOH eklenerek vortekslendi ve süspansiyon haline getirildi.
11. Önceden soğutulmuş olan santrifüjde 4°C'de 1500xg devirde 10 dakika santrifüj edildi.
12. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım alındı, daha önce ayrılıp bir tüpte toplanmış olan üst faz ile birleştirildi.
13. Toplanan üst fazlar N₂ gazı altında uçurularak kurutuldu.(Hemen kullanılmayacak örnekler -20°C'de saklandı.)
14. Aynı gün SFE işlemi ile çalışmaya devam edilecek ise özütler 500 µL fosfat (pH'sı 7.3-7.4 olan 0.05 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄) tamponunda çözülerek mikro elüsyon plağına verildi.

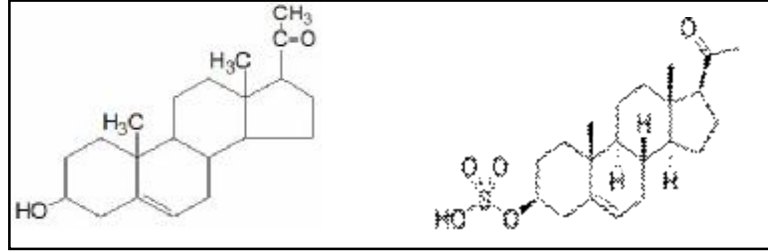
Fosfat tamponu hazırlığı:

- Ø 0.6 g NaH₂PO₄ tartıldı ve 100 mL'e saf su ile tamamlanarak 0.05 M NaH₂PO₄ hazırlandı.
- Ø 0.71 g Na₂HPO₄ tartıldı ve 100 mL'e saf su ile tamamlanarak 0.05 M Na₂HPO₄ hazırlandı.
- Ø 0.05 M NaH₂PO₄ ile 0.05 M Na₂HPO₄ solüsyonu pH metrede pH 7.3-7.4 olacak şekilde karıştırıldı.

3.4.3.2. Solid Faz Ekstraksiyon (SFE) Plağı ile saflaştırma:

Fosfat tamponu içinde çözölmüş olan örnekler ‘‘Waters Oasis HLB µElution Plate’’ kullanılarak saflaştırıldı. SFE kolonları polar ve non-polar organik bileşikleri dedekte etmek için dizayn edilmiş olup, lipofilik diviybenzene ve hidrofilik N-vinylpyrrolidone ‘nun dengeli oranda bulunduğu iki monomerdan yapılmış büyük porlu kopolimerleşmiş madde içerir. Ayırmanın temelinde, saflaştırılacak maddelerin yapısal özelliklerinin (hidrofilik-hidrofobik etkileşim) farklı oluşundan faydalanılır. Aynı zamanda bu kolonlar kullanılarak 2-15 kat artmış konsantrasyonda saf ekstrakt üretebilir.

P üçüncü karbonunda OH grubu, PS ise üçüncü karbonunda sülfat (O_3SO) grubu taşımaktadır. Bu nedenle PS; P’a göre daha hidrofilik yapıdadır (Şekil 21).



Şekil 21: Pregnenolon ve Pregnenolon sülfatın yapısı [110, 111]

Mikro elüsyon plağı kullanımı:

1. Vakum uygulayıcı (manifold) içine uygun atık kabı yerleştirildi.
2. ‘‘Oasis HLB µElution Plate’’ vakum manifolda takıldı. 10 mmHg’lık basınç uygulayacak şekilde vakum ayarlandı.
3. Plak kullanılmadan önce her bir kuyucuk (kolon) sırasıyla 1mL etilasetat, 2mL etanol, 2mL saf su ile yıkandı.
4. Atık sıvı kabındaki sıvılar boşaltıldı.
5. 500 µL fosfat tamponu içinde özönmüş olan örnekler kuyucuklara tek tek yüklendi.
6. Tamamen akmaları sağlandıktan sonra 2 mL saf su ile yıkama yapıldı, atık sıvı kabı uzaklaştırıldı ve örneklerin toplanacağı uygun toplama ependorf tüpleri yerleştirildi.
7. Her kuyucuktan 1 mL etilasetat akıtılarak PREG elüe edildi.

PS'in toplanacağı uygun toplama ependorf tüpleri yerleştirildi ve her kuyucuktan 1.5 mL etanol akıtılarak PS elüe edildi. Sonuçta elde edilen 1 mL etilasetat içinde P ve 1.5 mL etanol içindeki PS karıştırıldı. Daha sonra iki eşit hacme bölünerek P ve PS ölçümünde kullanıldı. Bunun sebebi ise yapılan ön çalışmalarda her iki steroidin azda olsa hem etilasetat hem de etanol içinde elüe edilebildiğinin gösterilmiş olmasıdır.

Yükleme ve elüe etme basamaklarında akış hızlarının 0.5 mL/dak'ı geçmemesine dikkat edildi. Diğer tüm basamaklarda akış hızı 5 mL/dak'a kadar kabul edildi.

3.4.3.3. Solvolisis (Steroidin sülfat grubunun ayrılması):

Pregnenolonun sülfat esteri olan PS'nin sülfatının koparılması pek çok farklı reaksiyon ile mümkün olmaktadır. Enzimatik olarak arilsülfataz ile monosülfat parçasının hidrolizi mümkün olabildiği gibi doymuş NaCl çözeltisi içinde H₂SO₄ ile pH'nın 1'e düşürülmesi (asit hidroliz) ile de koparılabilir [16, 112-114].

Arilsülfataz ile monosülfat parçasının hidrolizi:

1.5 mL etanol içinde elüe edilen PS örnekleri N₂ gazı altında uçurularak kurutuldu. Özütlere 10 µL arilsülfataz içeren 750 µL asetat-sodyum asetat tamponu (250 mM) içinde çözülerek 40°C'de gece boyunca inkübe edilerek sülfatın koparılması sağlandı. Ancak çalışmanın devamında aşağıda ayrıntısı verilen "asit hidroliz" yöntemi kullanıldı.

Asit hidroliz ile monosülfat parçasının koparılması:

Uygulama Basamakları:

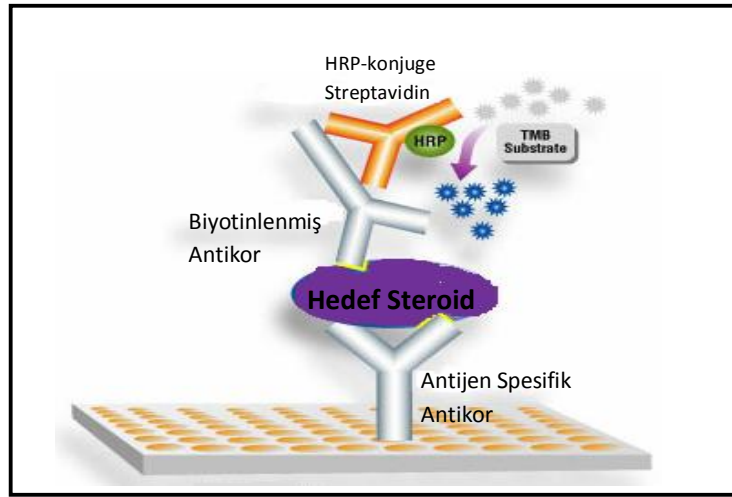
1. 1.5 mL etanol içinde elüe edilen PS örnekleri N₂ gazı altında uçurularak kurutuldu.
2. 4 mL etilasetat içinde çözülen örneklere aynı hacimde 6 M NaCl çözeltisi eklendi (doymuş NaCl çözeltisi hazırlamak için 36 g NaCl tuzu tartıldı, saf su ile 100 mL'e tamamlandı).
3. Toplam 8 mL hacmindeki örneğin pH'sı H₂SO₄ damlatılarak 1'e düşürüldü.
4. 37°C'de gece boyunca inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresinin sonunda tüp içindeki örnekler liyofilize edildi. Kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4.4. Pregnenolon Ölçümü

3.4.4.1. ELISA ile Pregnenolon Ölçümü:

BLK Pregnenolon ELISA® kiti hücre içi pregnenolonun kantitatif ölçümünde kullanıldı. Yöntemin prensibi iki basamaklı yarışmalı bağlanmaya dayanmaktadır. Mikroplak kuyuları pregnenolona karşı geliştirilmiş poliklonal antikor ile kaplıdır. Kuyulara ilave edilen örnek veya kalibratör (işaretsiz antijen) hemen ardından ilave edilen biyotin ile işaretli antijen (HRP Konjugat) ile birlikte plak yüzeyinde bulunan sınırlı sayıdaki antikorlara yapışmak için yarışmaya girer. Bağlanmadan kalan materyaller yıkama ile uzaklaştırılır. İkinci inkübasyon periyodunda ise Streptavidin- Horseradish peroksidaz ilave edilir ve bu da HRP Konjugat'a bağlanır. Yıkama basamağından sonra oluşan Antikor-Antijen-Antikor-enzim sandviğine tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenir (Şekil 22). Reaksiyon 1 M'lık sülfürik asit ilavesi ile durdurulduktan sonra renk şiddeti 450 nm' de ELISA plak okuyucusunda ölçülür. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülmüş absorbanlar ile oluşturulmuş standart eğri ile örnekteki pregnenolon miktarı ölçülür. Pregnenolon konsantrasyonu ng/mL olarak ifade edilir.

Kitin belirlemiş olduğu ölçüm aralığı: 0.054 ng/mL – 25.6 ng/mL, alt saptama sınırı 0.054 ng/mL'dir.



Şekil 22: Pregnenolon ELISA kitinin çalışma prensibi [115]

Uygulama Basamakları:

1. Kullanılacak kuyucuk sayısı dikkate alınarak uygun hacimde yıkama solüsyonu hazırlandı.

Yıkama solüsyonunun hazırlanması: Yıkama tampon konsantresi 1:10 oranında saf su ile seyreltildi.

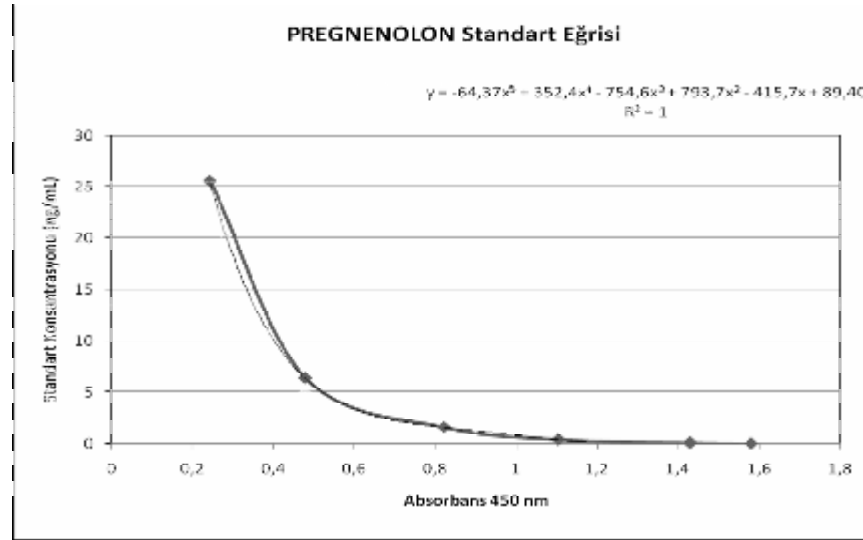
2. Çalışma solüsyonları kulanımdan hemen önce taze olarak uygun hacimde hazırlandı.

Biotin Konjugat Çalışma Solüsyonunun hazırlanması: Pregnenolon-Biotin Konjugat konsantresi 1:50 oranında biotin konjugat tamponu ile seyreltildi.

HRP Konjugat Çalışma Solüsyonunun hazırlanması: Streptavidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) Konjugat konsantresi 1:50 oranında HRP konjugat tamponu ile seyreltildi.

3. Pregnenolon ELİSA ölçümü oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Analizden önce tüm reaktif ve örneklerin oda sıcaklığına ulaşması için beklendi.
4. Örneklerin hazırlanması: Sayfa 59-62'de detaylı olarak açıklandığı gibi hücre parçalanması, ayırma (çekitleme), saflaştırma ve solvolizis basamaklarını içermektedir.
5. Önceden hazırlanan analiz şablonuna göre 50 µL kalibratör, örnek ve kontrol uygun kuyucuklara eklendi.
6. Her kuyucuğa 100 µL Biotin Konjugat çalışma solüsyonu eklendi.
7. Plağın üzeri kapatıldı, 200 rpm'de karıştırıcı üzerinde bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Plak ters çevrilerek içi boşaltıldı ve her kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.
9. Her kuyucuğa 150µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi.
10. Plağın üzeri kapatıldı, 200 rpm'de karıştırıcı üzerinde yarım saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

11. Plak ters çevrilerek içi boşaltıldı ve her kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.
12. Her kuyucuğa 150µL TMB eklendi.
13. Plağın üzeri kapatıldı, 200 rpm'de karıştırıcı üzerinde 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
14. Her kuyucuğa 50µL stop solüsyonu eklendi.
15. 20 dakika içinde ELISA plak okuyucusunda 450 nm'de her kuyucuğun absorbansı okunarak saptandı.
16. 0, 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 ve 25.6 ng/mL'lik kalibratörlerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile hazırlanan eğriye elde edilen absorbans değerleri yerleştirilerek pregnenolon konsantrasyonları saptandı (Grafik 1).



Grafik 1: Pregnenolon standart eğrisi

BLK Pregnenolon ELISA[®] kiti ile hücre içi pregnenolon ölçümü sırasında kitin performansını değerlendirmek için yaptığımız deney içi tekrarlanabilirlik çalışmasında (n=10) %CV: %2.96, deneyler arası tekrarlanabilirlik (n=8) %CV değeri ise % 16.38 bulundu.

3.4.4.2. HPLC ile Pregnenolon Ölçümü:

Pregnenolon analizi DEÜTF ARLAB laboratuvarında yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği ile gerçekleştirildi. Bilinen konsantrasyonlara karşı ölçülen piklerin altındaki alan ile oluşturulan standart eğri, örneklerdeki P miktarını belirlemede kullanıldı. P konsantrasyonu nmol/mL olarak ifade edildi.

Analiz koşulları:

Kolon: 250x4.6 mm çapında C18 kolon,

Mobil faz: %1 asetik asit içeren metanol,

Mobil faz akış hızı: 0.2 mL/dakika,

Fırın sıcaklığı: 25°C,

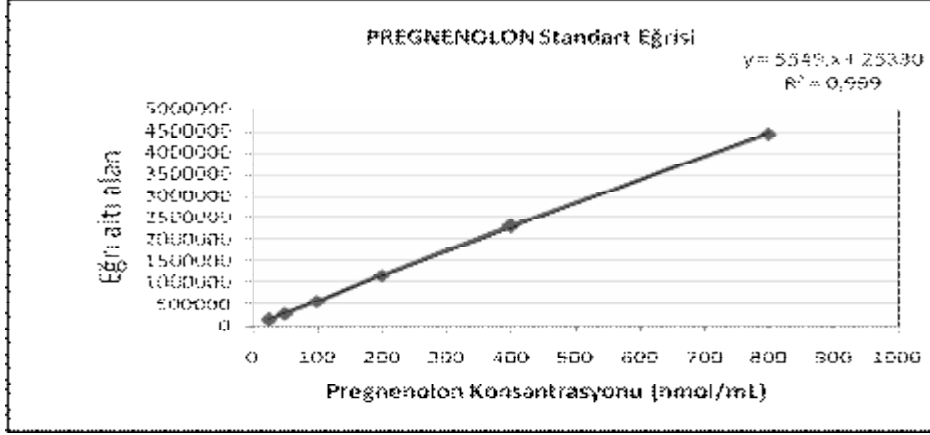
Gradyent programı: izokratik olarak ayarlandı,

Dedektör: UV-VIS dedektör, 230 nm

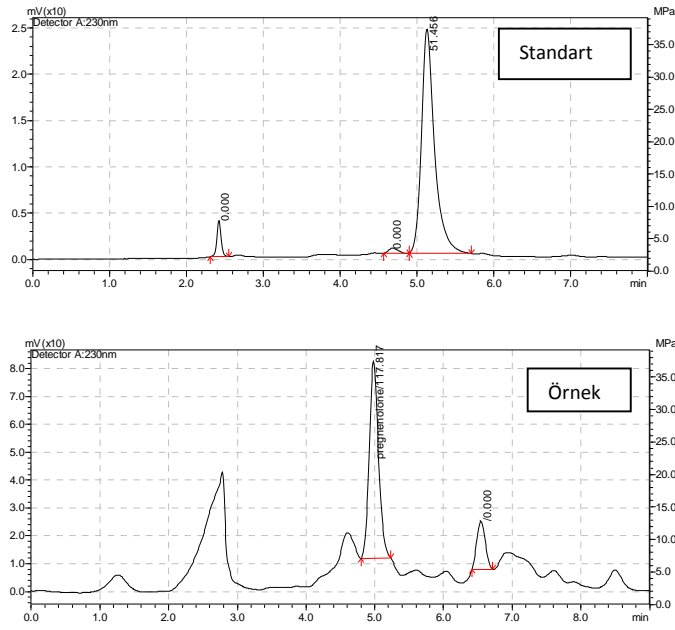
Standart için çözücü: DMSO, metanol

Örnekler 3.4.3. "Hücre İçi Steroid Ölçümünde Kullanılan Örneğin Hazırlığı" başlığı altında ayrıntılı şekilde açıklandığı gibi hazırlanıp tamamen uçurulduktan sonra HPLC cihazına enjekte edilmeden önce solvolizis uygulanmayan grup 100 µL, solvolizis uygulanan grup 3 mL metanol içinde çözüldü. Örnek hacmi 10 µL olacak şekilde kolona enjekte edildi.

25, 50, 100, 200, 400, 1000 nmol/mL'lik standart konsantrasyonlarına karşılık gelen eğri altı alan değerleri ile hazırlanan standart eğri kullanılarak örneklerin pregnenolon konsantrasyonları belirlendi (Grafik 2 ve 3).



Grafik 2: Pregnenolon standart eğrisi



Grafik 3: Pregnenolon standart ve örnek çalışması

Her iki hücre hattında HPLC yöntemi ile ölçülen P ve PS düzeyleri, ELISA ile elde edilen sonuçlarla korele bulunmuştur ($r^2=0.725$).

3.4.5. Akış Sitometri ile apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi:

“ApopNexin™ FITC Apoptosis Detection Kit” kullanılarak süspansiyon halindeki hücrelerde kantitatif erken/geç apoptoz ve nekroz tayini yapıldı.

Yöntemin prensibi; FITC ile konjüge Annexin V’in apoptotik hücrelerin hücre zarının dış yüzeyinde bulunan fosfotidil serin fosfolipidine bağlanması ve nekrotik hücrelerin zar bütünlüğünün tamamen bozulması sonucu PI boyasının DNA’ya bağlanarak floresan ışığa vermesine dayanır.

Normalde canlı hücrelerde fosfotidil serin hücre zarının iç yüzeyinde bulunur ancak apoptozun erken döneminde translokasyona uğrayarak dış yüzeye çıkar ve fagositik hücrelerin yapışması için bir sinyal oluşturur. Apoptozda meydana gelen hücre zarındaki değişikliklerden sadece biri olan bu olay erken dönemde apoptotik hücreleri kantite etmemizi sağlar. Nekrotik hücrelerin hücre zarları tamamen zarar görmüş olduğundan PI boyası hücre zarından geçip nükleik asitlere bağlanır . DNA’ları boyanan hücreler akım sitometride farklı bir dedektör ile belirlenir(Tablo 8).

Tablo 8: Canlı, erken/geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin fluoresan boya ile boyanması

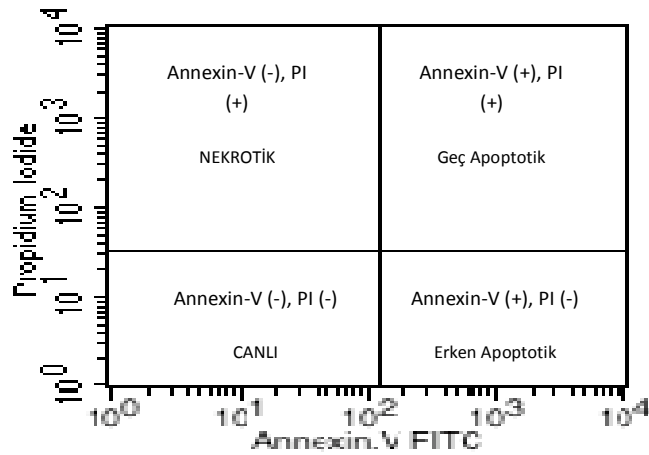
Hücre Tipi	Annexin V ile boyama	PI ile boyama
NORMAL (CANLI)	(-)	(-)
ERKEN APOPTOTİK	(+)	(-)
GEÇ APOPTOTİK	(+)	(+)
NEKROTİK	(-)	(+)

Uygulama Basamakları:

1. Hücre kültür kaplarının içindeki ortam atıldı.
2. 6 kuyulu hücre kültür kaplarının her kuyusu 1 mL steril PBS ile yıkandı.
3. Her kuyuya 400 µL önceden 37°C’ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
4. Hücre kültür kaplarının tabanındaki hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin tabandan yeterince ayrılmaması durumunda hücre kültür kapları bir dakikayı geçmeyecek kadar 37°C’de inkübatörde bekletildi.

5. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra hücre kültür kaplarına 1200 µL büyüme ortamı ilave edildi, hücreler buz üzerinde soğutulan 15 mL'lik tüplere alındı.
6. Tüpler 800 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
7. Üst faz atıldı.
8. Altta kalan çökeltiliye 5 mL soğuk PBS ilave edildi.
9. 400 xg'de 5 dakika 4°C'de santrifüjlendi.
10. Üst faz atıldı.
11. Alta kalan hücreler 200 µL soğutulmuş "1x Binding Buffer" ile tekrar süspansiyon haline getirildi.
12. Her tüpe 3 µL FITC ile kojüğe annexin ve 2 µL PI eklendi.
13. 15 dakika karanlıkta, oda ısısında inkübe edildi.
14. Tüpler tekrar buz üzerine alındı ve akış sitometrede FL1 ve FL2 filtreleri kullanılarak her örnekte 15000 hücre sayılacak şekilde okuma yapıldı.

Hesaplama: Hücreler, her bir hücrenin Annexin V ve PI ile boyanmasına göre diyagrama yerleştirilir (Şekil 23). Annexin V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece Annexin V sinyalinin algılandığı hücreler erken apoptotik, hem Annexin V hem de PI sinyalinin algılandığı hücreler geç apoptotik ve sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik olarak değerlendirildi. Diyagramdaki her bir bölgeye düşen hücre sayısının sayılan toplam hücre sayısına oranından yüzde değerler hesaplandı.



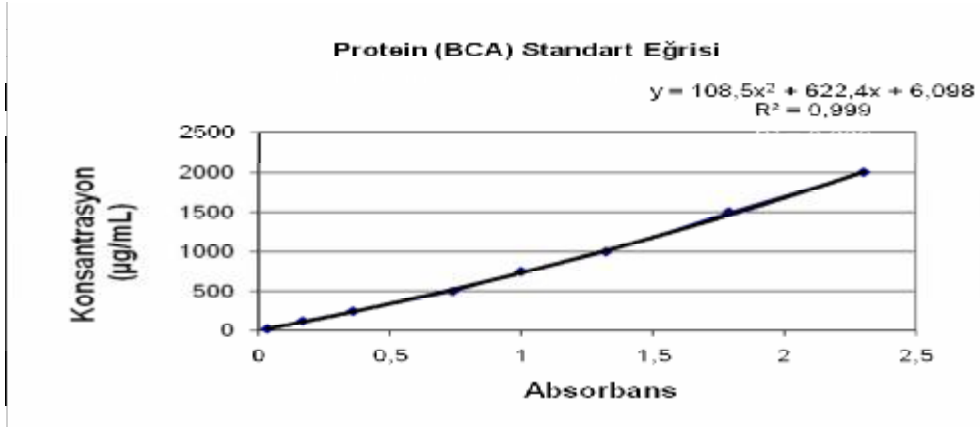
Şekil 23: Apoptoz ve nekroz belirlenmesinde akış sitometri diyagramı

3.4.6. Protein Tayini:

“Pierce BCA kiti” kullanılarak total protein konsantrasyonu Bisinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile kolorimetrik olarak saptandı. Yöntemin prensibi alkali ortamda protein tarafından Cu^{+2} iyonunun Cu^{+1} iyonuna indirgenmesine (Biüret reaksiyonu) ve bisinkoninik asit içeren tek bir reaktif kullanarak Cu^{+1} 'in renk değişiminin ölçülmesine dayanmaktadır.

Uygulama Basamakları:

1. Standart hazırlanması: Protein ölçümü için standart olarak 2 mg/mL konsantrasyonda olan sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. Seri dilüsyon ile 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda standart hazırlandı. Dokuzuncu tüpe kör olarak saf su eklendi.
2. Çalışma reaktifinin “Working Reagent” hazırlanması: BCA A Reaktifi (bisinkoninik asit içerir) ve BCA B Reaktifi (%4 bakır sülfat içerir) 50:1 oranında karıştırıldı.
3. Ölçümlerde düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı Her bir kuyucuğa 25 μL standart veya örnek eklendi.
4. Her kuyucuğa 200 μL “Working Reagent” eklendi.
5. 30 sn karıştırıcıda karıştırıldı. Üzeri kapatıldıktan sonra 30 dakika 37°C 'de inkübe edildi.
6. Plağın oda sıcaklığına gelmesinin ardından absorbanslar 562 nm'de ELISA plak okuyucusunda okundu.
7. Standart eğrisi hazırlandıktan sonra her örneğin içerdiği protein miktarı belirlendi (Grafik 4).



Grafik 4: Protein standart eğrisi

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gruplar Mann-Whitney U testi ile kıyaslandı. p değeri 0.05'in altında olanlar anlamlı kabul edildi. Oluşturulan tüm deney koşulları her iki hücre hattında kendi içinde üçer kez ve farklı zamanlarda en az 3 kez çalışıldı ve sonuçlar ortalama±S.E.M olarak verildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR

4.1. MODEL I

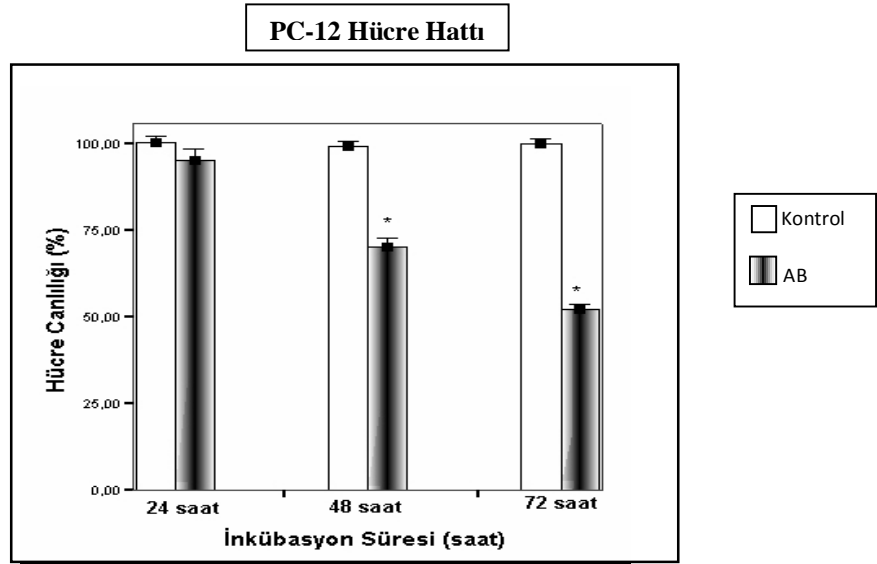
4.1.1. A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesinin oluşturulması:

PC-12 hücrelerine 24 saat süreyle 20 μ M A β ₂₅₋₃₅ peptidi uygulandığında MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirme sırasında hücre canlılığında kontrole kıyasla azalma olsada bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak 48 ve 72 saat boyunca 20 μ M A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile muamele edilen PC-12 hücrelerinin canlılıkları kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (sırasıyla p=0.001 ve p=0.000) (Şekil 24 A).

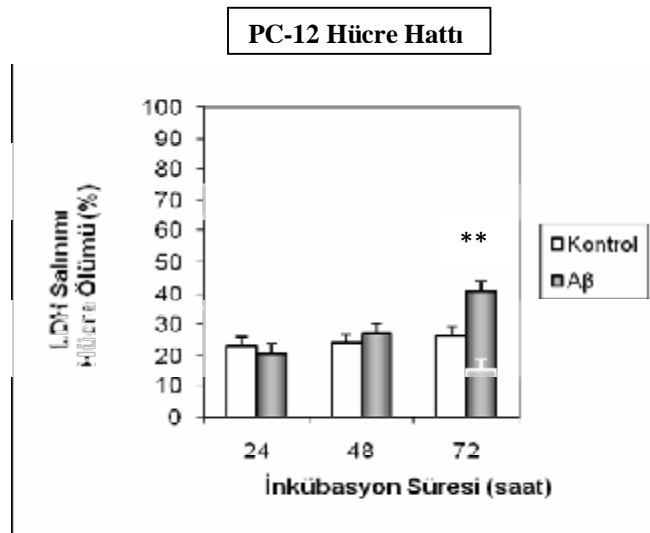
Bununla birlikte PC-12 hücrelerinde LDH salınımı ile değerlendirme yapıldığında ise A β ₂₅₋₃₅ 'nın anlamlı hücre ölümü artışını ancak 72 saatlik inkübasyonun sonunda ortaya çıkardığı gözlemlendi (p=0.017) (Şekil 24 B).

SHSY-5Y hücrelerine 72 saat boyunca 37°C'de inkübe edilerek agregasyonu sağlanan 40 μ M A β ₂₅₋₃₅ ilave edilmesinin 24. saatin sonunda hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı azalma yaratmadığı gözlemlendi (MTT redüksiyonu yöntemi ile). SHSY-5Y hücrelerinin canlılıkları ancak hücreler 48 ve 72 saat süreyle A β ₂₅₋₃₅ peptidine maruz bırakıldığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla p=0.003 ve p=0.000) (Şekil 25).

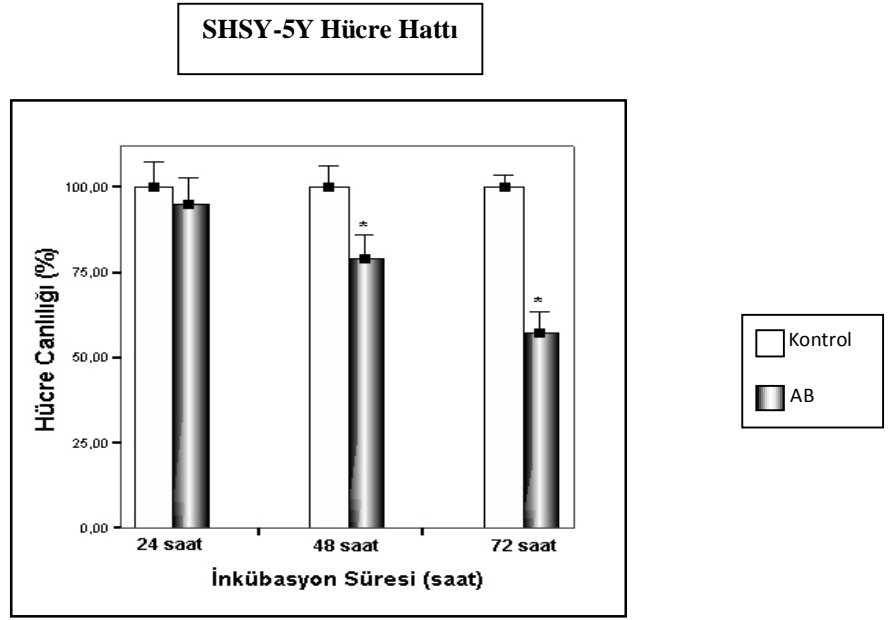
Ters-faz ışık mikroskobu ile her iki hücre hattı 72. saatin sonunda A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesi açısından değerlendirildiğinde hücre membran yapılarında bozulma, sitoplazmik granülasyon artışı gözlemlendi.



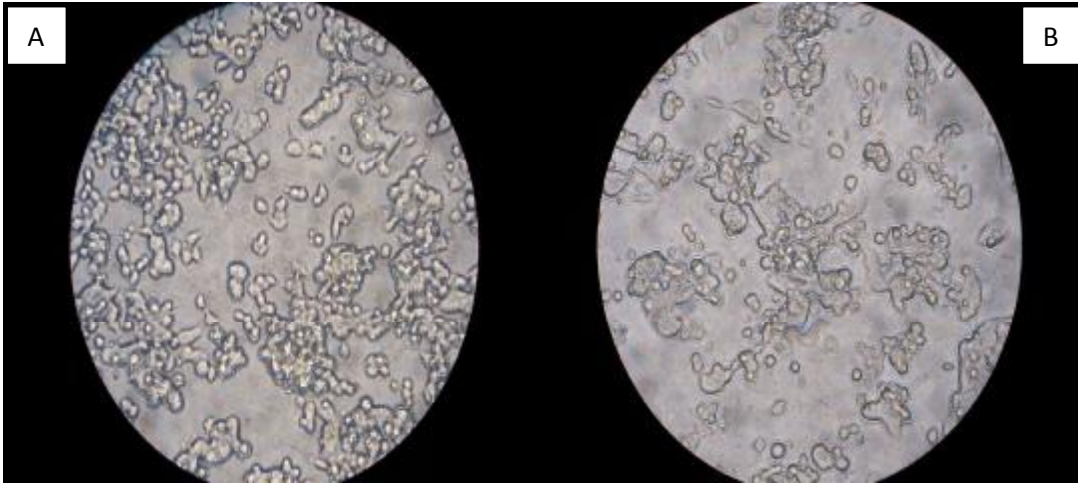
Şekil 24 A: 20 μ M $A\beta_{25-35}$ muamelesinin 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda PC-12 hücre canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. (* $p < 0.005$) (MTT redüksiyon sonuçları kontrol hücre canlılıklarının (sadece %1.5 serum içeren ortamlar ile muamele edilen hücreler) yüzde oranı olarak verilmiştir.)



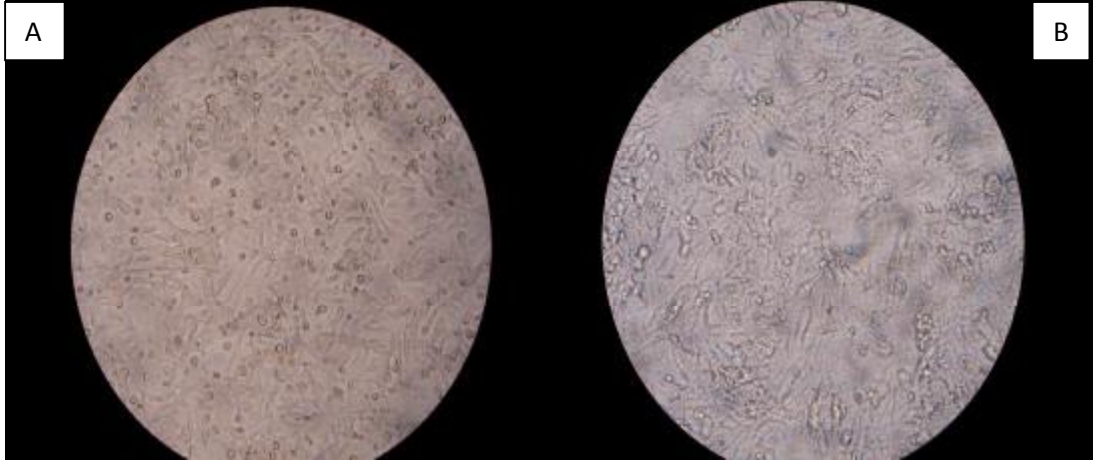
Şekil 24 B: $A\beta_{25-35}$ peptidinin PC-12 hücre canlılığına uygulama süresine bağlı etkisinin LDH salınımı yöntemi ile değerlendirilmesi. (** $p < 0.05$) (LDH salınımı sonuçları en fazla LDH salınımı yapan kontrol II grubunun (TritonX-100 ile muamele edilen hücreler) yüzde oranı olarak verilmiştir.)



Şekil 25: Agrege 40 μ M $A\beta_{25-35}$ peptidi uygulamasının 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda SHSY-5Y hücrelerinin canlılığına etkisinin MTT redüksiyonu yöntemi ile değerlendirilmesi. * $p < 0.005$



Resim 3: A. PC12 hücrelerinin ters faz ışık mikroskobundaki görüntüsü (x20) B. 72 saat süreyle $A\beta_{25-35}$ peptidine maruz kalmış PC-12 hücreleri



Resim 4: A. SHSY-5Y hücrelerinin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüsü (x20) B. 72 saat süreyle A β_{25-35} peptidine maruz kalmış SHSY-5Y hücreleri

4.1.2. A β_{25-35} peptit toksisitesinin steroid sentezine etkisi:

72 saat boyunca 20/40 μ M A β_{25-35} ile muamele edilen PC-12 ve SHSY-5Y hücrelerinde steroid düzeylerindeki değişim ELISA ve HPLC yöntemleri ile değerlendirildi. A β_{25-35} peptit uygulaması sonucu her iki hücre hattında hücre içi pregnenolon (P) düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış ($p < 0.05$), pregnenolon sülfat (PS) düzeyleri ise A β_{25-35} uygulanan hücre grubunda kontrole göre azalma eğilimi gösterdi (ELISA için Şekil 26, 27, HPLC için Şekil 28, 29).

ELISA yöntemi ile belirlenen steroid düzeyleri ng/mg protein olarak verildi. HPLC yöntemi ile belirlenen steroid düzeyleri ise nmol/mL olarak verildi.(Çalışma sırasında HPLC örneklerinin protein analizi yapılamamıştır.)

4.1.3. Steroid sentez inhibisyonunun hücre içi P, PS düzeylerine etkisi:

Steroid sentez inhibitörlerinden aminoglutetimidin (AMG) (kolesterolden P'e dönüşümü sağlayan P450_{scc} enziminin inhibitörü) ve 2,4-dikloro-6-nitrofenol'ün (DCNP) (P'nin PS'e dönüşümünü inhibe eder) P ve PS düzeyi üzerine etkileri de her iki hücre hattı için incelendi.

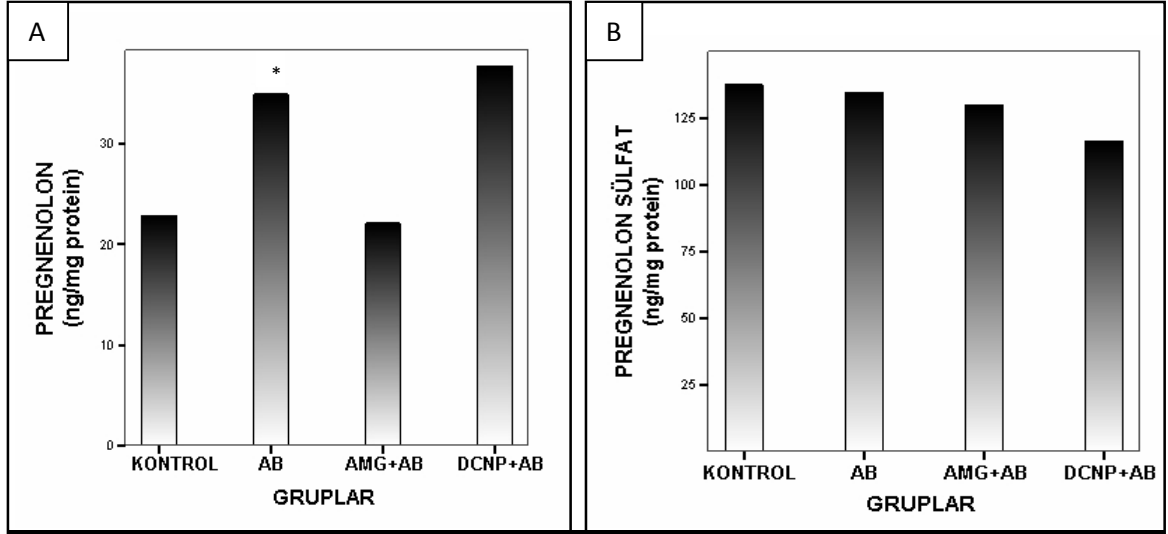
ELISA yöntemi ile belirlenen steroid düzeyleri değerlendirildiğinde A β ile birlikte AMG uygulamasının her iki hücre hattında P düzeylerini azalttığı, PS düzeylerini azaltma eğiliminde olduğu gözlemlendi.

A β ile birlikte DCNP verilen gruplarda P düzeyleri her iki hücre hattında hem kontrol hem de sadece A β uygulanan gruplara göre artma, PS düzeyleri ise azalma eğilimi gösterdi (Şekil 26, 27).

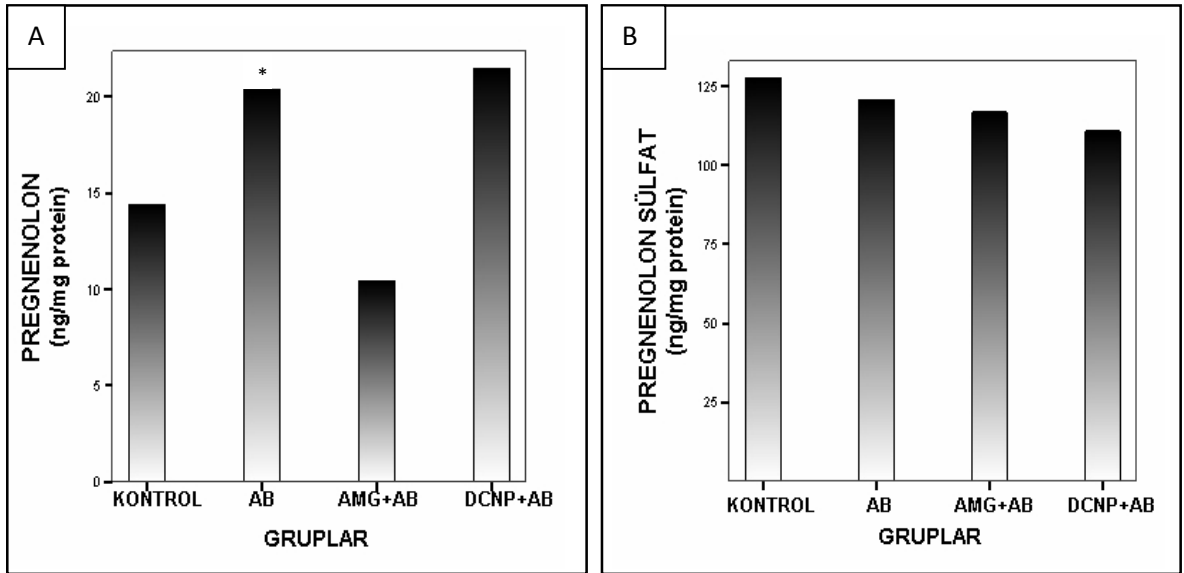
HPLC yöntemi ile elde edilen steroid düzeyleri değerlendirildiğinde A β ile birlikte AMG uygulamasının her iki hücre hattında P ve PS düzeylerini azalttığı gözlemlendi.

A β ile birlikte DCNP verilen gruplarda P düzeyleri her iki hücre hattında artma eğilimi, PS düzeyleri ise hem kontrol hem de sadece A β uygulanan gruplara göre azalma gösterdi.

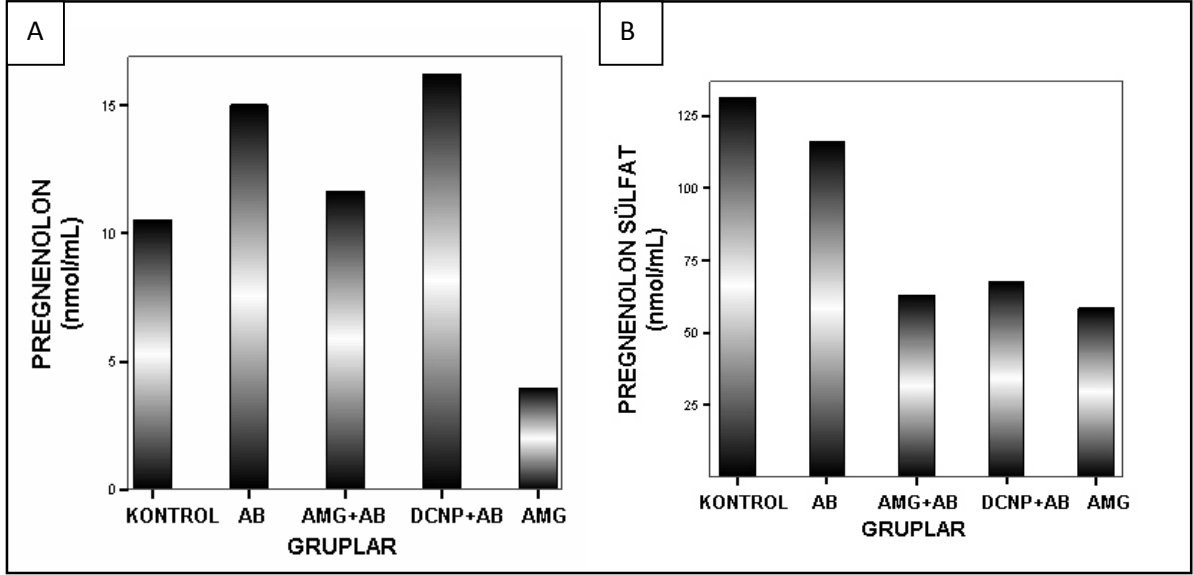
Bununla birlikte tek başına AMG uygulamasının da her iki hücre hattında hem kontrol hem de A β uygulanan gruplara göre steroid düzeylerini azalttığı gösterildi (Şekil 28, 29).



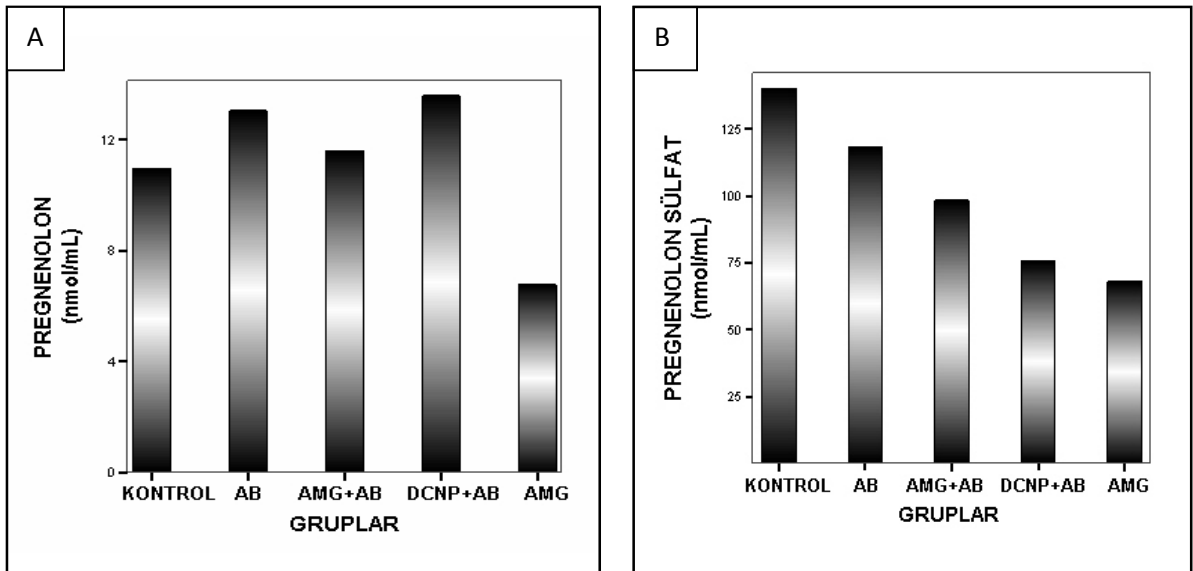
Şekil 26: $A\beta_{25-35}$ peptidin ve steroid sentez inhibitörlerinin PC-12 hücrelerinde hücre içi steroid düzeylerinde ortaya çıkardığı değişimin ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi. **A.** Pregnenolon (P) düzeyleri * $p<0.05$ **B.** Pregnenolon sülfat (PS) düzeyleri



Şekil 27: $A\beta_{25-35}$ peptidin ve steroid sentez inhibitörlerinin SHSY-5Y hücrelerinde hücre içi steroid düzeylerinde ortaya çıkardığı değişimin ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi. **A.** Pregnenolon (P) düzeyleri * $p<0.05$ **B.** Pregnenolon sülfat (PS) düzeyleri



Şekil 28: $A\beta_{25-35}$ peptidinin ve steroid sentez inhibitörlerinin hücre içi steroid düzeylerine etkisinin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi (PC-12 hücre hattı). **A.** Pregnenolon düzeyleri **B.** Pregnenolon sülfat düzeyleri

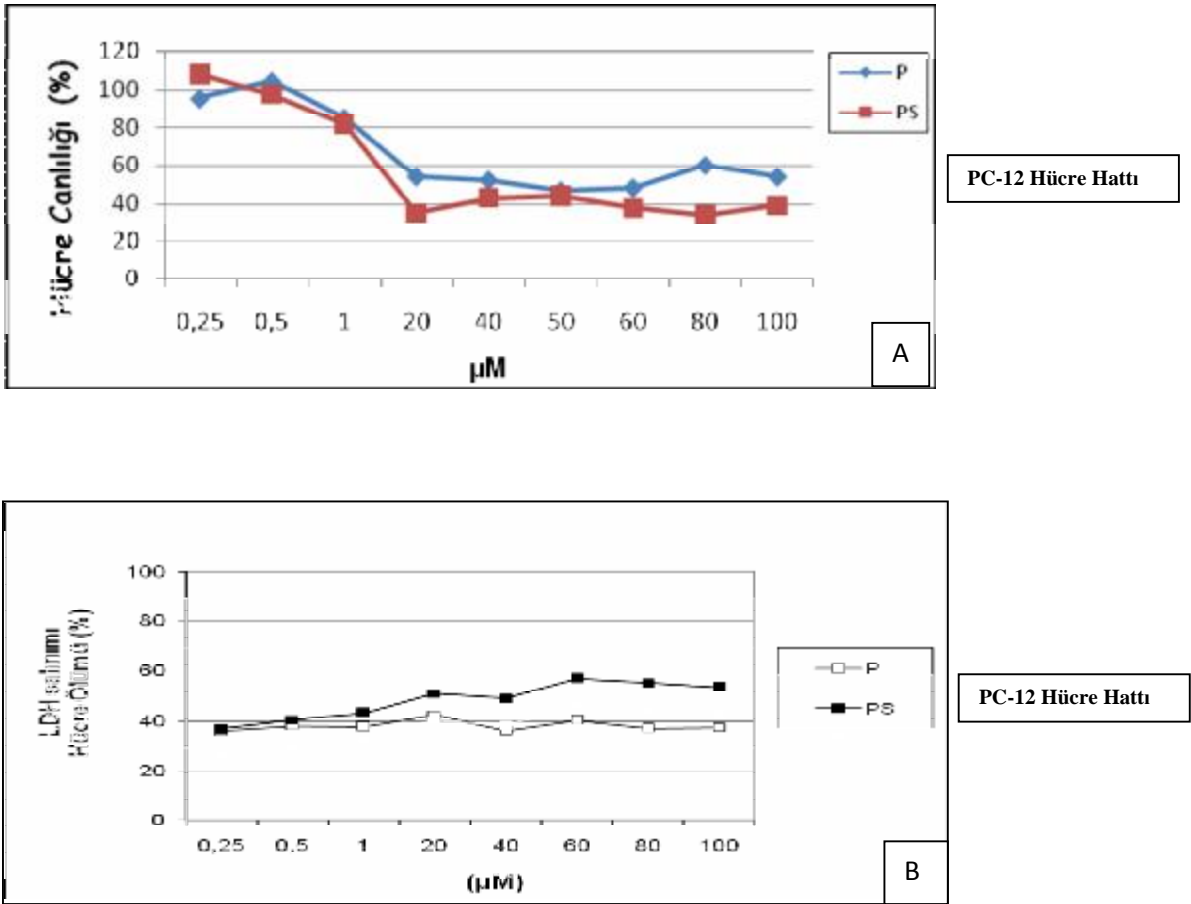


Şekil 29: $A\beta_{25-35}$ peptidinin ve steroid sentez inhibitörlerinin hücre içi steroid düzeylerine etkisinin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi (SHSY-5Y hücre hattı). **A.** Pregnenolon düzeyleri **B.** Pregnenolon sülfat düzeyleri

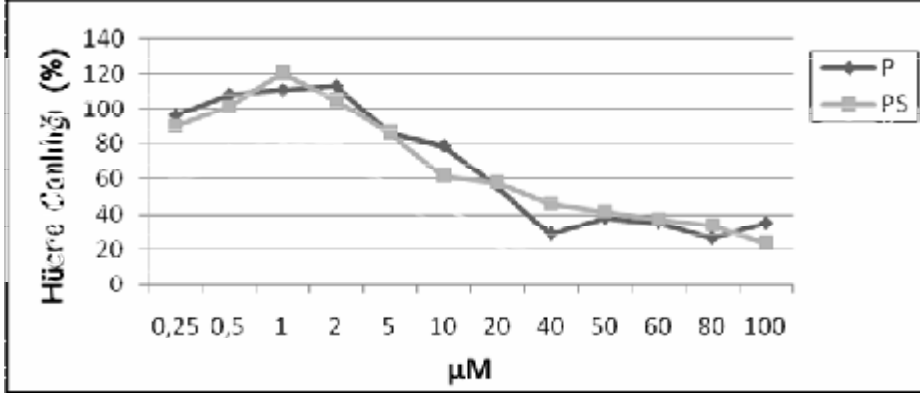
4.2. MODEL II

4.2.1. Steroidlerin hücre canlılığına etkisi:

Her iki hücre hattına 0.25-100 μM arasında değişen konsantrasyonlarda pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat (PS) 72 saat süreyle uygulandı ve hücre canlılıklarındaki değişim MTT redüksiyon yöntemi ve PC-12 hücrelerinde ayrıca LDH salınımı ile değerlendirildi (Şekil 30, 31).



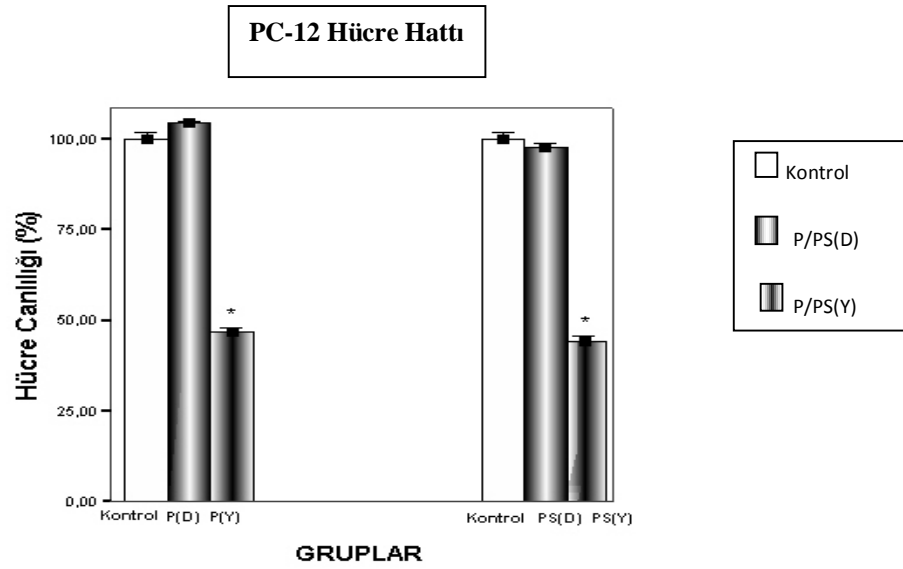
Şekil 30: PC-12 hücrelerinde pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat'ın (PS) doza bağlı etkilerinin **A.** MTT redüksiyonu **B.** LDH salınımı ile 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda değerlendirilmesi.



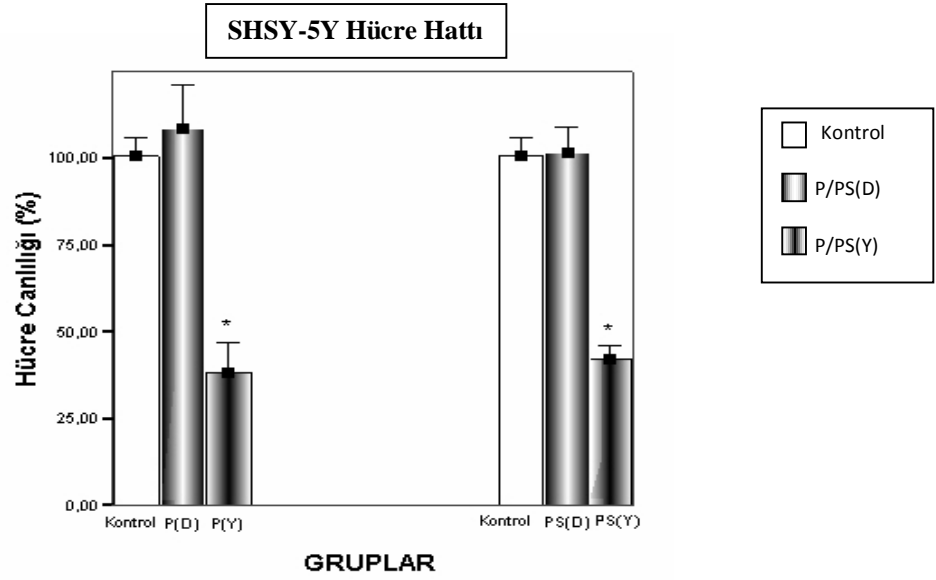
SHSY-5Y Hücre Hattı

Şekil 31: SHSY-5Y hücrelerinde pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat'ın (PS) doza bağlı etkilerinin 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda değerlendirilmesi

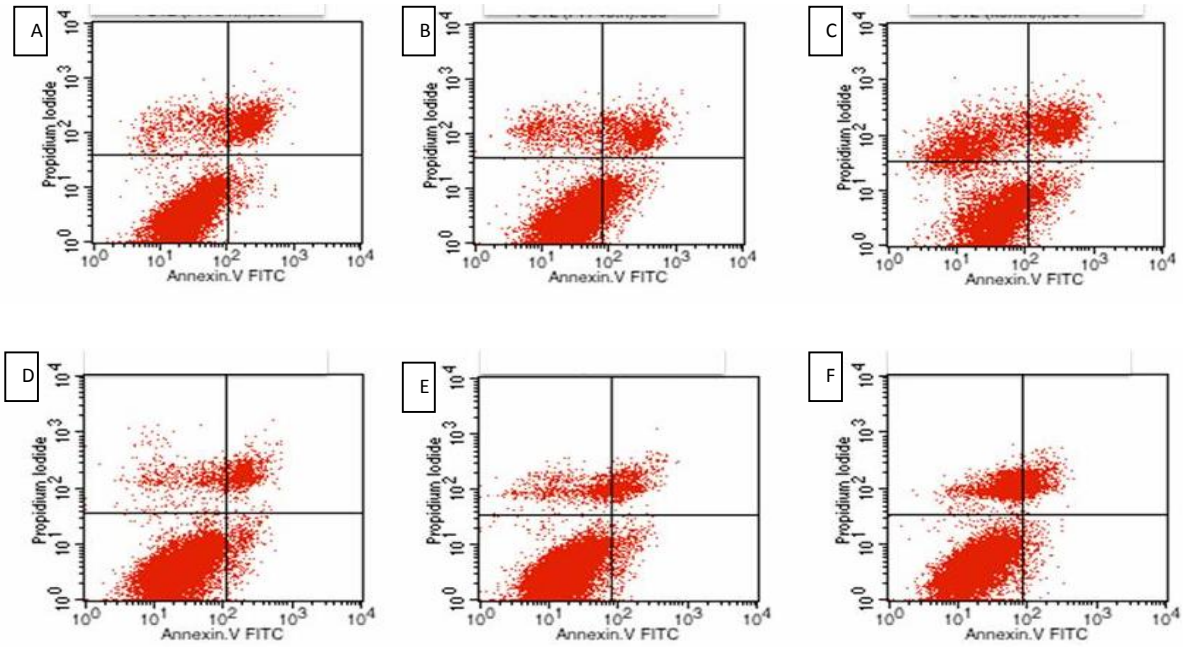
0.5 μM gibi düşük dozda P ve PS uygulanan hücrelerin canlılığında anlamlı değişiklik gözlenmedi. Ancak 50 μM gibi yüksek dozda steroid ile muamele edilen grubun hücre canlılığında anlamlı azalma gözlemlendi (P ve PS için sırasıyla PC-12 hücrelerinde; p=0.000, p=0.000 ve SHSY-5Y hücrelerinde; p=0.001, p=0.000) (Şekil 32, 33).



Şekil 32: 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat'ın (PS) düşük ve yüksek dozlarının PC-12 hücre hattında hücre canlılığına etkilerinin MTT redüksiyonu ile değerlendirilmesi. P(D): 0.5 μM, P(Y):50 μM, PS(D): 0.5 μM, PS(Y):50 μM konsantrasyonda steroid uygulanan hücreler. *p<0.005



Şekil 33: 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda düşük ve yüksek doz P ve PS'nin SHSY-5Y hücre hattında hücre canlılığına etkilerinin MTT redüksiyonu ile değerlendirilmesi. P(D): 0.5 μ M, P(Y):50 μ M, PS(D): 0.5 μ M, PS(Y):50 μ M konsantrasyonda steroid uygulanan hücreler. *p<0.005



Şekil 34: Akış sitometresinden elde edilen hücre dağılımları. A PC-12 (kontrol), B 0.5 μ M P C 50 μ M P, D SHSY-5Y (kontrol), E 0.5 μ M P, F 50 μ M P ile 48 saat muamele edilen hücreler.

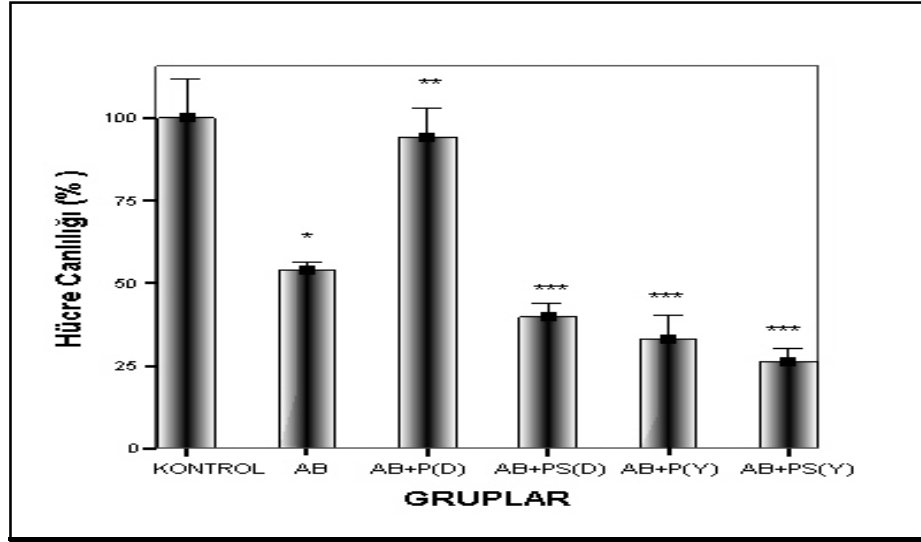
4.2.2. Steroidlerin A β ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesine etkisi:

Her iki hücre hattına 72 saat süreyle A β ₂₅₋₃₅ peptidi ve A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile birlikte eş zamanlı olarak düşük ve yüksek dozlarda pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat (PS) uygulandı.

PC-12 hücrelerine tek başına 20 μ M A β verildiğinde hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı azalma gözlemlendi (p=0.000). A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile eş zamanlı olarak 0.5 μ M P uygulanan hücrelerin [A β +P(D)] canlılıkları sadece A β uygulanmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (p=0.001). Diğer yandan A β ile birlikte uygulanan 0.5 μ M PS, 50 μ M P ve 50 μ M PS hücrelerin [A β +PS(D), A β +P(Y) ve A β +PS(Y)] canlılıklarında sadece A β verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden oldu (sırasıyla p=0.006, p=0.018, p=0.005) (Şekil 35).

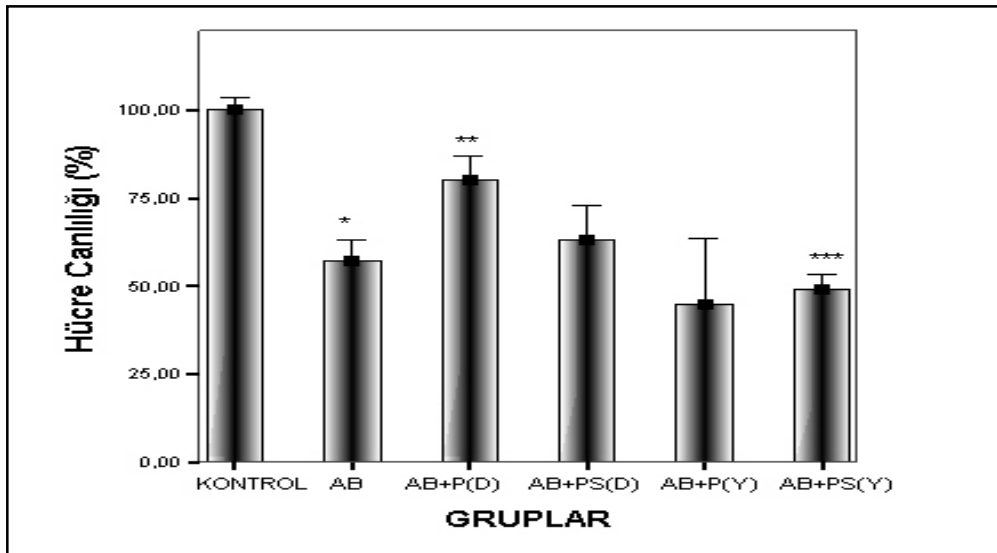
SHSY-5Y hücrelerine 72 saat süreyle 40 μ M agregat A β ₂₅₋₃₅ uygulanarak istatistiksel olarak anlamlı toksisite oluşturuldu (p=0.000). A β ile eş zamanlı 0.5 μ M P uygulanan grupta [A β +P(D)] hücre canlılıkları tek başına A β uygulanmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (p=0.002). 0.5 μ M PS ve 50 μ M P A β ile birlikte [A β +PS(D), A β +P(Y)] 72 saat boyunca hücrelere uygulandığında ise hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Bunun yanında A β ile birlikte 50 μ M PS ile muamele edilen [A β +PS(Y)] hücrelerin canlılıkları tek başına A β uygulanmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (p=0.023) (Şekil 36).

PC-12 Hücre Hattı



Şekil 35: Farklı dozlarda P ve PS uygulamasının $A\beta_{25-35}$ toksisitesi üzerine etkisi. $AB+P/PS(D)$: 72 saat boyunca $20 \mu M$ $A\beta_{25-35}$ ile birlikte $0.5 \mu M$ steroid uygulanan hücreler. $AB+P/PS(Y)$: 72 saat boyunca $20 \mu M$ $A\beta_{25-35}$ ile $50 \mu M$ steroid uygulanan hücreler. * $p < 0.005$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.05$

SHSY-5Y Hücre Hattı

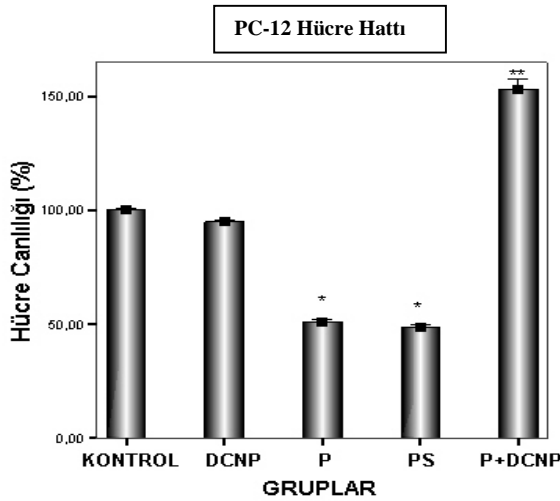


Şekil 36: Farklı dozlarda pregnenolon (P) ve pregnenolon sülfat (PS) uygulamasının $A\beta_{25-35}$ toksisitesi üzerine etkisi. $AB+P/PS(D)$: 72 saat boyunca $40 \mu M$ agreste $A\beta_{25-35}$ ve $0.5 \mu M$ steroid uygulanan hücreler. $AB+P/PS(Y)$: 72 saat boyunca $40 \mu M$ agreste $A\beta_{25-35}$ ile birlikte $50 \mu M$ steroid uygulanan hücreler. * $p < 0.005$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.05$

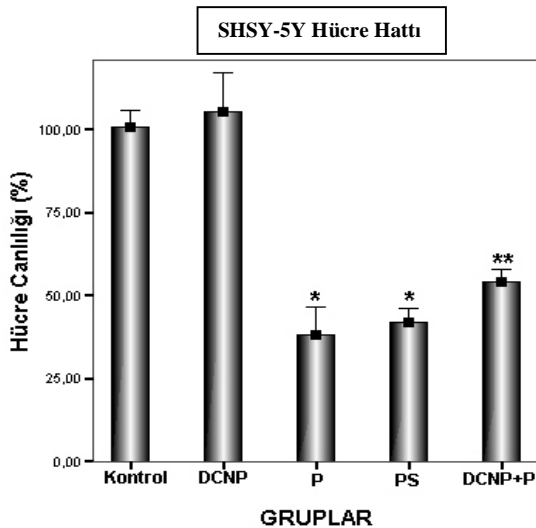
4.2.3. Steroid sentez inhibisyonunun hücre canlılığına etkisi:

P'nin PS'e dönüşümünü katalizleyen sülfotransferaz enziminin inhibitörü 2,4-dikloro-6-nitrofenol'ün (DCNP) hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. 50 µM P veya PS ile her iki hücre hattında anlamlı hücre canlılığı azalması önceki bölümde gösterilmişti (P ve PS için sırasıyla PC-12 hücrelerinde; p=0.000, p=0.000 ve SHSY-5Y hücrelerinde; p=0.001, p=0.000).

50 µM P ile eş zamanlı olarak 1µM DCNP uygulamasının her iki hücre hattında hücre canlılığını sadece 50µM P ile muamele edilen gruba göre anlamlı arttırdığı gözlemlendi (PC-12 hücreleri için p=0.000 ve SHSY-5Y hücreleri için p=0.005)



Şekil 37: DCNP ilave edilmesinin 72 saat boyunca P (50µM) ile muamele edilen hücrelerin canlılığı üzerinde oluşturduğu değişimin değerlendirilmesi. 72 saat boyunca 50µM P veya PS ile muamele edilen PC-12 hücrelerinin canlılığı anlamlı derecede azaldı *p<0.005. 1µM DCNP uygulaması P(Y) grubuna göre canlılığı anlamlı arttırdı **p<0.05



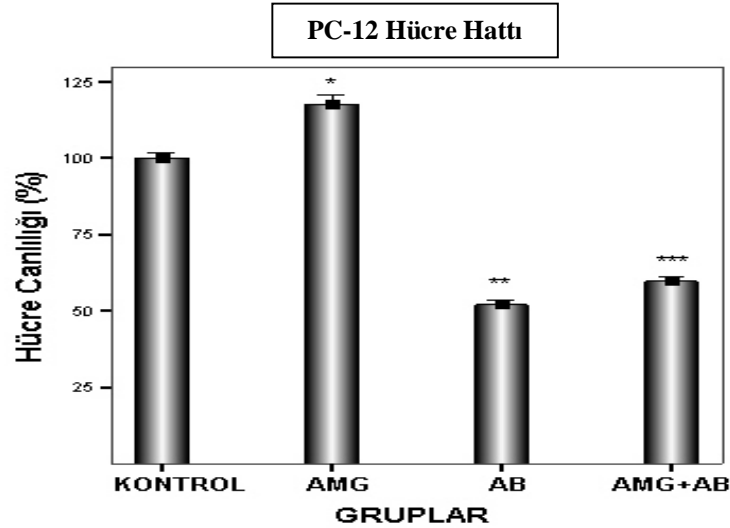
Şekil 38: DCNP ilave edilmesinin P(50µM) ile 72 saat muamele edilen hücrelerin canlılığında yarattığı değişimin değerlendirilmesi. 50µM P veya PS ile 72 saat muamele edilen SHSY-5Y hücrelerinin canlılığı anlamlı derecede azaldı *p<0.005. 1µM DCNP uygulaması P(H) grubuna göre canlılığı anlamlı arttırdı **p<0.05

4.2.4. Steroid sentez inhibisyonunun $A\beta_{25-35}$ peptit toksisitesi üzerine etkisi:

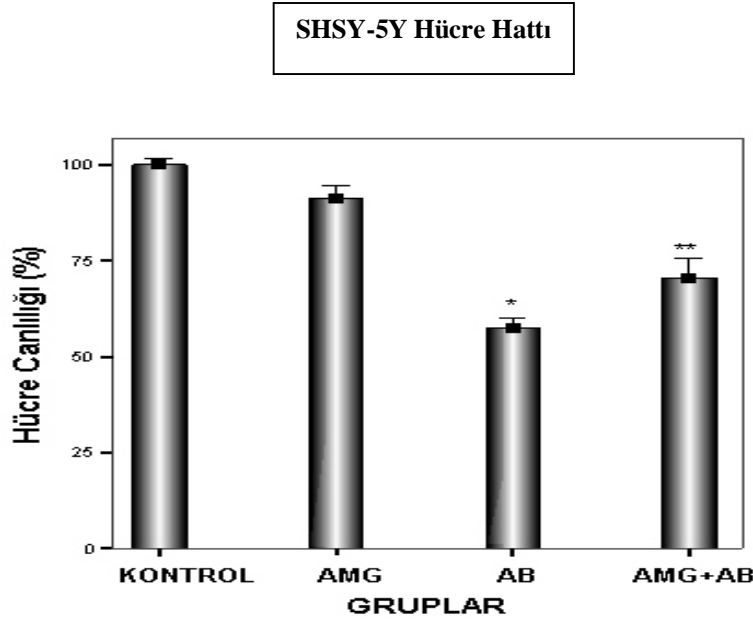
Kolesterolden P'e dönüşümü sağlayan P450_{scc} enziminin inhibitörü aminoglutetimidin (AMG) $A\beta_{25-35}$ peptit toksisitesinde hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. Her iki hücre hattında 72 saat süreyle $A\beta_{25-35}$ peptidi ile birlikte 0.76 mM AMG uygulamasının hücre canlılıklarında sadece $A\beta$ uygulanan gruba göre anlamlı artışa neden olduğu gözlemlendi.

PC-12 hücrelerine 72 saat süreyle $A\beta_{25-35}$ peptidi uygulaması ile oluşturulan anlamlı toksisitenin ($p=0.000$), $A\beta_{25-35}$ peptidi ile birlikte 0.76 mM AMG uygulaması ile anlamlı azaldığı gözlemlendi ($p=0.024$).

SHSY-5Y hücrelerinde de 72. saatin sonunda 40 μ M $A\beta_{25-35}$ peptidi ile kontrole kıyasla anlamlı ($p=0.000$) toksisite oluşturulduktan sonra $A\beta$ ile birlikte 0.76 mM AMG uygulamasının da hücre canlılığını anlamlı arttırdığı gözlemlendi ($p=0.037$).



Şekil 39: 0.76 mM AMG ilave edilmesinin 72. saatin sonunda PC-12 hücre hattında hücrelerin canlılığına ve $A\beta_{25-35}$ peptidinin oluşturduğu toksisite üzerine etkilerinin değerlendirilmesi. *Kontrole göre hücre canlılığında anlamlı artış $p<0.005$, ** Kontrole göre hücre canlılığında anlamlı azalma $p<0.001$, *** $A\beta$ grubuna göre anlamlı artış $p<0.05$



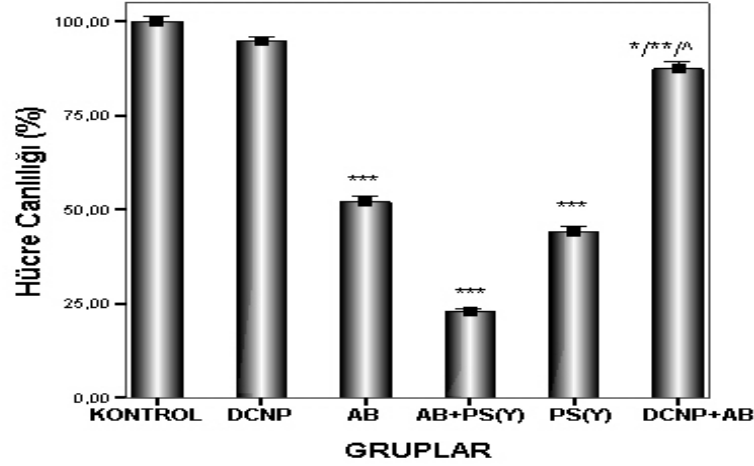
Şekil 40: 0.76 mM AMG ilave edilmesinin 72. saatin sonunda SHSY-5Y hücre hattında hücrelerin canlılığına ve $A\beta_{25-35}$ peptidinin oluşturduğu toksisite üzerine etkilerinin değerlendirilmesi*Kontrole göre hücre canlılığında anlamlı azalma $p<0.001$, ** $A\beta$ grubuna göre anlamlı hücre canlılığı artışı $p<0.05$

Aynı zamanda P'nin PS'e dönüşümünü inhibe eden 2,4-dikloro-6-nitrofenol'ün (DCNP) de $A\beta_{25-35}$ peptit toksisitesinde hücre canlılığı üzerine etkileri her iki hücre hattında incelendi. 72 saat süreyle $A\beta_{25-35}$ peptidi ile birlikte $1\mu\text{M}$ DCNP uygulamasının hücre canlılıklarında sadece $A\beta$, $50\mu\text{M}$ PS veya $A\beta$ ile birlikte yüksek doz PS uygulanan gruplara göre anlamlı artışa neden olduğu gösterildi.

PC12 hücrelerine 72 saat süreyle $A\beta_{25-35}$ peptidi, $A\beta$ +PS(Y) veya PS(Y) uygulanması sonucu her üç grupta kontrole kıyasla ortaya çıkan hücre canlılıklarında anlamlı azalma $1\mu\text{M}$ DCNP uygulaması ile tersine döndürüldü. $A\beta$ ile birlikte $1\mu\text{M}$ DCNP uygulaması hücre canlılıklarını bu üç gruba göre anlamlı arttırdı. Sırasıyla $p=0.011$, $p=0.05$, $p=0.02$

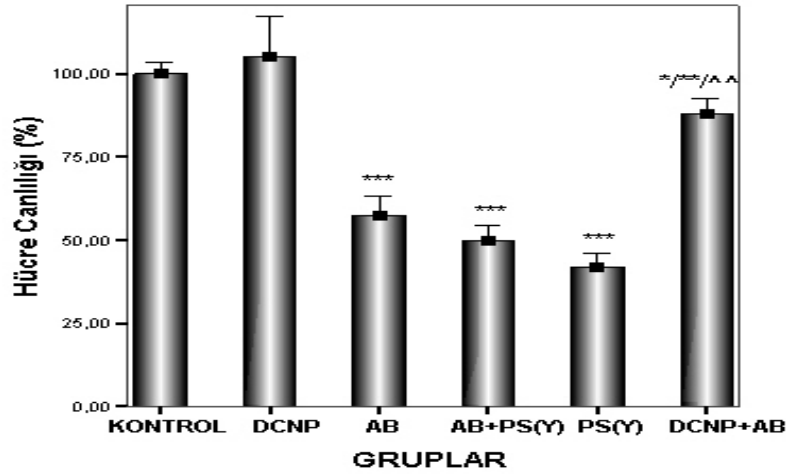
SHSY-5Y hücrelerinde de benzer sonuç elde edildi. $A\beta$ ile birlikte $1\mu\text{M}$ DCNP uygulaması hücre canlılıklarını $A\beta_{25-35}$ peptidi, $A\beta$ +PS(Y) veya PS(Y) uygulanan gruplara göre anlamlı arttırdı. Sırasıyla $p=0.002$, $p=0.004$, $p=0.001$

PC-12 HÜCRE HATTI



Şekil 41: 1 μ M DCNP ilave edilmesinin 72. saatin sonunda PC-12 hücre hattında hücrelerin canlılığına ve A β ₂₅₋₃₅ peptidinin oluşturduğu toksisite üzerine etkilerinin değerlendirilmesi. *** Kontrole göre hücre canlılığında anlamlı azalma p<0.05, * A β grubuna, ** A β +PS(Y) grubuna ve ^ PS(Y) grubuna göre anlamlı hücre canlılığı artışı p<0.05

SHSY-5Y HÜCRE HATTI



Şekil 42: 1 μ M DCNP ilave edilmesinin 72. saatin sonunda SHSY-5Y hücre hattında hücrelerin canlılığına ve A β ₂₅₋₃₅ peptidinin oluşturduğu toksisite üzerine etkilerinin değerlendirilmesi. *** Kontrole göre hücre canlılığında anlamlı azalma p<0.05, * A β grubuna, ** A β +PS(Y) grubuna ve ^^ PS(Y) grubuna göre anlamlı hücre canlılığı artışı p<0.05

BESİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Alzheimer Hastalığı (AH) selektif nöronal hücre ölümü ile giden geri dönüşümsüz serebral dejenerasyon ile karakterize bir hastalıktır. Progresif demansların en sık nedenidir ve batı ülkelerinde ölüm nedenleri arasında 4. sırada yer almaktadır. Türkiye’de 300-400 bin civarında Alzheimer hastası olduğu ve genç nüfusun giderek yaşlanacağı bir ülke olarak Türkiye’de 30-40 yıl sonra bu hastalığın en önemli sağlık sorunu olacağı düşünülmektedir [1, 2]. Nöronların rejenerasyon yeteneği olmadığından hastalık ortaya çıkmadan önce koruyucu ve/veya engelleyici etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği önem kazanmaktadır [116]. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklarda nöron ölümünün nedenleri ve mekanizmalarının tamamen aydınlatılması bir zorunluluk haline gelmiştir.

AH patogeneğinde belirleyici bir özellik nöronal dokuda aşırı miktarda amiloid beta ($A\beta$) birikimidir [6]. Beyinde $A\beta$ peptid çözünür, çözünmez formlarda, monomerden yüksek molekül ağırlıklı oligomerlere kadar değişen farklı şekillerde hücre içinde veya hücre dışında bulunabilir [46]. Senil plakta çözünmez ekstrasellüler depozitler olarak birikiminin hastalık patogeneğinde temel mekanizma olduğuna dair artan görüşler mevcut olsa da. $A\beta$ ’nın indüklediği toksisitenin oluşum mekanizması kesin olarak bilinmemektedir.

$A\beta_{25-35}$ AH modeli oluşturulurken sıklıkla kullanılan $A\beta$ formudur [117]. Amfipatik özelliğe sahip $A\beta_{1-42}$ peptidin C-terminaldeki 12-14 aminoasitlik kısmı oldukça hidrofobik olup N-terminal kısım hidrofilitiktir. 11 aminoasitlik $A\beta_{25-35}$ fragmanı $A\beta_{1-42}$ ’nin hidrofobik fonksiyonel kısmına lokalize C-terminal parçasıdır [118]. AH olanların beyinlerinde $A\beta_{25-35}$ antijeninin varlığı ve fibriler olmayan, çözünür ve toksik olmayan $A\beta_{1-40}$ ‘ın beyin proteaz bağımlı olarak fibriler, toksik $A\beta_{25-35}$ fragmanına dönüştüğü yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir [119]. Bu bilgiler de AH ile ilişkili mekanizmaların hayvan modellerinde veya hücre hatlarında araştırılırken $A\beta_{25-35}$ kullanımının sebebini desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da nöronal toksisite ajanı olarak sentetik $A\beta_{25-35}$ peptidi kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan $A\beta_{25-35}$ peptidinin hücre canlılığı üzerine toksik etkilerini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda $A\beta_{25-35}$ peptidinin nöronal dokuda olası etkilerini inceleyebilmek için hücre hattı olarak, deneysel AH modeli çalışmalarında yaygın olarak kullanılan nöroendokrin

özelliğe sahip kromaffin hücrelerden gelişmiş sıçan feokromasitoma (PC-12) [120] ve nörosteroidogenik enzimleri içerdiği ve nörosteroidleri üretebildikleri önceki çalışmalarla gösterilmiş olan insan nöroblastoma (SHSY-5Y) hücre hatları kullanılmıştır [99].

A β_{25-35} peptidi ile her iki hücre hattında nöronal toksisite oluşturmak için hangi miktarda ve ne kadar süre A β_{25-35} uygulanacağına ait veriler literatürde incelendiğinde farklı araştırmacılar tarafından farklı doz ve süreler bildirilmiştir. Jang JH ve ark. 2003 te yayınladıkları makalelerinde, PC-12 hücrelerini 50 μ M A β_{25-35} ile 36 saat boyunca inkübe etmenin faz-kontrast mikroskopta hücre morfolojisini değiştirdiğini bildirmişlerdir [121]. Peng QL ve ark. (2002) ‘‘pyncogenol’’ün nöronlar üzerine koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında nörotoksisiteyi PC-12 hücre hattına 24 saat süreyle 10, 20, 40, 60 μ M (37°C’de gece boyu agrege edilen) A β_{25-35} uygulayarak gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmacılar nörotoksisiteyi MTT redüksiyonu, LDH salınımı yöntemlerini kullanarak ve apoptotik hücre sayısı oranını belirleyerek değerlendirdiklerinde 24 saatin sonunda 10, 20, 40, 60 μ M A β_{25-35} ‘in kontrole kıyasla anlamlı toksisite yaptığını göstermişlerdir [120].

SHSY-5Y hücrelerini Kelicen P. ve ark. (2006) 10 μ M non-agrege A β_{25-35} ile muamele ederek hücre canlılığını 24. saatin sonunda %60’a düşürmüşlerdir [122]. Blasko I. ve ark. (1997) TNF- α ’nın A β_{25-35} ‘in indüklediği apoptozisi arttırdığını gösterdikleri çalışmalarında insan nöroblastoma hücrelerine (SK-N-SH) uygulama öncesi agrege edilmemiş 10 μ g/mL konsantrasyonda (~9.43 μ M) A β_{25-35} peptidini 72 saat süreyle uygulayarak toksisiteyi akış sitometresi ile değerlendirdiklerinde kontrole kıyasla anlamlı apoptoz artışını göstermişlerdir [123]. Wei W.ve ark. (2002) SHSY-5Y hücre hattında 20 μ M A β_{1-40} , A β_{1-42} , A β_{25-35} , A β_{17-40} ve A β_{17-42} fragmanlarını kullanarak 48 saatin sonunda ortaya çıkan toksik etkileri değerlendirmişler ve kontrol ile karşılaştırıldığında 37°C’de 24 saat süreyle agrege edilen A β_{25-35} peptidinin istatistiksel olarak en yüksek anlamlılıktaki toksisiteyi oluşturduğunu göstermişlerdir [124]. Schaeffer V. ve ark (2008) SHSY-5Y hücre hattında A β peptidinin nörosteroidogenez üzerine doza bağlı ve dizi sensitif etkilerini inceledikleri çalışmalarında 37°C’de 24 saat süreyle agrege edilen A β_{25-35} ’in 12 μ M’lık dozu ile MTT redüksiyonu sonuçlarına göre kontrole kıyasla anlamlı toksisite elde etmişlerdir [99]. Zhang S. ve ark. 2009 da, ‘‘Indirubin-3’-monoxime’’in SHSY-5Y hücrelerinde A β nörotoksitesini engellediğini bildirdikleri makalelerinde. toksisite oluşturmak amacıyla kullandıkları A β_{25-35} ’i 7 gün süreyle 37°C’de agrege etmişler ve daha sonra 10, 20, 30, 40, 50 μ M gibi değişen dozlarda 48 saat boyunca hücrelere uygulayarak toksisiteyi değerlendirmişlerdir. 10, 20, 30

μM $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulanan grupta hücre canlılığında kontrole göre anlamlı azalma gözlenmiş ancak 40 ve 50 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulanan gruplarda daha yüksek anlamlılıkta toksisite oluşturmuşlardır [125].

Tez çalışmamızda $\text{A}\beta_{25-35}$ toksisitesini oluşturmak için mevcut literatür verilerini de göz önüne alarak doz ve inkübasyon sürelerini optimize etmek amacıyla ön deneyler yapıldı.

PC-12 hücrelerine 24, 48, 72 saat süreyle 20 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulayıp hücre canlılıklarını değerlendirdiğimizde $\text{A}\beta$ verilen grupta 48. ve 72. saatlerin sonunda kontrole göre anlamlı canlılık azalması gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 24A).

SHSY-5Y hücrelerine 20 μM non-agrege $\text{A}\beta_{25-35}$ uyguladığımızda 72.saatın sonunda Kelicen P. ve ark ile Blasko I. ve ark.'nın bulgularının aksine hem $\text{A}\beta_{25-35}$ dozu hem de inkübasyon süresi arttırılmış olmasına rağmen yeterli oranda hücre canlılığında azalma elde edilemedi (hücre canlılığı ancak %76.9'a düşürülebildi). 10-100 μM arasında değişen dozlarda $\text{A}\beta$ uygulayarak doz eğrisi yapıldığında ise doz artışı ile orantılı toksisite artışı gözlemlenmedi. Bu sonuçlara dayanarak uygulama öncesinde $\text{A}\beta_{25-35}$ peptidini 37°C'de inkübe ederek agrege etme yoluna gidildi.

$\text{A}\beta$ toksisitesi için 24-168 saat arasında değişen agregasyon süreleri kullanılmıştır [99, 124, 125]. Çalışmamızda 24-312 saat arasında değişen farklı sürelerde inkübe ederek agrege ettiğimiz $\text{A}\beta$ 'ları toksisite oluşturmak üzere hücrelere uyguladığımızda toksisitenin agregasyonsuz $\text{A}\beta$ 'lara göre daha fazla geliştiği belirlendi. Diğer taraftan agregasyon süresini 24 saatten 72 saate uzatmak hücre canlılıklarındaki azalmayı attırdı ancak agregasyon süresini 72 saat üzerine çıkarmak toksisitede anlamlı değişiklikler yaratmadı.

SHSY-5Y hücrelerine 24, 48, 72 saat süreyle 40 μM agrege $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulayıp hücre canlılıklarını değerlendirdiğimizde $\text{A}\beta$ verilen grupta 48. ve 72. saatlerin sonunda kontrole göre anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 25).

$\text{A}\beta_{25-35}$ toksisitesinin nörosteroid metabolizması ile ilişkisini değerlendirmek için anlamlı nöron ölümüne yol açan PC-12 hücreleri için non-agrege 20 μM , SHSY-5Y hücreleri için 72 saat süreyle 37°C'de agrege edilmiş 40 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ 'nın hücrelere 72 saat süre ile muamele edilmesinin uygun olacağı sonucuna varıldı.

Nörosteroidlerin sinir sisteminde de novo sentezinin varlığının tanımlanmasından sonra araştırmacılar, bu NS'ler ile nöronların yaşamsal fonksiyonları arasındaki ilişkiyi araştırmışlar [21, 24] ve ayrıca A β ile indüklenen nörotoksisite durumunda ortaya çıkan NS düzeyi değişimlerini de incelemişlerdir [99]. Bunun yanı sıra nöronal dokuda P konsantrasyonunun iskemik hasar, oksidatif stres ve glutamatın yanı sıra A β ile indüklenen nörotoksisite durumunda değişime uğradığı gösterilmiştir [15, 95]. Ancak PS ve A β ilişkisi günümüzde henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre 20/40 μ M A β_{25-35} ile 72 saat süreyle muamelenin her iki nöronal hücre hattında P sentezini anlamlı arttırdığı ($p < 0.05$), PS sentezini ise azaltma eğiliminde olduğu gösterildi (Şekil 26-29). Tüm steroid hormonların öncülü olan P'nin konsantrasyonundaki artış diğer steroidlerin miktarındaki değişim ile yakın ilişkide olabilir. Bununla ilgili olarak 2008 yılında Schaeffer V. ve ark.'nın yaptığı SHSY-5Y hücre hattında A β peptidinin nörosteroidogenez üzerine doza bağlı ve dizi sensitif etkilerini inceledikleri çalışmayla A β_{25-35} ile A β_{1-42} 'nin progesteron ve/veya östradiol düzeylerinde değişiklik yarattığı ancak testosteron ve 3 α -androstanediol düzeylerinde değişime yol açmadığı ortaya konulmuştur, ayrıca A β_{25-35} 'nin prekürsör olarak verilen pregnenolondan progesterona dönüşümü kontrole göre anlamlı azalttığı gösterilmiştir. [99]. Çalışmamızın bulguları bu araştırmacıların yayınlamış oldukları çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Diğer taraftan çalışmamızda PS sentezinde belirlenen azalma eğilimi ise AH olan kişilerin beyin kortekslerindeki PS düzeyleri ile A β peptid düzeylerinin negatif korelasyonunun gösterildiği çalışma ile uyumlu görülmektedir [96]. A β 'nin tetiklediği P'de belirlenen artış, PS ile korele değildir. Bu bulgu A β toksisitesinde konsantrasyonu artmış P'nin metabolik olarak sülfotransferaz yoluna değil, diğer steroid hormonların sentezlendiği basamaklara yönelme eğiliminde olduğunu düşündürmektedir.

PS rodent modellerinde öğrenme ve hafıza üzerine olumlu etki gösteren önemli bir nöroaktif steroidtir [92]. Sinir sisteminde aktif nörotransmitter rolü oynayan PS diğer bazı NAS'lar gibi genomik olmayan etkilerini GABA $_A$, NMDA, sigma 1 gibi çeşitli reseptörleri ve bir çok ligand-kapılı ve voltaj bağımlı iyon kanallarını düzenleyerek gerçekleştirmektedir [83, 87, 93]. Nöromodülatör özelliğe de sahip olan NAS'lar pek çok beyin fonksiyonunu düzenleyen nöron-nöron haberleşmesini aktive veya inaktive edebilmektedirler [84].

NS'ler ile nörogelişimsel, psikiyatrik yada davranışsal bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda NS'lerin yokluğunun veya azalmış konsantrasyonlarının bu bozukluklara yol açtığı vurgulanmış ve bu bileşikler ile tedavinin de nörojenezi, nöronal yaşam süresini, miyelinizasyonu, hafızada artışı ve nörotoksisitede azalmayı sağlayabilecekleri gösterilmiştir [79].

PS, DHEAS gibi doğal bir eksitator olup fizyolojik konsantrasyonlarda GABA'nın etkisini inhibe etmektedir [77]. PS'nin yüksek konsantrasyonu NMDA reseptörlerini uyararak eksitator etkiyi güçlendirmektedir. Aynı zamanda PS sigma-1 ters agonist etkilidir [77]. PS'ın kültüre rat hipokampal nöronlarında NMDA'nın aktiflediği akımı güçlendirdiği GABA ilişkili akımı inhibe ettiği Bowlby M.R. ve ark. (1993), Irwin R.P. ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Beynin öğrenme ve hafıza ile ilgili alanı olan hipokampusta PS lokal bir mediatör gibi davranıp glutamat bağımlı nöronal uyarılabilirliğe katkıda bulunmaktadır [69].

AH'daki nöronal hasardan A β peptit toksisitesi ve NMDA reseptörlerini kullanan eksitotoksiste sorumlu tutulmaktadır [97]. Eksitotoksiste; SSS'de ana eksitator nörotransmitter olan glutamatın reseptörlerinin anormal aktivasyonunun ortaya çıkardığı hücre hasarını tanımlamaktadır. Glutamat, öğrenme ve bellek ile ilgili olaylarda rol oynayan eksitator bir aminoasit olup özellikle NMDA reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. Ayrıca AMPA ve kainat reseptörlerine de bağlanabilir. AH'da hipokampus, assosiasyon kortikal alanlarda glutamatın yüksek konsantrasyonlarda bulunması nörodejenerasyona yol açabilmektedir [98].

Sinir dokusunda P ve PS için fizyolojik düzey 1 μ M ve altı olarak tanımlanmıştır [79]. Çalışmamızda ELISA yöntemi ile elde ettiğimiz hücre içi P ve PS düzeyleri nM konsantrasyonda yani fizyolojik sınırlar içinde bulunmuştur. PS'nin mikromolar konsantrasyonları ile NMDA reseptör aktivasyonunun gerçekleştiği göz önünü alındığında nM konsantrasyonlarda PS'nin NMDA reseptörlerini uyararak eksitotoksisteye neden olması beklenmeyen bir durumdur. Diğer taraftan Synder Z. ve ark.'ı A β 'nın NMDA reseptör duyarlılığını arttırdığını göstermişlerdir [97, 126]. Bu konunun açıklığa kavuşması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Pregnenolon (P) da PS gibi eksitator bir NS olup [79] rodent modellerinde nöroprotektif etkili olduğu [94, 95], kognitif fonksiyonları güçlendirdiği [127], GABA

reseptör antagonistik etkili [94] olduğu bildirilmektedir. Öğrenme ve hafıza üzerine olumlu etkiler gösteren P'nin in vitro çalışmalarda Aβ toksisitesine karşı koruyucu olduğuna dair yaygın bir görüş ortaya çıkmış [94, 128-130] olsa da bunun tersini savunan çalışmalar da mevcuttur.

Guarneri P. ve ark. (1998) izole rat retina hücrelerine 1-100 µM arasında değişen konsantrasyonlarda NMDA uygulayarak NMDA reseptörleri tarafından uyarılan eksitotoksisite yaratmışlardır ve daha sonra P ve PS düzeylerini değerlendirdiklerinde NMDA bağımlı NS sentez stimülasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile P ve PS sentezinin nöronal apoptozun erken bir kanıtı olduğu ileri sürülmüş ve bu NS'lerin sentezinin inhibisyonunun da rat retinasında eksitotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. [21]

Weaver ve ark (1998), Yaghoubi ve ark (1998), Shirakawa ve ark (2002) tarafından yayınlanan farklı çalışmalarda, PS'nin NMDA reseptörlerini pozitif düzenleyerek NMDA'nın indüklediği nörotoksisiteyi şiddetlendirdiği belirtilmiştir [98].

Cascio C. ve ark.'nın 2000 ve 2002 yıllarında yaptıkları çalışmalarla PS'nin rat retina hücreleri için doğal bir eksitotoksin olduğu ve 50 µM PS tarafından indüklenen hücre ölümünün NMDA reseptör antagonistlerince azaltılabildiği gösterilmiştir [24, 25].

Aβ'nin nörotoksik etkilerini farklı metabolik süreçleri kullanarak hücre içi Ca⁺⁺ arttırma yoluyla gösterdiği ileri sürülmektedir [46]. Kato-Negishi M. ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada rat hippokampal nöronlarında Aβ'nin tetiklediği hücre içi Ca⁺⁺ artışının P, DHEA, DHEAS ile bloke edilebildiği gösterilmiştir [131]. Waters ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada renal proximal tüp hücrelerinde antimycin A ile mitokondrial inhibisyon sonucu ortaya çıkan hipoksinin oluşturduğu hücre hasarında P ve DHEAS'ın sitoprotektif etkili olduğunu göstermişlerdir [130].

Bizim çalışmamızda P ve PS'nin suprafizyolojik(>1 µM) konsantrasyonları nöronal karakterli hücrelerin canlılıklarını azaltmış, bunun yanında fizyolojik konsantrasyonlarda (<1 µM) 72 saate kadar toksik etki göstermemişlerdir (Şekil 30, 31). Sonuç olarak yüksek P veya PS sentezinin nöronal hücre canlılığında negatif yönde kritik bir role sahip olabileceği düşünülebilir. 50 µM PS ile elde ettiğimiz sonuçlarımız Cascio C. ve ark.'nın 2000 ve 2002 yıllarında yaptıkları çalışmaları destekler nitelikte olup anlamlı hücre canlılığı azalmasına

neden olmuştur. Bunun yanı sıra 50 µM P de her iki hücre hattında anlamlı hücre canlılığı azalmasına neden olmuştur. (p<0.05) (Şekil 32, 33).

Çalışmamızda P'nin doz bağımlı olarak Aβ'ın indüklediği hücre ölümünden nöronları koruduğu gösterilmiştir. Aβ ile birlikte 0.5 µM P uygulanması Aβ toksisitesini her iki hücre hattında anlamlı azaltırken p<0.05, 50 µM P uygulaması ise Aβ toksisitesini PC-12 hücrelerinde anlamlı şiddetlendirmiş p<0.05, SHSY-5Y hücrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da toksisiteyi arttırmıştır (Şekil 35, 36). Pek çok çalışmada koruyucu kabul edilen P'nin doza bağımlı görülen bu etkisi ilgi çekicidir.

Gursoy E. ve ark.'nın 2001 yılında yayınlamış oldukları çalışmada 0.5 µM P'nin fare hipokampal hücre hattını (HT-22) nörotoksinlere (glutamat ve Aβ₂₅₋₃₅) karşı 24 saate kadar koruduğu gösterilmiştir [94]. Araştırmacılar steroidlerin bu etkisini C3 pozisyonunda OH grubu taşıyor olmalarına bağlamışlar ve dolayısıyla P,östradiol ve DHEA'nın nöroprotektif steroidler olduklarını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Gursoy ve ark.'larının sonuçlarına benzer şekilde 0.5 µM P'nin her iki hücre hattını Aβ toksisitesine karşı 72 saate kadar koruduğu gösterildi.

NS sentezinin inhibisyonunun Aβ₂₅₋₃₅ peptit toksisitesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde ilk olarak kolesterolden P'e dönüşümü sağlayan P450_{scc} enziminin inhibitörü aminoglutetimidin (AMG) Aβ toksisitesinde hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi.

Shirakawa H. ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada 100-1000 µM AMG uygulamasının kortikal nöronlarda 20 µM NMDA ile oluşturulan eksitotoksositeye ve kimyasal ajanlar ile oluşturulan iskemi üzerine etkilerini incelemişlerdir. 300 µM ve üzerindeki dozlarda AMG uygulamasının NMDA'nın ve iskeminin indüklediği hücre ölümünü anlamlı azalttığını göstermişlerdir. AMG'nin bu nöroprotektif etkisini steroid sentez inhibisyonu yoluyla gerçekleştirip gerçekleştirmediğini gösterebilmek amacıyla dışarıdan pregnenolon, östron, 17-β östradiol ve östriol uyguladıklarında ise bu etkinin tersine dönmediğini, AMG'nin nöroprotektif etkisinin steroid sentez inhibisyonundan bağımsız farklı mekanizmalar ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ayrıca tek başına 1000 µM AMG uygulamasının kortikal nöronlarda kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik yaratmadığını da göstermişlerdir [98].

Çalışmamızda 0.76 mM AMG'in 72. saatin sonunda PC-12 hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir artışa yol açtığı, SHSY-5Y hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik yaratmadığı gözlemlendi. Ayrıca her iki hücre hattında A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile birlikte eş zamanlı 0.76 mM AMG uygulamasının A β toksisitesini anlamlı azalttığı gösterildi (p<0.05) (Şekil 39,40). Bu sonuçlar, AMG'in in vitro oluşturulan nörotoksositeye karşı nöroprotektif etkili olduğunu vurgulayan Shirakawa H. ve ark.'nın bulgularını destekler niteliktedir. AMG'in bu nöroprotektif etkisinin sadece steroid metabolizması üzerine olan inhibisyonu ile ilişkili olup olmadığı ileri araştırmalara ihtiyaç gösteren bir konudur.

P'den PS'e dönüşümü inhibe eden DCNP'nin A β toksisitesinde hücre canlılığı üzerine etkilerini incelediğimizde de AMG ile elde ettiğimiz sonuçlara paralel sonuçlar elde edildi. 72 saat süreyle A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile birlikte 1 μ M DCNP uygulamasının, sadece A β , 50 μ M PS veya A β ile birlikte yüksek doz PS uygulanan gruplara göre hücre canlılıklarında anlamlı artışa neden olduğu gösterildi (p<0.05) (Şekil 41, 42).

Şu ana kadar bizim ulaşabildiğimiz literatürler arasında AMG ve DCNP'nin A β toksisitesi üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya ulaşamamıştır. Bu nedenle çalışmamız hem insan hem de sıçan kaynaklı iki farklı nöronal karakterli hücre hattında A β ₂₅₋₃₅ peptidi ile oluşturulan nörotoksositeye karşı AMG'nin ve DCNP'nin koruyucu etkilerinin gösterildiği ilk çalışma olması açısından da önemlidir.

Miller A. ve ark. (1987), Alshowaier I.A. ve ark. (1999) çalışmalarında AMG'nin ABD'de metastatik meme kanseri gibi hormon bağımlı malign tümörü olan hastaların tedavisinde (ağız yolu ile) kullanıldığını bildirmişlerdir [132, 133]. Hayvan modeli ile yapılan bir başka çalışma ile [¹⁴C] işaretli AMG'nin farelere sistemik uygulanmasından sonra AMG'nin beyin dokusunda birikebildiği gösterilmiştir [134]. Bu bilgiler ve tez çalışmamızın sonuçlarının ışığında sinir sistemine penetre olabilen AMG ve DCNP analoglarının geliştirilmesi ve bunların A β 'a bağlı nörodejeneratif değişikliklerin önlenmesinde kullanılması düşünülebilir.

AH patofizyolojisinde büyük öneme sahip A β 'nın indüklediği toksisite süreci ve NS sentezi arasındaki ilişki in vitro çalışmalarla incelendiği gibi in vivo hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar ile de açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır.

Beynin öğrenme ve hafıza ile ilgili alanı olan hippocampusta PS bölgesel bir mediatör gibi davranıp glutamat bağımlı nöronal uyarılabilirliğe katkıda bulunur [69]. Sıçanlarda hippocampustaki PS konsantrasyonunun bellek performansı ile korele olduğu ve ayrıca NMDA antagonistlerince indüklenen hafıza bozukluğunun intraserebroventriküler PS enjeksiyonu ile düzeltilebildiği gösterilmiştir [92]. Diğer taraftan AH'lı hastaların postmortem beyin dokularında ölçülen NS düzeyleri ile AH arasındaki korelasyonun gösterildiği çalışmada kontroller ile kıyaslandığında AH'lı hastaların beyin DHEA düzeyleri yüksek, allopregnenolon düzeyleri ise düşük bulunmuştur [135].

Naylor J.C. ve ark.'nın 2008 yılında 25 AH olan hasta ve 16 kişilik kontrol üzerinde yapmış oldukları çalışmada aynı kişilerin hem BOS hem de temporal korteks DHEA ve P düzeylerini GC/MS ile belirlemişlerdir. BOS DHEA düzeyleri ile temporal korteks DHEA düzeylerini ve nöropatolojik hastalık evresini pozitif korele bulmuşlardır. Ancak BOS P düzeyleri ile temporal korteks P düzeyleri pozitif korele iken BOS P düzeyleri nöropatolojik hastalık evresi ile korele olma eğilimi göstermiştir. Kontrol ile kıyaslandığında AH'lı hastaların BOS DHEA düzeyleri anlamlı yüksek, P düzeyleri ise yüksek olma eğiliminde bulunmuştur. Sonuç olarak insanlarda BOS NS düzeyleri beyin NS düzeyleri ile korele ise bu moleküllerin BOS gibi elde edilmesi çokta zor olmayan vücut örneklerinde tayin edilmesinin AH'nın erken tanısında faydalı olabileceği düşünülebilir [136].

Çalışmamızda kullandığımız analiz yöntemleri değerlendirildiğinde; P düzeyleri ELISA ve HPLC yöntemi ile analiz edildi. PS düzeyleri ise solvolizis işleminden sonra sülfat grubu kopartılarak toplam P düzeyi üzerinden indirekt olarak belirlendi. Bu şekilde PS düzeyini indirekt yolla belirlemiş olmamız çalışmamızın en önemli kısıtlılığı gibi görünmektedir. Diğer taraftan kullandığımız ELISA analiz yönteminin kesinliği çalışma içi %2.96 ve çalışmalar arası %16.38'dir ve HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre daha düşük olmakla birlikte (%bias=%2.49) iyi korelasyon göstermiştir ($r^2=0.725$).

Bunun yanı sıra oluşturduğumuz deney modellerindeki hücre canlılıklarını değerlendirirken MTT redüksiyonu, LDH salınımı ve akış sitometre ile apoptoz tayini yöntemleri kullanıldı. LDH salınımı sadece PC-12 hücre hattında yüzde hücre ölümünün belirlenmesinde kullanılabilir. SHSY-5Y hücrelerinin değerlendirilmesinde kullanılamama sebebi bu hücrelerin büyümesi için kullandığımız ortamın (DMEM) piruvat içeriyor

olmasıdır. Aynı zamanda PC-12 hücrelerinde MTT verilerine göre yüzde canlılığın A β verilen grupta 48 ve 72. saatin sonunda kontrole göre anlamlı azaldığı, LDH salınımına göre ise yüzde hücre ölümünün ancak 72. saatin sonunda anlamlı arttığı ($p < 0.05$) gözlemlendi (Şekil 24). 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda kontrole kıyasla hücre ölümünde anlamlı artış saptanamadı. Bu sonuç PC-12 hücrelerinde LDH ölçümünün, erken hasarın belirlenmesi için uygun bir yöntem olmadığı göstermektedir.

Bizim deneysel modelimizde A β toksisitesini saptamada MTT redüksiyonu yöntemi LDH salınımına göre daha sensitif bulundu. PC-12 hücreleri eksojen herhangi bir ajan verilme bile yüksek miktarda LDH salınımı yapabilen hücreler olduğu için kullandığımız LDH kiti ile ölçüm yaparken deteksiyon limiti içinde LDH aktivitelerini ölçebilmek amacıyla hücre süpernatantları 1/10 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır. Ayrıca PC-12 hücreleri sıçan feokromasitoma hücrelerinden köken almaktadır ve bilindiği gibi neoplastik hücreler anaerobik glikolize adapte olmuşlardır [137]. Bu nedenle bu yolun enzimlerinden piruvatı laktata dönüştüren enzim olan LDH, hücre içinde artmış düzeylerde bulunmaktadır. Sonuç olarak PC-12 hücrelerinden spontan olarak ortama salınan LDH miktarıda zaten yüksek olacaktır.

Ayrıca çalışmamızda kullandığımız bir diğer yöntem olan akış sitometre ile apoptoz/nekroz tayini her iki hücre hattındaki hücrelerin aderan özellik gösteriyor olmaları nedeniyle oldukça güç gerçekleştirildi. Oluşturulan deney koşullarında inkübasyon süresi tamamlandığında yüzeye yapışmış halde bulunan hücreler, membranlarına zarar vermeden tripsin ile kültür kaplarından kaldırıp süspansiyon haline getirildi ve apoptoz tayini yapıldı. Ancak bu aşamada hücrelerin membran yapılarının bozulması kontrol grubundaki apoptoz oranlarının da beklenenden yüksek bulunmasına neden oldu. Aderan özellik gösteren hücre hatlarında apoptoz/nekroz tayini yapılırken karşılaşılan bu tür yöntemsel zorluklar da dikkate alınmalıdır.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile nöronal hücrelerde P ve PS sentezi üzerine A β 'nın etkili bir faktör olduğu ve bu steroidlerin sentez inhibitörlerinin kullanılması ile A β toksisitesinin önlenildiği gösterilmiştir. AH patofizyolojisinde büyük öneme sahip A β 'nin indüklediği toksisite süreci ve NS sentezi arasında gösterdiğimiz bu ilişkinin moleküler temellerinin açıklığa kavuşturulması ve yeni nöroprotektif ajanların geliştirilebilmesi için hücre kültürü çalışmalarına ek olarak daha ileri in vivo hayvan ve insan çalışmalarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

ALTINCI BÖLÜM

6. KAYNAKLAR

1. National Institute on Aging, National Institutes of Health, *Alzheimer's Disease Progress Report* (<http://www.alzheimers.org/pr01-02/index.htm>). 2001-2002.
2. <http://www.noroloji.org.tr/page.aspx?menu=473>. (Türk Nöroloji Derneği). [cited.
3. Przedborski, S., M. Vila, and V. Jackson-Lewis, *Neurodegeneration: what is it and where are we?* J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 3-10.
4. Gamblin, T.C., et al., *Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 10032-7.
5. Ling, Y., K. Morgan, and N. Kalsheker, *Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(11): p. 1505-35.
6. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
7. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach, *Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 64-76.
8. Waldmeier, P.C., *Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. **27**(2): p. 303-21.
9. Golde, T.E., *Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted?* J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 11-8.
10. Su, Y. and P.T. Chang, *Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from beta-amyloid peptide*. Brain Res, 2001. **893**(1-2): p. 287-91.
11. Maccioni, R.B., J.P. Munoz, and L. Barbeito, *The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders*. Arch Med Res, 2001. **32**(5): p. 367-81.
12. Drake, J., C.D. Link, and D.A. Butterfield, *Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic Caenorhabditis elegans model*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(3): p. 415-20.
13. Compagnone, N.A. and S.H. Mellon, *Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators*. Front Neuroendocrinol, 2000. **21**(1): p. 1-56.
14. Baulieu, E.E., *Neurosteroids: a novel function of the brain*. Psychoneuroendocrinology, 1998. **23**(8): p. 963-87.
15. Brown, R.C., C. Cascio, and V. Papadopoulos, *Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide*. J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 847-59.
16. Guarneri, P., et al., *Neurosteroidogenesis in rat retinas*. J Neurochem, 1994. **63**(1): p. 86-96.
17. Kimoto, T., et al., *Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis*. Endocrinology, 2001. **142**(8): p. 3578-89.
18. Behl, C., *Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease*. Cell Tissue Res, 1997. **290**(3): p. 471-80.
19. Yankner, B.A., et al., *Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease*. Science, 1989. **245**(4916): p. 417-20.
20. Behl, C., et al., *Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity*. Cell, 1994. **77**(6): p. 817-27.
21. Guarneri, P., et al., *Induction of neurosteroid synthesis by NMDA receptors in isolated rat retina: a potential early event in excitotoxicity*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(5): p. 1752-63.

22. Hosoda, T., H. Nakajima, and H. Honjo, *Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptotic cell death*. Neuroreport, 2001. **12**(9): p. 1965-70.
23. Maurice, T., T.P. Su, and A. Privat, *Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism*. Neuroscience, 1998. **83**(2): p. 413-28.
24. Cascio, C., et al., *Pregnenolone sulfate, a naturally occurring excitotoxin involved in delayed retinal cell death*. J Neurochem, 2000. **74**(6): p. 2380-91.
25. Cascio, C., et al., *A caspase-3-dependent pathway is predominantly activated by the excitotoxin pregnenolone sulfate and requires early and late cytochrome c release and cell-specific caspase-2 activation in the retinal cell death*. J Neurochem, 2002. **83**(6): p. 1358-71.
26. Mesulam, M., *Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri*. 2 ed. 2004: Yelkovan Yayınları. 465
27. Haxby, J.V., et al., *Neocortical metabolic abnormalities precede nonmemory cognitive defects in early Alzheimer's-type dementia*. Arch Neurol, 1986. **43**(9): p. 882-5.
28. Katzman, R., et al., *Development of dementing illnesses in an 80-year-old volunteer cohort*. Ann Neurol, 1989. **25**(4): p. 317-24.
29. Suh, Y.H. and F. Checler, *Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 469-525.
30. AE, Ö., *Nöroloji İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi temel ve klinik bilimler ders kitapları 2004: Nobel Tıp Kitabevleri*. 369.
31. Price, B.H., et al., *Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1993. **50**(9): p. 931-7.
32. Rasmusson, D.X., et al., *Accuracy of clinical diagnosis of Alzheimer disease and clinical features of patients with non-Alzheimer disease neuropathology*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1996. **10**(4): p. 180-8.
33. Strittmatter, W.J. and A.D. Roses, *Apolipoprotein E and Alzheimer's disease*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 53-77.
34. Rowland, L.P., *Merritt's Neurology*. Onbirinci baskı ed. 2008: Güneş Tıp Kitabevleri. 771-776.
35. Blennow, K. and H. Hampel, *CSF markers for incipient Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2003. **2**(10): p. 605-13.
36. Motter, R., et al., *Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1995. **38**(4): p. 643-8.
37. Rodgers, A.B., *Alzheimer's Disease: Unraveling the Mystery*. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute on Aging, NIH Publication Number: 08-3782. 2008.
38. Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal, *Alzheimer disease is multifactorial and heterogeneous*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(6): p. 901-2; discussion 903-4.
39. Shastry, B.S., *Neurodegenerative disorders of protein aggregation*. Neurochem Int, 2003. **43**(1): p. 1-7.
40. Huang, Y., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease*. Neurology, 2006. **66**(2 Suppl 1): p. S79-85.
41. Poirier, J., *Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(3): p. 355-61.
42. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. Neurology, 1993. **43**(8): p. 1467-72.
43. Puglielli, L., R.E. Tanzi, and D.M. Kovacs, *Alzheimer's disease: the cholesterol connection*. Nat Neurosci, 2003. **6**(4): p. 345-51.
44. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
45. Kumar, V., *Robbins Temel Patoloji*. 7. ed. 2003: Nobel Tıp Kitabevleri

46. Finder, V.H. and R. Glockshuber, *Amyloid-beta aggregation*. *Neurodegener Dis*, 2007. **4**(1): p. 13-27.
47. Thinakaran, G. and E.H. Koo, *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(44): p. 29615-9.
48. Van Gassen, G., W. Annaert, and C. Van Broeckhoven, *Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant?* *Neurobiol Dis*, 2000. **7**(3): p. 135-51.
49. Evin, G. and A. Weidemann, *Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides*. *Peptides*, 2002. **23**(7): p. 1285-97.
50. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. *Nature*, 2004. **430**(7000): p. 631-9.
51. Cole, S.L. and R. Vassar, *The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1*. *Mol Neurodegener*, 2007. **2**: p. 22.
52. Simmons, L.K., et al., *Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro*. *Mol Pharmacol*, 1994. **45**(3): p. 373-9.
53. Wang, R., et al., *The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(50): p. 31894-902.
54. Gibson Wood, W., et al., *Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1610**(2): p. 281-90.
55. McNamara, M.J., T. Gomez-Isla, and B.T. Hyman, *Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta40 and Abeta42 in Alzheimer disease*. *Arch Neurol*, 1998. **55**(7): p. 1001-4.
56. Rapoport, M., et al., *Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(9): p. 6364-9.
57. Pike, C.J., et al., *Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state*. *J Neurosci*, 1993. **13**(4): p. 1676-87.
58. Weldon, D.T., et al., *Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo*. *J Neurosci*, 1998. **18**(6): p. 2161-73.
59. Butterfield, D.A. and C.M. Lauderback, *Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **32**(11): p. 1050-60.
60. Mark, R.J., et al., *A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide*. *J Neurochem*, 1997. **68**(1): p. 255-64.
61. Aksenov, M., et al., *Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain*. *J Neurochem*, 2000. **74**(6): p. 2520-7.
62. Janciauskiene, S., H.T. Wright, and S. Lindgren, *Fibrillar Alzheimer's amyloid peptide Abeta(1-42) stimulates low density lipoprotein binding and cell association, free radical production and cell cytotoxicity in PC12 cells*. *Neuropeptides*, 1999. **33**(6): p. 510-6.
63. Varadarajan, S., et al., *Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35)*. *J Am Chem Soc*, 2001. **123**(24): p. 5625-31.
64. Ischiropoulos, H. and J.S. Beckman, *Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?* *J Clin Invest*, 2003. **111**(2): p. 163-9.
65. Chauhan, V. and A. Chauhan, *Oxidative stress in Alzheimer's disease*. *Pathophysiology*, 2006. **13**(3): p. 195-208.
66. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(1): p. 134-47.
67. Multhaup, G., et al., *Possible mechanisms of APP-mediated oxidative stress in Alzheimer's disease*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(1): p. 45-51.

68. Multhaup, G., et al., *Reactive oxygen species and Alzheimer's disease*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **54**(5): p. 533-9.
69. Vallee, M., et al., *Neuroactive steroids: new biomarkers of cognitive aging*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. **85**(2-5): p. 329-35.
70. Baulieu, E.E., P. Robel, and M. Schumacher, *Neurosteroids: beginning of the story*. *Int Rev Neurobiol*, 2001. **46**: p. 1-32.
71. Robel, P., et al., [*Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats*]. *C R Acad Sci III*, 1986. **303**(6): p. 235-8.
72. Robel, P., et al., *Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain*. *J Steroid Biochem*, 1987. **27**(4-6): p. 649-55.
73. Iwahashi, K., et al., *Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P-450_{scc}-linked monooxygenase system in the adult rat brain*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1035**(2): p. 182-9.
74. Le Goascogne, C., et al., *Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain*. *Science*, 1987. **237**(4819): p. 1212-5.
75. Jung-Testas, I., et al., *Steroid synthesis in rat brain cell cultures*. *J Steroid Biochem*, 1989. **34**(1-6): p. 511-9.
76. Hu, Z.Y., et al., *Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(23): p. 8215-9.
77. Plassart-Schiess, E. and E.E. Baulieu, *Neurosteroids: recent findings*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001. **37**(1-3): p. 133-40.
78. Beaujean, D., et al., *Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain*. *J Neurochem*, 1999. **72**(2): p. 848-57.
79. Mellon, S.H., *Neurosteroid regulation of central nervous system development*. *Pharmacol Ther*, 2007. **116**(1): p. 107-24.
80. <http://www.propeciahelp.com>. (*Neurosteroids*). [cited.
81. Do-Rego, J.L., et al., *gamma-Aminobutyric acid, acting through gamma -aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13925-30.
82. Mellon, S.H. and L.D. Griffin, *Neurosteroids: biochemistry and clinical significance*. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. **13**(1): p. 35-43.
83. Stoffel-Wagner, B., *Neurosteroid metabolism in the human brain*. *Eur J Endocrinol*, 2001. **145**(6): p. 669-79.
84. Kallonen, S.E., et al., *Discovery of neurosteroid glucuronides in mouse brain*. *Anal Chim Acta*, 2009. **651**(1): p. 69-74.
85. Dubrovsky, B.O., *Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005. **29**(2): p. 169-92.
86. Melcangi, R.C. and G.C. Panzica, *Neuroactive steroids: old players in a new game*. *Neuroscience*, 2006. **138**(3): p. 733-9.
87. Rupprecht, R. and F. Holsboer, *Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives*. *Trends Neurosci*, 1999. **22**(9): p. 410-6.
88. Zheng, P., *Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance*. *Prog Neurobiol*, 2009. **89**(2): p. 134-52.
89. Ramirez, V.D. and J. Zheng, *Membrane sex-steroid receptors in the brain*. *Front Neuroendocrinol*, 1996. **17**(4): p. 402-39.
90. Stoffel-Wagner, B., *Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **1007**: p. 64-78.
91. Schumacher, M., et al., *Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001. **37**(1-3): p. 343-59.

92. Kohjitani, A., et al., *Regulation of SULT2B1a (pregnenolone sulfotransferase) expression in rat C6 glioma cells: relevance of AMPA receptor-mediated NO signaling*. *Neurosci Lett*, 2008. **430**(1): p. 75-80.
93. Guarneri, P., et al., *Neurosteroids in the retina: neurodegenerative and neuroprotective agents in retinal degeneration*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **1007**: p. 117-28.
94. Gursoy, E., A. Cardounel, and M. Kalimi, *Pregnenolone protects mouse hippocampal (HT-22) cells against glutamate and amyloid beta protein toxicity*. *Neurochem Res*, 2001. **26**(1): p. 15-21.
95. Marx, C.E., et al., *Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia*. *Brain Res*, 2000. **871**(1): p. 104-12.
96. Weill-Engerer, S., et al., *Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(11): p. 5138-43.
97. Snyder, E.M., et al., *Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(8): p. 1051-8.
98. Shirakawa, H., et al., *Aminoglutethimide prevents excitotoxic and ischemic injuries in cortical neurons*. *Br J Pharmacol*, 2006. **147**(7): p. 729-36.
99. Schaeffer, V., et al., *Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells*. *Neurochem Int*, 2008. **52**(6): p. 948-55.
100. Green, P.S., K.E. Gridley, and J.W. Simpkins, *Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells*. *Neurosci Lett*, 1996. **218**(3): p. 165-8.
101. Guarneri, P., et al., *Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization*. *J Neurosci Res*, 2000. **60**(5): p. 656-65.
102. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
103. Lobner, D., *Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?* *J Neurosci Methods*, 2000. **96**(2): p. 147-52.
104. Boada, J., et al., *MPP(+)-induced mitochondrial dysfunction is potentiated by dopamine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **268**(3): p. 916-20.
105. <http://www.chem-station.com/yukitopics/images/hishoku3.jpg>. [cited.
106. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644793a.pdf>. [cited.
107. Liere, P., et al., *Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000. **739**(2): p. 301-12.
108. Higashi, T., et al., *Studies on neurosteroids XV. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for examining whether pregnenolone sulfate is a veritable neurosteroid*. *J Pharm Biomed Anal*, 2003. **30**(6): p. 1907-17.
109. Higashi, T., et al., *Studies on neurosteroids XVI. Levels of pregnenolone sulfate in rat brains determined by enzyme-linked immunosorbent assay not requiring solvolysis*. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26**(5): p. 709-11.
110. <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/pregnenolone.jpg>. [cited.
111. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/ca/Pregnenolone_sulfate.png/200px-Pregnenolone_sulfate.png. [cited.
112. Tagawa, N., et al., *Serum levels of 16-dehydropregnenolone sulfate during the early neonatal period*. *Biol Pharm Bull*, 1997. **20**(1): p. 76-8.
113. Tagawa, N., et al., *Serum dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and pregnenolone sulfate concentrations in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism*. *Clin Chem*, 2000. **46**(4): p. 523-8.

114. Burstein, S. and S. Lieberman, *Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures*. J Biol Chem, 1958. **233**(2): p. 331-5.
115. http://newenglandbiolabs.de/en/images/stories/cst_elisa_gross.jpg. [cited.
116. Saido, T.C., *Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid*. Neurobiol Aging, 1998. **19**(1 Suppl): p. S69-75.
117. Li, G., et al., *Protective effect of erythropoietin on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms*. Neurosci Lett, 2008. **442**(2): p. 143-7.
118. Yankner, B.A., L.K. Duffy, and D.A. Kirschner, *Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides*. Science, 1990. **250**(4978): p. 279-82.
119. Kubo, T., et al., *In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients*. J Neurosci Res, 2002. **70**(3): p. 474-83.
120. Peng, Q.L., A.R. Buz'Zard, and B.H. Lau, *Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. **104**(1): p. 55-65.
121. Jang, J.H. and Y.J. Surh, *Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(8): p. 1100-10.
122. Kelicen, P. and A. Nordberg, *Feedback regulation of SREBP and aromatase in A beta(25-35)-supplemented human neuroblastoma cells*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(3): p. 225-35.
123. Blasko, I., et al., *Tumor necrosis factor alpha augments amyloid beta protein (25-35) induced apoptosis in human cells*. Neurosci Lett, 1997. **238**(1-2): p. 17-20.
124. Wei, W., et al., *A beta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis*. Brain, 2002. **125**(Pt 9): p. 2036-43.
125. Zhang, S., et al., *Indirubin-3'-monoxime inhibits beta-amyloid-induced neurotoxicity in neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Neurosci Lett, 2009. **450**(2): p. 142-6.
126. Molnar, Z., et al., *Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus in vivo*. Neuroreport, 2004. **15**(10): p. 1649-52.
127. Vallee, M., W. Mayo, and M. Le Moal, *Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **37**(1-3): p. 301-12.
128. Gridley, K.E., P.S. Green, and J.W. Simpkins, *Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells*. Brain Res, 1997. **778**(1): p. 158-65.
129. Green, P.S., et al., *Estradiol attenuation of beta-amyloid-induced toxicity: a comparison o. J Neurocytol, 2000. 29(5-6): p. 419-23.*
130. Waters, S.L., et al., *Neurosteroid inhibition of cell death*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 2): p. F869-76.
131. Kato-Negishi, M. and M. Kawahara, *Neurosteroids block the increase in intracellular calcium level induced by Alzheimer's beta-amyloid protein in long-term cultured rat hippocampal neurons*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2008. **4**(1): p. 209-18.
132. Miller, A.A., et al., *Clinical pharmacology of aminoglutethimide in patients with metastatic breast cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 1987. **20**(4): p. 337-41.
133. Alshowaier, I.A., et al., *Pharmacokinetics of S- and R-enantiomers of aminoglutethimide following oral administration of racemic drug in breast cancer patients*. J Clin Pharmacol, 1999. **39**(11): p. 1136-42.
134. Unger, C., et al., *Aminoglutethimide. Penetration of the blood brain barrier*. Invest New Drugs, 1986. **4**(3): p. 237-40.
135. Marx, C.E., et al., *The neurosteroid allopregnanolone is reduced in prefrontal cortex in Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2006. **60**(12): p. 1287-94.

136. Naylor, J.C., et al., *Cerebrospinal fluid dehydroepiandrosterone levels are correlated with brain dehydroepiandrosterone levels, elevated in Alzheimer's disease, and related to neuropathological disease stage.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(8): p. 3173-8.
137. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-9.