



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İN VİTRO AMİLOİD-BETA TOKSİSİTE MODELİNDE
BORAKS VE BORİK ASİDİN EKSOZOMAL PROTEİN
İÇERİĞİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MEHMET ÖZGEN ALTINTAŞ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÜLKAN KILIÇ

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL - 2018

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Sahibi : Mehmet Özgen ALTINTAŞ
Tez Başlığı : In Vitro Amiloid- Beta Toksikite Modelinde Boraks ve Borik Asidin Eksozomal Protein İçeriğine Etkilerinin Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 16.07.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof.Dr.Ülkan KILIÇ

Kurumu

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üyesi Berrak ÇAĞLAYAN İstanbul Medipol Üniversitesi

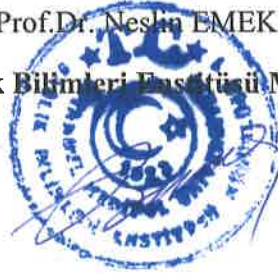
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet OZANSOY İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 17./07/2018. tarih ve 2018.../28... - ...04... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

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

Mehmet Özgen ALTINTAŞ



TEŞEKKÜR

Bu tezde yapmış olduğum bütün çalışmaların imkanlarını sağlayan, elde ettiğim verileri değerlendirmemi ve bunları yazabilmemi sağlayan danışmanım sayın Prof. Dr. Ülkan KILIÇ ve Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yine tezim dahilinde ve haricinde, beni yalnız bırakmayan ve tecrübelerini paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ozansoy'a da teşekkürü borç bilirim.

Ortak çalışmalar hakkındaki ön yargılarımı kıran, her daim yanımda olan, desteğini ve arkadaşlığını esirgemeyen Serdar ALTUNAY'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım dahilinde ve haricinde desteklerini esirgemeyen A. Burak ÇAĞLAYAN, M. Çağlar BEKER, Taha KELEŞTEMUR, Berrak ÇAĞLAYAN, Arman DALAY, Aysun DİLDEN, Elif SERTEL, Zeynep BALÇIKANLI, Reyda KARAÇAY, Nilay ATEŞ ve Semih DURMUŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmalarım sırasında sorularıma sabırla cevap vererek desteğini esirgemeyen Hilal Melis SEZER'e teşekkür ederim.

Son olarak beni ben yapan, sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme minnettarlığımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vii
RESİMLERİN LİSTESİ	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
1- ÖZET	1
2- ABSTRACT	2
3- GİRİŞ VE AMAÇ	3
4- GENEL BİLGİLER	4
4.1. Alzheimer Hastalığı	4
4.2. Klinik Bulgular.....	6
4.3. Alzheimer Hastalığının Evreleri.....	7
4.4. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi.....	8
4.4.1. Amiloid kaskat hipotezi	8
4.5. Oksidatif stres.....	11
4.6. Eksozom ve Alzheimer Hastalığı	12
4.7. Bor Türevleri ve Alzheimer Hastalığı	13
5- MATERYAL VE METOT	15
5.1. Deney Dizaynı.....	15
5.2. Hücre Kültürü.....	16
5.2.1. Hücrelerin çoğaltılması ve deneye hazır hale getirilmesi	16
5.2.2. Plakaların kaplanması ve deney başlangıcı	17
5.3. Toksik Amiloid-Beta Konsantrasyonunun Belirlenmesi	18

5.4. Uygun Boraks ve Borik Asit Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	18
5.5. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Analizi.....	19
5.6. Oksidatif Stres İndeksinin Ölçülmesi.....	19
5.7. Protein ve Eksozom İzolasyonu	20
5.7.1. Protein izolasyonu	20
5.7.2. Eksozom izolasyonu.....	20
5.7.3. İmmünopresipitasyon metodu	21
5.8. Western Blot.....	21
5.8.1. Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi ve örneklerinin hazırlanması	21
5.8.2. Western blot	22
5.8.3. Stripleme	22
5.9. İstatistiksel Analiz.....	23
6- BULGULAR	24
6.1. Toksik Amiloid Beta Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	24
6.2. Boraks ve Borik Asit Maddelerinin Minimum Toksikite Dozunun Belirlenmesi	25
6.2.1. Boraks maddesinin minimum toksisite dozunun belirlenmesi.....	25
6.2.2. Borik asit maddesinin minimum toksisite dozunun belirlenmesi	26
6.3. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi	27
6.3.1. Deney başlangıcı öncesi hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi.....	27
6.3.2. Deney başlangıcından 24 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi.....	28
6.3.3. Deney başlangıcından 48 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi.....	32
6.3.4. Deney başlangıcından 72 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi.....	37

6.3.5. Deney başlangıcından 96 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi.....	41
6.4. Laktat dehidrogenaz Analizi	42
6.5. Oksidatif Stres İndeksinin Ölçümü	43
6.5.1. TOS ölçümü	43
6.5.2. TAS ölçümü	44
6.5.3. OSI değerinin ölçümü	45
6.6. Toksikite Modelinde Protein Seviyesindeki Değişimler	46
6.6.1. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin Akt anlatımına etkisi	47
6.6.2. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin GSK3 α anlatımına etkisi	55
6.6.3. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin GSK3 β anlatımına etkisi	63
6.6.4. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin Sirt1 anlatımına etkisi	71
6.7. Toplam Eksozom Miktarı Analizi	75
7- TARTIŞMA	76
8- SONUÇ	83
9- KAYNAKLAR	84
10- ÖZGEÇMİŞ	93

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

α -sekretaz	Alfa sekretaz
β -sekretaz	Beta sekretaz
γ -sekretaz	Gamma sekretaz
A β	Amiloid-beta
AH	Alzheimer hastalığı
APP	Amiloid öncül proteini
BOS	Beyin omurilik sıvısı
FAD	Flavin adenin dinükleotit
ISA	İnterstisyel Akışkan
KBB	Kan beyin bariyeri
LDH	Laktat dehidrogenaz
MDA	Malondialdehit
miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
ROT	Reaktif oksijen türleri
SSS	Santral sinir sistemi
TAS	Toplam antioksidant statü
TOS	Toplam oksidant statü

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 6.3.1.1 Deneş başlangıcından önce SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri. A. Hücre hattının p:12 pasajından görüntü B. Hücre hattının p:13 pasajından görüntü C. Hücre hattının p:14 pasajından görüntü.....	27
Resim 6.3.1.1 SH-SY5Y hücrelerinin kontrol grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	28
Resim 6.3.2.2 SH-SY5Y hücrelerinin sadece amiloid beta grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	28
Resim 6.3.2.3 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	29
Resim 6.3.2.4 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra boraks eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	29
Resim 6.3.2.5 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	30
Resim 6.3.2.6 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	30
Resim 6.3.2.7 SH-SY5Y hücrelerinin sadece boraks eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	31
Resim 6.3.2.8 SH-SY5Y hücrelerinin sadece borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	31
Resim 6.3.3.1 SH-SY5Y hücrelerinin kontrol grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	32
Resim 6.3.3.2 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisite grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	33
Resim 6.3.3.3 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	33
Resim 6.3.3.4 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra boraks eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	34
Resim 6.3.3.5 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütölmüş morfolojik görüntüsü.....	34

Resim 6.3.3.6 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	35
Resim 6.3.3.7 SH-SY5Y hücrelerinin sadece boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	35
Resim 6.3.3.8 SH-SY5Y hücrelerinin sadece borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	36
Resim 6.3.4.1 SH-SY5Y hücrelerinin kontrol grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	37
Resim 6.3.4.2 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisite grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü.....	37
Resim 6.3.4.3 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	38
Resim 6.3.4.4 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	38
Resim 6.3.4.5 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	39
Resim 6.3.4.6 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	39
Resim 6.3.4.7 SH-SY5Y hücrelerinin sadece boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	40
Resim 6.3.4.8 SH-SY5Y hücrelerinin sadece borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	40
Resim 6.3.5.1 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	41
Resim 6.3.5.2 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü	41

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1.1 Alzheimer hastalığının patolojik evrimi. (a. Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların histolojik görüntüleri b. Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların hastalık ileledikçe oluşturdukları agregat şiddetini göstermektedir).	5
Şekil 4.4.1.1 Amiloid kaskat hipotezine göre AH'ye yol açan majör patojenik olaylar dizisi	9
Şekil 4.6.1 Ekstraselüler veziküllerin biyogenezi ve karakteristikleri.....	13
Şekil 5.1.1 Deney dizaynı. A. Toksik Aβ, koruyucu boraks ve borik asit konsantrasyonlarının belirlenmesini zaman çizelgesi. B. Deney gruplarının oluşturulması ve moleküler çalışmaların yapılmasının zaman çizelgesi.	15
Şekil 6.1.1 Aβ LDH Grafiği. Aβ uygulamasından 48 saat sonra yapılan LDH testi sonrasında elde edilen sonuçlar. *p<0,05	24
Şekil 6.2.1.1 Boraks LDH grafiği. Boraks maddesinin eklenmesinden 48 saat sonra yapılan LDH analizinden elde edilen sonuçlar. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01	25
Şekil 6.2.2.1 Borik asit LDH grafiği. Borik asit maddesinin eklenmesinden 48 saat sonra yapılan LDH analizinden elde edilen sonuçlar. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01	26
Şekil 6.3.5.1 Amiloid beta toksisite modeli LDH analizi grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucunda ki hücre canlılığı göstermektedir. *p≤0,05, **p≤0,01, #p≤0,05, ##p≤0,01 değerlerini ifade etmektedir.....	42
Şekil 6.5.1.1 TOS analiz grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucundaki oksidan seviyesini göstermektedir. *p≤0,05, **p≤0,01, #p≤0,05, ##p≤0,01 değerlerini ifade etmektedir.	43
Şekil 6.5.2.1 TAS analiz grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucundaki antioksidant seviyesini göstermektedir. *p≤0,05, **p≤0,01, #p≤0,05, ##p≤0,01 değerlerini ifade etmektedir.	44
Şekil 6.5.3.1 OSI analiz grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucundaki oksidatif stres indeksini göstermektedir. *p≤0,05, **p≤0,01, #p≤0,05, ##p≤0,01 değerlerini ifade etmektedir	45
Şekil 6.6.1 Western blot yöntemi ile elde edilen bant görüntülerinin protein ağırlıklarına göre sıralı görseli	46
Şekil 6.6.1.1 Toksisite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi.	47

Şekil 6.6.1.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi - Toksikite grubunun karşılaştırılması	48
Şekil 6.6.1.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi - Boraks grubunun karşılaştırılması.....	49
Şekil 6.6.1.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması	50
Şekil 6.6.1.5 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi	51
Şekil 6.6.1.6 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi - Toksikite grubunun karşılaştırılması	52
Şekil 6.6.1.7 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi - Boraks grubunun karşılaştırılması.....	53
Şekil 6.6.1.8 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması	54
Şekil 6.6.2.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi	55
Şekil 6.6.2.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi - Toksikite grubunun karşılaştırılması.....	56
Şekil 6.6.2.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi - Boraks grubunun karşılaştırılması	57
Şekil 6.6.2.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması	58
Şekil 6.6.2.5 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi	59
Şekil 6.6.2.6 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması.....	60
Şekil 6.6.2.7 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması.....	61
Şekil 6.6.2.8 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması.....	62
Şekil 6.6.3.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi	63

Şekil 6.6.3.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması	64
Şekil 6.6.3.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması.....	65
Şekil 6.6.3.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması	66
Şekil 6.6.3.5 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi	67
Şekil 6.6.3.6 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması.....	68
Şekil 6.6.3.7 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması.....	69
Şekil 6.6.3.8 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması.....	70
Şekil 6.6.4.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi	71
Şekil 6.6.4.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması	72
Şekil 6.6.4.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması.....	73
Şekil 6.6.4.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması	74
Şekil 6.7.1 Toplam eksozom miktarı grafiği. Hücreler arası salınan toplam eksozom miktarının gruplara göre olan değişimi	75
Şekil 8.1. Protein veribankaları aracılığı ile oluşturulmuş protein-protein etkileşimleri hakkında bilgi vermek için üretilen protein ağı şablonu	83

1-ÖZET

İN VİTRO AMİLOİD-BETA TOKSİSİTE MODELİNDE BORAKS VE BORİK ASİDİN EKSOZOMAL PROTEİN İÇERİĞİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doğal bir bileşik olan bor minerali doğada borat formunda bulunmakla birlikte insanlarda ve hayvanlarda borik asit olarak metabolize edilerek vücut dokularında ve sıvılarında bulunur ve bor mineralinin mineral metabolizmasında, immün yanıtta ve endokrin sistemde önemli fonksiyonları olduğu kabul görmektedir. Bu fonksiyonların bir kısmının hücreler arası iletişimde ekstraselüler veziküller yardımı ile yayıldığı bilinmektedir. Eksozomlar çapları 50 ile 100 nm arasında değişen küçük membran vezikülleri olup çeşitli vücut sıvıları ve ekstraselüler alanlarda bulunurlar. Eksozomların kargo olarak miRNA, mRNA, çeşitli mineraller ve proteinler taşıyarak hücreler arası iletişim ile birlikte Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalık patolojilerini yayabildikleri düşünülmektedir. Bu tezde bor bileşiklerinin *in vitro* olarak oluşturulan A β toksisite modelinde eksozomal ve intraselüler protein içeriğine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırmanın yapılabilmesi için Alzheimer hastalığının patofizyolojisinde önemli yere sahip olan A β 'nın *in vitro* toksisite modeli kullanılmıştır. Oksidatif stres ölçümlerinde özellikle toksisite uygulamasından sonra eklenen bor bileşenlerinin stres seviyelerini normal hücre stres seviyelerine getirdiği saptanmıştır. Toplam eksozom miktarı analizlerinde ise toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks maddesinin eksozom salınımını anlamlı derecede düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca bor bileşenlerinin intraselüler protein seviyelerine anlamlı derecede etki ettiği saptanmıştır. Bu tezde elde edilen sonuçların Alzheimer hastalığı ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarda görülen A β toksisitesi gibi patofizyolojik bulguların tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin literatüre kazandırılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: A β Toksisite Modeli, Boraks, Borik Asit, Eksozom, Oksidatif Stres

2-ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS BORAX AND BORIC ACID ON EXOSOMAL PROTEIN CONTENT IN IN VITRO AMYLOID-BETA TOXICITY MODEL

Boron is a natural compound and found as the form of borate in nature. Also borate is metabolized as boric acid in humans and animals and exists in body tissues and fluids. Borate forms are known to have important functions in mineral metabolism, immune response and endocrine system. It is known that some of these functions spread via extracellular vesicles in intercellular communication. Exosomes are small membrane vesicles with diameters ranging from 50 to 100 nm and are found in various body fluids and extracellular spaces. Exosomes are thought to spread intercellular communication as well as various neurodegenerative disease pathologies, such as Alzheimer's disease, by carrying miRNA, mRNA, various minerals and proteins as cargo. In this thesis, the aim is to investigate the effects boron compounds on exosomal and intracellular protein content in *in vitro* amyloid-beta toxicity model. In oxidative stress measurements, especially boric acid added after toxicity application helps to downregulation of stress levels to normal cell stress levels. In total exosomal analysis, borax added after toxicity application significantly reduced total amount of exosomal release. It has also been determined that boron compounds have a significant effect on intracellular protein levels. It is expected this thesis to contribute to the finding of novel target molecules for A β toxicity in other neurodegenerative diseases such as AD.

Keywords: A β Toxicity Model, Borax, Boric Acid, Exosome, Oxidative Stress

3-GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer Hastalığı (AH), demans grubu nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en yaygın görülen hastalıktır. AH, diagnostik olarak sporadik form (%95 ve fazlası) ve ailesel form (%1'den azını) olmak üzere iki ana grupta değerlendirilmektedir. AH'nin patofizyolojisinde önemli yere sahip olan başlıca iki nöropatolojik bulgu vardır; beyinde ekstrasellüler boşlukta çözünmeye dirençli amiloid-beta ($A\beta$) formlarının oluşturduğu plaklar ve hiperfosforile tau protein formlarını içeren intraselüler nörofibriler yumaklar. $A\beta$ proteini, amiloid öncül proteininin (APP) γ -sekretaz ve β -sekretaz gibi proteolitik enzimler vasıtası ile kesimi sonucu oluşmaktadır. Amiloidojenik özelliklere sahip olan 1-42 $A\beta$ peptidinin aşırı üretiminin temel sebebi APP mutasyonları olarak gösterilmektedir. AH gibi nörodejeneratif hastalık türlerindeki yayılımın ekstrasellüler veziküller aracılığı ile olduğu düşünülmektedir (1). Eksozomlar çapları 50 ile 100 nm arasında değişen küçük membran vezikülleri olup çeşitli vücut sıvıları ve ekstrasellüler alanlarda bulunurlar (2). Eksozomların kargo olarak miRNA, mRNA, APP, $A\beta$ ve tau proteinlerini taşıyarak hücreler arası iletişim ile birlikte $A\beta$ ve tau patolojilerinin yayılmasını kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (1). AH'nin tam tedavisi henüz bulunmamaktadır, ancak hastalık şiddetinin hafifletilmesi için çeşitli tedaviler mevcuttur. Bu tedavilerde kullanılan ilaçlar doğadaki bileşiklerden üretilmektedir. Doğal bir bileşik olan bor minerali de doğada genel olarak borat formunda bulunmaktadır (3). Ancak borat formundaki mineraller insanlarda ve hayvanlarda borik asit olarak metabolize edilerek vücut dokularında ve sıvılarında bulunur (4). Borat formundaki minerallerin beyin işlevsel ve bilişsel mekanizmalarını, iskelet ve bağışıklık sistemini etkileyebilecek bileşikler olduğu bilinmektedir (5).

Bu tezde bor bileşiklerinin *in vitro* olarak oluşturulan $A\beta$ toksisite modelinde eksozomal ve intraselüler protein içeriğine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırmanın yapılabilmesi için AH'nin patofizyolojisinde önemli yere sahip olan $A\beta$ 'nin *in vitro* toksisite modeli kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda bulunan $A\beta$ toksisitesi gibi patofizyolojik bulguların tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin literatüre kazandırılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

4-GENEL BİLGİLER

4.1.Alzheimer Hastalığı

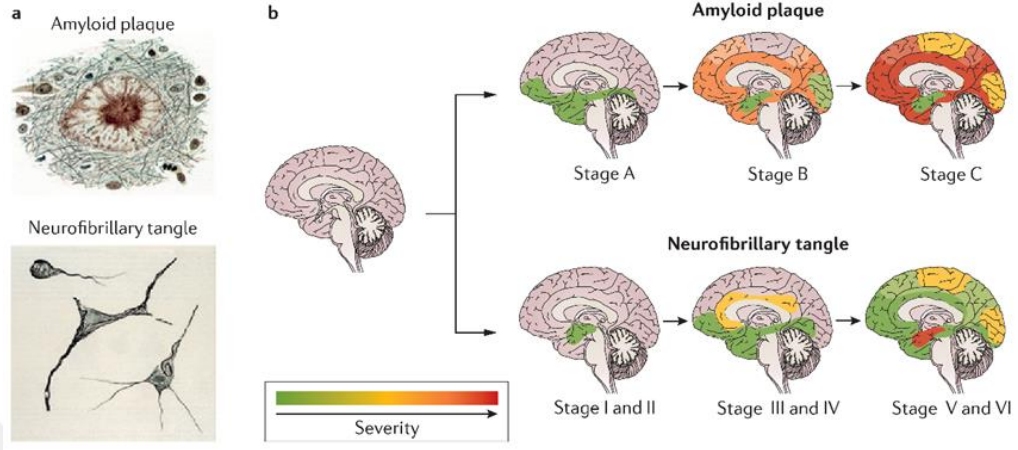
Alzheimer hastalığı (AH), demansın en yaygın görülen türü olmakla birlikte tüm demansa bağlı hastalıkların %50-80'lik kısmını karşılamaktadır. AH, beyinde serebral korteks ve hipokampusun geniş bölgelerini etkileyen ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Beyin dokusundaki anomaliler hasta bireyler arasında önemli ölçüde değişse de ilk olarak frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda tespit edilir, daha sonra neokorteksin diğer bölgelerine yavaşça ilerler (6).

Dünyada on milyonlarca bireyi etkileyen Alzheimer hastalığının görüldüğü yaş grubu yaşlı bireyler olarak gruplandırılan 64 yaş ve üzeri bireyleri kapsamaktadır. Yapılan meta analiz sonuçları baz alındığında, yaşlı bireylerde hastalık riski her beş yıl içerisinde yaklaşık iki katına çıkmaktadır (7, 8). Türk popülasyonundaki prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte 70 yaş üzerinde olası AH prevalansı %11, demans prevalansı ise %20 olarak literatürde bildirilmiştir (9) ve Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2018 yılında 27595 sayı numarasıyla yayınladığı veriler incelendiğinde Alzheimer hastalığı nedeni ile ölen yaşlı bireylerde artış olduğu ve bu oran 2012 yılında %3,4 iken 2016 yılında %4,5'e yükseldiği belirtilmiştir. AH'nın risk faktörleri sıralandığında en önemli etkenin yaşlanma olduğu göze çarpmaktadır. Bu sebeple ortalama yaşam süresinin uzamasının, hasta sayısının artmasına neden olabileceği düşünülmektedir (10). AH için potansiyel risk faktörleri diabetes mellitus, orta yaş hipertansiyonu, orta yaş obezitesi, hareketsizlik, depresyon, sigara kullanımı ve düşük eğitim düzeyi olarak sıralanmaktadır (11).

AH tanısına sahip hasta sayısının çoğunluk kısmını (%95 ve fazlasını) hastalığın sporadik formları oluştururken, küçük oranını ise (%1'lik kısmından azını) amiloid-betanın (A β) prosesinde etkin rol oynayan genlerde mutasyona sahip bireyler oluşturmaktadır (12).

Anormallikler genellikle ilk olarak frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda tespit edilmektedir ve daha sonra neokorteksin diğer bölgelerine yavaşça

ilerlemektir. Bu ilerleme ve birikim bireyler arasında önemli ölçüde değişen oranlarda gerçekleşmektedir (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1 Alzheimer hastalığının patolojik evrimi. (a. Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların histolojik görüntüleri b. Amiloid plakların ve nörofibriler yumakların hastalık ile birlikte oluşturdukları agregat şiddetini göstermektedir).

*doi:10.1038/nrdp.2015.56

Alzheimer hastalığı, çözünmeye dirençli amiloid-beta ($A\beta$) formlarının kan damarlarının duvarlarında ve plaklar halinde ekstraselüler matrikste birikmesiyle ve bir mikrotübül proteini olan tau'nun nörofibriler yumaklar halinde nöronlarda birikmesi ile ilişkilidir. $A\beta$ proteini, amiloid öncül proteininin (APP) γ -sekretaz ve β -sekretaz gibi proteolitik enzimler vasıtası ile kesimi sonucu oluşmaktadır. Hastalığın ortalama süresi 8–10 yıl olmak ile birlikte, presemptomatik evrenin yirmi yıldan uzun sürdüğü de göz önünde tutulmalıdır. Sporadik Alzheimer hastalığı en sık görülen tiptir ve ortalama seksenli yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın ana nedeni olarak beyin dokusundaki $A\beta$ peptidinin temizlenmesinde karşılaşılan problem gösterilmektedir. Bununla birlikte, serebrovasküler hastalıklar ve hipokampal skleroz gibi komorbiditeler bu yaşta sık görülmektedir ve bu da hastalığın tanı ve yönetimini güçleştirmektedir. Aynı zamanda Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve frontotemporal demans gibi diğer moleküler olarak tanımlanmış nörodejeneratif hastalıklarla birçok özelliği paylaşmaktadır. Önemli farklılıklarından biri ise Alzheimer hastalığının 70 ile 90 yaş arasında açıkça tanımlanabilir bir tepe insidansına sahip olması ve sonrasında keskin bir azalma göstermesidir.

4.2.Klinik Bulgular

Alzheimer hastaları en çok sinsice ilerleyen hafıza kaybı şikâyeti ile kliniğe başvurmaktadırlar. Bu kayıp, yavaş ilerleyen davranışsal değişikliklerle ilişkili olabilmektedir. Özellikle erken dönem AH'nda temel nörolojik bulguların normal kabul edilebilecek aralıkta olması AH'nın erken döneminde nörolojik tanı aşamasını zorlaştırmaktadır. Bu yüzden AH'nın, diğer demans ve demans türevli nörodejeneratif hastalıklardan ayrılabilmesi için diğer hastalık etiyojilerine bakılarak iyi ayırıcı tanımlar elde edilmelidir (13). Hafıza kaybı şikayetleri meydana gelmeye başladıktan sonra hastalar görme bozukluğu, yönetici işlevlerinde bozulma ve dil bozuklukları gibi sorunları da yaşayabilmektedirler. Bunlarla birlikte spesifik olmayan nörolojik işaretler, kranial sinir anomalileri ve yürüme anomalileri normal yaşlanmaya kıyasla AH'nda daha sık görülmektedir (14). Erken dönem AH tanısı konulan hastalar genellikle daha az yönetici, dil veya görsel-işitsel disfonksiyona sahip olduklarından nörolojik muayenelerde tanı koymak zorlaşmaktadır. Daha ileri seviyelerde, AH ile ilişkili en sık görülen nörolojik işaretler miyoklonik hareketler ve Parkinsonizm, distoni, bradikinezi, tremor ve tardif diskinezi gibi ekstrapiramidal işaretlerdir (EPI) ve bunların varlığı hastalığın klinik ilerlemesini etkiler (13). Birçok çalışma, hastalığın erken evrelerinde ayırıcı tanı olabileceğinden EPI üzerine odaklanmıştır. Miyoklonik hareketler ise akşamları ya da uyurken daha sık görülmektedir (13). AH tanısına sahip hastalar arasında daha az yaygın olan, ancak biyopsi veya otopsi ile kanıtlanmış çalışmalarda sağ parietal lob sendromu, ilerleyici afazi ve fiziksel becerilerde bozulma da görülmektedir (15).

Psikotik semptomlar (örneğin halüsinasyonlar) ve yıkıcı davranışlar (örn. agresif davranış, psikomotor ajitasyon, dolaşım) AH tanılı hastalarda yaygındır (13).

Tanı konulurken sadece hastadan değil, hastayı iyi tanıyanlardan da eksiksiz anamnez alınması önemlidir. Ayrıca, AH'nın aile öyküsü veya diğer demans formları da göz önünde bulundurulmalıdır. AH tanısı konulan pek çok hasta karşılaştığı semptomların bir kısmını göz ardı edebilmekle birlikte bazı bulguları da inkar edebilmektedir. Alzheimer hastalığının erken döneminde, hasta ayrıca hastalığın seyirini kavrayabilir ve anlayışını koruyabilir.

4.3.Alzheimer Hastalığının Evreleri

AH ilişkili kortikal ve subkortikal nörofibriler değişiklikler, dağılım paterni ve lezyonların gelişim zamanına göre daha sıklıkla üç ana evrede incelenmektedir. Bu üç ana evre ise kendi içerisinde ikili ayrımlarla altı alt evreye bölünmektedir. Hiperfosforile tau proteininin büyük kısmının transentorinal ve entorhinal bölgelerde (I-II evreleri), limbik allokortekste ve bitişik neokortekste (evre III-IV) veya neokortekste ikincil ve birincil alanlarda (V-VI evreleri) tespit edilip edilmediği baz alınarak başlangıç teşhisi belirlenmektedir.

Birinci evrede lezyonlar transentorinal bölgede gelişir (16). Subkortikal çekirdekler (yani, bazal önbeyin magnoselüler çekirdekleri) lokal olarak kortikal tutulumun olmadığı durumlarda en erken değişiklikleri gösterirler (17). İkinci evrede lezyonlar entorhinal bölgeye yayılım gösterirler, transentorinal bölgeden entorhinal bölgeye, özellikle de yüzeysel hücresel tabakaya nüfuz eder. Oluşan dilatasyonlar geçici olarak, CA1'in stratum lacunosum bölgesinden içinden geçen apikal dendritlerde gelişir , dağınık nöritik plaklar CA1'de görülür (18).

Üçüncü evrede lezyonlar fusiform ve lingual gyri'nin neokorteksine uzanır. Transentorinal bölgeden lezyonlar fusiform ve lingual gyri'nin neokorteksine girer ve bu noktanın ötesinde belirgin bir şekilde azalır (18). Dördüncü evrede hastalık süreci daha çok neokortikal asosiyasyon alanına ilerler. Evre III'te etkilenen bölgelerde lezyon yoğunluğu artar. Patoloji, geniş ölçüde olgun neokorteksin içine uzanır. Neokortikal nöritik plakların immünoreaktivitesinde hafif bir azalma, transentorinal bölgeye bakan sınırdan başlayarak fark edilebilir (18).

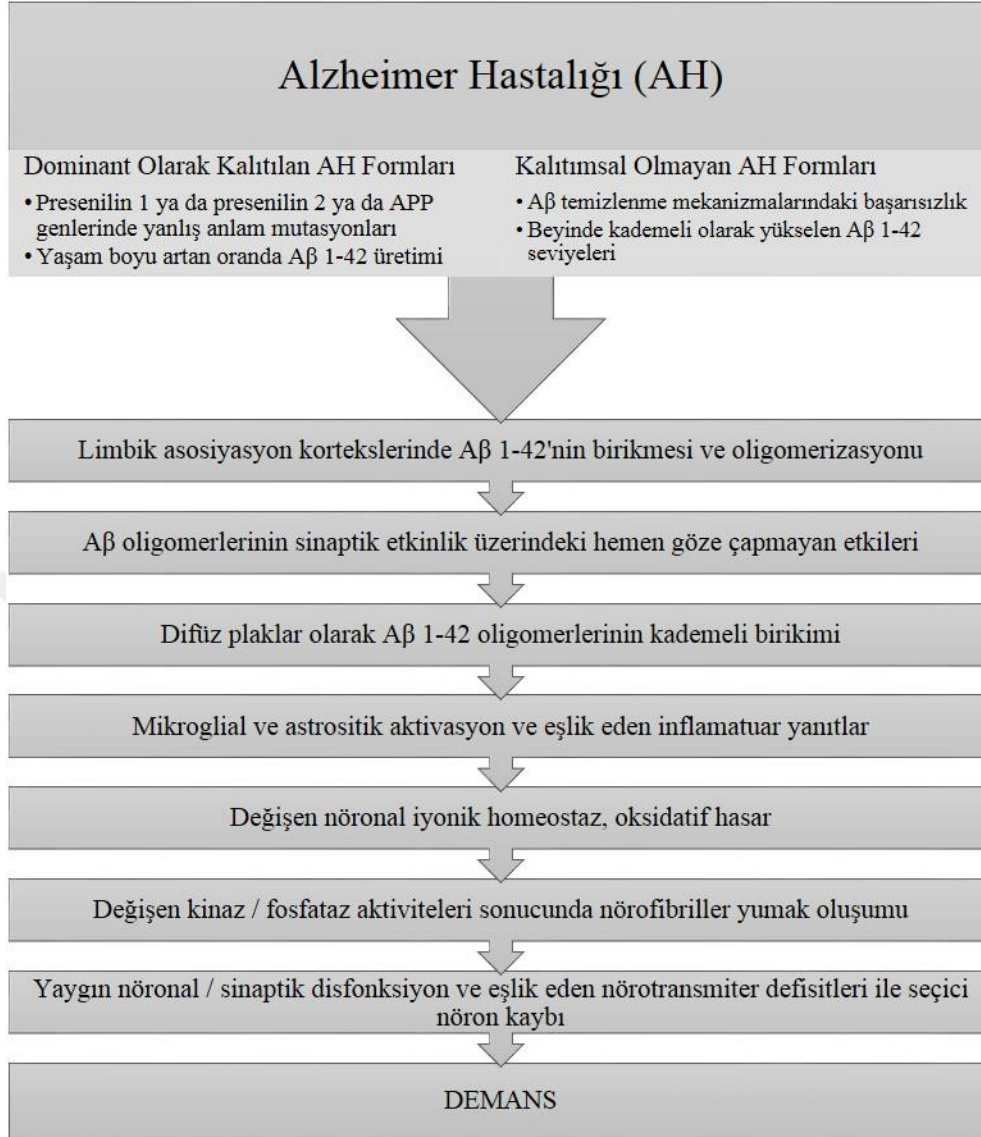
Beşinci evrede neokortikal patoloji frontal, superolateral ve oksipital yönlerde uzanır ve peristriatal bölgeye ulaşır. IV. Evrede yer alan bölgelerden lezyonlar şimdiye kadar hiç karşılaşılmamış alanlarda ortaya çıkar ve frontal, parietal ve oksipital neokorteksin yüksek dereceli asosiyasyon bölgelerine kadar geniş ölçüde uzanır (18). Altıncı evrede ise patoloji sekonder ve primer neokortikal bölgelere ulaşır ve oksipital lobda striatum bölgesine uzanır. Neokorteksin çoğu bölgesi ve hemen hemen tüm tabakalar AT8-ir nöritleri ile dolar. Oksipital lobda, patoloji parastriatumu ve diğer striatal bölgelerini bozar (18).

4.4.Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

Alzheimer Hastalığı gibi temelinde çoklu genetik ve / veya çevresel faktörleri içeren nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojilerini açıklamak adına birçok hipotez öne sürülmüştür. Literatüre bakıldığında kolinerjik hipotez, A β hipotezi, tau hipotezi ve nöroinflamasyon hipotezi gibi hipotezler daha çok kabul görmektedir.

4.4.1.Amiloid kaskat hipotezi

Amiloid-Beta peptidi, AH'nın önemli ayırt edici unsurlarından biri olmakla beraber agregasyona yatkın yapısı nedeni ile hastalığın karakteristiğindeki intraserebral plaklarda sıklıkla rastlanmaktadır (19, 20). A β proteini, kromozom 21 üzerinde lokalize olan amiloid öncül proteini (APP) geni tarafından kodlanan proteinin proteolitik enzimler vasıtası ile kesimi sonucu oluşmaktadır (21-23). Hücrel çalışmalar ile beyin-omurilik sıvısı ve plazma üzerinden yapılan çalışmalar A β proteininin APP metabolizmasının normal bir ürünü olduğunu ve APP metabolizmasındaki anomalilerin A β biyokimyasında anormal değişikliklere yol açtığını ortaya koymuştur (24-26). A β 'nin fizyolojik metabolizması sadece beyinde değil, aynı zamanda böbreküstü bezi, böbrek, kalp, karaciğer, dalak, pankreas, kaslar ve çeşitli kan ve endotel hücreleri gibi periferik organlarda da meydana gelir (27, 28). APP mutasyonları, büyük ölçüde beyin parankiminin dışında olsa da, A β birikmesine neden olabileceği literatürde belirtilmiştir (29). APP üzerindeki mutasyonların çoğunluğu, α -sekretaz, β -sekretaz ve γ -sekretaz kesim bölgelerinde veya yakınlarında kümelenmiştir. Bu mutasyonlardan β -sekretaz ve γ -sekretaz bölgelerinde olanlar A β oluşumunu destekler (30-32). Ayrıca bu mutasyonlar A β 'nin agregasyonu ile amiloid plak oluşumunda etkin rol oynar (20). Bu mutasyonlara ek olarak, yapılan çalışmalar (33, 34) ışığında presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) üzerinde meydana gelen mutasyonlar ve AH ile ilişkili mutasyonlar hem APP prosesini arttıracığından (35) hem de plak oluşumuna etki edeceğinden önemli bir genetik risk altyapısı oluşturmaktadır (Şekil 4.4.1.1).

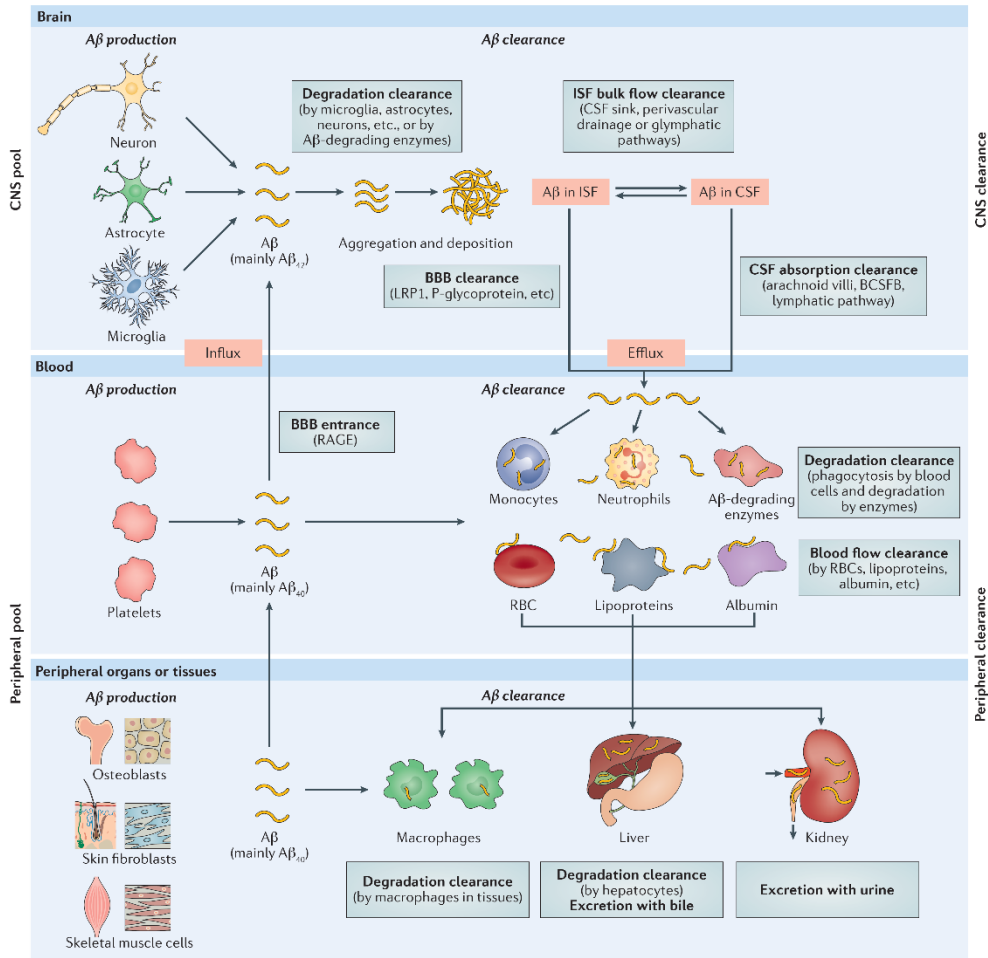


Şekil 4.4.1.1 Amiloid kaskat hipotezine göre AH'ye yol açan majör patojenik olaylar dizisi

Literatürde amiloid kaskat hipotezini destekleyen birçok veri bulunmaktadır. Tauopatiler, nörodejeneratif hastalıklarda en sık görülen patolojik bulgulardan olup beyinde tau agregasyonu görülen nörodejeneratif hastalıklar olarak tanımlanırlar (36). Tau proteinini kodlayan gendeki mutasyonlar, parkinsonizm ile birlikte AH'nın da içinde yer aldığı frontotemporal demansa neden olur (37). Bu tip nörodejeneratif hastalıklarda amiloid plaklardan ziyade hiperfosforile tau proteinlerinin agregatı ile oluşan intraselüler nörofibriller yumaklar görülmektedir. Moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte nörofibriller yumakların varlığının A β plak birikiminin indüklenmesi için yeterli olmaması gerçeği söz konusu yumakların A β metabolizmasının bozulmasından sonra biriktiğini düşündürmektedir (38). Bu bulgu,

değişime uğramış APP prosesinin, AH patojenik kaskadında tau değişikliklerinden önce gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (39). Ayrıca bu çerçevede amiloid kaskat hipotezini destekleyen bir çok literatürel veri de bulunmaktadır. APP mutasyonlarının çoğu, amiloidojenik özelliklere sahip olan 1-42 A β peptidinin aşırı üretimi ile sonuçlanır (40). APP'deki çoğu mutasyon, APP proses mekanizmasını değiştirir, böylece etkilenen hasta plazmalarında A β ₄₂/A β ₄₀ oranının artışı gözlemlenir (35) (Şekil 4.4.1.2).

Alzheimer Hastalığının önemli karakteristiklerinden biri sinaptik kayıplara bağlı nöron ölümleridir (41). Sinaps sayısındaki azalma, AH'ndaki demans değerlendirildiğinde en güçlü kantitatif nöropatolojik korelasyon olarak kabul edilmektedir. Geçtiğimiz on yılda yapılan çalışmalar, A β oligomerlerinin hem sinaptik yapıyı hem de sinaptik fonksiyonu bozduğunu göstermiştir.



Şekil 4.4.1.2 Aβ'nin beyin ve periferdeki fizyolojik metabolizması. Aβ beyindeki nöronlar, mikroglia ve astrositler tarafından ve periferde trombositler, deri fibroblastları, osteoblastlar ve iskelet kası hücreleri tarafından üretilir. Merkezi sinir sistemi (MSS) ve Aβ'nin periferik havuzları etkileşebilir; MSS'deki bazı Aβ peptidleri fagositoz veya proteolitik degradasyon yoluyla temizlenirken, diğerleri kan-beyin bariyeri (KBB), interstisyel akışkan (ISA) yığın akışı veya beyin-omurilik sıvısı (BOS) çıkış yolları ile kan içine salınır.

*doi:10.1038/nrneuro.2017.111

4.5.Oksidatif stres

Hücreler oksijen kullanarak ürettikleri enerjinin yan ürünü olarak bazı serbest radikaller üretir. Özellikle mitokondride elektron taşıma sistemi başta olmak üzere inflamasyona bağlı fagositik aktiviteler, bazı sentez ve yıkım reaksiyonları ve diğer faktörlerden çeşitli reaktif oksijen türleri (ROT) oluşmaktadır (42). ROT'lar, normal fizyolojik koşullar altında sinyal molekülleri olarak görev alabilmeleri birlikte yüksek enerjili olmaları nedeni ile aşırı miktarlarda üretildiklerinde nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi ana molekülleri oksitleyerek biyolojik sistemlere zarar

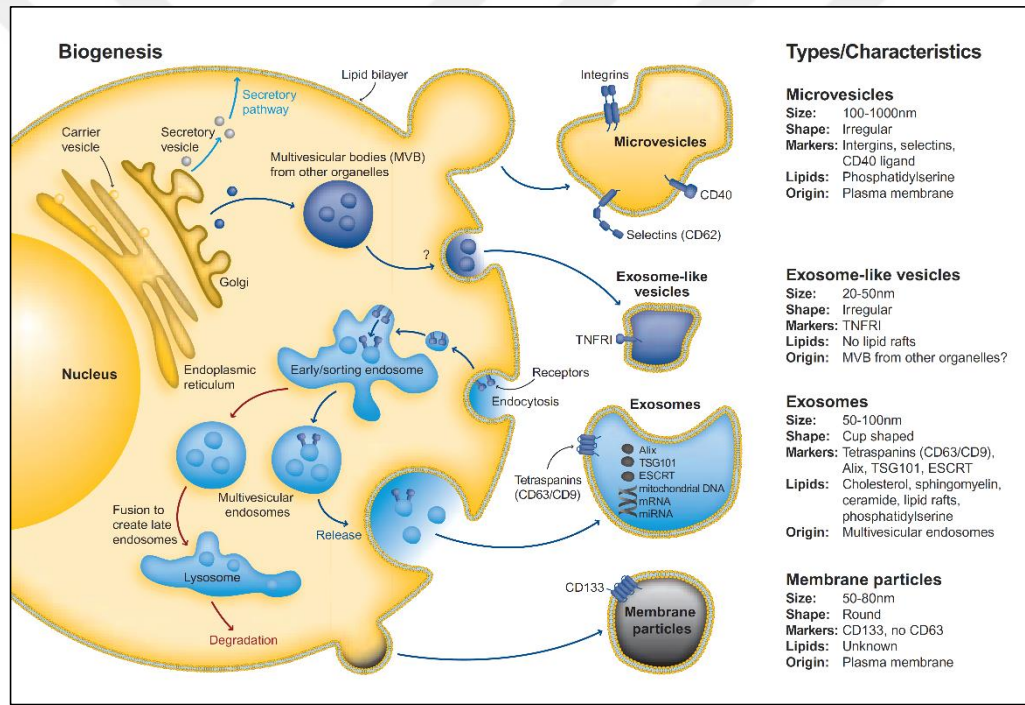
verebilmektedirler (43). ROT'nin, kimyasal özellikleri nedeni ile biyolojik sistemlerde oluşturdukları hasara oksidatif hasar denilmiştir (44). AH özelinde, ROT üretiminde redoks-aktif bakır ve demir gibi metaller, mikroglia aktivasyonu, amiloid beta, bazı glikasyon ürünleri, mitokondriyal anormallikler yer almaktadır (45). ROT, yapısı gereği yüksek oranda reaktif olması nedeni ile kararsızdır ve çok kısa bir yarı ömre sahiptir; bu da ROT'lerini doğrudan ölçmeyi zorlaştırır. ROT'nin oksitlediği biyomoleküller daha kararlı yapıda olduklarından belirteç olarak kullanılabilirler. Bunun yanında antioksidan seviyeleri ve antioksidan enzim aktiviteleri de ROT'nin ölçümünde dolaylı olarak yardımcı olabilmektedir.

Özellikle hücre ve organel membranlarının yapıları göz önüne alındığında, serbest radikaller kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyon vererek lipid peroksidasyonuna neden olurlar ve yan ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur (46). Bu molekül membran bileşenlerinde polimerizasyona yol açarak membran yapısında, iyon taşımında ve enzim aktivitelerinde bozulmalara yol açar. Tiyol radikalleri ise sülfür taşıyan radikaller olup disülfid bağ oluştururlar. Sülfür içeren amino asitlere sahip proteinler, bu radikaller ile tepkimeye girerek disülfid bağ oluşturabileceğince yapıları ve aktiviteleri bozulacaktır. Hidroksil radikalleri ise beş karbonlu şekerlerle ve bazlarla reaksiyona girerek çeşitli bozukluklara ve mutasyonlara neden olabilmektedir.

4.6. Eksozom ve Alzheimer Hastalığı

Eksozomlar çapları 50 ile 100 nm arasında değişen, çeşitli vücut sıvıları ve ekstraselüler alanlarda bulunan küçük membran vezikülleridir (2). Kendilerine özgü proteinleri ve lipid kompozisyonları tanımlanmalarında yardımcı olur. Endozomal orijinlerinin bir sonucu olarak eksozomların hemen hemen hepsi membran taşıma, Rab GTPazlar, Anneksinler, flotillin gibi füzyon proteinleri, Alix and TSG101 gibi multiveziküler cisimcik proteinleri, hsc70 ve 90 gibi ısı-şok proteinleri ve CD63, CD9, CD81 ve CD82 gibi integrin ve tetraspanin proteinlerini içerir (47). Özellikle Alix, flotillin, TSG101, CD63 gibi proteinler eksozomlarda zengince bulunduğu için eksozomal markör protein olarak kullanılmaktadır (48, 49). Farklı hücre tipleri tarafından salınan hücre dışı veziküllerin çeşitliliği, isimlendirme ile ilgili bazı kafa karışıklarına yol açmıştır. Endozomal orijin, eksozomları tanımlamak için yaygın

olarak kullanılan bir ölçüt iken, plazma membranından oluşma, mikrovezikülleri tanımlamak için de kullanılır (47). Fonksiyonel olarak incelendiğinde eksozomlar aynı anda farklı hücre yüzeyi reseptörlerini birleştirecek olan ligand kombinasyonlarını taşıyabilir. Bu olay, doğrudan hücre-hücre bağlantısına gerek duymadan hücreler arasındaki etkileşime benzer bir yapıda gerçekleşecektir. Daha sonrasında hedef hücre membranına bağlanarak yeni yüzey molekülleri kazandıracak ve hücreye potansiyel olarak yeni özellikler kazandıracaktır. Füzyon sonunda membran proteinleri ve sitosol iki hücre arasında taşınmış olacaktır (50). Eksozomların kargo olarak miRNA, mRNA, APP, A β ve tau proteinlerini taşıyarak hücreler arası iletişim ile birlikte A β ve tau patolojilerinin yayılmasını kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (1) (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6.1 Ekstraselüler veziküllerin biyogenezi ve karakteristikleri

*abcam.com sitesinden alınmıştır.

4.7. Bor Türevleri ve Alzheimer Hastalığı

Bor, doğal bir bileşik olmakla birlikte doğada genellikle borat formunda bulunmaktadır (3). Borat bileşikleri, borun oksijen ile bağlanmasından kaynaklanan bor-oksijen bileşikleridir. Hayvanlara uygulandığında, inorganik borat bileşikleri, borik asitlere biyotransforme edilir ve mukozal yüzeylerden emilmektedir. İnsanlara veya hayvanlara verilen boratın % 90'ından fazlası borik asit olarak atılmaktadır. Hem *in vitro* hem de *in vivo* sistemlerde borik asit, cis-hidroksil grupları için bir özdeşlik

göstermektedir (51). Bu özdeşlikler ile birlikte literatürde borun hayvanlar ve insanlar için gerekli bir mineral olduğu belirtilmiştir (52). Borun mineral metabolizmasında, immün yanıtta ve endokrin sistemde önemli fonksiyonları olduğu kabul edilmektedir (52), ancak işleyişi tam olarak açıklanamamıştır.

Borun, insanlarda ve hayvanlarda borik asit olarak vücut dokularında ve sıvılarında bulunduğu (4) ve beynin işlevini veya bileşimini, iskelet ve bağışıklık sistemini etkileyebilecek bir bileşik olduğu (5) çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur. Bor ile yapılmış bazı çalışmalarda, bor eksikliğinin bilişsel ve motor testlerde performansı düşürdüğü ortaya konmuştur (53).

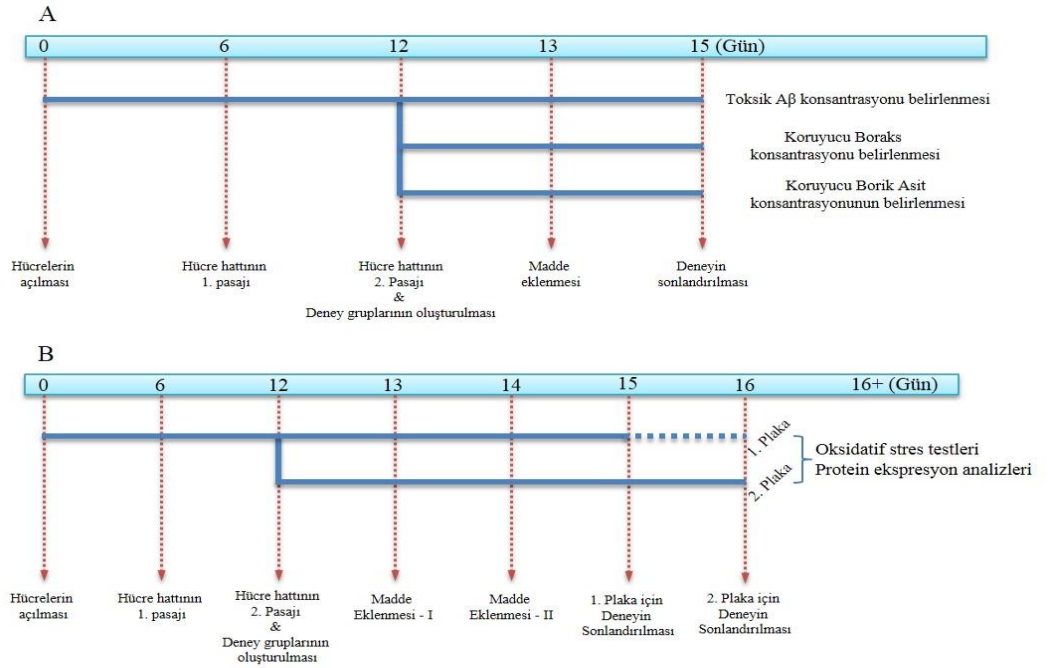
Borun enzimatik metabolizmasına bakıldığında enerji substrat metabolizması için gerekli olan en az 26 farklı enzimin aktivitesini etkilediği saptanmıştır (54). Ayrıca borat bileşiklerinin nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) inhibe ettiği (55, 56) ve NAD'ın hidroksil gruplarının borat bileşiği ile kompleksler oluşturduğu (57) çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD +) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP+), enerji metabolizmasında aktif olan riboz bileşenlerini içerirler ve bu bileşenlere bağlanmanın belirli metabolik yolları etkilediği bilinmektedir (52). NAD +, oksidoredüktaz enzimlerinin beş alt-alt sınıfı için temel bir kofaktör olduğu ve bor için güçlü bir afiniteye sahip olduğu literatüre bildirilmiştir (52).

Borun, serin proteazlar (hidrolazlar) veya oksidoredüktazlar kullanan bazı yolları kontrol etmede önemli bir role sahip olabileceği düşünülmektedir (52, 54). Bu enzimler piridin veya flavin nükleotitleri (NAD +, NADP veya FAD) ile kompleks oluşturarak, geçiş durumu analogları oluşturmalarından veya NAD veya FAD için rekabet etmelerinden dolayı, bor bileşenleri ile aktivelerinin düzenlenebileceği düşünülmektedir (52, 54). Alzheimer hastalığına yol açan moleküler nöropatolojik etkenlerden birinin de oksidatif stres ve bozulmuş enerji metabolizması olduğu bilinmektedir (58). Bor ve bor türevlerinin NAD, NADP veya FAD koenzimleri yolu ile hücresel enerji metabolizmasının etkinliğini ve verimini etkileme olasılığı düşünüldüğünde Alzheimer hastalığı patolojilerinin engellenmesinde, ortadan kaldırılmasında veya hafifletilmesinde olumlu rol oynayabileceği düşünülmektedir.

5-MATERYAL VE METOT

5.1.Deney Dizaynı

Yapılan çalışmada insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı kullanılmış olup proje iki ana aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada toksik 1-42 amiloid-beta ($A\beta_{1-42}$), koruyucu boraks ve borik asit konsantrasyonları belirlenmiştir. İkinci aşamada ise kontrol (herhangi bir işlem yapılmamış hücre grubu), sadece toksisite uygulaması (sadece $A\beta$) grubu, sadece boraks grubu, sadece borik asit grubu, toksisite uygulamasından önce uygulanan boraks grubu, toksisite uygulamasından önce uygulanan borik asit grubu, toksisite uygulamasından sonra uygulanan boraks grubu ve toksisite uygulamasından sonra uygulanan borik asit grubu şeklinde düzenlenen gruplara saptanan konsantrasyonlar uygulanmıştır. Deney sonlandırmalarını takiben laktat dehidrogenaz (LDH) ve oksidatif stres testleri yapılmıştır. Ekzozom ve protein izolasyonu yapılarak protein seviyelerinin analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.1.1).



Şekil 5.1.1 Deney dizaynı. **A.** Toksik $A\beta$, koruyucu boraks ve borik asit konsantrasyonlarının belirlenmesini zaman çizelgesi. **B.** Deney gruplarının oluşturulması ve moleküler çalışmaların yapılmasının zaman çizelgesi.

5.2.Hücre Kültürü

5.2.1.Hücrelerin çoğaltılması ve deneye hazır hale getirilmesi

İçerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS, FB-1001H/500, Biosera, ABD), %10 dimetil sülfoksit (DMSO, sc-358801, Chem Cruz, ABD) ve %1 Penisilin/Streptomisin (XC-A4122/100, Biosera, ABD) solüsyonu bulunan Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, LM-D1110/500, Biosera, ABD) içerisinde dondurularak -80 °C'de saklanan hücre stoğu, 37 °C olan su banyosunda çözündürüldü. Hücre stoğu, steril hücre kültürü kabini içerisinde (Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinets, Thermo Fisher Scientific, Almanya) içerisinde DMEM, %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin solüsyonu bulunan tamamlanmış besiyeri içerisinde alınarak DMSO'nun seyreltilmesi sağlandı ve 1500 rpm hızda +4 °C'de 5 dakika santrifüj (SL 16R, Thermo Fisher Scientific, ABD) edildi. Santrifüj sonrası üst faz atıldıktan sonra hücre pelleti 5 ml tamamlanmış besiyeri içerisinde çözündürüldü ve T25 flask (430168, Corning, ABD) adı verilen 25 cm² yüzey alanına sahip kültür kabına konularak %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıktaki hücre kültürü inkübatörüne (Forma™ Steri-Cycle™ CO₂ Incubators, Thermo Fisher Scientific, ABD) kaldırıldı. Kültür kabında tek katmanlı olacak şekilde büyütülen hücreler, yoğunlukları kabın tüm kültür yüzey alanı düşünüldüğünde yaklaşık %80 oranında kapladığı gözlemlendiğinde pasaj yapıldı. Pasaj prosedüründe, ölü hücre ve hücre atıklarının bulunduğu eski besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür kabı 2 ml magnezyum ve kalsiyum eklentisi olmayan steril fosfat tamponlu salin (dPBS) ile yıkandı ve dPBS ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür kabına 1 ml %0,25 Tripsin/EDTA solüsyonu (25200056, Gibco, ABD) eklenerek 3 dakikalık inkübasyon için %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıktaki hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı. Inkübasyon sonunda yüzeyden kalktığı gözlemlenen hücrelerin üzerine 5 ml tamamlanmış besiyeri eklenerek hücrelerin birbirinden ayrışması için pipetleme yapıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 15 ml santrifüj tüpüne aktarılarak 1500 rpm dönüş hızında +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Santrifüj tüpü içerisindeki hücre pelleti üzerine 5 ml tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetleme ile hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı. Yeni elde edilen hücre süspansiyonu 1:15 oranında seyreltilerek yeni kültür kabına konuldu ve %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıktaki hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı.

Pasaj protokolü öncesinde hücre kültürü için kullanılan invert mikroskop (Primo Vert, Carl Zeiss, Almanya) ve görüntü adaptörü (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Almanya) kullanılarak hücrelerin morfolojik açıdan değerlendirilmesi için 20x oranında büyütülmüş görüntüleri alındı.

5.2.2.Plakaların kaplanması ve deney başlangıcı

Hücrelerin daha iyi tutunabilmesi ve uzantılarını daha iyi yapabilmesi adına 6-kuyucuklu hücre kültürü plakaları (3516, Corning, ABD) Poly-L-Lizin (P4707, Sigma, ABD) ile kaplandı. Kaplama sürecinde 10 x konsantrasyonda olan Poly-L-Lizin solüsyonu steril ultra saf su (ddH₂O) ile 1 x konsantrasyon olacak şekilde seyreltildi. Her kuyucuk başına 1 ml 1 x Poly-L-Lizin eklendi ve kuyucuğun tamamını kaplaması için yayma yapıldı. Plakalar hücre kültürü kabini içerisinde oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda solüsyon kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 3 kez 1 ml steril ultra saf su ile yıkandı ve kabin içerisinde kurumaya bırakıldı.

Morfolojik yapıları uygun olduğu gözlenen hücreler eksozomal içeriğin araştırılması için planlanan deney prosedürüne alındı. Kültür kabındaki eski besiyeri ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml magnezyum ve kalsiyum eklentisi olmayan dPBS ile yıkandı ve dPBS'de ortamdaki uzaklaştırıldı. Kültür şişesine 1 ml %0,25 Tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek 3 dakika hücre kültürü inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. Kültür şişesinden toplanan hücreler 15 ml santrifüj tüpüne aktarılarak 1500 rpm dönüş hızında +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pellet 5 ml dPBS ile çözdürüldükten sonra yine 1500 rpm dönüş hızında +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Daha sonra hücre pelleti, içeriğinde DMEM, %10 Eksozom içermeyen FBS (A2720801, Gibco, ABD) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren 10 ml tamamlanmış besiyeri içerisinde çözdürüldü ve hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonundan alınan bir miktar hacim, mikrosantrifüj tüpünde 1:10 oranında tripan mavisi (15250061, Gibco, ABD) ile karıştırılarak 10 µl hacim hemositometreye (0630010, Marienfeld, Almanya) yüklenerek canlı hücre sayımı yapıldı. Hemositometre üzerinde bulunan dört bölgeden canlı hücre sayımı yapılarak elde edilen sayıların ortalaması alındı ve mililitrede bulunan toplam hücre sayısı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı;

Toplam Hücre Sayısı/ml = Bölgelerde sayılan hücrelerin ort. x 10⁴ x Besiyeri Hacmi (ml)

Kuyucuk başına 220.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve pasaj numarası 15 olan hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıktaki hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı.

Hücre ekiminden 24 ve 48 saat sonrasında ilgili kuyucuklara 1-42 amiloid beta peptidi (ab120301, Abcam Biochemicals, İngiltere) boraks (71997, Sigma-Aldrich, Almanya) ve borik asit (B6768, Sigma, Almanya) eklendi. 1. plaka 72 saat, 2. plaka ise 96 saat sonunda sonlandırılarak besiyeleri ve hücreler toplanarak eksozom ve protein izolasyonları yapıldı.

5.3.Toksik Amiloid-Beta Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Deneyde kullanılmak üzere ticari olarak satın alınan 1-42 amiloid beta peptidinin çözündürülmesi 1 ml %1 amonyum hidroksit (221228-M, EMD Millipore, Almanya) kullanılarak yapıldı ve stoğun son konsantrasyonu 1 mg/ml oldu. Aktif plak formunun oluşabilmesi için ise 37 °C sıcaklıktaki ısı bloğunda 48 saat inkübe edildi.

96-kuyucuklu hücre kültürü (3599, Corning, ABD) tabakasına kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işlemi takip eden 24. saatte üç kopyalı olacak şekilde 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda eklendi ve 72. Saat sonunda deney sonlandırılarak besiyerinden laktat dehidrogenaz (LDH) analizi yapıldı.

5.4.Uygun Boraks ve Borik Asit Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Deneyde kullanılmak üzere ticari olarak satın alınan boraks ve borik asit maddeleri 10 mg/ml stok konsantrasyonunda tamamlanmış besiyeri içerisinde çözündürüldükten sonra 0,22 µm por çapı olan steril filtrelerden (99722, TPP, İsviçre) geçirilerek sterilize edildi. 96-kuyucuklu hücre kültürü tabakasına kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işlemi takip eden 24. Saatte üç kopyalı olacak şekilde 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda eklendi ve 72. Saat sonunda deney sonlandırılarak besiyerinden LDH analizi yapıldı.

5.5.Laktat Dehidrogenaz (LDH) Analizi

Sitotoksik analiz için ticari olarak satın alınan Sitotoksisite Belirleme kiti (Cytotoxicity Detection Kit, 11644793001, Roche, Almanya) kullanıldı. Analiz metodu kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Toplanan besiyerlerinden 100 µl hacim alınarak yeni 96-kuyucuklu hücre kültürü tabakasının ilgili kuyucuklarına eklendi. Üzerlerine 100 µl hacimde reaksiyon solüsyonu eklendi ve karışması için pipetleme yapıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Chromate Reader 4300 (Awareness Technology, Palm City, ABD) cihazı kullanılarak 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak uygun konsantrasyonlar belirlendi.

5.6.Oksidatif Stres İndeksinin Ölçülmesi

Deneyde kullanılmak üzere ticari olarak satın alınan Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit (RL0024, Rel Assay Diagnostic, Türkiye) ve 3. Generation Total Antioxidant Status (TAS) Assay Kit (RL0017, Rel Assay Diagnostic, Türkiye) ile üretici prosedürlerine bağlı kalarak oksidatif stres indeksinin (OSI) ölçümü yapıldı.

Bu bağlamda TAS assay için, 96-kuyucuklu plakanın, üç kopyalı olacak şekilde planlanarak, kullanılacak her kuyucuğuna 100 µl hacimde test tamponu eklendi. Üzerlerine 6 µl hacimde standart ya da örnek koyularak pipetleme yapıldı ve Chromate Reader ile 630 nm dalga boyunda ilk absorbans ölçümü yapıldı. Sonrasında kullanılan tüm kuyucuklara 15 µl hacimde ABTS radical solüsyonu eklenerek pipetleme yapıldı ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İkinci absorbans ölçümü için yine Chromate Reader 630 nm dalga boyunda kullanıldı.

TOS testi için, ilk olarak çalışma solüsyonu hazırlandı. 50 µl hacimde Stock Stabilized Standart Solution alınarak 10 ml steril ultra saf su içersinde çözdürüldü. Daha sonra yeni hazırlanan solüsyondan yine 50 µl alınarak 10 steril ultra saf su içersinde çözdürüldü. 96-kuyucuklu plakanın, üç kopyalı olacak şekilde planlanarak, kullanılacak her kuyucuğuna 100 µl hacimde assay buffer eklendi. Üzerine 15 µl çalışma solüsyonu ya da örnek eklenerek pipetleme yapıldı ve Chromate Reader ile 530 nm dalga boyunda ilk absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrasında kullanılan tüm kuyucuklara Procromogen solüsyonu eklenerek karışması için pipetleme yapıldı. Karanlıkta oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra ikinci absorbans ölçümü için yine Chromate Reader 530 nm dalga boyunda kullanıldı.

5.7. Protein ve Eksozom İzolasyonu

5.7.1. Protein izolasyonu

Deneyi sonlandırılacak olan 6-well plate steril kabine alındı. Her kuyucuktaki besiyeri daha sonra eksozom izolasyonunda kullanılmak üzere önceden soğutulmuş ve etiketlenmiş ilgili 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Her ayrı kuyucuk önceden soğutulmuş kalsiyum ve magnezyum eklentisi olmayan 1 ml 1 x PBS ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuktaki hücreler yaklaşık 1 ml önceden soğutulmuş kalsiyum ve magnezyum eklentisi olmayan 1 ml 1 x PBS ile fişkirtme yöntemi kullanılarak plate tabanından kalkması sağlandı ve önceden soğutulmuş ve etiketlenmiş ilgili 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu mikrosantrifüj tüpleri 3000 rpm dönüş hızında 10 dakika +4 °C'de santrifüj (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası üst faz atıldıktan sonra hücre pelletleri, 1:100 oranında proteaz/fosfotaz inhibitör kokteyli (5872, Cell Signaling Technology, ABD) içeren lizis tamponu (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Triton-X-100, 0,5 M EDTA) içerisinde çözdürüldükten sonra buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda örnekler 14000 rpm dönüş hızında 15 dakika +4 °C'de santrifüj yapılarak üst faz önceden soğutulmuş ve etiketlenmiş yeni 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ölçüm için -20 °C buzdolabında saklandı.

5.7.2. Eksozom izolasyonu

Protein izolasyonu kısmında önceden soğutulmuş ve etiketlenmiş ilgili 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılan besiyerlerinden ticari olarak satın alınan Cell Culture Media Exosome Purification Mini Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada) kullanılarak eksozom izolasyonu yapıldı.

Toplanan besiyerlerinin her birinden 1,5 ml alınarak etiketlenmiş ve soğutulmuş yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Oda sıcaklığında 1000 rpm dönüş hızında 15 dakika santrifüj yapıldı ve üst faz yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Her bir tüpün üzerine 3,75 µl ExoC buffer ve 200 µl Slurry E eklendi, karışması için pipetleme ve vorteks yapıldı. Dik konumda oda sıcaklığında beş dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda pipetleme ve vorteks yapılarak 2000 rpm dönüş hızında iki dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılarak pellet üzerine 200 µl ExoR buffer eklendi, pipetleme ve vorteks yapıldı. Dik konumda oda sıcaklığında beş dakika

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda pipetleme ve vorteks yapılarak 500 rpm dönüş hızında iki dakika santrifüj edildi. Üst faz spin kolonuna transfer edildi ve 6000 rpm dönüş hızında bir dakika santrifüj edildi. Tüp içerisinde toplanan faz etiketlenerek immünopresipitasyon metodunda kullanılmak üzere -20 °C dondurucuda saklandı.

5.7.3.İmmünopresipitasyon metodu

Elde edilen eksozom verimini zenginleştirmek için immünopresipitasyon metodu uygulandı. PureProteome™ Protein A/G Mix Magnetic Bead (LSKMAGAG10, Millipore, Almanya) süspansiyonu içerisinde, örnek sayısı kadar, 50 µl alınarak 500 µl yıkama tamponu solüsyonu (%0,1 Tween-20 içeren PBS, pH:7,4) içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünde 3 kez yıkandı. Yıkama işleminde PureProteome™ Magnetic Stand (Millipore, LSKMAGS08, Almanya) kullanılarak manyetik boncukların toplanması sağlandı. Eksozom içeren mikrosantrifüj tüpleri kırık buz üzerinde çözülmesi sağlandı. Çözünen tüplerin içerisindeki eksozom içeriği manyetik boncukların olduğu mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerlerine üreticisinin önerdiği oran olan 1:50 oranda Alix (2171, Cell Signaling Technology, ABD) antikoru eklendi. Örneklerin oda sıcaklığında 30 dakika sürekli karışması sağlandı. İnkübasyon sonunda manyetik stand kullanarak antikor-antijen ilişkisi ile yakalanmış örneklerin toplanması sağlandı. Örnekler bu yöntem ile 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Invitrogen NuPAGE (NP0321PK2, Invitrogen, ABD) kiti protokolüne uygun olarak, toplam hacim 60 µl olacak şekilde LDS Sample Buffer (4 x), Reducing Agent (10 x) ve steril ultra saf su ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika ısı bloğunda inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde örnekler hemen kırık buza gömüldü ve western blot analizinde kullanılmak üzere -20 °C dondurucuda saklandı.

5.8.Western Blot

5.8.1.Protein konsantrasyonlarının ölçülmesi ve örneklerinin hazırlanması

Protein izolasyonu sonrasında -20 °C buzdolabında saklanan örnekler kırık buz üzerinde çözdürüldü. Pipetleme ile homojen yapıya getirilen örnekler 1:10 oranında steril ultra saf su ile seyreltildi. Spektrofotometrik ölçüm cihazı (İmpen, Almanya) kullanılarak 2 µl örnek ile protein miktar tayini yapıldı.

Örnekler, miktar tayini sonrası 20 µg/10 µl olacak şekilde hesaplandıktan sonra Invitrogen NuPAGE (NP0335BOX, Invitrogen, ABD) kiti protokolüne uygun olarak

LDS Sample Buffer (4 x), Reducing Agent (10 x) ve steril ultra saf su ile karıştırılarak 70 °C'de 10 dakika ısı bloğunda inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde örnekler hemen kırık buza gömüldü.

5.8.2. Western blot

Hazırlanan örnekler, NuPAGE %4-12 Bis-Tris jel (1.0 mm x 10 well) jelinin her bir kuyucuğuna 20 µg/10 µl olacak şekilde yüklenerek 110 V'da 15 dakika ve sonrasında 150 V'da 90 dakika olarak yürütülmüştür. Elektroforez işlemi bitiminde iBlot (Invitrogen, ABD) cihazı ve iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Regular (IB401001, Invitrogen, ABD) transfer kiti kullanılarak jellerdeki proteinlerin poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transferi gerçekleştirilmiştir. PVDF membranlar jel boyutlarında kesildikten sonra tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) ile hazırlanmış % 5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) 1 saat blokladı. Bloklama aşaması sonrasında kullanılacak primer antikorlar (p-akt (4051, Cell Signaling Technology, ABD), p-GSK3β (8566, Cell Signaling Technology, ABD), p-Tau (12885, Cell Signaling Technology, ABD), Sirt1 (9475, Cell Signaling Technology, ABD), eNOS (NB300-500, Novus Biologicals, ABD), p47phox (4312, Cell Signaling Technology, ABD)) 1:1000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde seyreltilerek +4 °C'de gece boyu 20 rpm sallantı hızında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda membranlar, TBS-T solüsyonu ile 3 kez beşer dakika yıkandıktan sonra bloklama solüsyonu içerisinde seyreltilerek hazırlanan ilgili sekonder antikor (anti rabbit (7074, Cell Signaling Technology, ABD) ya da anti Mouse (7076, Cell Signaling Technology, ABD)) oda sıcaklığında ışıktan etkilenmeyecek şekilde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bantların görüntülenmesinde deteksiyon solüsyonu (Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, WP20005, Invitrogen, ABD) kullanıldı ve ChemiDoc MP (Biorad, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

5.8.3. Stripleme

Membranlar strip solüsyonu (%73,7 ddH₂O, %20 Sodyum Dodesil Sülfat (10%), %0,007 β-merkaptioethanol) ile muamele edilerek 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından TBS-T ile 6 kez beş dakika boyunca yıkandı. Bloklama aşamasından itibaren izlenen protokol, farklı bir antikor

(t-akt (LS-C47763, LSBio, ABD), t-GSK3 β (5676, Cell Signaling Technology, ABD), t-tau (4019, Cell Signaling Technology, ABD), beta aktin (3700, Cell Signaling Technology, ABD), tsg-101 (sc-7964, Santa Cruz Biotechnology, ABD)) kullanılarak tekrar edildi. Örnek olarak; eNOS antikorunu kullanılarak görüntülenen membran striplendikten sonra beta aktin antikorunu kullanılarak tekrar görüntü alınmıştır.

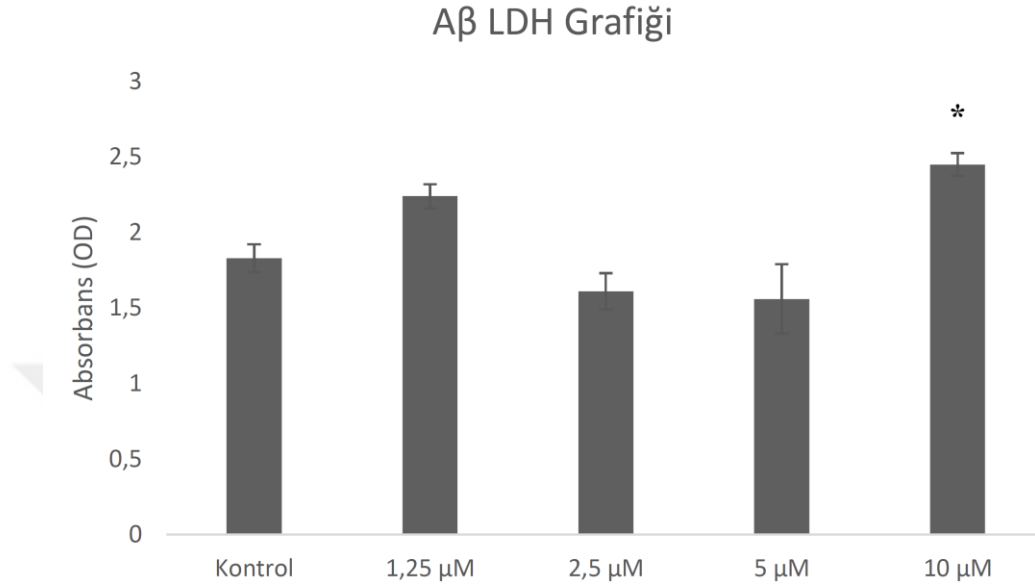
5.9. İstatistiksel Analiz

LDH testi sonunda elde edilen sonuçlar SPSS programında tek-yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirildi. Western blot sonunda elde edilen görüntüleme sonuçları ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Bant boyutlarının piksel bazlı optik yoğunluk değerlerinden zemin değeri çıkartılarak endojen kontrol olarak kullanılan beta aktin proteinine göre optimize edildi. Gruplar arasındaki değişimler tek-yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile Tukey post-hoc testi kullanılarak SPSS (version 18, IBM, ABD) programında değerlendirildi. İstatistiksel açıdan anlamlılık için $p < 0,05$ şartı arandı.

Elde edilen tüm değerler ortalama \pm standart sapma olarak verildi, * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi (59).

6-BULGULAR

6.1.Toksik Amiloid Beta Konsantrasyonunun Belirlenmesi



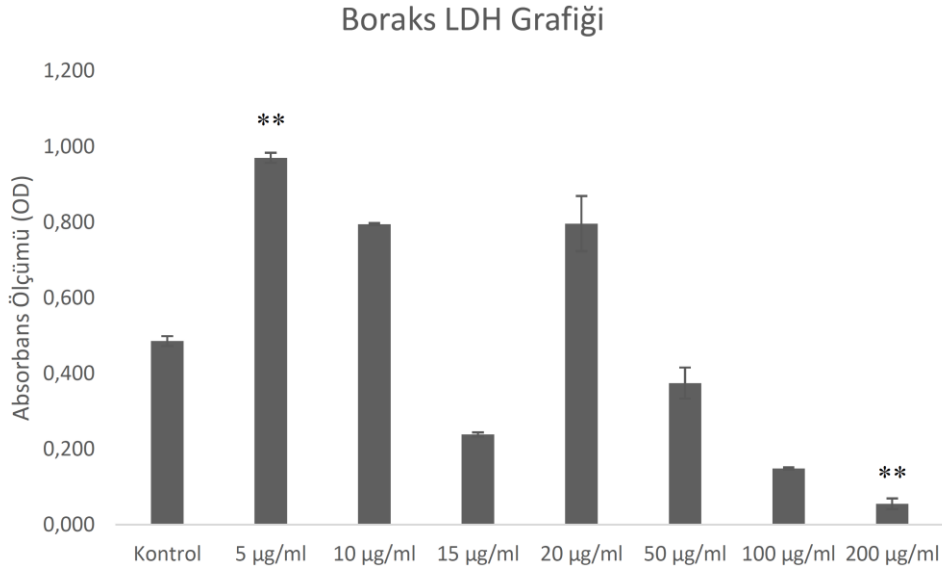
Şekil 6.1.1 A β LDH Grafiği. A β uygulamasından 48 saat sonra yapılan LDH testi sonrasında elde edilen sonuçlar. *p<0,05

Grafik, grubun yapmış olduğu “Melatonin affects the release of exosomes and tau-content in *in vitro* amiloid-beta toxicity model” isimli çalışmasından alınmıştır. #

Yapılan çalışmada metodolojide belirtilen konsantrasyonlar kullanılarak hücreler 48 saat A β_{1-42} peptidine maruz bırakılmış, 48 saat inkübasyon sonunda yapılan LDH testi sonucunda 10 μM konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

6.2.Boraks ve Borik Asit Maddelerinin Minimum Toksikite Dozunun Belirlenmesi

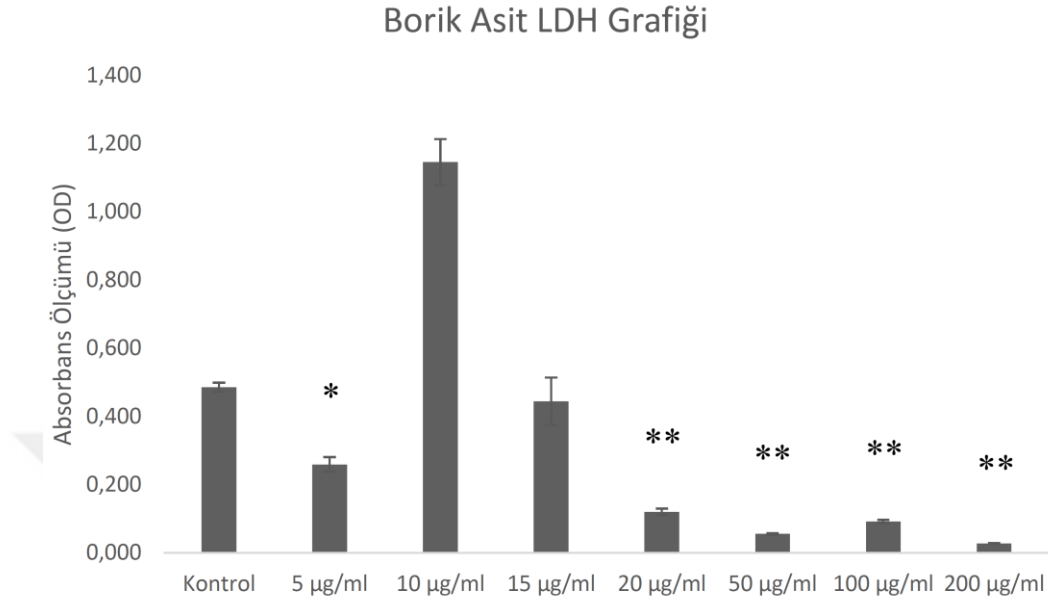
6.2.1.Boraks maddesinin minimum toksisite dozunun belirlenmesi



Şekil 6.2.1.1 Boraks LDH grafiği. Boraks maddesinin eklenmesinden 48 saat sonra yapılan LDH analizinden elde edilen sonuçlar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Boraks maddesinin minimum toksisite dozunun belirlenmesi için belirli konsantrasyonlarda madde denemeleri yapılmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 200 µg/ml ($p=0,010$) konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlılık görülmüştür.

6.2.2. Borik asit maddesinin minimum toksisite dozunun belirlenmesi

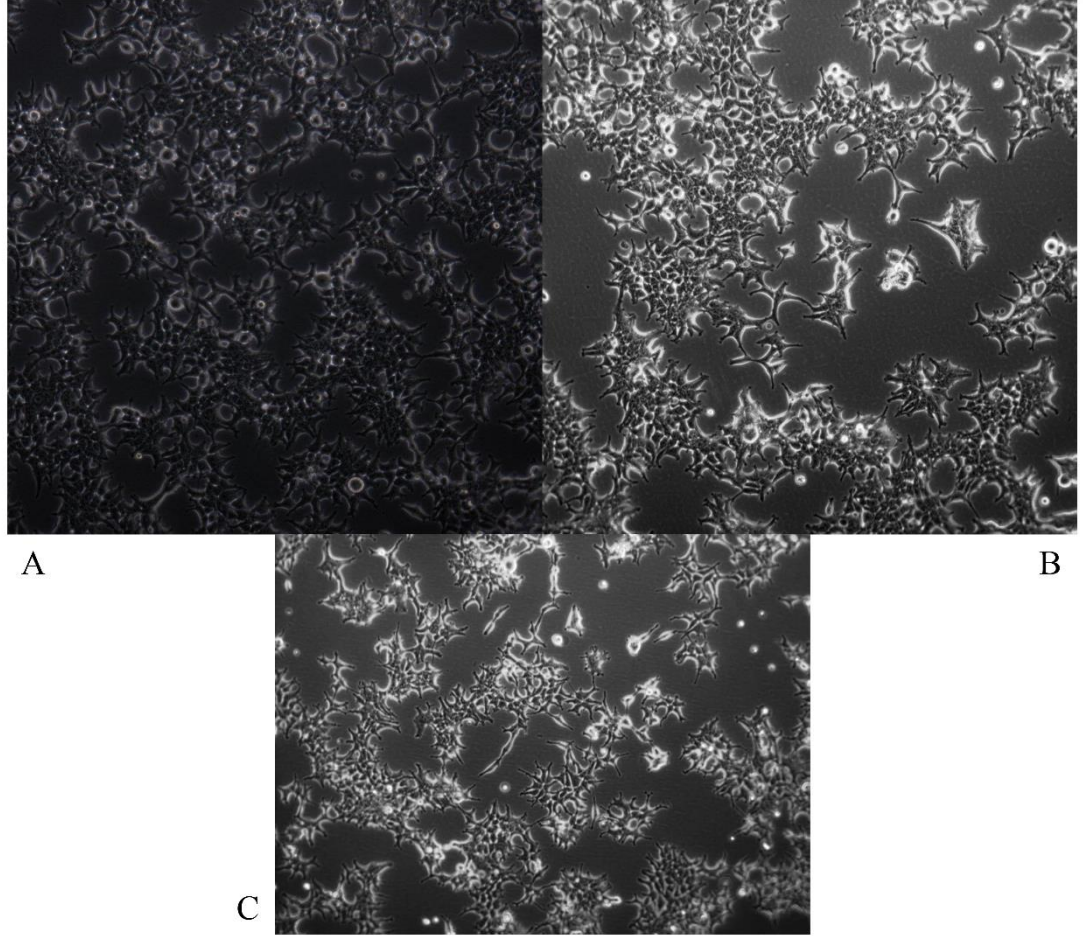


Şekil 6.2.2.1 Borik asit LDH grafiği. Borik asit maddesinin eklenmesinden 48 saat sonra yapılan LDH analizinden elde edilen sonuçlar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Borik asit maddesinin minimum toksisite dozunun belirlenmesi için belirli konsantrasyonlarda madde denemeleri yapılmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 µg/ml ($p=0,033$), 20 µg/ml ($p=0,026$), 50 µg/ml ($p=0,012$), 100 µg/ml ($p=0,028$) ve 200 µg/ml ($p=0,008$) konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlılık görülmüştür.

6.3.Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

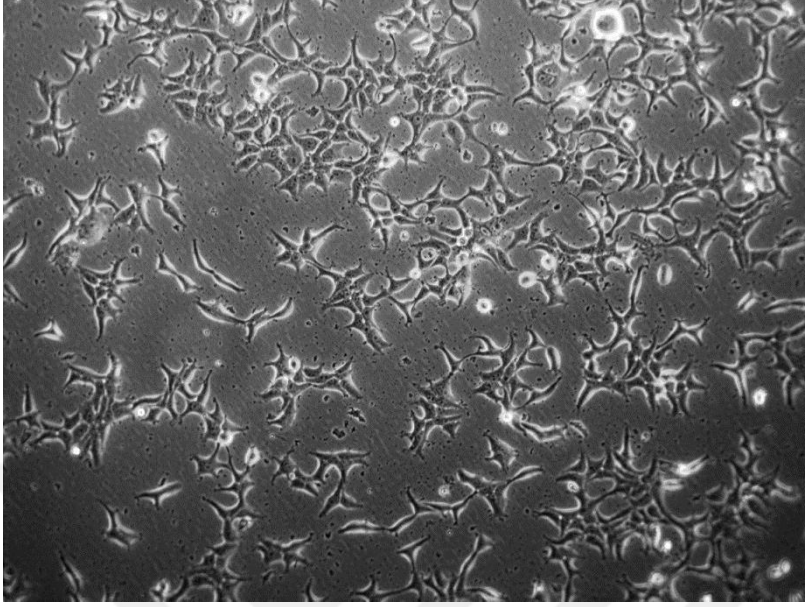
6.3.1.Deney başlangıcı öncesi hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi



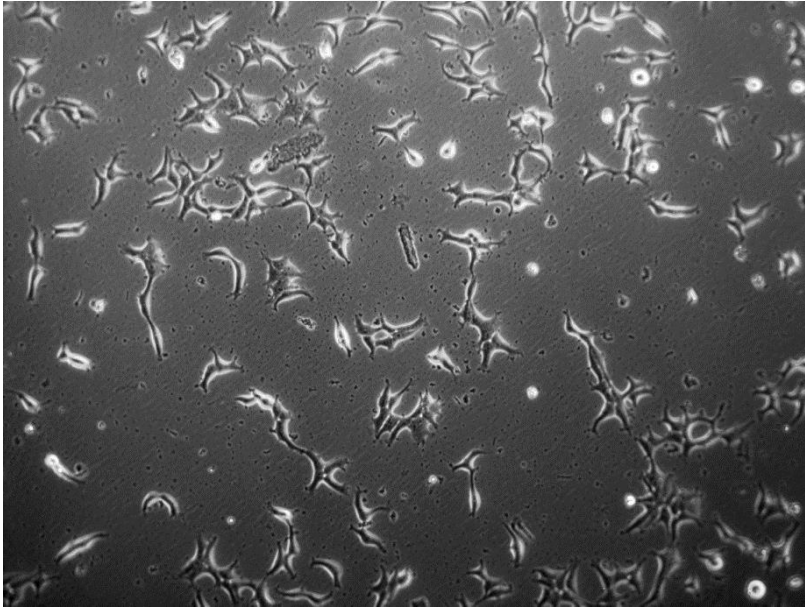
Resim 6.3.1.1 Deney başlangıcından önce SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri. **A.** Hücre hattının p:12 pasajından görüntü **B.** Hücre hattının p:13 pasajından görüntü **C.** Hücre hattının p:14 pasajından görüntü

Nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattının invert mikroskop (Primo Vert, Carl Zeiss, Almanya) ve görüntü adaptörü (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Almanya) kullanılarak 20x oramında büyütülmüş görüntüleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

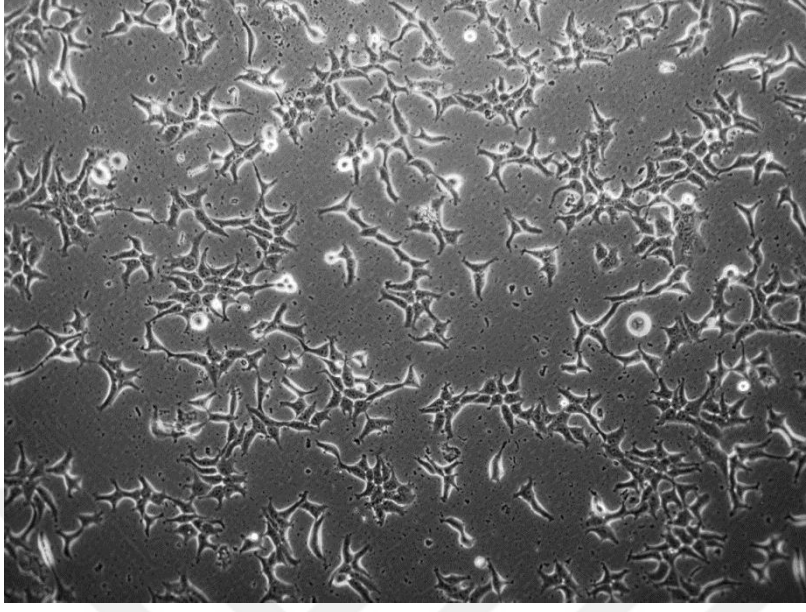
6.3.2.Deney başlangıcından 24 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi



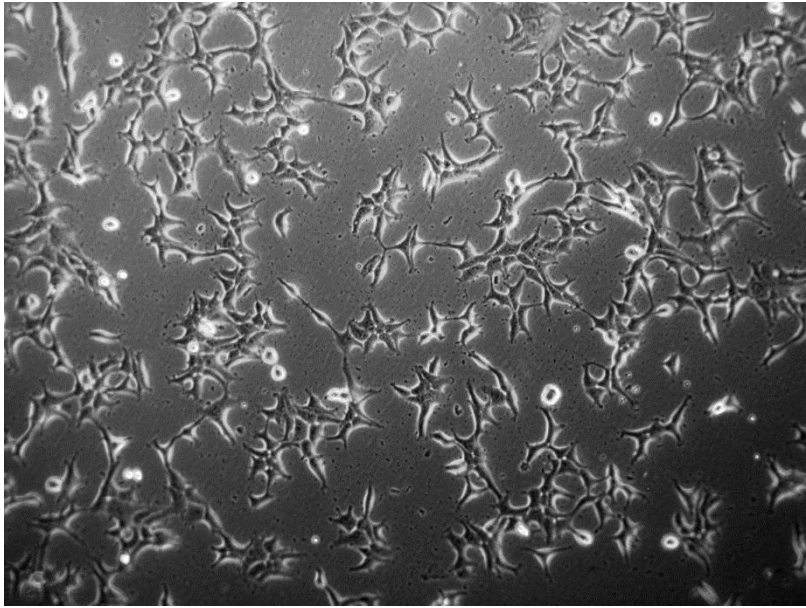
Resim 6.3.1.1 SH-SY5Y hücrelerinin kontrol grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



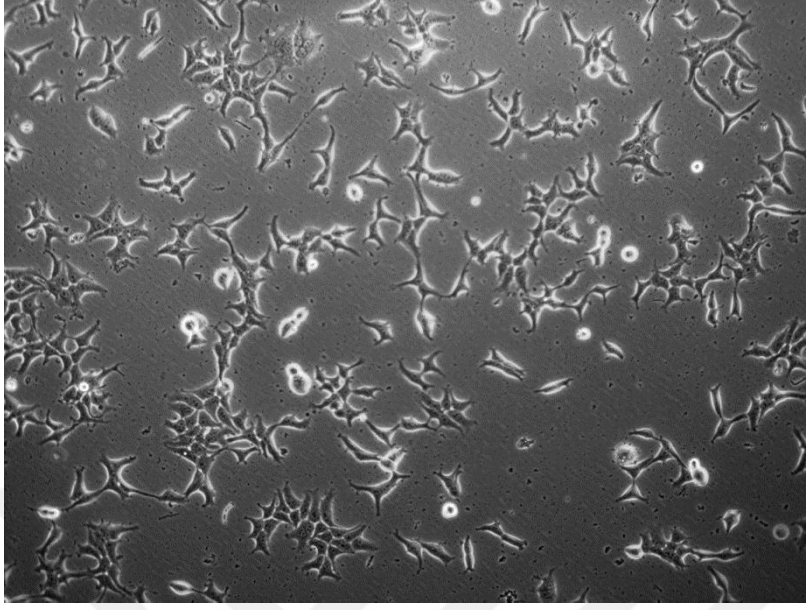
Resim 6.3.2.2 SH-SY5Y hücrelerinin sadece amiloid beta grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



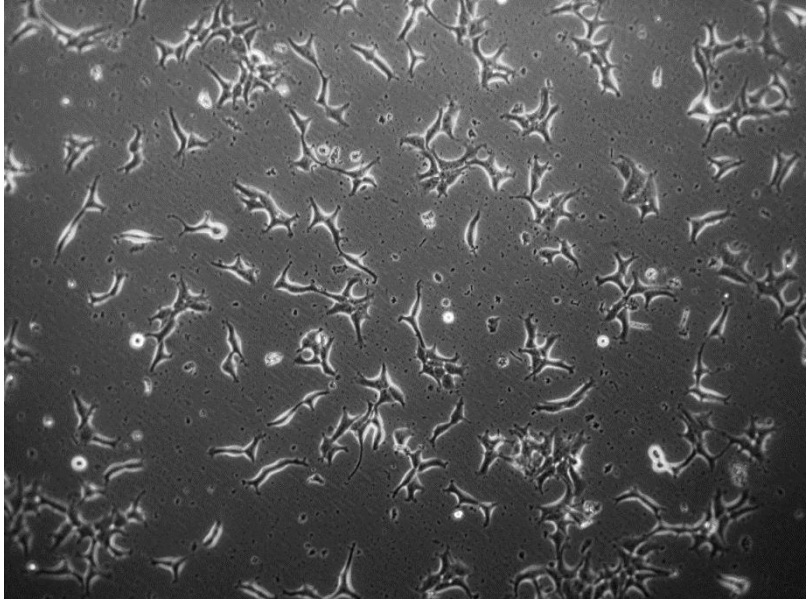
Resim 6.3.2.3 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



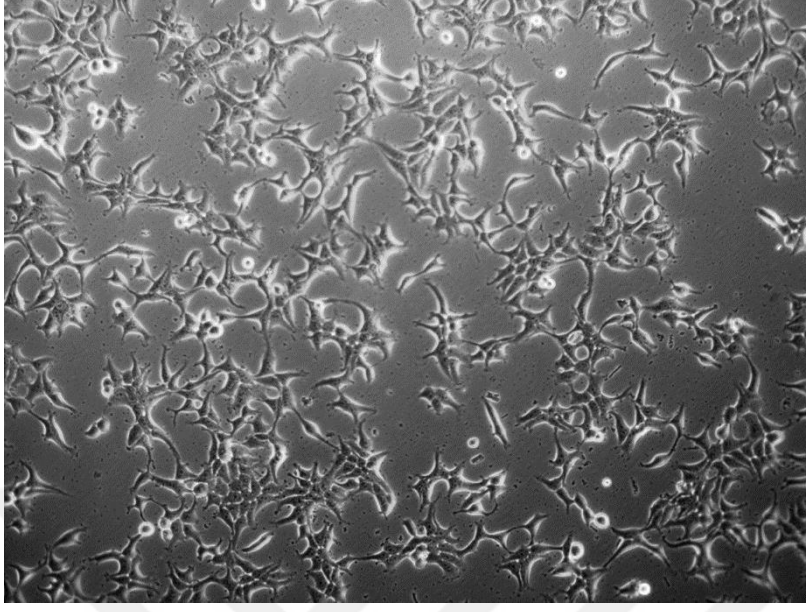
Resim 6.3.2.4 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



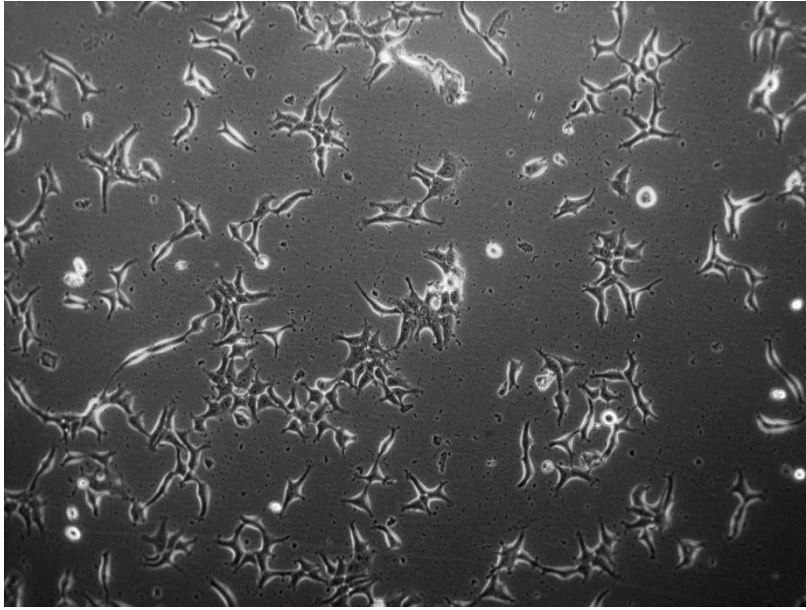
Resim 6.3.2.5 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



Resim 6.3.2.6 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



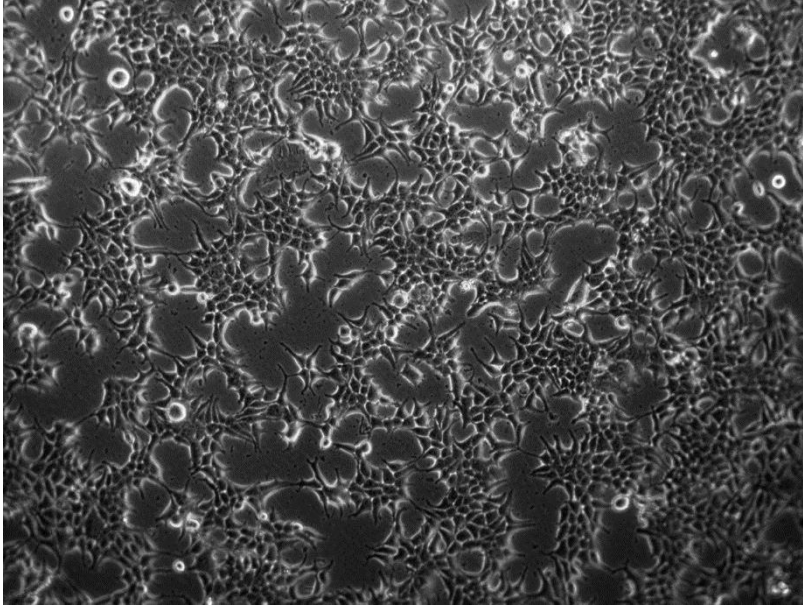
Resim 6.3.2.7 SH-SY5Y hücrelerinin sadece boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



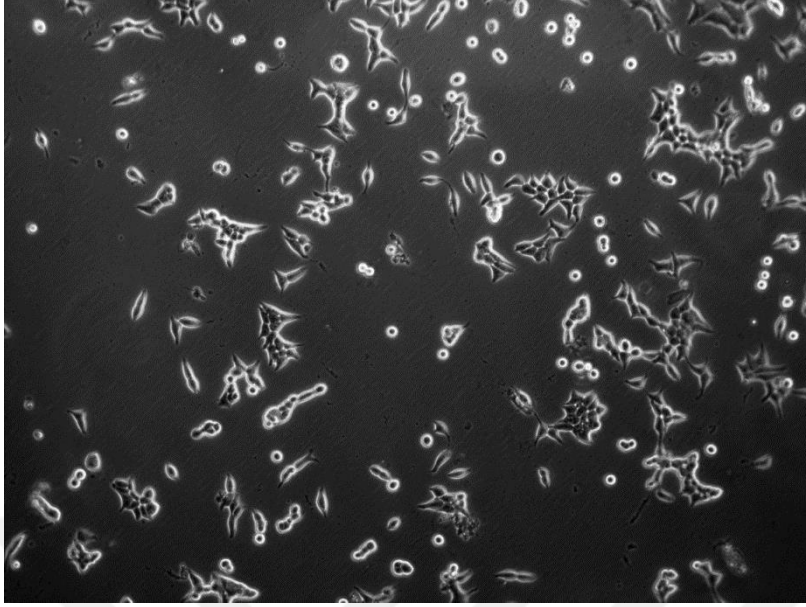
Resim 6.3.2.8 SH-SY5Y hücrelerinin sadece borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü

Pasaj numarası 15 olan SH-SY5Y hücre hattının, deney başlangıcından 24 saat sonra invert mikroskop ve görüntü adaptörü kullanılarak 20x oranında büyütülmüş görüntüleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

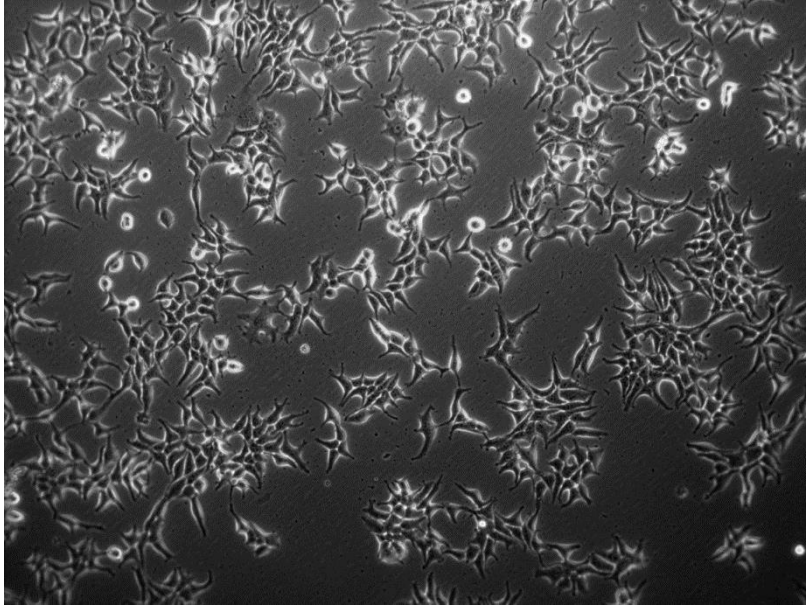
6.3.3. Deney başlangıcından 48 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi



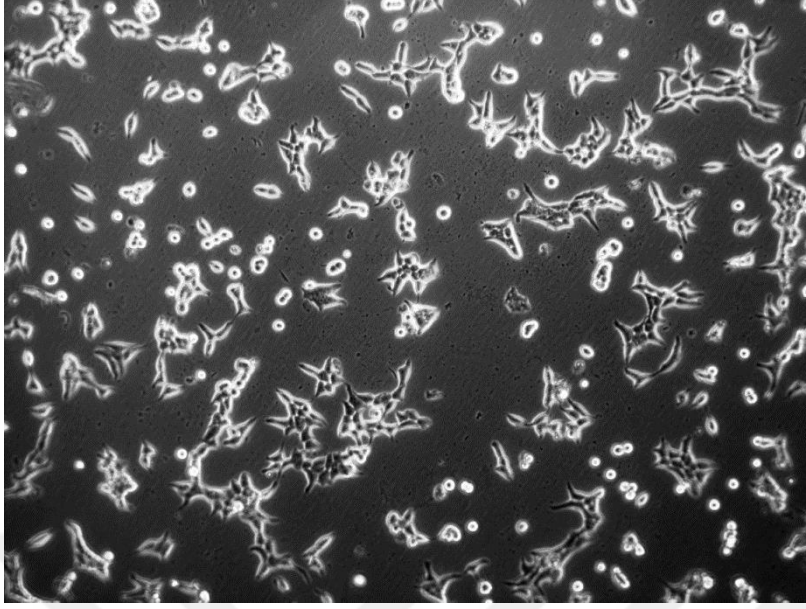
Resim 6.3.3.1 SH-SY5Y hücrelerinin kontrol grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



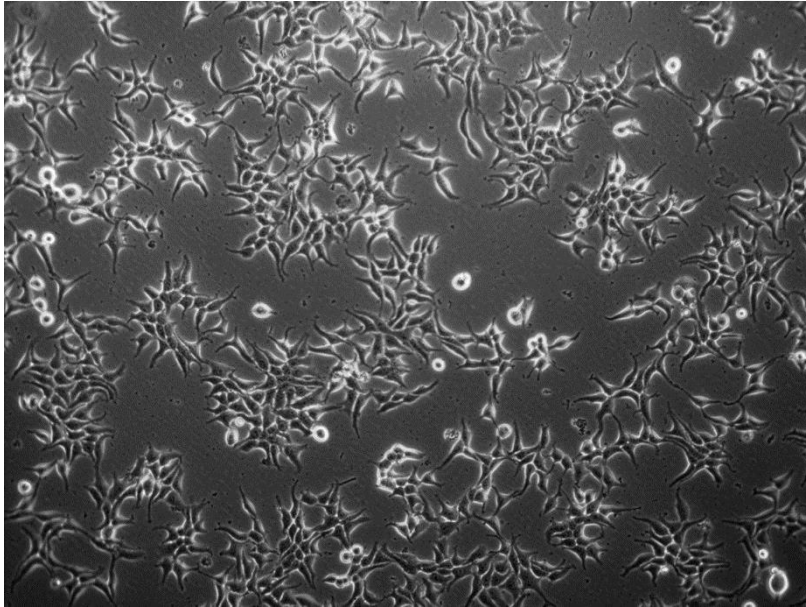
Resim 6.3.3.2 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisite grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



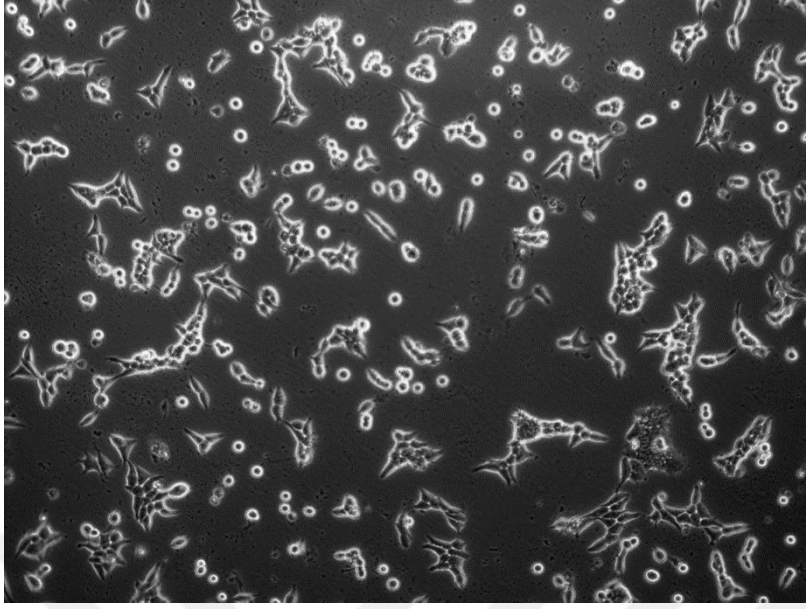
Resim 6.3.3.3 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



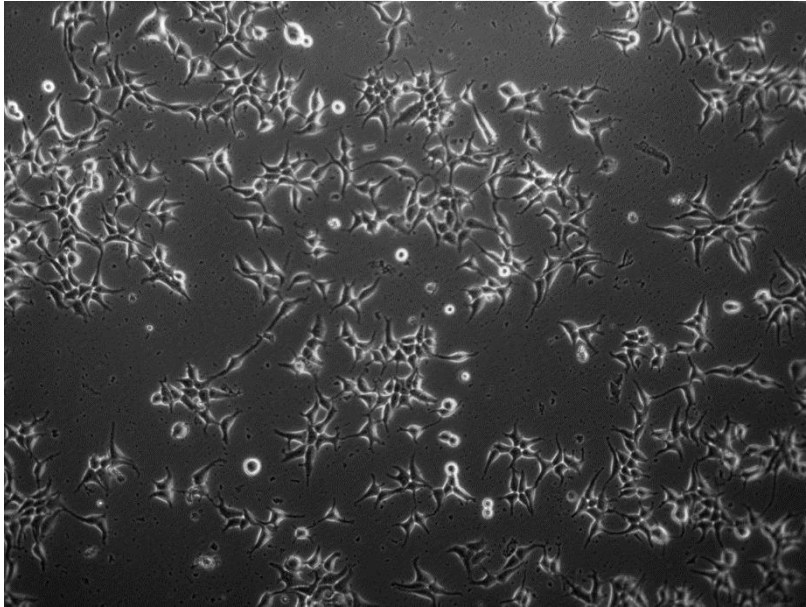
Resim 6.3.3.4 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



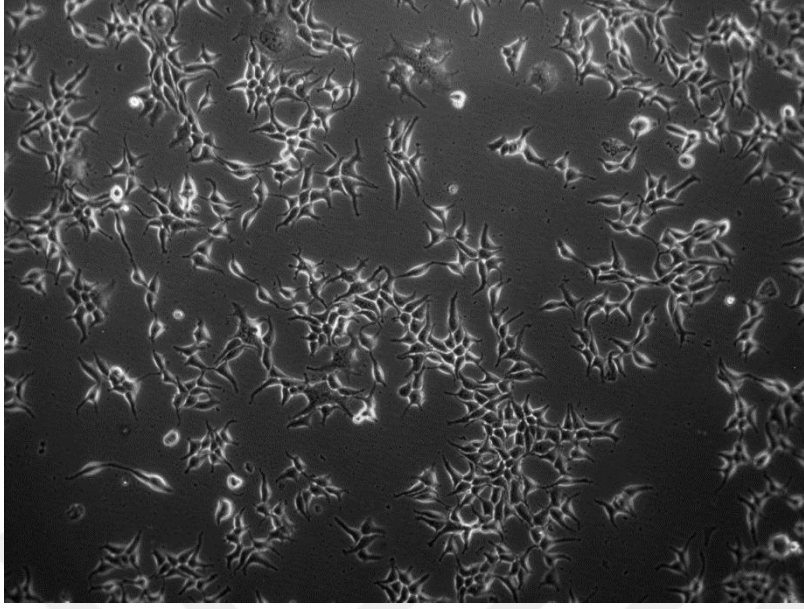
Resim 6.3.3.5 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



Resim 6.3.3.6 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



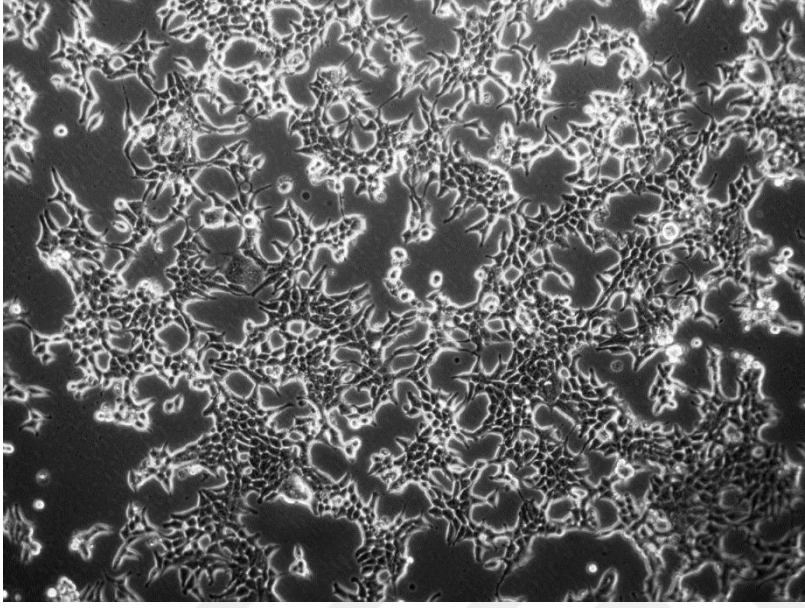
Resim 6.3.3.7 SH-SY5Y hücrelerinin sadece boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



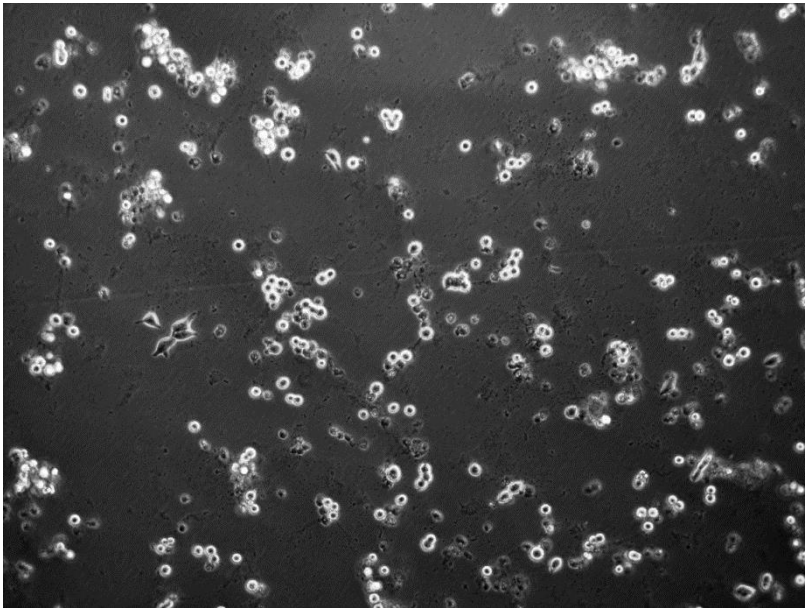
Resim 6.3.3.8 SH-SY5Y hücrelerinin sadece borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü

Pasaj numarası 15 olan SH-SY5Y hücre hattının, deney başlangıcından 48 saat sonra invert mikroskop ve görüntü adaptörü kullanılarak 20x oranında büyütülmüş görüntüleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

6.3.4.Deney başlangıcından 72 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi

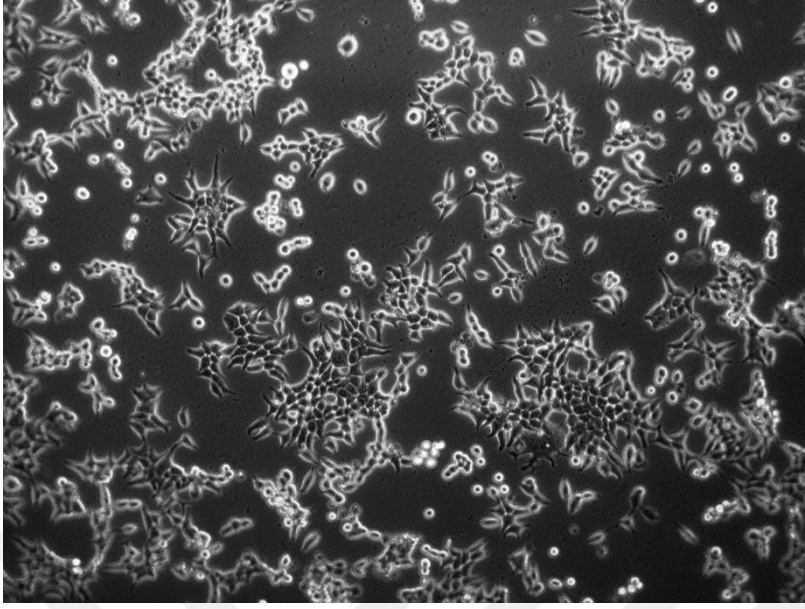


Resim 6.3.4.1 SH-SY5Y hücrelerinin kontrol grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü

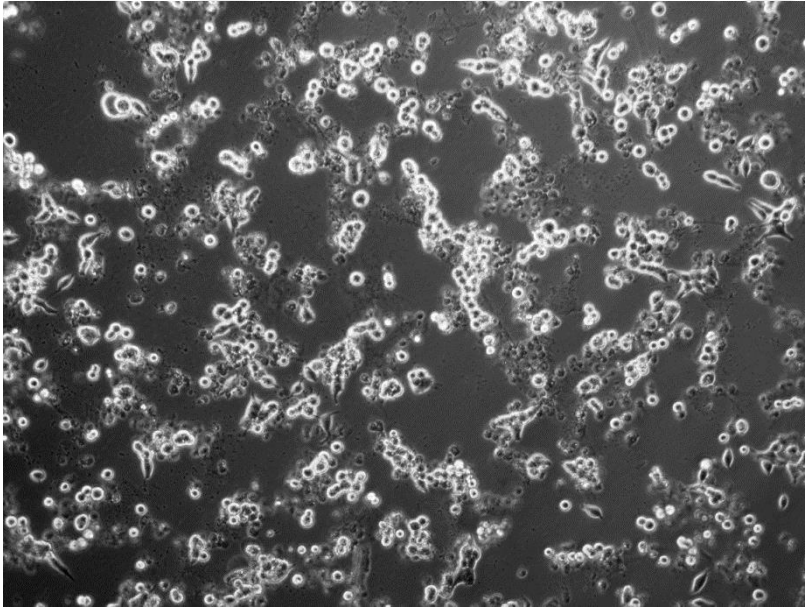


Resim 6.3.4.2 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisite grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü

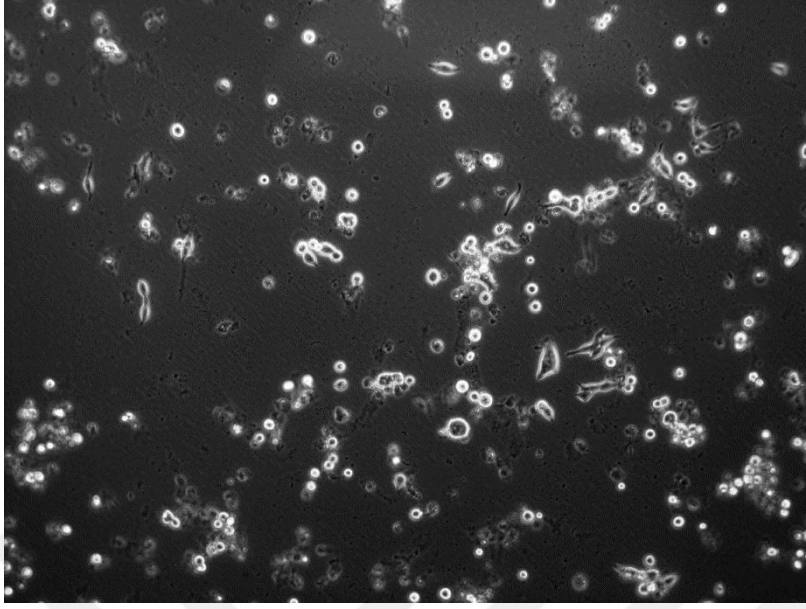
“



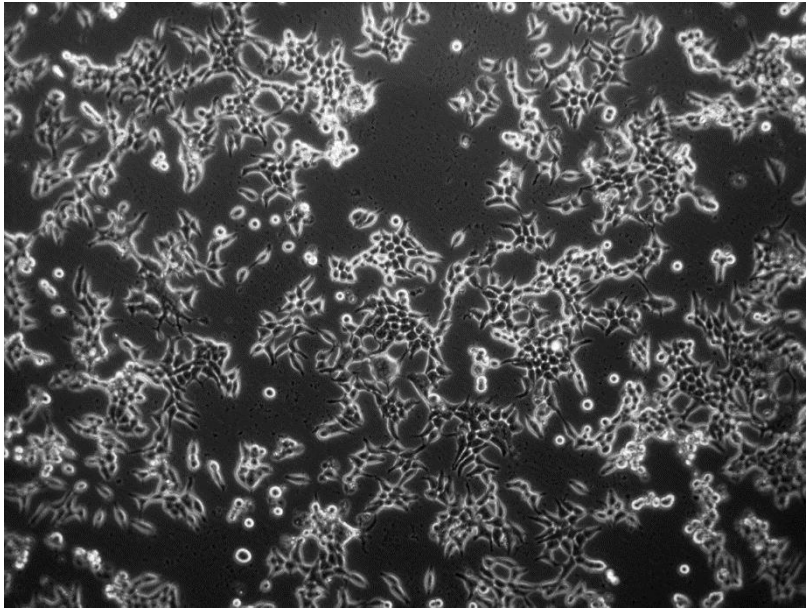
Resim 6.3.4.3 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



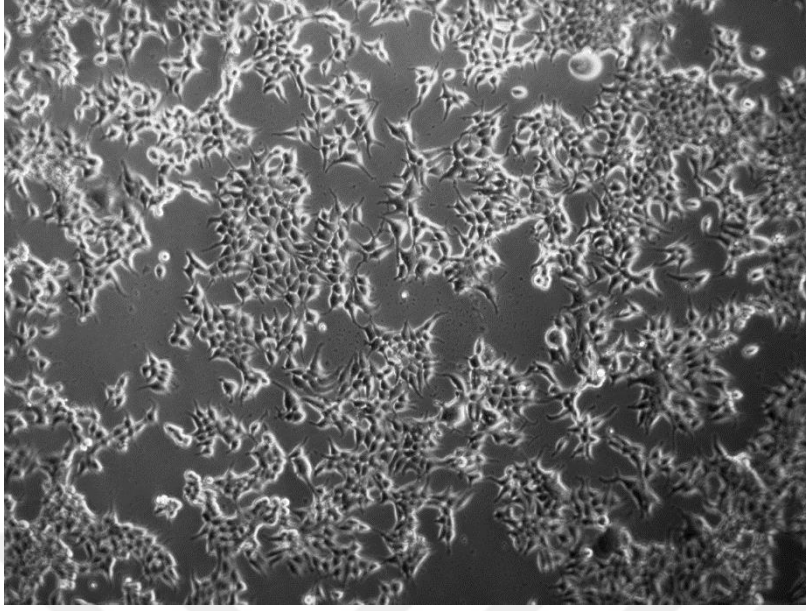
Resim 6.3.4.4 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



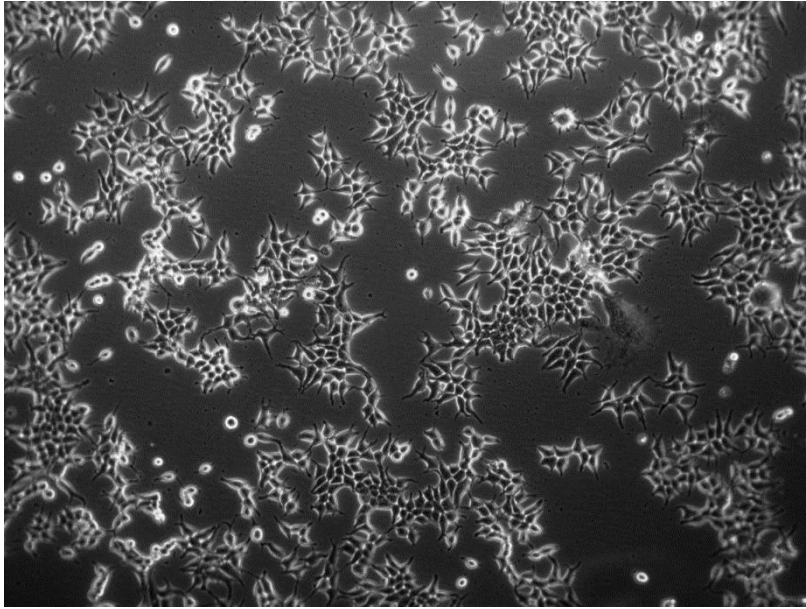
Resim 6.3.4.5 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



Resim 6.3.4.6 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden sonra borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



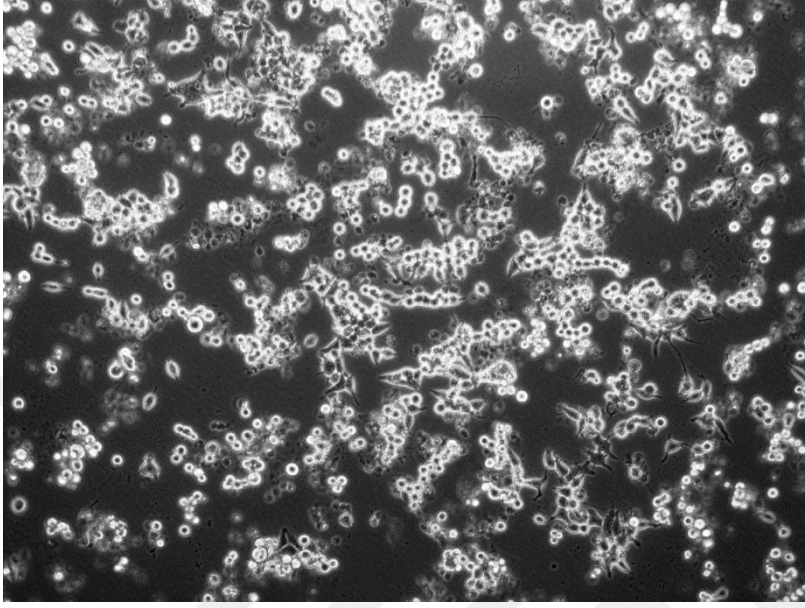
Resim 6.3.4.7 SH-SY5Y hücrelerinin sadece boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



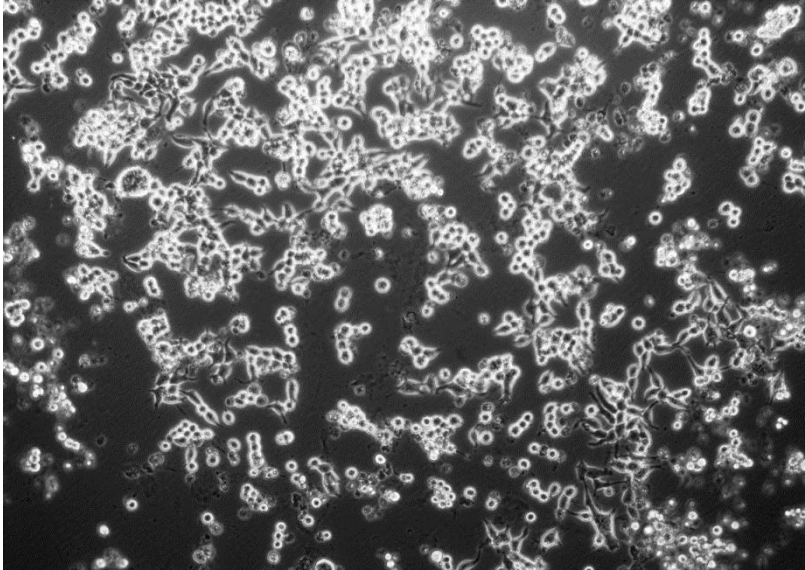
Resim 6.3.4.8 SH-SY5Y hücrelerinin sadece borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü

Pasaj numarası 15 olan SH-SY5Y hücre hattının, deney başlangıcından 72 saat sonra invert mikroskop ve görüntü adaptörü kullanılarak 20x oranında büyütülmüş görüntüleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

6.3.5.Deney başlangıcından 96 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi



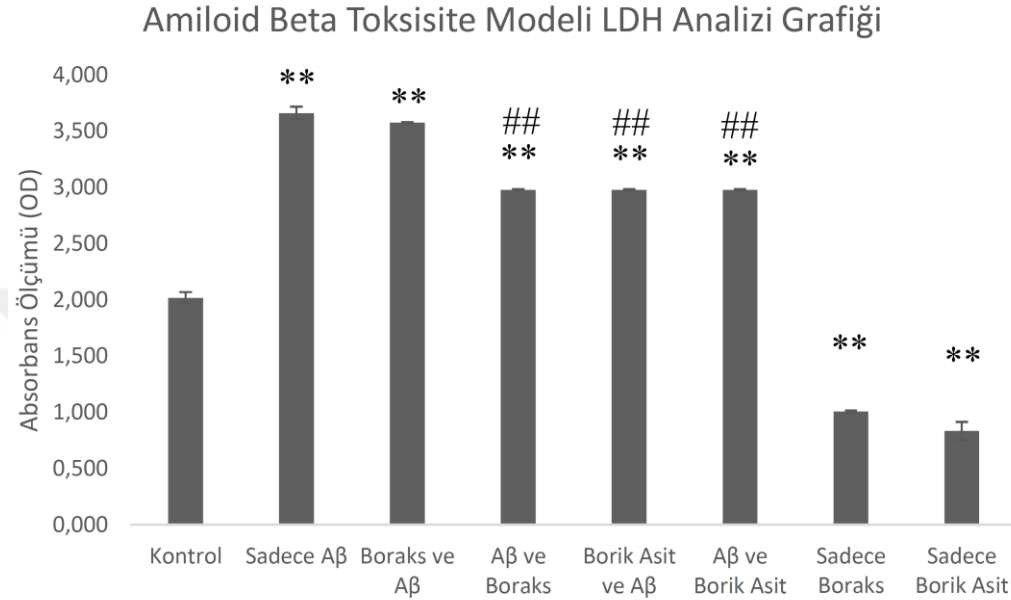
Resim 6.3.5.1 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce boraks eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü



Resim 6.3.5.2 SH-SY5Y hücrelerinin amiloid beta toksisitesinden önce borik asit eklenmiş grubunun 20x büyütülmüş morfolojik görüntüsü

Pasaj numarası 15 olan SH-SY5Y hücre hattının, deney başlangıcından 96 saat sonra invert mikroskop ve görüntü adaptörü kullanılarak 20x oranında büyütülmüş görüntüleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

6.4.Laktat dehidrogenaz Analizi



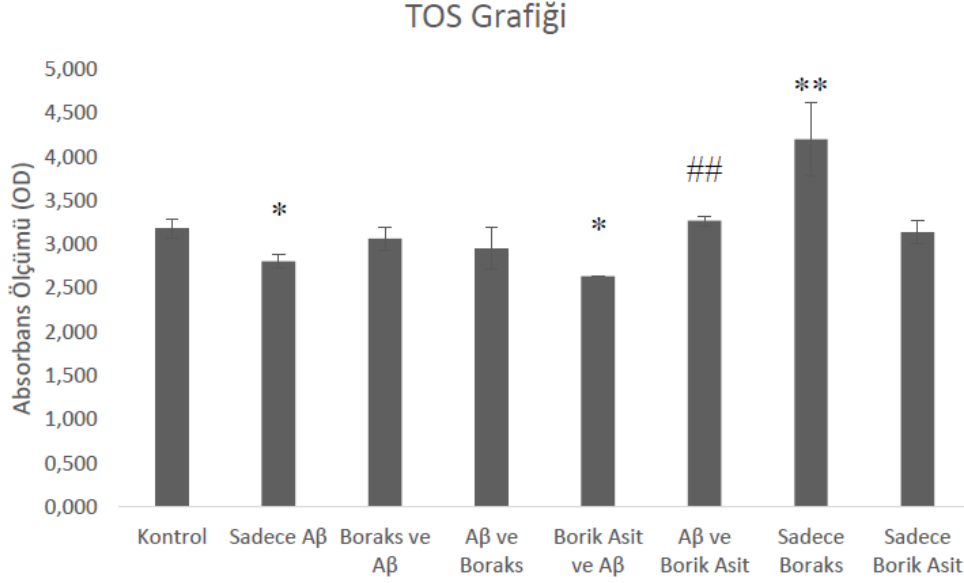
Şekil 6.3.5.1 Amiloid beta toksisite modeli LDH analizi grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucunda ki hücre canlılığı göstermektedir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ değerlerini ifade etmektedir

Deneyin sonlandırılması ile besiyerinden hücre canlılığı karşılaştırılması yapılması amacı ile LDH analizi yapılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında toksisite grubunda ($p=0,000$), toksisite uygulamasından önce eklenen boraks ($p=0,000$) ve borik asit ($p=0,000$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Sadece boraks ($p=0,000$) ve sadece borik asit ($p=0,000$) gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır.

Toksosite grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks ($p=0,003$) ve borik asit ($p=0,006$) gruplarında ve toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır.

6.5.Oksidatif Stres İndeksinin Ölçümü

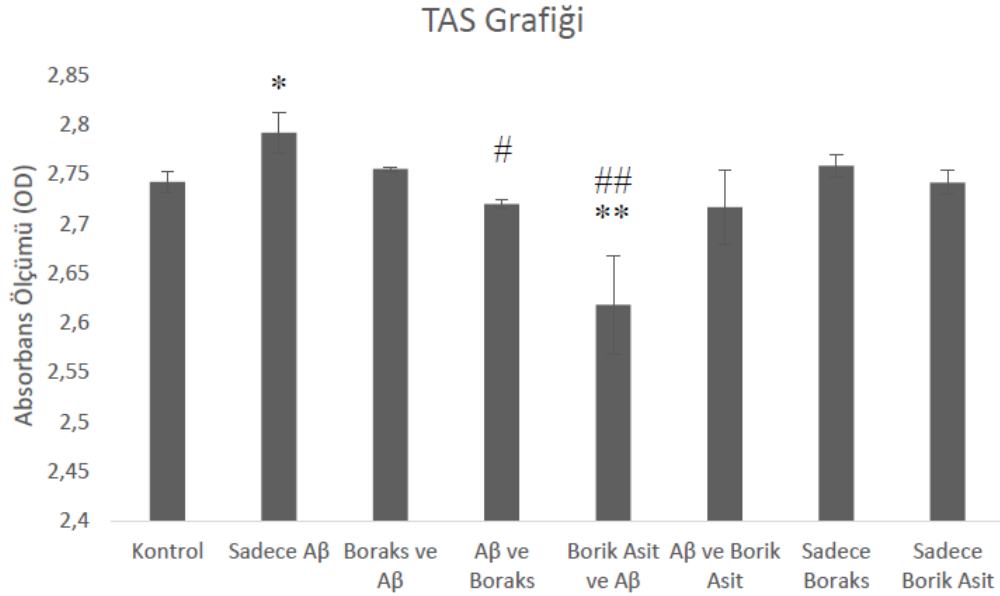
6.5.1.TOS ölçümü



Şekil 6.5.1.1 TOS analiz grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucundaki oksidan seviyesini göstermektedir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ değerlerini ifade etmektedir.

Toplam oksidatif durumun belirlenmesi için kolorimetrik ölçüm yapılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında toksisite grubunda ($p=0,049$) ve toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,011$) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma; sadece boraks eklenen grupta ($p=0,000$) ise istatistiksel olarak anlamlı derecede artış görülmüştür. Toksisite grupları kendi içerisinde kıyaslandığında toksisite uygulamasından sonra verilen borik asit grubunda ($p=0,010$) istatistiksel olarak anlamlı derecede artış görülmüştür.

6.5.2.TAS ölçümü

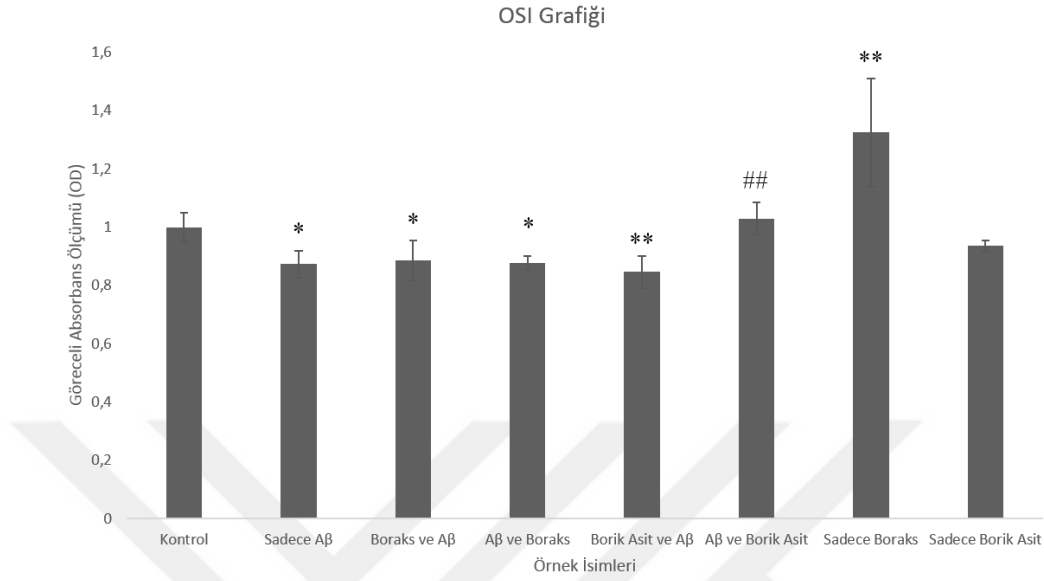


Şekil 6.5.2.1 TAS analiz grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucundaki antioksidant seviyesini göstermektedir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ değerlerini ifade etmektedir.

Toplam oksidatif durumun belirlenmesi için kolorimetrik ölçüm yapılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında toksisite grubunda ($p=0,045$) istatistiksel olarak anlamlı artış, toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür.

Toksisite grubu kendi içerisinde kıyaslandığında toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,013$), toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür.

6.5.3.OSI değerinin ölçümü



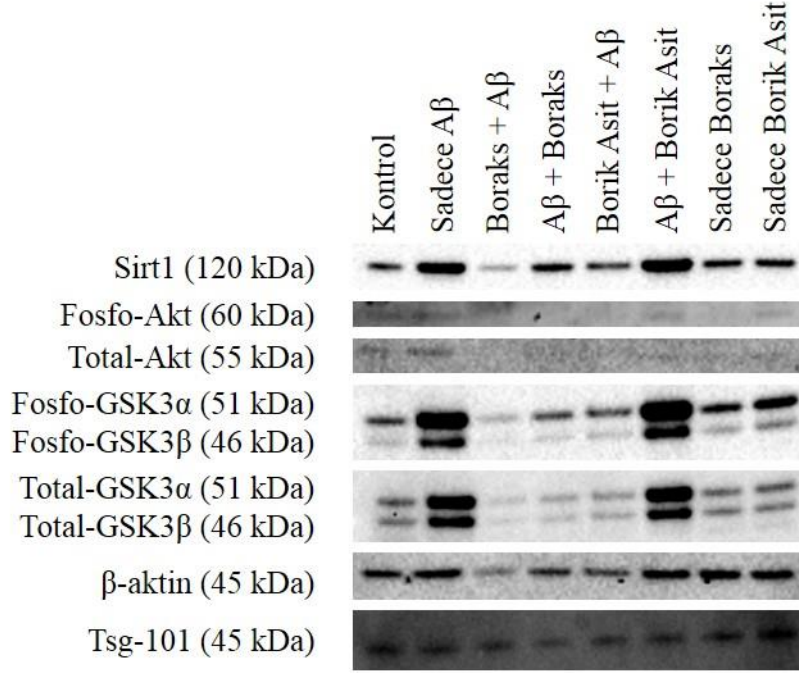
Şekil 6.5.3.1 OSI analiz grafiği. Deney grupları sonlandırıldıktan sonra yapılan testler sonucundaki oksidatif stres indeksini göstermektedir. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ değerlerini ifade etmektedir

Oksidatif stres indeksi TAS ve TOS sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında toksisite grubunda ($p=0,015$), toksisite uygulamasından önce eklenen boraks grubunda ($p=0,025$), toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,018$), toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı azalma, sadece boraks maddesinin verildiği grupta ($p=0,000$) ise istatistiksel olarak anlamlı artış görölmüştür.

Toksisite grupları grubu kendi içerisinde kıyaslandığında toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,005$) istatistiksel olarak anlamlı artış görölmüştür.

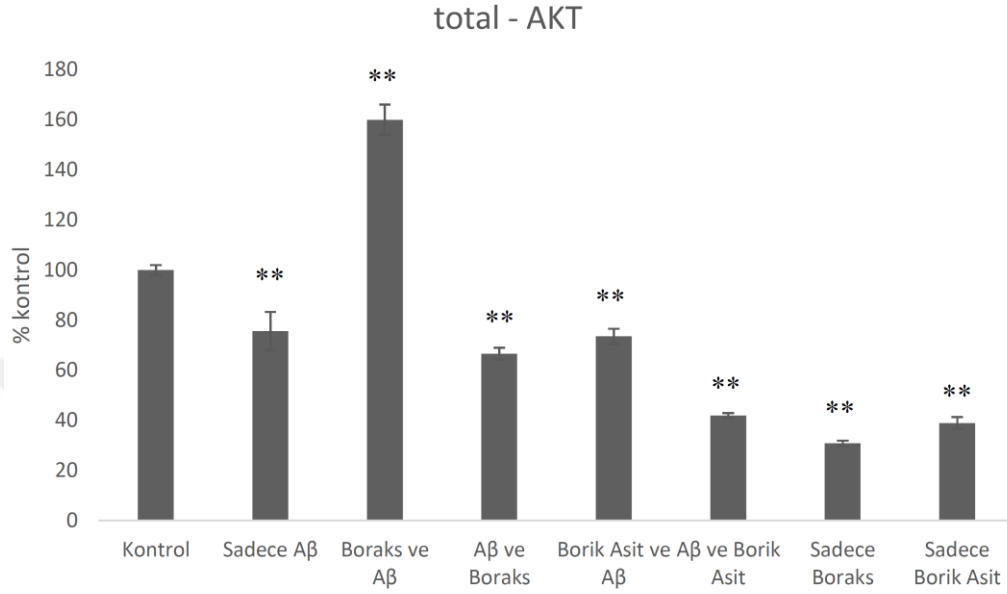
6.6.Toksisite Modelinde Protein Seviyesindeki Değişimler

Çalışma kapsamında total-Akt, fosfo-Akt, total GSK3 α/β , fosfo GSK3 α/β ve SIRT1 protein seviyelerindeki değişimlerin Western blot yöntemi kullanılarak elde edilen bantlar üzerinden istatistiksel analizleri yapılmıştır (Şekil 6.6.1).



Şekil 6.6.1 Western blot yöntemi ile elde edilen bant görüntülerinin protein ağırlıklarına göre sıralı görseli

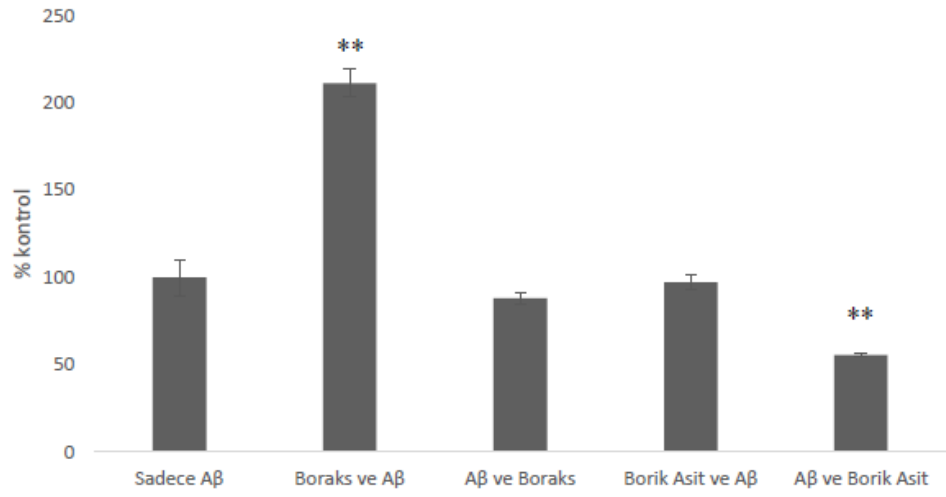
6.6.1. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin Akt anlatımına etkisi



Şekil 6.6.1.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi.

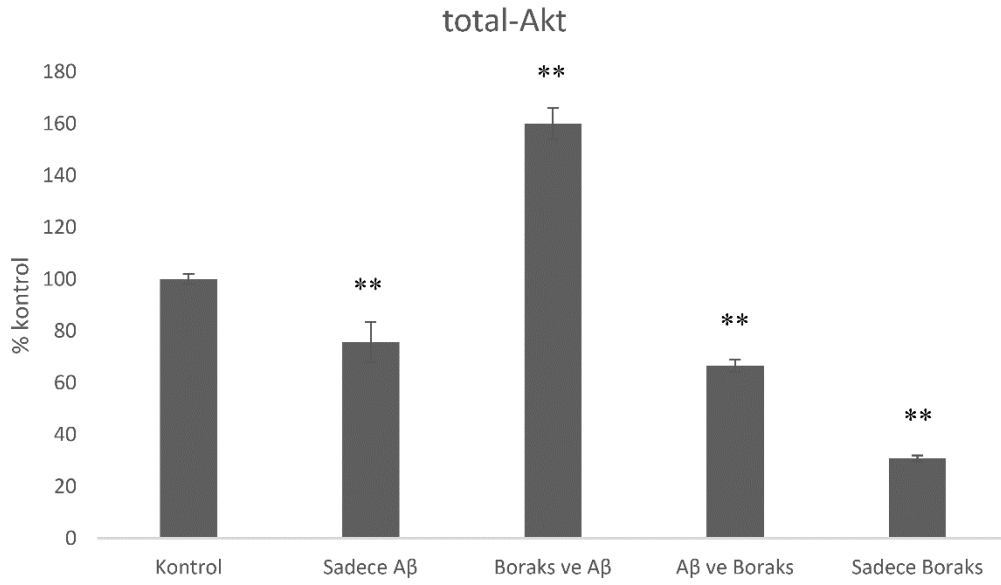
Kontrol grubu ile kıyaslandığında toksisite uygulamasında önce eklenen boraks grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Sadece A β , toksisite uygulamasında sonra eklenen boraks ($p=0,000$) ve borik asit ($p=0,000$) gruplarında, toksisite uygulamasında sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$), sadece boraks grubunda ($p=0,000$) ve sadece borik asit grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır (Şekil 6.6.1.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Aβ Grubu içerisinde total AKT Değişimi



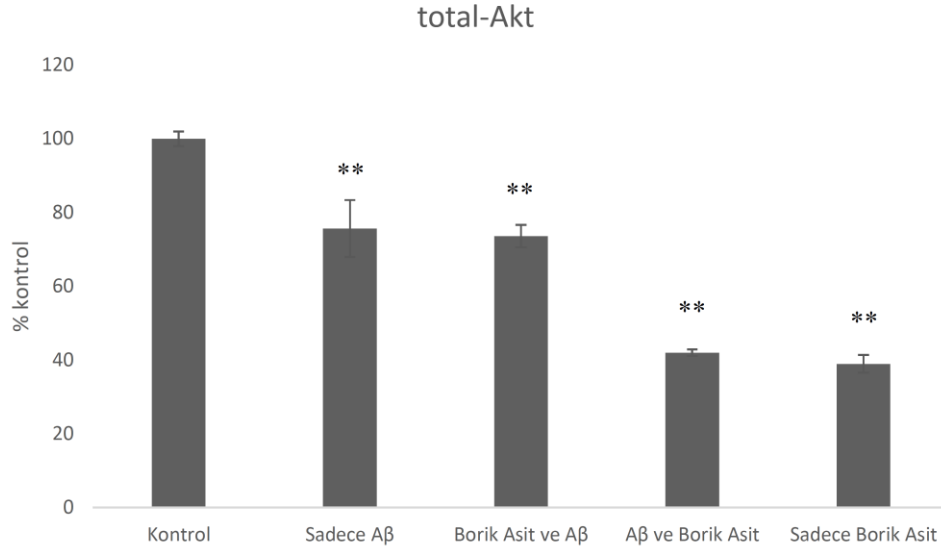
Şekil 6.6.1.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi - Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksikite uygulamasında önce eklenen boraks grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış ve toksikite uygulamasında sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır (Şekil 6.6.1.2., $*p<0,05$, $**p<0,01$).



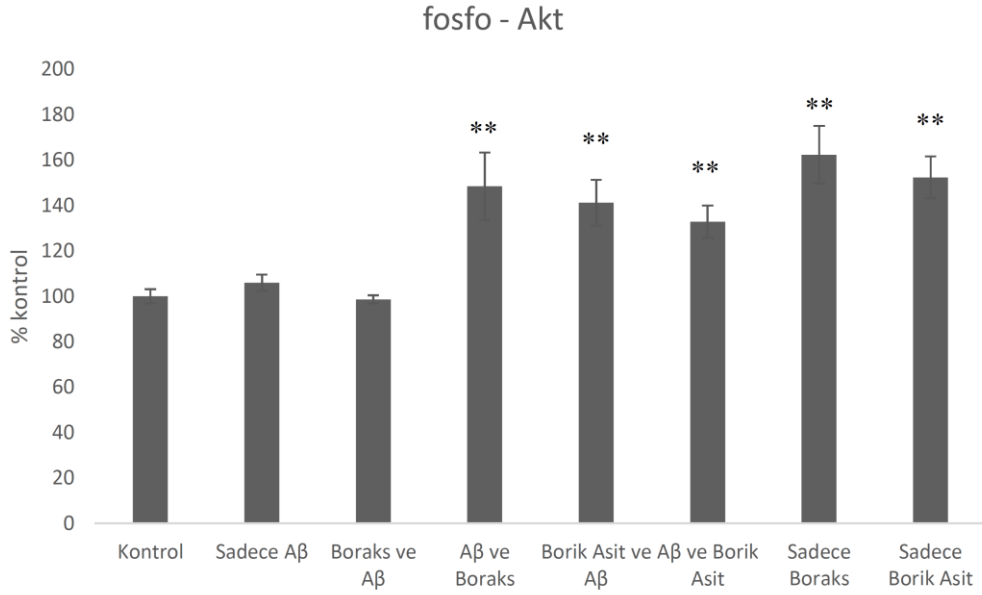
Şekil 6.6.1.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi - Boraks grubunun karşılaştırılması

Boraks grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında sadece Aβ grubunda ($p=0,001$), toksisite uygulamasında sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,000$) ve sadece boraks grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. Toksikite uygulamasında önce eklenen boraks grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.1.3., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.1.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-Akt seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

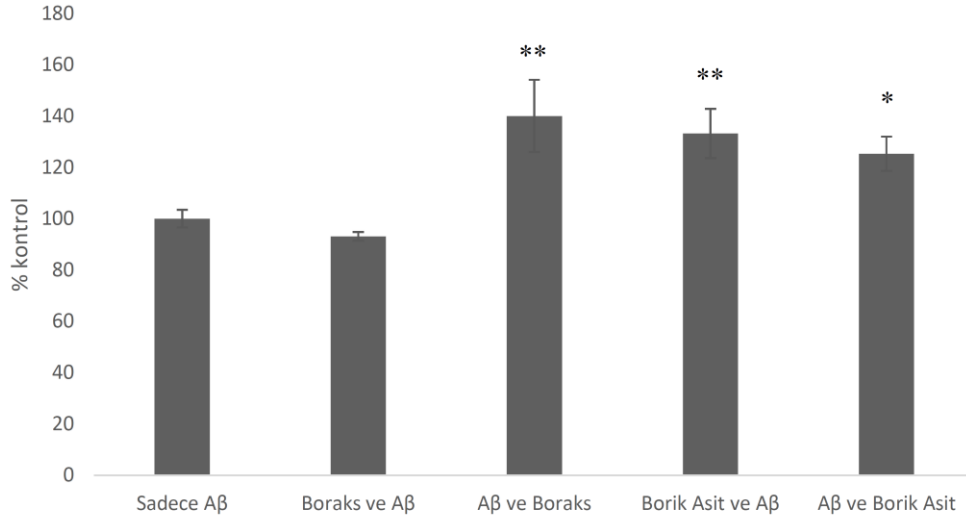
Borik asit grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında sadece Aβ grubunda ($p=0,000$), toksisite uygulamasında önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$), toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) ve sadece borik asit grubunda ($p=0,000$) total-Akt seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptamıştır (Şekil 6.6.1.4., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.1.5 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi

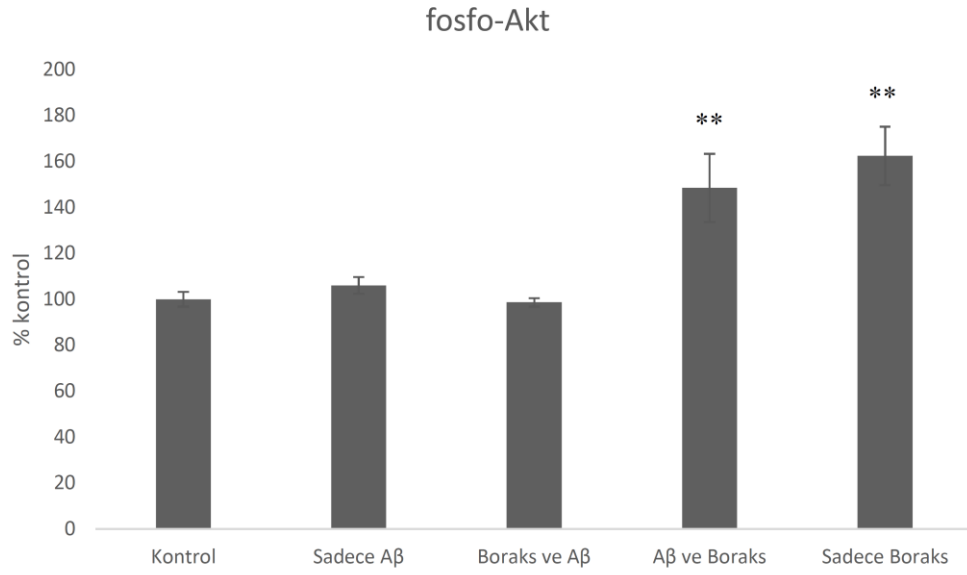
Kontrol grubu ile kıyaslandığında toksisite uygulamasında sonra eklenen boraks ($p=0,000$) ve borik asit ($p=0,007$) gruplarında, toksisite uygulamasında önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,001$), sadece boraks grubunda ($p=0,000$) ve sadece borik asit grubunda ($p=0,000$) fosfo akt seviyelerinde anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.1.5., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Aβ Grubu içerisinde fosfo - AKT Değişimi



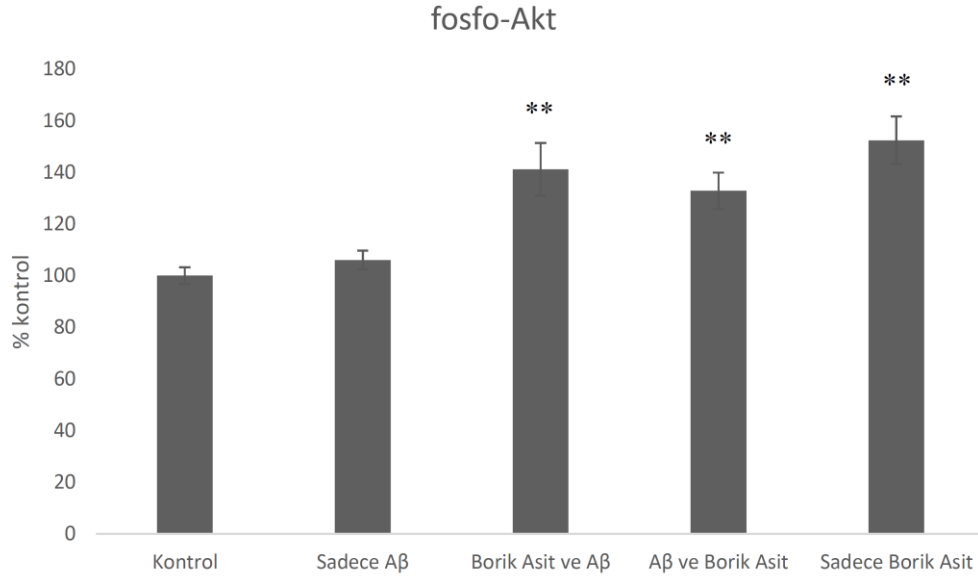
Şekil 6.6.1.6 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi - Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksisite uygulamasında önce eklenen borik asit grubunda ($p=0,005$), toksisite uygulamasında sonra eklenen boraks ($p=0,001$) ve borik asit ($p=0,026$) gruplarında fosfo-Akt seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.1.6., $*p<0,05$, $**p<0,01$).



Şekil 6.6.1.7 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi - Boraks grubunun karşılaştırılması

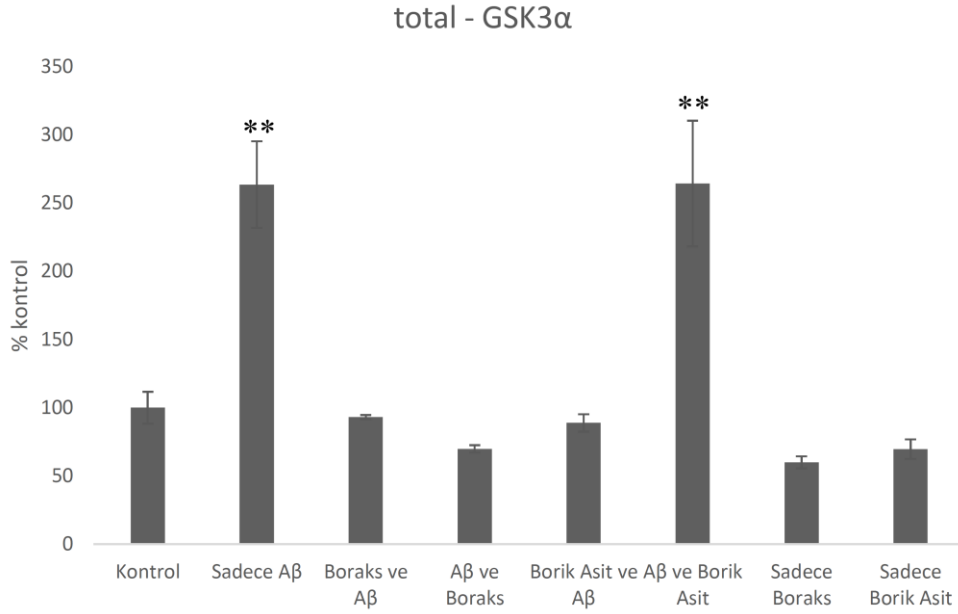
Boraks grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,000$) ve sadece boraks grubunda ($p=0,000$) fosfo-Akt seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.1.7., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.1.8 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-Akt seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

Borik asit grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubu ($p=0,000$), toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubu ($p=0,002$) ve sadece borik asit grubunda ($p=0,000$) fosfo-Akt seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.1.8., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

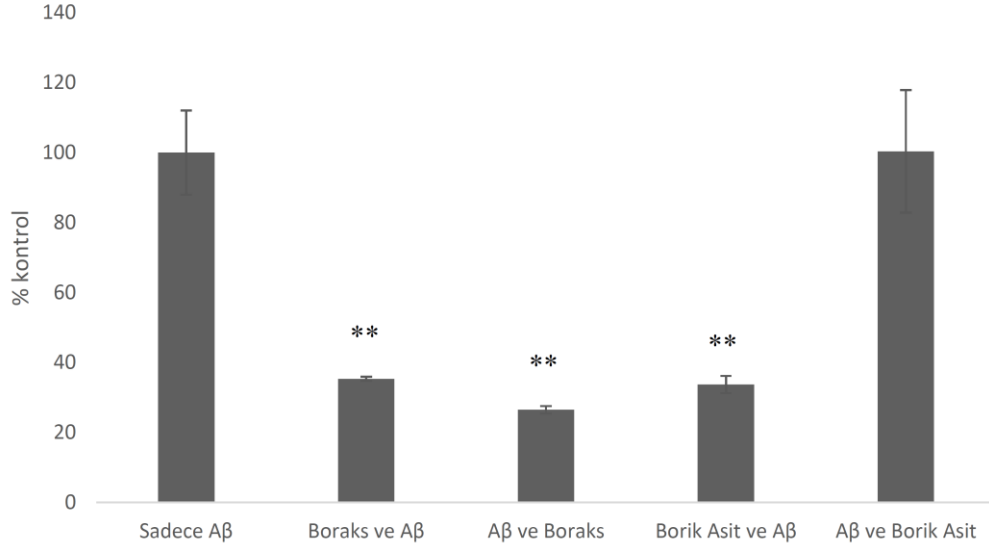
6.6.2. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin GSK3 α anlatımına etkisi



Şekil 6.6.2.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi

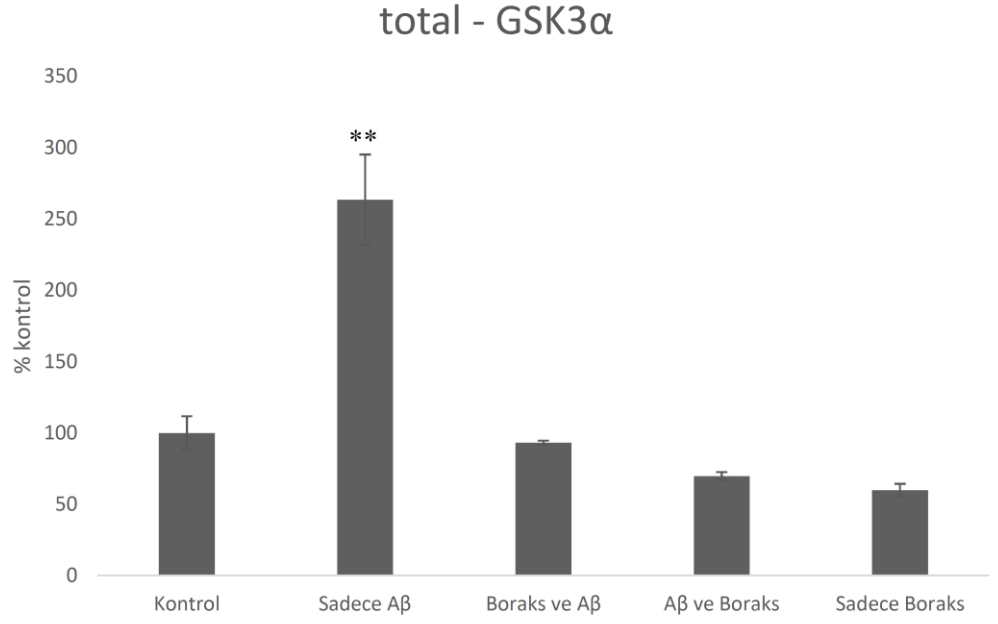
Kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece A β grubu ($p=0,000$) ve toksisite uygulamasında sonra eklenen borik asit grubunun ($p=0,000$) total-GSK3 α seviyelerinde istatistiksel olarak artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

A β Grubu içerisinde total GSK3 α Değişimi



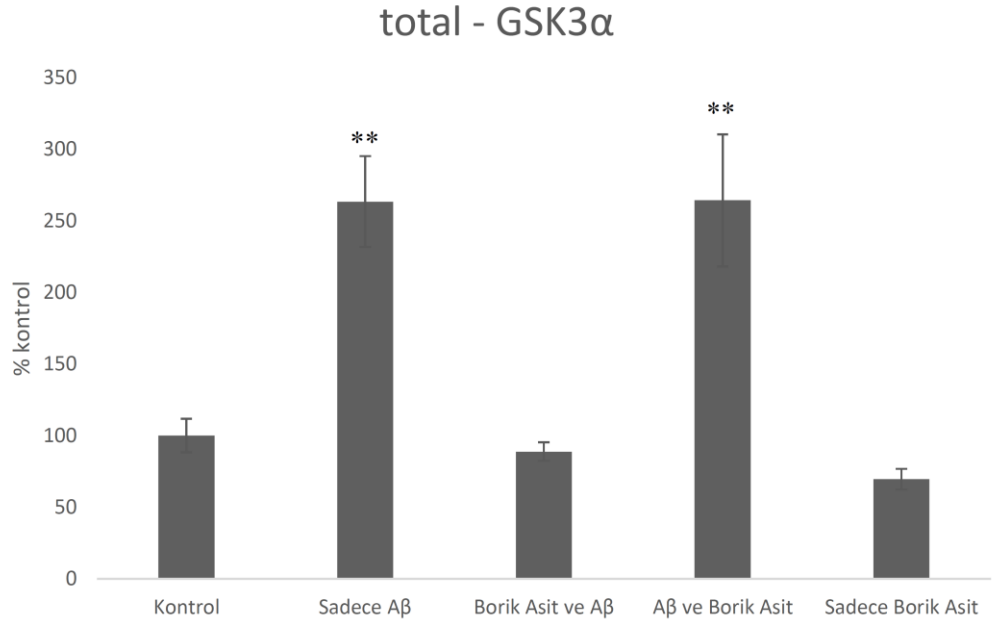
Şekil 6.6.2.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi - Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde toksikite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubu haricinde tüm gruplarda total-GSK3 α seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,000$) şekilde düştüğü saptanmıştır (Şekil 6.6.2.2., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



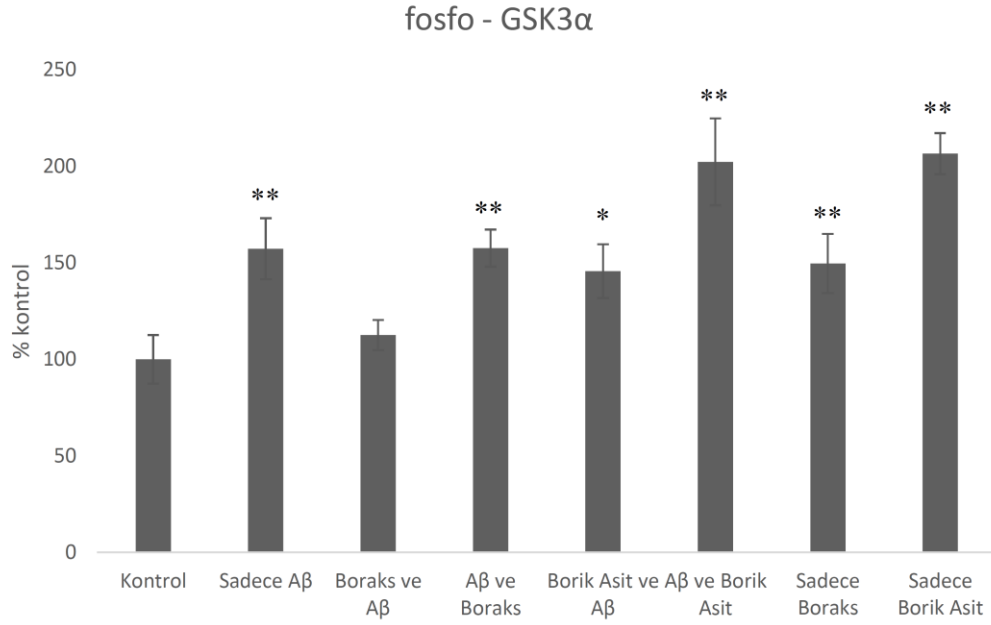
Şekil 6.6.2.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi - Boraks grubunun karşılaştırılması

Boraks grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında sadece A β grubunda ($p=0,000$) total-GSK3 α seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.3., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.2.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 α seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

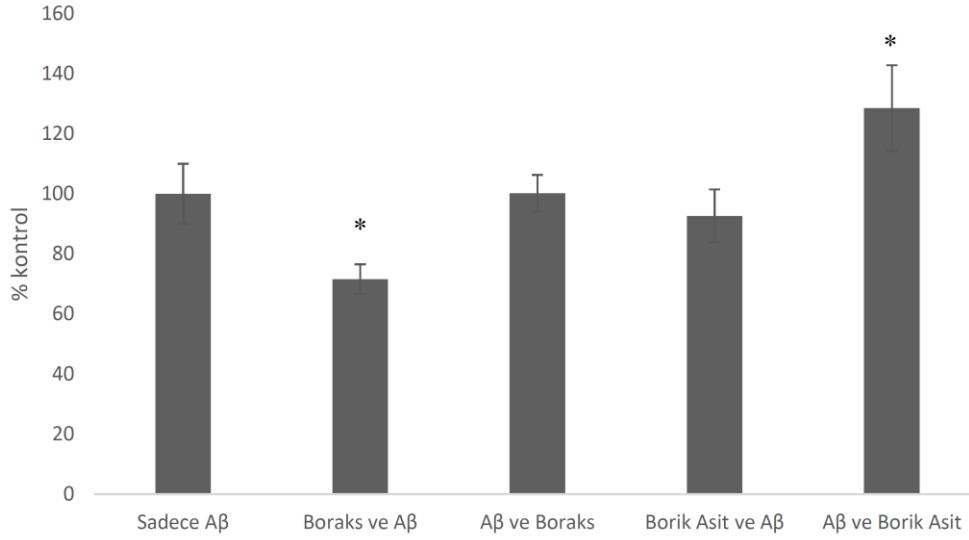
Borik asit grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında sadece A β grubunda ve toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda total-GSK3 α seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,000$) artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.4., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.2.5 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi

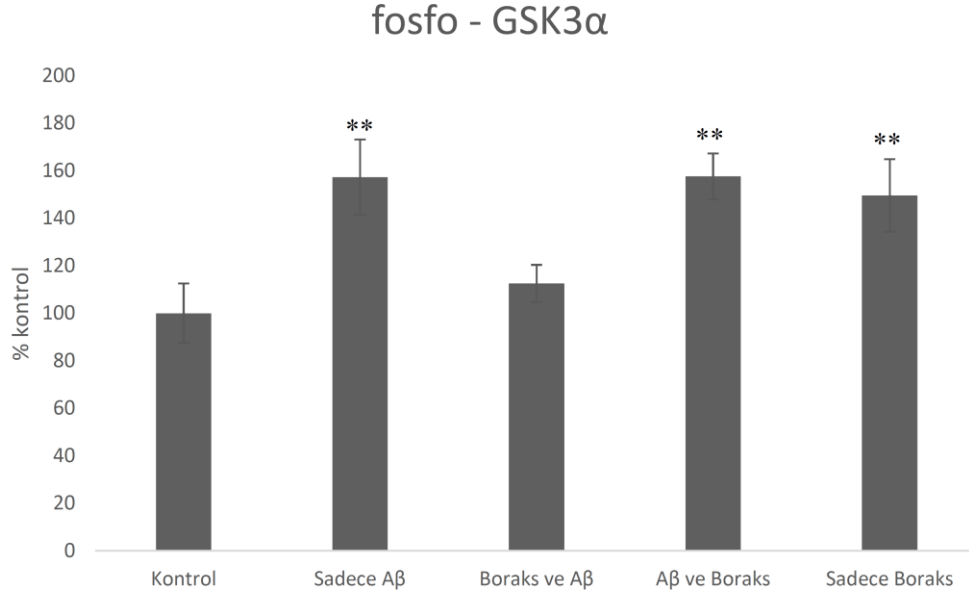
Kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece A β grubu (p=0,003), sadece boraks grubunda (p=0,009), sadece borik asit grubunda (p=0,000), toksisite uygulamasından önce eklenmiş borik asit grubunda (0,020),), toksisite uygulamasından sonra eklenmiş boraks (p=0,003) ve borik asit gruplarında (p=0,000) fosfo-GSK3 α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (Şekil 6.6.2.5., *p<0,05, **p<0,01).

A β Grubu içerisinde fosfo - GSK3 α Değişimi



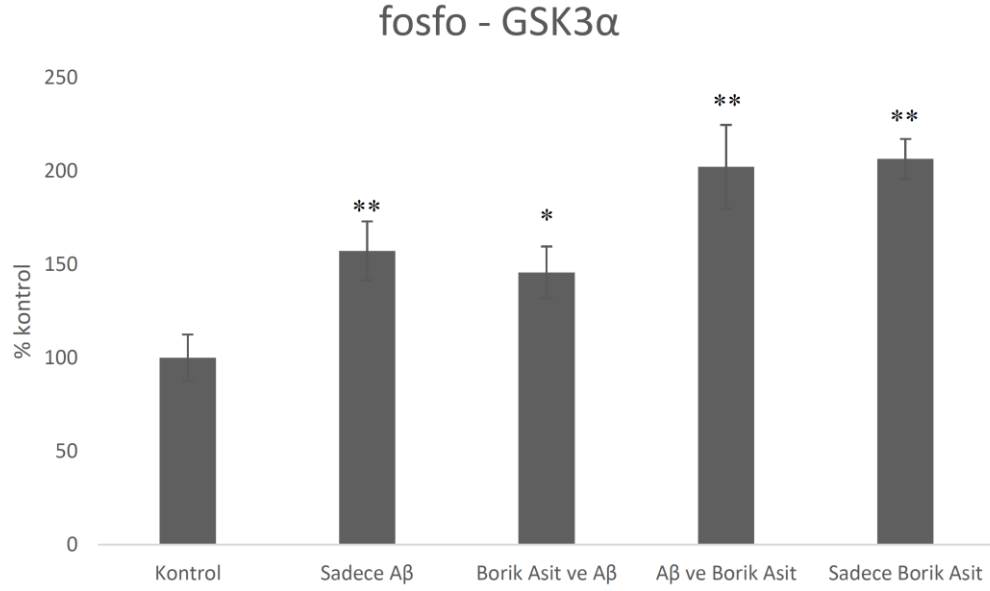
Şekil 6.6.2.6 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksikite uygulamasından sonra eklenmiş boraks grubunda ($p=0,027$) fosfo-GSK3 α seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür. Toksikite uygulamasından sonra eklenmiş borik asit grubunda ise borik asit grubunda ise ($p=0,026$) fosfo-GSK3 α seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.6., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.2.7 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması

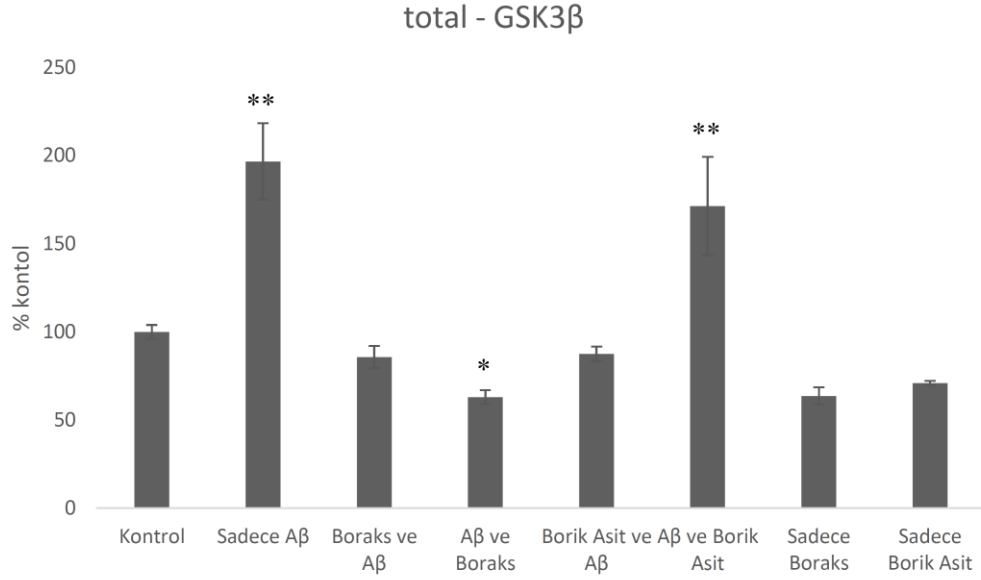
Boraks grubu kendi içerisinde kıyaslandığında sadece A β grubunda ($p=0,002$), toksisite uygulamasında sonra eklenmiş boraks grubunda ($p=0,002$) ve sadece boraks grubunda ($p=0,005$) fosfo-GSK3 α seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.7., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.2.8 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 α seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

Borik asit grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde sadece A β grubunda ($p=0,008$), toksisite uygulamasında önce eklenmiş borik asit grubunda ($p=0,032$), toksisite uygulamasında sonra eklenmiş borik asit grubunda ($p=0,000$) ve sadece borik asit grubunda ($p=0,000$) fosfo-GSK3 α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.8, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

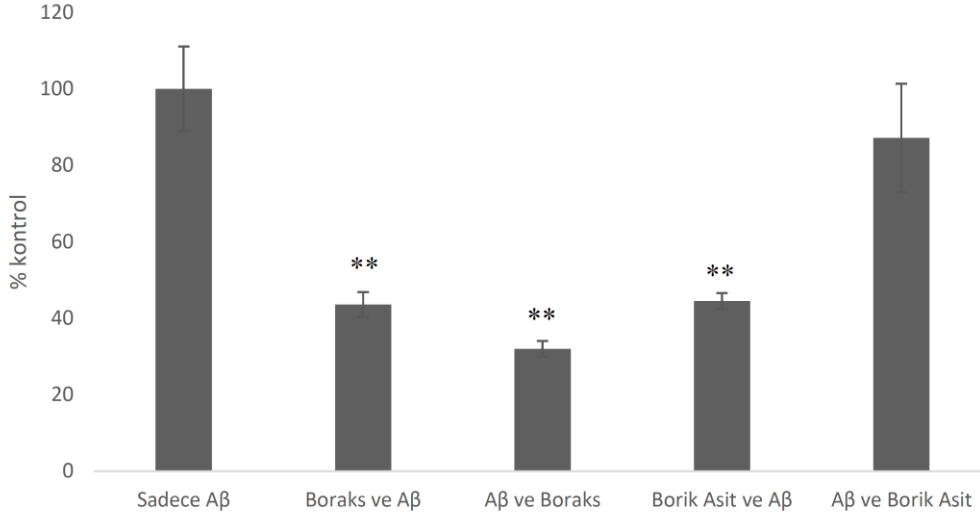
6.6.3. Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin GSK3 β anlatımına etkisi



Şekil 6.6.3.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi

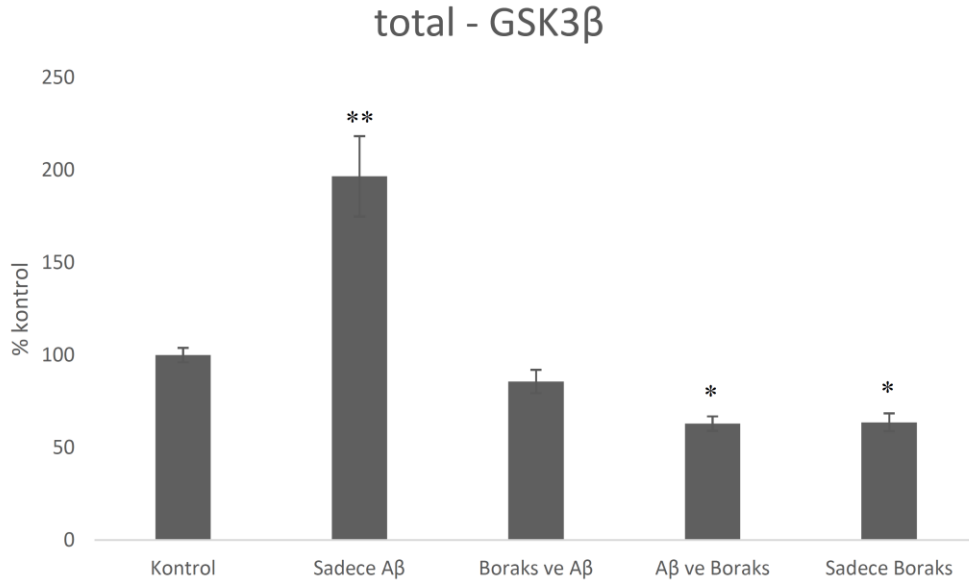
Kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece A β grubu ($p=0,000$) ve toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($0,000$) total-GSK3 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır. Toksikite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,049$) ise total-GSK3 β seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma görülmüştür (Şekil 6.6.3.1, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

A β Grubu içerisinde total GSK3 β Değişimi



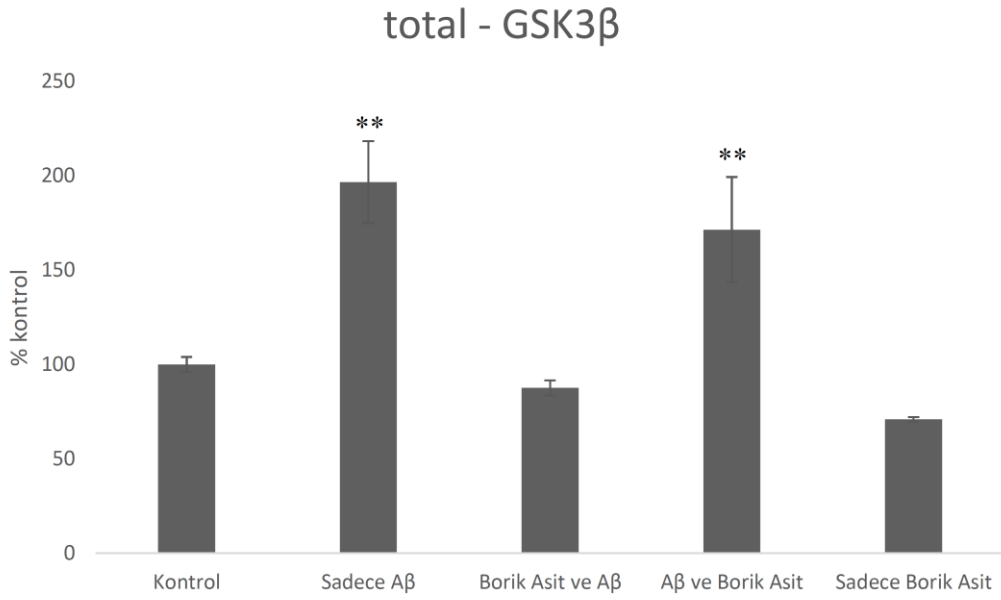
Şekil 6.6.3.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında toksikite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubu hariç tüm gruplarda total-GSK3 β seviyelerinin istatistiksel olarak ($p=0,000$) anlamlı şekilde düştüğü saptanmıştır (Şekil 6.6.3.2, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



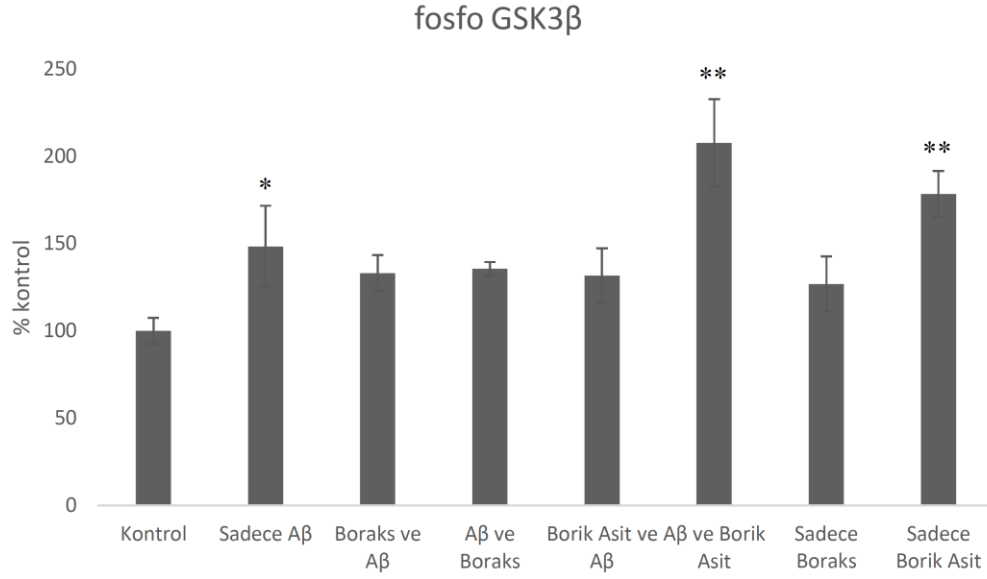
Şekil 6.6.3.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması

Boraks grubu kendi içerisinde karşılaştırıldığında sadece A β grubunda ($p=0,000$) total-GSK3 β seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür. Sadece boraks grubunda ($p=0,013$) ve toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,011$) total-GSK3 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır (Şekil 6.6.3.3, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.3.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin total-GSK3 β seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

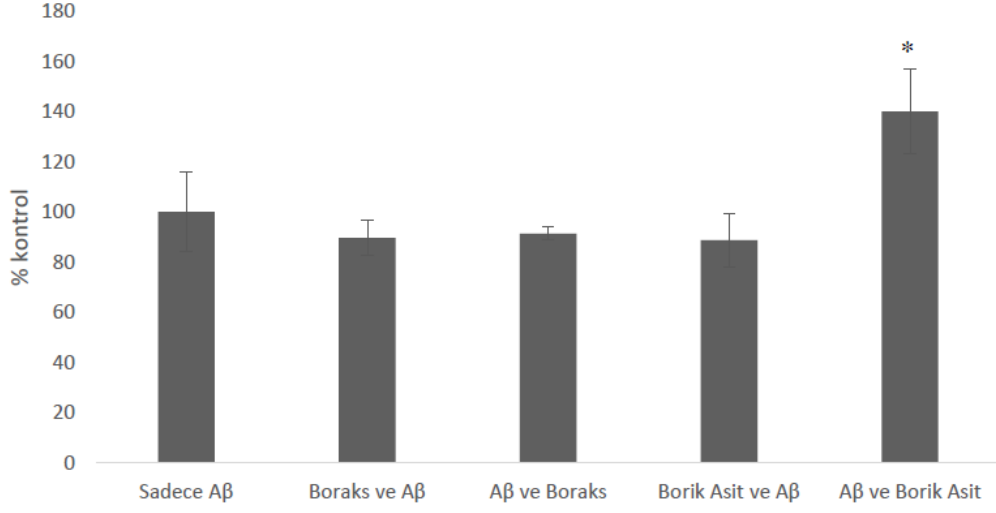
Borik asit grubu karşılaştırıldığında sadece A β grubunda ($p=0,000$) ve toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,002$) total-GSK3 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.3.4, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.3.5 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi

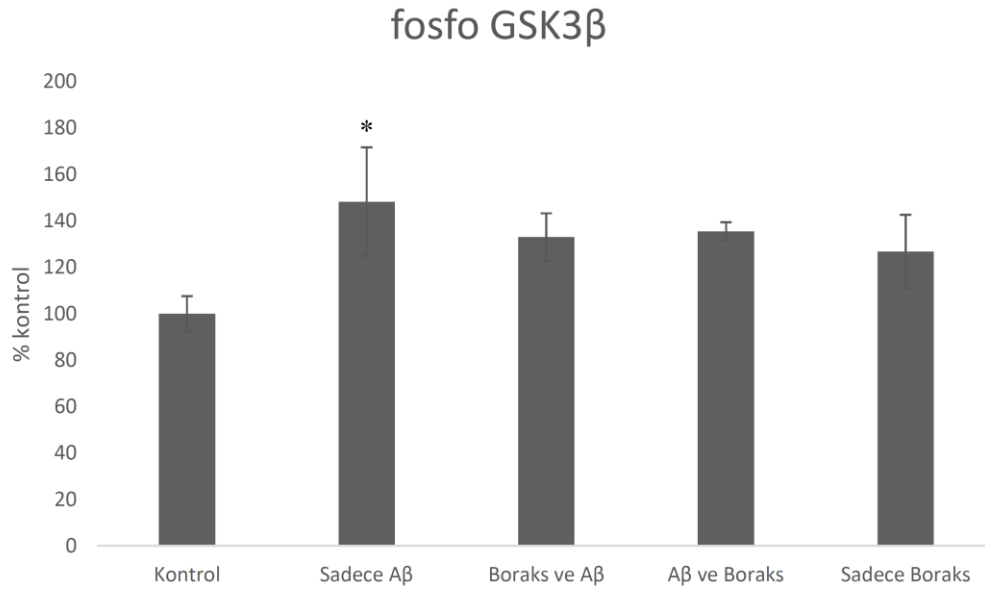
Kontrol grubu ile kıyaslandıklarında sadece A β grubunda ($p=0,031$), toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) ve sadece borik asit grubunda ($p=0,000$) fosfo-GSK3 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.3.5, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

A β Grubu içerisinde fosfo GSK3 β Değişimi



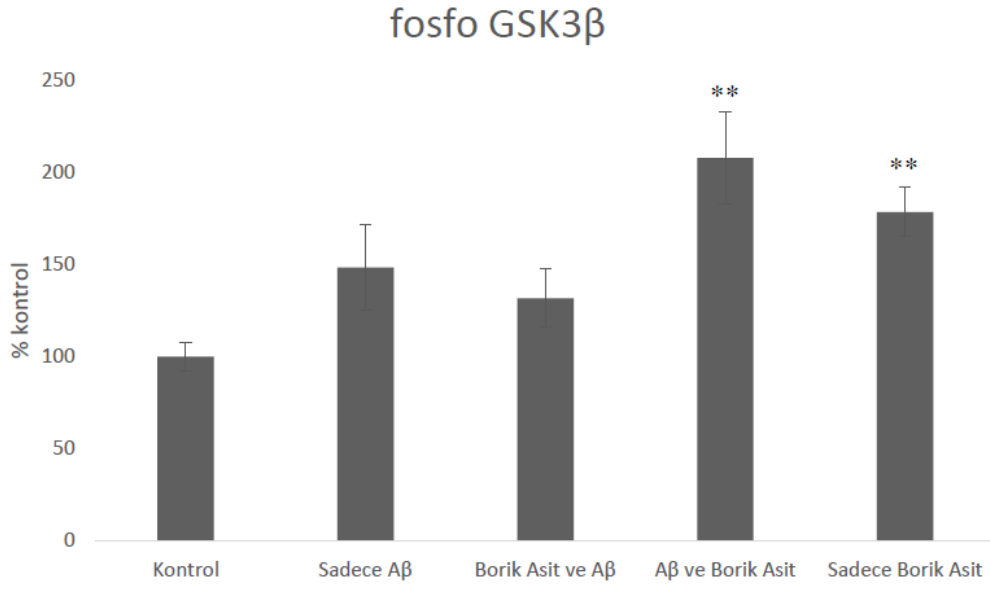
Şekil 6.6.3.6 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grubu kendi içerisinde kıyaslandığında toksikite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,013$) fosfo-GSK3 β seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.3.6, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.3.7 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması

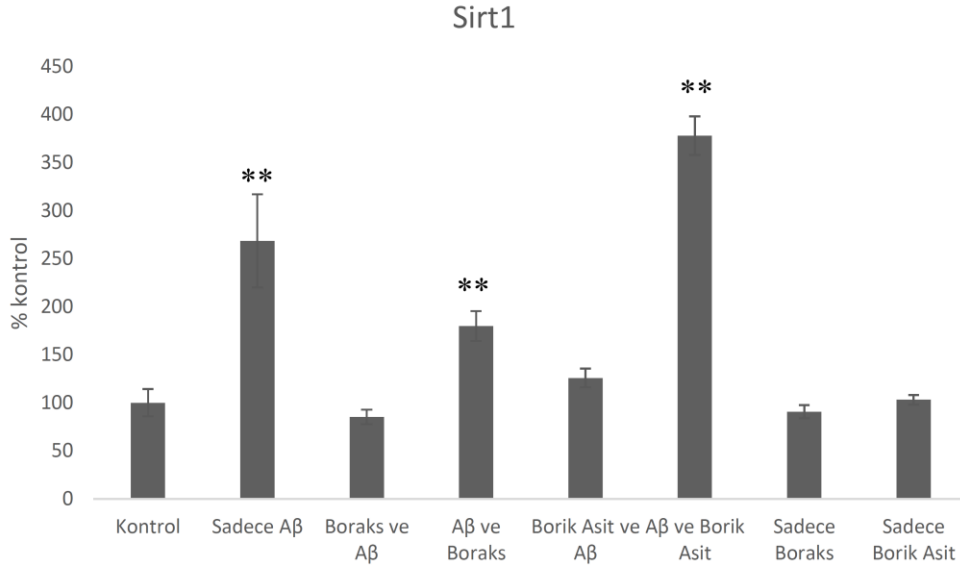
Boraks grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde sadece A β grubunda ($p=0,012$) fosfo-GSK3 β seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.3.7, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.3.8 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin fosfo-GSK3 β seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

Borik asit grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde sadece borik asit grubunda ($p=0,003$) ve toksisite uygulamasında sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) fosfo-GSK3 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.3.8, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

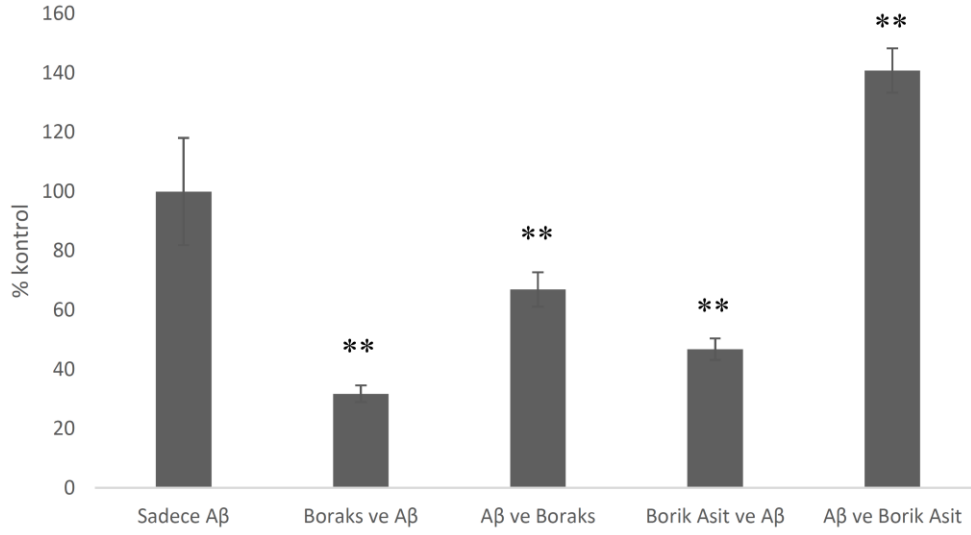
6.6.4.Amiloid beta toksisitesi sonrası boraks ve borik asit maddelerinin Sirt1 anlatımına etkisi



Şekil 6.6.4.1 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi

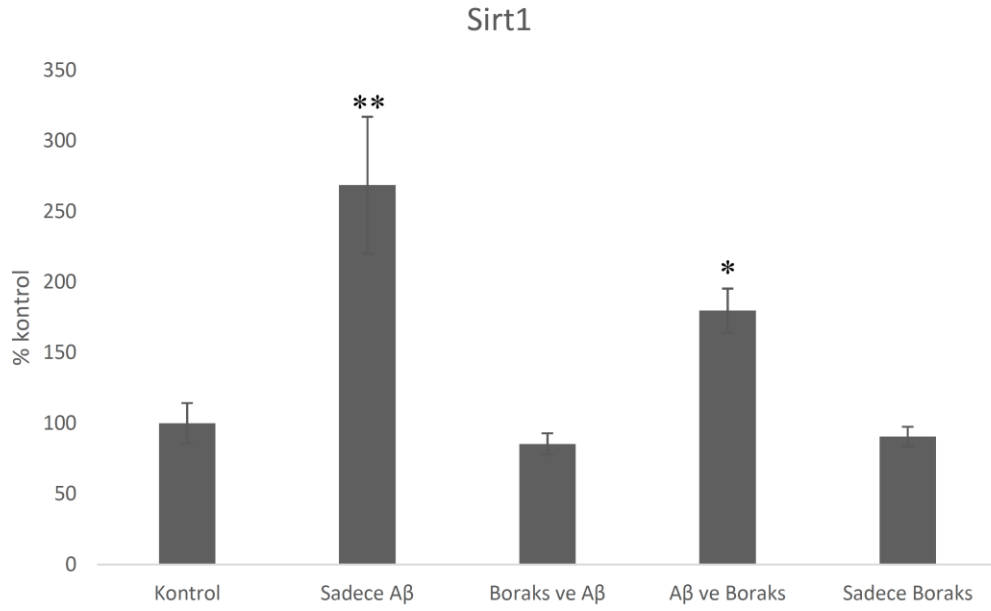
Kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece A β grubunda ($p=0,000$), toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks ($p=0,004$) ve borik asit ($p=0,000$) gruplarında Sirt1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.4.1., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Aβ Grubu içerisinde Sirt1 Değişimi



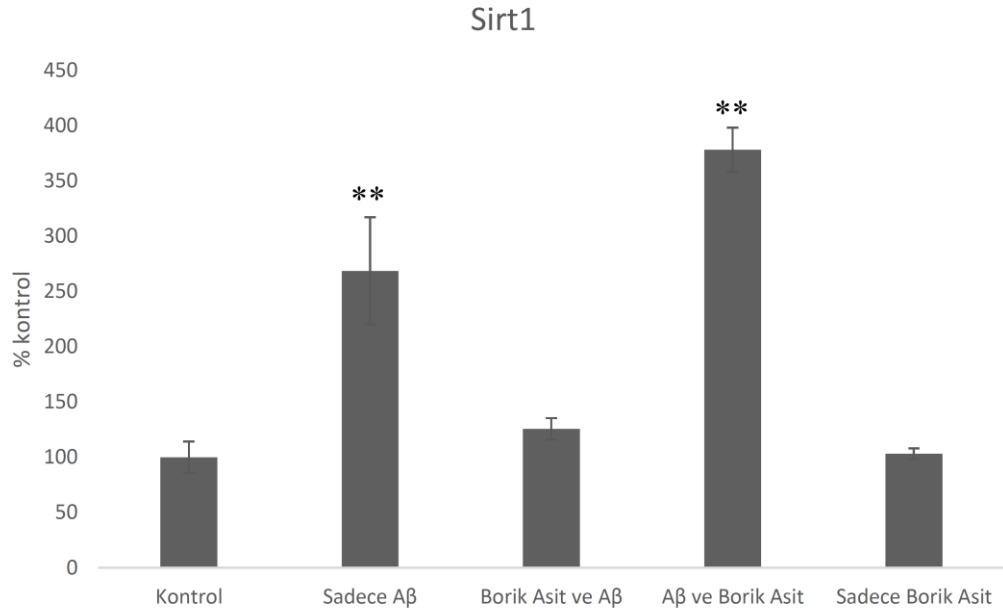
Şekil 6.6.4.2 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi – Toksikite grubunun karşılaştırılması

Toksikite grubu kendi içerisinde kıyaslandığında toksikite uygulamasından önce eklenen boraks ($p=0,000$) ve borik asit ($p=0,000$) gruplarında ve toksikite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,010$) Sirt1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. Toksikite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,002$) ise istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.4.2., $*p<0,05$, $**p<0,01$).



Şekil 6.6.4.3 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi – Boraks grubunun karşılaştırılması

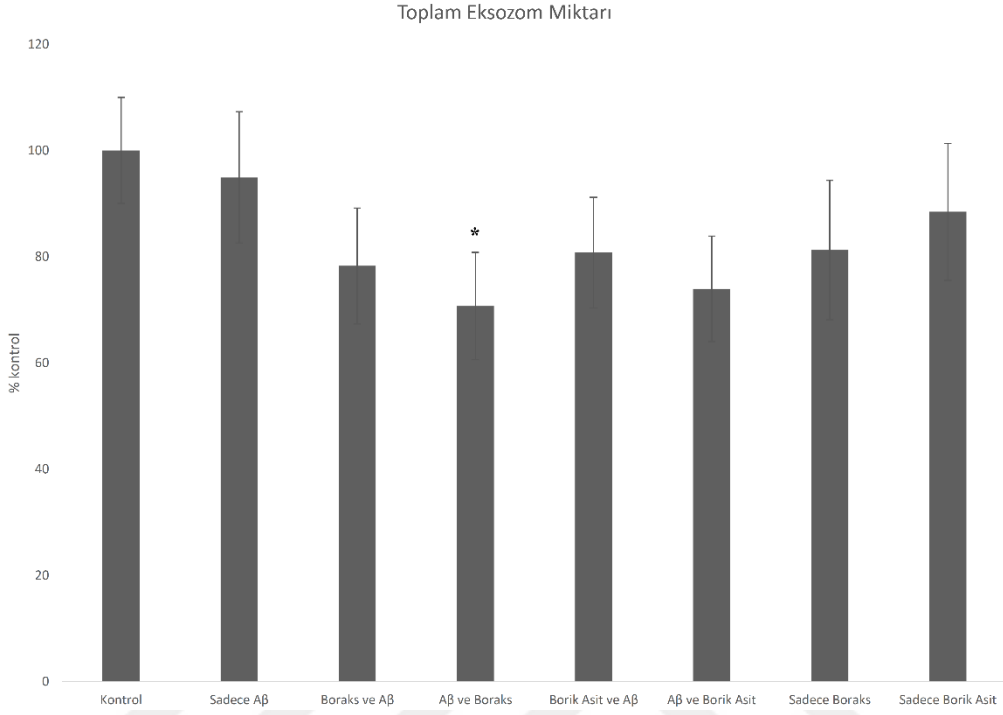
Boraks grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde sadece Aβ grubunda ($p=0,000$), toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,015$) Sirt1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır (Şekil 6.6.4.3., * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Şekil 6.6.4.4 Toksikite modelinde boraks ve borik asidin Sirt1 seviyesine etkisi – Borik asit grubunun karşılaştırılması

Borik asit grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde sadece Aβ grubunda ($p=0,000$), toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ($p=0,000$) Sirt1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır (Şekil 6.6.4.4., $*p<0,05$, $**p<0,01$).

6.7.Toplam Eksozom Miktarı Analizi



Şekil 6.7.1 Toplam eksozom miktarı grafiği. Hücreler arası salınan toplam eksozom miktarının gruplara göre olan değişimi

Gruplar kontrol grubuna göre kıyaslandığında toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda ($p=0,029$) toplam eksozom miktarı istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü saptanmıştır (Şekil 6.7.1 $*p<0,05$).

7-TARTIŞMA

Yapılmış olan bu tezde bor türevli bileşiklerden olan boraks ve borik asidin, SH-SY5Y hücre hattı kullanılarak oluşturulan toksisite modeli üzerine olan hücre içi dinamiklere ve eksozomal içeriğe olan etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu etkileri araştırmak amacı ile Alzheimer hastalığında etkin rolü olan amiloid-beta kullanılarak *in vitro* toksisite modeli oluşturulmuştur.

SH-SY5Y insan kökenli hücre hattı olmasının yanında adrenerjik fenotip ve dopaminerjik karakter de göstermektedirler. Bu nedenle nöronal fonksiyon ve nöronal farklılaşma çalışmalarında *in vitro* model olarak kullanılmaktadırlar.

Deneyde kullanılan amiloid-beta toksisite modeli, Alzheimer hastalığının oluşmasında etkin olan ve amiloid-beta kaskat hipotezi ele alındığında diğer demans türlerinden ayırıcı bir konumda olması sebebi ile seçilmiştir. Bu model esas olarak hastalıkta olduğu gibi ekstraselüler boşlukta amiloid-beta 1-42 birikimini taklit etmek üzere tasarlanmıştır. Ancak diğer nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi Alzheimer hastalığında da tek nöropatolojik etkenin 1-42 amiloid-beta ($A\beta_{1-42}$) protein birikimi olmaması bu çalışmada kullanılan *in vitro* modelin *in vitro* Alzheimer modelinden ziyade nörotoksisite modeli olarak isimlendirilmesi daha rasyonel olmaktadır. Hücre kültürüne dışarıdan eklenen $A\beta_{1-42}$ peptidi ile toksisite modelinde kullanılan hücreler 48 saat inkübe edilmiştir.

Deneylerin tekrar edilebilirliğinin kontrolü açısından hücreler 96-kuyucuklu hücre kültürü plakasına 20.000 hücre, 6-kuyucuklu hücre kültürü plakasına ise 220.000 hücre ekimi yapılmıştır. Oluşturulan tüm toksisite gruplarında, yapılan hücre canlılığı (LDH) analizinin sonucunda ölüm oranlarının istatistiksel olarak anlamlı artışı saptanmıştır (Şekil 6.5.1.).

$A\beta$ toksisite modeli oluştururken etkin dozun belirlenmesi için 1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M gibi çeşitli konsantrasyonlar test edilmiştir. Yapılan konsantrasyon denemeleri LDH analizi ile değerlendirildikten sonra 10 μ M $A\beta$ konsantrasyonunun en etkin doz olduğu saptanmıştır (Şekil 6.1.1). Deneyde kullanılacak olan bor türevli boraks ve borik asit maddelerinin ise 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml ve 200 μ g/ml gibi çeşitli konsantrasyonları etkin koruyucu dozu belirlemek

için test edilmiştir. Yapılan LDH analizleri sonucunda hem boraks maddesinde hem de borik asit maddesinde 200 µg/ml konsantrasyonu en etkin koruyucu doz olarak saptanmıştır (Şekil 6.2.1.1. ve Şekil 6.2.2.1.). Bu veriler daha önce literatürde belirtilen toksisite açısından benzer performans gösterdiği verisi ile de örtüşmektedir (60). Deneysel gruplarının LDH analiz verileri en etkin doz için yapılan LDH ön çalışmaları ile örtüşmektedir (Şekil 6.5.1., Şekil 6.1.1., Şekil 6.2.1.1., Şekil 6.2.2.1. ve Şekil 6.2.2.1.). İlk bakışta Şekil 6.1.1. ile Şekil 6.5.1 arasında belirtilen Aβ verileri arasında istatistiksel olarak farklılık göze çarpmaktadır. Bu veriler kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Oksidatif stres ölçümleri için hücre kültürü besiyeri kullanılarak Total Oxidant Status (TOS) ve Total Antioxidant Status (TAS) analizleri yapılmıştır. TAS analizi sonuçları (Şekil 6.4.2.1.) değerlendirildiğinde sadece Aβ verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Yine aynı analiz üzerinden yapılan değerlendirme sonucunda toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit konsantrasyonunun TAS değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düşürdüğü saptanmıştır. Diğer deneysel gruplarının ise kontrol grubu ile arasında istatistiksel bir farka rastlanmamıştır. TOS analizi sonuçlarında (Şekil 6.4.1.1) ise sadece Aβ verilen grupta TOS değerinin istatistiksel olarak anlamlı düşüşü aynı deneysel grubun TAS değerindeki değişimi ile tutarlıdır; hücrelerin Aβ toksisitesi karşısında antioksidant mekanizmalarını aktive etmeleri sonucu TOS değeri istatistiksel olarak anlamlı derecede düşülmektedir. Buna ek olarak toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit konsantrasyonunun TOS değerlerini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca sadece boraks konsantrasyonunun eklendiği deneysel grubunda ise TOS seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Literatürde Alzheimer hastalığının oksidatif stres ile olan ilişkisi pentoz fosfat yolu üzerinden açıklanmıştır (61). Bu yolda Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) önemli bir rol oynamaktadır ve bu koenzimin artışı ile reaktif oksijen türlerinde artış olduğu bilinmektedir (62). Borat bileşenlerinin de Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) ve NADP⁺ koenzimlerini baskıladığı literatürde bilinmektedir (52). Bu bilgiler ışığında borat bileşenlerinden özellikle borik asidin ilgili koenzim mekanizmalarında baskılayıcı ve Sirtuin 1 (SIRT1) proteinini aktive edici rolü (63) sebebi ile kontrol ve toksisite gruplarındaki özellikle TAS seviyesi

karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasının bu sebep ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Ancak kontrol ile sadece bor bileşiklerinin verildiği gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması durumu ise hücrenin stres durumu altında bu mekanizmayı kullandığı konusunu düşündürmektedir.

Eksozomların kargo olarak miRNA, mRNA ve proteinleri taşıyarak hücreler arası iletişim ile birlikte hastalık patolojilerinin yayılmasını kolaylaştırabileceği bilinmektedir (47). Hücre kültürü besiyerlerinden izole edilen eksozomların western blot analizleri yapıldığında toksisiteden sonra eklenen boraks konsantrasyonunun toplam eksozom miktarında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüşe neden olduğu saptanmıştır (Şekil 6.7.1). Yapılan diğer western blot analizlerinde ise fosfo-AKT, total- AKT, fosfo-GSK3, total-GSK3, fosfo-tau, total-tau ve SIRT1 proteinlerini taşıdığı yönünde herhangi bir veri saptanamamıştır. Bunun sebeplerinden biri izole edilen eksozomların içeriğinde yer alan olası protein konsantrasyonlarının düşük olması nedeni ile western blot yönteminin bunu saptayamayacak olduğu düşünülmektedir. Diğer sebep ise yakın zamanda yapılan çalışmalarda (64) eksozom içeriğinde bulunan kargo protein seviyelerinin çok düşük olduğu bildirilmiştir ki bu ilk görüşümüz ile uyumaktadır. Ayrıca ilgili proteinlerin kendisinden öncül proteinlerini taşıdıkları bildirilmiştir (64).

Tau proteininin fonksiyonu, tubulin ile etkileşime girerek mikrotübül organizasyonunu oluşturması ve bu yapının kararlılığını devam ettirme yönünde yardımcı olması olarak açıklanmıştır (65). Alzheimer hastalığında, anormal şekilde hiperfosforile olmuş tau proteinlerin agregatları tarafından oluşturulan intraselüler nörofibriler yumaklar görülmektedir (66). Yapılan çalışmada fosfo-tau ve total-tau'nun western blot analizlerinde herhangi bir veri saptanamamıştır. Bu problem literatürde kullanılan antikor, denaturasyon prosesinin etkisi veya lizis solüsyonu ile açıklanabilmektedir (67).

Serin / treonin kinaz Akt'nin (A ve C protein kinazlara bağlı protein kinaz B), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) ve diğer trofik faktörler için fosfatidilinositol-3-kinaz (PI-3K) sinyalizasyonunu düzenleyerek hücrel sağkalım yolağını düzenlediği bilinmektedir (68). Literatürde yer alan çalışmalarda Akt enzim aktivitelerinin Braak evrelemesi ile pozitif korelasyon gösterdiği ve AH'nın şiddetinin artması ile birlikte

artış gösterdiği bildirilmiştir (69). Yaptığımız total-Akt analizi sonucunda toksisite uygulamasından önce eklenen boraks grubu haricinde tüm gruplarda seviyelerin istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır (Şekil 6.6.1.1.). Analiz sonuçlarında sadece A β grubunda fosfo-akt seviyesinin arttığı saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 6.6.1.5.). Bunun yanında bor minerallerinin aktif Akt seviyelerini ciddi şekilde arttırdığı görülmüştür (Şekil 6.6.1.5.). Toksisite grubunun total-Akt seviyeleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise toksisite uygulamasından önce eklenen boraks grubunda anlamlı artış, sonra eklenen borik asit grubunda ise anlamlı azalış saptanmıştır (Şekil 6.6.1.2). Fosfo-Akt analizleri sonucunda ise toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks ve borik asit grupları ile önce eklenen borik asit grubunda fosfo-Akt formlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (Şekil 6.6.1.6.). Akt grafiklerine bakıldığında, sadece A β grubunda total-Akt seviyesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü halde fosfo-Akt seviyesindeki görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu verilere bakıldığında sadece A β grubunda Akt aktivite seviyesinde değişiklik olmadığı düşünülmektedir. Toksisite uygulamasından önce eklenen boraks grubunda total-Akt seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı ancak sadece A β grubunda olduğu gibi bu değişimin fosfo-Akt seviyesine yansımadağı görülmektedir. Bunların yanında toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks ve borik asit grupları ile önce eklenen borik asit grubunda hem total-Akt seviyelerindeki istatistiksel olarak anlamlı azalış hem de fosfo-Akt seviyelerindeki istatistiksel olarak anlamlı artış ile Akt aktivitesinin arttığını düşünülmektedir. Bu sebeple Glikojen sentez kinaz 3 (GSK3) yolağının baskılandığı ve/veya hücrel sağkalım yolağının tetiklendiğı düşünülmektedir.

GSK3 α ve GSK3 β tüm hücrelerde yapısal olarak aktif anlatımı yapılan ve glikojen metabolizması, gen transkripsiyonu, apoptoz ve mikrotübül stabilitesi de dâhil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerde yer alan prolin-yönelimli serin / treonin kinazların substratı olan önemli proteinlerdir (70). GSK3 aktivitesi insülin ve Wnt sinyalizasyonu ile modüle edilir ve her iki yol da negatif düzenleyici şekilde etki eder. GSK3 α ve GSK3 β sırası ile Serin 21(Ser 21) ve Ser 9 rezidülerinden fosforlanarak inaktif konuma gelirler (71). GSK3 aktivitesinin özellikle AH'ında tau'nun hiperfosforilasyonunda, hafıza bozukluğunda, A β 'nin artan üretiminde ve enflamatuar yanıtlarda etkin rol

oynadığı bilinmektedir (70). GSK3, apoptozun temel araçlarından biridir ve dolayısıyla AH'de görülen nöronal kayıpta doğrudan rol oynadığı düşünülmektedir (72). GSK3 α 'nın GSK3 β 'dan farklı olarak artan A β üretimi ile sonuçlanan APP bölünmesini etkilediği literatüre bildirilmiştir (73). Yapılan total-GSK3 α analizleri sonucunda sadece A β grubunda ve toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.1). Bunun yanında fosfo-GSK3 α analizlerinde sadece A β grubunda, sadece boraks ve borik asit grubunda, toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks ve borik asit gruplarında ve toksisite uygulamasından önce eklenen borik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.2.5). Buradan elde edilen sonuçlarla özellikle borik asit maddesinin GSK3 α aktivitesini baskılayarak APP üretimini üzerinden A β toksisitesini düşürdüğünü düşünülmektedir. Toksisite grubunun total-GSK3 α seviyeleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise toksisite uygulamasından önce eklenen boraks ve borik asit gruplarında ve toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda total-GSK3 α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düştüğü saptanmıştır (Şekil 6.6.2.2). Bunun yanında fosfo-GSK3 α analizleri sonucunda toksisite uygulamasından önce eklenen boraks grubunda seviyenin istatistiksel olarak anlamlı düştüğü, toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı arttığı saptanmıştır (Şekil 6.6.2.6). Bu sonuçlar ışığında borik asit maddesi GSK3 α aktivitesini azaltmaktadır.

Yapılan çalışmalarda GSK3 β 'nın, GSK3 α 'ya göre, glikojen sentezinin ana düzenleyicisi olduğu literatüre bildirilmiştir (74). Ayrıca GSK3 β insüline yanıt olarak glikojen sentaz aktivitesini kontrol etmektedir (74). Ayrıca GSK3 β 'nın hafıza ile ilişkisi özellikle AH'nda önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalarda GSK3 β 'nın aşırı anlatımı "long-term potentiation (LTP)" negatif etkilediği ve mekânsal öğrenmeyi azalttığını göstermiştir (75). Yaptığımız çalışmada, total-GSK3 β analizleri sonucunda sadece A β grubunda ve toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış, toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır (Şekil 6.6.3.1). Bunun yanı sıra fosfo-GSK3 β analizlerinde sadece A β grubunda, toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ve sadece borik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Bununla birlikte toksisite grubunun total-

GSK3 β seviyeleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubu haricinde diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmış olup, fosfo-GSK3 β seviyeleri karşılaştırıldığında ise toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.3.5). Bu bilgiler çerçevesinde borik asit maddesinin toksisite sonrasında GSK3 β inaktivasyonuna neden olduğunu düşünülmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde GSK3 inaktivasyonunun mutant APP'nin aşırı anlatımı sonucu oluşan tau patojenitesini tersine çevirdiği belirtilmiştir (76). Bu sebeple borik asit maddesinin toksisiteden sonra uygulanması nörodejenerasyon sürecin ilerleyişini azaltıcı etki yapabileceğini düşündürmektedir.

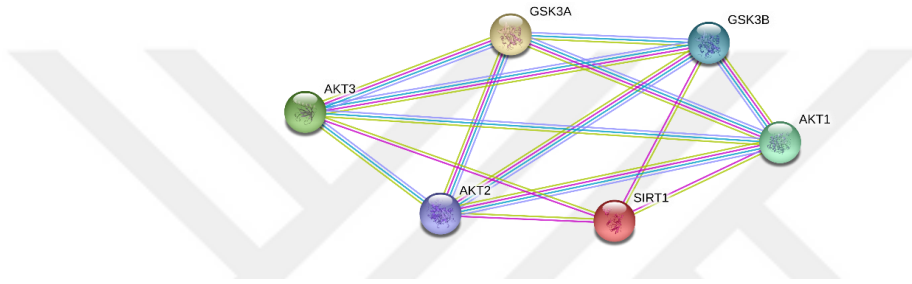
SIRT1 sirtuin ailesinin bir üyesi olup, nikotinamid adenosin dinükleotit (NAD) bağımlı deasetilazdır ve fonksiyonu birçok histon ve histon olmayan proteinlerinden asetil gruplarını çıkartmak üzerinedir (63, 77). *In vivo* modellerde yapılan çalışmalarda, SIRT1'in oksidatif strese karşı koruyucu bir rolü ortaya koyulmuştur (78-80). Ayrıca SIRT1'in birçok nörodejeneratif hastalık modelinde koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. Bu nöroprotektif fonksiyonu ile SIRT1'in aşırı anlatımı ile başta Alzheimer hastalığı ve Huntington hastalığı olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağladığı literatürde mevcuttur (81-84). Bunun yanında SIRT1'in, artmış NAD biyosentezinin azaltıcı efektörü olarak görev yapabileceği ve aksonal dejenerasyonu geciktirebileceği literatürde belirtilmiştir (85). Çalışmamızda yaptığımız SIRT1 analizleri sonucunda sadece A β grubunda ve toksisite uygulamasından sonra eklenen bor mineralleri gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.4.1). Toksisite grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde SIRT1 seviyelerinde, toksisite uygulamasından önce eklenen boraks ve borik asit grupları ile toksisite uygulamasından sonra eklenen boraks grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalış, toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 6.6.4.2). Bu çerçevede yapılan değerlendirmeler sonucunda SIRT1'in nöroprotektif fonksiyonu ile toksisiteye karşı yanıt oluşturarak hücrel sağ kalım mekanizmasını tetiklediği düşünülmektedir. Bunun yanında NAD biyosentezini azaltıcı yönü ile oksidatif stres seviyesini düşürmesi olasılığı mevcuttur. Bu bağlamda borik asit molekülünün enzimatik

aktivitelerdeki rölü ile SIRT1 seviyesine arttırıcı yönde etki ederek direkt ve/veya dolaylı yoldan hücrel sağkalım yolağını ve insülin sinyalizasyon yolağını tetiklediği düşünölmektedir.



8-SONUÇ

Elde edilen tüm veriler incelendiğinde A β toksisite modelinde bor minerallerinden özellikle borik asidin intraselüler protein seviyelerini değiştirerek hücresel sağkalım ve insülin sinyalizasyon yollarını tetiklediği düşünülmektedir. SIRT1 proteininin, özellikle toksisite uygulamasından sonra eklenen borik asit ile hücrelerdeki oksidatif stres seviyesini normal koşullara yaklaştırarak ve nöroprotektif etkisi üzerinden direkt ve/veya dolaylı olarak Akt ve GSK3 yolağına etki etmesi ile sağkalımı arttırdığı öngörülmektedir.



Şekil 8.1. Protein veribankaları aracılığı ile oluşturulmuş protein-protein etkileşimleri hakkında bilgi vermek için üretilen protein ağı şablonu

*<https://string-db.org> internet sitesi üzerinden oluşturulmuştur (Son erişim 05.07.2018)

Bu çerçevede, elde edilen veriler ilk olarak primer nöron kültüründe kullanılarak çalışmanın gerçekliğinin artırılması amaçlanmaktadır. Elde edilecek veriler doğrultusunda organizma düzeyinde etkilerinin araştırılması üzerine *in vivo* çalışmalar planlanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bor mineralinin çeşitli yiyeceklerde bulunması ile *in vivo* beslenme çalışmalarının yapılabileceği öngörülmektedir.

9-KAYNAKLAR

1. Yuyama, K, Sun, H, Sakai, S, Mitsutake, S, Okada, M, Tahara, H, et al. Decreased Amyloid- β Pathologies by Intracerebral Loading of Glycosphingolipid-enriched Exosomes in Alzheimer Model Mice. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 24488-24498. (2014).
2. Conde-Vancells, J, Rodriguez-Suarez, E, Embade, N, Gil, D, Matthiesen, R, Valle, M, et al. Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes. *Journal of proteome research* **7**, 5157-5166. (2008).
3. Howe, PD. A review of boron effects in the environment. *Biological Trace Element Research* **66**, 153-166. (1998).
4. Sutherland, B, Strong, P, and King, JC. Determining human dietary requirements for boron. *Biological Trace Element Research* **66**, 193-204. (1998).
5. Nielsen, FH. Boron in human and animal nutrition. *Plant and Soil* **193**, 199-208. (1997).
6. Braak, H, and Braak, E. Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. *Neurobiology of Aging* **18**, 351-357. (1997).
7. Bermejo-Pareja, F, Benito-León, J, Vega, S, Medrano, MJ, and Román, GC. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *Journal of the Neurological Sciences* **264**, 63-72. (2008).
8. Antonio, DC, Marzia, B, Luigi, A, Vito, L, Laura, B, Stefania, M, et al. Incidence of Dementia, Alzheimer's Disease, and Vascular Dementia in Italy. The ILSA Study. *Journal of the American Geriatrics Society* **50**, 41-48. (2002).
9. Gurvit, H, Emre, M, Tinaz, S, Bilgic, B, Hanagasi, H, Sahin, H, et al. The Prevalence of Dementia in an Urban Turkish Population. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*® **23**, 67-76. (2008).
10. Bonda, DJ, Wang, X, Lee, H-G, Smith, MA, Perry, G, and Zhu, X. Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-glass. *Neuroscience Bulletin* **30**, 243-252. (2014).

11. Norton, S, Matthews, FE, Barnes, DE, Yaffe, K, and Brayne, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology* **13**, 788-794. (2014).
12. Masters, CL, Bateman, R, Blennow, K, Rowe, CC, Sperling, RA, and Cummings, JL. Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers* **1**, 15056. (2015).
13. López, OL, and DeKosky, ST. Clinical symptoms in Alzheimer's disease. In *Handbook of Clinical Neurology* Vol. 89 pp. 207-216, Elsevier(2008).
14. Becker, JT, Boiler, F, Lopez, OL, Saxton, J, and McGonigle, KL. The natural history of alzheimer's disease: Description of study cohort and accuracy of diagnosis. *Archives of Neurology* **51**, 585-594. (1994).
15. Organization, WH. The ICD-10 Classification of Mental And Behavioural Disorders. 262. (1993).
16. Braak, H, and Braak, E. The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neuroscience Research* **15**, 6-31. (1992).
17. Braak, H, and Del Tredici, K. Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid- β formation. *Neurobiology of Aging* **25**, 713-718. (2004).
18. Braak, H, Alafuzoff, I, Arzberger, T, Kretschmar, H, and Del Tredici, K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica* **112**, 389-404. (2006).
19. Wang, J, Gu, BJ, Masters, CL, and Wang, Y-J. A systemic view of Alzheimer disease — insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology* **13**, 612. (2017).
20. Hardy, J, and Selkoe, DJ. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **297**, 353-356. (2002).
21. Goldgaber, D, Lerman, M, McBride, O, Saffiotti, U, and Gajdusek, D. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* **235**, 877-880. (1987).

22. Tanzi, R, Gusella, J, Watkins, P, Bruns, G, St George-Hyslop, P, Van Keuren, M, et al. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **235**, 880-884. (1987).
23. Robakis, NK, Ramakrishna, N, Wolfe, G, and Wisniewski, HM. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 4190-4194. (1987).
24. Shoji, M, Golde, T, Ghiso, J, Cheung, T, Estus, S, Shaffer, L, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129. (1992).
25. Haass, C, Schlossmacher, MG, Hung, AY, Vigo-Pelfrey, C, Mellon, A, Ostaszewski, BL, et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322. (1992).
26. Seubert, P, Vigo-Pelfrey, C, Esch, F, Lee, M, Dovey, H, Davis, D, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* **359**, 325. (1992).
27. Roher, AE, Esh, CL, Kokjohn, TA, Castaño, EM, Van Vickle, GD, Kalback, WM, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* **5**, 18-29. (2009).
28. Yankner, BA, and Mesulam, M-M. β -Amyloid and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **325**, 1849-1857. (1991).
29. Levy, E, Carman, M, Fernandez-Madrid, I, Power, M, Lieberburg, I, van Duinen, S, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248**, 1124-1126. (1990).
30. Citron, M, Oltersdorf, T, Haass, C, McConlogue, L, Hung, AY, Seubert, P, et al. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* **360**, 672. (1992).
31. Suzuki, N, Cheung, T, Cai, X, Odaka, A, Otvos, L, Eckman, C, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid

- beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**, 1336-1340. (1994).
32. Cai, X, Golde, T, and Younkin, S. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* **259**, 514-516. (1993).
 33. Sherrington, R, Rogaev, EI, Liang, Y, Rogaeva, EA, Levesque, G, Ikeda, M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754. (1995).
 34. Levy-Lahad, E, Wasco, W, Poorkaj, P, Romano, D, Oshima, J, Pettingell, W, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**, 973-977. (1995).
 35. Scheuner, D, Eckman, C, Jensen, M, Song, X, Citron, M, Suzuki, N, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine* **2**, 864. (1996).
 36. Virginia M-Y Lee, Michel Goedert, and Trojanowski, JQ. Neurodegenerative Tauopathies. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 1121-1159. (2001).
 37. Hutton, M, Lendon, CL, Rizzu, P, Baker, M, Froelich, S, Houlden, H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702. (1998).
 38. Hardy, J, Duff, K, Hardy, KG, Perez-Tur, J, and Hutton, M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nature Neuroscience* **1**, 355. (1998).
 39. Rapoport, M, Dawson, HN, Binder, LI, Vitek, MP, and Ferreira, A. Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 6364-6369. (2002).
 40. Golde, TE, Eckman, CB, and Younkin, SG. Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1502**, 172-187. (2000).
 41. Selkoe, DJ, and Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* **8**, 595-608. (2016).

42. R., CA. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *BioEssays* **21**, 238-246. (1999).
43. Ferrer, MD, Sureda, A, Mestre, A, Tur, JA, and Pons, A. The Double Edge of Reactive Oxygen Species as Damaging and Signaling Molecules in HL60 Cell Culture. *Cellular Physiology and Biochemistry* **25**, 241-252. (2010).
44. Praticò, D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochemical Pharmacology* **63**, 563-567. (2002).
45. González-Gross, M, Marcos, A, and Pietrzik, K. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *British Journal of Nutrition* **86**, 313-321. (2001).
46. Wang, X, Wang, W, Li, L, Perry, G, Lee, H-g, and Zhu, X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1842**, 1240-1247. (2014).
47. Simons, M, and Raposo, G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 575-581. (2009).
48. Subra, C, Laulagnier, K, Perret, B, and Record, M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* **89**, 205-212. (2007).
49. Wubbolts, R, Leckie, RS, Veenhuizen, PTM, Schwarzmann, G, Möbius, W, Hoernschemeyer, J, et al. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 10963-10972. (2003).
50. Théry, C, Zitvogel, L, and Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* **2**, 569. (2002).
51. Bolaños, L, Lukaszewski, K, Bonilla, I, and Blevins, D. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 907-912. (2004).
52. Hunt, CD. Dietary boron: Progress in establishing essential roles in human physiology. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **26**, 157-160. (2012).
53. Penland, JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological Trace Element Research* **66**, 299-317. (1998).

54. Hunt, CD, Halas, ES, and Eberhardt, MJ. Long-term effects of lactational zinc deficiency on bone mineral composition in rats fed a commercially modified Luecke diet. *Biological Trace Element Research* **16**, 97-113. (1988).
55. Deitrich, RA. Diphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde dehydrogenase: III. Sulfhydryl characteristics of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **119**, 253-263. (1967).
56. Strittmatter, P. Reversible Direct Hydrogen Transfer from Reduced Pyridine Nucleotides to Cytochrome b5 Reductase. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 3043-3050. (1964).
57. Aysan, E, Sahin, F, Telci, D, Yalvac, ME, Emre, SH, Karaca, C, et al. Body Weight Reducing Effect of Oral Boric Acid Intake. *International Journal of Medical Sciences* **8**, 653-658. (2011).
58. Hartl, D, Schuldt, V, Forler, S, Zabel, C, Klose, J, and Rohe, M. Presymptomatic Alterations in Energy Metabolism and Oxidative Stress in the APP23 Mouse Model of Alzheimer Disease. *Journal of Proteome Research* **11**, 3295-3304. (2012).
59. Kilic, Ü, Kilic, E, Järve, A, Guo, Z, Spudich, A, Bieber, K, et al. Human Vascular Endothelial Growth Factor Protects Axotomized Retinal Ganglion Cells *In Vivo* by Activating ERK-1/2 and Akt Pathways. *The Journal of Neuroscience* **26**, 12439-12446. (2006).
60. Kabu, M, and Akosman, MS. Biological Effects of Boron. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Whitacre, D. M., ed) pp. 57-75, Springer New York, New York, NY. (2013).
61. N., MR, G., HC, B., SG, and L., MC. Increased Cerebral Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Alzheimer's Disease May Reflect Oxidative Stress. *Journal of Neurochemistry* **46**, 1042-1045. (1986).
62. Su, B, Wang, X, Nunomura, A, Moreira, PI, Lee, H-g, Perry, G, et al. Oxidative Stress Signaling in Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research* **5**, 525-532. (2008).
63. Rahman, S, and Islam, R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling : CCS* **9**, 11-11. (2011).

64. Marimpietri, D, Petretto, A, Raffaghello, L, Pezzolo, A, Gagliani, C, Tacchetti, C, et al. Proteome Profiling of Neuroblastoma-Derived Exosomes Reveal the Expression of Proteins Potentially Involved in Tumor Progression. *PLoS ONE* **8**, e75054. (2013).
65. Weingarten, MD, Lockwood, AH, Hwo, SY, and Kirschner, MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 1858-1862. (1975).
66. Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K, Tung, YC, Quinlan, M, Wisniewski, HM, and Binder, LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 4913-4917. (1986).
67. Boban, M, Miskic, T, Babic Leko, M, Hof, PR, and Simic, G. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with okadaic acid express phosphorylated high molecular weight tau immunoreactive protein species. *bioRxiv* (2018).
68. Russell, JW, Windebank, AJ, Schenone, A, and Feldman, EL. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *Journal of neurobiology* **36**, 455-467. (1998).
69. Rickle, A, Bogdanovic, N, Volkman, I, Winblad, B, Ravid, R, and Cowburn, RF. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *NeuroReport* **15**, 955-959. (2004).
70. Hooper, C, Killick, R, and Lovestone, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **104**, 1433-1439. (2008).
71. Lizcano, JM, and Alessi, DR. The insulin signalling pathway. *Current Biology* **12**, R236-R238. (2002).
72. Turenne, GA, and Price, BD. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biology* **2**, 12-12. (2001).
73. Phiel, CJ, Wilson, CA, Lee, VMY, and Klein, PS. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature* **423**, 435. (2003).

74. McManus, EJ, Sakamoto, K, Armit, LJ, Ronaldson, L, Shpiro, N, Marquez, R, et al. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO Journal* **24**, 1571-1583. (2005).
75. Claudie, H, Vladimir, M, Florian, P, Richard, K, Emma, S, Tobias, E, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience* **25**, 81-86. (2007).
76. Rockenstein, E, Torrance, M, Adame, A, Mante, M, Bar-on, P, Rose, JB, et al. Neuroprotective Effects of Regulators of the Glycogen Synthase Kinase-3 β Signaling Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease Are Associated with Reduced Amyloid Precursor Protein Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience* **27**, 1981-1991. (2007).
77. Michan, S, and Sinclair, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *The Biochemical journal* **404**, 1-13. (2007).
78. Yamamoto, T, and Sadoshima, J. Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. *Trends in Cardiovascular Medicine* **21**, 27-32. (2011).
79. Vinciguerra, M, Santini, MP, Claycomb, WC, Ladurner, AG, and Rosenthal, N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging (Albany NY)* **2**, 43-62. (2010).
80. Vinciguerra, M, Fulco, M, Ladurner, A, Sartorelli, V, and Rosenthal, N. SirT1 in muscle physiology and disease: lessons from mouse models. *Disease Models & Mechanisms* **3**, 298-303. (2010).
81. Gizem, D, and Leonard, G. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell* **9**, 285-290. (2010).
82. Kim, D, Nguyen, MD, Dobbin, MM, Fischer, A, Sananbenesi, F, Rodgers, JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO Journal* **26**, 3169-3179. (2007).
83. Parker, JA, Arango, M, Abderrahmane, S, Lambert, E, Tourette, C, Catoire, H, et al. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature Genetics* **37**, 349. (2005).

84. Qin, W, Yang, T, Ho, L, Zhao, Z, Wang, J, Chen, L, et al. Neuronal SIRT1 Activation as a Novel Mechanism Underlying the Prevention of Alzheimer Disease Amyloid Neuropathology by Calorie Restriction. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 21745-21754. (2006).
85. Araki, T, Sasaki, Y, and Milbrandt, J. Increased Nuclear NAD Biosynthesis and SIRT1 Activation Prevent Axonal Degeneration. *Science* **305**, 1010-1013. (2004).



10-ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mehmet Özgen	Soyadı	ALTINTAŞ
Doğum Yeri	Fatih/İstanbul	Doğum Tarihi	22.01.1992
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	
E-mail	mozgen.altintas@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		-
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Lisans	Fatih Üniversitesi	2016
Lise	Hüseyin Bürge Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1.			
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
KPDS	YÖK-DİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	70,00							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,05	71,48	71,73
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi
MATLAB	Orta
Java	Orta

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

Uluslararası Yayınlar

1. Altintas O, **Ozgen Altintas M**, Kumas M, Asil T. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of cerebral miRNAs against transient cerebral ischemia in diabetic rats. *Neurol Res.* 2016;1-9. [Epub ahead of print]
2. Altintas O, **Altintas MO**, Tasal A, Kucukdagli OT, Asil T. The relationship of platelet-to-lymphocyte ratio with clinical outcome and final infarct core in acute ischemic stroke patients who have undergone endovascular therapy. *Neurol Res.* 2016;1-7.
3. Altintas O, Kumas M, Altintas MO. Neuroprotective Effect of Ischemic Preconditioning via Modulating the Expression of Adropin and Oxidative Markers against Transient Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. *Peptides.* 2016;79:31-8.
4. Ozge Altintas, **Mehmet Ozgen Altintas**, Mehmet Serif Aydin, Oguz Baran, Veysel Antar, Mukaddes Esrefoglu, Talip Asil. Neuroprotective Effects of Chronic Fenofibrate Treatment via Modulating the Immunoreactivity of Cleaved Caspase-3 in Stroke Induced by Transient Middle Cerebral Occlusion Rat Model. *Turk Neurosurg.* 2016. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.16772-15.3.
5. Altintas O, Antar V, Baran O, Karatas E, **Altintas MO**, Kesgin S, Buyukpinarbasili N, Kocyigit A, Asil T. Neuroprotective effects of hemicraniectomy in malign middle cerebral artery infarctions: experimental study. *J Neurosurg Sci*, 2015

Uluslararası Bildiriler

1. Sözel Sunum - Mehmet Ozansoy, **Mehmet Özgen Altintas**, Ulkan Kilic, Effects of two boron containing compounds and melatonin in A β 1-42 toxicity. 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, Malatya, Turkey, 2018
2. Poster - Altintas, M Kumas, **MO Altintas**, T Asil, Neuroprotective Effect of Ischemic Preconditioning via Modulating the Expression of Adropin and Oxidative Markers against Transient Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. European Stroke Organisation Congress, Barcelona, Spain, 2016
3. Poster - Altintas, V Antar, O Baran, S Kesgin, E Karatas, **MO Altintas**, N Buyukpinarbasili, A Kocyigit, T Asil, Experimental and Translational Neuroscience: Neuroprotective effects of hemispherectomy in malignant middle cerebral artery infarctions: Experimental study. World Stroke Congress (WSO), Istanbul, Turkey, 2014
4. Poster - Z. Aydın Sinirlioğlu, **M.O.Altıntaş**, D.Sinirlioğlu, F. Akbaş, Preparation of cross-linked enzyme aggregates of laccase enzyme and using dye decolorization. 2nd International GEN-AREL Molecular Biology and Genetics Student Congress, Istanbul, Turkey, 2014

Ulusal Bildiriler ve Sözlü Sunumlar

1. Sözel Sunum - Özge Altıntaş, Abdurrahman Tasal, Taha Ökkeş Küçükdağlı, **Mehmet Özgen Altıntaş**, Talip Asil, Akut İskemik İnme Hastalarında Trombosit Lenfosit Oranının Nörogörüntülemeler, Revaskularizasyon Başarısı ve Klinik Prognoz ile İlişkinin Değerlendirilmesi. 51. National Neurology Congress, Antalya, Turkey, 2015.
2. Sözel Sunum - Özge Altıntaş, Meltem Kumaş, **Mehmet Özgen Altıntaş**, Zeynep Aydın Sinirlioğlu, Talip Asil, Diyabetik Sıçanlarda Malign Serebral İskemi ve İskemik Ön koşullanmanın Epigenetik Rolünün Araştırılması. 51.National Neurology Congress, Antalya, Turkey, 2015.
3. Sözel Sunum - Özge Altıntaş, Veysel Antar, Oğuz Baran, Ersin Karataş, **Mehmet Özgen Altıntaş**, Sıddıka Kesgin, Abdurrahim Koçyiğit, Nur Büyükpınarbaşılı, Talip Asil, Malign Anterior Sirkülasyon Infarktlarında

Erken Dekompresyonun İnfarkt Hacmi, Serebral Ödem, Kan Beyin Bariyeri Üzerine Etkisinin Araştırılması. 50. National Neurology Congress, Antalya, Turkey, 2014.

4. Poster - Özge Altıntaş, **Mehmet Özgen Altıntaş**, Mehmet Şerif Aydın, Talip Asil, Orta Serrebral Arter Okluzyonu ile Oluşturulan Serebral İskemi Reperfüzyon Modelinde Fenofibratın Nöroprotektif Etkisinin Gösterilmesi. 51.National Neurology Congress, Antalya, Turkey, 2015.

Sertifikalar

1. Deney hayvanları kullanım sertifikası

Ödüller

1. Fatih Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Poster Sunumu Yarışması İkincilik Ödülü (2016)