

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SELENYUM NANOPARTİKÜLLERİNİN ALZHEİMER
HASTALIĞI OLUŞTURULAN SİNİR HÜCRELERİNDE
OKSİDATİF STRES VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ramazan ÇINAR

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

ISPARTA - 2017



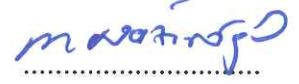
© 2017 [Ramazan ÇINAR]

TEZ ONAYI

Ramazan ÇINAR tarafından hazırlanan “**Selenyum Nanopartiküllerinin Alzheimer Hastalığı Oluşturulan Sinir Hücrelerinde Oksidatif Stres ve Apoptozis Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mehmet KARA
Yüzüncü Yıl Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Ramazan ÇINAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alzheimer Hastalığı	4
2.2. Oksidatif Stres.....	6
2.3. Antioksidanlar	8
2.3.1. Enzimatik antioksidanlar	8
2.3.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	9
2.4. Selenyum	11
2.4.1. Selenyumun etkileri	12
2.4.2. Selenyumun Alzheimer hastalığında oksidatif stres rolü	13
2.4.3. Selenyum nanopartiküllerin Alzheimer hastalığındaki rolü	16
2.5. Apoptozis	18
2.5.1. Mitokondri aracılı (İntrensek) yolak	19
2.5.2. Ölüm reseptörleri aracılı (Ekstrensek) yolak.....	20
2.5.3. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı yolak.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Kullanılan alet ve malzemeler	22
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	23
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Selenyum nanopartiküllerin hazırlanması	23
3.2.2. Hücrelerin çoğaltımı	24
3.2.3. Grupların oluşturulması	29

3.2.4. Laboratuvar analizleri.....	30
3.2.4.1. Hücre canlılığı (MTT) analizi	30
3.2.4.2. Hücre içi SOR üretimi tayini.....	31
3.2.4.3. Mitokondriyal membran depolarizasyonu analizi.....	31
3.2.4.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 analizleri.....	32
3.2.4.5. Apoptozis testi.....	32
3.3. İstatistiksel Analiz.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1 Araştırma Bulguları	33
4.1.1. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin hücre canlılığı (MTT) düzeyleri üzerine etkileri	33
4.1.2. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin hücre içi SOR seviyeleri üzerine etkileri	34
4.1.3. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin mitokondriyal zar depolarizasyon düzeyleri üzerine etkileri	34
4.1.4. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin apoptozis düzeyleri üzerine etkileri	35
4.1.5. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin kaspaz 3 aktivite değerleri üzerine etkileri	36
4.1.6. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin kaspaz 9 aktivite değerleri üzerine etkileri	37
4.2. Tartışma	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SELENYUM NANOPARTİKÜLLERİNİN ALZHEİMER HASTALIĞI OLUŞTURULAN SİNİR HÜCRELERİNDE OKSİDATİF STRES VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Ramazan ÇINAR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Hücrel oksidatif stres düzeyinin normal sınırların üzerine çıkması Alzheimer hastalığı (AlzH)'nin ve amiloid beta (A β) senil plakların oluşmasında önemli bir role sahiptir. Gelişen teknolojiyle beraber nanomateryal kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklardan AlzH yaklaşık %80'lik bir oranla en sık rastlanan demans tipi olarak bilinmektedir. AlzH tedavisinde şimdiye kadar klasik tıbbi yaklaşımlar benimsense de hastalığın tedavisinde fazla etkin olmadıkları bilinmektedir. AlzH görülen hastaların kan ve saç örneklerinde glutatyon peroksidaz ve selenyum (Se) yetersizliğinin olduğuna dair bildirimler mevcuttur.

Se içeren nanopartiküllerin (SeNP), deneysel AlzH oluşturulan modellerde mitokondriyal oksidatif stres ve apoptozis düzeyleri üzerine henüz bir bildirim mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışmada; DBTRG hücrelerinde *in vitro* AlzH modelinin tedavisinde Se ve SeNP'nin apoptozis düzeyleri, hücre canlılığı, kaspaz 3 ve 9 enzim aktiviteleri, mitokondriyal zar depolarizasyon ve hücre içi serbest oksijen radikalleri (SOR) üretimi seviyelerine etkileri araştırıldı. Hücreler; kontrol, Se (200 nM), A β (20 μ M), SeNP (50 nM), A β + Se ve A β + SeNP olmak üzere altı gruba ayrıldı. Tüm hücreler 24 saat boyunca rutin hücre kültürü ortamında bırakıldılar. İnkübasyonu tamamlanan gruplara yukarıda anılan analizler yapıldıktan sonra gerekli istatistik değerlendirmeleri tamamlandı.

Kontrol grubuna kıyasla, A β grubunda SOR üretimi, mitokondriyal zar depolarizasyonu, apoptozis düzeyleri ile kaspaz 3 ve 9 aktivite düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Se, SeNP, A β + Se ve A β + SeNP gruplarında, bu düzeylerde anlamlı azalma gözlenirken, hücre canlılığı değerinin A β grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Sonuç olarak; AlzH modeli oluşturulmuş DBTRG hücrelerinde mitokondriyal oksidatif stres ve apoptozis düzeyleri üzerinde Se ve SeNP'nin olumlu etkileriyle düzenlendiği gözlemlendi. Bu değerler üzerinde SeNP'ye kıyasla, Se'nin etkisi daha önemli seviyede olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, Apoptozis, DBTRG hücreleri, Hücrel oksidatif stres, Selenyum ve Selenyum Nanopartikülleri,

2017, 56 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

EFFECTS OF SELENIUM NANOPARTICLES ON OXIDATIVE STRESS AND APOPTOSIS IN CELL CULTURE OF ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

Ramazan ÇINAR

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biomedical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Alzheimer's disease (AlzH) is one of the neurodegenerative diseases, is known to the most common dementia type with a high rate of 80%. Although it is not an effective option for the treatment until now, the conventional methods are used to treatment of AlzH. Exceeding the normal limits of intracellular oxidative stress (SOR) levels has a trigger role of AlzH incidence and amyloid beta ($A\beta$) senyl plaque formation. The usage of nanomaterials with developing technology is becoming very common. In the present reports in the literature, the low level of selenium (Se) and glutathione peroxidase enzyme are observed in blood and hair of patientst with AlzH.

There is no report on the effects of Se containing nanoparticles (SeNP) on apoptosis and SOR levels in the literature. Hence in this study, we investigated effects of selenium (200 nM and 24 h) SeNP (50 nM and 24 h) on apoptosis, cell viability, caspase 3 and 9 activity values, mitochondrial membrane depolarization and intracellular SOR production levels in *in vitro* AlzH model of DBTRG neuronal cells. The cells were divided into six groups as follows; control, $A\beta$, Se, SeNP, $A\beta$ +Se and $A\beta$ +SeNP. After all incubations (24 hours), the cells were experimented with aforementioned analyzes and statistical evaluations were completed.

The SOR, mitochondrial membrane depolarization, apoptosis, caspase 3 and 9 values were lower in the $A\beta$ group compared to control group, although cell viability level was higher in the group than in control. However, the values were decreased in Se, SeNP, $A\beta$ +Se and $A\beta$ +SeNP groups by the Se and SeNP treatments, although cell viability level in the group was increased by the treatments.

In conclusion, treatment by Se and SeNP may help the cells keeping their survival though inhibition of $A\beta$ -induced mitochondrial oxidative stress and apoptosis. It seems that protective effects of Se treatment on the values were more significant as compared to SeNP treatment. This is the first *in vitro* study and report that proves the amendatory effects of Se and SeNP treatments on cell viability parameters which impaired by oxidative stress in DBTRG cells as an AlzH model.

Keywords: Alzheimer's disease, Apoptosis, Cellular oxidative stress, DBTRG cells, Selenium and selenium nanoparticles

2017, 56 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve Yüksek lisans Eğitimimde katkısı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim ve tez yazım aşamalarında desteğini hep hissettiğim Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e, değerli çalışma arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Ahmi ÖZ, Sayın Bilal ÇİĞ ve Asistan Sayın İshak Suat ÖVEY'e laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen teknisyen arkadaşlarım Sayın Muhammet ŞAHİN ve Sayın Fatih ŞAHİN'e,

Her zaman yanımda olan ve bu tezin sunulduğu güne kadar desteğini her anımda hissettiğim dayım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇAY'a teşekkürlerimi sunarım

Hayata gözlerimi açtığım ilk andan bu tezin sunulduğu güne kadar desteklerini her anımda hissettiğim, haklarını asla ödeyemeyeceğimi düşündüğüm aileme minnettarım...

Ramazan ÇINAR
ISPARTA 2017

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Tiyoil redoks döngüleri ve antioksidan savunma ağı üzerindeki yeri	9
Şekil 2. Hücrede serbest radikallerin üretimi	11
Şekil 3. Hücre kültüründeki laminar flow cihazı	25
Şekil 4. Buzdolabı ve steril inkübatörler	25
Şekil 5. Hücre kültürü laboratuvarındaki inverted mikroskoplar ve santrifüj cihazı ..	26
Şekil 6. -196 °C sıvı azot tankı ve çalkalamalı su banyosu	26
Şekil 7. Hücre kültüründeki laminar flow cihazında hücrelerin pasajlanması	28
Şekil 8. Casy TT hücre sayım cihazı	28
Şekil 9. Analizlerin yapıldığı plate reader (kuyucuk okuyucu) cihazı	30
Şekil 10. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının MTT düzeyleri üzerine etkileri.	33
Şekil 11. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının hücre içi SOR seviyeleri üzerine etkileri.	34
Şekil 12. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) seviyeleri üzerine etkileri.	35
Şekil 13. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının apoptozis seviyeleri üzerine etkileri.	36
Şekil 14. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri.	37
Şekil 15. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri.	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. Selenyum nanopartiküllerinin AlzH üzerindeki etkileri 17



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

¹O₂	: Singlet Oksijen
Ag	: Gümüş
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Faktör-1
APP	: Amiloid Prekürsor Protein
Aβ	: Amiloid Beta
Ca⁺²	: Kalsiyum
DBTRG	: Denver Brain Tumor Research Group
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ER	: Endoplazmik Retikulum
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: Glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
KAT	: Katalaz
NO[·]	: Nitrik Oksit
NÖFY	: Nörofibriler Yumaklar
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit
OH[·]	: Hidroksil
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
Se	: Selenyum
SeNP	: Selenyum Nanopartiküller
SEP	: Senil Plaklar
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TRPM2	: Transient Receptor Potential Melastatin 2
Trx-1	: Tiyoredoksin Redüktaz 1
TÜNFR	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör

1. GİRİŞ

Dünyada insanların ortalama yaşam süreleri modern tıbbın gelişmesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Zarkovic vd., 2016). Ancak bazı hastalıkların tıbbın gelişmesine rağmen halen tam olarak oluşum mekanizmaları aydınlatılmamış ve bu mekanizmaları önleyecek kalıcı bir tedavi bulunamamıştır. Bu hastalıklardan biri de AlzH'dır. Genellikle 65 yaş ve üstü yaşlarda AlzH görülmektedir. Bu hastalık, demans (unutkanlık) olarak da karşımıza çıkmaktadır. Türkiye Alzheimer Derneğinin 2015 verilerine göre ülkemizde 400.000'in üzerinde Alzheimer hastası bulunurken bu sayı dünya geneline bakıldığında ise 46,8 milyon civarında olduğu saptanmıştır. (Türkiye Alzheimer Derneği 2015; Hao ve Friedman, 2016).

Hastalığın oluşumunda hücre içi SOR, amiloid β 1-42 ve Tau protein seviyeleri önemli yer tutmaktadır ve bu yapılar hücre içerisinde metabolik olaylar sırasında meydana gelmektedir. Hücre içi metabolitlere örnek olarak SOR; süperoksit ($O_2^- \cdot$), hidroksil ($\cdot OH$) ve tekli oksijen (1O_2) verilebilir. Bu radikaller enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarca kontrol altında tutulmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutasyon (GSH), C ve E vitaminleri yer almaktadır. Enzimatik antioksidanlar arasında katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GPx) yer almaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar sinir hücrelerinde ve beyinde yeterince bulunmazlarsa, SOR türlerinin sinir hücreleri ve beyindeki en önemli hedefleri olan lipitler, proteinler ve nükleik asitler önemli ölçüde zarar görmektedir. Vücuttaki oksijenin %30'u beyin tarafından tüketilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) bakımından zengin olan beyin ve sinir hücrelerinin aynı zamanda antioksidan savunma sistemi bakımından fakir olması nedeniyle SOR türleri bu dokularda oksidatif hasar meydana getirmektedir. (Halliwell, 2006; Hao ve Friedman, 2016).

Temel bir element olan Se birçok fizyolojik olayda önemli rol oynamaktadır. Se antioksidan olarak görev alarak hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır (Kahya vd., 2017). Enzimatik antioksidanlar arasında GPx önemli bir yer tutmaktadır. $O_2^- \cdot$ radikali SOD tarafından, hidrojen peroksit'e (H_2O_2) dönüştürülür. H_2O_2 , KAT ve GPx enzimleri ile suya kadar parçalanmaktadır. GPx enziminin yapısına Se elementi girmektedir. Se eksikliğinde vücut savunması zayıflamakta ve AlzH'yi de içerisine alan nörolojik hastalıklar artış göstermektedir (Pillai vd., 2014). Se aşırı miktarda

uygulandığı durumlarda ise hücreyi apoptozise sürüklemektedir (Uğuz vd., 2009). GPx'in Se bağımlı ve Se bağımsız olmak üzere, farklı substratlar kullanan iki tipi mevcuttur. Se bağımsız formu organik H₂O₂ moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterir. Se bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve antioksidan kapasitesi daha güçlüdür (Schweizer vd., 2004). Se, GSH ve lipoik asit gibi antioksidan redoks siteminde de önemli rolü vardır (Ajith ve Padmajanair, 2015). Se ile ilgili buraya kadar anlatılan özellikler uzun yıllardan beri iyi bilinmektedir.

Elementçe zenginleştirilmiş nanopartiküller 1-200 nm boyutta özel fizikokimyasal karakteristiklere sahip parçacıklardır (Song vd., 2016). Nanopartiküllerin AlzH ve diğer demans tipleri gibi nörolojik hastalıklardaki rolüne odaklanan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Deneysel hayvanlarından inhalasyon yoluyla trake ve akciğerlere, enjeksiyon yoluyla damarlar ve periton içine enjekte, ağız yoluyla da (gavaj) sindirim sistemine nanopartiküller verilebilmektedir (Parveen vd., 2015; Shinohara vd., 2015; Zhang vd., 2010; Ciobica vd., 2012). Titanyum dioksit (TiO₂), silika dioksit (SiO₂), gümüş (Ag) ve çinko oksit (ZnO) gibi nanopartiküller sindirim yolundan emilerek, ciltten veya inhalasyonla vücuda alınır ve alınan element ile zenginleştirilmiş nanopartiküllerin oksidatif toksik etkilerine karşı en hassas organ beyin olmasına rağmen emilen bu nanopartiküller farklı organlarda depolanır (Feng vd., 2015). Yukarıda bahsedildiği gibi, nöronlar yüksek oranda oksijen tüketimi, yüksek miktarda PUFA varlığı ve enzimatik antioksidan aktivitesinin düşük seviyeleri nedenleriyle oksidatif hasara karşı özellikle hassastır (Halliwell, 2006; 2009). Se, sülfüre benzer özellikleri ile bir eser elementtir. Se'nin çeşitli allotropları (kırmızı, siyah ve gri) sıcaklık değişikliklerine bağlı olarak dönüşüm yaparlar. Se'nin yüksek dozları kanser hücrelerinin çoğalmasını artırır ve nörotoksik etkilere sahipken düşük ve orta dozları kanser hücre çoğalmasını azaltır ve AlzH'ni da içeren nörolojik hastalıklar üzerinde tedavi edici etkilere sahiptir (Halliwell, 2006; 2009). Se'nin antioksidan ve antienflamatuvar etkileri *in vitro* çalışmalarda hücre hatları kullanarak, *in vivo* hayvan modellerinde ispatlanmıştır (Nogueira ve Rocha, 2011). Buna ek olarak uygulanan Se bileşiklerinin tipi ve Se'nin toksik etkisi arasında doğrudan ilişkide mevcuttur (Weekley ve Harris, 2013). Buna rağmen, Se'nin özelliklerinin ve SeNP'in nöronal hastalıklarının tedavisinde kullanıma ilişkin mevcut çalışmalarda zıtlıklar bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlardaki zıtlıklar deneylerdeki farklı konsantrasyonlar ve *in vitro* çalışmalarındaki farklı hücre hatları

kullanılmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Oksidatif stres, çoğu nörolojik hastalıkların etiyopatogenezinde çoklu faktörlerle ilişkilendirilebilir. Yukarıda bahsedilenlerden ötürü nörodejenaratif hastalıkları tedavide doğal antioksidan bileşenlerle çeşitli tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir (Nazıroğlu, 2011; 2015). Ancak yine de doğal antioksidanların başarıları az olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, nörolojik hastalıkların tespit ve tedavisinde ilerleme kaydedebilmek için yeni tedavi edici nanopartiküllerin keşfedilmesi önem kazanmaktadır. Eldeki mevcut verilere göre; hafıza kaybı yaşayan hastalarla yapılan çalışmalarda, AlzH ile serum ve saç numunelerindeki Se konsatrasyonunun azalması arasında doğrudan ilişki olduğu bildirilmiştir (Ceballos-Picot vd., 1996; Koç vd., 2015). AlzH ve hayvan modellerinde uygulanan Se'nin hafıza kaybı riskini azalttığı gözlemlenmiştir (Kosik, 1992; Balaban vd., 2016). Günümüzde Se ve Se proteinlerin AlzH dâhil nörodejenaratif hastalıklarda rolünün araştırıldığı çalışmaların sayısı hızla çoğalmaktadır. Seleno proteinler; aminoasit formunda olup, selenosistein yani Se içeren proteinlerdir. Seleno proteinler, çoğunlukla insan beyinde olmak üzere birçok dokuda eksprese edilir ve Alzheimer'ın ilerlemesinin önlenmesinde anahtar faktörler olan antioksidanlarla ilişkilendirilir (Schweizer vd., 2004). Ek olarak yeni sentezlenen seleno proteinleri ile SeNP'nin önemli biyolojik etkileri bulunmaktadır (Fernandes ve Gandin, 2015; Kahya vd., 2014). Bu partiküllerin yüksek potansiyeli ve düşük sistematik toksisitesi nedeniyle Alzheimer'i da içeren nörolojik hastalıkların tedavisi için kullanılan geleneksel tıbbi tedavilere alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi, AlzH benzeri hastalıklarda apoptozis oluşumunda oksidatif stresin önemli bir rolü vardır. Yaptığımız literatür taramalarına göre, günümüze kadar SeNP'nin deneysel hücre kültüründe Alzheimer modelinde faydasını belirlemek için yapılmış herhangi bir hücre kültürü çalışması ile karşılaşılma. SeNP'nin, insidansı artmakta olan AlzH'nın tedavisinde fayda sağlayabileceği düşüncesinden yola çıkarak DBTRG (Denver Brain Tumor Research Group) gliblastoma hücrelerinde SeNP'nin oksidatif stres ve apoptozis değerleri üzerine etkilerinin hücre kültürü ortamında araştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Dr. Alois Alzheimer'a 1907 yılında günlük ihtiyaçlarını karşılayamadığı şikâyetiyle gelen 51 yaşındaki Auguste'ye yapılan tetkikler sonucunda; bellekte bozukluk, okuma ve yazma gibi yetilerde de zorluk çektiği de gözlemlenmiştir. Gözlem altında tutulan Auguste'nin gösterdiği belirtilerin zaman geçtikçe daha da ilerlediği görülmüştür. Auguste'nin ölümünden sonra beynine boyama analiz tekniğiyle otopsi yapıldı. Mikroskopik ortamda yapılan otopsi sonucunda serebral korteksin incelendiği ve iki sıradan bulgu görüldü; gümüş (Ag) boyalar ile boyanarak senil plaklar (SEP) ve nörofibriler yumaklar (NÖFY) görüntülendi. Bu mikroskopik görüntülerde görülen SEP ve NÖFY gibi bulgular farklı bir hastalığın habercisi olarak kabul edildi. Alois Alzheimer bu vakayı "serebral korteksin tuhaf bir hastalığı" adıyla sunduktan sonra klinik idarecisi psikiyatrist Emil Kraepelin hastalığa Alzheimer ismini verdi (Selekler, 2010).

AlzH 40 yaşlarında görülse de 65 yaş ve üstü bireylerde daha çok rastlanmaktadır. 65 yaş ve üstündeki hastalarda ölüm oranı 40'lı yaşlardaki hastalara oranla daha yüksektir. AlzH önceleri yaşlılık hastalığı olarak bilinmesine rağmen günümüzde 40'lı yaşlarda dahi görülmeye başlayan bir nörodejeneratif hastalık halini almıştır. Şu an için dünya üzerinde 35 milyon, Türkiye'de ise 400 bin üzerinde Alzheimer hastası bulunduğu saptanmış ve yapılan tahminlere göre bu rakamların 2030'da iki, 2050'li yıllarda ise üç katına çıkması beklenmektedir (Eker, 2008).

Demans, kognitif alanlarının ve birçok günlük aktivitelerinin bozulmasına sebep olan kalıcı ve ilerleyici bir sendromdur (Gürvit, 2004: 377-204). AlzH, dünya üzerinde bir problem haline gelerek milyonlarca insanın Alzheimer'dan muzdarip olmasına sebep olmuştur. AlzH halk arasında hafıza kaybı olarak bilinse de bunun yanında karar verme güçlüğü, unutma, fiziksel aktivitelerinin bozulması, kavrama işlevinin ve zihinsel aktivitelerin bozulduğu nörodejeneratif bir hastalıktır. AlzH, limbik sistemin bozulmasıyla meydana gelen ve ilerleyen evrelerde neokortikal alanda çıkan sorun, ilk yakın bellek bulanıklığı ile kendini gösterir iken, ilerleyen süreçte unutma ile ayırt edilen demans sendromudur.

AlzH'nin patolojik belirtileri; hücre ölümü, sinirler arası iletim kaybı, NÖFY ve SEP birikimi ile karakterizedir. Kliniklerde AlzH genel olarak ana semptomunun büyük bölümünü NÖFY patolojisi olarak gözlenmektedir. Bu patoloji medyal temporal alanına etki yaparak yakın bellek problemini meydana getirmektedir. (Braak ve Braak, 1991, Weintraub vd., 2012). İlk başlarda hiçbir belirti göstermeyen hastalık gizliden gizliye neokortikal bölgeyi tahrip eder. Bu gizli hastalığın sinsi belirtileri ortaya çıkmasıyla birlikte diğer bilişsel bölgelerde hasarlara yol açmaya başlar. AlzH genetiğine bağlı olarak meydana gelen hastalarda %1 frekansına karşılık gelmekte ve bu 3 ana temel üzerinde değerlendirilebiliriz. Birinci temel Presenilin 1, ikinci temeli Presenilin 2 ve üçüncü temeli ise Amiloid prekürsor proteini (APP)'dir (Liu vd., 2017). Bahsedilen üç ana temel gendeki değişimleri ile genetiğe bağlı oluşan AlzH ile ilişkilendirilmektedir. Üç ana temele ek olarak Apolipoprotein E4 (APOE4) allel taşıyıcılığı ile güçlü bir risk oluşturmaktadır (Solomon vd., 2014; Guerreiro ve Hardy, 2014). Her ne kadar çoklu etken olarak görülseler de bunların dışında en büyük riski yaşlılık oluşturmaktadır. Patolojik aşamalarının temeli, genetik ve çevre etkenleri olsa da temelde yatan sürekli aktif mikroglial ve astrositik hücreler ile kaplanmış NÖFY'ler ile SEP'ler ana unsur teşkil etmektedir (Solomon vd., 2014). A β plakların oluşumu, bir transmembran olan APP'nin yıkımı sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiş ve A β 'nin bir araya gelerek nöron içermeyen plaklar ve zehir etkisinin sınırlı olduğu diffuz plaklar olduğu ortaya konmuştur (Norstrom, 2017). A β plaklar oksidatif stres veya mikroglial bir dizi faktörlerin etkisi ile daha güçlü plaklara dönüşerek nöronal hasara sebep olabildiği bildirilmiştir. Nöronal plaklar ile akson parçacıkları ve dentrit arasında meydana gelen iplikçi düğümler olan A β , özellikle NÖFY'nin da bu yapıya katılarak AlzH'nin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Diffüz plaklar genel olarak demans da görülmeyen yaşlı insanlarda bulunurken, AlzH'li hastaların beyinde güçlü ve nöronal plaklar genellikle neokortekste bulunduğu görülmüştür (Thierry vd., 2017). Fazla fosforilasyona uğramış sıradan bir mikrotübül ile bağlantılı olduğu düşünülen Tau proteinleri norofibrillerin iplik topluluğunun ana maddesini meydana getirmektedir. Fazla fosforilasyon sonucu Tau proteini çift diziler halinde hücrede birikerek NÖFY'nin meydana gelmesine yardımcı olur (Serrano-Pozo vd., 2011). AlzH'nin ilk başlangıç evresi; duyu algılaması, motor emirlerin oluşumu, uzaysal muhakeme, bilinçli düşünme ve dil gibi yüksek fonksiyonların yürütülmesinde önemli rol alan limbik sistemde bulunurken,

hastalığın ilerlemesi ile sonraki aşamalarda neopalyum bölgesine doğru ilerler (Braak ve Braak, 1991).

AlzH'ye uygun yaklaşım, hastalığın etkin tedavisi ve hatta önlenmesi için hastalık patofizyolojisinin bilinmesi esastır. Alzheimer hastalarının otopsi materyallerinden elde edilen veriler, hastalığın patolojisinde A β ve NÖFY'nin varlığını ile bu patolojik agregatların belirli dağılım şekli ve yoğunluğu olduğu göstermiştir. Genel olarak AlzH'in patogenezinde; beyinde oluşan organ küçülmesi (atrofi), beyinde impuls iletiminde rol oynayan asetilkolin ve glutamat nörotransmitterlerini salgılayan nöronlarında belli ölçüde dejenerasyon izlenmektedir (Braak ve Del Trecidi, 2015).

2.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller daima tek elektron transferleri içeren biyolojik redoks tepkimelerinin sık görünen ürünlerindendirler. Bazı ilaç türleri, çevre kirliliğine yol açan maddeler, ağır metaller, sıcaklık, ultraviyole ışınları veya görünür ışık ile diğer iyonize olabilen radyasyon çeşitleri gibi birçok dış faktörler bu serbest radikallerin biyolojik sistemlerde üretilmesine sebep olmaktadır (Cheeseman ve Slater, 1993; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Reaktif türlerin kontrolsüz bir şekilde üretimi, DNA'yı, lipitleri, proteinleri, karbonhidratları tahripler ve hastalıklarda meydana gelen zincir reaksiyonlarının da dahil olduğu biyolojik moleküler mekanizmanın geniş alanında, önemli ölçüde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasara sebep olmaktadır (Akyol vd., 2002). Bu işlemlerin çoğu, hedef moleküllerin birçoğunda yayılan tek bir başlatıcı radikal türleri ile zincir reaksiyonları yapmaktadır. Kansere de dâhil olmak üzere hastalık çeşitlerinde, hücre hasarını içeren bu tür reaksiyonlar ve reaksiyonların aralarındaki ilişkilere büyük ilgi duyulmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

SOR ve reaktif nitrojen türleri (RNT) olmak üzere iki ana grubu mevcuttur. SOR'un üç ana türü mevcuttur. Bunlar; $O_2^- \cdot$, H_2O_2 ve $\cdot OH$ dir. $O_2^- \cdot$ bir serbest radikal olmasına rağmen, çok da zararlı bir tür değildir. $O_2^- \cdot$, doğada çoğunlukla indirgeyici madde olarak bulunmasının yanı sıra H_2O_2 ve geçiş metal iyonlarına kaynak teşkil etmektedir.

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her tür kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin aktivitesini olağanüstü artırır. Dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (Valko vd., 2007; Knight, 2000). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan oksijen, yapısı gereği radikal oluşturmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla 'SOR' ifade edilmektedir. SOR, organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Seifried vd., 2007).

O₂ ve nitrojen (N₂) molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O₂'in kısmi indirgenmesinden, SOR olan •OH radikali ve O₂^{-•} oluşmaktadır. Ayrıca singlet ¹O₂ ve H₂O₂ molekülleri, radikal olmayan SOR olarak ifade edilirler. O₂ kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit (NO•), peroksinitrit (ONOO⁻), lipid peroksidasyon sırasında oluşan peroksil (ROO•) radikalidir (Seifried vd., 2004; Lam vd., 2008).

Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O₂ kaynaklı radikallerdir. O₂'in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında SOR yeni ürün olarak oluşur. O₂'in kısmi indirgenmesinden, SOR arasında yer alan •OH ve O₂^{-•} oluşmaktadır. Ayrıca ¹O₂ ve H₂O₂ molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (Russell vd., 1989; Van Wijk vd., 2008).

Fizyolojik olarak SOR endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda ve fagositik hücrelerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, X ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara

dumanı gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (Valko vd., 2007).

2.3. Antioksidanlar

Fizyolojik koşullarda; antioksidanlar, SOR hasarını önleyen süpürücü maddelerdir. İnsan vücudunda, enzimatik antioksidan ve non-enzimatik antioksidan olmak üzere iki grup antioksidan koruma sistemi bulunur (Nazıroğlu, 2007).

2.3.1. Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, SOR hasarını nötralize eden ve hücre sel yapıya zarar vermesini önleyen doğal antioksidanlar olarak da bilinmektedirler. Enzimatik antioksidanlar; SOD, KAT, GPx, ve glutatyon reduktaz (GR) olmak üzere dört önemli antioksidan enzimi ihtiva etmektedir (Nazıroğlu vd., 2004).

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^- \cdot$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Bir tür metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki $O_2^- \cdot$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^- \cdot$ radikalini yükseltirken, diğer $O_2^- \cdot$ radikalini H_2O_2 'e indirger (Greenwald, 1990).

Glutatyon peroksidaz (GPx): GSH yolunun ilk enzimi olan GPx, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (Bhamre vd., 2000).

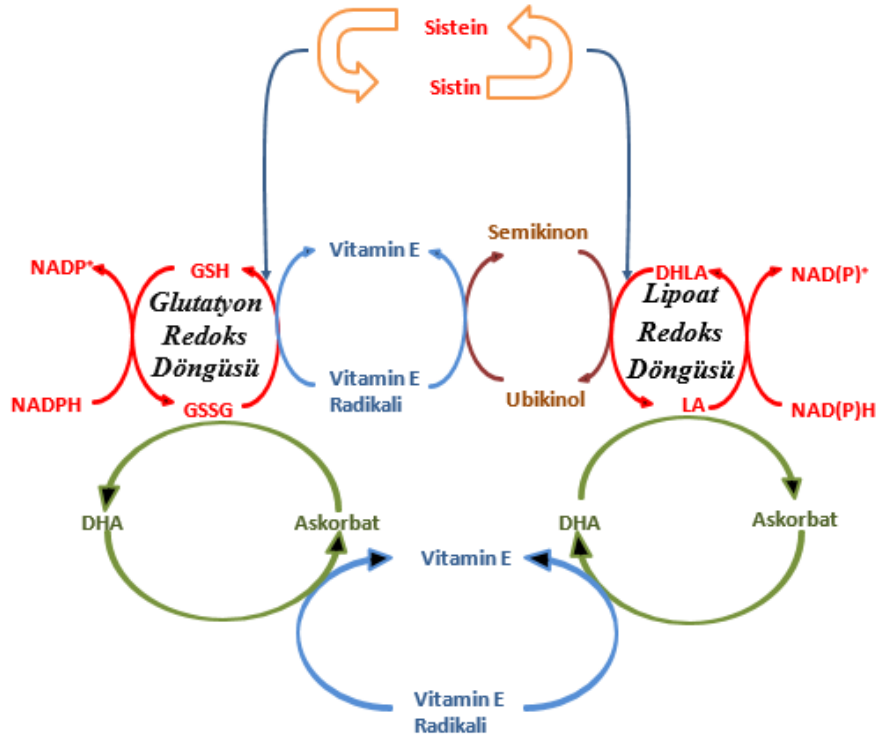
GPx, üç peptiden yapılmış GSH'ı kendi okside formuna (GSSG) okside ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliği'ne sahiptir (Zachara vd., 2006).

GPx'in selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere, farklı kofaktör kullanan iki tipi bulunur. Se'den bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Se bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (Bhamre vd., 2000; Cheng vd., 1999).

Esas peroksit uzaklaştırıcı olarak görev gören GPx'ın fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif'in yanma sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller.

Eritrositlerde de GPx oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan (ER) salınan H₂O₂'in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GPx aktivitesindeki azalma, H₂O₂'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır. Ayrıca GPx, araşidonik asit metabolizmasının lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarının aktivasyonunu artırarak, tümör oluşumunda anahtar rol oynar.

Katalaz (KAT): Glikoprotein yapısında, içeriğinde Fe⁺³ bulunduran dört 'HEM' grubuna ayrılmış bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu H₂O₂'in, peroksidazlarla beraber O₂ ve H₂O parçalanmasında rol alır (Vaziri vd., 2003).



Şekil 1. Tiyol redoks döngüleri ve antioksidan savunma ağı üzerindeki yeri. Hem glutatyon hem de lipoate redoks döngüleri kendi indirgenmiş formları olan GSH ve Dehidroaskorbat (DHA)'ları oluşturmak için hücresel düşürücü eşdeğeri tarafından yürütüldüğünü gösteren, bir dizi sinerjik reaksiyonların şematik gösterimi (Sen ve Packer, 2000).

2.3.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

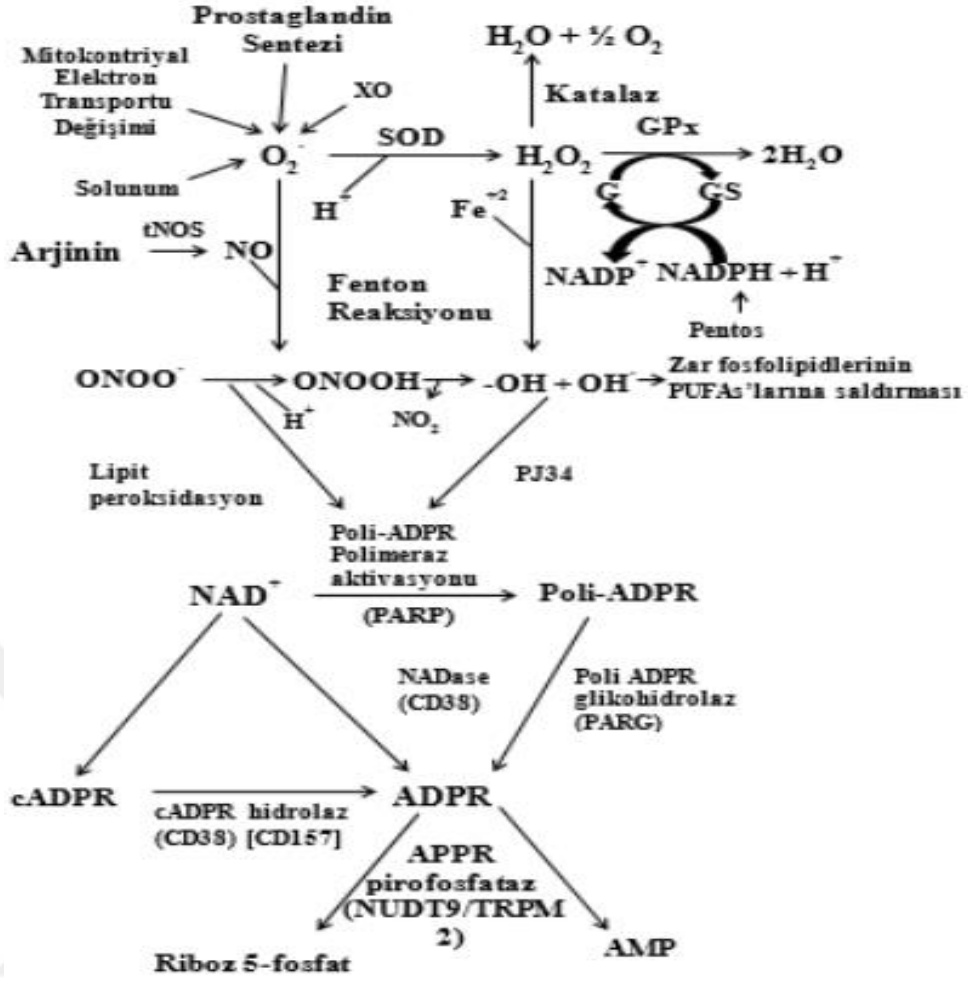
Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında, GSH, vitamin A, beta karoten, C vitamini, E vitamini, ubiquinol, alfa lipoik asit, melatonin ve N-asetil sistein gibi birçok antioksidan madde yer alır. Tez konusu ile ilgili enzimatik olmayan başlıca antioksidanlar şunlardır;

Glutasyon (GSH): Sistein içeren bir tripeptit olan GSH, *in vivo* sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen kaynaklı bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir.

DNA sentezi ve hasarlı bölümlerinin onarılmasında etkin olan GSH; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (Hall, 1999; Matthews ve Butler, 2005).

C Vitamini (Askorbik Asit): Suda eriyebilen bir vitamin olan askorbik asit; O₂, nitrat, sitokrom a ve c bileşiklerinin indirgenmesinde rol oynayabildiği gibi, sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir. Oksidan ajanlara karşı plazmada ilk antioksidan savunma hattını oluşturur. O₂⁻ ve •OH radikalleriyle reaksiyona girip, onları temizlemesinin yanısıra tokoferol radikalinin tekrar tokoferole dönüşümünü sağlar. C vitamini yetersizliğinde hücredeki GSH miktarı da azalır. C vitaminin okside formu L-dihidroaskorbik asit (DHHLA) olmak üzere C vitamininin iki ana formu vardır (Duarte ve Lunec, 2005).

E Vitamini: Alfa, beta, delta ve gama şeklinde dört organik ve dörtde inorganik olmak üzere 8 çeşit formları vardır. E vitaminin α-tokoferol formu, en geniş doğal dağılıma ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanıdır. Yağda çözünebildiği için hem hücresel hem de hücre içi membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Hücre içi organellerin ve hücre zarının yapısında yer almasından dolayı bu kısımların oksidatif strese karşı korunmasında en önemli yağda eriyen antioksidanlardandır (Hamza vd., 2017).



Şekil 2. Hücrede serbest radikallerin üretimi, radikallere etki eden antioksidan sistem ve oksidatif stres sonucunda, NAD^+ 'dan üç farklı yolla ADPR üretiminin şematik gösterimi. Hücrede lipit peroksidasyon sonucu NAD^+ 'dan üç farklı yolla ADPR üretilir. 1. NAD^+ poli-ADPR polimeraz (PARP) aktivasyonu ile poli-ADPR oluşur. Bu poli ADPR ise poli-ADPR glikohidrolaz (PARG) enzimi vasıtasıyla ADPR dönüşür. 2. NAD^+ CD38 reseptöründe bulunan NADase enzimi yoluyla, 3. NAD^+ 'dan siklik ADPR (cADPR) oluşur ve bundan da cADPR hidrolaz enzim aktivasyonu ile ADPR oluşur. Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) katyon kanallarının C ucunun Nudiks alanında (NUDT9) bulunan ADPR pirofosfataz enzimi yardımıyla, ADPR, riboz-5 fosfat ve AMP ye parçalanıp TRPM2 kanallarının açılmasına sebep olur (Nazıroğlu, 2007b).

2.4. Selenyum

Se; Yunancada 'ay' anlamına gelen 'Selen' kelimesinden türetilmiştir. 1817 tarihinde ilk defa İsveçli Kimyacı Bilim Adamı Jons Jacob Berzelius tarafından bakırın ısıtılması sırasında ocağın duvarında kırmızı bir tabaka şeklinde fark edilerek keşfedilmiştir. Ancak 1957'ye gelindiğinde Se yaşam için kullanılması zorunlu

olduğu bilinmesine rağmen 1973 tarihinden sonra canlı üzerinde ki rolü kesin olarak ortaya konmuştur. Se'nin ilk keşfi GPx enziminin yapısında fark edilmiştir. Bunun ardından bakışlar yiyecek ve sağlık üzerindeki faydalarına çevrilmiştir (Kaneko, 1989; Çakır, 2007). 1973'te Se'nin, sitozolik bir enzim olan ve hücre zarının bir bütün olarak dağılmadan bozulmasını önleyen GPx'in yapısında bulunduğu ve ciddi bir göreve sahip olduğu ortaya konulmuştur (Rotruck vd., 1973; Eriksson, 2001).

2.4.1. Selenyumun etkileri

Günümüzde Se'nin canlı organizmalar üzerindeki diğer etkilerini gözlemlemek için birçok çalışma yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalarla Se'nin ön plana çıkaran özelliği antioksidan olmasıdır. GSH ile tepkimeye girdiği zaman hücre zarının yapısını, hücrelerin bir arada tutulmasını ve lipid peroksidasyonların zarar verici etkilerini önlemenin yanında eritrosit, lökosit kromozomlarının zarar görmesini engeller ve bundan dolayı hücreler ile dokuların yaşlanma hızını yavaşlattığı görülmektedir (Steven McCarty, 1994). İki formlu bir element olan Se, organik ve inorganik yapılardadır. Se en fazla inorganik formda bulunup son derece zararlı olan sodyum selenit yapısındadır. Diğer organik formu ise seleometiyonin yapısında olup ve inorganik yapısına göre daha az zararlıdır. Se'nin en faydalı olduğu durum düzenli tüketim ve diyet halidir. Se canlılarda farklı elementler ile bir bağ kurabilir, kurulan bu bağ alınan miktarın çeşitliliğine göre farklı işaretler gösterebilir. Se ile E vitamini etkileşime girdiklerinde daha iyi sonuç göstermektedir. Ancak C vitamini ise E vitamini gibi davranmayıp inorganik Se'nin etkisiz hale getirirken, organik Se üzerinde etkisi yoktur (Çakır, 2007). Kanser gibi birçok hastalıklara ve hatta yaşlanma gibi problemlerle baş etmede yardımcı olmak üzere C ve E vitaminleri kullanılmaktadır. Se, viral enfeksiyonlara karşı canlıyı korumada etkin bir görev üstlenir ve AIDS/HIV'in gelişimini yavaşlatabilir (Steinbrenner vd., 2015). Se'nin erkeklerde sperm sayısının artışına yardımcı olabilir, alkol, sigara gibi zararlı maddelerin etkilerini ortadan kaldırabilir, hatta normal karaciğer fonksiyonlarına katkıda bulunur. Se yönünden yetersiz beslenme durumunda; kas zayıflığı, kas yorgunluğu, bünne zayıflığı, metabolik ve nörolojik hastalıklarda artış gibi tüm vücudu etkileyebilen sistemik ve metabolik bozukluklar meydana gelebilir. Bunların yanı sıra kolesterol seviyesinde bir artış, üreme bozukluğu, solunum bozuklukları, kemikler arasında bulunan eklemlerde romatizma, en önemlisi de kanser tehditleri

görülmektedir. Se seviyesinin az olması kan dolaşımı üzerinde de etkisi olduğu tespit edilmiştir (Valdiglesias vd., 2010). Se aşırı miktarlarda maruz kalındığında ise ağız kokusu ile beraber depresyon, mide bulantısı, kusma, sinirlilik ve hücre apoptozisine sürüklemektedir (Beslenmedestegi, 2010).

Se, canlılar üzerinde birçok açıdan biyolojik etki gösterebilir. Se doğal olarak en çok yiyecekler içerisinde bulunur. Se bakımından zengin yiyeceklere örnek olarak; buğday, kabuklu deniz ürünleri, mantarlar verilebilir. E vitamini ile benzer özellikler gösterdiği için antioksidan olarak da etki gösterir (Menon vd., 2001). Se, canlılardaki birçok biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde çok ciddi rol üstlenen bir elementtir. Hücrede de mitokondrideki elektron transfer sisteminin önemli bir ögesidir. Se, hücre zarından iyon geçişini ayarlamak, keratinlerin yapısının korunması, antikor üretiminin tetiklenmesi sağlar. (Hall, 2002). Antioksidan özellik gösterdiğinden dolayı kansere sebep olan kimyasalları engeller ve kanser etkisini azaltır (O'Grady vd., 2014). Selenyum tüm vücutta bulunmakla birlikte en fazla karaciğer, kas, böbrek ve plazmada bulunmaktadır (Kane vd., 2007). Se vücut için zararlı olan serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres gibi zararları engellemek suretiyle savunma sistemine katkıda bulunur. Doku esnekliğine karşı tehditleri engeller ve tiroid bezlerinin çalışması için gerekli olan bir maddedir (Thomson, 2004). Günlük Se ihtiyacı yaş ve hamilelik ile birlikte değişmekle beraber 40-100 mikrogram'dır. Bu ihtiyaç günlük 55 mikrogram olarak kabul edilmektedir (Kipp vd., 2015). Serbest radikallerin etkisini önleyen moleküller E vitamini ve GPx'dir. Bu iki molekülden biri (E vitamini) serbest radikallerinden oluşan peroksitlerin oluşumunu bloke etme suretiyle olumsuz şartları ortadan kaldırır. Diğer molekül ise (GPx) peroksitlerin hücre zarına olumsuz bir şart oluşturmadan ortadan kaldırır. GPx etkisi Se bağlı iken E vitaminin etkisi Se ile aynı özellikte olduğundan oksidatif stresin olumsuzluklarına karşı savunma mekanizmasını geliştirir. E vitamini ve GPx benzer görevleri üstlendiklerinden ötürü aralarında bir ilişki olduğu iddia edilmektedir (Lyi vd., 2007). Se ayrıca temel yağ asit metabolizmasının kendisini korumada rol oynar (Arthur vd., 2003).

2.4.2. Selenyumun Alzheimer hastalığında oksidatif stres rolü

SOR, fizyolojik süreçlerde ve normal şartlarda hücrelerde üretilmektedir. Örneğin; vücudu enfekte etmek üzere sızmış bakteri ve virüs gibi mikroorganizmaların

nötrofillerce eliminasyonunda SOR'dan yararlanılır. Hem SOR hem de RNT elektromanyetik radyasyon ve endüstriyel element kirliliği gibi çevresel faktörlere maruz kalınması sonucu beyinde üretilir (Kahya vd., 2014; Heusinkveld vd., 2016). Hava kirliliğinden kaynaklanan alüminyum veya mangan oksit gibi toksik nanopartiküller beyinde aşırı SOR üretimini ve oksidatif stresi indükleyebilir. Ayrıca AlzH, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini hızlandırabilir (Heusinkveld vd., 2016). SOR üretimi antioksidan sistemlerce kontrol altına alınmazsa, zincir reaksiyonlarını başlatıcı moleküller ile nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi geniş ölçekte biyomoleküller üzerinde önemli geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hasara sebep olmaktadır (Nazıroğlu, 2007). SOR'un indüklediği reaksiyonlar ve AlzH patofizyolojisi ile ilişkisi üzerine son yıllarda ilgi büyüktür (Weekley ve Harris, 2013). Oksidatif stresin AlzH etiolojisindeki ana faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. AlzH dünyada en yaygın demans tipidir. AlzH'nin görülme sıklığı giderek artmakta ve tedavi seçeneklerine yeni stratejilerin eklenmesine günden güne ihtiyaç duyulmaktadır. Çok sayıda çalışmada AlzH'nin başlangıcından sorumlu moleküler mekanizmalar araştırıldıysa da henüz yeteri kadar aydınlatılamamıştır. AlzH'ye sebep olan faktörleri açıklamak için birden fazla teori öne sürülmüştür: 1) A β plaklarını oluşturan APP birikimi, 2) Tau proteinlerinin aşırı fosforillenmesi, 3) Oksidatif stres, 4) Kolinerjik sinirsel iletimdeki değişimler, 5) Çevre kirliliği, 6) Amiloid prekürsör protein ve presenilin genlerinde genetik mutasyonlar, 7) İmmün sistemdeki gerileme vs. sayılmaktadır (Kosik, 1992; Bush vd., 1994; Wang vd., 2014). A β plaklarının patolojik bir şekilde ekstraselüler ortamda birikimi ve nöronlar arasında nörofibriler yumakların varlığı ölümlerinden sonra AlzH'li hastaların beyin dokularında tespit edilmiştir. A β , AlzH'ye yakalananların beyinlerinde bulunan SEP en önemli bileşenidir ve 1-42 aminoasitlik peptidlerin anlık birikiminden oluşur (Kosik, 1992; Yamin vd., 2008). Mikroglia hücrelerinin nöroinflamatuvar faktörlerin ana kaynağı olduğu ve bu faktörlerin AlzH'nin doğasını etkilediği iyi bilinmektedir (Kosik, 1992). İnflamatuvar süreçler SOR üretimi ile ilişkilendirilir. Hem SOR hem de RNT'nin AlzH'nin başlamasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Nazıroğlu, 2011; Ajith ve Padmajanair, 2015). Dahası, A β 25-35 fragmanı indüklenebilir NO-sentaz aktivasyonunu başlattığı ve AlzH'li bireylerin beyin dokularından elde edilen hipokampal fibroblastlarda protein oksidasyonuna sebep olduğu bilinmektedir (Choi vd., 2003; Tran, 2001). Buna ek olarak, SOR ve RNT'nin Alzheimer hastalarının

beyinlerinde nöroinflamasyon ve hatalı protein katlanması gibi diğer hasar süreçlerini başlattığı bildirilmiştir (Zhao vd.,2015, Vedagiri ve Thangarajan, 2016).

Se, vücudumuz için temel bir eser elementtir. En önemli Se bağımlı detoks süreçlerinden biri GPx enzim aktivitesi ile ilişkilidir. GPx enzimi aktif bölgesinde selenosistein alt birimi içerir. GPx, KAT, ve SOD enzimleri organik peroksidlerin ve H₂O₂'nin yıkılmasında sinerjetik fonksiyonlara sahiptir (Nazıroğlu, 2009). GPx, indirgenmiş iki monomerik GSH'nın H₂O₂ ile reaksiyona girmesi sonucu okside glutatyon ve suyun oluştuğu önemli bir reaksiyonu katalizler. GSH, yapısında tiyol grupları barındırır. Okside glutatyon ise glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar redükte formuna indirgenir (Schweizer vd., 2004).

Tiyoredoksinler, sitozol ve mitokondrilerde bulunan küçük peptidlerdir. Tiyol-disülfid değişim reaksiyonlarıyla hücreleri ve dokuları oksidatif strese korumada önemli bir rol üstlenmişlerdir (Bonda vd., 2010). Tiyoredoksinin indirgenmesi, tiyoredoksin redüktaz 1 (Trx-1) ile H₂O₂ ve NO gibi çoğu radikaller Trx-1 enzimi tarafından temizlenir.

Tau proteinin aşırı fosforillenmesi ve Aβ plak birikiminin nöronal hasarı tetiklemesinin yanı sıra artan sayıda çalışmada bunlarla indüklenen oksidatif strese dayalı apoptozis sonucu nöronal kayıpla da ilişkilerine değinilmiştir (Jazvinščak vd., 2015). Antioksidanlar, Aβ birikim yollarını engelleyebildiğinden, yeni tedavi arayışında potansiyel ajan olarak değerlendirilmektedir. Yukarıda da belirtildiği gibi, tiyoredoksin ve GSH, hücre redoks homeostazisinin sürdürülmesinde önemli rolü olan iki ana sistemdir. Aβ birikimi ve buna bağlı hücre ölümünde GSH sentezinin inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (Hayes vd., 2005). AlzH'de ve Alzheimer modeli oluşturulmuş hayvanlarda; azalmış Se, GSH ve GPx aktivitesi gözlenmiştir (Zhang vd., 2014). AlzH'de bilişsel fonksiyonların gerilemesinde ve plazma Se seviyeleri arasındaki ilişki de dikkati çekmektedir. Bu nedenle, AlzH'nin redoks dengelerinin sağlanmasında Se ve GSH redoks sisteminin ilişkisi önem arz eder (Loef vd., 2011). AlzH'de plazma Se içeriğinin azaldığı ve plazma Se düzeyi ile hastalığın insidansı arasında ters orantı olduğu dikkat çekicidir (González-Domínguez vd., 2014).

AlzH oluşturulan deney hayvanlarının Se ile tedavi edilmesi sonucu, beyin oksidatif stres ve Aβ oluşumunun azaldığı bildirilmiştir (Ishrat vd., 2009; Yin vd., 2015).

AlzH olan hastalarda Se düzeyi azalması ile beyin fonksiyonlarındaki azalma olduğu bildirilmiştir (Koç vd., 2015; Rita Cardoso vd., 2014). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Güney Hindistan'da AlzH olan kişilerin kanında Se, A β 42, toplam tau protein, GSH, lipid peroksidasyon ve antioksidan değerleri araştırılmıştır. Bu hastalarda incelenen değerler (Se, A β 42, toplam tau protein) arasında korelasyon olmadığı bildirilmiştir (Krishnan ve Rani, 2014). Bu bildirim zıt olarak, AlzH olan kişilerin alyuvarlarında, Se azalmasına paralel olarak GPx değerlerin de azaldığı bildirilmiştir (Ceballos-Picot vd., 1996).

2.4.3. Selenyum nanopartiküllerin Alzheimer hastalığındaki rolü

SeNP 20 ile 500 nm arasında büyüklükte olup kırmızı veya elemental Se olarak nitelendirilirler. Ancak, oluşan kırmızı elemental Se'nin büyüklüğü redoks sistemindeki protein miktarına bağlıdır. İnsan biyolojisinde önemli bir besin olarak eser element Se'nin sağlık üzerinde önemli etkileri vardır (Ze vd., 2014). Giderek artan sayıda çalışma redoksün düzenlenmesinde Se'nin önemli rolü olduğunu ve bilişsel zayıflamanın artması ile Se seviyesinin azalması arasında doğru orantıyı işaret etmektedir (Dziendzikowska vd., 2012). Redoks döngülerindeki Se (+2) ile sodyum selenat (+6) ve sodyum selenit (+5) formları beyindeki SOR üretiminin azaltılmasında önemli mekanizmalarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Schweizer vd., 2004). Geçen on yıllar içerisinde, oksidatif stresin demans ve AlzH gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili olup olmadığını araştırmak üzere geniş ölçekte çalışmalar yapılmıştır (Balaban vd., 2016; Weekley ve Harris, 2013; Yin vd., 2015). Se'nin değişik formları veya büyüklükleri ise performansını etkileyebilmektedir. Örneğin; en son yapılan iki çalışmada bildirildiği gibi, 20 ile 60 nm arasında büyüklüğü olan SeNP'nin biyolojik yararları sodyum selenit ile aynıdır (Zhang vd., 2001; Fernandes ve Gandin, 2015). Geçtiğimiz on yılda, mükemmel derecede düşük toksisite ve oksidatif stres üzerindeki azaltıcı etkilerinden dolayı Se içeren diğer nanopartiküllere insan nörobiyolojisi çalışanları oldukça fazla ilgi duyulmuştur (Zhang vd., 2001). Siyalik asitle modifiye edilmiş SeNP'nin PC12 hücrelerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada mitokondriyal membran depolarizasyonu, sitotoksisite ve apoptozis düzeyleri araştırılmış ve B6 peptid ile kaplanmış Se modifiye nanopartiküllerinin potansiyel terapötik uygulaması raporlanmıştır (Yin vd., 2015). Yeşil çaydaki ana fenol bileşiği olan epigallocatechin-3-gallate ile

stabilize SeNP'nin *in vitro* modelde A β plaklarının birikiminde ve amiloid fibril ayrışmasında koruyucu rolünün olduğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2014). Bazı ağaç türünde (*Oroxylum indicum*) ve çiçeklerinde chrysin flavonoidi (5,7-dihydroxyflavone) üretilir. Chrysin yüklenmiş katı-lipid nanopartiküllerinin A β 25-35 ile indüklenmiş oksidatif stres üzerine koruyucu etkileri rat hipokampal nöronlarında yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir (Vedagiri ve Thangarajan, 2016). Wang ve arkadaşları yapmış (2014) oldukları bir çalışmada SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında Cu⁺² ile oluşturulmuş A β oksidasyonu üzerine Se içeren kliolinol türevlerinin etkilerini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda Se içeren kliolinol türevlerinin, SHSY-5Y hücrelerinde H₂O₂'i etkisiz hale getirme aktivitesi, hücre içi SOR üretimi ve Cu⁺² ile oluşturulmuş A β agregasyonu üzerine faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir.

Gupta ve arkadaşları (2010) suda eriyebilen CdSe/ZnS quantum parçacıklarının, A β fibrilleri oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır ve parçacıkların fibrillerin oluşumunu önlemede olumlu rolünün olduğunu gözlemlemişlerdir.

Çizelge 1. Selenyum nanopartiküllerinin AlzH üzerindeki etkileri (Nazıroğlu vd., 2017).

Nanopartikül	Numune	Değer/Etki	Referans
Gümüş	Nöronal hücre hatları	AlzH'in başlaması ve ilerlemesi	Busquets vd., (2014)
Bifenil eterle konjüge CdSe / ZnS çekirdek / kabuk kuantum noktaları	<i>In vitro</i> A β modeli	A β fibrillerinin parçalanması	Gupta vd., (2010)
Krisin yüklü katı lipid nanopartikülleri	Sıçan	Koruyucu ve antioksidan etki	Vedagiri ve Thangarajan, (2016)
Epigallokateşin-3-gallat stabilize selenyum nanopartikülleri	A β peptidleri	Birikimi ve sitotoksik/koruyucu etki	Zhang vd., (2014)
Siyalik asitle modifiye selenyum	PC12 sinir hücre hattı	Kan beyin bariyerini geçme ve birikmiş A β seviyesinde azalma	Yin vd., (2015)
Selenyum içeren kliokinoldan türevleri	Nöroblastoma hücre hattı	2 değerlikli bakır ile indüklenmiş A β oksidasyonu ve birikmesi / koruyucu etkisi	Wang vd., (2014)

2.5. Apoptozis

Çok hücreli organizmalarda, hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı programlı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptozis ya da programlı hücre ölümü ile gerçekleşir (Cummings vd., 1997; Mak, 2003, Pınarbaşı, 2007). Apoptozis, dokularda hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir. Bunun yanında hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immun reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar (Elmore, 2007; Thompson, 1995; Vaux ve Flavell, 2000).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (Elmore, 2007). Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (Cohen, 1993; Squier vd., 1994).

Apoptozis sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında değişimler olur. En belirgin değişim normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır (Öniz, 2004).

Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişimlerinden biri de hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziküller apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür (Pınarbaşı, 2007). Apoptozisin en belirgin özelliği hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır. (Cohen, 1993; Pınarbaşı, 2007; Sakahira vd., 1998).

Apoptozis, genlerle düzenlenen normal gelişim aşamaları ve doku homeostazisinin sağlanmasında hücreler için kritik önemi olan programlanmış hücre ölümüdür. Hücrel apoptotik mekanizmaların en büyüğü kaspazlar (aspartik asitle yönlendirilen sistein proteazlar) olarak bilinen enzimlerin birden çok protein substratını topluca yıkımlamasıyla hücrel yapı ve fonksiyonun bozulması sonucu hücre ölümüne neden olan enzimatik reaksiyonlardır. Geleneksel olarak iki apoptotik yolak olarak, hücre yüzeyi ölüm reseptörü (ekstrinsik yol) ve mitokondriye bağımlı ölüm (intrinsik yol) tespit edilmiştir (Fadeel ve Orrenius, 2005). Ancak bunlara ek olarak ER üzerinden işleyen üçüncü bir apoptotik yoldan bahsedilmektedir. Bu yolda; esasen azalan serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun endoplazmik retikulumu uyarıcı etkisi ile gerçekleştiği hipotezi olarak karşımıza çıkmaktadır (Groenendyk ve Michalak, 2005). Memeli hücrelerinde en az 14 enzim kaspaz ailesini içerir. Özellikle bunlar arasında kaspaz 3, 8 ve 9 apoptozisde önemli rol oynarlar. Mitokondriyal yolda kaspaz 3, Fas / D95 yolda kaspaz-8 ve kaspaz 3 ise daha çok aşağı doğru uygulanan ve çok yollar tarafından aktive edilen ölümcül kaspazlardır (Stennicke ve Salvesen, 1997; Shi, 2002).

2.5.1. Mitokondri aracılı (İntrensek) yolak

Mitokondri hücredeki başka görevlerinin yanı sıra apoptozis mekanizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Sitokrom c, mitokondrinin zarları arasındaki bölgede bulunmakta ve ATP'nin meydana gelmesinde de rol üstlenmektedir. Hidrojen (H^+) ve başka iyonlar, buldukları mitokondrinin iç zarının iki tarafında elektriksel yük meydana getirecek biçimde asimetrik pozisyonda bulunmaktadır. Oksidatif stres; DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} miktarında artış, hormon ve büyüme faktörlerin eksikliği gibi sonuçlar doğurur. Hücrel oksidatif stres sonucu apoptozise sürüklenen hücrede mitokondrinin dış zarında transmembran potansiyelindeki gerilme fazla olduğundan zardaki geçirgenlik azalır, iç membranda geniş bir por ve porlar arası geçirgenlik meydana gelir. Mitokondrinin dış zarının yok olması sonucunda zarlar arasında bulunan sitokrom c zarlar arası boşluğa salınır (Grütter, 2000; Öztürk, 2002; Güçlü, 2004). Mitokondriden salınan sitokrom c sitozole boşalır ve apoptozis oluşumunu başlatması açısından önemli bir aşamayı başlatır. Nükleotid trifosfat ile aktive olan sitokrom c apoptotik proteaz aktive faktör-1 (Apaf-1) ile etkileşime girer ve Procaspaz-9'un oluşmasına sebep olur (Zou vd.,

1999). Bunun ardından Apaf-1 ile sitokrom c birleşerek çoklu protein kompleksinin meydana getirmesiyle birlikte kaspaz-9 aktif olur ve kaspaz kaskadının başlamasına sağlar (Green DR, 1998).

2.5.2. Ölüm reseptörleri aracılı (Ekstresek) yolak

Hücre dışından gelen sinyaller; solunum bozukluğu yüksek sıcaklık ve radyasyon gibi etkenler hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri aktive ederek apoptotik sürecini başlatırlar. Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TÜNFR) hücrenin apoptozise uğramasında membran reseptörler arasında en önemli gruptur. Diğerleri ise Fass (CD95,APO-1), death receptor 3, death receptor 4, death receptor 5, death receptor 6'dır (Tomatır AG, 2003; Sarıoğlu ve Ataman, 2003). Yüzey reseptörleri hücre membranında görülen, sistem açısından zengin olarak sitoplazmanın iç bölümünde ve hücre dışı alanları ile kökteş olan ölüm alanları olarak görülmektedir (Güçlü, 2004; Elmore, 2007). Hücre dışından gelen iletilerin hücre içi'ne iletmeleri için ölüm alanları, ölüm reseptörlerine bağlanarak ve apoptotik mekanizmayı uyarır (Ashkenazi ve Dixit, 1998).

Sitokine bağlı ekstrinik apoptozis yolu hücre ölümü ayarlamasındaki mekanizmaların başında gelir. TÜNFR ailesi, hücrenin üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak dış yolağı aktive eder. Membran reseptörü olan TÜNFR kendine özgü reseptörlere bağlanarak kötü huylu hücrelere ve normal hücrelerin ölümü neden olmaktadır (Elmore, 2007). Membranda bulunan reseptörler dıştan gelen sinyallerin bağlanmasıyla 3 TÜNFR yada fass molekülü kompleks oluştururlar. Bu TÜNFR ve fass kompleksi sitoplazmada sırasıyla TÜNFR'e ait ölüm alanı ve fass'a ait ölüm alanı ismi verilen proteinlere bağlanır. Proteinlerin yapısında bulunan ölüm bölgelerinin yanında proteazların oluşumunu meydana getiren bölümlere bağlanan kısımları da dahildir. Hücre ölümünü başlatan sinyalleme kompleksini oluşturan reseptörlerin sitoplazmik kısımları ile adaptör proteinleri ve proteazlar ile bağlanarak meydana getirirler (Brooks, 2006; Bao ve Shi, 2007).

Fass lenfoid, akciğer ve tümör hücrelerinde bulunur ve Fass reseptörleri üç kısımdan (hücre dışı, membran ve hücre içi) oluşur. Bu reseptör kendine özgü reseptöre bağlanarak apoptotik mekanizmayı tetiklemektedir (Güçlü, 2004).

2.5.3. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı yolak

Apoptozisin üçüncü yolağı olan ER yolağını mekanizması tam olarak çözülmemiştir. Bu yolağın, sitokrom c'den salınan kaspaz 9 ve kaspaz 12'ye ihtiyaç duymadan aktive olabileceğı bildirilmiştir (Morishima vd., 2002). ER; her ne kadar protein sentezlemede ve protein katlanma alanı olarak bilinmesine rağmen, hücre içi Ca^{+2} dengesi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren önemli görevlerde de rol almaktadır. ER'nin hasarına neden olan Ca^{+2} dengesindeki bozukluklar, serbest radikaller, hipoksi, glukoz eksikliği gibi hücrel oksidatif stresler, protein sentezinin miktarının eksilmesine ve protein katlanmalarının açılmasına sebep olur. TÜNFR bağlantılı faktör-2 (TÜNFR2) canlı hücrelerde bir ana kilit proteini olup, vazifesi prokaspaz-12'ye bağlanarak onu inaktif hale getirmektir. ER'nin strese maruz kalması sonucu faktör-2 ayrılır ve bu kopma ile kaspaz-12'nin aktif olmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir (Yoneda vd., 2001). Kaspaz-12, bu yolu ilerletmek için prokaspaz-9'a bağlanır, bağlanma sonucundan aktif hale gelen kaspaz-9 bu yolda bulunan prokaspaz-3'e bağlanarak hücrede pasif halde var olan kaspaz-3'ü aktive ederek hücreyi apoptozise sürükler (Morishima vd., 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan alet ve malzemeler

Buz yapma makinesi: ITV IQ P5C (ABD)

CO₂ inkübatör: Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)

Cryo tüp: Greiner Bio-One GmbH (Almanya)

Çalkalama cihazı: Biosan Orbital shaker PSU 10i (Türkiye)

Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Derin dondurucu (-80°C): Wisd Persnal Digital (Kore)

Distile ve ultradistile su cihazı: ELGA Purelab option DU25 (ABD)

Falkon tüpleri: ISOLAB, 15 ml ve 50 ml hacimlerde (Almanya)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Hücre sayım cihazı: Casy TT, Roche, (Almanya)

İnverted mikroskop: Zeiss, Primo Vert (Almanya)

Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı: Variomag Monoterm (Almanya)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Plate reader: Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)

Soğutmalı santrifüj: Kubota 2800 (Japonya)

Steril 96'lık plakalar: Greiner Bio-One (Almanya)

Şarjlı pipet uçları: LP Italiana 5 ml ve 10 ml hacimlerde (İtalya)

Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)

Ultrasonik parçalayıcı: Bandelin Sonuplus HD2070

Vorteks: Nüve NM 100 senikatür de (Türkiye)

T75 flasklar: Cell Star, Greiner Bio-One GmbH (Almanya)

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Amiyloid Beta Peptide (1-42), Abcam Biochemicals (İngiltere)

APOPercentage Apoptosis Kit, Biocolor (İngiltere)

Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich (ABD)

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), Sigma Aldrich, (ABD)

Dimethyl Sulphoxide (DMSO), Sigma Aldrich (ABD)

Fetal Bovine Serum (FBS), Biochrom (Almanya)

Hydrochloric Acid (HCl), Merck (Almanya)

JC-1 Dye, Life Technologies, (ABD)

Kaspaz 3 (AC-DEVD-AMC) Substratı, Bachem, (İsviçre)

Kaspaz 9 (AC-LEHD-AMC) Substrat, Bachem, (İsviçre)

L-glutamic Acid, Merck (Almanya)

Penicillin/Streptomycin, Biochrom (Almanya)

Phosphate Buffered Saline (PBS, 10X), Biochrom (Almanya)

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640), Sigma Aldrich (ABD)

Sodium Hydroxide (NaOH), Sigma Aldrich (ABD)

Sodyum Prüvat, Sigma Aldrich (ABD)

Sodyum Selenit, Sigma Aldrich (ABD)

Tripsin-EDTA (%0,25), Sigma Aldrich (ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Selenyum nanopartiküllerin hazırlanması

Selenyum nanopartiküllerin oluşturmak için gerekli kimyasallar sığır serum albümin (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, ABD), GSH, Sodyum selenit ve distile su'dur. GSH'ten 3070 mg alıp 40 ml distile su içerisinde çözüldü ve üzerine 2000 mg sığır serum albümin ilave edildi bunları güzelce homojenize bir şekilde pipetaj yaptıktan sonra 10 ml içerisinde çözmüş olduğumuz sodyum selenit ile karıştırıldı.

Daha sonra bu solüsyonun pH'sını NaOH ile 7,2 ye ayarladıktan sonra solüsyonumuz açık kırmızı rengine dönüştüğünü gördük ve dönüşüm selenyum nanopartiküllerinin varlığını göstermektedir. Daha sonra santrifüj edilerek süper natant kısmı atılır ve pelet kısmı 4,2 ml olacak şekilde ayarlanır, elde ettiğimiz pelet kısmı 4 kat seyreltilerek gereken doz kullanıldı (Zhang vd., 2001).

3.2.2. Hücrelerin çoğaltımı

Medyumların Hazırlanması

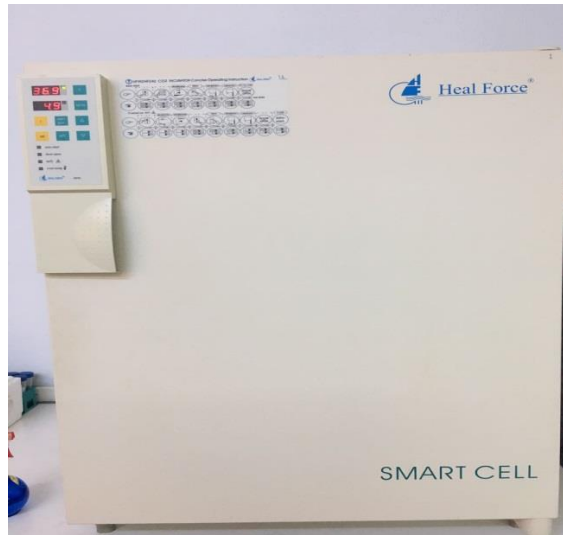
DBTRG hücrelerinin ekim ve pasajlanmasında RPMI-1640, (Biochrom, Almanya) medyumunu kullanılmıştır. DBTRG hücre hattı besi ortamı; %89 Medyum (RPMI-1640), %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Almanya), %1'i Sodyum pruvat (Sigma Aldrich, ABD), %1'i Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Almanya), antibiyotik kombinasyonu olacak şekilde değiştirildi. Hazırlanan bu karışım bundan sonraki bölümlerde sadece 'medyum' olarak anılmıştır.

Laminar Akım Kabini ve Diğer Ekipmanların Hazırlanması

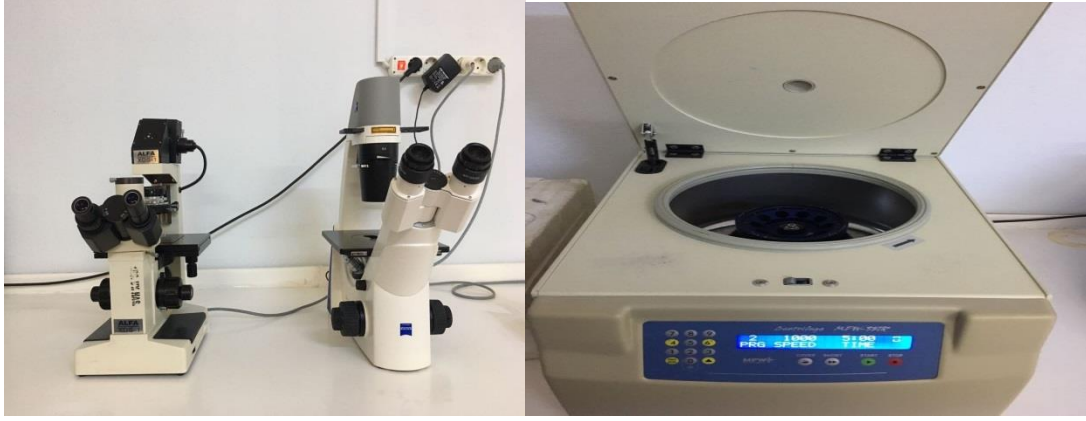
DBTRG hücrelerinin ekim, pasajlama ve transfeksiyon işlemleri steril Laminar Akım Kabini (Laminar Flow) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemlerin öncesinde laminar flow'un (MSC 12, Jouan, ABD) kültür kaplarının yüzeyleri ile temas edecek çalışma alanı, 15 dakika boyunca Ultra Viyole (UV) ışığa maruz bırakılmak suretiyle sterilize edilmiştir. Hücrelerin ekim işlemine geçmeden önce laminar flowun çalışma yüzeyi, inverted mikroskopun (Zeiss, Primo Vert, Almanya) tablası ve diğer tek kullanımlık olmayan malzemeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. DBTRG hücreleri -196 °C sıcaklıkta sıvı nitrojen tankı içerisinde bulunan 2 ml'lik cryo tüplerde (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. Hücre kültüründeki laminar flow cihazı



Şekil 4. Buzdolabı ve steril inkübatörler



Şekil 5. Hücre kültürü laboratuvarındaki inverted mikroskoplar ve santrifüj cihazı



Şekil 6. -196 °C sıvı azot tankı ve çalkalamalı su banyosu

Hücrelerin Çözdürülmesi

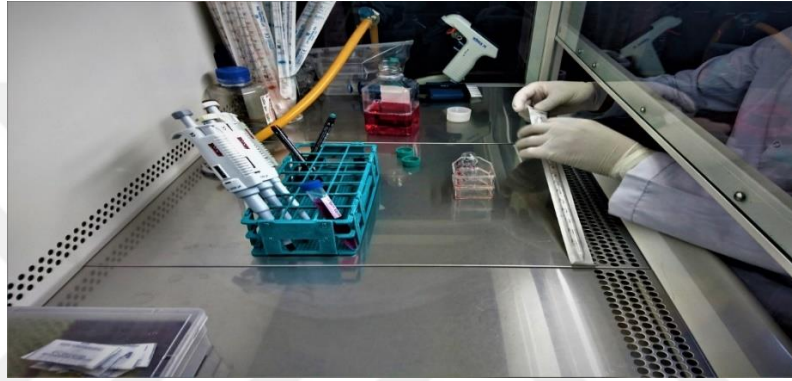
Hazırlanan medyundan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla 75 cm²'lik zemin alanına ve 250 ml'lik hacme sahip olan T75 flask (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) paketi laminar flow kabini içerisinde açılıp kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildiler. Bunun yanı sıra 15 ml'lik bir falkon tüp içerisine taze medyundan 9 ml koyuldu. DBTRG hücrelerini ihtiva eden cryo tüp sıvı nitrojen tankı içerisinden alınarak sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Termal Laboratuvar Aletleri, Türkiye) yarı sıvı yarı buz haline gelinceye kadar ısıtıldı. Cryo tüp iç çeperi eriyince ısıtma işlemi sonlandırılarak ve tüpün etrafı %70'lik etil alkol ile silinerek laminar flow kabini içerisine yerleştirildi. Henüz yarı buz-yarı sıvı haldeyken cryo tüp içerisindeki sıvının tamamı daha önceden hazırlanan içerisnde 9 ml medyum bulunan 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 800 RPM (yaklaşık 125 g) devirde 5 dakika süreyle ve 20-23 °C sıcaklıkta santrifüj (Kubota 2800, Japonya) edildi. Süpernatant hassas bir şekilde uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler üzerine 10 ml taze medyum eklendi. 20-25 kez hassas bir şekilde

resüspense edip hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Pipetaj işlemi bittikten sonra bu falkon tüp içerisindeki hücre-medyum süspansiyonu daha önceden hazırladığımız boş flasklara aktarıldı. Böylece hücrelerin çözme ve ekim işlemleri tamamlandı. Bu flasklar daha sonra steril inkübatöre alınarak burada 24 - 48 saat inkübe (37 °C ve %5 CO²) edildi (HF 90, Heal Force, Smart Cell, ABD).

Hücrelerin Pasajlanması

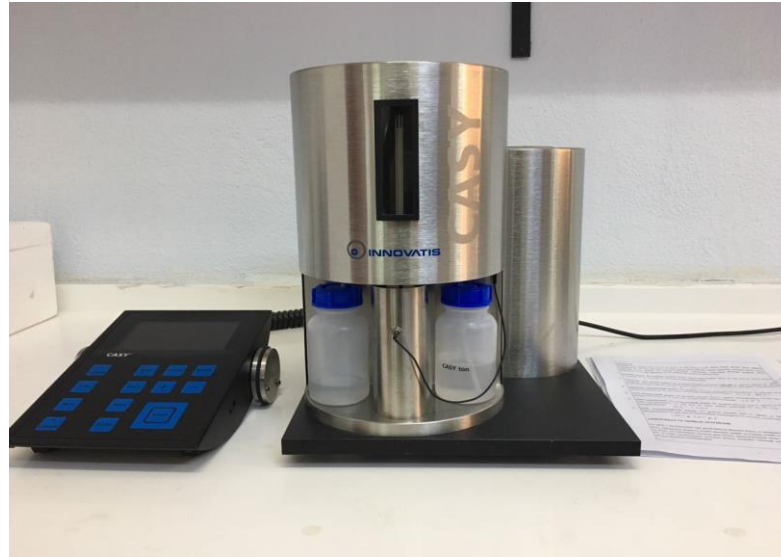
Hücrelerin, 25 cm² yüzey alanına sahip T25 flasklara (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) pasajlanması amaçlanmıştır. Laminar flow kabini içerisinde ambalajları açılan flasklar kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildi. T75 flasklarda 24 - 48 saat inkübe edilen hücrelerin üreme yoğunlukları (konfluent) inverted mikroskop yardımıyla tespit edilerek en az %80 konfluent olan flasklar çalışmaya dâhil edildi. Ayrıca mikroskopta kontaminasyon olup olmadığı da değerlendirildikten sonra çalışmaya uygun flasklar laminar flowa alındı. DBTRG hücreleri buldukları kültür kaplarının zeminine tutunma özelliği göstermektedir. Deneysel çalışmaların yapılabilmesi için flask zemininden kaldırılmaları gerekmektedir. Hücrelerin büyütme medyumunu atık toplama şişesine boşaltıldı. Her flaskın üzerine yaklaşık 2,5 ml 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom, Almanya) koyularak yavaş hareketlerle hücreler nazikçe yıkandı. Flask içerisindeki PBS pipet yardımıyla hücrelerin bulunduğu flasktan uzaklaştırıldı. Böylelikle ölü hücre artıkları ve ekstraselüler ortamda bulunan toksik metabolitler ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. Hücrelerin üzerine %0,25'lik Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD) çözeltisinden flask zeminini kaplayacak miktarda (yaklaşık olarak 1-2 ml) koyuldu. Hücrelerin inverted mikroskop ile tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyden ayrıldıkları tespit edilince flasklar laminar flow kabinine alındı ve üzerlerine 8-9 ml taze medyum eklendi. Çok hassas bir şekilde 10-15 kez pipetaj işlemi uygulandı. Pipetaj işlemi bitince hücreler steril boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 5 dakika boyunca 1200 RPM de santrifüj edildi. Süpernatant atık toplama şişesine döküldü. Böylece hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA'dan arındırıldı. Falkon tüpün dip kısmında biriken DBTRG hücre topluluğu üzerine yaklaşık 5 ml medyum eklendi ve tek kullanımlık steril bir pipetle hassas bir şekilde pipetaj işlemi yapıldı. Daha önceden hazırladığımız ve içerisine 4'er ml medyum aktardığımız T25 flasklara falkon

tüpünde bulunan DBTRG hücre topluluğu-medyum karışımından 1'er ml alınarak eklendi. Flaskların kapağı kapatıldıktan sonra bulunduğu zemin üzerinde öne-arkaya ve sağa-sola doğru çok yavaş hareket ettirilerek hücrelerin flask içerisindeki medyumda homojen bir biçimde yayılması sağlandı. Böylece pasajlama işlemi tamamlanan hücreler beşe bölündükten sonra inverted mikroskopta son kez kontrol edilerek tekrar inkübatöre alındı ve 24 - 48 saat boyunca inkübe (37 °C ve %5 CO²) edildi. Süre sonunda hücrelerin %80'den fazla konfluente ulaşması durumunda; 'Hücrelerin Pasajlanması' başlığı altındaki adımlar takip edilerek yeniden pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi yaklaşık her 24 - 48 saate bir tekrarlandı.



Şekil 7. Hücre kültüründeki laminar flow cihazında hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin Sayılması



Şekil 8. Casy TT hücre sayım cihazı

3.2.3. Grupların oluşturulması

DBTRG hücreleri 8-10 flaska (250 ml ve 75 cm²) ve her flaskta 1x10⁶ hücre olacak şekilde hücre kültürü inkubatoründe (37 °C, 5% CO₂ ve 95% hava) ekildi. Hücre sayımları otomatik hücre sayıcı cihazında (Casy Modell TT, Roche, Germany) yapıldı. Hücrelerin ekileceği medyum olarak RPMI-1640 (%10 sıgır albümini ve %1 antibiyotik içeren) kullanıldı.

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki hücreler hiçbir tedavi almayacaklar fakat 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında (37 °C, 5% CO₂ ve 95% hava) bekletildi.

2. Se grubu: Bu gruptaki hücreler selenyum (200 nM ve sodyum selenit) ile inkübe edildikten sonra 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında (37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava) bekletildi (Çiğ ve Nazıroğlu, 2015).

3. Aβ Grubu: Bu gruptaki hücelere 24 saat süre ile 20 µM Aβ1-42 inkübasyonu yapıldı (Abe ve Misawa, 2003).

4. SeNP grubu: Bu gruptaki hücelere selenyumca zengin nanopartiküller ile (50 nM) ile inkübe edildikten sonra 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında (37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava) bekletildi (Zhang vd., 2001).

5. Se ve Aβ Grubu: Bu gruptaki hücelere 24 saat süre ile 20 µM Aβ1-42 (Abe ve Misawa, 2003) ve selenyum (200 nM ve sodyum selenit) ile inkübe edildikten sonra 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında (37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava) bekletildi (Çiğ ve Nazıroğlu, 2015)

6. SeNP ve Aβ Grubu: Bu gruptaki hücelere 24 saat süre ile 20 µM Aβ1-42 (Abe ve Misawa, 2003) ve selenyumca zengin nanopartiküller (50 nM) ile hücre kültürü ortamında (37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava) bekletildi (Zhang vd., 2001).

24 saat sonunda tüm hücelere alınıp, medyum santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra yıkanarak aşağıdaki analizler gerçekleştirildi.

3.2.4. Laboratuvar analizleri



Şekil 9. Analizlerin yapıldığı plate reader (kuyucuk okuyucu) cihazı

3.2.4.1. Hücre canlılığı (MTT) analizi

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 μ l'lik hacim alınarak her bir eppendorfta 50'şer μ l olacak şekilde 3'e bölündü ve üzerlerine 950 μ l 1X PBS koyuldu. Her bir eppendorfa 15 μ l MTT kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün eppendorflar 8-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün eppendorflar 400 g de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir eppendorfa 450'er mikrolitre Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, ABD) ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi. Sonra her bir küvete 150 μ l bu örnekten konuldu. Plate Readerda 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs490 nm –Abs650 nm: x). Elde edilen değerler kontrole kıyasla hesaplandı (Khodorov vd., 2002).

3.2.4.2. Hücre içi SOR üretimi tayini

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 µl'lik hacim alınarak SOR üretim tayini analizi için yapılması için her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü ve üzerlerine 950 µl 1X PBS koyuldu. Sonrasında 8-10 kez pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Üzerine 1µl Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Aldrich, ABD) SOR boyasından konulduktan sonra tekrar 8-10 kez pipetaj yapıldı. Bu işlemi takiben eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 4x100 g de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1X PBS koyuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölündü. Plate Reader cihazında (Infinite 200 Pro, Avusturya) 488 nm eksitasyon (uyarım) ve 530 ve 590 nm emisyon dalga boylarında okunup aradaki fark değer olarak belirlendi (Uğuz ve Nazıroğlu, 2012).

3.2.4.3. Mitokondriyal membran depolarizasyonu analizi

1 ml 1xPBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si ise mitokondriyal membran depolarizasyonu analizi için ayrıldı. 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl taze medyum koyuldu ve 15-20 kez pipetaj yapıldı. Üzerine 1µl 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) mitokondriyal membran depolarizasyon boyasından koyuldu ve tekrar 15-20 kez pipetaj yapıldı. Eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 3500 RPM devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1xPBS koyuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde bölündü. Plate reader'da 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 emisyon oranıyla sonuçlar hesaplandı. Veriler kontrol grubuna kıyasla nispi artış şeklinde grafiklendirildi (Wang ve Joseph, 1999).

3.2.4.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 analizleri

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponu ham solüsyonlarından ayrı ayrı 15 ml'lik falkon tüplerine koyuldu. Her iki tüpe de 2,5µl NP-40 kimyasalından ilave edildi. Sonrasında vortekslenip floresan kaspaz DTT boyasından 12,5µl koyulup tekrar vortekste karıştırıldı. 1 ml 1X PBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si kaspaz 9, 150 µl'si kaspaz 3 analizi için ayrıldı. Her iki analiz için de 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde koyuldu. Üzerlerine öncesinde hazırlanmış olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50'şer µl eklendi. Sonrasında açığa çıkan enzimler Plate Reader cihazında 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (Uğuz vd., 2009).

3.2.4.5. Apoptozis testi

1 ml 1xPBS ile dilüe edilmiş hücrelerden 150 µl'si ise apoptozis testi için ayrıldı. 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölündü. Daha sonra üzerine 950 µl 1X PBS koyuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 3-5µl apoptozis boyasından (APOPercentage, Biocolor, İngiltere) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına bırakıldı. Çalkalama sonrası 3500 RPM de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Üzerine 1X PBS eklenerek yıkandı ve 200µl APOpercentage Dye Release'den ilave edildi. Pipetaj ve ardından santrifüj yaptıktan sonra süpernatant alındı ve kuyucuklara aktarılıp 550 nm dalga boyunda Plate Reader cihazında okundu. Elde edilen değerler kontrole kıyasla hesaplandı (Uğuz vd., 2009)

3.3. İstatistiksel Analiz

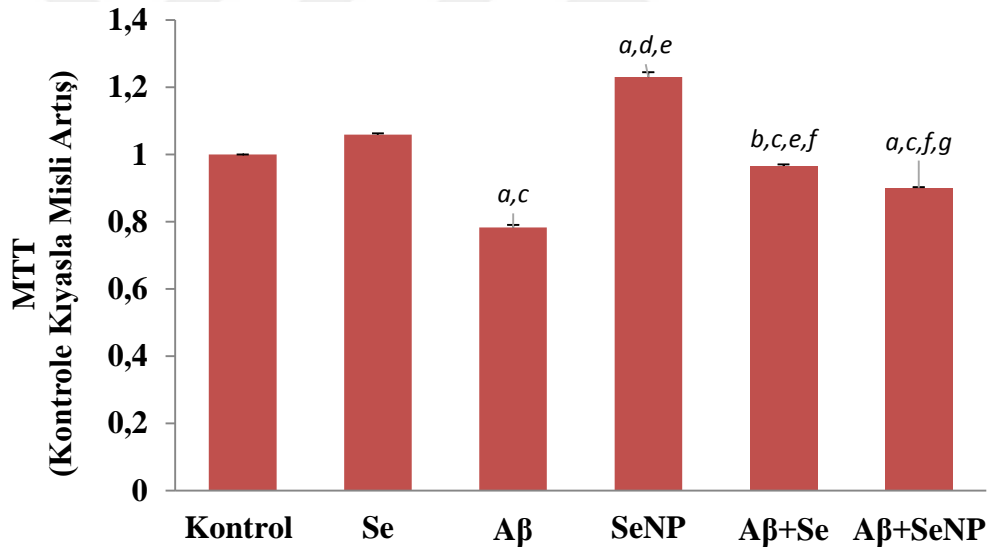
Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [ortalama \pm standart sapma (SD)] olarak verildi. DBTRG hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Araştırma Bulguları

4.1.1. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin hücre canlılığı (MTT) düzeyleri üzerine etkileri

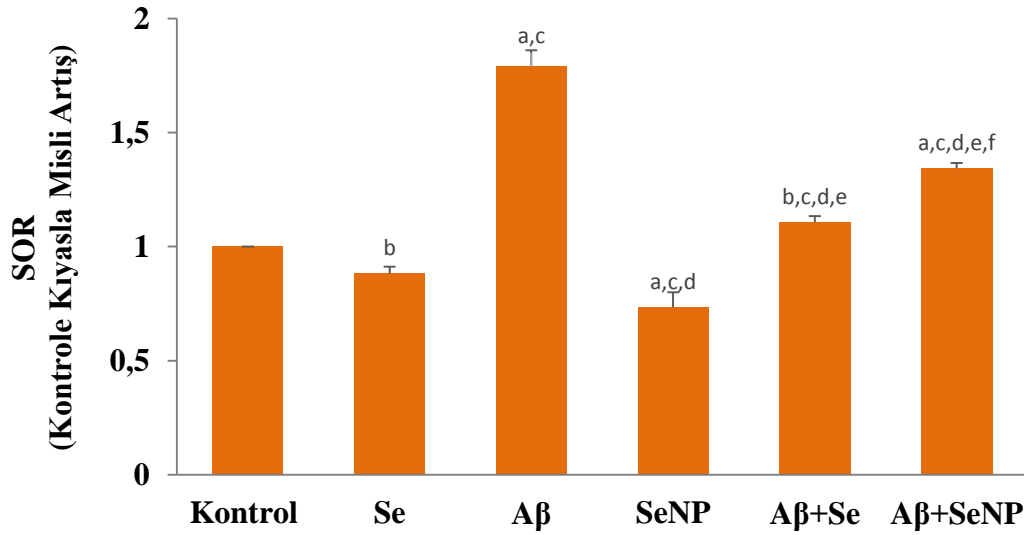
A β 1-42 ile inkübe edilen DBTRG hücrelerinde selenyum nanopartiküllerinin MTT düzeyleri üzerine etkileri şekil 10 da gösterilmiştir. Kontrol ve Se gruplarına kıyasla A β grubunda MTT düzeylerinin anlamlı seviyede ($p < 0.001$) azaldığı gözlemlendi. Buna ek olarak, A β grubunda MTT değerinin SeNP ($p < 0.001$), A β + Se ($p < 0.001$) ve A β + SeNP ($p < 0.001$) gruplarına kıyasla önemli derecede arttığı analizler sonucu tespit edildi. Se ve SeNP grupları kendi aralarında kıyaslandığında, SeNP grubunda MTT düzeyinin ($p < 0.001$) daha da artmış olduğu gözlemlendi.



Şekil 10. A β inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının MTT düzeyleri üzerine etkileri. (^a $p < 0,001$ ve ^b $p < 0,05$ kontrol grubuna kıyasla, ^c $p < 0.001$ ve ^d $p < 0,05$ Se grubuna kıyasla, ^e $p < 0.001$ A β grubuna kıyasla, ^f $p < 0.001$ SeNP grubuna kıyasla, ^g $p < 0.05$ A β + Se grubuna kıyasla). (Ortalama \pm SD; n=3)

4.1.2. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin hücre içi SOR seviyeleri üzerine etkileri

A β 1-42 ile inkübe edilen DBTRG hücrelerinde selenyum nanopartiküllerinin SOR seviyeleri üzerine etkileri şekil 11 de gösterilmiştir. Kontrol ve Se gruplarına kıyasla A β grubunda SOR seviyesi anlamlı bir şekilde ($p < 0.001$) artmış olduğu gözlemlendi. Buna ilave olarak, A β grubu SOR seviyesinin, SeNP ($p < 0.001$), A β + Se ($p < 0.001$) ve A β + SeNP ($p < 0.001$) grupları SOR seviyelerine kıyasla önemli düzeyde azaldığı istatistiksel olarak bulundu. Se ve SeNP grupları aralarında karşılaştırıldığında, SeNP grubunda SOR seviyesinin ($p < 0.001$) azaldığı gözlemlenmiştir.

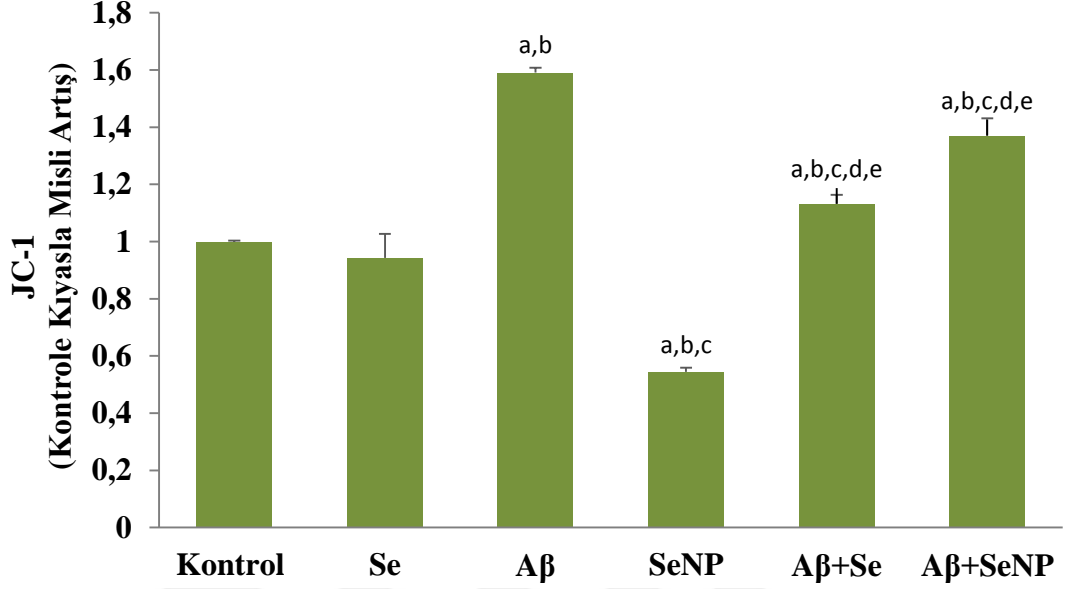


Şekil 11. A β inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının hücre içi SOR seviyeleri üzerine etkileri. (^a $p < 0,001$ ve ^b $p < 0,05$ kontrol grubuna kıyasla, ^c $p < 0.001$ Se grubuna kıyasla, ^d $p < 0.001$ A β grubuna kıyasla, ^e $p < 0.001$ SeNP grubuna kıyasla, ^f $p < 0.001$ A β + Se grubuna kıyasla). (Ortalama \pm SD; n=3)

4.1.3. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin mitokondriyal zar depolarizasyon düzeyleri üzerine etkileri

A β 1-42 ile inkübe edilen DBTRG hücrelerinde selenyum nanopartiküllerinin mitokondriyal zar depolarizasyonu düzeyleri üzerine etkileri şekil 12 de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile Se grubu kıyaslandığında aralarında istatistiki olarak anlam ifade eden bir değişiklik olmadığı bulundu. Kontrol ve Se gruplarına kıyasla A β grubunda mitokondriyal zar depolarizasyonu düzeyleri önemli seviyede ($p < 0.001$) arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte, A β grubu mitokondriyal zar

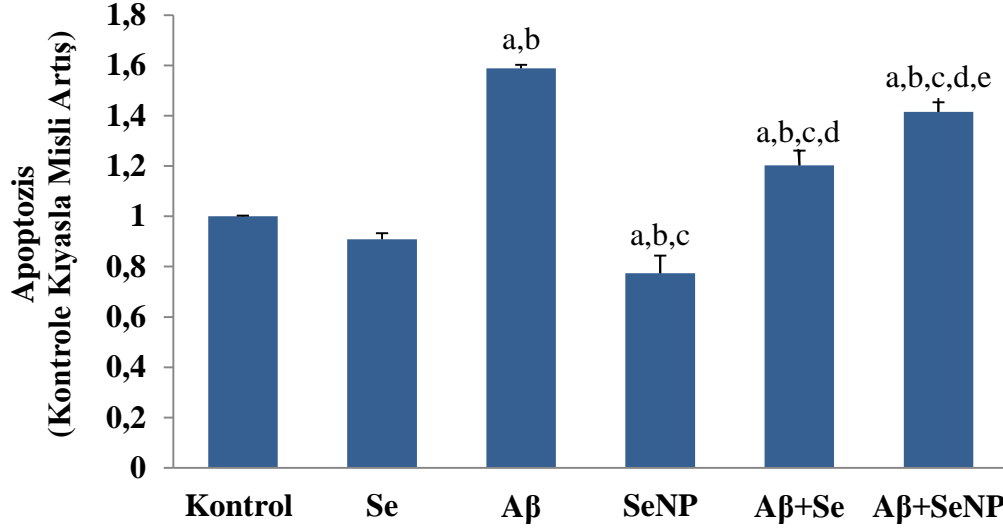
depolarizasyonu düzeylerinin SeNP ($p<0.001$), A β + Se ($p<0.001$) ve A β + SeNP ($p<0.001$) gruplarına kıyasla önemli seviyede azaldığı istatistiksel olarak bulundu. Se ve SeNP grupları kendi aralarında kıyaslandığında, SeNP grubunda mitokondriyal zar depolarizasyonu düzeyinin ($p<0.001$) daha az olduğu gözlemlendi.



Şekil 12. A β inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) seviyeleri üzerine etkileri. (^a $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla, ^b $p<0.001$ Se grubuna kıyasla, ^c $p<0.001$ A β grubuna kıyasla, ^d $p<0.001$ SeNP grubuna kıyasla, ^e $p<0.001$ A β + Se grubuna kıyasla). (Ortalama \pm SD; n=3)

4.1.4. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin apoptozis düzeyleri üzerine etkileri

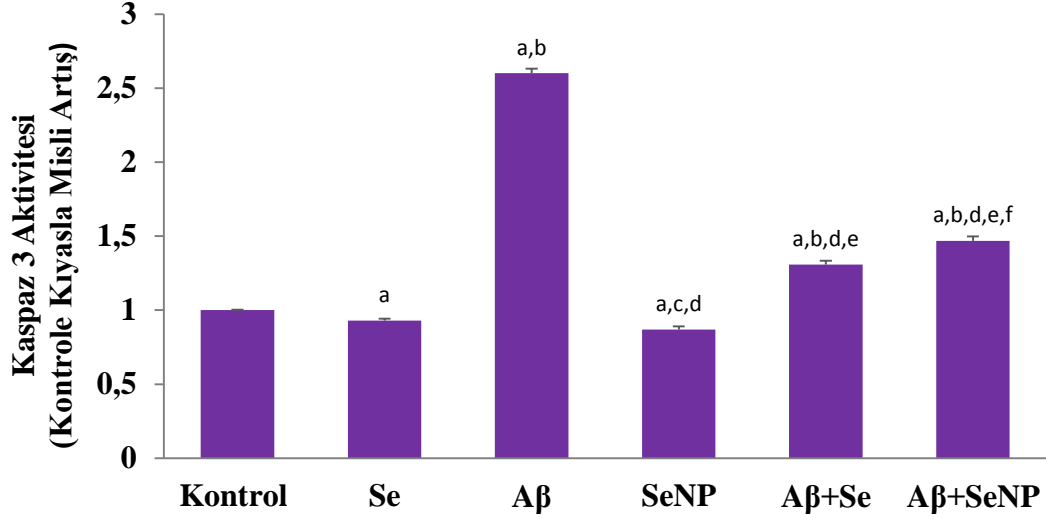
A β 1-42 ile inkübe edilen DBTRG hücrelerinde selenyum nanopartiküllerinin apoptozis düzeyleri üzerine etkileri şekil 13 de gösterilmiştir. Kontrol ve Se gruplarına kıyasla A β grubunda apoptozis düzeyinin önemli ölçüde ($p<0.001$) artmış olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, A β grubun apoptozis düzeyinin SeNP ($p<0.001$), A β + Se ($p<0.001$) ve A β + SeNP ($p<0.001$) gruplarına kıyasla önemli seviyede azaldığı istatistiksel olarak tespit edildi. Se ve SeNP grupları aralarında kıyaslandığında, SeNP grubunda apoptozis düzeyinin daha da azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$).



Şekil 13. A β inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının apoptozis seviyeleri üzerine etkileri. (^ap<0,001 kontrol grubuna kıyasla, ^bp< 0.001 Se grubuna kıyasla, ^cp<0.001 A β grubuna kıyasla, ^dp<0.001 SeNP grubuna kıyasla, ^ep<0.001 A β + Se grubuna kıyasla). (Ortalama \pm SD; n=3)

4.1.5. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin kaspaz 3 aktivite değerleri üzerine etkileri

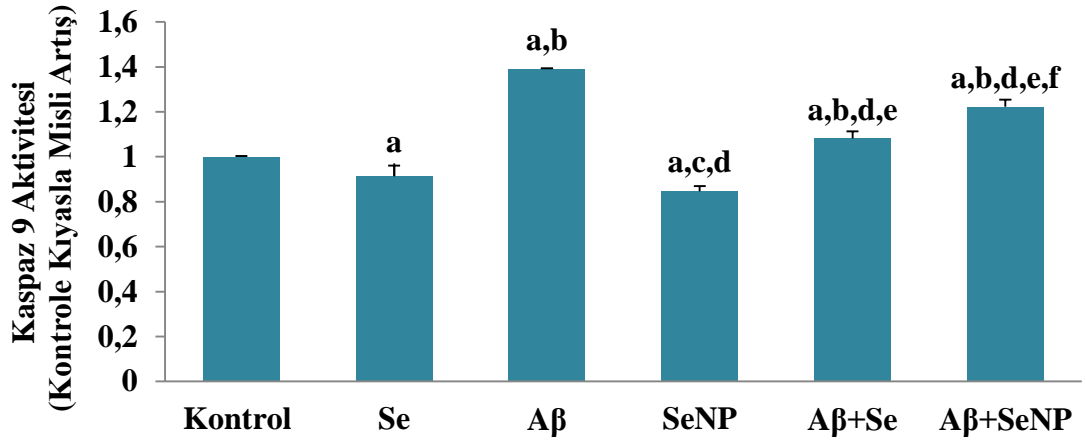
A β 1-42 ile inkübe edilen DBTRG hücrelerinde selenyum nanopartiküllerinin kaspaz 3 aktivite değerleri üzerine etkileri şekil 14 de gösterilmiştir. Kontrol ve Se gruplarına kıyasla A β grubunda kaspaz 3 aktivitesinin önemli bir şekilde ($p<0.001$) arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, A β grubun kaspaz 3 aktivitesinin SeNP ($p<0.001$), A β + Se ($p<0.001$) ve A β + SeNP ($p<0.001$) gruplarına kıyasla önemli seviyede azaldığı istatistiksel olarak hesaplandı. Se ve SeNP grubu aralarında kıyaslandığında istatistiki anlam ifade eden bir değişiklik olmadığı gözlemlendi ($p<0.05$).



Şekil 14. A β inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkileri. (^ap<0,001 kontrol grubuna kıyasla, ^bp<0.001 ve ^cp<0,05 Se grubuna kıyasla, ^dp<0.001, A β grubuna kıyasla, ^ep<0.001 SeNP grubuna kıyasla, ^fp<0.001 A β + Se grubuna kıyasla). (Ortalama \pm SD; n=3)

4.1.6. Selenyum nanopartiküllerinin A β ile inkübe edilmiş DBTRG hücrelerinin kaspaz 9 aktivite değerleri üzerine etkileri

A β 1-42 ile inkübe edilen DBTRG hücrelerinde selenyum nanopartiküllerinin kaspaz 9 aktivite değerleri üzerine etkileri şekil 15 te gösterilmiştir. Kontrol ve Se gruplarına kıyasla A β grubunda kaspaz 9 aktivitesinin önemli bir şekilde (p<0.001) artmış olduğu gözlemlendi. Bunun yanında, A β grubu kaspaz 9 aktivitesinin SeNP (p<0.001), A β + Se (p<0.001) ve A β + SeNP (p<0.001) gruplarına kıyasla önemli seviyede azaldığı istatistiksel olarak hesaplandı. Se ve SeNP grubu aralarında kıyaslandığında istatistiksel anlam ifade eden bir değişiklik olmadığı gözlemlendi (p<0.05).



Şekil 15. Aβ inkübe edilmiş hücrelerde Se ve SeNP uygulamasının kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkileri. (^ap<0,001 kontrol grubuna kıyasla, ^bp< 0.001 ve ^cp<0,05 Se grubuna kıyasla, ^dp<0.001, Aβ grubuna kıyasla, ^ep<0.001 SeNP grubuna kıyasla, ^fp<0.001 Aβ + Se grubuna kıyasla). (Ortalama ± SD; n=3)

4.2. Tartışma

Dünya genelinde ortalama ömür yaşının artına bağılı olarak AlzH görülme sıklığı da artmaktadır. 2015 verilerine göre ülkemizde 400.000'in üzerinde Alzheimer hastası bulunurken bu sayı dünya geneline bakıldığında ise 46,8 milyon civarında olduğu saptanmıştır. (Türkiye Alzheimer Derneğı 2015, Hao ve Friedman, 2016). Hastalığın oluşumunda SOR, amiloid β 1-42 ve Tau protein oluşumu önemli yer tutmaktadır. SOR üreminin önlenmesinde antioksidanlar rol oynamaktadır. Eser element olan Se birçok fizyolojik olayda önemli rol oynamaktadır. Selenyum antioksidan olarak görev almakta ve hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Enzimatik antioksidanlar arasında GPx önemli bir yer tutmaktadır. O_2 radikali SOD tarafından, H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 , KAT ve GPx enzimleri ile suya kadar parçalanır. GPx enziminin yapısına Se elementi kofaktör olarak katılmaktadır. Nanopartiküllerin AlzH ve diğer demans tipleri gibi nörolojik hastalıklardaki rolüne odaklanan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Beyin, element ile zenginleştirilmiş nanopartiküllerin oksidatif toksik etkilerine karşı en hassas organ olmasına rağmen emilen bu nanopartiküller farklı organlarda depolanır (Feng vd., 2015). Nöronlar yüksek oranda oksijen tüketimi, yüksek miktarda PUFA varlığı ve enzimatik antioksidan aktivitesinin düşük seviyeleri nedenleriyle oksidatif hasara karşı özellikle hassastır (Halliwell, 2006; 2009). Doğal antioksidan bileşenlerle yeni tedaviler çeşitli nörodejenaratif hastalıkları tedavi için araştırılmaktadır (Nazıroğlu, 2011; 2015). Ancak yine de doğal antioksidanların başarıları düşüktür. Bu nedenle, nörolojik hastalıkların tespit ve tedavisinde ilerleme kaydedebilmek için yeni tedavi edici nanopartiküllerin keşfedilmesine acil ihtiyaç vardır. AlzH ve benzeri nörolojik hastalıklarda apoptozis oluşmasında oksidatif stresin önemli bir rolü vardır. Yaptığımız literatür taramalarına göre, günümüze kadar SePN'nin deneysel hücre kültürü AlzH modelinde faydasını belirlemek için yapılmış bir *in vitro* çalışma henüz yoktur. SePN'nin, görülme sıklığı artmakta olan AlzH'nın tedavisinde fayda sağlayabileceğı düşüncesinden yola çıkarak DBTRG hücrelerinde SePN'nin oksidatif stres ve apoptozis değerleri üzerine etkileri hücre kültürü ortamında araştırıldı. Bu çalışmada, A β inkübasyonu sonucu, mitokondriyal zar depolarizasyon, hücre içi SOR üretimi, apoptozis, kaspaz 3 ve 9 değerleri artarken hücre canlılığı değerlerinin azaldığı gözlemlendi. Se ve SeNP inkübasyonu sonucu, mitokondriyal zar

depolarizasyon, hücre içi SOR üretimi, apoptozis, kaspaz 3 ve 9 aktivite değerleri azalırken hücre canlılığı değerlerinin arttığı gözlemlendi.

Bu çalışmada A β inkübasyonu ile hücre içi SOR üretimi ile mitokondriyal membran depolarizasyon değerlerinin arttığı ve bununla birlikte, Se ve SeNP uygulaması ile her iki değerlerin belirgin bir düzeyde azaldığı gözlemlendi. Çalışma sonuçlarına benzer şekilde, siyalik asitle modifiye edilmiş SeNP'ların PC12 hücrelerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada mitokondriyal membran depolarizasyonu, sitotoksikite ve apoptozis düzeyleri araştırılmış ve B6 peptid ile kaplanmış selenyum modifiye nanopartiküllerinin potansiyel terapötik uygulaması bildirilmiştir. Bu nanopartiküller A β plaklarının birikimini engellediği bildirilmiştir (Yin vd., 2015). Yine başka bir çalışmada, yeşil çaydaki ana fenol bileşiği olan epigallocatekin-3-gallate ile stabilize selenyum nanopartiküllerinin *in vitro* modelde A β plaklarının birikiminde ve amiloid fibril ayrışmasında koruyucu rolünün olduğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2014). Bazı ağaç türünde (*Oroxylum indicum*) ve ağaç türünün çiçeklerinde chrysin flavonoidi (5,7-dihydroxyflavone) üretilir. Rat hipokampal nöronlarında yapılan bir çalışmada, Krisin yüklenmiş katı-lipit nanopartiküllerinin A β 25-35 ile indüklenmiş oksidatif stres üzerine koruyucu etkileri rapor edilmiştir (Vedagiri ve Thangarajan, 2016). Wang ve arkadaşları (2014) yapmış oldukları bir çalışmada SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında bakır ile oluşturulmuş A β oksidasyonu üzerine selenyum içeren kliolinol türevlerinin etkilerini araştırmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda selenyum içeren kliolinol türevlerinin, SH-SY5Y hücrelerinde H₂O₂'i etkisiz hale getirme aktivitesi, hücre içi SOR üretimi ve bakır ile oluşturulmuş A β agregasyonu üzerine faydalı etkileri olduğu göstermişlerdir. Yine başka bir çalışmada, Gupta ve arkadaşları (2010) suda eriyebilen CdSe/ZnS quantum parçacıklarının, A β plakların oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır ve bu parçacıkların bu plakların oluşumunu önlemede olumlu rolünün olduğunu gözlemlemişlerdir.

Vücudumuzdaki iyonlar içerisinde en önemlilerinden biri olan Ca⁺² iyonudur. Genel olarak Ca⁺²'nin kemik gelişimine katılmasıyla bilinmesinin aksine mikro seviyede incelendiğinde hücrelerin yaşamsal aktivitelerini devam ettirebilmesi için bir denge denklemi şeklinde hücre içi ve hücre dışı olacak şekilde hücre zarı üzerindeki bir grup iyon kanalları vasıtasıyla karşılıklı faaliyet içerisindedirler. Ca⁺² miktarı hücre

içine kıyasla hücreler arası sıvıda 20.000 kat daha fazla bulunmaktadır. AlzH oluşturulmuş hücrede hasar meydana gelmekte ve sonucunda normalden fazla miktarda Ca^{+2} iyonu girdiği iyi bilinmektedir (Övey ve Nazıroğlu, 2015). TRPM2 ve Transient Receptor Potential Vanilloid gibi bir kısım katyon kanalları oksidatif stres ile aktive olmaktadır (Wehage vd., 2002; Nazıroğlu, 2017). Bu kanalların aşırı oksidatif stres ile aktive olmaları sonucu hücre içerisine (sitozole) aşırı Ca^{+2} iyonu girmekte ve mitokondri zarlarını depolarize etmektedir. Şayet hücre içi aşırı Ca^{+2} artışına bağlı mitokondri depolarize olursa iki moleküler yolak aktive olmaktadır. Bunlar (1) Aşırı SOR üretimi ve (2) kaspaz ve apoptotik yolların aktivasyonudur. Se ve SeNP, antioksidan özellikleri ile bu katyon kanallarını düzenleyerek hücre içerisine Ca^{+2} girişini azaltarak aşırı SOR ve apoptozis üretimini azaltmaktadırlar. Bu çalışmada hücre içi serbest Ca^{+2} ve katyon kanal aktivasyonları ölçülmedi. Fakat AlzH'de sitozolik Ca^{+2} düzeyinin arttığı ve memantin gibi bir kısım ilaçların tedavide rol oynadıkları bilinmektedir (Miguel-Hidalgo vd., 2002). Bu nedenle, hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışına bağlı hücre içi SOR düzeyi ve mitokondriyal, apoptozis, kaspaz 3 ve 9 aktivasyon düzeyleri A β grubunda artmıştır. Ancak Se ve SeNP gruplarında ise bu değerlerin anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlendi.

Yaş ve çevresel etmenlerin değişikliğiyle beraber AlzH'nin oluşumunda genetiğin, NÖFY ve SEP'nin etkisi olduğu gözlemlenmektedir (Solomon vd., 2014). Hastalığın oluşum sebeplerinden en önemli faktörlerinden birisi A β plakların meydana gelmesi ve hücreler arası boşlukta fazla olmasıdır (Solomon vd., 2014). Trasmembran proteinlerinden olan APP'nin metabolize'si sonucu A β plakları ortaya çıkar, bu plaklar bir araya gelerek SEP'yi oluşturur. Oluşan SEP'nin yapıları antitoksik ve nöronlarda inflamasyona sebep olmayan özelliğe sahiptir (Klementieva vd., 2017). Fakat oksidatif stres ve mikrogliyal aktivasyonlar gibi sebeplerle birlikte plaklar sert özellikli bir yapıya dönüştüklerinden dolayı nörotoksik etkiye sahip bir yapı kazanırlar (Klementieva vd., 2017). Nörotik plaklar bozulmuş akson ve dendrit parçaları, çözünür olmayan fibriller A β yapıları ve NÖFY ile birlikte meydana getirmektedir (Tosun, 2014). Aynı yaş ortalamasındaki bireyler arasında yapılan araştırmalarda Alzheimer'li bireylerin beynindeki nörotik plakların diğerlerine nazaran daha fazla olduğu görülmüş ve bu plakların daha çok neokorteks alanında bulunduğu gözlemlenmiştir (Tosun, 2014).

Apoptozis, hücre ölümünün genlerle düzenlendiği, organizmada normal bir gelişim ve doku homeostazisi için kritik öneme sahip olgudur. Apoptotik mekanizmanın en büyük bileşenini, kaspazlar olarak adlandırılan ve birden fazla protein substratlarını yıkma kabiliyetine sahip bir grup protein ailesi oluşturur. Kaspaz aktivitesi ile hücre yapısı ve fonksiyonu bozulur, neticede hücre ölümü gerçekleşir (Stennicke ve Salvesen, 1997). Apoptozis sürecinde kaspaz ailesi üyelerinden, kaspaz 8, 9 ve 10 indükleyici rol alırken, kaspaz 3, 6 ve 7 ise sürecin devam ettirilmesinde görev alan enzimlerdir (Earnshaw vd., 1999). Kaspaz 3, hücrenin bazı yapı proteinlerinin yıkımına ve DNA zincirinde kırıkların oluşmasına böylece hücrenin yapısal bütünlüğünün bozulmasına sebep olmaktadır (Enari vd., 1998). Apoptozisin intrinsik yolağında kaspaz 9'un birçok düzenleyici ve sitokrom c gibi dönüştürücü ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (Shi, 2002). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında da Se ve SeNP uygulanan gruplarda hücrenin canlılığının devam ettirilmesinde önemli rolü olan prokaspaz 3 ve 9 ekspresyonunun azalttığı ve buna bağlı olarak programlı hücre ölümünün belirteci olan kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. A β grubunda arttığı, Se ve SeNP bulunan gruplarda ise anlamlı düzeyde azaldığı göz önüne alınınca, DBTRG hücrelerinde apoptozisi önlemede Se ve SeNP gruplarının dâhil olduğu inkübasyonlar sonucunda etkili olduğu neticesine varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada ortalama yaş ömrünün artışına bağlı, AlzH hastalığının yayılması da gün geçtikçe artmaktadır. Bu hastalığın nedenleri kesin olarak bilinmediği için, tedavisine büyük miktarda masraflar yapılmaktadır. Hastalığı etiyolojisinde öne sürülen mekanizmalar arasında, tau proteinleri ile β plakların oluşumudur. Bunların oluşmasında da oksidatif stresin rolü iyi bilinmektedir. Se esansiyel bir eser element olup, başta yapısına girdiği GPx enzimi ve diğer unsurlar ile oksidatif stresin inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır. SeNP, Se'den daha etkin olarak kanser gibi bir kısım hastalıklarda tedavide fayda sağlarken AlzH üzerindeki rolü yeterince bilinmemektedir. Bu çalışmada, A β inkübasyonu sonucu, mitokondriyal membran depolarizasyon, hücre içi SOR üretimi, apoptozis, kaspaz 3 ve 9 aktivite değerleri artarken hücre canlılığı değerlerinin azaldığı gözlemlendi. Se ve SeNP inkübasyonu sonucu, mitokondriyal membran depolarizasyon, hücre içi SOR üretimi, apoptozis, kaspaz 3 ve 9 aktivite değerleri azalırken hücre canlılığı değerlerinin arttığı gözlemlendi. Oksidatif stres arttığında, hücre içi apoptotik ve mitokondriyal depolarizasyon değerleri artmakta ve AlzH hastalığı oluşumuna aracılık ettiği bilinmektedir. Se ve SeNP antioksidan özellikleri ile oksidatif stresi önleyerek apoptotik ve mitokondriyal oksidatif stres oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir. Sonuçlar üzerinde SeNP kıyasla Se etkisinin daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Fakat bu çalışma sonuçlarının deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışma sonuçları, bu alandaki *in vitro* çalışma boşluğunu dolduracak nitelikte olup AlzH hastalığının oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abe, K., Misawa, M., 2003. Amyloid Beta Protein Enhances the Clearance of Extracellular L-glutamate by Cultured Rat Cortical Astrocytes. *Neurosci Res.* 45, 25-31.
- Ajith, T.A., Padmajanair, G., 2015. Mitochondrial Pharmaceuticals, A New Therapeutic Strategy to Ameliorate Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Curr Aging Sci.* 8, 235-240.
- Akyol, O., Herken, H., Uz, E., Fadilliođlu, E., Unal, S., Söđüt, S., Ozyurt, H., Savaş, H.A., 2002. The Indices of Endogenous Oxidative and Antioxidative Processes in Plasma from Schizophrenic Patients. The Possible Role of Oxidant/Antioxidant Imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 26, 995-1005.
- Amerikan Psikiyatri Birliđi (1994) Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı, Dördüncü Baskı (DSM-IV) çev. ed. Körođlu, E., 1995. Hekimler Yayın Birliđi, Ankara.
- Arthur, J.R., McKenzie, R.C., Beckett, G.J., 2003. Selenium in the Immune System. *J Nutr.* 133, 1457-9.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science.* 281, 1305-8.
- Balaban, H., Nazıroğlu, M., Demirci, K., Övey, İ.S., 2016. The Protective Role of Selenium on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Oxidative Stress, and Apoptosis in Aged Rats, the Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Mol Neurobiol.* 54, 2852-2868.
- Bao, Q., Shi, Y., 2007. Apoptosome: A Platform for the Activation of Initiator Caspases. *Cell Death and Differentiation,* 14, 56–65.
- Beslenme Desteđi Selenyumun ve Faydaları, Vitaminler ve Mineraller. Erişim Tarihi: 05.05.2017. <http://www.beslenmedestegi.com/mineraller/Selenyum-faydalari>.
- Bhamre, S., Nuzzo, R.L., Whitin, J.C., Olshen, R.A., Cohen, H.J., 2000. Intracellular Reduction of Selenite into Glutathione Peroxidase. Evidence for Involvement of NADPH and not Glutathione as the Reductant. *Mol Cell Biochem.* 211, 9-17.
- Bonda, D.J., Wang, X., Perry, G., Nunomura, A., Tabaton, M., Zhu, X., Smith, M.A., 2010. Oxidativestress in Alzheimer disease: A Possibility for Prevention. *Neuropharmacology.* 59, 290-4.

- Braak, H., Del Trecidi, K., 2015. Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Alzheimer's Disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 215, 1- 162. Review.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239-59.
- Brooks, N.L., 2006. Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. Department of Medical Biosciences University of the Western Cape Bellville. (Supervisor: Prof. Dr. Gerhard van der Horst, Co-supervisor: Dr. Silke Dyer).
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Tanzi, R.E., 1994. Rapid Induction of Alzheimer A Beta Amyloid Formation by Zinc. *Science.* 265, 1464-7.
- Busquets, M.A., Sabaté, R., Estelrich, J., 2014. Potential Applications of Magnetic Particles to Detect and Treat Alzheimer's Disease. *Nanoscale Res Lett.* 9, 538.
- Ceballos-Picot, I., Merad-Boudia, M., Nicole, A., Thevenin, M., Hellier, G., Legrain, S., Berr, C., 1996. Peripheral Antioxidant Enzyme Activities and Selenium in Elderly Subjects and in Dementia of Alzheimer's Type-Place of the Extracellular Glutathione Peroxidase. *Free Radic Biol Med.* 20, 579-87.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull.* 49, 481-493.
- Cheng, W., Fu, Y.X., Porres, J.M., Ross, D.A., Lei, X.G., 1999. Selenium-Dependent Cellular Glutathione Peroxidase Protects Mice Against A Pro-Oxidant-Induced Oxidation of NADPH, NADH, Lipids, and Protein. *FASEB J.* 13, 1467-75.
- Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Conrad, C.C., Carroll, C.A., Weintraub, S.T., Gracy, R.W., 2003. Anti-Apoptotic Proteins are Oxidized by Abeta25-35 in Alzheimer's Fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 163, 135-41.
- Ciobica, A., Olteanu, Z., Padurariu, M., Hritcu, L., 2012. The Effects of Pergolide on Memory and Oxidative Stress in A Rat Model of Parkinson's Disease. *J Physiol Biochem.* 68, 59-69.
- Cohen, J.J., 1993. Programmed Cell Death and Apoptosis in Lymphocyte Development and Function. *American College of Physicians, CHEST*, 103, 99-101.
- Cummings, M.C., Winterfold, C.M., Walker, N.I., 1997. Apoptosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 21, 88-101.
- Çakır, S., 2007. Selenyum Toksisitesinin İki Arpa (*Hordeum Vulgare*) Çeşidinde (Tarm 92, Bülbül 89) Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayser.

- Çiğ, B., Nazıroğlu, M., 2015. Investigation of the Effects of Distance from Sources on Apoptosis, Oxidative Stress and Cytosolic Calcium Accumulation via TRPV1 Channels Induced by Mobile Phones and Wi-Fi in Breast Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta*. 1848, 2756-65.
- Duarte, T.L., Lunec, J., 2005. Review: When is An Antioxidant not an Antioxidant? A Review of Novel Actions and Reactions of Vitamin C. *Free Radic Res*. 39, 671-86.
- Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff, A., Oczkowski, M., Krawczyńska, A., Chwastowska, J., Sadowska-Bratek, M., Chajduk, E., Wojewódzka, M., Dušínská, M., Kruszewski, M., 2012. Time-Dependent Biodistribution and Excretion of Silver Nanoparticles in Male Wistar rats. *J Appl Toxicol*. 32, 920-8.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 68, 383-424.
- Eker, E., 2008. Alzheimer Hastalığı, Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi, 62, 85-110.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35, 495-516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., 1998. A Caspase-Activated DNase that Degrades DNA During Apoptosis, and Its Inhibitor ICAD. *Nature*. 391, 43-50.
- Eriksson, J., 2001. Concentrations of 61 Trace Elements in Sewage Sludge, Farmyard Manure, Mineral Fertilizer, Recipitation and in Oil and Crops, The Swedish Environmental Protection Agency. Report. 5159s.
- Fadeel, B., Orrenius, S., 2005. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Human Disease. *J Intern Med* 258, 479–517.
- Feng, W., Lv, S., Cui, J., Han, X., Du, J., Sun, J., Wang, K., Wang, Z., Lu, X., Guo, J., Oda, K., Amizuka, N., Xu, X., Li, M., 2015, Histochemical Examination of Adipose Derived Stem Cells Combined with β -TCP for Bone Defects Restoration under Systemic Administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 54, 133-41.
- Fernandes, A.P., Gandin, V., 2015. Selenium Compounds as Therapeutic Agents in Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1850, 1642-1660.
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2014. Homeostasis of Metals in the Progression of Alzheimer's Disease. *Biometals* 27, 539-549.
- Green, D.R., 1998. Apoptotic Pathways: the Roads to Ruin. *Cell*. 94, 695-8.

- Greenwald, R.A., 1990. Superoxide Dismutase and Catalase as Therapeutic Agents for Human Diseases. A Critical Review. *Free Radic Biol Med.* 8, 201-9.
- Groenendyk, J., Michalak, M., 2005. Endoplasmic Reticulum Quality Control and Apoptosis. *Acta Biochim Pol* 52, 381–395.
- Grütter, M.G., 2000. Caspases: Key Players in Programmed Cell Death. *Current Opinion in Structural Biology.* 10, 649-655.
- Guerreiro, R., Hardy, J., 2014. Genetics of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics.* 11, 732-7.
- Gupta, S., Babu, P., Surolia, A., 2010. Biphenyl Ethers Conjugated CdSe/ZnS core/Shell Quantum Dots and Interpretation of the Mechanism of Amyloid Fibril Disruption. *Biomaterials* 31, 6809-6822.
- Güçlü, E., 2004. Apoptozis. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Semineri, Konya, (Danışman: Prof. Dr. Selçuk Duman).
- Gürvit, İ.H., 2004. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer Dışı Demanslar Nöroloji (Editör A. Emre Öge). Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 377-204.
- Hall, A.G., 1999. Review: The Role of Glutathione in the Regulation of Apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 29, 238-45.
- Hall, J.L., 2002. Cellular Mechanisms For Heavy Metal Detoxification And Tolerance, *Journal of Experimental Botany,* 53, 1-11.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals, Other Reactive Species and Disease. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, New York, 639–645.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative Stress and Neurodegeneration, Where are We Now? *J Neurochem.* 97, 1634-1658.
- Halliwell, B., 2009. The Wanderings of A Free Radical. *Free Radic Biol Med.* 46, 531-42.
- Hamza, R.Z., Al-Harbi, M.S., El-Shenawy, N.S., 2017. Ameliorative Effect of Vitamin E and Selenium Against Oxidative Stress Induced by Sodium Azide in Liver, Kidney, Testis and Heart of Male Mice. *Biomed Pharmacother.* 91, 602-610.
- Hao, W., Friedman, A., 2016. Mathematical Model on Alzheimer's Disease. *BMC Syst Biol.* 18, 10-108.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.

- Heneka, M.T., Golenbock, D.T., Latz, E., 2015. Innate Immunity in Alzheimer's Disease. *Nat Immunol.* 16, 229–236.
- Heusinkveld, H.J., Wahle, T., Campbell, A., Westerink, R.H., Tran, L., Johnston, H., Stone, V., Cassee, F.R., Schins, R.P., 2016. Neurodegenerative and Neurological Disorders by Small Inhaled Particles. *Neurotoxicology* 56, 94-106.
- Hölscher, C., 1998. Possible Causes of Alzheimer's Disease: Amyloid Fragments, Free Radicals, and Calcium Homeostasis. *Neurobiol Dis.* 5, 129-141.
- Ishrat, T., Parveen, K., Khan, M.M., Khuwaja, G., Khan, M.B., Yousuf, S., Ahmad, A., Shrivastav, P., Islam, F., 2009. Selenium Prevents Cognitive Decline and Oxidative Damage in Rat Model of Streptozotocin-Induced Experimental Dementia of Alzheimer's Type. *Brain Res.* 1281, 117-27.
- Jazvinščak Jembrek, M., Hof, P.R., Šimić, G., 2015. Ceramides in Alzheimer's Disease, Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and A β Accumulation. *Oxid Med Cell Longev.* 346783.
- Jobst, K.A., Barnetson, L.P., Shepstone, B.J., 1998. Accurate Prediction of Histologically Confirmed Alzheimer's Disease and the Differential Diagnosis of Dementia: the Use of NINCDS-ADRDA and DSM-III-R criteria, SPECT, X-Ray CT, and Apo E4 in Medial Temporal Lobe Dementias. Oxford Project to Investigate Memory and Aging. *Int Psychogeriatr.* 10, 271-302.
- Kahya, M.C., Nazıroğlu, M., Çiğ, B., 2014. Selenium Reduces Mobile Phone (900 MHz)-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Biol Trace Elem Res.* 160, 285-293.
- Kahya, M.C., Nazıroğlu, M., Övey, İ.S., 2017. Modulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca(2+) Entry Through TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion and Hippocampus of Diabetic Rats by Melatonin and Selenium. *Mol Neurobiol.* 54, 2345-2360.
- Kane, J., Canas, F., Kramer, M., Ford, L., Gassmann-Mayer, C., Lim, P., Eerdeken, M., 2007. Treatment of Schizophrenia with Paliperidone Extended-Release Tablets: A 6-Week Placebo-Controlled Trial. *Schizophr Res.* 90, 147-61.
- Kaneko, J.J., 1989. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Pres, Inc, San Diego, 772-776.
- Khodorov, B.I., Storozhevykh, T.P., Surin, A.M., Yuryavichyus, A.I., Sorokina, E.G., Borodin, A.V., Vinskaya, N.P., Khaspekov, L.G., Pinelis, V.G., 2002. The Leading Role of Mitochondrial Depolarization in the Mechanism of Glutamate-Induced Disruptions in Ca $^{2+}$ Homeostasis. *Neurosci Behav Physiol.* 32, 541-547.

- Kipp, A.P., Strohm, D., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, L., Bechthold, A., Leschik-Bonnet, E., Hesecker, H., 2015. German Nutrition Society (DGE). Revised Reference Values for Selenium Intake. *J Trace Elem Med Biol.* 32, 195-9.
- Klementieva, O., Willén, K., Martinsson, I., Israelsson, B., Engdahl, A., Cladera, J., Uvdal, P., Gouras, G.K., 2017. Pre-Plaque Conformational Changes in Alzheimer's Disease-Linked A β and APP. *Nat Commun.* 8, 14726.
- Knight, J.A., 2000. Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System. *Ann Clin Lab Sci.* 30, 145-58.
- Koç, E.R., İlhan, A., Aytürk, Z., Acar, B., Gürler, M., Altuntaş, A., Karapirli, M., Bodur, A.S., 2015. A Comparison of Hair and Serum Trace Elements in Patients with Alzheimer Disease and Healthy Participants. *Turk J Med Sci.* 45, 1034-9
- Kosik, K.S., 1992. Alzheimer's Disease, A Cell Biological Perspective. *Science* 256, 780-783.
- Krishnan, S., Rani, P., 2014. Evaluation of Selenium, Redox Status and Their Association with Plasma Amyloid/Tau in Alzheimer's Disease. *Biol Trace Elem Res.* 158, 158-165.
- Lam, M.A., Pattison, D.I., Bottle, S.E., Keddie, D.J., Davies, M.J., 2008. Nitric Oxide and Nitroxides can Act as Efficient Scavengers of Protein-Derived Free Radicals. *Chem Res Toxicol.* 21, 2111-9.
- Liu, C.Y., Ohki, Y., Tomita, T., Osawa, S., Reed, B.R., Jagust, W., Berlo, V.V., Jin, L.W., Chui, H.C., Coppola, G., Ringman, J.M., 2017. Two Novel Mutations in the First Transmembrane Domain of Presenilin1 Cause Young-Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 58, 1035-1041.
- Loef, M., Schrauzer, G.N., Walach, H., 2011. Selenium and Alzheimer's Disease, A Systematic Review. *J Alzheimers Dis* 26, 81-104.
- Lyi, S.M., Zhou, X., Kochian, L.V., Li, L., 2007. Biochemical and Molecular Characterization of the Homocysteine S-methyltransferase from Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Phytochemistry.* 68, 1112-9.
- Mak, T., 2003. The E. Donnall Thomas Lecture-Apoptosis: "Tis death that makes Life Live". *Biol. Blood Marrow Transplant,* 9, 483-8.
- Matthews, G.M., Butler, R.N., 2005, Cellular Mucosal Defense During Helicobacter Pylori Infection: A Review of the Role of Glutathione and the Oxidative Pentose Pathway. *Helicobacter.* 10, 298-306.

- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, EM., 1984. Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 34, 939-944.
- Menon, A.R., Aktoprakligil, D., Özdemir, A., Vertü, A., 2001. Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mecanisms in Plants, TÜBİTAK Marmara Research Center, 25, 111-121.
- Miguel-Hidalgo, J.J., Alvarez, X.A., Cacabelos, R., Quack, G., 2002. Neuroprotection by Memantine Against Neurodegeneration Induced by Beta-Amyloid(1-40). *Brain Res*. 958, 210-21.
- Morishima, N.N.K., Takenouchi, H., Shibata, T., 2002. An Endoplasmic Reticulum Stress-Specific Caspase Cascade in Apoptosis. *J Biol Chem*, 277, 34287–34294.
- Mountz, J.D., Zhou, T., 2001. Apoptosis and autoimmunity (in) *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions*. WJ Kopman (Editör), Lippincott-Williams&Wilkins.
- Nazıroğlu, M., Muhamad, S., Pecze, L., 2017. Nanoparticles as Potential Clinical Therapeutic Agents in Alzheimer's Disease: Focus on Selenium Nanoparticles. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 16, 1-10.
- Nazıroğlu, M., 2009. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-Induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res* 34, 2181–2191.
- Nazıroğlu, M., 2011. TRPM2 Cation Channels, Oxidative Stress and Neurological Diseases, Where are We Now? *Neurochem Res*. 36, 355-366.
- Nazıroğlu, M., 2015. Editorial: Role of Antioxidants Treatments on Oxidative Stress and Calcium Entry in Neurological Disease: Focus on TRP Channels. *Curr Neuropharmacol*. 13, 233.
- Nazıroğlu, M., 2017. Activation of TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion by NADPH Oxidase and Protein Kinase C Molecular Pathways: a Patch Clamp Study. *J Mol Neurosci*. 61, 425-435.
- Nazıroğlu, M., Simşek, M., Kutlu, M., 2004. Moderate Exercise with A Dietary Vitamin C and E Combination Protects Against Streptozotocin-Induced Oxidative Damage to the Blood and Improves Fetal Outcomes in Pregnant Rats. *Clin Chem Lab Med*. 42, 511-7.
- Nazıroğlu, M., 2007. New Molecular Mechanisms on the Activation of TRPM2 Channels by Oxidative Stress and ADP-ribose. *Neurochem Res*. 32, 1990-2001.

- Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2011. Toxicology and Pharmacology of Selenium, Emphasis on Synthetic Organoselenium Compounds. *Arch Toxicol.* 85,1313-1359.
- Norstrom, E., 2017. Metabolic Processing of the Amyloid Precursor Protein – New Pieces of the Alzheimer's Puzzle. *Discov Med.* 23, 269-276.
- O'Grady, T.J., Kitahara, C.M., DiRienzo, A.G., Gates, M.A., 2014. The Association between Selenium and Other Micronutrients and Thyroid Cancer Incidence in the NIH-AARP Diet and Health Study. *PLoS One.* 9, 110886.
- Öniz, H., 2004. Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi,* 14.
- Övey, I.S., Nazıroğlu, M., 2015. Homocysteine and Cytosolic GSH Depletion Induce Apoptosis and Oxidative Toxicity Through Cytosolic Calcium Overload in the Hippocampus of Aged Mice: Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Neuroscience.* 284, 225-33.
- Öztürk, F., 2002. Apopitoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.*9, 143-148.
- Parveen, R., Baboota, S., Ali, J., Ahuja, A., Ahmad, S., 2015. Stability Studies of Silymarin Nanoemulsion Containing Tween 80 as A Surfactant. *J Pharm Bioallied Sci.* 7, 321-4.
- Pascale, A., Etcheberrigaray, R., 1999. Calcium Alterations in Alzheimer's Disease: Pathophysiology, Models and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Res.* 39, 81-88.
- Pınarbaşı, E., 2007. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) *Moleküler Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör),* 423-468, Nobel Yayın, Ankara.
- Pillai, R., Uyehara-Lock, J.H., Bellinger, F.P., 2014. Selenium and selenoprotein Function in Brain Disorders. *IUBMB Life.* 66, 229-39.
- Rita Cardoso, B., Silva Bandeira, V., Jacob-Filho, W., Franciscato Cozzolino, S.M., 2014. Selenium Status in Elderly, Relation to Cognitive Decline. *J Trace Elem Med Biol.* 28, 422-426.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium: Biochemical Role as A Component of Glutathione Peroxidase. *Science.* 179, 588-90.
- Russell, R.C., Roth, A.C., Kucan, J.O., Zook, E.G., 1989. Reperfusion Injury and Oxygen Free Radicals: A Review. *J Reconstr Microsurg.* 5, 79-84.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., 1998. Cleavage of CAD Inhibitor in CAD Activation and DNA Degradation during apoptosis. *Nature,* 391, 96–9.

- Sarioğlu, S., Ataman, Ş., 2003. Apoptoz. T Klin FTR, 3, 37-44.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., Van der Flier, W.M., 2016. Alzheimer's Disease. Lancet. 388, 505-17.
- Schweizer, U., Bräuer, A.U., Köhrle, J., Nitsch, R., Savaskan, N.E., 2004. Selenium and Brain Function, A Poorly Recognized Liaison. Brain Res Brain Res Rev 45, 164-178.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I., Milner, J.A., 2007. A Review of the Interaction among Dietary Antioxidants and Reactive Oxygen Species. J Nutr Biochem. 18, 567-79.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Sorkin, B.C., Costello, R.B., 2004. Free Radicals: the Pros and Cons of Antioxidants. Executive summary report. J Nutr. 134, 3143-3163.
- Selekler, K., 2010. Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı, Geriatri Dersisi Özel Sayı, 11, 9-14.
- Sen, C.K., Packer, L., 2000. Thiol Homeostasis and Supplements in Physical Exercise. Am J Clin Nutr. 72, 653-69.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T., 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 1, 006189.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Mol Cell 9, 459-470.
- Shinohara, N., Oshima, Y., Kobayashi, T., Imatanaka, N., Nakai, M., Ichinose, T., Sasaki, T., Kawaguchi, K., Zhang, G., Gamo, M., 2015. Pulmonary Clearance Kinetics and Extrapulmonary Translocation of Seven Titanium Dioxide Nano- and Submicron Materials Following Intratracheal Administration in Rats. Nanotoxicology. 9, 1050-8.
- Solomon, A., Mangialasche, F., Richard, E., Andrieu, S., Bennett, D.A., Breteler, M., Fratiglioni, L., Hooshmand, B., Khachaturian, A.S., Schneider, L.S., Skoog, I., Kivipelto, M., 2014. Advances in the Prevention of Alzheimer's Disease and Dementia. J Intern Med. 275, 229-50.
- Song, B., Zhang, Y., Liu, J., Feng, X.L., Zhou, T., Shao, L.Q., 2016. Is Neurotoxicity of Metallic Nanoparticles the Cascades of Oxidative Stress? Nanoscale Res Lett 11, 291.
- Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M., Cohen, J.J., 1994. Calpainactivation in Apoptosis. J. Cell Physiol. 159, 229-237.

- Steinbrenner, H., Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., Wunderlich, F., Sies, H., 2015. Dietary Selenium in Adjuvant Therapy of Viral and Bacterial Infections. *Adv Nutr.* 6,73-82.
- Stennicke, H.T., Salvesen, G.S., 1997. Biochemical Characteristics of Caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 272, 25123–25719.
- Steven McCarty, L., 1994. Design and Application Of Dynamic Headspace Sampling System for The Study of Bioremediation of Toxic Metalloids By Bacteria, Master of Science (Chemistry), Sam Houston State University Huntsville, Texas.
- Thierry, M., Marty, S., Boluda, S., Duyckaerts, C., 2017. Alzheimer's Senile Plaque as Shown by Microcryodissection, A New Technique for Dissociating Tissue Structures. *J Neural Transm (Vienna)*. 124, 685-694.
- Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in Thepathogenesisandtreatment of Disease. *Science*, 267, 1456–1462.
- Thomson, C.D., 2004. Assessment of Requirements for Selenium and Adequacy of Selenium Status: a Review, *Eur J Clin Nutr*, 58, 391-402.
- Tomatır, A.G., 2003. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*, 23, 499-508.
- Tosun, E., 2014. YL Tezi. Büt-2-Endoik Asit Bis-(Benzil-Fenil-Amit) Türevi Bileşiklerin Sentezi Asetilkolinesteraz ve Butilkolinesteraz Enzimlerine Karşı Aktivitelerinin Araştırılması, Erzurum Atatürk Üniv. Farmasötik Kimya A. D. YÖK Tez No: 379330.
- Tran, M.H., Yamada, K., Olariu, A., Mizuno, M., Ren, X.H., Nabeshima, T., 2001. Amyloid Beta-Peptide Induces Nitric Oxide Production in Rat Hippocampus: Association with Cholinergic Dysfunction and Amelioration by Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *FASEB J.* 15, 1407-9.
- Trump, B.F., Berezsky, I.K., Chang, S.H., Phelps, P.C., 1997. Thepathways of Celldeath: Oncosis, Apoptosis, Andnecrosis. *Toxicol. Pathol.* 25, 82–8.
- Türkiye Alzheimer Derneği'nin 2015 Yılına Ait Sunmuş Olduğu Alzheimer'lı Hasta Raporu. <http://www.alzheimerdernegi.org.tr/adan-zye-alzheimer/> (TAD-2016).
- Uguz, A.C., Nazıroglu, M., Espino, J., Bejarano, I., Gonzalez, D., Rodriguez, A.B., Pariente, J.A., 2009. Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase-3 and -9 Activities. *J Membr Biol* 232, 15-23.
- Uğuz, A.C., Nazıroğlu, M., 2012. Effects of Selenium on Calcium Signaling and Apoptosis in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons Induced by Oxidative Stress. *Neurochem Res.* 37, 1631-1638.

- Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B., 2010. *In vitro* Evaluation of Selenium Genotoxic, Cytotoxic, and Protective Effects: A Review. *Arch Toxicol.* 84, 337-51.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.
- Van Wijk, R., Van Wijk, E.P., Wiegant, F.A., Ives, J., 2008. Free Radicals and Low-Level Photon Emission in Human Pathogenesis: State of the Art. *Indian J Exp Biol.* 46, 273-309.
- Vaux, D.L., Flavell, R.A., 2000. Apoptosis, genes and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 719-724.
- Vaziri, N.D., Lin, C.Y., Farmand, F., Sindhu, R.K., 2003. Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and NADPH Oxidase in Lead-Induced Hypertension. *Kidney Int.* 63, 186-94.
- Vedagiri, A., Thangarajan, S., 2016. Mitigating Effect of Chrysin Loaded Solid Lipid Nanoparticles Against Amyloid β 25-35 Induced Oxidative Stress in rat Hippocampal Region, An Efficient Formulation Approach for Alzheimer's Disease. *Neuropeptides* 58, 111-125.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader. *Free Radic Biol Med.* 27, 612-6.
- Wang, Z., Wang, Y., Li, W., Mao, F., Sun, Y., Huang, L., Li, X., 2014. Design, Synthesis, and Evaluation of Multitarget-Directed Selenium-Containing Clioquinol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 5, 952-62.
- Weekley, C.M., Harris, H.H., 2013. Which form is that? The Importance of Selenium Speciation and Metabolism in the Prevention and Treatment of Disease. *Chem Soc Rev.* 42, 8870-8894.
- Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jüngling, E., Zitt, C., Lückhoff, A., 2002. Activation of the Cation Channel Long Transient Receptor Potential Channel 2 (LTRPC2) by Hydrogen Peroxide. A Splice Variant Reveals A Mode of Activation Independent of ADP-ribose. *J Biol Chem.* 277, 23150-6.
- Weintraub, S., Wicklund, A.H., Salmon, D.P., 2012. The Neuropsychological Profile of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, 006171.
- Yamin, G., Ono, K., Inayathullah, M., Teplow, D.B., 2008. Amyloid-Protein Assembly as A Therapeutic Target of Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 14, 3231-3246.

- Yin, T., Yang, L., Liu, Y., Zhou, X., Sun, J., Liu, J., 2015. Sialic Acid (SA)-Modified Selenium Nanoparticles Coated with A High Blood-Brain Barrier Permeability Peptide-B6 Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease. *Acta Biomater.* 25, 172-83.
- Yoneda, T.I.K., Oono, K., Yui, D., 2001. Activation of Caspase-12, An Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, Through Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2-Dependent Mechanism in Response to ER Stress. *J Biol Chem*, 276, 13935–13940.
- Zachara, B.A., Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Zbrog, Z., 2006. Red Blood Cell and Plasma Glutathione Peroxidase Activities and Selenium Concentration in Patients with Chronic Kidney Disease: A Review. *Acta Biochim Pol.* 53, 663-77.
- Zarkovic, K., Jakovcevic, A., Zarkovic, N., 2016. Contribution of the HNE-Immunohistochemistry to Modern Pathological Concepts of Major Human Diseases. *Free Radic Biol Med.* 0891-5849, 31096-6.
- Ze, Y., Hu, R., Wang, X., Sang, X., Ze, X., Li, B., Su, J., Wang, Y., Guan, N., Zhao, X., Gui, S., Zhu, L., Cheng, Z., Cheng, J., Sheng, L., Sun, Q., Wang, L., Hong, F., 2014. Neurotoxicity and Gene-Expressed Profile in Brain-Injured Mice Caused by Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 102, 470-8.
- Zhang, F., Jiang, L., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 11, 243–256.
- Zhang, J., Gao, X., Zhang, L., Bao, Y., 2001. Biological Effects of A Nano Red Elemental Selenium. *BioFactors* 15, 27-38.
- Zhang, J., Zhou, X., Yu, Q., Yang, L., Sun, D., Zhou, Y., Liu, J., 2014. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-Stabilized Selenium Nanoparticles Coated with Tet-1 Peptide to Reduce Amyloid-B Aggregation and Cytotoxicity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 6, 8475-87.
- Zhang, R., Niu, Y., Li, Y., Zhao, C., Song, B., Li, Y., Zhou, Y., 2010. Acute Toxicity Study of the Interaction between Titanium Dioxide Nanoparticles and Lead Acetate in Mice. *Environ Toxicol Pharmacol.* 30, 52-60.
- Zhao, Q.F., Yu, J.T., Tan, L., 2015. S-Nitrosylation in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 51, 268-280.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X., 1999. An APAF-1.Cytochrome C Multimeric Complex is A Functional Apoptosome that Activates Procaspase-9. *J Biol Chem.* 274, 11549-56.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ramazan Çınar
Doğum Yeri ve Yılı : Şanlıurfa, 1991
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : rcinar63@gmail.com

Taranmış

Fotoğraf

Eğitim Durumu

Lise : Hilvan Lisesi, 2009

Lisans : Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji

Katıldığı Kongre / Kurs / Sempozyum / Seminer / Eğitim / Workshop:

1. 5. Uluslararası Oksidatif Stres Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları Dünya Kongresi, 9-12 Eylül 2014, Isparta. Düzenleme kurulu üyesi.
2. 6. Uluslararası Oksidatif Stres Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları Dünya Kongresi Poster Sunumu, 24-27 Mayıs 2016, Isparta. Düzenleme kurulu üyesi.
3. Uluslararası Beyin Araştırmaları Okulu Kurs Programı- Düzenleme kurulu üyesi, 24 Ağustos - 4 Eylül 2015, Isparta. Düzenleme kurulu üyesi.

Uluslararası kongrelerde sunulan posterler ve sözlü bildiriler

Öz A, Çınar R, Çelik Ö, Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of N-acetylcysteine treatment on CoCl₂-induced apoptosis and oxidative stress levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels, 24-27 May 2016, Isparta, Turkey