



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AB (1-42) İLE MUAMELE EDİLMİŞ SIÇAN
SİNAPTOZOMLARI ÜZERİNDE KORUYUCU
AJAN OLARAK BEXAROTENE VE NİKOTİNAMİD
FONKSİYONUNUN EX VİVO OLARAK
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

CEYHAN HACIOĞLU

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜNGÖR KANBAK

2020



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AB (1-42) İLE MUAMELE EDİLMİŞ SIÇAN
SİNAPTOZOMLARI ÜZERİNDE KORUYUCU
AJAN OLARAK BEXAROTENE VE NİKOTİNAMİD
FONKSİYONUNUN EX VİVO OLARAK
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

CEYHAN HACIOĞLU

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜNGÖR KANBAK

2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ceyhan Hacıoğlu'nun Doktora Tezi olarak hazırladığı “A8 (1-42) ile Muamele Edilmiş Sıçan Sinaptozomları Üzerinde Koruyucu Ajan Olarak Bexarotene ve Nikotinamid Fonksiyonunun Ex Vivo Olarak Araştırılması” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

13 / 08 / 2020

Üye: Prof. Dr. Güngör KANBAK

Üye: Prof. Dr. Sema USLU

Üye: Doç. Dr. Cengiz ÜSTÜNER

Üye: Dr. Öğrt. Üye. İbrahim Ethem şAHİN

Üye: Dr. Öğrt. Üye. Fatih DAVRAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / ... tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Selma METİNTAş
Enstitü Müdürü

ÖZET

Nörodejenerasyonla ilişkili nöronal işlev bozukluklarını araştırmak için kullanılan sinaptozomlar, sinaptik fonksiyonların incelenmesine olanak sağlayan bir in vitro model sistemidir. Sirtuin 1 (SIRT1) ve poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1)'in yanı sıra peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama (PPAR γ), Alzheimer hastalığında (AD) rol oynayan stres yanıtı ve apoptotik yolları regüle ederek nöroprotektif etkiler göstermektedir. AD etyopatogenezinde henüz etkin bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Bu nedenle, potansiyel yeni terapötik ajanların AD'deki rollerini daha iyi anlayabilmek için nöroprotektif sinyal yolları üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda, nükleer reseptör agonisti olan bexarotene ve hücrel biyoenerjetik homeoastazından sorumlu olan nikotinamid, A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlardaki nöroprotektif etkilerinin antioksidan, oksidatif stres, apoptoz ve SIRT1/PARP1/PPAR γ sinyal yolları üzerinden araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız in vivo ve in vitro olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. İn vivo kısmında, her grupta altı hayvan olacak şekilde yirmi dört adet Wistar albino erkek sıçan 4 gruba (kontrol, DMSO, nikotinamid ve bexarotene) ayrıldı. Deney gruplarındaki hayvanlara 7 gün boyunca intraperitoneal olarak DMSO (%1), nikotinamid (100mg/kg) ve bexarotene (0.1mg/kg) uygulanı. Ardından, hayvanlar dekapite edilerek serum ve beyin dokuları alındı. Çalışmamızın in vitro kısmında ise, AD modelinin oluşturulmasında kullanılacak olan sinaptozomların beyin dokusundan elde edilme için 3 farklı izolasyon yöntemi (Whittaker, Percoll gradient ve sükröz gradient) kullanıldı. Elektron mikroskop analiz sonuçlarına göre, en efektif izolasyon yönteminin sükröz gradient prosedürü olduğu belirlendi. 10 μ M A β (1-42) konsantrasyonu ile inkübe edilen sinaptozomlardaki TAS, TOS, CASP3, Cyt c, SIRT1, PPAR γ ve PARP-1 seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Serum ve beyin örneklerindeki biyokimyasal analizler ve histopatolojik incelemeler DMSO, nikotinamid ve bexarotene uygulamalarının sıçan beyin dokusunda herhangi bir hasara neden olmadığını gösterdi. İn vitro A β (1-42)

uygulamasının sinaptozomlarda TAS, SIRT1 ve PPAR γ seviyelerini azaltırken, TOS, CASP3, Cyt c, ve PARP1 seviyelerini arttığını bulduk. Nikotinamid tedavisinin antioksidan kapasitesini destekleyerek oksidatif stresi ve apoptozu baskıladığı ve SIRT1 aktivasyonu üzerinden PPAR γ artırırken, PARP1 düşüşüne neden olmuştur. Bexarotene ise, PPAR γ aktivasyonu ile SIRT1 seviyelerinde ılımlı bir artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak, AD patogenezinde nikotinamid sinaptozomlardaki miktokondriyal fonksiyonları düzenleyerek bexarotene göre daha etkili olabileceğini bulduk.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Sinaptozomlar, Nikotinamid, Bexarotene, Antioksidan, Oksidatif stres, Apoptoz, SIRT1, PARP1, PPAR γ .

SUMMARY

Synaptosomes used to investigate neuronal dysfunctions associated with neurodegeneration are an *in vitro* model system that allows examination of synaptic functions. Sirtuin1 (SIRT1) and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) as well as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) have neuroprotective effects by regulating stress response and apoptotic pathways involved in the Alzheimer's disease (AD). There is no effective treatment for AD pathogenesis yet. Therefore, it is necessary to investigate the effects of potential new therapeutics on neuroprotective signaling pathways in order to understand their role in AD. In our study, we were aimed to investigate the neuroprotective effects of bexarotene, nuclear receptor agonist, and nicotinamide, responsible for the homeostasis of cellular bioenergetics, in synaptosomes incubated with A β (1-42) through antioxidant, oxidative stress, apoptosis and SIRT1/PARP1/PPAR γ signal pathways.

Our study consists of 2 parts, *in vivo* and *in vitro*. In the *in vivo* section, twenty four Wistar albino male rats were divided into 4 groups (control, DMSO, nicotinamide and bexarotene) with six animals in each group. DMSO (1%), nicotinamide (100mg/kg) and bexarotene (0.1mg/kg) were administered intraperitoneally to animals in the experimental groups for 7 days. Then, animals were decapitated and serum and brain tissues were removed. In the *in vitro* part of our study, 3 different isolation methods (Whittaker, Percoll gradient and sucrose gradient) were used to obtain the synaptosomes from the brain tissue that will be used to create the AD model. According to the electron microscope analysis results, the most effective isolation method was determined to be the sucrose gradient procedure. TAS, TOS, CASP3, Cyt c, SIRT1, PPAR γ and PARP-1 levels in the synaptosomes incubated with a concentration of 10 μ M A β (1-42) were measured by ELISA method.

Biochemical analysis and histopathological examinations in serum and brain samples showed that DMSO, nicotinamide and bexarotene treatments did not cause any damage to the rat brain tissue. We found that *in vitro* A β (1-42) administration decreased TAS, SIRT1 and PPAR γ levels in synaptosomes while increasing TOS, CASP3, Cyt c, and PARP1 levels. Nicotinamide

treatment suppressed oxidative stress and apoptosis by supporting antioxidant capacity and increased PPAR γ through SIRT1 activation, causing PARP1 decrease. On the other hand, bexarotene caused a moderate increase in SIRT1 levels with PPAR γ activation.

Consequently, we found that nicotinamide can be more effective than bexarotene in AD pathogenesis by regulating mycochondrial functions in synaptosomes.

Keywords: Alzheimer's disease, Synaptosomes, Nicotinamide, Bexarotene, Antioxidant, Oxidative stress, Apoptosis, SIRT1, PARP1, PPAR γ .



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Alzheimer Hastalığı ve Nörodejeneratif Mekanizmalar.....	6
2.1.1. Oksidatif stres.....	9
2.1.2. Mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz.....	11
2.1.3. Antioksidan mekanizmalar.....	13
2.2. Sirtuinler.....	15
2.3. Poli (ADP-Riboz) Polimerazlar.....	17
2.4. Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler.....	19
2.5. Sinaptozomlar: Sinaptik Fizyolojinin İncelenmesi İçin Model Sistemler.....	21
2.6. Bexarotene.....	23
2.7. Nikotinamid.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
3.1. Deney Hayvanları.....	29
3.2. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Sarf Malzemeler.....	29
3.3. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Cihazlar.....	30
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	31
3.4.1. <i>In vivo</i> deneyler.....	31
3.4.2. <i>In vitro</i> deneyler.....	33
3.4.2.1. <i>Whittaker yöntemi</i>	33
3.4.2.2. <i>Percoll gradient yöntemi</i>	34
3.4.2.3. <i>Sükroz gradient yöntemi</i>	36
3.5. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analizi.....	37
3.6. Aβ (1-42) Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve MTT Analizi ...	38

3.6.1. Çalışma prosedürü	39
3.7. Nörodejenarasyon Modelinin Oluşturulması ve Biyokimyasal Analizler	39
3.7.1. TAS ve TOS seviyelerinin belirlenmesi	39
3.7.2. CASP3, Cyt c, SIRT1 ve PPAR γ ve PARP1 için reaktiflerin hazırlanması ve çalışma prosedürü	40
3.7.3. PARP1 çalışma reaktiflerinin hazırlanması ve çalışma prosedürü	42
3.7.4. Protein analizi	42
3.8. Histolojik Analiz	44
3.8.1. Beyin dokusunda apoptotik hücrelerin belirlenmesi	45
3.9. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. Subakut Bexarotene ve Nikotinamidin Tedavisinin Kan Parametreleri Üzerindeki Etkisi	46
4.2. Sinaptozomal Fraksiyonların Morfolojik Değerlendirilmesi... ..	51
4.3. İn vitro Nörodejenerasyonda Kullanılan A β (1-42) Konsantrasyonu ve MTT Analizi	53
4.4. Nikotinamid ve Bexarotene'nin A β (1-42) İnkübe Edilmiş Sinaptozomlar Üzerindeki Etkileri	55
4.4.1. Antioksidan ve oksidatif mekanizmalara etkileri	55
4.4.2. Apoptotik mekanizmalara etkileri	58
4.4.3. SIRT1/PARP1/PPAR γ sinyal yolları üzerindeki etkileri	60
4.5. Histolojik Analiz Sonuçları	63
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	82
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1	Percoll gradient çözeltilerinin hazırlanması.....	34
Tablo 3.2	Protein miktarının ölçümü ve standartların hazırlanması.....	43
Tablo 4.1	Nikotinamid ve bexarotene'nin kan şekeri ALT, AST ve GGT seviyeleri üzerindeki etkisi.....	46
Tablo 4.2	Nikotinamid ve bexarotene'nin lipit seviyeleri üzerindeki etkisi *: Kontrole göre karşılaştırıldığında $p < 0.05$	47
Tablo 4.3	Nikotinamid ve bexarotene'nin BUN, CREA, UA ve kan elektrolit düzeyleri üzerindeki etkisi.....	47
Tablo 4.4	Sıçan beyninden farklı izolasyon yöntemleriyle elde edilen sinaptosomal fraksiyonların sinaptik vezikül, sinaptik bağlantı noktası, mitokondri ve miyelin içerikleri bakımından değerlendirilmesi.....	53
Tablo 4.5	A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlara ait MTT değerlerinin kontrol grubuna göre yüzdesel değişimleri. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$	54
Tablo 4.6	A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin TAS ve TOS seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$	57
Tablo 4.7	A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin CASP3 ve Cyt c seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p < 0.05$	59

Tablo 4.8 A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin SIRT1, PARP1 ve PPAR γ seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05.....61



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1	Transmembran proteini olan APP'nin sekretaz enzimleri tarafından proteolizis.....	7
Şekil 2.2	PARP ailesi. PARP'lar tüm hücrel süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Renkler PARP'ların sahip olduğu enzimatik aktiviteyi göstermektedir: mavi = poli ADP-ribozil) transferaz, kırmızı = mono (ADP ribozil) transferaz, yeşil = transferaz aktivitesi yok.....	18
Şekil 2.4	Sinaptozom yapısı.....	22
Şekil 2.4	Bexarotene (targretin) yapısı.....	24
Şekil 2.5	NAD sentezinde nikotinamid, niasin ve triptofan metabolizması için anahtar yolların basitleştirilmiş şematik gösterimi.....	26
Şekil 3.1	Homojenize beyin dokusunun süreksiz Percoll gradient yardımıyla fraksiyonlara ayrılması.....	35
Şekil 3.2	Sükroz gradient ile sinaptozomların saflaştırılması	37
Şekil 3.3	CASP3, Cyt c, PPAR γ ve SIRT1 standartlarının hazırlanışı. A: CASP3, Cyt c ve PPAR γ için dilüsyon serileri. B: SIRT1 için dilüsyon serileri	41
Şekil 3.4	Protein standart kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.1	Deney gruplarına ait kan şekeri, ALT, AST ve GGT seviyeleri.....	48
Şekil 4.2	Deney gruplarına ait total kolesterol, trigliserit, LDL ve HDL seviyeleri. *: Kontrolle karşılaştırıldığında $p < 0.05$	49
Şekil 4.3	Deney gruplarına BUN, CREA ve UA seviyeleri.....	50
Şekil 4.4	Deney gruplarına ait elektrolit seviyeleri.....	50

Şekil 4.5	Sinaptozom fraksiyonlarının elektron mikrografları. P 1-3: Percoll gradient görüntüleri; S 1-3: Sükroz gradient görüntüleri; W 1-3: Whittaker görüntüleri; SV: Sinaptik vezikül, SJ: Sinaptik bağlantı noktası; MT: Mitokondri; MY: Miyelim membran.....	52
Şekil 4.6	A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlara ait MTT değerlerinin kontrol grubuna göre yüzdesel değişimleri. * p<0.05; ** p<0.01	54
Şekil 4.7	A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin TAS ve TOS seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05 ##p <0.01.....	58
Şekil 4.8	A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin CASP3 ve Cyt c seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05.....	60
Şekil 4.9	A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin SIRT1, PARP1 ve PPAR γ seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0.05 **p <0.01; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p<0.05.....	62
Şekil 4.10	Kontrol grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 μ m, 100 μ m, 50.0 μ m)	63
Şekil 4.11	DMSO grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 μ m, 100 μ m, 50.0 μ m)	64
Şekil 4.12	Nikotinamid grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 μ m, 100 μ m, 50.0 μ m)	64

- Şekil 4.13** Bexarotene grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 µm, 100µm, 50.0µm)64
- Şekil 4.14** Deney gruplarına ait sıçan beyinlerinin TUNEL ışık mikroskopik görüntüleri. Kontrol grubu (A): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma. DMSO grubu (B): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma. Nikotinamid grubu (C): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma. Bexarotene grubu (D): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma (D). Ölçek: 50.0µm.....65



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABCA1	ATP bağlayıcı kaset A1
ABTS	3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat
AD	Alzheimer hastalığı
ADP	Adenozin difosfat
ALT	Alanin transaminaz
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid öncü protein
AST	Aspartat transaminaz
ATP	Adenozin trifosfat
Aβ	Amiloid-beta
BSA	Bovin serum albumin
BUN	Kan üre azotu
CASP3	Kaspaz 3
CAT	Katalaz
CREA	Kreatinin
CTCL	Kutanöz T hücreli lenfoma
Cyt c	Sitokrom c
DMSO	Dimetil sülfoksit
ER	Endoplazmik retikulum
HE	Hematoksilen-eosin
GGT	Gama glutamil transferaz
GPx	Glutatyon peroksidaz

GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S transferaz
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HD	Huntington hastalığı
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HO•	Hidroksil radikali
HO₂•	Hidroperoksil radikali
KBB	Kan-beyin bariyeri
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	Metiltiyazolidifenil-tetrazolium bromür
Na	Sodyum
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAMN	Nikotinik asit mononükleotid
NAMPT	Nikotinamid fosforibosiltransferaz
NFT	Nörofibriler düğümler
NMN	Nikotinamid mononükleotid
NMNAT	Nikotinamid mononükleotid adenililtransferaz
NNMT	Nikotinamid N-metiltransferaz
NO	Nitrik oksit
O₂	Moleküler oksijen
O₂•-	Süperoksit radikali

OH⁻	Hidroksil iyonu
ONOO⁻	Peroksinitrit
K	Potasyum
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PD	Parkinson hastalığı
PHF	Eşleşmiş helikoidal filament
PPAR	Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler
PPRE	Peroksizom proliferatör yanıt elemanı
PSD	Postsinaptik yoğunluk
RAR	Retinoik asit reseptörleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RXR	Retinoid X reseptörleri
SIRT	Sirtuin
SJ	Sinaptik bağlantı noktası
SOD	Süperoksit dismutaz
SV	Sinaptik vezikül
TAS	Total anitoksidan kapasite
TC	Total kolesterol
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TOS	Total oksidan kapasite
UA	Ürik asit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlerleyici bir nörodejeneratif bozukluk olan Alzheimer hastalığı (AD), yaşlılarda demansın önde gelen nedenlerinden biridir. AD, amiloid-beta (A β) plakların hücre dışı birikimi ve nörotoksisite ve sinaptik kayba neden olan nörofibriler düğümlerin (NFT) hücre içi birikimiyle ortaya çıkmaktadır (Masters vd., 2015). Ayrıca, A β plaklarının birikimi, nevritik yaralanma kaskatını tetikleyici bir role sahip olması nedeniyle, AD'de nöronal disfonksiyona ve hücre ölümüne yol açmaktadır. A β peptid, amiloid öncü proteininin (APP) β ve γ sekretazlar tarafından proteolitik yıkılımı ile farklı uzunluklardaki polipeptitlere ayrılır. Ancak, diğer polipeptitlerden daha hidrofobik yapıya sahip A β (1-42), A β peptitlerinin üretiminin artması veya klirensinin bozulması nedeniyle AD hastalarının beyinde biriken başlıca türüdür (Scheltens vd., 2016).

AD, dünya nüfusunun yaşlanmasıyla belirgin şekilde daha yaygın hale gelmektedir. 2050 yılına kadar her seksen beş kişiden birinin AD'ye yakalanacağı tahmin edilmektedir (Brookmeyer, Johnson, Ziegler-Graham, & Arrighi, 2007). Bu hastalıkla ilişkili kişisel ve mali yükler göz önüne alındığında, AD'nin önlenmesi ve/veya tedavisi için yeni ve etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

Beynin farklı bölgelerinde izole edilebilen subselüler membranöz yapılar veya izole edilmiş sinir terminalleri olan sinaptozomlar, beyin nörotransmisyonu ve nöroplastisitesinin yapısı ve moleküler mekanizmaları dahil olmak üzere birçok beyin fonksiyonunu incelemek için kullanılan ilgi çekici bir model sistemidir (Tai vd., 2014). Sinaptozomlar, protein sentezini, plazma membran potansiyelini ve iyon homeostazını sürdüren metabolik ve enzimatik olarak aktif düzenli membranöz yapılardır. Ayrıca, nörotransmitterlerin alınması, depolanması ve serbest bırakılması ve sinyal iletimi için gerekli kanalları ve reseptörleri içerirler (Whittaker, 1993). Sinaptozom çalışmaları, nörotransmisyon ve sinaptik protein-protein etkileşimlerine olan moleküler yaklaşımlar hakkındaki anlayışımıza yardımcı olan nörokimya araştırmalarının temel taşlarından birini oluşturmaktadır

(Ghijsen, Leenders, & da Silva, 2003). Ayrıca, sinaptozomlarda aktif kalan biyokimyasal süreçler daha fazla araştırma yapmaya ve nörodejeneratif süreçler hakkındaki yeni bulguların ortaya konmasına olanak sağlamaktadır. Bu nedenle, AD gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili sinaptik işlev bozukluklarını araştırmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olan ve ROS'un ortadan kaldırılmasından sorumlu antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Yaşlanma süreciyle yakından ilişkili olan oksidatif stres, hücrel redoks dengesinin bozulmasından kaynaklanmakta ve apoptotik yolları indüklemektedir (Smith, Harris, Sayre, & Perry, 1997). Beyin vücudun toplam bazal oksijen tüketiminin yaklaşık %20'sini oluşturur ve bu yüksek oksijen tüketimini ROS üretimini arttırabilir. Bu nedenle, beyindeki nöronal sistemler önemli ölçüde oksidan strese maruz kalmaktadır (Radi, Formichi, Battisti, & Federico, 2014). Yaşlanma süreci, ROS üretimindeki artışla ilişkili olduğundan, yaşla ilişkili bir nörodejeneratif hastalık olan AD üzerine yapılan çalışmalar, oksidan hasarın AD'de sadece erken safhalarında meydana gelen bir olay olmadığını, aynı zamanda hücre sinyal yollarını uyararak hastalığın başlatılmasında da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Su vd., 2008). A β aracılı nöronal sitotoksiste, oksidan stresi artırarak nöronal apoptoza yol açmaktadır. Apoptozu başlatan veya engelleyen sinyal yollarının bileşenleri sinaptik terminallerde yoğunlaşarak sinaptik fonksiyonları düzenlerler. Sinaptik terminallerde, A β birikimiyle indüklenen oksidan stres, kaspaz kaskadını aktive ederek nöronal kayıplarına neden olur (Li, & Sheng, 2012).

Sirtuinler, AD, Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı gibi birçok yaygın nörodejeneratif hastalıkta protektif etkiler sergileyen nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) bağımlı enzimlerdir. NAD⁺-bağımlı deasetilaz sirtuin ailesinin 7 üyesinden biri olan sirtuin 1 (SIRT1)'in, in vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda A β birikimini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, SIRT1'in antioksidan, antiapoptotik, gen ekspresyonu ve mitokondriyal biyogenez gibi nöroprotektif işlevlerin düzenlenmesinden sorumlu mekanizmalarda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Albani, Polito, & Forloni, 2010). Fakat

SIRT1, hem nöroprotektif hem de nörodejeneratif paradigmalarla ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, SIRT1'in hem aktivasyonunun hem de inhibisyonunun nörodejeneratif süreçlerde etkili olduğu ifade edilmektedir (Tang, & Ng, 2013).

ADP-riboz birimlerinin donörü olan poli (adenozin difosfat [ADP]-riboz) polimerazlar (PARP'lar), NAD⁺'in substrat olarak kullanıldığı mono- veya poli (ADP-ribozil) transferaz aktivitesine sahiptir. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1, EC 2.4.2.30), genom stabilitesinin korunması, transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve apoptotik sinyal yolları gibi çeşitli biyokimyasal süreçlerde rol alır. Çünkü PARP-1 oksidatif ve genotoksik streslerle aktive olmaktadır (Krishnakumar, & Kraus, 2010). PARP-1, mitokondriyal proteinlerin ekspresyonunun epigenetik regülasyonu ile mitokondrideki enerji metabolizmasını etkiler. Çoğunlukla mitokondride lokalize olan hücresel NAD⁺; PARP, mono-ADP-riboz transferazlar ve sirtuinler tarafından kullanılır. PARP1, DNA onarımını düzenleyerek ve genomik bütünlüğünü koruyarak, hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda, mitokondriyal hücre ölüm efektörlerinin modülasyonunu düzenleyerek apoptozu indüklemesi gibi çift işlevli sinyal molekülüdür (Aredia, & Scovassi, 2014). Bu nedenle, nörodejenaratif süreçlerdeki PARP1 aktivasyonu veya inhibisyonuna yönelik tedavi stratejileri hala belirsizliğini korumaktadır.

Nükleer reseptörlerin bir alt ailesi olan peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler (PPAR'lar), insülin duyarlılığının düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca, AD tedavisinde potansiyel terapötik hedefler olarak hizmet etmektedir. Son yıllarda, bir PPAR ailesinin bir üyesi olan PPAR gama (PPAR γ)'nın, transgenik AD hayvan modellerinde A β ve tau patolojisini azaltarak öğrenmeyi ve hafızayı geliştirdiği bulunmuştur (Masciopinto vd., 2012). Bununla birlikte, PPAR γ aktivasyonunun, AD etyopatogenezindeki moleküler sinyal yolları üzerindeki belirsizliği hala süremektedir. Bu yüzden, PPAR γ hedefli terapötik ajanların hücresel hedefleri nasıl modüle ettiğini araştıran daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Retinoidler, nükleer retinoik asit reseptörlerine (RAR) ve retinoid X reseptörlerine (RXR'ler) bağlanarak, gen ekspresyonunu, hücre farklılaşmasını ve proliferasyonu ve ölüm yollarını regüle ederler. Bexarotene, 1999'da ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından kutanöz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış bir retinoittir (Gniadecki vd., 2007). Bexarotene, yüksek kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve mevcut güvenlik profili göz önüne alındığında, AD tedavisinde kullanılabilecek iyi bir terapötik adaydır. Uygun dozlarda kullanılırsa, bexarotene'nin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de faydalı olabileceği bildirilmektedir (Cramer vd., 2012). Bexarotene, PPAR- γ ve RXR reseptörlerine bağlanarak apolipoprotein E (ApoE) ekspresyonunu ve A β klirensini arttırmasıyla, hafıza ve bilişsel aktivitedeki iyileşme ile ilişkilendirilmiştir (Tai vd., 2014). Öte yandan, bexarotene'nin nörofibriler düğüm oluşumunu geciktirdiği, ancak A β plakların temizlenmesinde doğrudan bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Huy vd., 2017). Bu nedenle, bexarotene'nin nöroprotektif mekanizmaları hakkındaki araştırmalar halen devam etmektedir.

B3 vitamininin amid formu olan nikotinamid, çeşitli hücresel fonksiyonlarda ve metabolizmada rol alan koenzim NAD ve fosforlu türev olan NADP sentezinin öncüsüdür. Nikotinamid, NAD biyosentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olan nikotinamid fosforiboziltransferazın (NAMPT) aktivasyonu yoluyla NAD⁺'a dönüştürülür. Elektron transferi için bir enerji substratı ve kofaktörü olarak NAD⁺, aerobik enerji metabolizmasının ve redoks dengesinin sürdürülmesi ile NAD⁺-bağlı sinyal yollarının regüle edilmesi gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçler için gereklidir (Belenky, Bogan, & Brenner, 2007). Ayrıca, nikotinamidin kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmesiyle, AD'de A β aracılığıyla indüklenen nörodejeneratif süreçlere karşı koruyucu etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir (Green vd., 2008). Bu nedenle nikotinamid, hücredeki NAD⁺ konsantrasyonunu koruyarak nörodejeneratif hastalıklar ile hücre ölüm mekanizmalarına karşı gösterdiği protektif etkiler bakımından gelecek vadede terapötik bir ajandır.

Tez çalışmamızda ilk olarak, sıçanlar kontrol, DMSO, nikotinamid ve bexarotene olmak üzere dört gruba ayrıldı. Bexarotene DMSO içerisinde

çözündüğünden, DMSO grubu deneysel protokole eklendi. Deney prosedürün in vivo kısmında, sıçanlara bir hafta boyunca intraperitoneal olarak DMSO, bexarotene ve nikotinamid uygulanması yapıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara ise serum fizyolojik verildi. Bu sürenin sonunda, sıçanlar dekapite edilerek serum ve beyin dokuları alındı. Çalışmamızın in vitro kısmında, A β (1-42) aracılı ex vivo AD modelini oluşturmak için kullanılacak sıçan beyin sinaptozomlarının elde etmeyi amaçladık. Bu amaçla, beyin sinaptozomlarının elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan 3 yöntemin (Whittaker ve ark. (1964), sükröz gradient ve Percoll gradient yöntemleri) metodolojik karşılaştırılmasını yapmayı planladık. Böylece, 3 farklı yöntem ile elde edilen sinaptozomların transmisyon elektron mikroskobu (TEM) yardımıyla presinaptik ve postsinaptik membran yapılarının morfolojik olarak incelenmesiyle, kullanılan izolasyon yöntemlerinden hangisinin daha etkili veya verimli olduğuna karar vermeyi amaçladık. İzolasyon yönteminin belirlenmesinden sonra, A β (1-42) maruziyetine karşı deney gruplarındaki sıçanların beyin dokusundan izole edilen sinaptozomlarda, nikotinamid ve bexarotene'nin nöroprotektif etkilerinin araştırılmasını hedefledik. Bu amaçla, A β (1-42) inkübasyonu öncesi ve sonrasında sinaptozomlardaki total oksidan kapasite (TOS), total antioksidan kapasite (TAS), kaspaz 3 (CASP3), sitokrom C (Cyt c), SIRT1, PARP1 ve PPAR γ seviyeleri ölçmeyi planladık. Ayrıca, bexarotene ve nikotinamid uygulamasının sıçan beyin dokusunda histopatolojik bulgulara neden olup olmadığını belirlemek için histolojik ve immunohistokimyasal analizler de gerçekleştirdik.

Sonuç olarak tez çalışmamızda, bexarotene ve nikotinamid gibi AD tedavisinde kullanılabilecek potansiyel terapötiklerin oksidatif ve apoptotik mekanizmalar yanı sıra SIRT1/PARP1/PPAR γ sinyal yolları üzerindeki etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece, nikotinamid ve bexarotene'nin bu biyokimyasal yollar üzerindeki literatürde yer alan çelişkili sonuçlara yeni bulgular sunarak bu alandaki bilimsel birikime önemli bir katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

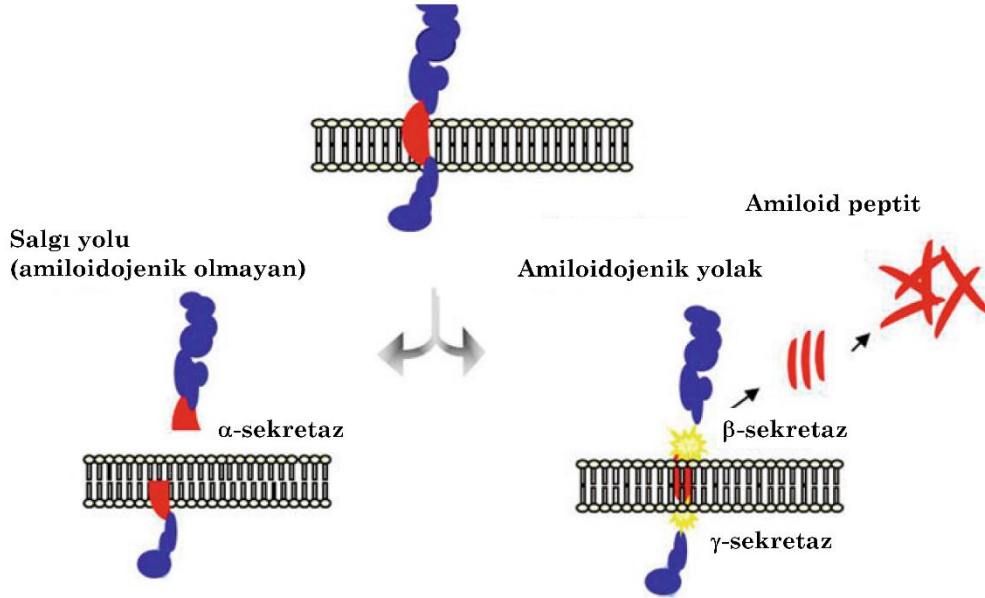
2.1. Alzheimer Hastalığı ve Nörodejeneratif Mekanizmalar

Dünya nüfüsündeki yaşlanma oranının artmasıyla, son yıllarda AD'ye yönelik yoğun bilimsel ilgi, bu ilerleyici nörodejeneratif bozukluğun yaygınlığının önemli bir yansımasıdır. AD ilk kez 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır ve günümüzde dünya çapında yirmi milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın demansla ilişkili hastalık haline gelmiştir. Alois Alzheimer 1907'de dikkat çektiği amiloid plakların ve nörofibriler düğümlerin, vakaların yaklaşık %50 ila %70'i için patolojik substrat gibi görüldüğünü göstermiştir.

AD, NFT'lerin oluşumuna ve nöronal hücrelerin kaybına yol açan A β peptitlerinin ve tau proteininin patolojik birikimi ile karakterizedir. 39-43 amino asitlik bir peptid olan A β , sağlıklı insan beyninde de bulunur ve normal bir fizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir. AD'de, beyin hücrelerinin ekstraselüler kısmında amiloid plakların birikimi; sinaptik disfonksiyon, inflamatuvar yanıtlar ve nöron kaybı ile yakından ilişkilidir. AD patolojisinde, tau proteini yoğun hiperfosforilasyona uğrar ve bu da hücre içi NFT'leri oluşturan tau proteininin birikimine yol açar. NFT'nin hücre içi oluşumu mikrotübül deformasyonuna, dendritik spinal bozulmaya ve aksonların dejenerasyonuna neden olur (Combs, Hamel, & Kanaan, 2016).

A β -proteinin senil plaklarda ve serebral kan damarlarının duvarlarında birikimi, AD patolojisinin temel özelliğidir. A β , çeşitli hücrelerde eksprese edilen kromozom yirmi bir üzerinde bulunan bir gen tarafından kodlanan ~110-130 kDa'lık tip I transmembran glikoprotein olan APP'nin proteolitik yıkılımla üretilir (Selkoe, 1994). İnsan dokularının tamamında ifade edilebilen bu protein, plazma zarı, endoplazmik retikulum (ER), golgi aygıtı ve mitokondri gibi çeşitli organellerde bulunmaktadır. Amino asitlerin sayısına ve sekansına göre değişen birkaç A β türü vardır; kırk ve kırk iki amino aside sahip olanlar (sırasıyla, A β 1-40 ve A β 1-42) beyinde en bol A β türleridir (Recuero, Serrano, Bullido, & Valdivieso, 2004). A β oluşumunda sorumlu olan APP, salgı yolu (veya amiloidojenik olmayan) ve amiloidojenik yol olmak üzere

2 farklı mekanizma ile metabolize edilir. Birinci yolakta, APP ilk olarak α -sekretaz tarafından proteolize uğrayarak çözümlenen fraksiyonlar olan N-terminal (sAPP α) ve C-terminal (C83) parçalarını oluşturur. C83 devamında, 3 kDa'lık (C3) daha küçük bir C-terminal parçasını oluşturmak için γ -sekretaz tarafından parçalanır. APP'nin α -sekretaz ile bölünmesi A β peptidine ait amino asit dizisi içinde meydana geldiğinden amiloid peptitlerin oluşumunu engeller. Amiloidojenik yolakta APP, β -sekretaz ile proteolizi sonucunda kısa N-terminal parçası (sAPP β) ve amino asitlerin tam amiloidojenik sekansını içeren daha uzun C-terminal parçası (C99) oluşumunu sağlar. Ardından, APP'nin daha sonra ikinci kez γ -sekretaz ile bölünmesiyle, A β peptitleri oluşturur (Şekil 2.1). A β türleri, nihayetinde amiloid plaklarını oluşturmak için dimerler, trimerler, oligomerler, protofibriller ve fibriller halinde kademeli olarak toplanan monomerler olarak salınır. Benzerliklerine rağmen A β (1-42), agregasyona ve fibrilizasyona daha yatkın nörotoksik A β peptid türüdür. Bu nedenle, A β (1-42), AD patogeneğinde önemli bir rol oynar (Rhein, & Eckert, 2007).



Şekil 2.1 Transmembran proteini olan APP'nin sekretaz enzimleri tarafından proteolizi (De-Paula, Radanovic, Diniz, & Forlenza, 2012).

A β oligomerleri, amiloid türevlerinin en toksik formları olarak kabul edilir. Bu oligomerler nöronlar ve glial hücrelerle etkileşime girerek, pro-

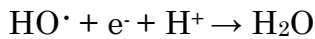
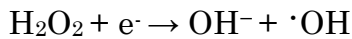
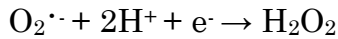
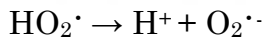
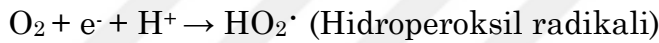
inflamatuvar kaskadların aktivasyonuna, mitokondriyal disfonksiyona, artmış oksidan strese, hücre içi sinyal yollarının bozulmasına, sinaptik plastisiteye, tau hiperfosforilasyonuna, kalsiyum metabolizmasının deregülasyonuna, nöronal apoptozun indüksiyonuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu mekanizmalar, sonuçta APP metabolizmasının işlev bozukluğuna ve A β peptitlerinin daha fazla üretimine yol açtığından, kendi kendine devam edebilen, pozitif bir geri besleme döngüsüne yol açar (Sanz-Blasco, Valero, Rodriguez-Crespo, Villalobos, & Nunez, 2008).

Nörodejenerasyonun ilerlemesi, hem A β hem de NFT'lerin birikim derecesi ile yakından ilişkilidir. Bu patoloji NFT'lerin esasen hücre içi birikimiyle oluşur. Bu düğümlerin ana bileşeni, mikrotübül ile ilişkili tau proteindir. Nöronlarda hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan tau, çoğu dokuda bulunan ve periferik sinir sisteminde yüksek oranda eksprese edilen bir proteindir. α - ve β -tübülün ile etkileşime giren tau'nun fosforilasyon durumu, mikrotübüllerin stabilizasyonu için önemlidir. Nöronlardaki mikrotübüller, nöronal yapı, aksonal taşıma ve nöronal plastisitenin korunması için gereklidir (Lindwall, & Cole, 1984). Tau, merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edildiğinden, nöronal fosfoprotein olarak kabul edilebilir. Tau'nun nöronal sentezinin korunması, mikrotübüllerin stabilitesi ve nörotransmitterlerin aksonal taşınması için gereklidir (Shahani, & Brandt, 2002). Tau'nun anormal fosforilasyonu, mikrotübüllerin yapısını bozarak tübülüne bağlanma yeteneğini olumsuz etkiler. Ek olarak, hiperfosforillenmiş tau, aksonal taşımayı ve sinaptik metabolizmayı bozarak, hücre iskeletinin bozulmasına ve nöronal ölüme neden olur. Tau'nun serin ve treonin kalıntılarının fosforilasyonu ve defosforilasyonu nöronal homeostazda kritik düzenleyici olaylardır. Fosforillenmiş tau proteini, NFT'lerin ana bileşeni olan eşleşmiş helikoidal filamanlarla (PHF) bir arada bulunur. PHF-tau kompleksi, tau proteini molekülüne başına 6 ila 8 fosfat grubuna sahiptir; bu da, sağlıklı beyindeki tau proteininin (normalde, protein başına 2 fosfat grubu) normal fosforilasyon derecesinden çok daha yüksektir (Wang, Grundke-Iqbal, & Iqbal, 2007). Ancak, embriyonik gelişim aşamalarında, nöronal tau baskın olarak hiperfosforillenmiş durumdadır.

Bunun nedeni, merkezi sinir sisteminin (MSS) erken gelişim aşamalarında nöronlarda ve sinapslarda nöroplastik değişiklikler için hiperfosforile tau proteinlerine ihtiyaç duyulmasıdır. Yetişkin MSS'de tau, baskın bir şekilde defosforile halde bulunur; çünkü nöronal homeostazı korumak için hücre iskeletinin gerekli stabilitesi defosforile haldeyken sağlanmaktadır (Johnson, & Stoothoff, 2004).

2.1.1. Oksidatif stres

Yaşlanma ile beyinde artan bir süreç olan oksidatif stres, ROS'un aşırı üretimini veya antioksidan sistemin işlev bozukluğunu içeren redoks durumundaki bir dengesizlik ile indüklenir. Mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki sitokrom oksidaz kompleksi moleküler oksijenin (O_2) yaklaşık %98'ini kullanır ve kalan oksijen hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikallerine ($O_2^{\cdot-}$) indirgenir. Oksijenin bir elektron tarafından indirgenmesi, oksidatif stres zincir reaksiyonlarında ROS öncüllerinin oluşumuna neden olur. Aşamalı olarak O_2 'nin indirgenmesi aşağıdaki gibi gerçekleşir:



$O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'in aşırı üretimi, demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonuyla ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\cdot} + OH^- + O_2$) genellikle yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve hidroksil iyonu (OH^-) gibi oksidan moleküllerin oluşumunu içerir (Leeuwenburgh, & Heinecke, 2001). Ayrıca $O_2^{\cdot-}$, nitrik oksit (NO) gibi diğer radikallerle de reaksiyona girer ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılan son derece güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna neden olur. Buna göre, ROS ve/veya RNS, sınırlı antioksidan savunması mekanizması varlığında oksidatif stresi indükleyen ana moleküllerdir. Bununla birlikte, redoks dengesindeki hafif bir dalgalanma kontrol altına alınmadığında,

oksidan konsantrasyonunda artışa yol açarak lipitleri, proteinleri, polisakkaritleri ve hatta DNA'yı hedefleyen ROS aracılı zincir reaksiyonların başlatılmasına neden olur (Droge, 2002). $O_2^{\cdot-}$, mitokondri tarafından enzimatik ve enzimatik olmayan işlemlerin kontrolü altında üretilmektedir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, elektronları oksijene taşıyan bir dizi redoks merkezi içerir. Bu nedenle, $O_2^{\cdot-}$ 'nin başlıca enzimatik kaynakları, sitokrom P450 sistemi ve H_2O_2 'ye bağlı oksijenazlar dahil olmak üzere çeşitli hücre zarlarında bulunan NADPH oksidazlardır. $O_2^{\cdot-}$ 'nin bir başka enzimatik kaynağı ise, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza proteolitik dönüşümüdür. Enzimatik olmayan $O_2^{\cdot-}$ üretimi ise, oksijenin doğrudan, indirgenmiş koenzimler veya flavin, demir kükürt proteinleri gibi prostetik gruplar tarafından transferi yoluyla gerçekleşir (Hlavica, 2015).

AD'de, beyin dokusunun anormal şekilde A β peptitlerin ve NFT'lerin birikimi ile oksidatif hasar da artmaktadır. A β aracılı nörodejenerasyonda demir (Fe), çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi indirgeyici geçiş metalleri önemli bir rol oynar. Çünkü A β ve APP'nin N terminal alanlarında bakır ve çinko için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri bulunur. Bu metallerin birikimi, yaşlanmadan etkilenen ve AD sırasında amiloid ve tau patolojileri tarafından artan bozulmuş nöronal metal homeostazından kaynaklanmaktadır. Proteinin yanlış katlanması, agregasyonu ve metal iyonu homeostazı arasında sıkı bir bağlantı vardır. Özellikle Zn, APP'ye bağlanarak proteinin işlenmesini doğrudan etkiler. Zn, Fe ve Cu, A β 'ye bağlanarak agregasyona neden olmaktadır. Benzer şekilde, bu geçiş metallerinin tau'ya bağlanması, proteinin fosforilasyonuna ve mikrotübüllerden ayrılarak NFT'lerin oluşumuna neden olmaktadır (Barnham, & Bush, 2014). Zn, Fe ve Cu, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'yi HO^{\cdot} dönüştürdüğü Fenton reaksiyonuna benzer katalitik reaksiyonlar kullanarak ROS üretimini teşvik ederler. Cu atomunun yüksek derecede reaktif $^{\cdot}OH$ 'ın üretimine aracılık etmesi, amiloid plaklarda bulunan yüksek Cu konsantrasyonu nedeniyle AD beyninde oksidatif stresi indüklemektedir. Ayrıca, A β peptitlerinin uzunluğu oksidatif hasar ile doğrudan ilişkilidir. A β (1-42) A β (1-40)'den daha toksiktir ve H_2O_2 'yi ve diğer ROS üretme olasılığı daha yüksektir (Valko, Morris, & Cronin, 2005).

2.1.2. Mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz

A β 'nin aracılık ettiği ROS üretimi, mitokondriyal membran hasarına neden olarak; mitokondriyal disfonksiyona, anormal enerji metabolizmasına ve sinaptik kayba yol açarak ROS üretimini hızlandırabilmektedir. Mitokondri hem enerji metabolizması hem de çeşitli apoptotik yollar üzerindeki kavşak noktası olduğundan, nöronal hücrelerin canlılığını devam ettirebilmesi için kritik öneme sahip bir organeldir. AD'li hastaların beyinde artmış oksidatif stres, sinaptik aktivite kaybı da dahil olmak üzere birden fazla hücre fonksiyonu kademeli olarak etkileyebilirken; aynı zamanda Cyt c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişiyle de apoptozu tetikleyebilir. Bu nedenle mitokondriyal disfonksiyonlar, hücre yaşama nöronların normal işleyişini etkileyen önemli metabolik anormalliklere neden olmaktadır (Padurariu vd, 2013).

Programlanmış hücre ölümünün özgün bir formu olan apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişimi ve homeostazı için önemli bir yoldur. Memeli hücrelerinde ekstrinsik veya ölüm reseptörü tarafından başlatılan yol ve intrinsik veya mitokondriyal bağımlı yol olmak üzere 2 ana apoptotik yoldur. İntrinsik yoldaki, pro-apoptotik protein olan Cyt c'nin mitokondriden sitozole salınımı DNA hasarı ve oksidatif stres gibi sinyaller tarafından tetiklenir (Liv d., 2000). Mitokondriyal iç zarın periferik bir proteini olan Cyt c, solunum zincirindeki kompleks III ve kompleks IV arasında bir elektron mekiği olarak işlev görür. Cyt c, sitozol içinde bir apoprotein olarak sentezlenir ve mitokondriye translokasyondan sonra hem grubuyla ilişkilendirilir. Dolayısıyla, fonksiyonel Cyt c veya holo-Cyt c, hem grubuna kovalent olarak bağlanan 104 amino asit kalıntısından oluşan tek bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır (Kagan vd., 2004). Fizyolojik pH'da, Cyt c çoğunlukla protonlanır, yani çoğu Cyt c, elektrostatik bağlar yoluyla mitokondriyal iç zarında bol miktarda bulunan asidik fosfolipitlere bağlanır. Bu nedenle, mitokondrideki Cyt c'nin çoğunluğu membrana bağlı halde bulunur. Mitokondriyal Cyt c'nin en az %15'i hem elektrostatik hem de hidrofobik etkileşimler yoluyla membran fosfolipitlerine sıkıca bağlanır. Geriye kalan Cyt c, zayıf elektrostatik etkileşimlerin bir sonucu olarak mitokondriyal iç zarına

gevşek bir şekilde bağlanır ve kolayca mobilize edilebilir. Gevşek ve sıkıca bağlı Cyt c havuzları farklı işlevlerde rol oynamaktadırlar. Gevşek bağlı Cyt c, elektron taşınmasına katılarak ROS oluşumunu ve oksidatif stresi önler. Diğeri ise, büyük ölçüde mitokondriyal iç zarı ile sınırlı olan bir lipit olan kardiyolipine bağlıdır. Kardiyolipin, Cyt c'nin mitokondriyal membranlara bağlanabilmesi için gereklidir. Kardiyolipine bağlı Cyt c, solunum zincirinde elektron taşımına katılmaz, ancak Cyt c'ye atfedilen peroksidaz aktivitesinden sorumludur (Garrido vd., 2006).

Mitokondriden salınan Cyt c, sitozol içindeki apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile etkileşime girerek apoptozom oluşumunu ve kaspaz aktivasyonunu sağlar. Kaspazlar aktif bölgesinde yer alan sistein kalıntıları ile proteolitik aktiviteye sahiptirler ve proteinleri aspartik asit kalıntılarında kesebilirler (Adrain, Brumatti, & Martin, 2006). Kaspazlar bir kez aktive olduktan sonra, hücre ölümüne karşı geri dönüşü olmayan biyokimyasal mekanizmaları başlatmış olurlar. Kaspazlar, apoptozdaki (memelilerde kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9) ve inflamasyondaki (insanlarda kaspaz-1, -4, -5, -12) rollerine göre sınıflandırılırlar. Apoptozda rol alan kaspazlar etki mekanizmalarına göre başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve -9) ve uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır. Kaspazlar başlangıçta, genellikle aktivasyon için dimerizasyon ve hidroliz gerektiren inaktif monomerik prokaspazlar olarak sentezlenir (Taylor, Cullen, & Martin, 2008). İnsanlarda en az on dört kaspaz olmasına rağmen, bu enzimlerin sadece bazıları, farklı hücre tiplerinde çeşitli ölüm uyarıcıları tarafından proteolitik olarak aktive edilirler. Bununla birlikte, pro-CASP3 genellikle otoproteolitik bölünme ile aktif hale gelir. Pro-CASP3 regüle edilmezse, kaspaz aktivitesi hücreleri ayırım gözetmeden öldürür. Bir uygulayıcı kaspaz olarak pro-CASP3, apoptotik sinyaller oluşuktan sonra bir başlatıcı kaspaz tarafından proteolize uğrayana kadar hiçbir aktiviteye sahip değildir. CASP3'ün katalitik bölgesi, 163. pozisyonundaki sisteinin (Cys-163) sülfidril grubunu ve 121. pozisyonundaki histidin (His-121) imidazol halkasını içerir. His-121, hedef moleküldeki aspartat kalıntısının karbonil grubunu stabilize ederken; Cys-163 ise peptit bağını hidrolize eder. Cys-163 ve 238. pozisyonundaki glisin (Gly-238) ayrıca

enzim-substrat kompleksinin tetrahedral geçiş durumunu hidrojen bağıyla stabilize etme işlevi görür. CASP3, diğer uygulayıcı kaspazların birçoğundan biraz daha geniş bir pH aralığında aktiftir. Bu geniş aralık, CASP3'n normal ve apoptotik hücre koşulları altında tamamen aktif olmasını sağlamaktadır (Stennicke, & Salvesen, 1997). CASP3 apoptotik hücrede hem dışsal (ekstrinsek-ölüm ligandı) hem de içsel (intrinsik-mitokondriyal) yollarla aktive edilir. Her 2 yolakta, enerjiye bağlı bir moleküler olay dizisinin başlaması için spesifik tetikleme sinyallerine ihtiyaç duyar. Her bir yol kendi başlatıcı kaspazını (-8, -9, -10) aktive ederek CASP3'n aktivasyonunu sağlar.

Kaspazlar, APP proteolizinde ve Aβ peptid türlerinin biyogenezinde doğrudan bir role sahiptirler. Özellikle, CASP3 aracılı APP hidrolizi ile elde edilen C31 C-terminal peptidi, bazı genlerin transkripsiyonel regülasyonu ile apoptoza aracılık etmektedir. Nöronların Aβ'ya maruz kalması veya Aβ birikmesine neden olan APP'nin aşırı ekspresyonu, CASP3'n hem ekstrinsek hem de intrinsik yollar üzerinden aktive ederek apoptozu indüklemektedir (Glabe, 2001).

2.1.3. Antioksidan mekanizmalar

Nörodejeneratif hastalıklar beyin ve plazmadaki antioksidan seviyeleri ile yakında ilişkilidir. Antioksidanlar, oksidatif strese karşı nöronal korumada ve AD'nin bilişsel ve davranışsal semptomlarını tedavisinde önemli bir yere sahiptirler (Khlebnikov, Schepetkin, Domina, Kirpotina, & Quinn, 2007). Antioksidanlar ilk olarak “oksitlenebilir bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde” olarak tanımlanmışlardır (Halliwell, & Gutteridge, 1995). Daha sonra bu tanım geliştirilerek, antioksidanlar “ROS'u doğrudan temizleyen ya da dolaylı olarak antioksidan savunma sistemlerini destekleyen veya ROS üretimini engelleyen herhangi bir madde” olarak tanımlanmıştır. Bir antioksidan molekül, oksidasyon sırasında üretilen radikalik formları temizledikten sonra, moleküller arası hidrojen bağları kurarak yeni radikallerin oluşumunu engellemektedir (Khlebnikov vd., 2007). Antioksidanlar serbest lipit radikallerinin oluşumunu engellemek, otoksidasyon zincir reaksiyonunun

yayılmasını önlemek (zincir kırıcı antioksidanlar), diğer antioksidanlarla sinerjizm oluşturarak hidroperoksitleri kararlı bileşiklere indirgemek, indirgeyici geçiş metalleri (demir ve bakır türevleri) şelatlamak ve pro-oksidatif enzimleri (lipooksijenazlar) inhibe etmek gibi çeşitli biyokimyasal yollarla aktivitelerini gösterebilirler (Kancheva, 2009).

Antioksidan savunma mekanizmaları, endojen ve ekzojen olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlar enzimatik veya non-enzimatik 2 alt sınıfa sahiptir. Endojen enzimatik antioksidanlar glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S transferaz (GST)'dan oluşurken, non-enzimatik antioksidanlar glutatyon (GSH), ürik asit, lipoik asit, koenzim Q ve selenyumdur. Ekzojen antioksidanlar ise E vitamini, A vitamini, C vitamini, doğal flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Pisoschi, & Pop, 2015).

Enzimatik antioksidanlar, ROS oluşumunu önleyen veya nötralize eden enzimlerden oluşur. Peroksitleri indirgemek için 2 elektron veren ve aynı zamanda Fenton reaksiyonu ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$) için potansiyel substrat olarak peroksitleri ortadan kaldıran selenyum içeren bir enzim olan GPx, H_2O_2 'nin su (H_2O) veya ilgili alkollere indirgenmesini katalize eder. CAT ise, H_2O_2 'yu H_2O ve O_2 dönüştürür. Memeli dokularında kofaktör olarak bakır-çinko içeren sitozolde (Cu,Zn-SOD), kofaktör olarak manganez içeren mitokondriyal matrikste (Mn-SOD) ve hücre dışında olmak üzere 3 izoforma sahip SOD, süperoksit anyonlarını ($O_2^{\cdot-}$) H_2O_2 'ya dönüştürür. GR, glutatyonu okside halden (GSSG) indirgenmiş hale (GSH) dönüştürerek ROS nötralizasyonunu sağlar. Sitozol, mitokondri ve mikrozoimler gibi farklı hücrel organellerde bulunan GST, GSH'ın konjugasyon aktivitesiyle ksenobiyotiklere ve zararlı bileşiklere karşı hücrel detoksifikasyona ve oksidatif strese karşı kritik bir rol oynar (Allocati, Masulli, Di Ilio, & Federici, 2018).

Non-enzimatik antioksidanlardan bir hidrojen atomu veya bir elektron donörü olarak GSH, hücreleri ROS'a karşı koruyan endojen bir tripeptittir (γ -glutamil sisteinil glisin). Hücrenin ana tiyol-disülfid redoks tamponu olan

GSH, detoksifikasyonda ve antioksidan mekanizmalarda önemli rol oynar. Ürik asit, hemoglobinin otoksidasyonu veya makrofaj aracılı peroksit üretimi gibi reaksiyonlardan kaynaklanan radikalleri temizleme yeteneğine sahiptir. Benzer şekilde, lipoik asit ve elektron taşıma zincirindeki temel elektron taşıyıcısı olan koenzim Q, ROS ve RNS kaynaklı lipit peroksidasyonunu önlemektedir. Selenyum öncelikle GPx kofaktörü olarak işlev görür ve H₂O₂'ye karşı koruma da sağlar (Carocho, & Ferreira, 2013).

E vitamini (α-tokoferol), radikallerin zincir reaksiyonlarını durdurarak hücre zarlarını lipit peroksidasyonuna karşı korur. C vitamini, lipitlerin peroksidasyondan korunması için E vitamini ile birlikte hareket eden suda çözünür bir antioksidandır. C vitamini, hidroksil, alkoksil ve süperoksit radikal anyonunu ve RNS'leri temizleyerek DNA, lipitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi makro moleküllerin oksidasyonunu önler. ROS'lar üzerinde şelatör etkiye sahip olan fenolik asitler ve bir karotenoid olan A vitamini ROS temizleyicileri olarak antioksidan aktiviteye sahiptirler (Jee, Lim, Park, & Kim, 2006).

2.2. Sirtuinler

Sirtuin ailesi, sınıf I ve II histon deasetilazlarından farklı olarak, kofaktör olarak NAD⁺-bağımlı olan sınıf III protein deasetilazlardan oluşur. İlk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de tanımlanan sirtuinlere sessiz bilgi düzenleyicileri (SIR) adı verilmişti. Ardından sirtuinlerin, çok çeşitli histon (H3 ve H4) ve histon olmayan proteinlerde hidroliz yoluyla asetil gruplarını lizin kalıntılarından uzaklaştırdığının bulunmasıyla, genel olarak lizin deasetilazlar olarak adlandırılmışlardır (Chang, & Guarente, 2014).

Sirtuinler deasetilasyon mekanizmaları ile hücrel fizyolojinin birçok yönünü etkilemektedir. Memelilerde, her biri farklı hücrel lokalizasyona sahip oldukça spesifik fonksiyonlar gösteren 7 farklı sirtuin proteini (SIRT1-7) bulunur. SIRT1 ve SIRT2 hem çekirdekte hem de sitoplazmada lokalizedir. Çekirdeğe lokalize olan SIRT1, insülin sinyalinin inhibisyonu gibi sitoplazmik hedefler üzerinde hareket etmesi gerektiğinde sitoplazmaya transfer edilir. SIRT2 sitoplazmaya lokalize olmasına karşın, bir nükleer protein olarak

hareket edebilir ve hücre döngüsünü düzenleyebilir. SIRT2, tübülün mikrotübüllerini ve sitoplazmadan çekirdeğe geçen transkripsiyon faktörlerini deasetile eder. Mitoz sırasında hücrelerin mitotik fazdan çıkışı için SIRT2 gereklidir. SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 sadece mitokondriye lokalizedir ve mitokondriyal strese yanıt olarak enerji metabolizmasını düzenler. Örneğin SIRT3, amino asit metabolizmasını, yağ asidi oksidasyonunu, trikarboksilik asit döngüsünü, elektron taşıma zinciri aktivitesini, mitokondriyal DNA replikasyonunu, transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenlemek için çeşitli proteinleri deasetile eder. SIRT4'ün birçok hedef proteini, SIRT3 tarafından da düzenlenebilir. SIRT5 özellikle enerji metabolizmasının düzenlenmesinde sorumlu enzimlerle etkileşime girer. SIRT6 ve SIRT7, histonlar dahil olmak üzere hücre içi sinyal proteinlerini deasetile ederek gen ekspresyonunu düzenlerler (Donmez, 2012).

Genel olarak, sirtuinler proteinlerin sentezini ve fonksiyonunu düzenleyerek hücrelerin metabolik streslere uyum sağlamasına yardımcı olurlar. Her sirtuin karakteristik bir deasetilaz aktivitesine sahiptir. Deasetilasyon, SIRT1 ve SIRT2'nin en belirgin aktivitesidir. Buna karşılık, SIRT4 ve SIRT6 çoğunlukla mono-ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. SIRT3 ve SIRT6 ise her 2 aktiviteye de sahiptir (Morris, 2013).

SIRT1'in C-terminal alanındaki yirmi beş amino asitlik sekans, deasetilaz aktivitesi için gereklidir. Tek başına düşük katalitik aktiviteye sahip C-terminal, N-terminaliyle birlikte katalitik aktiviteyi on iki ila kırk beş kat daha fazla güçlendirir. SIRT1'in aktivitesi, substratlarından biri olan NAD⁺'in hücrese seviyeleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. NAD tüm canlı hücrelerde bulunan önemli bir koenzimdir. Metabolizmada, NAD elektron transferi yoluyla redoks reaksiyonlarında okside (NAD⁺) ve redükte (NADH) formlarda bulunabilir. NAD⁺ ve NADH metabolik reaksiyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve NAD⁺'nin hücrese seviyesi, hücrese enerji durumunun önemli bir göstergesidir. Sonuç olarak SIRT1, hücrese enerji durumu ile uyarlanabilir transkripsiyonel faktörler arasında moleküler bir bağlantı sağlar. Sistemik metabolik homeostazda yer alan çok sayıda

transkripsiyon faktörü regüle etmesi nedeniyle, SIRT1 metabolizmanın entegrasyonunda kritik bir öneme sahiptir (Li, & Kazgan, 2011).

2.3. Poli (ADP-Riboz) Polimerazlar

Poli (ADP-ribozilasyon) (PARilasyon), poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) enzimleri tarafından katalize edilen bir posttranslasyonel protein modifikasyonudur. PARP enzim ailesi on sekiz üyeden oluşmakta ve bu enzimlerin sadece 3'ü protektif etkili PARP olarak kabul edilebilirken, diğer aile üyeleri mono (ADP-ribozil) transferazlar olarak işlev görmekte veya enzimatik aktiviteleri henüz belirlenmemiştir. PARP'ların hedef protein ve substratlarla etkileşimiyle aktivasyona uğraması, transkripsiyon ve replikasyondan DNA onarımına kadar birçok hücreyel olayı etkiler. Bu moleküler yolaklar; hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolizması ve hücre ölümü gibi hücreyel fonksiyonların temelini oluşturur (Şekil 2.2). PARilasyon işlemi sırasında, substrat olarak NAD⁺ kullanılır ve bu yüksek enerjili metabolit, aktif PARP enzimleri tarafından nikotinamid ve ADP-riboza hidrolize edilir. Buna karşılık, PARP'lar ilk ADP-riboz birimini uygun substratlara bağlar ve daha sonra tekrarlanan NAD⁺ hidrolizi ile diğer ADP-riboz birimlerini oluşturarak ADP-riboz kısımlarını polimerize eder. PARP'lar, multikatalitik domainlere sahip enzimlerdir. Bu katalitik bölgeler PARP'ların protein-protein, protein-nükleik asit ve protein-metabolit etkileşimlerinin gerçekleştirilmesinden sorumludurlar (Burkle, & Virag, 2013).

modifikasyon alanı ve C-terminal katalitik alanı olmak üzere 3 temel kısımdan oluşur. PARP1, N-terminal DNA bağlanma bölgesinde bulunan çinko parmak motifleri yoluyla kırık DNA uçlarına bağlanır. C-terminal bölgesi, substrat olarak NAD⁺ kullanır ve poli (ADP-riboz) polimerlerin katalitik sentezinde rol oynar (Langelier, Servent, Rogers, & Pascal, 2008). Birçok ROS ve RNS türü, DNA zincirlerinin kopmasına neden olabileceğinden PARP1'i bu yolla aktive eder. Ayrıca, AD'de, A β sentezi ve klirensi arasındaki dengesizlik, elektron transport zincir komplekslerinin inhibisyonuna neden olarak ROS üretimini ve oksidatif stres seviyesini arttırır; böylece PARP1'in aktive etmekte ve mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerle apoptotik yolları indüklemektedir (Kraus, & Hottiger, 2013).

2.4. Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler

Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler (PPAR'lar), çeşitli metabolik süreçlerde rol alan ve hücrel fonksiyonlar için gerekli olan genleri düzenleyen ligandla aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. PPAR'lar, N-terminalinde bir DNA bağlayıcı bölge, peroksizom proliferatör yanıt elemanlarını (PPRE) spesifik olarak tanıyan esnek bir DNA bağlayıcı bölge ve C-terminalinde bir ligand bağlayıcı bölge içermektedir. Spesifik ligandlarla etkileşimin ardından PPAR'lar, yapılarını değiştirdikleri ve gen transkripsiyonunu düzenledikleri çekirdeğe taşınır ve başka bir nükleer reseptör olan retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerize olurlar. PPAR/RXR heterodimeri, hedef genlerin promotör bölgesindeki PPRE'ye bağlanır ve birlikte hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için kromatin gevşemesini başlatan histon asetil transferazlar ve RNA polimerazlar ile etkileşime girmektedir. Ayrıca, PPAR'lar mitokondriyal biyogenezi, oksidatif metabolizmayı, yağ asidi oksidasyonunu ve glukoneogenezi düzenler; mitokondri üzerindeki koruyucu etkileri sayesinde beyin fonksiyonlarını da iyileştirebilirler. PPAR ailesi PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ olmak üzere 3 izoformdan oluşurlar. Bu 3 izoform, doku dağılımları, ligand özgüllükleri ve fizyolojik rolleri bakımından birbirinden farklıdır (Zoete, Grosdidier, & Michielin, 2007). PPAR α esas olarak karaciğer, böbrek, beyaz ve

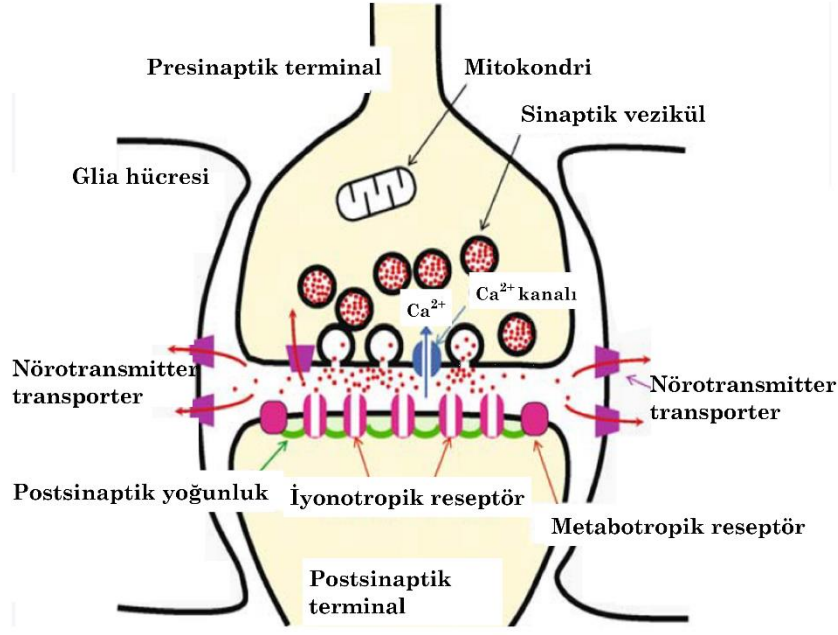
kahverengi yağ dokusu dahil olmak üzere yüksek yağ asidi metabolizmasına sahip olan dokularda eksprese edilir. PPAR β/δ hemen hemen tüm dokularda eksprese edilir ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler. PPAR γ , insan ve kemirgenlerde 2 izoformdan oluşur: PPAR γ 1, ~54.5 kDa daha kısa form ve PPAR γ 2, ~57.6 kDa daha uzun form. PPAR γ 2 yağ dokusu ile sınırlıdır ve adiposit farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Aksine, PPAR γ 1, nöronlar ve glia gibi beyin hücreleri ve kemik iliği kaynaklı bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilir (Yonutas, & Sullivan, 2013).

PPAR γ , G-protein bağlı reseptörler, büyüme faktörleri, antioksidan enzimler, kök hücre genleri, kinazlar, sitokinler/kemokinler, pro-inflamatuar faktörler, iyon kanalları ve taşıyıcılar dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonunu sıkı bir şekilde düzenlemektedir. Düzenlenen genler 3 ana kategoriye ayrılabilir: 1) yağ asidi/glukoz metabolizması, 2) inflamasyon/oksidatif stres/apoptoz ve 3) kanser. PPAR γ , oksidatif hasara, mitokondriyal disfonksiyona ve apoptoza karşı nöronları ve glial hücreleri korumaktadır. PPAR γ , hem antioksidan yanıt elemanını (ARE) hem de PPRE bölgelerine sahip GSH, CAT, SOD ve GST gibi redoks homeostazının korunması için kritik öneme sahip antioksidan genlerini aktive eder (Wang vd., 2014).

PPAR γ , çeşitli nörodejeneratif hastalık modellerinde umut verici terapötik potansiyele sahip olan ve AD tedavisi için PPAR γ agonisti geliştirme konusunda büyük ilgi yaratan PPAR ailesinin en çok çalışılan izoformudur. PPAR γ reseptörünün PPAR γ agonisti tarafından aktivasyonu, nörodejenerasyonun önlenmesine yardımcı olur ve nörojenezi teşvik eder. AD'nin ayırt edici özelliği ve hastalığın ilerlemesinden sorumlu olan A β plaklarının sentezi ve temizlenmesi, AD hastalarında hastalık ilerlemesinin kontrol edildiği mekanizmalardan biridir. PPAR γ agonistleri, PPAR γ 'nin APP'nin sekretazlar aracılı parçalanmasını etkileme kabiliyeti nedeniyle amiloid patolojisinin tedavisi için umut vadetmektedir (Cheng, Shang, Jiang, Shi, & Wang, 2016).

2.5. Sinaptozomlar: Sinaptik Fizyolojinin İncelenmesi İçin Model Sistemler

Beyindeki sinir terminalleri şekilleri ve büyüklükleri, mitokondri ve sitoiskelet içerikleri ve postsinaptik hücrelerle olan bağlantı sayıları bakımından farklılık gösterir. Sinir ağların bağlantı noktaları olan sinapslar, 2 nöron arasındaki elektriksel veya kimyasal iletişim noktalarıdır ve sinyal iletim mekanizmalarına bağlı olarak kimyasal ve elektriksel sinapslar olmak üzere 2 temel tipi vardır. Elektriksel sinapslar (nöronal bağlantı noktaları), elektriksel impulsların bir hücreden diğerine doğrudan ve fiziksel temas yoluyla yayılmasında işlev görürler. Bu sinapslar, membran yapısının ve ilişkili organellerin nispeten basit bir organizasyonu ile karakterize edilir. Karakteristik olarak kimyasal sinapslar, hücreler arası iletişim için gerekli olan çeşitli nörotransmitterleri ve nöropeptitleri içerirler. Kimyasal iletim ile meydana gelen hücre-hücre iletişimi nörotransmitter sentezi, depolanması, salınımı ve alımı gibi protein odaklı moleküler mekanizmaları ile karakterize edilir. Genel olarak sinapslar 3 ana yapıdan oluşur: presinaptik bölge (presinaptik son, akson terminali), sinaptik yarık ve postsinaptik bölge (dendritik omurga) (Şekil 2.3). Pre- ve postsinaptik membranlar, sinaptik yarık ile birlikte sinaps olarak adlandırılır (Pocklington, Armstrong, & Grant, 2006). Presinaptik bölge, nörotransmitterin depolandığı vezikülleri yoğun bir şekilde içerir. Presinaptik bölgedeki veziküller depolarizasyonuna yanıt olarak, ekzositoz ile sinaptik yarığa salınır. Presinaptik bölge ayrıca mitokondri, düz endoplazmik retikulum, mikrotübüller ve nörofilamentler gibi diğer organelleri de içerir. Postsinaptik bölgeler, sitoplazmik yüzeyinde yoğun membranöz yapıları içeren kısımlardır. Postsinaptik yoğunluk (PSD) olarak adlandırılan bu bölgeler, hücre iskeletinin bileşenlerini ve düz endoplazmik retikulumu içermektedir (Bermejo, Milenkovic, Salahpour, & Ramsey, 2014).



Şekil 2.3 Sinaptozom yapısı (Binder, Hirokawa, & Windhorst, 2009).

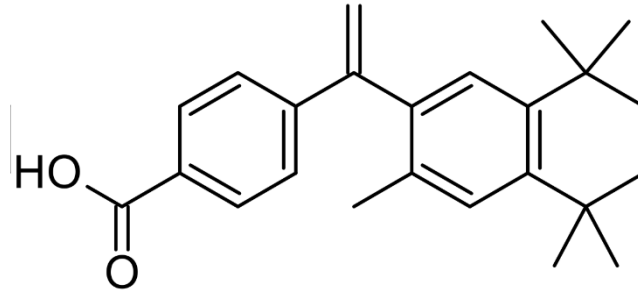
Beyindeki sinaptik terminalleri incelemek için subselüler fraksiyonlama teknikleri ile dokulardan izole edile sinir uçları bakımından zenginleştirilmiş preparatlara “sinaptozomlar” denir. “Sinaptozom” terimi ilk kez 1964 yılında Whittaker, Michaelson, & Kirkland tarafından yayınlanan bir makalede belirtilmiştir. O zamanlar amaç, bilinen ve varsayılan nörotransmitterlerin ve bunları sentezleyen enzimlerin sinaptozomal lokalizasyonunu araştırmaktı. Bu bağlamda sinaptozomlar, organellerden ziyade, sinaptik bileşenler içeren membranöz yapılardır ve homojenize edilmiş sinir dokusunun subselüler fraksiyonlanması ile izole edilirler. Genellikle “sıkışmış sinir uçları” olarak adlandırılırlar. Çünkü akson terminalleri homojenleştirmenin fiziksel kuvveti tarafından yırtıldıktan sonra doğal olarak birlikte tekrar reorganize olurlar. Sinaptozomlar, postsinaptik membran ve PSD ile birlikte mitokondri ve sinaptik veziküller de dahil olmak üzere tam bir presinaptik terminali içermektedir. Beyin dokularından taze olarak hazırlanan sinaptozomlar metabolik ve enzimatik olarak aktiftir (Whittaker, 1993). Nörotransmitterlerin alınması, depolanması ve serbest bırakılması için gerekli moleküler mekanizmaları ve sinyal iletimi için gerekli kanalları ve reseptörleri içerirler. Ayrıca sinaptozomlar, protein sentezi, plazma membran potansiyelinin

korunması ve iyon homeostazı açısından aktiftirler. Sinaptozomlar daha ileri fraksiyonlama yöntemleriyle sinaptik veziküller, PSD ve sinaptik plazma membranları gibi çeşitli subselüler bileşenleri ayrı ayrı elde etmek için de kullanılabilirler (Bai, & Witzmann, 2007). Sinaptozomların incelenmesi, nörotransmisyon ve sinaptik protein-protein etkileşim ağlarının moleküler mekanizmaları hakkındaki anlayışımıza yardımcı olan nörokimya araştırmalarının temel taşlarından biri olmuştur. Sinaptozomlarda aktif kalan biyokimyasal reaksiyonlara ait bilgiler, gelişen analitik yöntemlerle birlikte artmaya devam etmektedir.

2.6. Bexarotene

Bexarotene [Targretin; (4-{1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil) etenil} benzoik asit] izopren omurgası dışında doğal retinoidlere çok az benzeyen sentetik bir bileşiktir (Şekil 2.4). Bexarotene 348.48 kD moleküler ağırlığı ve $C_{24}H_{28}O_2$ moleküler formülü ile lipofilik bir karaktere sahiptir. Bexarotene, hücrel farklılaşma ve büyümede rol alan genleri düzenlemek için retinoid reseptörleri (RXR agonisti olarak) üzerinden hareket eden sentetik bir retinoid analogu ve antineoplastik ajandır. Bexarotene, A vitamini benzeri aktivitelere sahip olduğu için üçüncü nesil bir retinoid olarak kabul edilir ve RXR'lere (RXR α , RXR β , RXR γ) seçici olarak bağlanır ve aktive eder. RXR'nin bağlayıcı cebi hidrofobiktir ve geleneksel olarak, RXR agonistleri van der Waals etkileşimleri ağı üzerinden ligandlarla etkileşime giren polar olmayan bir yüzeye sahiptir. Bexarotene 2000 yılında kutanöz T hücreli lenfomada (CTCL) kullanım için onaylanmıştır ve bu lenfoma formunun kutanöz belirtileri için ikinci basamak bir tedavi olmaya devam etmektedir. Bexarotene, CTCL hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurmasının yanı sıra, CASP3'ün eşlik ettiği apoptoz indüksiyonu yoluyla hücre proliferasyonunu da inhibe etmektedir. Bexarotene'nin Amerika Birleşik Devletleri'nin Sağlık Bakanlığı'na bağlı Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından CTCL hastalarında tüm evrelerde tedavi için kullanılabileceğinin onaylanmasından sonra, bexarotene'nin potansiyel etki mekanizmaları meme kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri ve kontrolsüz hücrel proliferasyonun

olduğu hastalıkların tedavisi için de araştırılmaya başlanmıştır (Qu, & Tang, 2010).



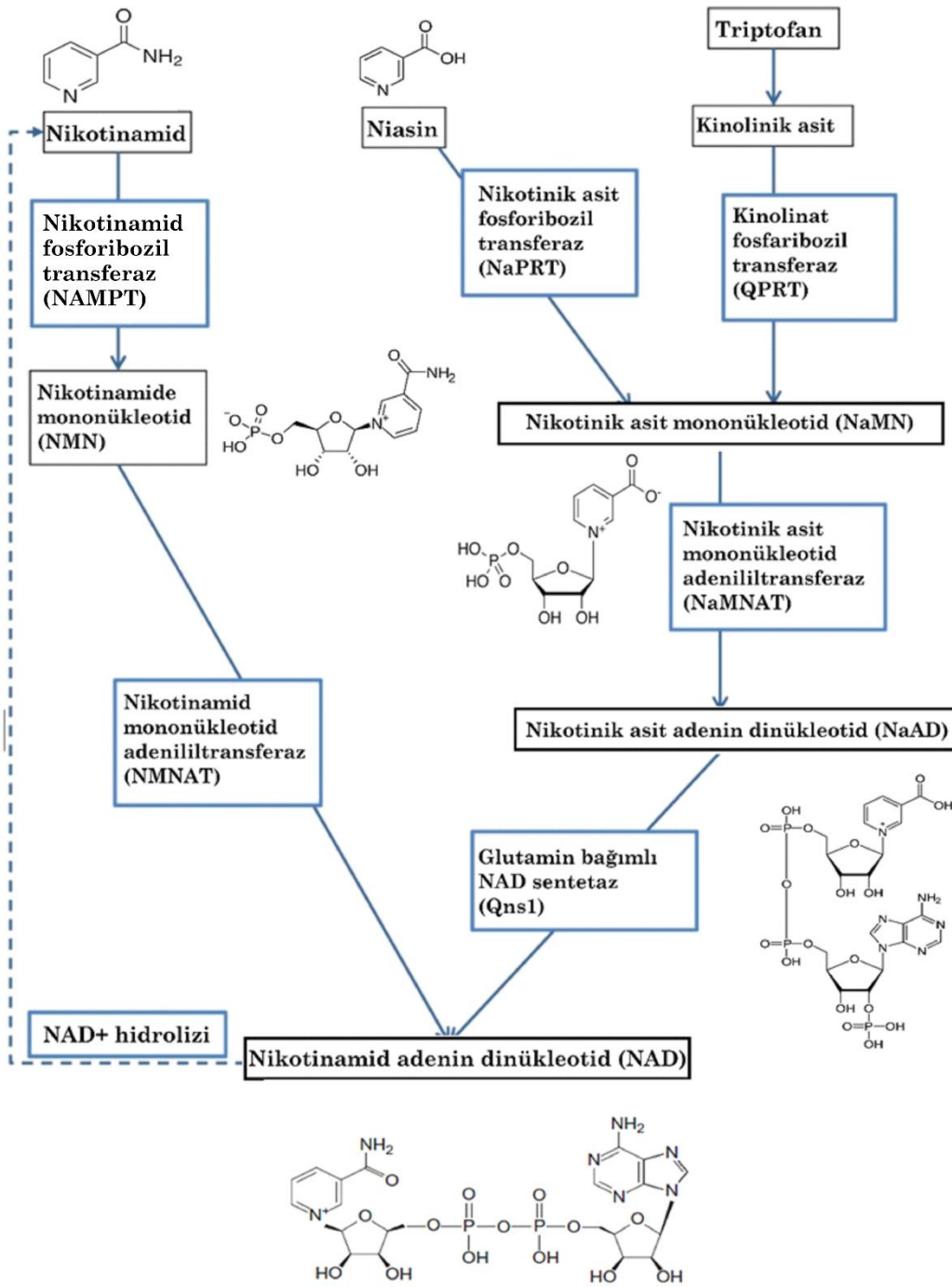
Şekil 2.4 Bexarotene (targretin) yapısı.

Bexarotene plazma proteinlerine yüksek afiniteyle bağlanabilmektedir (>%99). Bununla birlikte, bu ajanın sağlıklı bireylerdeki kan-beyin veya plasenta bariyerlerini geçme etkinliği düşüktür. Bexarotene hâlihazırda AD'de klinik denemeleri devam etmesine rağmen, hastalarda gözlenen terapötik yanıtların, RXR ve PPAR aktivasyonundan veya hastalardaki kan-beyin bariyeri (KBB) fonksiyonunun değiştirilmesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Çünkü RXR'lerin heterodimer ortağı olan PPAR'lar ile aktivasyonu, RXR'lerin düzenlediği genlerin ekspresyonunu arttırarak hücrel farklılaşmayı ve çoğalmayı düzenlemekte ve malignitelerin tedavisinde aktif bir rol oynamaktadır. RXR'ler ayrıca, lipitlerin transportundan sorumlu olan apolipoprotein E (ApoE) ve ATP bağlayıcı kaset A1 (ABCA1) genlerinin transkripsiyonunu aktive ederek ekspresyonlarını arttırmakta ve aynı zamanda A β klirensini hızlandırmaktadır (Skerrett, Pellegrino, Casali, Taraboanta, & Landreth, 2015). Öte yandan bexarotene, A β peptidinin monomerik yapısındaki β -tabakalara bağlanarak fibril oluşum süresinin artmasına yol açar (Pham vd., 2018). Bu da, bexarotene'nin fibril oluşumunu geciktirdiği, ancak A β plaklarının beyinden temizlenmesi üzerinde etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Fakat sinaptik işlevsellikte ve diğer nöronal fizyolojide bexarotene'nin kesin rolleri ve hastalık üzerindeki terapötik etkileri hala tam olarak anlaşılammıştır. A β patogenezinin altında yatan olası mekanizmalardan hangisinin bexarotene tedavisi ile tersine çevrilebildiğini belirlemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

2.7. Nikotinamid

B3 vitamininin suda çözüner amid formu olan nikotinamid, NAD'ın üretiminde yer alan metabolik yolun önemli bir bileşenidir. Nikotinamid, 2 koenzim formu olarak bulunur: nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺, NADH) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺, NADPH). Nikotinamid yumurta, et, balık ve mantar gibi gıdalardan sağlanabilirken, esansiyel bir amino asit olan endojen triptofan metabolizmasından (de novo sentezi) da sentezlenebilir. Nikotinamid ayrıca, NAD hidrolizi ile niasinden de üretilebilir (Şekil 2.5).





Şekil 2.5 NAD sentezinde nikotinamid, niasin ve triptofan metabolizması için anahtar yolların basitleştirilmiş şematik gösterimi

Nikotinamid, karaciğerde sadece küçük miktarlarda depolanırken, çoğu, metabolik reaksiyonlar sırasında katalize edilir. Nikotinamidin farmakolojik

olarak yüksek dozlardaki aşırı alımı genellikle herhangi bir anomaliye neden olmazken, ancak nadiren hepatotoksisiteye neden olabilmektedir (Imai, 2009).

Nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT) enzimi, nikotinamitten nikotinamid mononükleotitin (NMN) sentezini katalize eder. NAD⁺ biyosentezinden sorumlu bu enzimin rolü, nöronlar gibi NAD⁺ seviyelerindeki azalmaya duyarlı hücrelerde daha çok öne çıkmaktadır. NAD⁺ homeostazının yaşlanma ile değiştiği de bulunmuştur; bu nedenle, nöronlardaki NAD⁺ seviyelerini etkileyen nikotinamid, nöronal gelişimde ve nöroproteksiyonda önemli bir rol oynamaktadır (Zhu, Lu, Lee, Ugurbil, & Chen, 2015).

NMN adenililtransferaz (NMNAT), NMN'yi NAD⁺'a dönüştürür. İzoenzimleri, NMNAT1, 2 ve 3, sırasıyla çekirdek, sitoplazma ve mitokondride lokalize olur. NMNAT aktivitesindeki bir artışın nükleer NAD⁺ seviyelerini artırarak, nöroproteksiyonda rol alan NAD⁺-bağımlı protein deasetilaz SIRT1'in aktivasyonu ile Wallerian dejenerasyonuna sahip nöronlarda aksonal korumayı sağladığı gösterilmiştir (Jayaram, Kusumanchi, & Yalowitz, 2011). İnsanlarda nikotinamid, nikotinamid N-metiltransferaz (NNMT) enziminin aktivitesiyle N-metil nikotinamide dönüştürülür. Geri kalan nikotinamid, adenozin trifosfat (ATP) sentezi ve mitokondriyal solunum için önemli olan hem oksitlenmiş hem de indirgenmiş formlardaki NAD/NADP koenzimlerinin sentezine katılır; ayrıca antioksidan rollere sahip iki yüzden fazla enzimatik reaksiyonda da rol oynamaktadır (Anderson, Bradbury, & Schneider, 2008).

NAD⁺ ayrıca karaciğer ve böbreklerdeki triptofan metabolizması ile diyetle alınan nikotinik asit ve niasinden de sentezlenebilir. Triptofan, daha sonra NAD⁺'a dönüştürülebilene kadar az miktarda nikotinik asit mononükleotide (NAMN) metabolize edilebilir. Bununla birlikte, 1 mg niasine eşdeğer miktarda NAMN'yi üretebilmek için 60 mg triptofan gereklidir. Triptofan metabolizması 9 basamaklı bir süreçtir ve bunun kinurenin yolu olarak bilinen ilk kısmı, Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD) ve AD ve diğer nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi nörodejeneratif hastalıkta inhibisyona uğramaktadır. NAD⁺ hidrolizi nörotoksin üretimini artırmakta ve aynı zamanda NAD⁺ seviyelerini düşürerek nöronları hasara karşı daha

duyarlı hale getirmektedir. Bu nedenle, nikotinamid ve NAD⁺ arasındaki denge nöronal sağlığın sürdürülmesinde büyük öneme sahiptir (Davis, & Liu, 2015).

Beyin, sistemik enerji homeostazının düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Ayrıca, endokrin ve nöronal sinyallerin değerlendirilmesi ve entegrasyonu yoluyla, periferik metabolizmanın akut ve kronik enerji gereksinimlerini düzenlemektedir. Hızla artan yaşılanan nüfusun bir sonucu olarak, AD gibi nörodejeneratif hastalıklar küresel halk sağlığı için önemli bir sorun haline gelmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda yer alan moleküler yolları ilgili birçok ilerleme kaydedilmiş olsa da, henüz AD için etkili bir tedavi şekli yoktur.

Bu çalışmamızda, stres yanıtı ve nöroprotektif etkileri sayesinde nörodejeneratif hastalıklarda umut vadeden nikotinamid ve bexarotene'nin, Aβ kaynaklı AD patogenezindeki potansiyel terapötik hedefler olan oksidatif, antioksidan ve apoptotik süreçlerin yanı sıra SIRT1/PARP-1/PPAR γ sinyal yolları üzerindeki etkilerini araştırdık.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneysel çalışmalarımızı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Klinik Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirdik. ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun (HADYEK)'dan 18.09.2018 tarihli, 128 toplantı sayılı, 654-1 karar numarası ile onaylanan protokole göre çalışmamızı gerçekleştirdik.

3.1. Deneysel Hayvanları

Deneysel çalışmamızda TICAM'dan temin edilen 490±50 gram ağırlıkta, sağlıklı, 19-20 aylık, *Wistar albino* cinsi, yirmi dört adet erkek sıçan kullanıldı. Deneysel hayvanları deney süresince, on iki saatlik aydınlık/karanlık döngüsü olan, ısı (24±2°C) ve nemi (%45±5) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneysel sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart pellet sıçan yemi ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir.

3.2. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Sarf Malzemeler

- Nikotinamid (72340, Sigma-Aldrich)
- Bexarotene (SML0282, Sigma-Aldrich)
- Dimetil sülfoksit (D8418, Sigma-Aldrich)
- Serum fizyolojik (Polifarma)
- 1 ml, 5 ve 10 ml steril enjektör
- 10 – 1000 µL hacim aralıklı pipetörler ve uçları (Nichiryo)
- Sükroz (S0389, Sigma-Aldrich)
- 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansülfonik asit (HEPES; H3375, Sigma-Aldrich)
- Sodyum klorid (NaCl; 567442, Millipore)
- Potasyum klorid (KCl; 529552, Millipore)
- Magnezyum klorid (MgCl₂; M8266, Sigma-Aldrich)
- Sodyum fosfat monobazik (NaH₂PO₄, S8282, Sigma-Aldrich)
- Sodyum bikarbonat (NaHCO₃; S5761, Sigma-Aldrich)
- Kalsiyum klorid (CaCl₂; C1016, Sigma-Aldrich)
- Glukoz (158968, Sigma-Aldrich)

- Percoll (GE17-0891, Sigma-Aldrich)
- Etilen glikol diamin tetraasetik asit (EGTA; E3889, Sigma-Aldrich)
- Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris; T1503, Sigma-Aldrich)
- Ditiyotreitöl (DTT; D0632, Sigma-Aldrich)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA, E9884, Sigma-Aldrich)
- Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 63138, Sigma-Aldrich)
- Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4 ; 795488, Sigma-Aldrich)
- Potasyum hidroksit (KOH; P5958, Sigma-Aldrich)
- Glutaraldehit (354400, Sigma-Aldrich)
- Etanol (32205, Sigma-Aldrich)
- Osmium tetroksid (OsO_4 ; 75632, Sigma-Aldrich)
- Epon 812 (Fluka)
- Potasyum fosfat dibazik (KH_2PO_4 ; 795496, Sigma-Aldrich)
- Bakır sülfat ($CuSO_4$; 451657, Sigma-Aldrich)
- Bovin serum albumin (05470, Sigma-Aldrich)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3 ; S7795, Sigma-Aldrich)
- Sodyum hidroksit (NaOH; S8045, Sigma-Aldrich)
- Sodyum potasyum tartarat ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$; 217255, Sigma-Aldrich)
- Metiltiyazolildifenil-tetrazolium bromür (MTT) Hücre Çoğalması ve Sitotoksisite ELISA kit 96T (IS074, Cloud-Clone Corp.)
- Serum TAS kit (RL0017, Rel-Assay)
- Serum TOS kit (RL0024, Rel-Assay)
- Rat CASP3 ELISA kit 96T (SEA626Ra, Cloud-Clone Corp.)
- Rat Cyt c ELISA kit 96T (SEA594Ra, Cloud-Clone Corp.)
- Rat SIRT1 ELISA kit 96T (SEE912Ra, Cloud-Clone Corp.)
- Rat PPAR γ ELISA kit 96T (SEA886Ra, Cloud-Clone Corp.)
- Rat PARP1 ELISA kit 96T (LS-F27548, Lifespan Biosciences Inc.)

3.3. Deneysel İşlemlerde Kullanılan Cihazlar

- Homojenizatör (Janke and Kunkel ultra-turrax T25)
- pH metre (Ino Lab)

- Mikro plate yıkayıcı (ELx50, BIOTEK)
- ELISA okuyucu (ELx808 model, BIOTEK)
- Roche Cobas c501 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- Mikrotom bıçağı (RM 2025, Leica)
- CH40 ışık mikroskobu (Olympus)
- 3.2.0. model dijital kamera(Spot Insight)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin Dondurucu, -80°C (Thermo, ULT 1386-5-V40)
- Distile su cihazı
- Etüv (Binder)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Santrifüj (Nüve NF800)
- Soğutmalı santrifüj (Jouan MR22)
- Ultrasantrifüj (4.0 Hanil science industrial)
- Ultramikrotom (LEICA UltraCut R)
- Transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM-1220)

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

3.4.1. *İn vivo deneyler*

Sıçanlar ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde, her grupta altı sıçan olacak şekilde (n=6) dört gruba ayrıldı. Gruplar ve yapılan uygulamalar aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Yapılan literatür araştırması ve doz-cevap çalışmaları sonucuna göre belirlenen dozlarda 1 hafta boyunca günlük taze olarak hazırlanan nikotinamid (100 mg/kg, serum fizyolojik ile hazırlandı) (Bayrakdar vd., 2014) ve bexarotene (0.1 mg/kg, %1'lik DMSO ile hazırlandı) (Tunctan vd., 2018) intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Uygulama yapılan

hayvanlar çalışma süresince polikarbon ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş tekli kafeslerde tutuldu.

- **Kontrol Grubu:** Bu gruptaki deney hayvanlarına 1 hafta boyunca günde 1 defa olacak şekilde 0.5ml serum fizyolojik enjeksiyonu i.p. olarak uygulanmıştır.
- **DMSO Grubu:** Bu gruptaki deney hayvanlarına 1 hafta boyunca günde 1 defa olacak şekilde 0.5ml %1'lik DMSO enjeksiyonu i.p. olarak uygulanmıştır.
- **Nikotinamid Grubu:** Bu gruptaki deney hayvanlarına 1 hafta boyunca günde 1 defa olacak şekilde 0.5ml 100 mg/kg nikotinamid enjeksiyonu i.p. olarak uygulanmıştır.
- **Bexarotene Grubu:** Bu gruptaki deney hayvanlarına 1 hafta boyunca günde 1 defa olacak şekilde 0.5ml 0.1 mg/kg bexarotene enjeksiyonu i.p. olarak uygulanmıştır.

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Deney gruplarındaki hayvanlara yedinci günün sonunda intramuskular olarak 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi uygulandı. Anestezisi altındaki hayvanlardan intrakardiyak olarak kalpten tüm kanın alınması ile yaşamları sonlandırıldı ve dekapite edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Total beyin ağırlıkları alındıktan sonra serebral korteks bölgeleri buz üstünde disekte edildi. Beyin dokusu örnekleri deney gününe kadar -80°C'de saklandı.

Kalpten alınan kan, biyokimyasal analizlerin yapılması için jelli biyokimya tüplerine alındı. Alınan kan örnekleri MSE Mistral 2000 marka ve model santrifüj cihazında 10 dk 3000 rpm'de santrifüjlenerek serumlar elde edildi. Serum örnekleri polietilen tüplere aktarılarak analiz süresine kadar -80 °C'deki derin dondurucuda saklandı. Alınan kan örneklerinden elde edilen serumda, böbrek fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri, lipit profili ve elektrolit düzeylerinin belirlenmesi için glukoz, kan üre azotu (BUN), kreatinin (CREA), ürik asit (UA), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gama glutamil transferaz (GGT), trigliserit (Trigl),

total kolesterol (TC), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), sodyum (Na) ve potasyum (K) ölçümleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda Rosche COBAS C501 marka otoanalizör ile yapıldı.

3.4.2. *İn vitro* deneyler

İn vitro nörodejenerasyon oluşturmak amacıyla kullanılacak olan sinaptozomal fraksiyonlar, nörodejeneratif hasar ve oksidatif strese daha duyarlı olan sıçanların beyin serebral korteks bölgesinden izole edildi. Çünkü, AD hastalarında A β , beyinin plaku mezensefalon, alt beyin sapı ve serebellar korteks bölgelerinde yoğun bir şekilde birikmektedir (Rovelet-Lecrux vd., 2006). Sinaptozomlar 3 farklı izolasyon yöntemiyle elde edildi. Böylece sinaptozom izolasyonunda sıklıkla kullanılan 3 yöntemin metodolojik karşılaştırılması ile izolasyon yöntemlerinden hangisinin daha etkili veya verimli olduğuna karar verildi.

3.4.2.1. *Whittaker* yöntemi

Sinaptozomal fraksiyonların izolasyonu için Whittaker vd. (1964) uygulandığı yöntemin modifiye edilmiş hali kullanıldı. Sinaptozomal fraksiyonun eldesi için korteks bölgelerinin tartımı yapıldıktan sonra 1:10 (a/h) oranında olacak şekilde 0.32 mM sükröz ve 10 mM 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansülfonik asit (HEPES) içerisinde 1500 rpm'de homojenize edildi. Homojenat +4°C'de 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısmı alındı. Süpernatant 1:10 (h/h) oranında 0.32 mM ve 10 mM HEPES içerisinde +4°C'de 15000xg'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı atıldı. Geriye kalan sinaptozomca zengin pellet kısmı 2ml'lik yapay serebrospinal sıvı (CSF; 116mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.9 mM MgCl₂, 0.9 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1.8 mM CaCl₂ ve 10 mM glukoz, pH 7.2) içinde resüspanse edilerek +4°C'de saklandı.

0.32 mM sükröz çözeltisi: 0.01 g sükröz tartılıp 100 ml distile saf suda çözündürülür.

10 mM HEPES: 2.38 g sükröz tartılıp 100 ml distile saf suda çözündürülür.

Yapay serebrospinal sıvı: 0,7 g NaCl (116mM), 0,4 g KCl (5,4 mM), 0,008 g MgCl₂ (0,9 mM), 0,01 g NaH₂PO₄ (0,9 mM), 0,2 g NaHCO₃ (25 mM), 0,02 g CaCl₂ (1,8 mM) ve 0,2 g glukoz (10 mM) artılıp 100 ml distile saf suda çözdürülür.

3.4.2.2. Percoll gradient yöntemi

Percoll, 17 nm çapında polivinil pirolidon kaplı silika parçacıklarının koloidal bir süspansiyonudur. Hücresel organellerin izolasyonu için geliştiren Percoll'un 2 büyük avantajı vardır: (i) hızlı sedimantasyona ve daha düşük merkezkaç kuvvetlerinin kullanılmasına izin veren düşük viskoziteye sahiptir ve (ii) ozmolariteyi korumak için izotonik çözelti içinde hazırlanabilir.

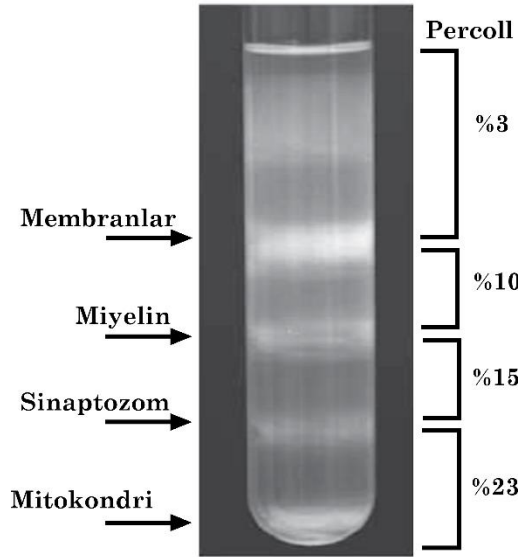
Percoll gradient çözeltileri Tablo 3.1'de gösterildiği gibi buz üzerinde polikarbonat santrifüj tüpünde hazırlandı. İlk olarak 2 ml %23 Percoll gradient tamponu eklendi. Daha sonra, bunun üzerine 45°'lik açı ile bir pipetör yardımıyla yavaşça 2 ml %15 Percoll gradient tamponu, ardından 2 ml %10 Percoll gradient tamponu ve son olarak 2 ml %3 Percoll gradient tamponu eklendi. Böylece 4 adımda süreksiz Percoll gradienti hazırlandı.

Tablo 3.1 Percoll gradient çözeltilerinin hazırlanması

	Percoll (ml)	Gradient tamponu (ml)	50 mM DTT (µl)	Su hacmi (ml)
%3 Percoll	0.75	6.25	125	17.875
%10 Percoll	2.50	6.25	125	16.125
%15 Percoll	3.75	6.25	125	14.875
%23 Percoll	5.75	6.25	125	12.875

Sıçan korteks bölgeleri 1:10 (a/h) oranında, +4°C'deki homojenat tamponu (0,32 M sükröz çözeltisi, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA ve 1mM DTT, pH 7,4)

içerisinde 800 rpm'de homojenize edildi. Homojenatlar +4°C'de 10 dakika boyunca 3000xg'de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak yeniden 1:10 (h/h) oranında homojenat tamponu içerisinde ikinci kez +4°C'de 20 dakika 14000xg'de santrifüj edildi. Bu işlemden sonra 2 ml süpernatant alınarak 1 ml/dk olacak şekilde Percoll gradient tüpü üzerine yavaş ve dikkatli bir şekilde aktarıldı. Ardından, Percoll gradient tüpü +4°C'de 5 dakika boyunca 31000xg'de santrifüj edildi ve Şekil 3.1'de görülen hücresel yapılar, Percoll gradientinin birbirini izleyen tabakaları arasında birbirinden ayrılması sağlanmış oldu. Percoll gradient tüpündeki %23 Percoll ve %15 Percoll tabakaları arasında bulunan sinaptozomları toplamak için 5 ml pastör pipeti yardımıyla üst tabaklar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Sinaptozomal fraksiyon buz üzerindeki boş bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerinde 10 katı kadar sükröz/EDTA tamponu eklenerek +4°C'de 30 dakika boyunca 20000xg'de santrifüj edildi. Elde edilen pellet daha sonraki deneyler için gereken konsantrasyona kadar yavaşça yeniden Krebs tamponu ile süspanse hale getirildi ve +4°C'de saklandı.



Şekil 3.1 Homojenize beyin dokusunun süreksiz Percoll gradient yardımıyla fraksiyonlara ayrılması (Dunkley, Jarvie, & Robinson, 2008).

Homojenat tamponu: 10.95 g sükröz, 0.6 Tris, 0.08 g EGTA ve 0.01 g ditiyotreitöl 70 ml distile su içerisinde çözülür ve üzerine azar azar HCl eklenerek pH 7.4'ye ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanır.

Gradient tamponu (1.28 M sükröz, 4 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4): 43.18 g sükröz, 0.1 g EDTA ve 0.24 g Tris 70 ml distile suda çözülür ve üzerine azar azar HCl eklenerek pH 7.4'ye ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanır.

DTT çözeltisi: 0.7 g DTT 100 ml distile suda çözülür.

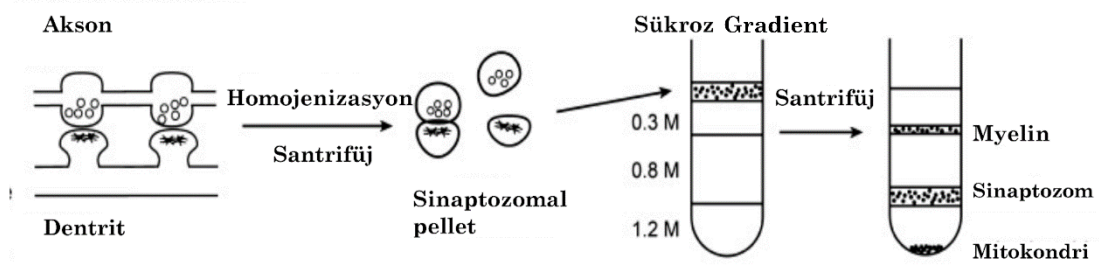
Sükröz/EDTA tamponu (0.32 M Sükröz, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4) 10 ml gradient tamponunu distile su ile 40 ml'ye seyreltilir.

Krebs tamponu (pH=7.6): 7 g NaCl (120 mM), 0.36 g KCl (4.8 mM), 0.1 mg CaCl₂ (1.3 mM), 0.3 g MgSO₄.7H₂O (1.2 mM), 0.16 g KH₂PO₄ (1.2 mM), 2.1 g NaHCO₃ (25 mM), 1.1 g glukoz (6 mM) tartılıp 100 ml distile suda çözülür.

3.4.2.3. Sükröz gradient yöntemi

Polikarbonat santrifüj tüpünde sırasıyla 3 ml 1.2 M, 3ml 0.8 M ve 3 ml 0.3 M sükröz çözeltileri pipetör yardımıyla 45° 'lik açı ile yavaş bir şekilde eklenerek 3 adımda sükröz gradienti hazırlandı (Tenreiro vd., 2017).

Sıçan korteks bölgeleri 1:10 (a/h) oranında +4°C'deki 0.5 M HEPES (pH 7.4) içerisinde 1000 rpm'de homojenize edildi. Homojenatlar +4°C'de 20 dakika boyunca 1400xg'de santrifüj edildi ve pellet atılarak süpernatant 1:10 (h/h) oranında solüsyon A ile resüspanse edildi ve ardından +4°C'de 10 dakika 32000xg'de santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldı. Ardından pellet, solüsyon B içinde 1:10 (a/h) oranında resüspanse edildi. 2 ml süspansiyon sükröz gradienti üzerine eklenerek +4°C'de 60 dakika 82000xg'de santrifüj edildi. 0.8 M ve 1.2 M sükröz tabakaları arasındaki sinaptosomal fraksiyon (Şekil 3.2) 5 ml pastör pipeti yardımıyla toplanarak 1 mM NaHCO₃ ile resüspanse edildi ve +4°C'de saklandı.



Şekil 3.2 Sükroz gradient ile sinaptozomların saflaştırılması

0.5 M HEPES çözeltisi: 11.9 g HEPES 70 ml distile su içerisinde çözülür ve üzerine azar azar 100 ml içerisinde 2.8 g çözülerek hazırlanmış 0.5 M KOH eklenerek pH 7.4'ye ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanır.

Solüsyon A: 10.9 g sükroz (0.32 M), 0.01 g $MgCl_2$ (1 mM), 0.0005 g $CaCl_2$ (0.5 mM), 0.008 g $NaHCO_3$ (1 mM) 100 ml distile su içerisinde çözdürülür.

Solüsyon B (0.32 M sükroz, 1 mM $NaHCO_3$). 10.9 g sükroz ve 0.008 g $NaHCO_3$ (1 mM) 100 ml distile su içerisinde çözdürülür.

3.5. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analizi

Transmisyon elektron mikroskopik (TEM) analizi, 3 farklı yöntemle izole edilmiş sinaptozomlardaki morfolojik farklılıkları belirlemek için yapılmıştır. Süspansiyon haldeki sinaptozomlar, 30 dakika boyunca 9000xg'de santrifüjlendi, süpernatant atıldı ve elde edilen pellet, oda sıcaklığında 2 saat boyunca %2.5 glutaraldehyd ile sabitlendi. Daha sonra sinaptozomlar, 10 dakika boyunca 16000xg'de santrifüjlendi. Pelletler 2 kez 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ile yıkandı ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca %1 OsO_4 içinde sabitlendi. Ardından, sinaptozomlar 4 saat boyunca uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı ve %75, %85, %90 ve %96'lık artan etanol konsantrasyonları ile dehidre edildi. Son olarak, epon reçinesine gömüldü ve ultramikrotomda 100-200 nm'lik kesitler alınarak JEOL JEM 1220 transmisyon elektron mikroskopunda fotoğraflandı.

Fosfat tamponu (0.1 M, pH:7.4): 3.4 gram KH_2PO_4 tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. 4.35 gram K_2HPO_4 tartılır ve 250 ml distile suda çözülür. K_2HPO_4 üzerine azar azar KH_2PO_4 eklenmesiyle pH'sı 7.4'e ayarlanır.

%1 OsO₄ çözeltisi: 1 g OsO₄ 100 ml distile suda çözündürülür.

%2.5 glutaraldehid çözeltisi: 10 ml %25'lik glutaraldehid çözeltisinden alınarak 100 ml tamamlanır.

3.6. A β (1-42) Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve MTT Analizi

Uygulama öncesi 5, 10, 20 ve 40 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde distile suda çözündürülerek hazırlanan A β (1-42) çözeltileri oda sıcaklığında 24 saat boyunca inkübe edilerek fibrile olması sağlanmıştır. En etkili izolasyon yönteminin belirlenmesinde sonra, in vitro nörodejenerasyon modelini oluşturmada en uygun A β (1-42) konsantrasyonunu belirlemek için kontrol grubuna ait sinaptozomlar, belirlenen A β (1-42) konsantrasyonları ile 6 saat 37°C'de inkübe edildi. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur:

- **Kontrol Grubu:** Kontrol grubu sinaptozomları + distile su
- **5 μ M A β (1-42) Grubu:** Kontrol grubu sinaptozomları + 5 μ M A β (1-42)
- **10 μ M A β (1-42) Grubu:** Kontrol grubu sinaptozomları + 10 μ M A β (1-42)
- **20 μ M A β (1-42) Grubu:** Kontrol grubu sinaptozomları + 20 μ M A β (1-42)
- **40 μ M A β (1-42) Grubu:** Kontrol grubu sinaptozomları + 40 μ M A β (1-42)

MTT analizi, hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan bir kolorimetrik analizdir. MTT, pozitif bir yük ve güçlü bir membran geçirgenliği olan hidrojen iyonlarının alıcısı olan bir boyadır. MTT canlı hücrelere girdiğinde, mitokondriyal süksinat dehidrojenaz tarafından MTT koyu mavi renkli formazan kristallerine indirgenir. Formazan kristali hücre zarı geçirgenliğine sahip olmadığından canlı hücrelerde kalıcı olarak korunacak ve canlı hücreleri renklendirecektir. Öte yandan ölü hücreler, mitokondriyal aktiviteye ve seçici geçirgen bir zara sahip olmadığından, MTT'yi formazan kristaline indirgeyemezler. Belirlenen konsantrasyonlardaki

A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlardaki mitokondriyal aktivite MTT ELISA kiti (IS074 Cloud-Clone Corp.) kullanılarak belirlendi. ELISA analizi kit protokolleri takip edilerek gerçekleştirildi.

3.6.1. Çalışma prosedürü

MTT analizinde 96'lık steril plakalar kullanıldı. Her kuyucuğa MTT çözeltisinin (5 mg/ml) 10 μ l'sine 1 mg/ml toplam proteine eşdeğer 100 μ l sinaptozom ilave edildi. Daha sonra örnekler, karanlık ortamda 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Formazan kristallerinin çözündürülmesi için 100 μ l DMSO eklendi ve 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ardından, plakalardaki renk değişikliği 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucuda spektrofotometrik olarak optik dansiteleri okundu. Sonuçlar, kontrolün yüzdesi olarak ifade edildi.

3.7. Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması ve Biyokimyasal Analizler

İn vitro nörodejenerasyon modelini oluşturmak amacıyla 10 μ M A β (1-42) konsantrasyonu; kontrol, DMSO, bexarotene ve nikotinamid gruplarına ait sinaptozomlarla 37°C'de 6 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında sinaptozomlardaki TAS, TOS, CASP3, Cyt c, SIRT1, PPAR γ ve PARP1 parametreleri rat spesifik ELISA kitleri (sırasıyla katalog no: RL0017, RL0024, SEA626Ra, SEA594Ra, SEE912Ra, SEA886Ra ve LS-F27548) kullanılarak belirlendi. ELISA analizi kit protokolleri takip edilerek gerçekleştirildi.

3.7.1. TAS ve TOS seviyelerinin belirlenmesi

Sinaptozomlardaki TAS seviyeleri, renkli 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonatın (ABTS) antioksidanlar tarafından renksiz ABTS formuna indirgenmesi esasına göre belirlendi. TAS ölçüm prosedüründe, antikor ile kaplanmamış streil plakalar kullanıldı. Standart, kör ve numunelerin her biri plakalardaki uygun kuyucuklara 18 μ l eklendi. Her bir kuyucuğa 300 μ l reaktif 1 eklendikten sonra meydana gelen karışımın ilk absorban değeri 660 nm'de belirlendi. Daha sonra her bir kuyucuğa 45 μ l reaktif 2 eklendi ve 5 dk

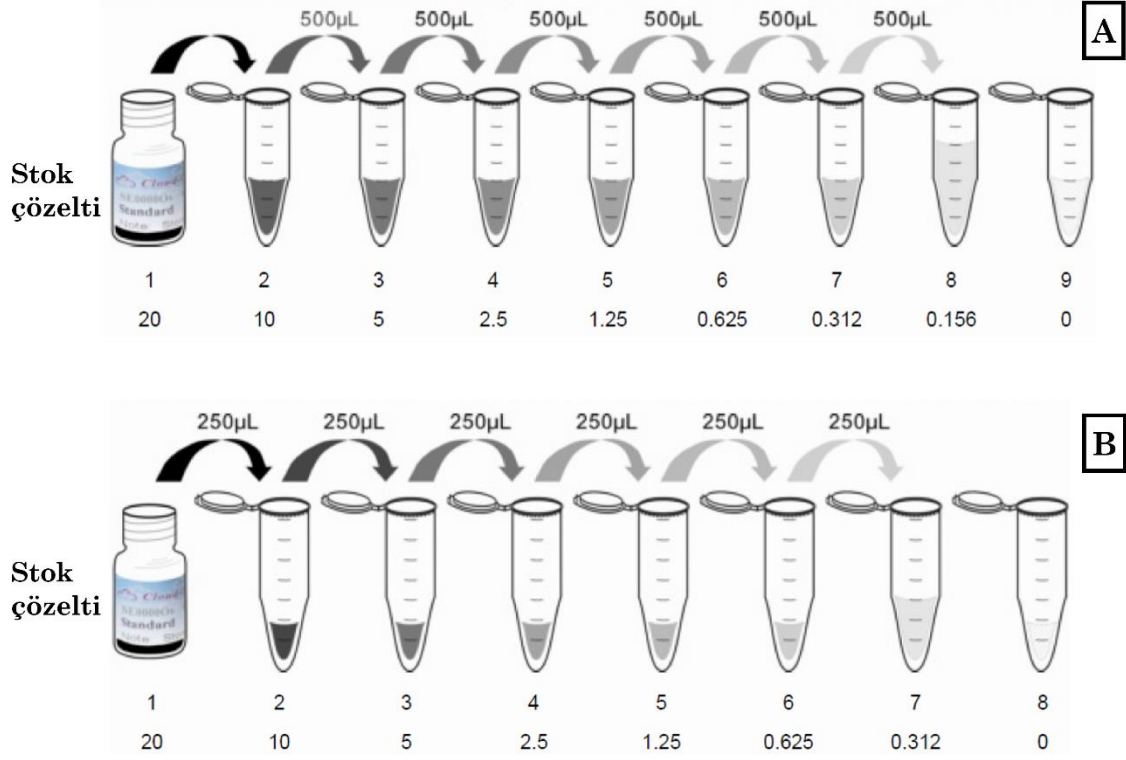
37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası son absorbans değerleri 660 nm'de okunarak kaydedildi. Sonuçlar mmol Trolox Equiv/mg protein olarak ifade edildi.

Sinaptozomlardaki TOS seviyeleri, ortamdaki oksidanlar tarafından ferröz demirin ferrik demire oksidasyonu esasına göre belirlendi. TOS ölçüm prosedüründe, antikor ile kaplanmamış streil plakalar kullanıldı. Standart, kör ve numunelerin her biri plakalardaki uygun kuyucuklara 45 µl eklendi. Her kuyucuğa 300 µl reaktif 1 eklendikten sonra meydana gelen karışımın ilk absorbans değeri 530 nm'de belirlendi. Daha sonra her kuyucuğa 15 µl reaktif 2 eklendi ve 5 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası son absorbans değerleri 530 nm'de okunarak kaydedildi. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.2. CASP3, Cyt c, SIRT1 ve PPARγ ve PARP1 için reaktiflerin hazırlanması ve çalışma prosedürü

Çalışma öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına (25°C) getirildi. 20 ml yıkama solüsyonu konsantrasyonunu (30x) 580 ml distile suyla seyreltilerek 600 ml yıkama solüsyonu hazırlandı. Biotin konjuge antikor ve avidin konjüğe yabanturbu peroksidaz (HRP) 1:100 oranında seyreltilerek hazırlandı.

CASP3, Cyt c, SIRT1 ve PPARγ ölçümü için kit içerisindeki standartlar, 1 ml standart dilüsyon ile sulandırılıp hafifçe karıştırılarak hazırlandı. Stok çözeltisindeki standardın konsantrasyonu 20 ng/ml idi. İlk olarak, stok çözeltisi 10 ng/ml'ye seyreltildi. Ardından, 500 µl standart dilüsyon (SIRT1 için 250 µl) içeren 1.5 ml'lik 8 tüp (SIRT1 için 7 tüp) hazırlanır ve Şekil 3.3'ki gibi seyreltme serisi oluşturmak için seyreltilmiş standart kullanılır. Standart dilüsyonun 0 ng/ml olduğu son tüp kör olarak kullanıldı.



Şekil 3.3 CASP3, Cyt c, PPAR γ ve SIRT1 standartlarının hazırlanışı. A: CASP3, Cyt c ve PPAR γ için dilüsyon serileri. B: SIRT1 için dilüsyon serileri

Her kitle yer alan spesifik antikorla kalanmış plakalar kullanıldı. Standart dilüsyonlar, kör ve numunelerin her biri plakalardaki uygun kuyucuklara 100 μ L eklendi ve adhezif film ile kaplanarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklar boşaltıldı. Hazırlanan biyotin konjüge antikor çözeltisinden 100 μ l eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Sonra, hazırlanan yıkama solüsyonu ile 3 kez 350 μ l'lik yıkama işlemi ve aspirasyon gerçekleştirildi. Hazırlanan avidin konjüge HRP çözeltisinden 100 μ l eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Aspirasyon ve yıkama işlemi beş kez tekrar edildi. Her kuyucuğa 90 μ l substrat solüsyonu eklendi ve 37°C'de 15 dk ışıktan koruyarak inkübasyonu sağlandı. Substrat solüsyonu eklendiğinde kuyucukların mavi renge döndüğü gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu 50 μ l sülfirik asit solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. Plakalardaki renk değişikliği 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucuda spektrofotometrik olarak optik dansiteleri okundu ve standart grafiği yardımıyla numunelerdeki parametrelerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7.3. PARP1 çalışma reaktiflerinin hazırlanması ve çalışma prosedürü

Çalışma öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve 10 ml yıkama solüsyonu konsantranesini (100x) 990 ml distile suyla seyreltilerek 1000 ml yıkama solüsyonu hazırlandı ve 4°C'de saklandı. Biyotin konjuge antikor ve avidin konjüge yabanturbu peroksidaz (HRP) 1:100 oranında seyreltilerek hazırlandı. PARP1 ölçümü için kit içerisindeki standartlar hazır halde bulunduğundan ilave seri dilüsyonlar yapılmadı.

Kit içerisindeki plakanın her kuyucuğu, PARP1 özgü antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Standartlar, kör ve numunelerin her biri plakalardaki uygun kuyucuklara 50 µL eklendi ve adhezif film ile kaplanarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklar boşaltıldı. Hazırlanan biyotin konjüge antikor çözeltisinden 100 µl eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Sonra, hazırlanan yıkama solüsyonu ile 3 kez 350 µl'lik yıkama işlemi ve aspirasyon gerçekleştirildi. Hazırlanan avidin konjüge HRP çözeltisinden 100 µl eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Aspirasyon ve yıkama işlemi beş kez tekrar edildi. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu eklendi ve 37°C'de 15 dk ışıktan koruyarak inkübasyonu sağlandı. Substrat solüsyonu eklendiğinde kuyucukların sarı renge döndüğü gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. Plakalardaki renk değişikliği 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucuda spektrofotometrik olarak optik dansiteleri okundu ve standart grafiği yardımıyla numunelerdeki PARP1 konsantrasyonları hesaplandı.

3.7.4. Protein analizi

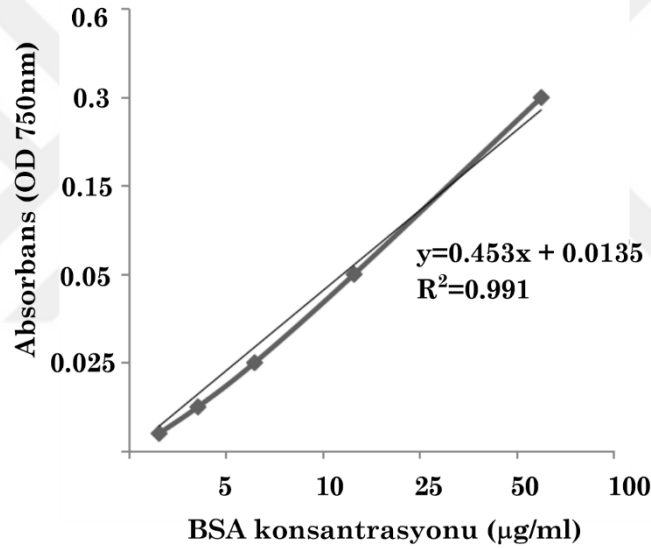
Sinaptozomlardaki protein miktarı Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall (1951) bildirdikleri yöntemle ölçülmüştür. Bu ölçümde, alkali ortamda önce peptid bağları bakır ile mavi-mor renkli bir kompleks oluşturur. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifinin eklenmesiyle protein yapısındaki tirozin ve triptofan aminoasitlerinin indirgenmesi renk oluşumuna katkıda bulunur.

Süspanse haldeki sinaptozomlara 1:5 (h/h) oranında alkali bakır çözeltisi eklenip 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında, üzerine

20 µl folin-ciocalteu çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat daha inkübe edildi. Protein miktarına bağlı oluşan renk yoğunluğu 750 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Tablo 3.2 Protein miktarının ölçümü ve standartların hazırlanması

	KÖR	NUMUNE	STANDARTLAR
Sinaptozom	-	40 µl	-
Standart	-	-	40 µl
Alkali bakır çözeltisi	200 µl	200 µl	200 µl
Folin-ciocalteu çözeltisi	20 µl	20 µl	20 µl
Distile su	40 µl	-	-



Şekil 3.4 Protein standart kalibrasyon eğrisi

Standartların Hazırlanması: Standart olarak Bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. 1 mg/ml stok çözelti hazırlanarak seri dilüsyonlar ile 100-50-25-10-5 µg/mL hacimde standartlar hazırlandı.

%2'lik sodyum karbonat çözeltisi: 2 g Na₂CO₃ tartılıp 100 ml 0.1 N NaOH içinde çözündürülür.

%2'lik sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 2 g KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O tartılıp distile suyla 100 ml'ye tamamlanır.

0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi: 0.4 g NaOH tartılıp distile suyla 100 ml'ye tamamlanır.

%1'lik bakır sülfat çözeltisi: 1 g CuSO₄ tartılıp distile suyla 100 ml'ye tamamlanır.

Alkali bakır çözeltisi: 100 ml %2'lik Na₂CO₃ çözeltisine 1 ml %2'lik sodyum potasyum tartarat ve 1 ml %1'lik CuSO₄ çözeltileri eklenerek günlük taze olarak hazırlandı.

Folin-ciocalteu fenol çözeltisi: Günlük taze olarak 1:1 oranında distile suyla seyreltilerek hazırlandı.

3.8. Histolojik Analiz

Tüm gruplarda dekapitasyonun hemen sonrasına beyin dokusu alınıp belirli bir kısım histolojik analizler için %10'luk nötral formaldehit içerisinde fiksasyon amacıyla koyuldu. Ardından, beynin dokuları %10 tamponlanmış nötralformaldehit solüsyonunda 24 saat süre ile bekletildi. Kimyasal fiksasyonu tamamlanan dokular etil alkol serisinde sırasıyla 1'er saat %70, %80, %90(1), %90(2), %96(1), %96(2) ve 30 dakika absöü etil alkolden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Kimyasal fiksasyonu tamamlanan dokular 30'ar dakika 2 kez ksilol uygulamasıyla dokuların şeffaflanması sağlandıktan sonra, dokular parafinizasyon için 60°C'deki etüvde 3 ayrı parafinde sırasıyla 30, 60 ve 90 dakika sürelerle bekletilerek bloklandı. Bu bloklardan standart hematoksilen-eosin (HE) boyama uygulaması yapılmak üzere kesit alışıını kolaylaştırmak amacıyla mikrotom bıçağı ve diğere malzemeler -20°C de soğutuldu.

Mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı ve su banyosunda parafin açılarak poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine kapatıldı. Kesitler 37°C etüvde 1 gece bekletildikten sonra ksilolde deparafinize edildi. Kesitler derecesi azalan etil alkol serilerinde hidratasyonu sağlanarak HE boyamaları yapıldı ve preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. HE ile boyanmış beyin kesitlerinde ışık mikroskobu düzeyinde histolojik incelemeleri yapıldı. Hazırlanan tüm doku kesitleri

Olympus marka, CH40 ışık mikroskopunda incelenerek Spot Insight marka 3.2.0. model dijital kamera ve Spot advanced, 4.0.6 version program yardımıyla fotoğraflandı.

3.8.1. Beyin dokusunda apoptotik hücrelerin belirlenmesi

TUNEL yöntemi, DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağladığı için doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Doku genelindeki apoptotik hücreleri belirlemek için ise TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yönteminden yararlanıldı. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalandıklarından, hücre içerisindeki kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH uç içeren DNA parçacıklarının sayısı artar. Hücrede terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biyotin işaretli dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biyotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları ışık mikroskopunda veya ortama floresans veren bir madde ile bağlanmış streptavidin eklendiğinde floresan mikroskopunda görünür hale gelirler. Beyin dokusundaki apoptotik hücrelerin analizi için ticari olarak satılan Apoptag Plus Peroxidase Tunel (Millipore S7101) kiti kullanıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, Kolmogorov-Simirnov ve Shapiro-Wilk normalite testleri kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Normal dağılım gösteren deney grupları arasındaki fark, tek yönlü varyans (One-Way ANOVA) analizi kullanılarak gösterildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilir. Analizler %5 anlam düzeyine göre yapılmış ve %5'ten düşük olasılık ($p < 0.05$) gösteren değerler arasındaki farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey ve Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel analiz SPSS Versiyon 21.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) ve Graphpad 7 Prism yazılım (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) programları kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Subakut Bexarotene ve Nikotinamidin Tedavisinin Kan Parametreleri Üzerindeki Etkisi

Her gruptaki 6 hayvandan elde edilen serum örneklerinin biyokimyasal ölçüm sonuçları normal dağılım gösterdiği içi veriler One-Way ANOVA ile analiz edildi ve ardından Tukey HSD testi ile gruplar karşılaştırıldı. Tüm deney gruplarına ait kan biyokimya analiz sonuçları Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Nikotinamid ve bexarotene'nin kan şekeri, ALT, AST ve GGT seviyeleri üzerindeki etkisi

Gruplar	Glukoz (mg/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)
Kontrol	79.3±2.1	84.7±2.1	276.4±4.2	1.6±0.2
DMSO	81.5±3.7	86.8±3.5	278.1±5.5	1.5±0.7
Nikotinamid	77.2±2.4	85.2±1.5	277.2±3.9	1.4±0.5
Bexarotene	80.1±2.4	86.1±3.7	278.6±5.5	1.6±0.4

Tablo 4.2 Nikotinamid ve bexarotene'nin lipit seviyeleri üzerindeki etkisi. *: Kontrole göre karşılaştırıldığında $p < 0.05$

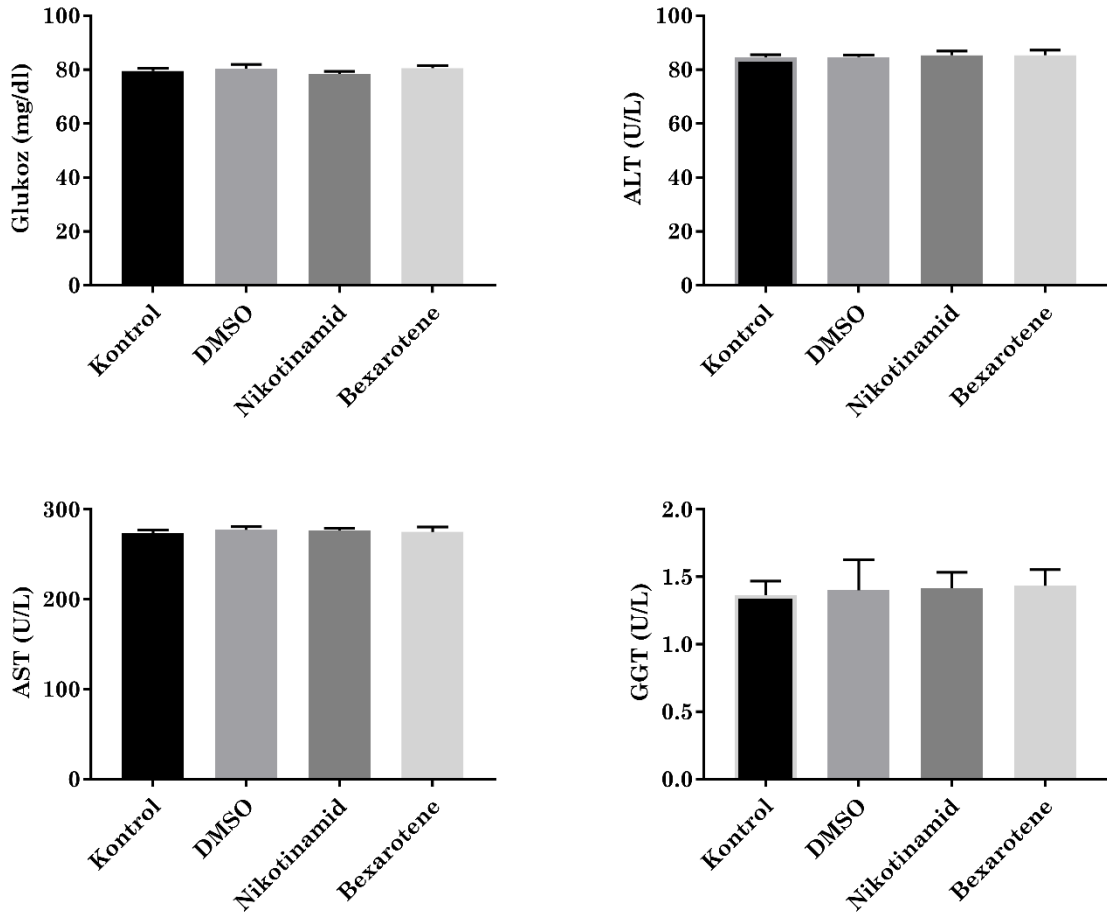
Gruplar	Trigl (mg/dl)	TC (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
Kontrol	48.5±2.2	55.1±2.6	7.4±1.5	36.4±1.2
DMSO	45.7±3.5	56.4±1.1	7.9±1.3	38.1±2.5
Nikotinamid	47.1±1.8	55.8±1.5	7.2±1.6	37.2±3.9
Bexarotene	52.1±1.6*	59.6±1.2*	8.8±1.5*	45.6±1.4*

Tablo 4.3 Nikotinamid ve bexarotene'nin BUN, CREA, UA ve kan elektrolit düzeyleri üzerindeki etkisi

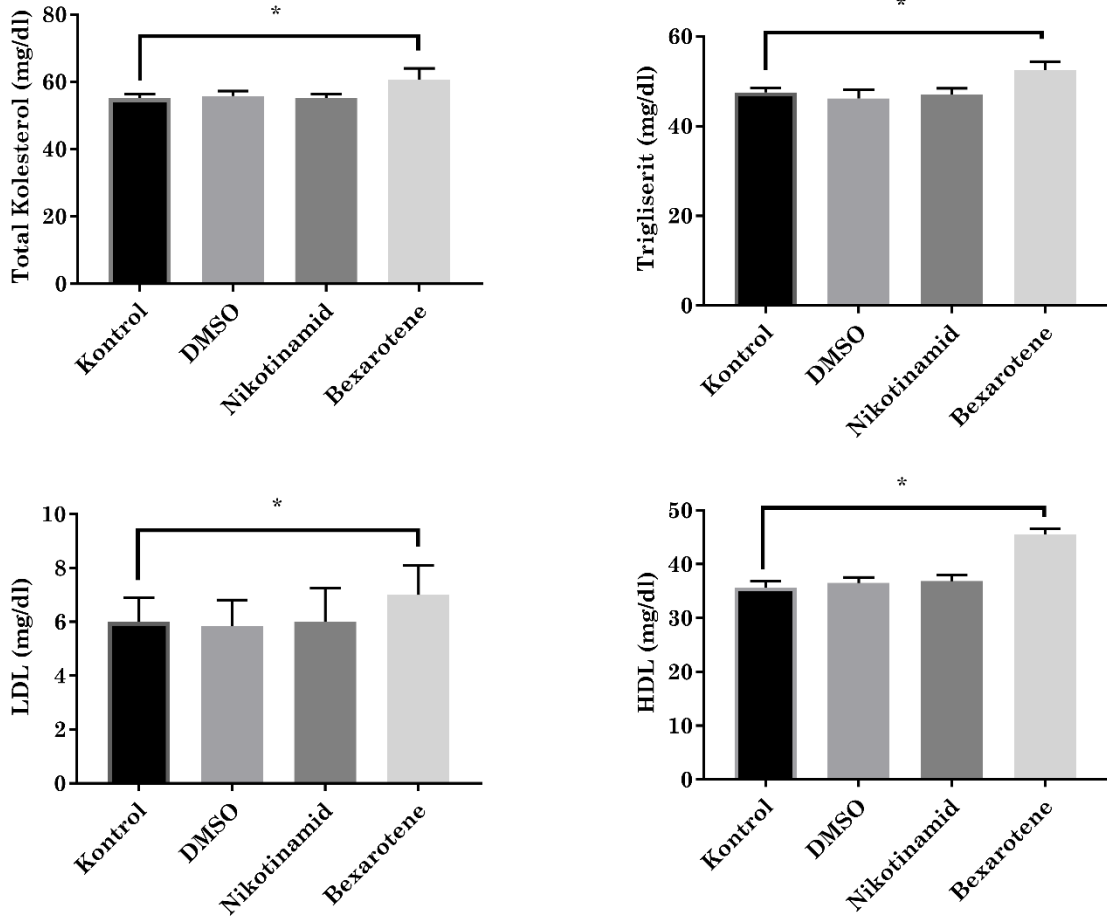
Gruplar	BUN (mg/dl)	CREA (mg/dl)	UA (mg/dl)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)
Kontrol	20.6 ±1.3	0.87 ±0.03	0.91 ±0.08	139 ±5.5	5.3 ±0.8
DMSO	21.5 ±1.1	0.87 ±0.06	0.90 ±0.03	138 ±6.1	5.5 ±0.3
Nikotinamid	20.2 ±1.5	0.86 ±0.05	0.91 ±0.05	140 ±3.7	5.1 ±0.6
Bexarotene	20.1 ±1.7	0.86 ±0.08	0.90 ±0.02	139 ±4.9	5.5 ±0.4

DMSO, nikotinamid ve bexarotene grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, glukoz, ALT, AST ve GGT seviyelerinde istatistiksel bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). Bexarotene grubunda Trigl,

TC, HDL ve LDL seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2).

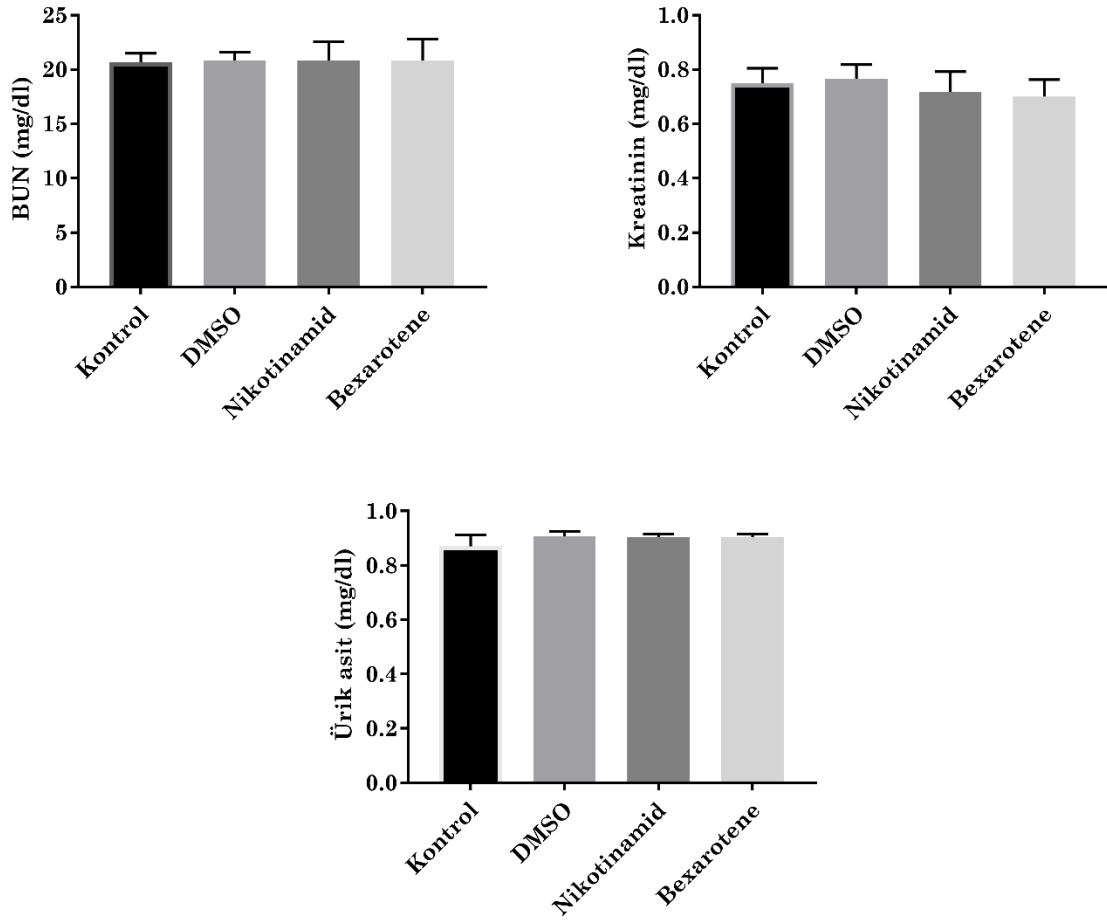


Şekil 4.1 Deney gruplarına ait kan şekeri, ALT, AST ve GGT seviyeleri



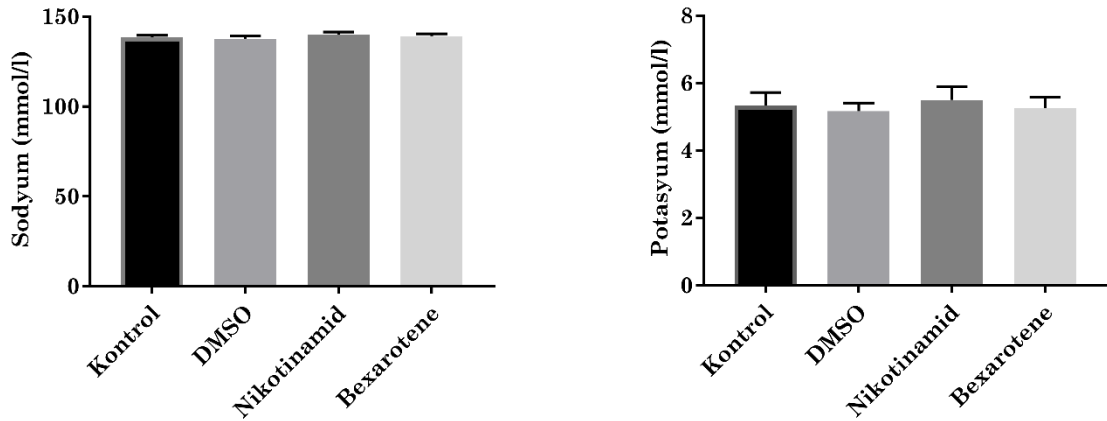
Şekil 4.2 Deney gruplarına ait total kolesterol, trigliserit, LDL ve HDL seviyeleri. *: Kontrolle karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, böbrek fonksiyonları değerlendirmek için ölçülen BUN, CREA ve UA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grupları arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).



Şekil 4.3 Deney gruplarına ait BUN, CREA ve UA seviyeleri

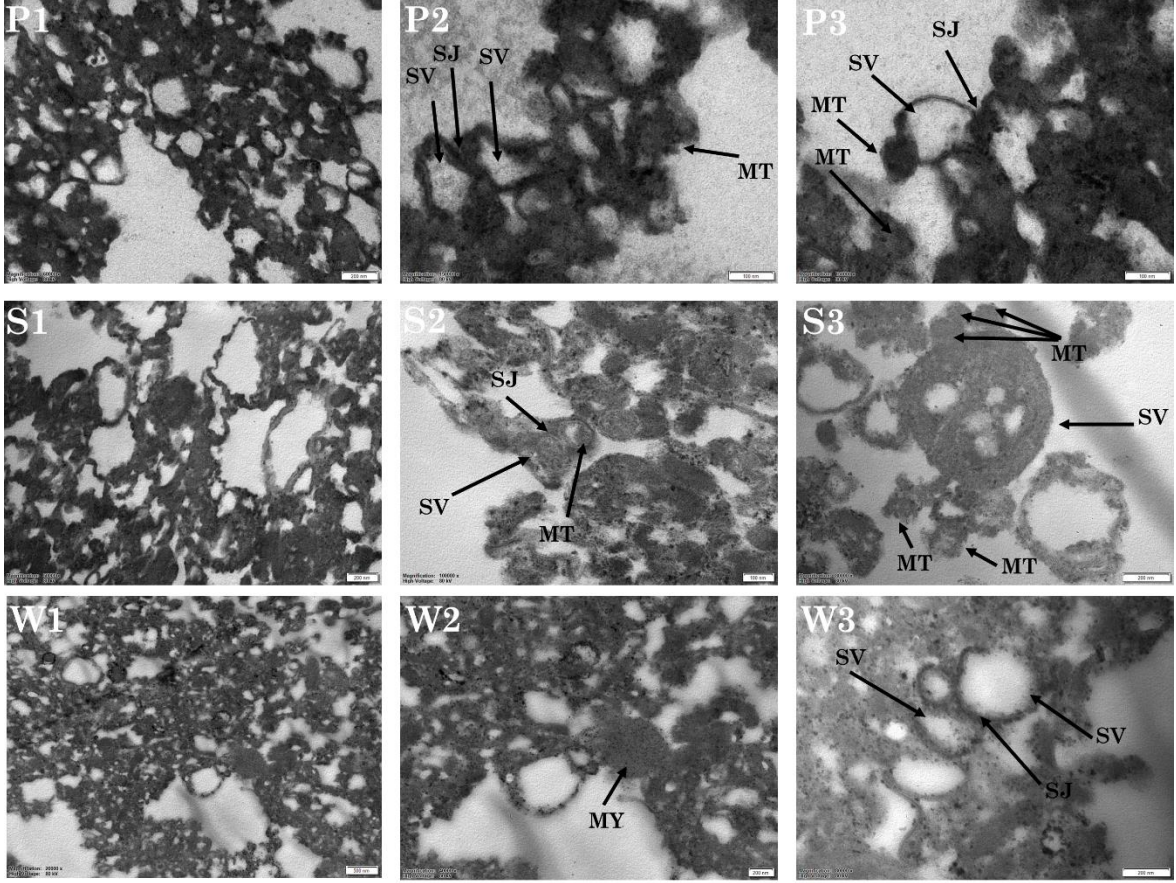
Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, serum elektrolit dengesini değerlendirmek için ölçülen Na ve K seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grupları arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).



Şekil 4.4 Deney gruplarına ait elektrolit seviyeleri

4.2. Sinaptozomal Fraksiyonların Morfolojik Değerlendirilmesi

Sinaptozomal fraksiyonların morfolojik özellikleri TEM ile değerlendirildi. Sinaptozomal fraksiyonların TEM analizinin sonuçları Şekil 4.5'te sunulmaktadır. Mikrograflarda görüldüğü gibi, sinaptozomlar 3 izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bununla birlikte, TEM görüntüleri detaylı bir şekilde incelendiğinde, sükröz gradient metodolojisi kullanılarak izole edilen sinaptozomlarda sinir terminallerinin yoğun ve düzgün morfolojiye sahip sinaptik veziküller (SV) içerdiği tespit edildi. Sinaptik bağlantı noktaları (SJ) tüm görüntülerde belirgindir, bu da izole edilen sinir terminallerinin işlevsel olduğunu gösteren ek bir göstergedir. Percoll gradient ve Whittaker yöntemi ile izole edilen sinaptozomların mitokondriyal içeriklerinin sükröz gradient yöntemine göre daha az olduğu görüldü. Sükröz gradient yöntemine göre izole edilen sinaptozomal fraksiyonlarda, SV ve SJ'lerin daha net organize morfolojik yapılara sahip olduğu belirlenmiştir. Percoll gradient yöntemine göre izole edilen sinaptozomlar düzgün SV yapıları göstermesine rağmen, SJ'ler sükröz gradient yöntemiyle izole edilen sinaptozomal fraksiyonlara göre daha az belirgindi. Whittaker yöntemine göre izole edilen sinaptozomlarda dağılmış veziküler yapılar ve serbest mitokondriyal yapılar tespit edilmiştir.



Şekil 4.5 Sinaptozom fraksiyonlarının elektron mikrografları. P 1-3: Percoll gradient görüntüleri; S 1-3: Sükröz gradient görüntüleri; W 1-3: Whittaker görüntüleri; SV: Sinaptik vezikül, SJ: Sinaptik bağlantı noktası; MT: Mitokondri; MY: Miyelin membran

Elektron mikroskobu ile kantitatif değerlendirildiğinde, her 3 yöntemle izole edilen sinaptozomların tanımlanabilecek yapılara sahip olduğu doğrulanmış ve 3 izolasyon yöntemine ait 20'şer adet mikrograftaki SV, SJ, mitokondri ve lameller miyelin yapılar rakamlarla tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Sıçan beyninden farklı izolasyon yöntemleriyle elde edilen sinaptozomal fraksiyonların sinaptik vezikül, sinaptik bağlantı noktası, mitokondri ve miyelin içerikleri bakımından değerlendirilmesi

	Sinaptik veziküller	Mitokondri	Miyelin	Mikrograf sayısı
Whittaker	28.5±1.2	2.7±0.3	4.8±0.6	20
Percoll gradient	32.9±2.5	4.5±1.2	1.3±0.1	20
Sükroz gradient	41.5±3.3	6.1±0.5	0.5±0.02	20

Whittaker mikrograflarındaki miyelin membran parçalarının oranı, Percoll gradient ve sükroz gradient yöntemlerine göre sırasıyla %63 ve %89.6 daha fazla olduğu bulunmuştur. Sükroz gradient yöntemiyle elde edilen sinaptozomlardaki mitokondri oranı (serbest olmayan), Whittaker yöntemine göre %55.6 ve Percoll gradient yöntemine göre %26.3 daha fazladır. Ayrıca, SV yoğunlukları sükroz gradient yönteminde, Whittaker ve Percoll gradient yöntemlerine göre sırasıyla %31.4 ve %20.8 daha fazladır. Bu bulgulara göre, 3 farklı izolasyon yönteminden sükroz gradient yönteminin diğer izolasyon yöntemlerine göre daha efektif olduğuna karar verilmiştir.

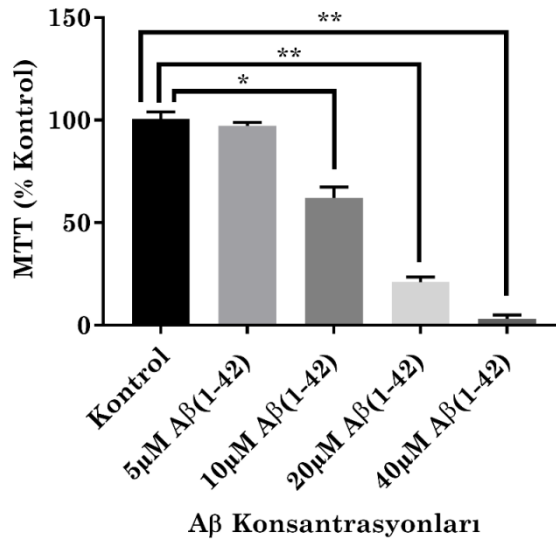
4.3. İn vitro Nörodejenerasyonda Kullanılan A β (1-42) Konsantrasyonu ve MTT Analizi

Sükroz gradient yöntemine göre izole edilen kontrol grubuna ait sinaptozomlar 0, 5, 10, 20 and 40 μ M konsantrasyonlarda A β (1-42) ile 37°C'de 6 saat boyunca inkübe edildi. A β (1-42)'nin sinaptozomlar üzerindeki etkin dozunu belirleyebilmek için MTT testi kullanıldı ve sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5 A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlara ait MTT değerlerinin kontrol grubuna göre yüzdesel değişimleri. * p<0.05; ** p<0.01

MTT Değerleri		
	Absorbans Değerleri	% Kontrol
Kontrol	0.280±0.005	100±1.03
5 μM Aβ (1-42)	0.275±0.003	98.6±5.6
10 μM Aβ (1-42)	0.174±0.008	62.5±6.2*
20 μM Aβ (1-42)	0.061±0.004	21.3±4.7**
40 μM Aβ (1-42)	0.005±0.002	2.4±0.8**

Şekil 4.6'te görüldüğü gibi, MTT test sonuçlarına göre 0, 5, 10, 20 ve 40 μ M A β (1-42) sinaptozomlardaki mitokondriyal aktiviteyi sırasıyla %2, %38, %79 ve %98 oranında azaltmıştır.



Şekil 4.6 A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlara ait MTT değerlerinin kontrol grubuna göre yüzdesel değişimleri. * p<0.05; ** p<0.01

5 µM Aβ (1-42) uygulamasının MTT sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemesi; 20 ve 40 µM Aβ (1-42) konsantrasyonlarının sinaptozomlardaki mitokondriyal aktiviteyi %75'den daha fazla düşürmesinden dolayı bu konsantrasyonlar sonraki deneylerde kullanılmamıştır. Çünkü mitokondriyal aktivitenin %50'den fazla düşmesi, sonuçların doğru bir şekilde yorumlanmasını etkileyecekti. Böylece, nikotinamid ve bexarotene'nin koruyucu etkilerini araştırmada 10 µM Aβ (1-42) konsantrasyonunun uygulanmasına karar verilmiştir.

4.4. Nikotinamid ve Bexarotene'nin Aβ (1-42) İnkübe Edilmiş Sinaptozomlar Üzerindeki Etkileri

Kontrol, DMSO, nikotinamid ve bexarotene gruplarına ait sükröz gradient yöntemiyle izole edilmiş sinaptozomlarda in vitro nörodejenerasyon modeli oluşturmak amacıyla 10 µM Aβ (1-42) konsantrasyonuyla 37°C'de 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur:

- Kontrol
- DMSO
- Nikotinamid
- Bexarotene
- 10 µM Aβ (1-42) + Kontrol
- 10 µM Aβ (1-42) + DMSO
- 10 µM Aβ (1-42) + Nikotinamid
- 10 µM Aβ (1-42) + Bexarotene

İnkübasyonun ardından sinaptozomlarda, TAS, TOS, CASP3, Cyt c, SIRT1, PPARγ ve PARP1 seviyeleri ölçülmüştür.

4.4.1. Antioksidan ve oksidatif mekanizmalara etkileri

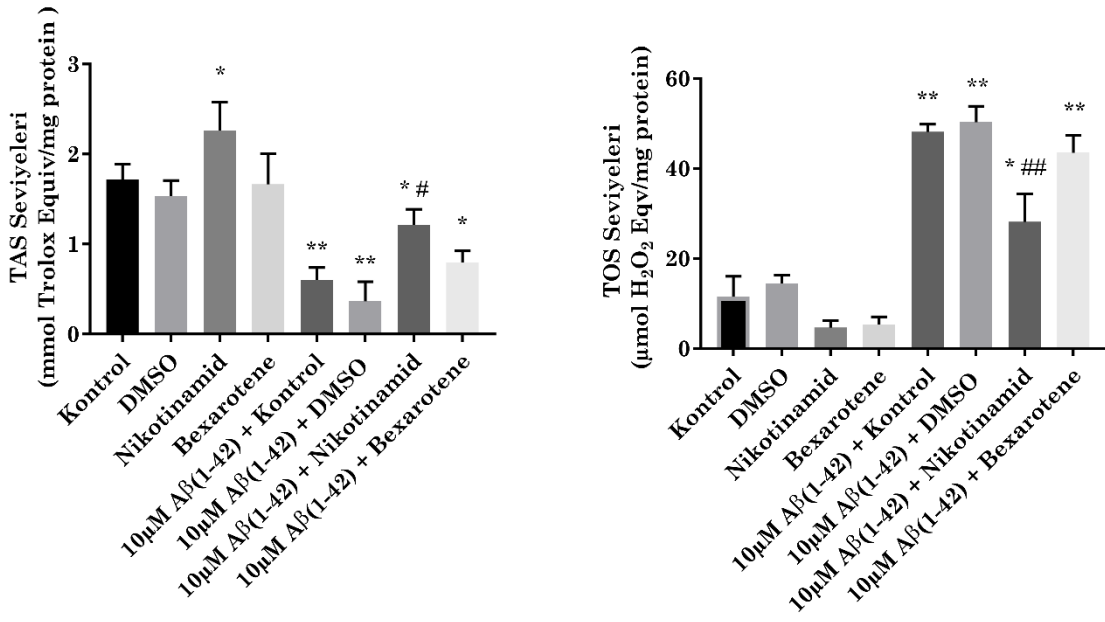
Deney gruplarında TAS ve TOS seviyeleri Tablo 4.6'te verilmiş olup, gruplar arasındaki farklar Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Aβ (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomların TAS ve TOS seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır.

A β (1-42) ile inkübe edilmeyen sinaptozomlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO ve bexarotene gruplarının TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmezken, nikotinamid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomların TAS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. 10 μ M A β (1-42) + Nikotinamid grubunun TAS seviyeleri, 10 μ M A β (1-42) + DMSO ve 10 μ M A β (1-42) + Bexarotene gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksekti ($p < 0.05$).



Tablo 4.6 A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin TAS ve TOS seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05 ##p <0.01

Gruplar	TAS (mmol Trolox Equiv/mg protein)	TOS (μmol H₂O₂ Eqv/mg protein)
Kontrol	1.85 \pm 0.27	10.61 \pm 2.56
DMSO	1.52 \pm 0.34	14.84 \pm 1.93
Nikotinamid	2.93 \pm 1.25*	6.74 \pm 1.08
Bexarotene	1.77 \pm 0.42	8.35 \pm 2.14
10 μM Aβ (1-42) + Kontrol	0.62 \pm 0.37 **	48.01 \pm 4.75 **
10 μM Aβ (1-42) + DMSO	0.75 \pm 0.26 **	51.87 \pm 6.92 **
10 μM Aβ (1-42) + Nikotinamid	1.36 \pm 0.28 * #	33.94 \pm 4.75 * ##
10 μM Aβ (1-42) + Bexarotene	0.82 \pm 0.35 * #	45.68 \pm 5.21 **



Şekil 4.7 Aβ (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin TAS ve TOS seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 µM Aβ (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05 ##p <0.01

Aβ (1-42) ile inkübe edilen gruplardaki TOS seviyeleri; kontrol, DMSO, nikotinamid ve bexarotene gruplarına göre istatistiksel olarak ileri düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. En yüksek TOS seviyeleri 10 µM Aβ (1-42) + DMSO grubunda olduğu bulunmuştur (p<0.01). 10 µM Aβ (1-42) + Nikotinamid grubunun TOS seviyeleri, 10 µM Aβ (1-42) + DMSO ve 10 µM Aβ (1-42) + Bexarotene gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha düşüktü.

4.4.2. Apoptotik mekanizmalara etkileri

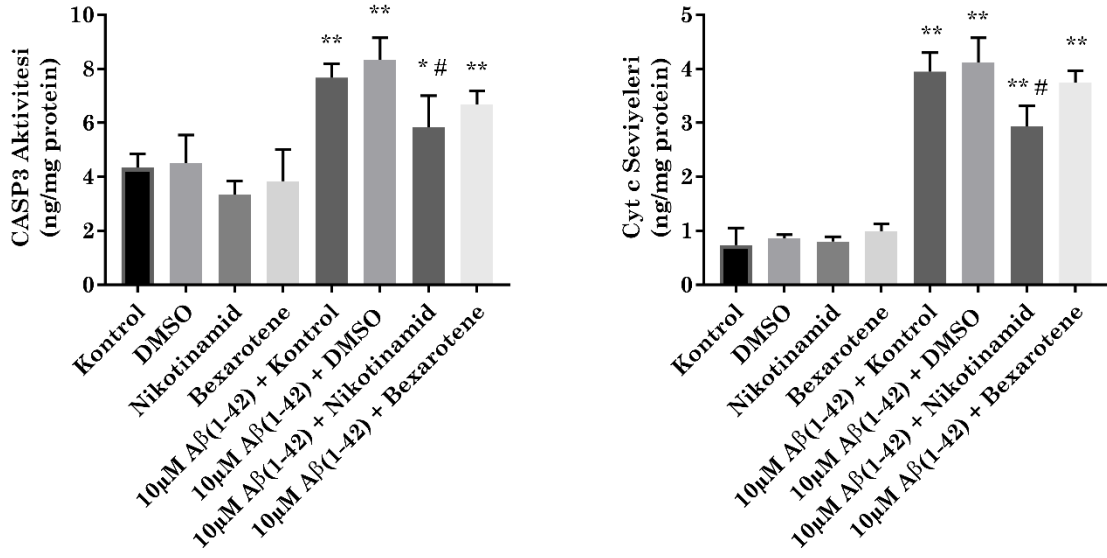
Aβ (1-42) ile inkübe edilen ve edilmeyen gruplarda CASP3 ve Cyt c değerleri Tablo 4.7'da verilmiştir. Gruplar arasındaki farkları gösteren grafikler ise Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Aβ (1-42) ile inkübe edilmeyen sinaptozomlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO, nikotinamid ve bexarotene gruplarının CASP3 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi (p>0.05). Ancak, Aβ (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomların CASP3 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. 10 µM Aβ (1-42) + Nikotinamid

grubunun CASP3 seviyeleri, 10 µM Aβ (1-42) + DMSO ve 10 µM Aβ (1-42) + Bexarotene gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha düşüktü (p<0.05).

Tablo 4.7 Aβ (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin CASP3 ve Cyt c seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 µM Aβ (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05

Gruplar	CASP3 (ng/mg protein)	Cyt c (ng/mg protein)
Kontrol	4.67±0.41	0.83±0.07
DMSO	5.13±0.85	0.91±0.04
Nikotinamid	4.38±0.45	0.76±0.03
Bexarotene	4.95±0.74	0.97±0.04
10 µM Aβ (1-42) + Kontrol	7.36±0.61 **	4.16±0.22 **
10 µM Aβ (1-42) + DMSO	8.14±0.92 **	4.31±0.89 **
10 µM Aβ (1-42) + Nikotinamid	5.53±0.88 * #	3.47±0.35 ** #
10 µM Aβ (1-42) + Bexarotene	6.15±0.74 **	3.88±0.25 **



Şekil 4.8 Aβ (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin CASP3 ve Cyt c seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 μM Aβ (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05

Aβ (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlarda Cyt c seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. En yüksek Cyt c seviyeleri 10 μM Aβ (1-42) + DMSO grubunda olduğu bulunmuştur (p<0.01). 10 μM Aβ (1-42) + Nikotinamid grubunun Cyt c seviyeleri, 10 μM Aβ (1-42) + DMSO ve 10 μM Aβ (1-42) + Bexarotene gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha düşüktü.

4.4.3. SIRT1/ PARP1/PPARγ sinyal yolları üzerindeki etkileri

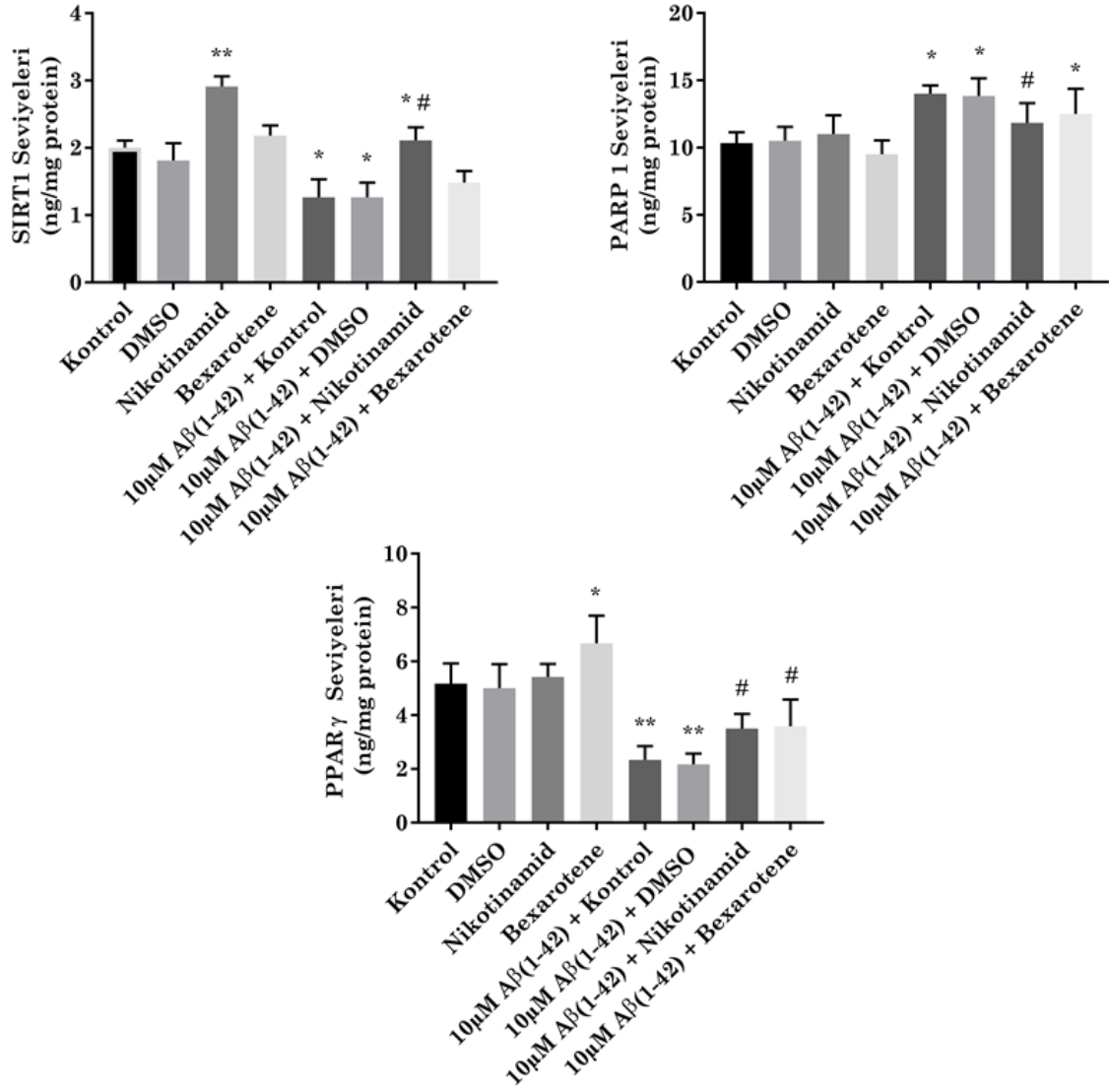
Deney gruplarında ait SIRT1, PARP1 ve PPARγ seviyeleri Tablo 4.8'de verilmiş olup, gruplar arasındaki farklar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Aβ (1-42) ile inkübe edilen ve edilmeyen sinaptozomların SIRT1, PARP1 ve PPARγ seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır.

Nikotinamid uygulamasının SIRT1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlamıştır (p<0.01). Ancak, bexarotene uygulaması SIRT1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan ılımlı bir artışa neden olmuştur. Aβ (1-42) uygulaması sinaptozomlardaki SIRT1 düzeylerinde

belirgin azalmaya neden olmuştur ($p < 0.05$). Nikotinamid uygulaması A β (1-42) inkübasyonuna karşı sinaptozomlarda SIRT1 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olurken ($p < 0.05$), bexarotene uygulaması ılımlı bir artış sağlamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 4.8 A β (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin SIRT1, PARP1 ve PPAR γ seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; 10 μ M A β (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında # $p < 0.05$

Gruplar	SIRT1 (ng/mg protein)	PARP1 (ng/mg protein)	PPAR γ (ng/mg protein)
Kontrol	1.98 \pm 0.37	10.36 \pm 1.73	5.21 \pm 0.68
DMSO	1.85 \pm 0.52	11.04 \pm 2.45	5.03 \pm 0.75
Nikotinamid	2.93 \pm 0.31 **	12.76 \pm 2.31 *	5.83 \pm 0.36
Bexarotene	2.37 \pm 0.16	10.92 \pm 2.14	7.29 \pm 0.81 *
10 μM Aβ (1-42) + Kontrol	1.35 \pm 0.12 *	15.75 \pm 1.82 *	2.62 \pm 0.14
10 μM Aβ (1-42) + DMSO	1.28 \pm 0.07 *	15.27 \pm 1.84 *	2.33 \pm 0.27
10 μM Aβ (1-42) + Nikotinamid	2.51 \pm 0.23 * #	13.12 \pm 1.96 #	3.93 \pm 0.36 #
10 μM Aβ (1-42) + Bexarotene	1.49 \pm 0.11	14.81 \pm 2.53 *	4.18 \pm 0.51 #



Şekil 4.9 Aβ (1-42) ile inkübe edilmiş sinaptozomlarda nikotinamid ve bexarotene'nin SIRT1, PARP1 ve PPARγ seviyelerine etkisi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p <0.05 **p <0.01; 10 µM Aβ (1-42) + Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında #p <0.05

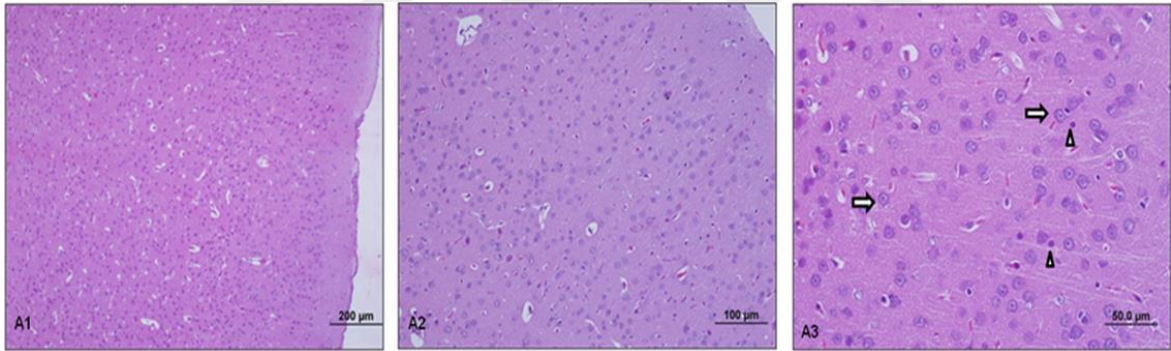
Aβ (1-42) ile inkübe edilmeyen sinaptozomlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO, nikotinamid ve bexarotene gruplarının PARP1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi. Aβ (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomların PARP1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (p<0.05). 10 µM Aβ (1-42) + Nikotinamid grubunun PARP1 seviyeleri, 10 µM Aβ (1-42) + Bexarotene gruplarıyla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bulundu.

A β (1-42) ile inkübe edilmeyen sinaptozomlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO ve nikotinamid gruplarının PPAR γ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmezken, bexarotene grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). A β (1-42) uygulaması sinaptozomlardaki PPAR γ aktivitesinde belirgin azalmaya neden olmuştur. Bexarotene ve nikotinamid uygulamaları A β (1-42)'ye karşı PPAR γ seviyelerini anlamlı biçimde arttırmış ve en iyi sonuç bexarotene uygulamasında elde edilmiştir.

4.5. Histolojik Analiz Sonuçları

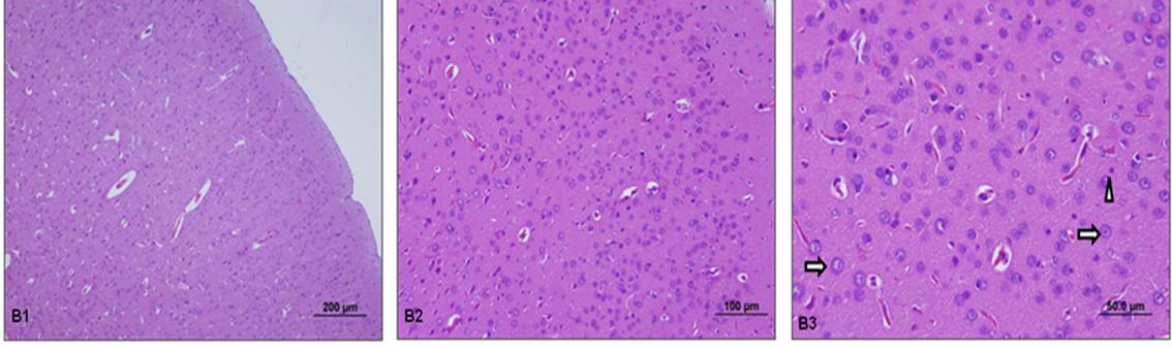
Çalışmamızdaki tüm deney gruplarının beyin dokularına ait kesitlerden elde edilen ışık mikroskobu ve TUNEL görüntüleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

Kontrol grubuna (A1-A3) ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal görünümlü nöronlar (\rightarrow) ve glial hücreler (\blacktriangleright) görüldü (Şekil 4.10).



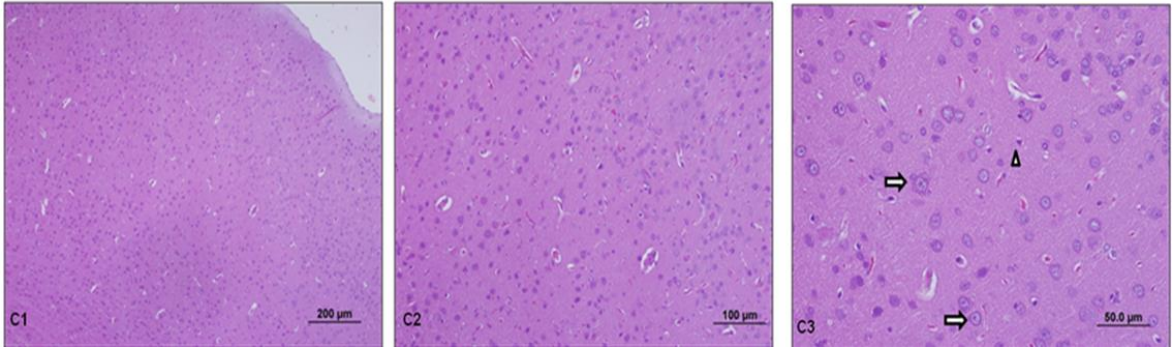
Şekil 4.10 Kontrol grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskobik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 μ m, 100 μ m, 50.0 μ m)

DMSO grubuna (B1-B3) ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal görünümlü nöronlar (\rightarrow) ve glial hücreler (\blacktriangleright) görüldü (Şekil 4.11).



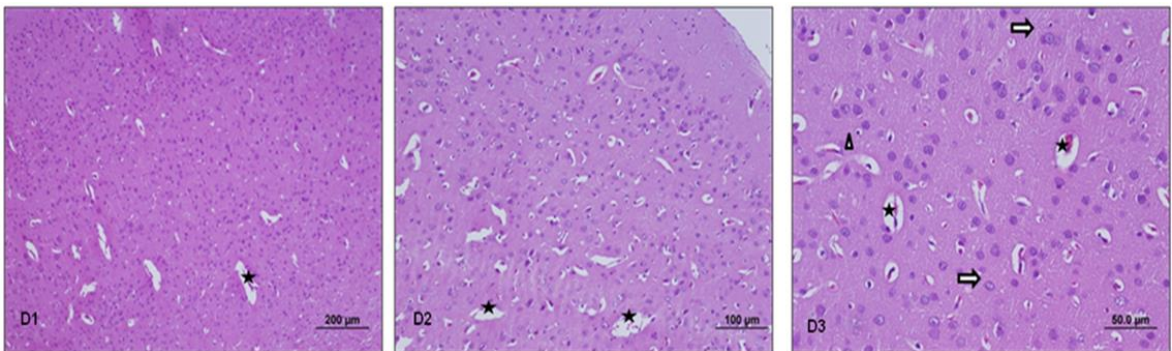
Şekil 4.11 DMSO grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 µm, 100µm, 50.0µm)

Nikotinamid grubuna (C1-C3) ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal görünümlü nöronlar (→) ve glial hücreler (▶) görüldü (Şekil 4.12).



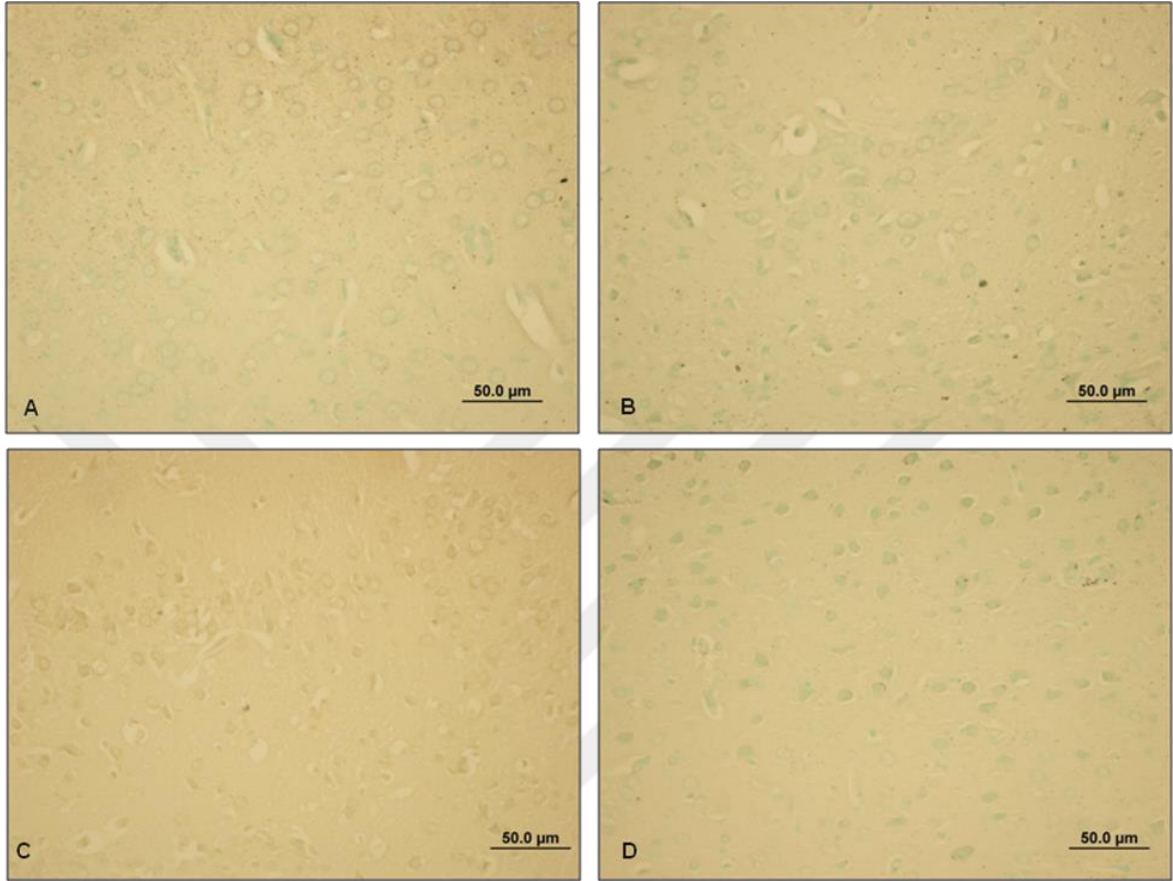
Şekil 4.12 Nikotinamid grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 µm, 100µm, 50.0µm)

Bexarotene grubuna (D1-D3) ait sıçan beyinlerinde kortikal alanda normal görünümlü nöronlar (→) ve glial hücreler (▶) izlendi. Sadece bazı bölgelerde kısmi vasküler dilatasyon (*) görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Bexarotene grubu sıçan beyinlerinin farklı büyültmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (HE, Ölçek: 200 µm, 100µm, 50.0µm)

Tüm deney gruplarından elde edilen beyin dokularındaki apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL görüntülerinde, tüm grupların kortikal alanlarında negatif boyanma görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Deney gruplarına ait sıçan beyinlerinin TUNEL ışık mikroskopik görüntüleri. Kontrol grubu (A): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma. DMSO grubu (B): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma. Nikotinamid grubu (C): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma. Bexarotene grubu (D): Kortikal alanda TUNEL negatif boyanma (D). Ölçek: 50.0µm

Hematoksilen eosin ve TUNEL boyamalarına göre; 1 hafta boyunca sıçanlara uygulanan DMSO, nikotinamid ve bexarotene'in beyin dokusunda herhangi bir histopatolojik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Sinaps, bir nöronun elektriksel veya kimyasal sinyali başka bir nöron hücreğine iletmesine izin veren ve nöronal fonksiyon için gerekli olan bir yapıdır. Sinaps kaybı, AD, PD ve HD gibi nörodejeneratif hastalıkların erken döneminde meydana gelen kritik bir olaydır. Düzgün sinaps fonksiyonu nöronal canlılık için önemlidir ve bu yapıların bozulması AD'deki bilişsel anormallikleri açıklamaktadır. Biyokimyasal analizler, sinaptik dejenerasyonun olduğu nörolojik hastalıkların patogeneğinde, presinaptik ve postsinaptik bileşenlerde kayıpların olduğunu ortaya koymuştur (Gyls, Fein, Yang, & Cole, 2004).

Beyindeki sinir terminalleri şekilleri ve büyüklükleri, vezikülleri, mitokondrileri, postsinaptik hücrelerle olan bağlantı sayıları ve nörotransmitter içerikleri bakımından farklılık gösterirler. Sinir terminallerinin fizyolojik ve moleküler işleyişine dair bilgiler, sinir terminallerinin beyinden izolasyonu ile birlikte önemli ölçüde artmıştır (Ashton, & Ushkaryov, 2005). Sinaptik proteinlerin zenginleştirilmiş kısmı, nöronal doku homojenizasyonu ile hazırlanan izole edilmiş sinir terminallerinden (sinaptozomlardan) elde edilebilmektedir. Sinaptozomlar, homojenizasyon ve ardından boyut veya yoğunluk bazında fraksiyonlama ile beyin dokusundan elde edilen subselüler membran yapılarıdır. Sinaptozomlar fonksiyonel olarak kapsamlı bir şekilde incelendiğinde, ATP sentezleyebildikleri, plazma membranlarına sahip oldukları, membran potansiyellerini ve iyon homeostazını korumalarını sağlayan fonksiyonel iyon kanallarına sahip oldukları, taşıyıcılar ve reseptörler içerdikleri, sinaptik vezikülleri sayesinde nörotransmitterleri dolayabildikleri ve serbest bırakabildikleri, endositoz yapabildikleri ve sinir terminallerindeki fizyolojik reaksiyonların devamlılığı için fonksiyonel enzimlere ve proteinlere sahip oldukları bulunmuştur. Sinaptozomlar, nörotransmitterlerin sinaptik boşluğa salınımından sorumlu olan presinaptik kısımları ile sinyal mekanizmalarının düzenlendiği postsinaptik membran ve PSD'yi içerirler. Sinaptozomlar, beyin nörotransmisyonu ve nöroplastisitesinin yapısı ve moleküler mekanizmaları

dahil olmak üzere birçok beyin fonksiyonunu incelemek için uygun bir in vitro model sistemidir. Bu nedenle, nörodejenatif hastalıklarla ilgili çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Sokolow vd., 2012). Ayrıca, sinaptozomlar sinapslardaki nörokimyasal değişimleri incelemek için de kullanılmaktadır. Ancak izolasyon sırasındaki heterojenite, sinaptozomların yaygın kullanımı sınırlayıcı bir faktör olması nedeniyle, araştırmalar açısından uygulanan izolasyon yöntemleri büyük önem arz etmektedir.

Sinaptozomlar izole edildikten sonra, çok çeşitli fonksiyonel özellikler açısından incelenebilirler. Deneylerin amacına bağlı olarak, sinaptozomlar doğrudan beyin homojenatından her biri belirli avantajları ve dezavantajları olan bir dizi farklı prosedür ile saflaştırılabilir. Yaygın olarak kullanılan tüm sinaptozom saflaştırma prosedürleri, beyin homojenatının diferansiyel santrifüjü ile başlar. Fakat zaman içerisinde, sinaptozomların izolasyon yöntemleri önemli değişikliklere uğramıştır. İlk izolasyon metodu olan Whittaker yöntemi, hipertonic sükröz çözeltisinde homojenizasyon ve ardından ultrasantrifüjleme üzerine kurulmuştur (Whittaker vd., 1964). Bu prosedürdeki en büyük zorluk birkaç resüspansiyon aşaması gerektirmesi ve son olarak bir ultrasantrifüj kullanımına bağlı olmasıydı. Bu adımlar açıkça sinaptozomal canlılık ve işlevsellikte bir azalmaya yol açmaktadır. Sonuçlarımızla benzer şekilde, yapılan TEM analizi Whittaker izolasyon yönteminde, biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri etkileyebilecek olan serbest mitokondriler, miyelin membran parçaları ve lizozomlar dahil olmak üzere önemli ölçüde enzimce zengin kirleticiler içerdiğini gösterdi (Dunkley vd., 2008).

Sinaptozomların saflaştırılmasını geliştirmek için ilave yöntemler geliştirilmiştir. Yeni yaklaşımlar temel olarak, homjenizasyon ve santrifüj aşamasındaki hız ve süre değişikliklerini içermektedir. Bu yöntemlerden biri olan sükröz gradient yöntemi, farklı sükröz konsantrasyonlarının kullanıldığı santrifüjleme aşamalarını kapsamaktadır (Dodd vd., 1981). Diğerisi ise, sinaptozomların hiperosmotik sükröze maruz kalmadığı ve sükröz replasmanı için geliştirilmiş daha hızlı bir protokol olan Percoll gradient yöntemidir (Sherman, 1989). Percoll, daha viskoz bir yapıya sahip olduğu için sükröze

göre kapsamlı bir hazırlık sürecine gerektirmesine rağmen, daha kısa santrifüj süreleri ile sükröz gradient yöntemine göre daha hızlı bir izolasyon imkanı sunmaktadır.

Çalışmamız da, sinaptozomal fraksiyonları AD ile ilişkili beyin bölgesinden biri olan, serebral korteksten izole etmek için kullanılan 3 yöntemi karşılaştırıyoruz. Percoll protokolünün sükröz protokolünden daha düşük saflaştırma verimine sahip olması önceki çalışmalarla da uyumludur (Bai, & Witzmann, 2007). Sonuçlarımız açıkça, korteks bölgesinden izole edilen sinaptozomal fraksiyonlarda, sinapsların morfolojik olarak daha çok korunduğu ve diğer subselüler kirleticilerin daha az olduğu sükröz yönteminin tercih edilmesi gerektiğini göstermiştir. Sükröz protokolü kullanılarak, düzgün morfolojiye sahip presinaptik sinir terminalleri ve daha net SV ve SJ yapıları gözlenmiştir. Ayrıca, sükröz gradient yöntemiyle izole edilen sinaptozomların presinaptik terminallerinde yoğun bir şekilde paketlenmiş düzgün morfolojiye sahip SV'lerin olması, bu fraksiyonların fonksiyonel olarak aktif olduğunu da göstermiştir.

Percoll prosedürüyle izole edilen sinaptozomlardaki presinaptik sinir terminallerin bazılarında SV yoktu veya düzgün bir morfolojiye sahip değildi. Presinaptik membranların izolasyon sırasında yüksek santrifüj kuvvetine maruz kalması nedeniyle, bu yapılar birbirinden ayrılır ve tekrar reorganize olmadan önce içeriklerini kaybedebilmektedir (Evans, 2015). Bu yüzde, Percoll prosedürüyle izole edilen sinir terminallerin bazılarında fonksiyonel olmadığını gösteren içi boş ve dağılmış presinaptik yapılar gözlenmiştir. Bununla birlikte, homojenleştirme aşaması nihai sonuçları da etkileyebildiğinden, ilk aşamadaki düşük hızlı santrifüjleme her 3 protokolde de oldukça farklıydı. Percoll ve Whittaker protokollerinin homojenizasyon aşamalarında 1400xg yerine 3000xg kullanılması, sinaptozomal fraksiyonların yapısını ve morfolojisini etkilemiştir. Bu nedenle, sadece saflaştırma adımlarının değil, aynı zamanda homojenleştirme adımlarının da nihai verim için önemli olduğu sonucuna varabiliriz.

AD yaşlılarda görülen demansın en sık nedenlerinden biridir. 2030 yılına kadar dünyada 70 milyondan fazla kişide AD'nin görüleceği ön görülmektedir. Ancak şimdiye kadar mevcut hiçbir tedavi AD'yi engelleyemez, durduramaz veya tersine çeviremez. Patolojik olarak AD, hücre dışında birikim gösteren A β plaklar ve mikrotübül ile ilişkili tau proteininden oluşan sitoplazmik NFT'ler ile karakterize edilir (McDade, & Bateman, 2017). A β , APP'nin β -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından ardışık proteolitik bölünmesi ile üretilir. Buna karşılık, APP'nin α -sekretaz ile hidrolizi A β oluşumunu engeller. A β 'nin fizyolojik fonksiyonları hâla tam olarak bilinmemektedir. AD beyinde A β , 7-13 nm çapında fibril morfolojisi gösteren β -tabakalı ikincil yapıya sahip, oldukça düzenli yapılardır. Birçok çalışma, A β ile AD patogenezi arasında nedensel bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, NFT'ler esas olarak hiperfosforilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon ve anormal posttranslasyonel modifikasyonlar taşıyan tau proteinlerinin birleşmesi ile oluşur. Öncelikle mikrotübülleri stabilize etmek için işlev gören tau, sinaptik aktiviteye bağlı sinyal moleküllerinin dağılımını modüle ederek uyarıcı nörotransmisyonu teşvik edebileceği veya artırabileceği gösterilmiştir. Bu yüzden, A β ve tau birlikte bilişsel bozulma derecesi ile yakından ilişkilidir (Morris, Vidoni, Honea, Burns, & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2014).

AD, oksidatif stresin önemli bir ayırt edici özellik olduğu nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık patogenezinde erken dönemde ortaya çıkan oksidatif hasar, hastalığın ilerlemesini şiddetlendirebilir. Mitokondri, ROS üretimi ve birikiminde önemli bir rol oynar. AD'de mitokondriyal fonksiyonunun bozulması, ROS üretiminin artmasına ve lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonuna yol açar. Beynin temel bir fonksiyon birimi olan nöron, ROS'a karşı son derece duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir. Ayrıca nöronlar, yüksek oranda indirgeyici geçiş metallerine, oksijen tüketim kapasitesine ve askorbat seviyelerine sahiptir. Birlikte ele alındığında, güçlü bir pro-oksidan olan bu moleküllere rağmen, beyin diğer organlara göre daha düşük antioksidan seviyesine sahiptir (Pratico, 2008).

Beyindeki ROS'ların kaynağı, mitokondriyal disfonksiyon, farklı indirgeyici geçiş metallerinin varlığı ve A β peptid agregasyonudur. Bu

süreçlerdeki meydana gelen anormallikler, ROS üretimindeki artışla sonuçlanır. AD gelişiminin erken aşamalarında, A β 'nin mitokondrindeki elektron taşıma sistemini inhibe ederek, ROS üretimiyle birlikte oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir. Nöronlar, ROS'ların ortadan kaldırılmasında önemli bir antioksidan olan GSH'ı düşük seviyelerde içermesi nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar (Pocernich, & Butterfield, 2012). GSH'ın bir antioksidan olarak en önemli görevi, ROS temizleyicisi olması ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynamasıdır. Oksidatif strese karşı etkili birçok antioksidan enzimin koenzimi olan GSH, hücrel redoks potansiyelinin sağlanması, çeşitli enzimlerin aktivasyonu, immün fonksiyonun regülasyonu, sinyal transdüksiyonu, gen ekspresyonunun ve apoptotik yolların düzenlenmesi gibi süreçlerde de önemli roller üstlendiği bildirilmiştir (Zhong, Ge, Li, Qu, & Ma, 2009).

Yaşlanmaya bağlı olarak görülen antioksidan düzeylerindeki azalma, nörodejeneratif hastalıklara yakalanma riskini arttırmaktadır. Oksidatif strese karşı hassas olan beynin antioksidan sistem kapasitesinin azalması nörodejeneratif süreçlerin hızlanmasına neden olur. Yapılan çalışmalar da, demansı olmayan yaşlı ve/veya AD hastalarının beyinlerindeki oksidatif yükün sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Torres vd., 2007). Ayrıca, yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda A β (1-42)'nin antioksidan düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Manczak vd., 2010). Literatür ile paralel bir şekilde, A β (1-42) inkübasyonunun sinaptozomlardaki TAS düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu bulduk (Tablo 4.5, Şekil 4.7).

Kandaki oksidatif stres biyobelirteç seviyeleri, beyindeki ROS seviyeleri ile dinamik bir korelasyon içindedir. Antioksidan enzim aktivitesindeki değişiklik, hem periferik dokularda hem de AD hastalarının MSS'inde hücre içi ROS birikmesine katkıda bulunmaya devam etmektedir. Bu nedenle, oksidatif stres AD'de anahtar patolojik bir özelliktir. Önceki araştırmalar, mitokondriyal anomaliler, inflamasyon, indirgeyici geçiş metal birikimi, tau proteininin hiperfosforilasyonu ve hücre dışı A β birikiminin ROS ve oksidatif

stresin karakteristik mekanizmaları olduğunu ileri sürmektedir (Federico vd., 2012).

AD beyinlerinde SOD, GPx ve CAT'ın azalmış aktiviteleri, beyin oksidatif stresinin indüklenmesine katkıda bulunur. SOD enziminin; bakır/çinko-SOD (SOD1), mangan-SOD (SOD2) ve ekstraselüler-SOD (SOD3) olmak üzere farklı hücrel kompartmanlarda bulunan 3 farklı izoformu tanımlanmıştır. Mitokondride bulunan SOD2 izoformu, oksidatif strese karşı savunmanın ilk basamağını oluşturur (Packer, 2002). GPx'in dört izoformu bulunmaktadır ve mitokondride de bulunan izoformu antioksidan savunmanın önemli mekanizmalarından birini oluşturur. Tüm GPx izoformları GSH varlığında H₂O₂ ve organik hidroperoksitleri indirgerler. İnsan beyninin düşük seviyelerde GSH içermesi nedeniyle, diğer dokulara göre daha az GPx aktivitesi göstermesine ve H₂O₂ kaynaklı oksidatif hasara olan hassasiyeti arttırmaktadır (Zhao, & Zhao, 2013). CAT, hücrede peroksisomlarda ve sitozolde bulunur. Nöronlardaki CAT seviyelerinin az olması ve yaşa bağlı olarak aktivitesinde azalması, beyindeki ROS'ların temizlenmesini yavaşlatmaktadır (Yan, Wang, & Zhu, 2013). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Aβ (1-42) inkübasyonunun sinaptozomlardaki azalan TAS seviyeleriyle birlikte TOS seviyelerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur (Tablo 4.5, Şekil 4.7). Bu da, AD patogenezinde antioksidanların önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır.

Mitokondri, hücre fonksiyonunun ve canlılığın korunması için gereklidir. Genellikle "hücrenin enerji merkezi" olarak tanımlanırlar. Mitokondrinin birincil işlevi, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP sentezlemektir. Major ROS kaynağı olan mitokondri, hücrede büyük miktarlarda ROS'a maruz kalması nedeniyle, özellikle oksidatif hasara daha duyarlıdır. Mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma, mitokondriyal solunum zincirindeki akışı bozarak ATP sentezinin azalmasına ve oksidatif stresin karakteristik sonuçları olan artmış ROS ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Stock, Gibbons, Arechaga, Leslie, & Walker, 2000).

Sinaptik kompartmanlar (presinaptik ve postsinaptik terminaller), yüksek seviyelerde oksidatif ve metabolik strese maruz kalan nöronal bölgelerdir. Bu bölgelerde bulunan iyon kanallarının aktivasyonu membran depolarizasyonuna ve yüksek miktarda ATP tüketimi ile sonuçlanır. Yüksek seviyedeki ATP ihtiyacını sağlamak için mitokondriler, sinaptik terminallerde konsantre edilirler ve sinaptik fonksiyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Sinapslar, AD'de nörodejeneratif sürecin başladığı yerlerdir. Yapılan çalışmalar da, AD'de A β 'ye maruz kalan nöronlarda apoptotik kaskadların (kaspaz aktivasyonu, mitokondriyal membran depolarizasyonu, ROS üretimi) lokal olarak sinapslarda aktive edildiğini göstermiştir (Mattson, & Liu, 2002).

Apoptozom oluşumu ile CASP3 aktivasyonuna yol açan apoptotik kaskad, mitokondriden sitozole transloke olan ve Apaf-1 ile etkileşime giren Cyt c salınımı ile başlar. Ardından sırayla, pro-kaspaz-9'a bağlanarak aktive eder ve aktif kaspaz-9, CASP3'ü aktive ederek apoptozu indükler. Mitokondriden Cyt c salımı, nörodejeneratif hastalıklarda hastalığın şiddeti ile orantılı olarak artmaktadır. Mitokondri, apoptozun intrinsik yolunda önemli bir rol oynar. Apoptoz sırasında, mitokondriyal membran potansiyeli azalır ve dış mitokondriyal membran geçirgen hale gelir, bu da Cyt c gibi apoptotik proteinlerin salınmasına neden olur (Hroudova, Singh, & Fisar, 2014).

Sinaps dejenerasyonunda CASP3 önemli bir rol oynamaktadır. Kaspazlar (sistein-bağımlı aspartat-spesifik proteazlar), özellikle aspartik asit kalıntılarından proteolitik yıkımı sağlayan bir proteaz ailesidir. CASP3, nöronal apoptoza yol açan apoptotik kaskadlardaki ana efektör kaspazdır. AD hastalarında, sinapslarda özellikle postsinaptik kısımda, CASP3'ün önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Ayrıca, AD hastaları sağlıklı kişilere karşılaştırıldığında sinaptik pro-CASP3 ve aktif CASP3 ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlar gösterdiği bildirilmiştir (Louneva vd., 2008). Sonuçlarımıza göre A β (1-42) uygulaması sinaptozomalarda Cyt c ve CASP3 seviyelerinde artışa neden olmuştur (Tablo 4.6, Şekil 4.8). MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar Cyt c ve CASP3 seviyelerindeki artış ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.6). Ayrıca, A β (1-42) uygulaması sinaptozomlardaki mitokondriyal aktivitede doz bağımlı bir azalmaya neden olmuştur. Elde

ettiğimiz sonuçlar, A β (1-42) aracılı nörodejenerasyonda apoptotik süreçlerin rol oynadığını vurgulamaktadır. Bu bulgular, aktive olan Cyt c ve CASP3'ün ilerleyici sinaptik dejenerasyona ve nihayetinde AD'deki bilişsel düşüşün en iyi patolojik korelasyonu olan sinaptik kaybı teşvik etmektedir.

Sirtuinler veya sınıf III histon deasetilazlar, hücrel ve doku fizyolojisinin veya patolojinin yanı sıra organizmal yaşlanmanın çeşitli yönlerini etkileyen, geniş bir hücrel hedef yelpazesine sahip NAD⁺-bağımlı deasetilazlardır. Nükleer bir protein olarak SIRT1, beyin korteks, hipokampus, beyincik ve hipotalamus bölgelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilir. SIRT1'in daha önce antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve mitokondriyal biyogenez gibi çok sayıda nöroprotektif fonksiyonu düzenlediği gösterilmiştir (Ng, Wijaya, & Tang, 2015). SIRT1 aktivitesi, NAD⁺'in ROS aracılı tükenmesine bağlı olarak azalır. Azalmış SIRT1 seviyesinin bir sonucu olarak asetillenmiş apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artması, SIRT1'in apoptotik proteinlerin posttranslasyonel asetilasyonun da önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Tanno, Sakamoto, Miura, Shimamoto, & Horio, 2007).

SIRT1, AD'de yoğun olarak araştırılan tek sirtuindir. APP'nin α -sekretaz hidrolizi APP'nin amiloidojenik sürecini engellediğinden; A β üretimindeki azalma, AD başlangıcını ve ilerlemesini doğrudan etkilemektedir. SIRT1'in ekspresyonunun artması α -sekretaz aktivitesini arttırdığını, buna karşılık A β üretiminde bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Qin vd., 2006). AD hastalarının beyin korteksinde SIRT1'in RNA ve protein ekspresyon seviyelerinin tau birikimi ile pozitif korelasyon gösterdiği, ancak A β ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Julien vd., 2009). Önceki çalışmalar ile paralel bir şekilde, A β (1-42) uygulamasının sinaptozomalarda SIRT1 seviyelerinde düşüşe neden olduğunu bulduk (Tablo 4.7 ve Şekil 4.9). Ayrıca, azalan SIRT1 seviyelerinin A β (1-42) aracılığıyla artmış ROS ve apoptotik süreçlerle de korele olduğu belirledik. Böylece, sirtuinlerin AD ile olan fonksiyonlarının tanımlanması, hastalığın tedavisini için geliştirilebilecek yeni terapötiklerin hedefi haline gelebileceğini düşündürmektedir.

PARP1 (EC 2.4.2.30), hücrel sağ kalım ve ölümün düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir enzimdir. PARP1, on sekiz farklı üyeden oluşan ailenin en önemli üyesidir. PARP1'in katalitik aktivitesi, NAD⁺'in nikotinamid ve ADP-riboza hidrolizi ve bunun sonucu oluşan ADP-riboz birimlerinin, PARP1'in kendi ve hedef proteinler üzerinde glutamat veya aspartat birimlerine eklenmesini içermektedir. PAR polimerindeki ADP-riboz birimleri, uzun bir lineer zincir üretmek için glikozidik riboz-riboz 1→2 bağları ve her 20-50 rezidü de bir PAR polimerlerinin dallanması için 2→1 glikozidik bağ yoluyla bağlanır. Beyindeki PARP1, PARilasyonun %90'ından fazlasından sorumludur. Tek veya çift zincirli DNA kırıklarına yanıt olarak PARP1, NAD⁺'in ADP-riboz kısımlarını bir hedef proteine transferini katalize eder. PARilasyon, DNA hasarının tespiti, transkripsiyonun düzenlenmesi, kromatin modifikasyonu, oksidatif ve apoptotik yolların düzenlenmesi gibi birçok temel moleküler süreçte rol oynar. Bununla birlikte, PARP1'in inaktivasyonu beyindeki nörodejenerasyonun hızlanmasına, nöronal kayıpların ve kanserojenin artmasına neden olur. Oksidatif stres altında, PARP1'in aşırı aktivasyonu, NAD⁺ seviyelerinin hızlı bir şekilde tükenmesine ve ATP düzeylerinin azalmasına neden olarak apoptotik hücre ölümüne yol açar. Oksidatif DNA hasarının onarılmasından sorumlu DNA tamir mekanizmalarının yetersizliği de, AD patogeneğinde önemli bir faktördür. Bununla birlikte, AD'lerin serebral kortekslerinde oksidatif hasar sonucu DNA zincir kırıklarında artış olduğu bildirilmiştir (Strosznajder, Czapski, Adamczyk, & Strosznajder, 2012).

PARP1, substrat olarak NAD⁺ kullanımı veya mitokondriyal proteinlerin ekspresyonunun epigenetik regülasyonu ile mitokondride enerji metabolizmasını önemli ölçüde etkiler. Büyük miktarda mitokondride lokalize olan hücrel NAD⁺; PARP, mono-ADP-riboz transferazlar ve sirtuinler tarafından kullanılır. A β aracılı mitokondriyal solunum zinciri komplekslerinin inhibisyonu, O₂⁻ üretiminin artmasıyla oksidatif strese neden olur; bu durumda PARP1 aşırı aktif hale gelerek enerji metabolizmasını ve mitokondriyal membran potansiyelini değiştirir (Schmitt vd., 2012). Çalışmamızda, A β (1-42) ile inkübe edilen sıçan beyin korteksinden izole

edilen sinaptozomlarda PARP1 seviyeleri anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Tablo 4.7 ve Şekil 4.9). Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar, PARP1 seviyelerinin Aβ (1-42) uygulanmasıyla artan TOS, CASP3 ve Cyt c seviyeleri ve MTT sonuçları ile tutarlı olduğunu da göstermiştir.

PPAR'lar, ligand- ve DNA-bağlanma bölgeleriyle transkripsiyonu aktive ederek veya baskılayarak hücrel fonksiyonları düzenleyen bir nükleer reseptör ailesidirler. PPAR'lar, karmaşık bir dizi mekanizma yoluyla çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlerler. PPAR, başka bir nükleer reseptör sınıfı olan RXR ile bir heterodimer oluşturur. PPAR/RXR heterodimer bir kez aktive edildiğinde, hedef genlerin promotör bölgesindeki PPRE'yi uyararak, hedef genlerin transkripsiyonunu sağlayan kromatin gevşemesini başlatan histon asetil transferazları ve RNA polimeraz kompleksini aktive eder (Mattson, 2012).

PPARγ beyindeki fizyolojik koşullar altında düşük seviyelerde eksprese edilir. Ancak, AD'li bireylerde yapılan gen ekspresyon analizlerinde PPARγ agonistlerinin PPARγ'nın mRNA seviyelerini arttırdığı ve nöroinflamasyona karşın koruma sağladığı gösterilmiştir (de la Monte, & Wands, 2006). PPARγ aktivasyonunun, AD hastalarında meydana gelen sinaptik disfonksiyona ve nöronal kayıplara aracılık eden Aβ kaynaklı nörotoksisite ve tau patolojisi arasındaki bağlantıyı kopardığı öne sürülmüştür (Moosecker vd., 2019). Biz de çalışmamızda, PPARγ'nın in vitro AD modelinde olası etkilerini inceledik. Önceki çalışmalarla paralel olarak, Aβ (1-42) ile inkübe sinaptozomlarda PPARγ seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığını bulduk (Tablo 4.7 ve Şekil 4.9) (Inestrosa, Godoy, Quintanilla, Koenig, & Bronfman, 2005). Ayrıca, Aβ aracılı nörotoksisite de, azalan PPARγ seviyelerine azalan MTT sonuçları da eşlik etmiştir.

Nikotinamid ve nikotinamid riboz, hücrel NAD⁺'ın temel kaynaklarıdır. Nikotinamid, NAMPT enzimi ile NMN'ye dönüştürülür ve ardında NMN adeniltransferaz ile NAD⁺ sentezlenebilir. Nikotinamid uygulamasının hücre içi NAD⁺ seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Bieganowski, & Brenner, 2004). NAD⁺; glikoliz, krebs döngüsü ve oksidatif

fosforilasyon gibi metabolik yollarda rol alan ortak bir ara maddedir. In vitro ve in vivo AD modelleri üzerinde yapılan çalışmalar NAD⁺ uygulamalarının doğrudan mitokondriyal fonksiyonlar üzerinde etkili olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, NAD⁺ tedavisinin bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı durdurmasından dolayı, AD'nin ilerlemesini önlemek için etkin bir terapötik olabileceği bildirilmiştir (Demarin, Podobnik, Storga-Tomic, & Kay, 2004). Çalışmamızda nikotinamid tedavisinin, A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmamızdaki asıl amaç, nikotinamid tedavisinin hücrel antioksidan savunma mekanizmaları destekleyerek, nörodejeneratif hastalıklarla mücadelede beyin performansını iyileştirmeye dayanıyordu. Nikotinamidin intraperitoneal olarak uygulandığı sıçanların beyin dokusundan izole edilen sinaptozomların A β (1-42) ile inkübasyonu sonrasında, artan oksidatif ve apoptotik süreçlere karşı antioksidan mekanizmaları destekleyerek nöroprotektif etki gösterdiğini bulduk.

NAD⁺ seviyelerindeki suprafizyolojik artışın nöroprotektif etkiler gösterdiği bilinmektedir. Hem NAD⁺ sentezinin öncüsü hem de PARP1 ve SIRT1'in önerilen inhibitörü olarak nikotinamid nöroprotektif etkisini, hücrel NAD⁺ seviyelerini koruyarak NAD⁺-bağımlı enzimlerin aktivitelerinin devamlılığını sağlayarak göstermektedir. Nikotinamid, SIRT1'in katalitik aktivitesini inhibe etmesine karşın; özellikle nikotinamidin NAD⁺'a dönüştürülmesiyle, nikotinamid tedavisi dolaylı olarak SIRT1 aktivasyonuna yol açabilmektedir. Yapılan önceki çalışmalarda, SIRT1 seviyelerinin ve aktivitesinin hücrel NAD⁺ seviyelerinden etkilendiğini ve nikotinamid tedavisinin NAD⁺ tükenmesini azaltarak nöronlardaki SIRT1 aktivitesini koruduğu gösterilmiştir (Liu, Gharavi, Pitta, Gleichmann, & Mattson, 2009). Böylece, aktive olan SIRT1, PPAR γ 'yı deasetile ederek aktive eder. Çünkü nikotinamid yüksek afiniteli nikotinic asit G-proteini bağlı reseptörlerine bağlanamamasından dolayısıyla PPAR γ 'yi aktive edememektedir. Bu yüzden, nikotinamid uygulamasıyla artan NAD⁺ seviyeleri, indirekt olarak PPAR γ 'nın aktivasyonunu regüle edebilmektedir (Li vd., 2007).

PARP1 ve SIRT1 arasındaki etkileşim sadece metabolik regülasyonu değil, aynı zamanda yaşlanmayı da etkiler. Oksidatif stres sırasında aktive olan PARP1, NAD⁺ tüketimine neden olarak SIRT1 aktivitesini azaltmaktadır. Aynı zamanda, nöronlardaki A β maruziyetinin PARP1 aktivasyonu ile saniyeler içindeki hücresele NAD⁺ seviyesinin %80-90'nının kullanılmasına neden olarak, nöronal ölümü indüklediği bildirilmiştir (Martire vd., 2013). PARP1 ve SIRT1, NAD⁺-bağımlı enzimler oldukları için sınırlı miktardaki NAD⁺ substratı için rekabet halindedirler. Her iki enzimin de NAD⁺ için olan Km farklılıkları, PARP1'in SIRT1'den daha hızlı bir şekilde NAD⁺'ı kullanmasına imkan sağlamaktadır (Smith, Hallows, & Denu, 2009). Ayrıca, yapılan bir çalışmada, PARP1 gen delesyonu olan farelerde, PARP1 inhibisyonuyla SIRT1 aktivitesinin artmasına neden olarak, mitokondriyal metabolizmayı desteklediği bildirilmiştir (Bai vd., 2011).

Nikotinamid, kompetitif inhibitör olarak PARP1'deki NAD⁺ bağlayıcı bölgeye bağlanır. Böylece, enzim aktivasyonu için gerekli olan NAD⁺'ın parçalanmasını önleyerek, NAD⁺ ve ATP düzeylerini artırıcı bir etki gösterir. Bununla birlikte, A β (1-42) aracılı nörotoksisitede nikotinamid uygulamasının PARP1 düzeylerini düşürerek apoptotik süreçlerin tetiklenmesini önlediği bildirilmiştir (Pandya, Patel, & Lau-Cam, 2010; Bayrakdar, Uyanıkgil, Kanit, Koylu, & Yalcin, 2012). Sonuçlarımıza göre, A β (1-42) ile inkübe edilen sinaptozomlarda artan oksidatif hasar ve apoptozla birlikte PARP1 seviyeleri de artmıştır (Tablo 4.7 ve Şekil 4.9). Bununla birlikte, artan PARP1 seviyelerinin azalan SIRT1 ve PPAR γ seviyeleri ile tutarlı olduğu belirlenmiştir. Çünkü PARP1 artışıyla birlikte azalan NAD⁺ seviyeleri doğrudan SIRT1 ve dolaylı olarak PPAR γ inaktivasyonuna neden olmuştur. Ancak, nikotinamidin uygulandığı sıçanların beyin dokusundan izole edilen sinaptozomlardaki PARP1 seviyelerinin azalması, beraberinde SIRT1 ve PPAR γ seviyelerinin artmasına neden olmuştur. Şöyle ki, PARP1'in NAD'a olan Km'sinin son derece düşük olması, nikotinamidin SIRT1 yerine PARP1 üzerindeki katalitik bölgeye bağlanmasına neden olmuş olabilir; böylece NAD⁺ tüketimini yavaşlatmış ve SIRT1 seviyelerinde artışa neden olmuş olabilir.

RXR agonist aktivitesine sahip ve endojen RXR ligandları olarak bilinen retinoik asit bileşiklerine yapısal olarak benzeyen sentetik bir ürün olan bexarotene (targretin), T hücreli kutanöz lenfoma hastalarında kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır. Bunu yanı sıra, in vivo AD modelinde bexarotene uygulamasının, nöral fonksiyonları düzenlenmesi ve A β klirensini attırması ile birlikte bilişsel fonksiyonları iyileştirildiği bildirmiştir (Kuntz vd., 2015). Bu etkinin temelinde, artan PPAR γ aktivasyonu olduğu öne sürülmüştür. Mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesiyle PPAR γ agonistlerinin, β -sekretazları inhibe ederek A β peptid oluşumunda doğrudan rol oynadığı gösterilmiştir (Sastre vd., 2006). Benzer şekilde, bexarotene'nin hem PPAR γ 'yı aktive ettiği hem de beyindeki A β seviyelerini azalttığı bulunmuştur (Ghosal vd., 2016). Bu da, bexarotene'nin, MSS nöronlarında PPAR γ 'nın ekspresyonunu arttırmasıyla AD'deki terapötik etkisine ışık tutmuştur.

PPAR γ dolaylı olarak ApoE geninin promotörüne bağlanarak ekspresyonunu teşvik etmekte ve HDL seviyelerini arttırmaktadır. HDL sentezinin uyarılması, A β peptitlerinin beyinden temizlenmesine yardımcı olmaktadır (Cramer vd., 2013). Bu durum, sonuçlarımızdaki, bexarotene uygulamasının yapıldığı sıçanlardaki lipit profilindeki artışı açıklamaktadır (Tablo 4.1 ve Şekil 4.2). Ancak, bexarotene uygulamasının yapıldığı sıçanlarda HDL'nin yanı sıra LDL, trigliserit ve kolesterol seviyelerinde de ılımlı bir artışın olduğunu bulduk.

SIRT1 katalitik bölgesi sayesinde PPAR γ ile kompleks oluşturur; hem SIRT1 hem de PPAR γ , SIRT1 geninin promotörüne bağlanarak nöredejeneratif hastalıklarda SIRT1 ekspresyonunu kontrol edebildiği bildirilmiştir (Han vd., 2010). Yapılan çalışmalarla paralel bir şekilde, bexarotene tedavisinin PPAR γ seviyelerinde önemli bir artış sağlarken, aynı zamanda da SIRT1 seviyelerinde ılımlı bir artışa neden olmuştur. Öte yandan, bexarotene tedavisinin PARP1 seviyelerinde düşüşe neden olmuştur. Bu düşüş, SIRT1 seviyelerindeki ılım artıştan kaynaklanmış olabilir. SIRT1 seviyelerindeki istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu artış, PARP1

aktivasyonu için gerekli olan hücrel NAD⁺ havuzunu bir kısmının kullanılmasına neden olmuş olabilir.

DMSO, tıbbi araştırmalarda yaygın olarak kullanılan çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip polar bir organik çözücüdür. Nöroloji alanında, DMSO yaygın olarak nöroprotektif veya nörotoksik ajanları çözmek için kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, DMSO tedavisinin, in vivo serebral iskemi modellerinde nöron kaybını azalttığı gösterilmiştir (Di Giorgio vd., 2008). Bununla birlikte, DMSO'nun fare ve sıçanların hipokampal nöronlarında apoptozu indükleyerek nöron kaybına neden olduğu da gösterilmiştir (Hanslick vd., 2009). Benzer şekilde, DMSO yetişkin fare beyinde AD'nin ayırt edici özelliği olan tau hiperfosforilasyonunu indükleyebildiği bildirilmiştir (Julien vd., 2012). Literatürdeki bu tutarsız veriler, DMSO'nun kullanıldığı modellerin veya uygulanan DMSO konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu yüzden, çalışmamızda çözücü olarak kullandığımız %1'lik DMSO için ayrı bir grup olarak oluşturduk. Kontrol grubundan elde edilen hem biyokimyasal hem de histolojik sonuçlar, DMSO grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sinaptozomlar nörokimyasal değişimlerin incelenmesinde kullanılan subselüler membran yapılarıdır. Sinaptozomların izolasyonu, araştırmaların gerçekleştirilmesi ve sonuçların doğruluğu açısından kritik bir öneme sahiptir. Bugüne kadar sinaptozomların izolasyonu için farklı yöntemler önerilse de, genel olarak Whittaker yöntemi, Percoll gradient ve sükröz gradient yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Sinaptik vezikül içeriği ve sayıları, sinaptik bağlantı noktaları, mitokondri sayıları ve yerleşimi ile miyelin membran parçaları gibi yapıların morfolojik incelemeleri sonucunda sükröz protokolünün, beyin korteks bölgesinden sinaptozomların saflaştırılması için Whittaker ve Percoll protokolünden daha verimli olduğu belirlenmiştir. Sistemik olarak, sükröz gradient izolasyon yönteminin daha sağlam ve düzgün morfolojiye sahip sinaptozomların elde edilmesini sağlamıştır. Bu nedenle, AD gibi nörodejeneratif hastaların moleküler temeli ile ilgili çalışmalarda kullanılacak olan sinaptozomal yapıların izolasyonunda sükröz gradient yönteminin kullanılmasını önermekteyiz.

AD'nin henüz kesin bir tedavisinin olmamasıyla birlikte kullanılan terapötik ajanların çoğu hastalığın patolojik bulgularını hafifletmekten öte geçememektedir. Antioksidan mekanizmaların yetersizliği, oksidatif stres, mitokondriyal aktivite kaybı ve apoptotik kaskatların aktivasyonu AD'de nöronal ve bilişsel anormalliklerin oluşumunda rol oynayan mekanizmalardan bazılarıdır. SIRT1, PPAR γ ve PARP1 sinyal yollarının aktivasyonu veya inhibisyonu AD patofizyolojisinde yer almaktadır. Çalışmamızda, AD patogenezinde rol alan bu sinyal yollarında etkili olabilecek terapötik bir yaklaşım olarak, nikotinamid ve bexarotene tedavisinin ex vivo AD modelindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, sıçanlara 1 hafta boyunca nikotinamid ve bexarotene uygulandı ve bu işlemin sonunda sıçanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Ardından, beyin dokularından izole edilen sinaptozomlar A β (1-42) inkübe ile edildi ve antioksidan savunma sistemi, oksidatif stress, apoptosis ve SIRT1/PPAR γ /PARP1 sinyal yolları üzerindeki nikotinamid ve bexarotene'nin nöroprotektif etkinlikleri

araştırılmıştır. Hücrel biyoenerjiğin ve redoks homeostazının sürdürülmesinde etkin rol oynayan NAD⁺'in öncüsü olan nikotinamid; TAS, TOS, CASP3 ve Cyt c seviyelerinin regülasyonunda bexarotene'den daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca nikotinamid indirek olarak SIRT1 ve PPAR γ 'nın aktivasyonunu sağlarken, PARP1'in inhibisyonunda neden olmuştur. Bexarotene uygulamasının, PPAR γ 'yı ve bağlantılı olarak SIRT1'i aktive etmiştir. Böylece NAD⁺ depolarının azalması ile dolaylı olarak PARP1 seviyelerinde ılımlı bir düşüşe neden olduğunu düşünmekteyiz. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, nikotinamid ve bexarotene'nin AD tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olabileceğini desteklemektedir.

Sıçanların anatomik yapısından dolayı bu çalışma sadece yaşlı sıçanlar üzerinde ve in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla nikotinamid ve bexarotene'nin genç sıçanlar üzerinde ve in vivo modellerde incelenmemiş olması bu çalışmanın başlıca limitasyonudur. Ayrıca çalışmamızda, SIRT1, PPAR γ ve PARP1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin analiz edilememiş olması diğer bir eksikliklerdir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adrain, C., Brumatti, G., & Martin, S. J. (2006). Apoptosomes: protease activation platforms to die from. *Trends in biochemical sciences*, 31(5), 243-247. doi: 10.1016/j.tibs.2006.03.004
- Albani, D., Polito, L., & Forloni, G. (2010). Sirtuins as novel targets for Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: experimental and genetic evidence. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 11-26. doi: 10.3233/JAD-2010-1215
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1), 1-15. doi: 10.1038/s41389-017-0025-3
- Anderson, D. W., Bradbury, K. A., & Schneider, J. S. (2008). Broad neuroprotective profile of nicotinamide in different mouse models of MPTP-induced parkinsonism. *European Journal of Neuroscience*, 28(3), 610-617. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06356.x
- Aredia, F., & Scovassi, A. I. (2014). Poly (ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical pharmacology*, 92(1), 157-163. doi: 10.1016/j.bcp.2014.06.021
- Ashton, A. C., & Ushkaryov, Y. A. (2005). Properties of synaptic vesicle pools in mature central nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37278-37288. doi: 10.1074/jbc.M504137200
- Bai, F., & Witzmann, F. A. (2007). Synaptosome proteomics. *Subcellular Biochemistry*, 3, 77-98. doi: 10.1007/978-1-4020-5943-8_6
- Bai, P., Canto, C., Oudart, H., Brunyanszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R. H., Schoonjans, K., Schreiber, V., Sauve, A. A., Menissier-de Murcia, J., & Auwerx, J. (2011). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell metabolism*, 13(4), 461-468. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.004

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Bai, P., Nagy, L., Fodor, T., Liaudet, L., & Pacher, P. (2015). Poly (ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(2), 75-83. doi: 10.1016/j.tem.2014.11.003
- Barnham, K. J., & Bush, A. I. (2014). Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chemical Society Reviews*, 43(19), 6727-6749. doi: 10.1039/c4cs00138a
- Bayrakdar, E. T., Armagan, G., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E., & Yalcin, A. (2014). Ex vivo protective effects of nicotinamide and 3-aminobenzamide on rat synaptosomes treated with A β (1–42). *Cell biochemistry and function*, 32(7), 557-564. doi: 10.1002/cbf.3049
- Bayrakdar, E. T., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E., & Yalcin, A. (2012). Neuroprotective effects of PARP-1 inhibitors on the model of Alzheimer's Disease induced by A β (1-42). *Free Radical Biology and Medicine*, 53, S173. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.363
- Belenky, P., Bogan, K. L., & Brenner, C. (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 12-19. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.006
- Bermejo, M. K., Milenkovic, M., Salahpour, A., & Ramsey, A. J. (2014). Preparation of synaptic plasma membrane and postsynaptic density proteins using a discontinuous sucrose gradient. *Journal of Visualized Experiments*, 91, e51896. doi:10.3791/51896
- Bieganowski, P., & Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 117(4), 495-502. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00416-7
- Binder, M. D., Hirokawa, N., & Windhorst U. (2009). *Encyclopedia of Neuroscience*. (9th edition). USA: Academic Press.

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 3(3), 186-191. doi: 10.1016/j.jalz.2007.04.381
- Burkle, A., & Virag, L. (2013). Poly (ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1046-1065. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.010
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021
- Chang, H. C., & Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(3), 138-145. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.001
- Cheng, H., Shang, Y., Jiang, L., Shi, T. L., & Wang, L. (2016). The peroxisome proliferators activated receptor-gamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease and mild-to-moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis. *International Journal of Neuroscience*, 126(4), 299-307. doi: 10.3109/00207454.2015.1015722
- Combs, B., Hamel, C., & Kanaan, N. M. (2016). Pathological conformations involving the amino terminus of tau occur early in Alzheimer's disease and are differentially detected by monoclonal antibodies. *Neurobiology of disease*, 94, 18-31. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.016
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., Casali, B. T., Restivo, J. L., Goebel, W. D., James, M. J., Brunden, K. R., Wilson, D. A., & Landreth, G. E. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*, 335(6075), 1503-1506. doi: 10.1126/science
- Daniels, C. M., Ong, S. E., & Leung, A. K. (2015). The promise of proteomics for the study of ADP-ribosylation. *Molecular cell*, 58(6), 911-924. doi: 10.1016/j.molcel.2015.06.012

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Davis, I., & Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics?. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(7), 719-721. doi: 10.1586/14737175.2015.1049999
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2006). Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 9(2), 167-181. doi: 10.3233/jad-2006-9209
- Demarin, V., Podobnik, S. S., Storga-Tomic, D., & Kay, G. (2004). Treatment of Alzheimer's disease with stabilized oral nicotinamide adenine dinucleotide: a randomized, double-blind study. *Drugs under experimental and clinical research*, 30(1), 27-33. <https://pdfs.semanticscholar.org/6846/559e41ff23bef694d0e6a20592c4f8d0d0c9.pdf>
- De-Paula, V.J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Alzheimer's disease. *Subcellular biochemistry*, 65, 329-352. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_14
- Di Giorgio, A. M., Hou, Y., Zhao, X., Zhang, B., Lyeth, B. G., & Russell, M. J. (2008). Dimethyl sulfoxide provides neuroprotection in a traumatic brain injury model. *Restorative neurology and neuroscience*, 26(6), 501-507. <https://content.iospress.com/articles/restorative-neurology-and-neuroscience/rnn00441>
- Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K., & Delaunoy, J. P. (1981). A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain research*, 226(1-2), 107-118. doi: 10.1016/0006-8993(81)91086-6
- Donmez, G. (2012). The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(9), 494-501. doi:10.1016/j.tips.2012.05.007
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., & Robinson, P. J. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature protocols*, 3(11), 1718. doi: 10.1038/nprot.2008.171
- Evans, G. J. (2015). The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(5), 421-424. doi: 10.1101/pdb.top074450
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G. N., & Radi, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the neurological sciences*, 322(1-2), 254-262. doi: 10.1016/j.jns.2012.05.030
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433. doi: 10.1038/sj.cdd.4401950.
- Ghijssen, W. E., Leenders, A. M., & da Silva, F. H. L. (2003). Regulation of vesicle traffic and neurotransmitter release in isolated nerve terminals. *Neurochemical research*, 28(10), 1443-1452. doi: 10.1023/a:1025606021867
- Ghosal, K., Haag, M., Verghese, P. B., West, T., Veenstra, T., Braunstein, J. B., Bateman, R. J., Holtzman D. M., & Landreth, G. E. (2016). A randomized controlled study to evaluate the effect of bexarotene on amyloid- β and apolipoprotein E metabolism in healthy subjects. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2(2), 110-120. doi: 10.1016/j.trci.2016.06.001
- Glabe, C. (2001). Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17(2), 137-145. doi: 10.1385/JMN:17:2:137
- Gniadecki, R., Assaf, C., Bagot, M., Dummer, R., Duvic, M., Knobler, R., Ranki, A., Schwandt, P., & Whittaker, S. (2007). The optimal use of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma. *British Journal of Dermatology*, 157(3), 433-440. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07975.x

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Green, K. N., Steffan, J. S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S. S., Thompson, L. M., & LaFerla, F. M. (2008). Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *Journal of Neuroscience*, *28*(45), 11500-11510. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3203-08.2008
- Gyls, K. H., Fein, J. A., Yang, F., & Cole, G. M. (2004). Enrichment of presynaptic and postsynaptic markers by size-based gating analysis of synaptosome preparations from rat and human cortex. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *60*(1), 90-96. doi: 10.1002/cyto.a.20031
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical biology & medicine*, *18*(1), 125-126. doi: 10.1016/0891-5849(95)91457-3
- Han, L., Zhou, R., Niu, J., McNutt, M. A., Wang, P., & Tong, T. (2010). SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic acids research*, *38*(21), 7458-7471. doi: 10.1093/nar/gkq609
- Hanslick, J. L., Lau, K., Noguchi, K. K., Olney, J. W., Zorumski, C. F., Mennerick, S., & Farber, N. B. (2009). Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of disease*, *34*(1), 1-10. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.006
- Hlavica, P. (2015). Mechanistic basis of electron transfer to cytochromes p450 by natural redox partners and artificial donor constructs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *851*, 247-297. doi: 10.1007/978-3-319-16009-2_10
- Hroudova, J., Singh, N., & Fisar, Z. (2014). Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *BioMed research international*, *2014*, 175062. doi: 10.1155/2014/175062

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Huy, P. D. Q., Thai, N. Q., Bednarikova, Z., Phuc, L. H., Linh, H. Q., Gazova, Z., & Li, M. S. (2017). Bexarotene does not clear amyloid beta plaques but delays fibril growth: Molecular mechanisms. *ACS chemical neuroscience*, 8(9), 1960-1969. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00107
- Imai, S. I. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Current pharmaceutical design*, 15(1), 20-28. doi: 10.2174/138161209787185814
- Inestrosa, N. C., Godoy, J. A., Quintanilla, R. A., Koenig, C. S., & Bronfman, M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor γ is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents β -amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. *Experimental cell research*, 304(1), 91-104. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.09.032
- Jayaram, H. N., Kusumanchi, P., & Yalowitz, J. A. (2011). NMNAT expression and its relation to NAD metabolism. *Current medicinal chemistry*, 18(13), 1962-1972. doi: 10.2174/092986711795590138
- Jee, J. P., Lim, S. J., Park, J. S., & Kim, C. K. (2006). Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63(2), 134-139. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.12.007
- Johnson, G. V., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of cell science*, 117(24), 5721-5729. doi: 10.1242/jcs.01558
- Julien, C., Marcouiller, F., Bretteville, A., El Khoury, N. B., Baillargeon, J., Hebert, S. S., & Planel, E. (2012). Dimethyl sulfoxide induces both direct and indirect tau hyperphosphorylation. *PloS one*, 7(6), e40020. doi: 10.1371/journal.pone.0040020
- Julien, C., Tremblay, C., Emond, V., Lebbadi, M., Salem Jr, N., Bennett, D. A., & Calon, F. (2009). Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68(1), 48-58. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181922348

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Potapovich, A. I., Kini, V., Amoscato, A. A., & Fujii, Y. (2004). Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(12), 1963-1985. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016
- Kancheva, V. D. (2009). Phenolic antioxidants–radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European journal of lipid science and technology*, *111*(11), 1072-1089. doi: 10.1002/ejlt.200900005
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., & Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *15*(4), 1749-1770. doi: 10.1016/j.bmc.2006.11.037
- Kraus, W. L., & Hottiger, M. O. (2013). PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Molecular aspects of medicine*, *34*(6), 1109-1123. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.005
- Krishnakumar, R., & Kraus, W. L. (2010). The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell*, *39*(1), 8-24. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.017
- Kuntz, M., Candela, P., Saint-Pol, J., Lamartiniere, Y., Boucau, M. C., Sevin, E., Fenart, L., & Gosselet, F. (2015). Bexarotene promotes cholesterol efflux and restricts apical-to-basolateral transport of amyloid- β peptides in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Journal of Alzheimer's Disease*, *48*(3), 849-862. doi: 10.3233/JAD-150469
- Landreth, G., Jiang, Q., Mandrekar, S., & Heneka, M. (2008). PPAR γ agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, *5*(3), 481-489. doi: 10.1038/cddis.2012.189
- Langelier, M. F., Servent, K. M., Rogers, E. E., & Pascal, J. M. (2008). A third zinc-binding domain of human poly (ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *Journal of biological chemistry*, *283*(7), 4105-4114. doi: 10.1074/jbc.M708558200

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 829-838. doi: 10.2174/0929867013372896
- Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X., & Williams, R. S. (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, 101(4), 389-399. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80849-1
- Li, X., & Kazgan, N. (2011). Mammalian sirtuins and energy metabolism. *International journal of biological sciences*, 7(5), 575-587. doi: 10.7150/ijbs.7.575
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Jeanette, G. T., Krieger, M., & Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular cell*, 28(1), 91-106. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.032
- Li, Z., & Sheng, M. (2012). Caspases in synaptic plasticity. *Molecular brain*, 5(1), 15. doi: 10.1186/1756-6606-5-15
- Lindwall, G., & Cole, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5301-5305. <https://www.jbc.org/content/259/8/5301.long>
- Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., & Mattson, M. P. (2009). Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *Neuromolecular medicine*, 11(1), 28-42. doi: 10.1007/s12017-009-8058-1
- Louneva, N., Cohen, J. W., Han, L. Y., Talbot, K., Wilson, R. S., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2008). Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 173(5), 1488-1495. doi: 10.2353/ajpath.2008.080434

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-375. <https://www.jbc.org/content/193/1/265.long>
- Manczak, M., Mao, P., Calkins, M. J., Cornea, A., Reddy, A. P., Murphy, M. P., Szeto, H. H., Park, B., & Reddy, P. H. (2010). Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(2), 609-631. doi: 10.3233/JAD-2010-100564
- Martire, S., Fuso, A., Rotili, D., Tempera, I., Giordano, C., De Zottis, I., Muzi, A., Vernole, P., Graziani, G., Lococo, E., Faraldi, M., Maras, B., Scarpa, S., Mosca, L., d'Erme, M. (2013). PARP-1 modulates amyloid beta peptide-induced neuronal damage. *PLoS One*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0072169
- Masciopinto, F., Di Pietro, N., Corona, C., Bomba, M., Pipino, C., Curcio, M., Di Castelnuovo, A., Ciavardelli, D., Silvestri, E., Canzoniero, L. M., Sekler, I., Pandolfi, A., & Sensi, S. L. (2012). Effects of long-term treatment with pioglitazone on cognition and glucose metabolism of PS1-KI, 3xTg-AD, and wild-type mice. *Cell death & disease*, 3(12), e448. doi: 10.1038/cddis.2012.189
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15056. doi: 10.1038/nrdp.2015.56
- Mattson, M. P. (2012). Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell metabolism*, 16(6), 706-722. doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.012
- Mattson, M. P., & Liu, D. (2002). Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine*, 2(2), 215-231. doi: 10.1385/NMM:2:2:215
- McDade, E., & Bateman, R. J. (2017). Stop Alzheimer's before it starts. *Nature News*, 547(7662), 153-155. doi: 10.1038/547153a

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Moosecker, S., Gomes, P. A., Dioli, C., Yu, S., Sotiropoulos, I., & Almeida, O. F. (2019). Activated PPAR γ abrogates misprocessing of amyloid precursor protein, Tau missorting and synaptotoxicity. *Frontiers in cellular neuroscience*, *13*, 239. doi: 10.3389/fncel.2019.00239
- Morris, B. J. (2013). Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *56*, 133-171. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525
- Morris, J. K., Vidoni, E. D., Honea, R. A., Burns, J. M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2014). Impaired glycemia increases disease progression in mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, *35*(3), 585-589. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.033
- Ng, F., Wijaya, L., & Tang, B. L. (2015). SIRT1 in the brain—connections with aging-associated disorders and lifespan. *Frontiers in cellular neuroscience*, *9*, 64. doi: 10.3389/fncel.2015.00064
- Packer, L. (2002). Highlight: oxidative stress. *Biological chemistry*, *383*(3-4), 345-345. doi: 10.1515/BC.2002.039
- Padurariu, M., Ciobica, A., Lefter, R., Lacramioara Serban, I., Stefanescu, C., & Chirita, R. (2013). The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatria Danubina*, *25*(4), 401-409. http://www.psychiatria-danubina.com/UserDocsImages/pdf/dnb_vol25_no4/dnb_vol25_no4_401.pdf
- Pandya, K. G., Patel, M. R., & Lau-Cam, C. A. (2010). Comparative study of the binding characteristics to and inhibitory potencies towards PARP and in vivo antidiabetogenic potencies of taurine, 3-aminobenzamide and nicotinamide. *Journal of biomedical science*, *17*(1), S16. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S16
- Pham, H. D. Q., Thai, N. Q., Bednarikova, Z., Linh, H. Q., Gazova, Z., & Li, M. S. (2018). Bexarotene cannot reduce amyloid beta plaques through inhibition of production of amyloid beta peptides: in silico and in vitro study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *20*(37), 24329-24338. doi: 10.1039/c8cp00049b

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, *97*, 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Pocernich, C. B., & Butterfield, D. A. (2012). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1822*(5), 625-630. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.10.003
- Pocklington, A. J., Armstrong, J. D., & Grant, S. G. N. (2006). Organization of brain complexity—synapse proteome form and function. *Briefings in Functional Genomics*, *5*(1), 66-73. doi: 10.1093/bfgp/ell013
- Pratico, D. (2008). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends in pharmacological sciences*, *29*(12), 609-615. doi: 10.1016/j.tips.2008.09.001
- Qin, W., Yang, T., Ho, L., Zhao, Z., Wang, J., Chen, L., Zhao, W., Thiyagarajan, M., MacGrogan, D., Rodgers, J. T., Puigserver, P., Sadoshima, J., Deng, H., Pedrini, S., Gandy, S., Sauve, A. A., & Pasinetti, G. M. (2006). Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 21745-21754. doi: 10.1074/jbc.M602909200
- Qu, L., & Tang, X. (2010). Bexarotene: a promising anticancer agent. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *65*(2), 201-205. doi: 10.1007/s00280-009-1140-4
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., & Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease*, *42*(3), 125-152. doi: 10.3233/JAD-132738
- Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M. J., & Valdivieso, F. (2004). A β production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS letters*, *570*(1-3), 114-118. doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.025

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Rhein, V., & Eckert, A. (2007). Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function—Role of glucose metabolism and insulin signalling. *Archives of physiology and biochemistry*, *113*(3), 131-141. doi: 10.1080/13813450701572288
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A., Vercelletto, M., Dubas, F., Frebourg, T., & Campion, D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature genetics*, *38*(1), 24-26. doi: 10.1038/ng1718
- Sanz-Blasco, S., Valero, R. A., Rodriguez-Crespo, I., Villalobos, C., & Nunez, L. (2008). Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PloS one*, *3*(7), e2718. doi: 10.1371/journal.pone.0002718
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B. O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D. R., Landreth, G., Walter, J., Klockgether, T., van Leuven, F., & Heneka, M. T. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress β -secretase gene promoter activity by the activation of PPAR γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(2), 443-448. doi: 10.1073/pnas.0503839103
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Flier, W. M. V. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *388*(10043), 505-517. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1
- Schmitt, K., Grimm, A., Kazmierczak, A., Strosznajder, J. B., Götz, J., & Eckert, A. (2012). Insights into mitochondrial dysfunction: aging, amyloid- β , and tau—a deleterious trio. *Antioxidants & redox signaling*, *16*(12), 1456-1466. doi: 10.1089/ars.2011.4400
- Selkoe, D. J. (1994). Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annual review of neuroscience*, *17*(1), 489-517. doi: 10.1146/annurev.ne.17.030194.002421

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Shahani, N., & Brandt, R. (2002). Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(10), 1668-1680. doi: 10.1007/pl00012495
- Sherman, A. D. (1989). Isolation of metabolically distinct synaptosomes on Percoll gradients. *Neurochemical research*, 14(1), 97-101. doi: 10.1007/bf00969765
- Skerrett, R., Pellegrino, M. P., Casali, B. T., Taraboanta, L., & Landreth, G. E. (2015). Combined liver X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist treatment reduces amyloid β levels and improves behavior in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21591-21602. doi: 10.1074/jbc.M115.652008
- Smith, B. C., Hallows, W. C., & Denu, J. M. (2009). A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Analytical biochemistry*, 394(1), 101-109. doi: 10.1016/j.ab.2009.07.019
- Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M., & Perry, G. (1997). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), 9866-9868. doi: 10.1073/pnas.94.18.9866
- Sokolow, S., Henkins, K. M., Williams, I. A., Vinters, H. V., Schmid, I., Cole, G. M., & Gyls, K. H. (2012). Isolation of synaptic terminals from Alzheimer's disease cortex. *Cytometry Part A*, 81(3), 248-254. Doi: 10.1002/cyto.a.22009
- Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1997). Biochemical characteristics of caspases-3,-6,-7, and-8. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25719-25723. doi: 10.1074/jbc.272.41.25719
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Current opinion in structural biology*, 10(6), 672-679. doi: 10.1016/s0959-440x(00)00147-0

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Strosznajder, J. B., Czapski, G. A., Adamczyk, A., & Strosznajder, R. P. (2012). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 in amyloid beta toxicity and Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 46(1), 78-84. doi:10.1007/s12035-012-8258-9
- Su, B., Wang, X., Nunomura, A., Moreira, P. I., Lee, H. G., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2008). Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 5(6), 525-532. doi: 10.2174/156720508786898451
- Tai, H. C., Wang, B. Y., Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Spire-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 2(1), 146. doi: 10.1186/s40478-014-0146-2
- Tai, L. M., Koster, K. P., Luo, J., Lee, S. H., Wang, Y. T., Collins, N. C., Ben Aissa, M., Thatcher, G. R., & LaDu, M. J. (2014). Amyloid- β pathology and APOE genotype modulate retinoid X receptor agonist activity in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30538-30555. doi: 10.1074/jbc.M114.600833
- Tang, B. L., & Ng, F. (2013). When is Sirt1 activity bad for dying neurons?. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 186. doi:10.3389/fncel.2013.00186
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6823-6832. doi: 10.1074/jbc.M609554200
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231-241. doi: 10.1038/nrm2312
- Tenreiro, P., Rebelo, S., Martins, F., Santos, M., Coelho, E. D., Almeida, M., Matos, A. A. D., & e Silva, O. D. C. (2017). Comparison of simple sucrose and percoll based methodologies for synaptosome enrichment. *Analytical biochemistry*, 517, 1-8. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.015

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Torres, L. L., Quaglio, N. B., de Souza, G. T., Garcia, R. T., Dati, L. M. M., Moreira, W. L., Loureiro, A. P., de Souza-Talarico, J. N., Smid, J., Porto, C. S., Bottino, C. M., Nitrini, R., Barros, S. B., Camarini, R., & Marcourakis, T. (2011). Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *26*(1), 59-68. doi: 10.3233/JAD-2011-110284
- Tunctan, B., Kucukkavruk, S. P., Temiz-Resitoglu, M., Guden, D. S., Sari, A. N., & Sahan-Firat, S. (2018). Bexarotene, a selective RXR α agonist, reverses hypotension associated with inflammation and tissue injury in a rat model of septic shock. *Inflammation*, *41*(1), 337-355. doi: 10.1007/s10753-017-0691-5
- Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, *12*(10), 1161-1208. doi: 10.2174/0929867053764635
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal of Neuroscience*, *25*(1), 59-68. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x
- Wang, P., Li, B., Cai, G., Huang, M., Jiang, L., Pu, J., Li, L., Wu, Q., Zuo, L., Wang, Q., & Zhou, P. (2014). Activation of PPAR- γ by pioglitazone attenuates oxidative stress in aging rat cerebral arteries through upregulating UCP2. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *64*(6), 497-506. doi: 10.1097/FJC.000000000000143
- Whittaker, V. P. (1993). Thirty years of synaptosome research. *Journal of neurocytology*, *22*(9), 735-742. doi: 10.1007/BF01181319
- Whittaker, V. P., Michaelson, I., & Kirkland, R. J. A. (1964). The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles (synaptosomes). *Biochemical Journal*, *90*(2), 293. doi: 10.1042/bj0900293
- Yan, M. H., Wang, X., & Zhu, X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *62*, 90-101. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014

“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Yonutas, H. M., & Sullivan, P. G. (2013). Targeting PPAR isoforms following CNS injury. *Current drug targets*, 14(7), 733-742. doi: 10.2174/1389450111314070003
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 316523. doi: 10.1155/2013/316523
- Zhong, S. Z., Ge, Q. H., Li, Q., Qu, R., & Ma, S. P. (2009). Peoniflorin attenuates A β (1–42)-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 280(1-2), 71-78. doi: 10.1016/j.jns.2009.01.027
- Zhu, X. H., Lu, M., Lee, B. Y., Ugurbil, K., & Chen, W. (2015). In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(9), 2876-2881. doi: 10.1073/pnas.1417921112
- Zoete, V., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 915-925. doi: 10.1016/j.bbalip.2007.01.007

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Ceyhan HACIOĞLU

Doğum tarihi ve yeri: 19.08.1989 / Kırcaali

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresleri: Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

Eğitim Durumu

1995-2003 Barbaros İlköğretim Okulu

2003-2006 Anadolu Çınar Lisesi

2008-2013 Ege Üniversitesi Lisans Eğitimi

2013-2015 Anadolu Üniversitesi Yüksek Lisans Eğitimi

2015-2020 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Doktora Eğitimi

Yabancı Dil: İngilizce – YDS 78,25

Mesleki Deneyim: Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Görevlisi
2015 – Devam ediyor

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Türk Biyokimya Derneği

Yayınlar:

Hacioglu C, Kar F, Kanbak G. Chronic mercury exposure: oxidative stress and neurotoxicity. *Biological Diversity and Conservation*. 2017; 10(3):58-64.

Hacioglu C, Kanbak G. The relationship between glutamatergic and serotonergic receptors of neuroapoptotic cell death pathways in fetal alcohol syndrome. *FNG & Bilim Tıp Dergisi*. 2017; 3(4):125-131. doi: 10.5606/fng.btd.2017.026.

Hacioglu C, Kar F, Kanbak G. Rat brain synaptosomes: In vitro neuroprotective effects of betaine against fluoride toxicity. *Medical Science and Discovery*. 2018; 5(5):192-7. doi: 10.17546/msd.421851.

Senturk H, Kar F, Hacioglu C, Kanbak G. Renal İskemi-Reperfüzyon ile İndüklenmiş Oksidatif Stres Hasarının Pankreas Üzerine Etkisi: Doza Bağımlı Borik Asidin Rolü. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*. 2018; 21(6):944-949. doi:10.18016/ksutarimdog.vi.430369.

Hacioglu C, Kar F, Senturk H, Kanbak G. Neuroprotective Effects of Boric Acid against Fluoride Toxicity on Rat Synaptosomes. *Medical Science and Discovery*. 2018; 5(7):260-66. doi: 10.17546/msd.443140Received12.

Akyuz F, Kara Y, Kar F, Hacioglu C, Donmez DB. Protective Effect of Vitamin E and N-Nitro L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) on Cigarette Induced Kidney Damage. *Turk J Life Sci*. 2018; 3:205-209.

Kar F, Hacioglu C, Kiraz ZK, Uslu S, Kanbak G. Eskişehir'deki Psikiyatrik Hastalarda Folat ve B12 Vitamin Seviyelerinin Değerlendirilmesi. *Turk J Life Sci*. 2018; 3:210-213.

Hacioglu C, Kar F, Senturk H, Kanbak G. Effects of boric acid on electrolyte balance and lipid profile against renal ischemia/reperfusion injury. *Biological Diversity and Conservation*. 2018; 11(2):76-81.

Kar F, Hacioglu C, Ozkoc M, Ustunısık N, Butun A, Uslu S, Kanbak G. The New Perspective Neuroprotective Effect Of Boric Acid Against Ethanol-Induced Oxidative Damage On Synaptosome. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2018; 12(2):28-33.

Kar F, Hacioglu C, Kacar S, Sahinturk V, Kanbak G. Betaine suppresses cell proliferation by increasing oxidative stress-mediated apoptosis and inflammation in DU-145 human prostate cancer cell line. *Cell Stress Chaperones*. 2019; 24(5):871-881. doi: 10.1007/s12192-019-01022-x.

Kar F, Cihaner O, Hacıoglu C, Kanbak G. Autism: Evaluation of psychological, biochemical and environmental factors. *BioDiCon*. 2019; 12(2):206-212. doi: 10.5505/biodicon.2019.47450

Kar F, Hacıoglu C, Uslu S, Kanbak G. Curcumin Acts as Post-protective Effects on Rat Hippocampal Synaptosomes in a Neuronal Model of Aluminum-Induced Toxicity. *Neurochem Res*. 2019; 44(8):2020-2029. doi: 10.1007/s11064-019-02839-9.

Hacıoglu C, Kar F, Kacar S, Sahinturk V, Kanbak G. High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 193(2):400-409. doi: 10.1007/s12011-019-01739-x.

Kacar S, Kar F, Hacıoglu C, Kanbak G, Sahinturk V. The effects of L-NAME on DU145 human prostate cancer cell line: A cytotoxicity-based study. *Hum Exp Toxicol*. 2020; 39(2):182-193. doi: 10.1177/0960327119880591.

Kar F, Hacıoglu C, Senturk H, Donmez DB, Kanbak G. The Role of Oxidative Stress, Renal Inflammation, and Apoptosis in Post Ischemic Reperfusion Injury of Kidney Tissue: the Protective Effect of Dose-Dependent Boric Acid Administration. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 195(1):150-158. doi: 10.1007/s12011-019-01824-1.

Hacıoglu C, Kacar S, Kar F, Kanbak G, Sahinturk V. Concentration-Dependent Effects of Zinc Sulfate on DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line: Oxidative, Apoptotic, Inflammatory, and Morphological Analyzes. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 195(2):436-444. doi: 10.1007/s12011-019-01879-0.

Kar F, Hacıoglu C, Goncu Y, Sogut I, Senturk H, Donmez DB, Kanbak G, Ay N. In Vivo Assessment of the Effect of Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles on Biochemical, Histopathological, Oxidant and Antioxidant Status. 2020; 10:55:45. doi: 10.1007/s10876-020-01811-w.

Kitap Bölümü:

Hacioglu C, Kar F. Potential Treatment Strategies and Therapeutic Agents in Alzheimer's Disease. In Current Academic Studies in Health Sciences-2018, Ivpe, 2018, pp. 29-38.

Kar F, Hacioglu C. Depresyonda Yeni Yaklaşımlar: Biyobelirteçler Ve Hayvan Modellemeleri. In Current Academic Studies in Health Sciences-2018, Ivpe, 2018, pp. 57-68.

Projeler:

ESOGÜ BAP 201911E01 nolu proje “Prenatal Dönemde Bağırsak Mikrobiyotasının Korunmasının Nörodejeneratif ve Alzheimer Yatkınlığı Üzerine Etkileri” 15.03.2019 – Devam Ediyor.

Eskişehir Teknik Üniversitesi BAP destekli proje “Sıçanlarda ntravenöz hBN uygulanması le meydana gelen byokmyasal ve hstopatolojik etklern araştırılması” 14.05.2020 tarihinde tamamlandı.

ESOGÜ BAP 201811D21 nolu proje “Aß (1-42) ile Muamele Edilmiş Sıçan Sinaptozomları Üzerinde Koruyucu Ajan Olarak Bexarotene ve Nikotinamid (NA) Fonksiyonunun Ex Vivo Olarak Araştırılması” 11.06.2019 tarihinde tamamlandı.

ESOGÜ BAP 201819D14 nolu proje “Renal İskemi Reperfüzyon ile İndüklenmiş Oksidatif Stress Hasarına Karşı Borik Asidin Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” 09.05.2019 tarihinde tamamlandı.

Kurslar ve Eğitim Programları:

11-22 Mart 2019 Düzce Üniversitesi 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifika Programı – Eğitici